

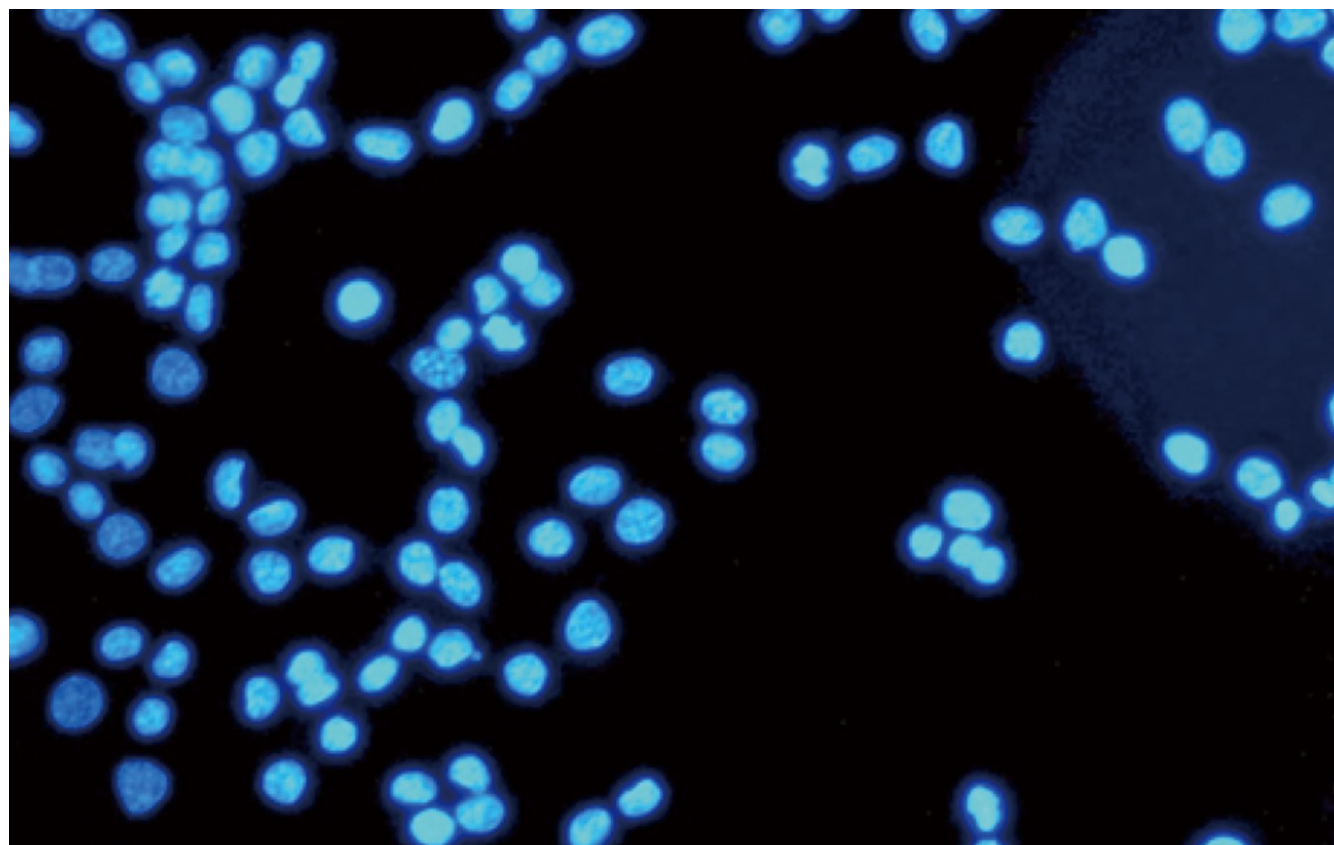
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

## WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2011年7月18日 第19卷 第20期 (Volume 19 Number 20)



# 20/2011

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcj@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

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

### 常务编委

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

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
栾新明教授  
陈国忠副主任医师  
陈洪副教授  
陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌教授  
迟宝荣教授  
崔立红教授

邓长生教授  
丁士刚教授  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
樊晓明主任医师  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师

高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
关晓辉主任医师  
郭晓钟教授  
郝建宇教授

何松教授  
洪天配教授  
侯晓华教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
霍丽娟教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
姜相君主任医师

金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
廖家智副主任医师

林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘海林主任医师

刘铁夫教授  
刘莹副主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
吕志武教授  
马红主任医师  
马欣主任医师

毛高平教授

孟庆华教授  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵先玉教授

沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
宋于刚教授

唐世刚教授  
田宇彬教授  
宛新建副教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
王俊平教授  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授

许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师

张晓岚教授  
张筱茵副教授  
张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师

周国雄主任医师  
周晓东副教授  
周宇教授  
朱春兰主任医师  
邹晓平主任医师

诸琦教授  
于珮主任医师  
**消化外科学**  
白雪巍副主任医师

蔡开琳副教授  
蔡三军主任医师  
曹杰主任医师  
陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈力教授  
陈立波教授  
陈凜教授

陈强谱教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师

程树群副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
董明教授  
杜成友教授  
杜顺达副主任医师  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师

高成新教授  
葛海燕教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾国利副主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师

郝立强副教授  
何超教授  
何晓顺教授  
何裕隆教授  
黄志勇教授  
季加孚教授  
荚卫东教授  
姜波健教授

蒋龙元副教授  
金山副教授  
黎乐群教授  
李革副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师

李杰教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李涛副主任医师  
李文岗教授  
李小荣教授  
李旭副教授  
李永翔主任医师  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
刘宝林教授  
刘超副教授  
刘建教授  
刘颖斌主任医师  
卢实春教授  
陆才德教授  
陆云飞教授  
禄韶英副主任医师  
吕明德教授  
吕云福教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
齐清会教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民副主任医师  
邱宝安主任医师  
邱双健副教授  
邱伟华副主任医师  
仇毓东副教授  
裘正军教授  
单云峰副主任医师  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
施宝民教授  
施诚仁教授  
施晓雷副主任医师  
石毓君研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
谭晓冬教授  
汤朝晖副主任医师  
汤恢焕教授  
汤绍涛教授  
唐南洪教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

汪根树副教授  
王春友教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王广义教授  
王健生教授  
王鲁副教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王悦华副主任医师  
王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴河水教授  
吴健雄教授  
吴金术教授  
吴泰璜教授  
吴志勇教授  
伍晓汀教授  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师  
徐迅迪教授  
徐泱副主任医师  
许戈良教授  
许剑民教授  
薛东波教授  
严律南教授  
杨柏霖副主任医师  
杨桦教授  
杨家和主任医师  
杨维良教授  
杨银学教授  
杨尹默教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
禹正杨副教授  
郁宝铭教授  
元云飞教授  
张必翔主任医师  
张宏伟教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张力为副教授  
张群华教授  
张水军教授  
张宗明教授  
赵刚副教授

智绪亭教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈仕珠主任医师  
陈志辉副主任医师  
党双锁教授  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
高润平教授  
高泽立副教授  
高志良主任医师  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
郝春秋副教授  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
靳雪源副主任医师  
林菊生教授  
刘正稳教授  
宁琴教授  
牛俊奇教授  
钱林学主任医师  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
唐晓鹏教授  
王凯教授  
王怡主任医师  
魏来教授  
吴建国教授  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副教授  
杨林副研究员  
姚鹏副教授  
张继明教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵连三教授  
赵秀英副教授  
周霞秋教授  
朱传武教授  
庄林主任医师

### 消化中医学

蔡淦教授

陈治水主任医师  
杜群副研究员  
黄恒青主任医师  
李军祥教授  
李康副教授  
李晓波教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员  
刘平教授  
刘绍能主任医师  
龙致贤教授  
南极星教授  
牛英才研究员  
沈洪教授  
司富春教授  
唐志鹏研究员  
王富春教授  
王新月教授  
邢建峰副教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
徐庆教授  
袁红霞研究员  
张声生教授

### 消化肿瘤学

曹秀峰教授  
曹志成院士  
陈公琰主任医师  
陈克能教授  
代智副研究员  
华海清教授  
李瑗教授  
刘宝瑞教授  
刘彬彬副研究员  
刘云鹏教授  
秦叔逵教授  
沈克平主任医师  
王阁教授  
向德兵副教授  
肖文华主任医师  
谢丹教授  
熊斌教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授  
韩新巍教授  
胡红杰主任医师  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师

倪才方教授  
施海彬教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐辉雄教授  
徐克教授  
严惟力副教授  
杨业发教授  
杨建勇教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授  
郝俊鸣副主任医师  
茅爱武教授  
潘林娜教授  
孙明军教授  
万军教授  
吴硕东教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
杨钦河教授  
张春虎副教授

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员  
曹师承教授  
陈敬贤教授  
陈秋生教授  
陈志龙教授  
崔莲花副教授  
樊红教授  
高春芳研究员  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
何敏教授  
黄昆教授  
黄文林教授  
黄园教授  
李东辉教授  
李刚教授  
李杰副教授  
李君文研究员  
李永哲副研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
刘森副教授

梅林教授  
钱其军研究员  
钱睿哲教授  
任超世研究员  
任浩副教授  
任晓峰副教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
田文静副教授  
田颖刚副研究员  
汪思应教授  
王钦红教授  
魏继福副研究员  
吴道澄教授  
吴军研究员  
吴俊华副教授  
徐宁志研究员  
许文燮教授  
姚登福教授  
阴赓宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授  
周晓东研究员  
周晓武副主任医师  
朱进霞教授

### 消化病理学

杜祥教授  
季菊玲副教授  
李淳副教授  
李晟磊副主任医师  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
吕宁主任医师  
马大烈教授  
门秀丽教授  
潘兴华副主任医师  
孙伟副研究员  
王鲁平主任医师  
王娅兰教授  
颜宏利副教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵春玲副教授  
赵景民教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011年7月18日 第19卷 第20期 (总第352期)

述 评	2091 胰腺癌免疫治疗的研究现状 吴应冬, 周国雄
基础研究	2097 ERK1/2信号通路阻断剂PD98059对胃癌细胞MGC-803中RECK、MMP-9基因表达的影响 黄靓, 李国庆, 毛振江, 钟鹰, 殷清华 2104 ENT1在人肝癌细胞中的表达特征及临床意义 蒋星星, 傅华群, 巢映辉, 刘征宇 2109 Conophylline联合Betacellulin- $\delta$ 4对胎猪导管源胰腺干细胞体外诱导分化的促进作用 黄跃南, 郭欣
临床研究	2116 DKK1在食管癌组织中的表达及其生物学功能 李书军, 和宇峥, 吕宝雷, 牛秀兰, 崔爱荣 2123 GRIM-19在肝细胞癌组织中的表达及临床意义 赵延大, 李菲菲, 任万华, 秦成勇 2128 LRP-5、LRP-6在溃疡性结肠炎相关癌组织中表达的临床意义 党彤, 田旭阳, 李慧艳, 陈言东, 孔洁, 杨莉
文献综述	2133 丙型肝炎病毒感染机制的相关研究进展 杨文祥, 熊威, 杨洁, 樊柏林 2141 骨髓间充质干细胞治疗急性肝衰竭的研究进展 范敬静, 李东良 2146 细胞因子与内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎关系的研究进展 李荣, 韩真 2153 内镜在溃疡性结肠炎诊治中的作用 牛俊坤, 缪应雷 2160 膜联蛋白A1与消化系肿瘤关系的研究进展 张晓娜, 张学彦, 曹秀红
研究快报	2166 NF- $\kappa$ B和RBP-J $\kappa$ 在大鼠肝再生过程中的作用及苦参碱的调节机制 杨志云, 王莉, 侯艺鑫, 王宪波
临床经验	2171 COX-2与GCS在胃癌组织中的表达及意义 王俊先, 张开光, 李诚, 李祥春, 王晓秋, 丁敏 2176 香菇多糖增强DCF方案治疗晚期胃癌40例 伍海鹰, 陈一明, 林龙, 林友刚, 邱庆安, 刘宁 2181 胃的胃肠间质瘤114例 张鹏, 陶凯雄 2185 经皮内镜胃造瘘患者的循证治疗 刘启胜, 董卫国

<b>病例报告</b>	2190 经胃内镜肝囊肿开窗术治疗肝囊肿1例 陈世耀, 曾晓清, 马丽黎, 高虹, 王剑, 周平红, 徐美东, 王萍, 王红美, 姚礼庆
<b>附 录</b>	2194 《世界华人消化杂志》投稿须知 2199 2011年国内国际会议预告
<b>志 谢</b>	2200 志谢世界华人消化杂志编委
<b>消 息</b>	2103 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 2108 WJG总被引频次排名位于第174名 2122 招聘生物医学编辑部主任 2145 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2152 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2159 《世界华人消化杂志》正文要求 2165 《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》 2170 百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和PMC收录 2175 《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》 2180 WJG成功通过评审被PMC收录 2193 《世界华人消化杂志》栏目设置
<b>封面故事</b>	李书军, 和宇峥, 吕宝雷, 牛秀兰, 崔爱荣. DKK1在食管癌组织中的表达及其生物学功能. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2116-2122 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2116.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2116.asp</a>
<b>本期责任人</b>	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 张洋, 李薇; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

# 世界华人消化杂志

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2011-07-18

原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣

总 编 辑 马连生

编辑部主任 李军亮

期 刊 名 称 世界华人消化杂志

主 管 单 位 山西省科学技术厅

主 办 单 位 太原消化病防治中心

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

E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

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

E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

**印刷** 北京科信印刷厂

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

**订购** 全国各地邮电局

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

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

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

### 特别声明

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

2011年版版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)** 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证  
CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期56.00元 全年2016.00元 1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# World Chinese Journal of Digestology

**July 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 20**

<b>EDITORIAL</b>	2091 Recent advances in immunotherapy for human pancreatic cancer <i>Wu YD, Zhou GX</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	2097 Effect of the ERK1/2 kinase inhibitor PD98059 on the expression of RECK and MMP-9 in human gastric cancer cell line MGC-803 <i>Huang L, Li GQ, Mao ZJ, Zhong Y, Yin QH</i> 2104 Expression characteristics of ENT1 in human hepatocellular carcinoma cells <i>Jiang XX, Fu HQ, Chao YH, Liu ZY</i> 2109 Alkaloid conophylline in combination with betacellulin- $\delta$ 4 promotes the differentiation of fetal porcine pancreatic duct stem cells <i>Huang YN, Guo X</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	2116 Expression and biological role of DKK1 in human esophageal cancer <i>Li SJ, He YZ, Lv BL, Niu XL, Cui AR</i> 2123 Clinical significance of GRIM-19 expression in hepatocellular carcinoma <i>Zhao YD, Li FF, Ren WH, Qin CY</i> 2128 Expression of LRP-5 and LRP-6 in ulcerative colitis-associated cancer <i>Dang T, Tian XY, Li HY, Chen YD, Kong J, Yang L</i>
<b>REVIEW</b>	2133 Mechanism of hepatitis C virus infection <i>Yang WX, Xiong W, Yang J, Fan BL</i> 2141 Bone marrow mesenchymal stem cells as a treatment for acute liver failure <i>Fan JJ, Li DL</i> 2146 Advances in understanding the role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography <i>Li R, Han Z</i> 2153 Endoscopic diagnosis and treatment of ulcerative colitis <i>Niu JK, Miao YL</i> 2160 Advances in understanding the relationship between annexin A1 and gastrointestinal cancer <i>Zhang XN, Zhang XY, Cao XH</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	2166 Matrine promotes hepatic regeneration by negatively regulating the Notch-RBP-J $\kappa$ -NF- $\kappa$ B signal pathway in rats <i>Yang ZY, Wang L, Hou YX, Wang XB</i>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	2171 Significance of expression of COX-2 and GCS in gastric cancer <i>Wang JX, Zhang KG, Li C, Li XC, Wang XQ, Ding M</i> 2176 Lentinan enhances the efficacy of the DCF regimen in patients with advanced gastric cancer: an analysis of 40 cases <i>Wu HY, Chen YM, Lin L, Lin YG, Qiu QA, Liu N</i> 2181 Gastric gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 114 cases <i>Zhang P, Tao KX</i>

	2185 Evidence-based treatment by percutaneous endoscopic gastrostomy <i>Liu QS, Dong WG</i>
<b>CASE REPORT</b>	2190 Transgastric endoscopic fenestration of a hepatic cyst: a report of one case <i>Chen SY, Zeng XQ, Ma LL, Gao H, Wang J, Zhou PH, Xu MD, Wang P, Wang HM, Yao LQ</i>
<b>APPENDIX</b>	2194 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 2199 Meeting events calendar in 2011
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	2200 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<i>Li SJ, He YZ, Lv BL, Niu XL, Cui AR.</i> Expression and biological role of DKK1 in human esophageal cancer. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2011; 19(20): 2116-2122 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2116.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2116.asp</a>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Yang Zhang, Wei Li</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Wei Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993  
Renamed on January 25, 1998  
Publication date July 18, 2011

#### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

#### RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

#### SPONSOR

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

#### EDITING

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

#### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

#### PUBLISHING

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

#### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

#### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

#### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

#### SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

#### SUBSCRIPTION

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

#### CSSN

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

#### COPYRIGHT

© 2011 Published by *WCJD*. All rights re-  
served; no part of this publication may be  
reproduced, stored in a retrieval system, or  
transmitted in any form or by any means,  
electronic, mechanical, photocopying, re-  
cording, or otherwise without the prior per-  
mission of *WCJD*. Authors are required to  
grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

#### SPECIAL STATEMENT

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

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2011 by Editorial Department  
of *World Chinese Journal of Digestology*

# 胰腺癌免疫治疗的研究现状

吴应冬, 周国雄

吴应冬, 周国雄, 南通大学附属医院消化科 江苏省南通市 226001

周国雄, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事胰腺疾病的基础与临床研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81072028

作者贡献分布: 本文写作吴应冬完成; 周国雄审核.

通讯作者: 周国雄, 教授, 主任医师, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化科.

zhouguoxiong@medmail.com.cn

电话: 0513-81161826

收稿日期: 2011-03-31 修回日期: 2011-06-27

接受日期: 2011-07-05 在线出版日期: 2011-07-18

## Recent advances in immunotherapy for human pancreatic cancer

Ying-Dong Wu, Guo-Xiong Zhou

Ying-Dong Wu, Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072028

Correspondence to: Professor Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. zhouguoxiong@medmail.com.cn

Received: 2011-03-31 Revised: 2011-06-27

Accepted: 2011-07-05 Published online: 2011-07-18

## Abstract

Pancreatic cancer is one of the common highly malignant digestive system tumors. It is associated with a high mortality rate because of early metastasis, low resection rate and poor chemoradiotherapy response. Advances in immunology, such as tumor antigen, immunological surveillance, immunological evasion, immunological tolerance, T cell signal transduction, regulation of cytokines and regulatory DCs, down-regulation of co-stimulatory molecules, and tumor microenvironment, have enriched our knowledge and promoted the development of immunotherapy for pancreatic cancer. In this paper, we will review the recent advances in immunotherapy for pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Immunotherapy; Recent advances

Wu YD, Zhou GX. Recent advances in immunotherapy

for human pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2091-2096

## 摘要

胰腺癌是常见的恶性程度较高的消化系统肿瘤之一, 转移早、手术切除率低、放化疗效果差、死亡率极高. 近年来对肿瘤免疫机制的研究有了很大的进展. 人们对肿瘤抗原、免疫监视、免疫逃避、免疫耐受、T淋巴细胞信号转导、细胞因子以及抑制性树突状细胞(DCs)的调节、共刺激分子的下调、肿瘤微环境有了一定的认识, 推动了胰腺癌免疫治疗的发展, 并在实验室和临床应用中取得了较大的进展, 本文主要介绍胰腺癌的免疫治疗进展.

关键词: 胰腺癌; 免疫治疗; 现状

吴应冬, 周国雄. 胰腺癌免疫治疗的研究现状. *世界华人消化杂志* 2011; 19(20): 2091-2096

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2091.asp>

## 0 引言

胰腺癌是常见的恶性程度较高的消化系统肿瘤之一, 其发病率在全球呈逐年上升趋势, 由于缺乏有效的早期诊断及治疗手段, 预后极差. 近几年来对肿瘤免疫机制的研究有了很大的进展, 人们对肿瘤抗原、免疫监视、免疫逃避、免疫耐受、T淋巴细胞信号转导、细胞因子以及调节性树突状细胞(dendritic cells, DCs)的调节、共刺激分子的下调及肿瘤微环境有了一定的认识<sup>[1-6]</sup>. 基于对胰腺癌免疫的认识, 针对免疫调节的关键位点, 人们对胰腺癌的免疫治疗进行了探索, 并且在实验室和临床应用中取得了较大的进展.

## 1 被动免疫

1.1 单克隆抗体 杂交瘤技术的发展使单克隆抗体的广泛运用成为可能, 通过作用于信号通路或与抗体偶联的偶联物, 如毒素或放射性同位素来杀伤肿瘤. 单克隆抗体可以单独运用, 也可以与其他放化疗同时运用. 单克隆抗体的作用机制包括对相应的功能蛋白特异性阻断、抗体

## ■背景资料

肿瘤免疫治疗的目的是激发或调动机体的免疫系统, 增强肿瘤微环境抗肿瘤免疫力, 从而控制和杀伤肿瘤细胞. 近几年来随着免疫学、分子生物学与基因工程技术的发展, 肿瘤免疫治疗已成为继手术和放、化疗之后肿瘤治疗的第4种模式.

## ■同行评议者

宣世英, 教授, 山东省青岛市市立医院肝病内科; 陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

## ■ 研发前沿

目前肿瘤的免疫治疗研究正成为热点。胰腺癌的免疫治疗改变了传统的思路,通过增强肿瘤特异性抗原的免疫原性,诱发机体的抗肿瘤免疫应答,使胰腺癌的免疫治疗更具有挑战。

依赖的细胞介导的细胞毒性作用、补体依赖的细胞毒作用、生长抑制、凋亡、对肿瘤细胞的靶向放化疗、加强DCs对抗原的处理和递呈等,目前已有很多针对胰腺癌单克隆抗体的实验室和临床研究的评估<sup>[7]</sup>。MORAb-009是抗间皮蛋白的一种单克隆抗体,间皮蛋白是一种肿瘤高表达的表面黏附蛋白,一期临床在检测安全性、剂量依赖性毒性和最大中毒剂量时,显示了很高的安全性。所有肿瘤患者中包括胰腺癌24例,有11例病情得到了稳定,目前二期临床试验正在进行中<sup>[8]</sup>。Mapatumumab为抗肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)受体1蛋白的人单克隆抗体,可诱导表达TRAIL-受体1蛋白的人肿瘤细胞凋亡,因此具有广泛的抗肿瘤活性。Stadel等<sup>[9]</sup>研究表明,Mapatumumab联合凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)抑制剂可诱导大多数的胰腺肿瘤细胞系的凋亡。Erlotinib为抗表皮生长因子受体酪氨酸激酶的单克隆抗体,2007年加拿大国家临床试验小组运用Erlotinib联合吉西他滨对569例晚期胰腺癌患者的随机双盲的三期临床试验表明,Erlotinib联合吉西他滨相对于安慰剂联合吉西他滨组能明显提高患者的生存率,并具有较低的不良反应,推荐剂量为100 mg/d<sup>[10]</sup>。

1.2 T淋巴细胞回输过继免疫治疗 T淋巴细胞在肿瘤免疫中是特异性识别和溶解肿瘤细胞的效应细胞,在体外运用IL-2非特异性扩增淋巴细胞,或肿瘤浸润淋巴细胞的体外扩增,或利用特殊的细胞因子诱导外周血单个核细胞产生效应细胞,绕过肿瘤患者体内免疫功能障碍的各种机制,直接回输到患者体内,发挥抗癌作用<sup>[11-13]</sup>。Kondo等<sup>[14]</sup>运用患者外周血分离的贴壁细胞和悬浮细胞分别诱导出MUC1修饰的DCs疫苗和对MUC1敏感的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocytes, CTLs),回输到患者体内,结果证实对胰腺癌是可行和有效的。Kawaoka等<sup>[15]</sup>从患者外周血中提取单个核细胞与灭活的胰腺癌细胞YPK-1共同培养3 d,再加入IL-2培养7 d,诱导出MUC1特异性CTLs。在体外,对表达MUC1的胰腺癌和乳腺癌细胞具有杀伤作用,对不表达MUC1的肿瘤细胞则表现为低杀伤作用。在临床上,用对MUC1敏感的CTLs对28例胰腺癌患者进行治疗,结果表明CTLs过继免疫治疗可以有效减少转移复发,提高中位生存率,且具有较高的安全性,特别是对手术切除后的患者。日本学

者Imai等<sup>[16]</sup>对一例52岁已有肝转移的胰腺癌患者运用吉西他滨联合MUC1-DC疫苗和抗CD3激活的T淋巴细胞回输,24 wk后,CT和MRI检查显示该患者得到了完全缓解。临床研究表明,自体回输高选择性的肿瘤反应性的T淋巴细胞可以引起肿瘤的消退,但要常规应用到临床进行肿瘤的治疗,还有很多的困难,如何常规扩大有活性的肿瘤特异性T淋巴细胞的数量;如何延长回输后淋巴细胞的作用持续时间;如何在体内创造免疫抑制的环境以利于回输细胞发挥最大的作用;如何可重复生产特异性T淋巴细胞;如何让淋巴细胞富集到肿瘤部位等。目前,运用基因工程技术,转染表达特异性T淋巴细胞受体的基因来产生所需要的T淋巴细胞,利用转基因技术,让T淋巴细胞表达相关趋化因子受体,有利于向肿瘤位点的富集,运用药物如环磷酰胺使机体处于免疫抑制状态或减少机体淋巴细胞,有利于回输淋巴细胞的生长和活化,增强抗肿瘤效率<sup>[17]</sup>。这些方法在一定的程度上提高了T淋巴细胞回输过继免疫治疗的效果。

## 2 主动免疫治疗

2.1 全细胞疫苗 要诱导肿瘤特异性的T淋巴细胞反应就需要知道确切的肿瘤特异性的抗原,由于目前对肿瘤特异性抗原知之甚少,肿瘤特异性疫苗的应用受到了限制。全细胞疫苗将肿瘤细胞本身作为抗原就绕过这个问题。肿瘤细胞经过辐射或其他的处理,让其失去增殖能力而保留其免疫原性。当他们被体内DCs摄取后促进T淋巴细胞活化。由于对一种肿瘤细胞系而言,他们具有绝大部分的相同的肿瘤抗原,专职抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs)在MHC限制下递呈免疫抗原给特异性T淋巴细胞是由宿主驱使的,因此疫苗细胞可以是自体肿瘤细胞,也可以是同种异体肿瘤细胞,只要疫苗细胞能够趋化APCs并释放细胞蛋白即肿瘤抗原,被APCs摄取就能引起充分的有效的免疫反应。研究表明仅仅瘤苗细胞或瘤苗细胞和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)分别注入患者体内作用有限,不是没有足够的具有免疫原性的肿瘤抗原,而是因为免疫系统不能对这些抗原起恰当的反应。人们认识到在肿瘤局部的刺激性细胞因子的存在,对促进免疫反应和吸引免疫细胞是很重要的<sup>[18]</sup>。GM-CSF是一种强大的细胞因子,能够引起CD4和CD8依赖性系

统性免疫反应, 另外GM-CSF可以由激活的CD4<sup>+</sup>淋巴细胞产生, 预示他可能在免疫效应细胞形成过程中发挥作用. 进一步是研究表明, GM-SCF的分泌必须在肿瘤抗原的相关部位保持高水平. Laheru等<sup>[19]</sup>运用GM-CSF修饰的同种异体胰腺癌细胞(CG8020/CG2505)免疫晚期胰腺癌患者, 第1组患者30例, 单独运用最大剂量的疫苗, 第2组20例患者, 在免疫接种前给予环磷酰胺, 结果表明两组均具有较低的毒性, 第1组和第2组的中位生存率分别为2.3和4.3 mo, 并且检测到间皮素特异性T淋巴细胞反应. 同样, Lutz等<sup>[20]</sup>进行的单中心二期临床研究表明, 在对60例胰腺癌手术后患者进行GM-CSF分泌性肿瘤细胞疫苗接种加5-FU为基础的放化疗后, 中位生存率为24.8 mo, 同时检测到了间皮素特异性CD8<sup>+</sup>淋巴细胞, 展示了良好的前景. 目前同种异体全细胞疫苗是多基于GM-CSF修饰的肿瘤疫苗(GM-CSF gene modified tumor vaccine, GVAX)平台的, 这种疫苗可以进行大规模的工厂生产和商业运用, 产品的连续性和特征性可以得到很好的控制, 更重要的是可以召集更多的患者进行临床研究, 在没有肿瘤细胞可以收集的情况下同样可以治疗. 因此基于这种GM-SCF分泌的同种异体全细胞疫苗的各种肿瘤疫苗得到了广泛的临床研究, 并取得了很好的效果, 观察到的不良反应也在可耐受的范围内.

**2.2 多肽疫苗** 多肽疫苗是基于对B淋巴细胞和T淋巴细胞表位的认识, 化学合成肿瘤相关蛋白中具有免疫优势并可能诱导特异性免疫反应的表位肽用于免疫治疗, 越来越多的对抗原分子水平的认识促进了多肽疫苗的发展. 与传统的疫苗相比具有很多的优势, 特别是生产的安全性、简单性以及化学的稳定性. 相对于其他抗原需要复杂精准处理和递呈, 多肽疫苗的接种相对灵活和简单, 具有药物样的特性, 并易于生产和运输. 不足是多肽疫苗免疫原性弱, 生物利用度低, 生物稳定性差, 激活DCs是需要免疫佐剂的辅佐等<sup>[21]</sup>. Kaida等<sup>[22]</sup>运用WT1多肽疫苗联合吉西他滨对25例晚期胰腺癌和胆管癌患者进行了一期临床研究, 运用Montanide佐剂提高免疫原性, 结果表明2例患者检测到迟发型超敏反应, 13例患者检测到WT-1特异性T淋巴细胞, 2 mo的疾病控制率胰腺癌为89%, 胆管癌为50%, 中位生存率胰腺癌为288 d, 胆管癌为259 d, 并具有较低的毒性和较高的安全性. 日本医学科学研究所运用HLA-A2402限制性血管内皮细胞生

长因子受体1(vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1)来源的多肽合并Montanide ISA51乳化剂免疫胰腺癌患者, 进行随机双盲实验, 虽然出现了胃肠出血, 但仍显示了对胰腺癌的应用前景<sup>[23]</sup>.

**2.3 DNA疫苗** DNA疫苗是指将编码某种蛋白质抗原的重组真核表达载体直接注射到人体内, 使外源基因在活体内表达, 产生的抗原激活机体的免疫系统, 从而诱导特异性的体液免疫和细胞免疫应答, 具有价格便宜、易于生产存储、工艺简单、安全稳定、能同时诱导细胞及体液免疫等优点, 在肿瘤、感染、遗传等疾病中有广泛的研究<sup>[24]</sup>. Wu等<sup>[25]</sup>用重组含Mucin1随机重复序列的质粒免疫小鼠后, 成功诱导了MUC1-VNTR的特异性CTLs和抗体反应. Rong等<sup>[26]</sup>成功构建了MUC1-VNTR DNA疫苗, 在预防组, 先给予DNA疫苗, 再接种Panc02-MUC1或Pan02胰腺癌细胞, 在治疗组, 先接种Panc02-MUC1或Pan02胰腺癌细胞, 再给予DNA疫苗, 预防组与治疗组和空白对照组对比结果表明, MUC1 DNA疫苗能够诱导MUC1特异性CTLs反应, 对接种Panc02-MUC1肿瘤细胞的小鼠具有预防和治疗作用.

**2.4 DC疫苗** DCs是人体内抗原递呈能力最强的细胞, DCs与肿瘤的发生发展有密切的联系<sup>[27]</sup>, 大部分的实体瘤内浸润的DCs数量多则患者的预后好, 一般运用外周血淋巴细胞分离术得到单个核细胞, 在GM-SCF、IL-4、TNF等细胞因子刺激培养诱导下, 分化成DCs, 然后负载相应的抗原, 再把这些DCs回注到体内刺激体内的肿瘤杀伤性淋巴细胞增殖, 发挥长期肿瘤监视作用和肿瘤杀伤作用, 达到消灭肿瘤的目的. DCs的激活可以运用肿瘤抗原多肽负载, 可以将肿瘤抗原基因转染至DCs, 可以完全肿瘤细胞抗原负载DCs, 也可以将肿瘤细胞与DCs融合, 他们各有优缺点<sup>[28,29]</sup>. Nakamura等<sup>[30]</sup>对17个胰腺癌患者进行化疗、DC疫苗治疗和淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine activated killer cells, LAK)回输治疗, 研究对照结果表明运用DC疫苗进行免疫治疗的难治性胰腺癌患者的中位生存率为9 mo. 杨德红等<sup>[31]</sup>运用经卡介苗活化的负载PANC1裂解产物的DCs, 诱导自体淋巴细胞, 观察淋巴细胞对胰腺癌细胞杀伤率, 结果表明经卡介苗活化的胰腺癌DC疫苗成熟度增加, 在体外表现出高特异的抗胰腺癌细胞效应.

**2.5 重组疫苗** 为了将抗原更好的传递给DCs, 运

#### ■创新盘点

本文反映了目前胰腺癌免疫治疗领域的进展, 引入了近年来国内外最新研究报道, 全面体现了胰腺癌的免疫治疗的疗效、安全性等问题.

### ■应用要点

本文进一步加强对胰腺癌的基础研究,解决肿瘤抗原免疫原性较弱以及存在肿瘤免疫逃逸问题,对进一步应用于临床治疗肿瘤具有重要的指导价值。

用细菌和病毒作为载体。卡介苗、沙门氏杆菌属、单核细胞增多性李斯特杆菌、痘病毒、腺病毒等由于他们具有天然的免疫刺激能力,能够目标性活化DCs,常被用来作为肿瘤抗原的载体。李斯特杆菌作为一个特殊的胞内菌被广泛的研究,进入人体后,李斯特杆菌迅速地被巨噬细胞和DCs在内的吞噬细胞所吞噬,进入到吞噬溶酶体内,绝大部分的细菌随后被降解,经处理的李斯特杆菌抗原通过经典的二类胞内途径表达于APCs的表面。另外在这个酸性的胞内吞噬溶酶体腔中,有许多的细菌的基因被激活,包括李斯特杆菌溶解素,他降解吞噬溶酶体,将李斯特杆菌释放到胞质中,存活的细菌分裂,并表达基因产物,这些基因产物通过经典的一类途径处理和递呈,从而激活宿主体内特异性CD8<sup>+</sup>淋巴细胞。这种同时经经典一类和二类处理途径的免疫治疗形式相对只存在于李斯特杆菌疫苗<sup>[32]</sup>。李斯特杆菌疫苗还具有其他的一些特性使他运用于肿瘤的免疫治疗:(1)易于被基因工程同时表达肿瘤抗原和刺激蛋白;(2)李斯特杆菌被DCs的摄取可以被抗体反应加强;(3)除非特殊基因工程处理过的,一般对传统的抗生素敏感;(4)可以在传统的细菌培养液中进行大量的扩增<sup>[33]</sup>。目前,这种疫苗已在动物和人中进行了相关的研究<sup>[34,35]</sup>。Maciag等<sup>[36]</sup>发表的文章显示,第1次运用表达HPV-16 E7抗原的活的减毒李斯特杆菌免疫晚期子宫癌患者,具有较高的安全性。间皮素是一种分化抗原,在正常组织中低表达,在肿瘤组织中高表达,Giedlin等<sup>[37]</sup>构建表达人间皮素的李斯特杆菌疫苗,免疫Balb/c和C57B1/6小鼠,诱导出了间皮素特异性的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞,免疫荷瘤小鼠,显示具有治疗性抗癌作用并能提高生存率,在对猕猴进行肌肉和静脉注射时具有较高的安全性。痘病毒载体是另外一种被研究很广泛的载体,痘病毒载体能够诱导产生Th细胞,CTLs和高水平的抗体。同时允许插入大的多种基因并能高水平的表达,这些特点使他成为一个理想的载体。Hance等<sup>[38]</sup>联合IFN- $\alpha$ 和针对CEA抗原的痘病毒疫苗运用于负载胰腺癌细胞的小鼠,结果表明可以抑制肿瘤的生长,提高生存时间,能够诱导CEA特异性CTLs反应。溶瘤腺病毒是溶瘤病毒的一种,具有一些特殊的性质,溶瘤腺病毒利用靶细胞中抑瘤基因的失活或缺陷从而选择性地感染并裂解肿瘤细胞的一种病毒,从肿瘤细胞中释放的病毒又可以进一步感染周围的肿瘤细胞,而不对正常的细

胞产生明显的不良反应,从而达到理想的治疗目的。利用基因工程技术将溶瘤腺病毒作为治疗载体导入外源基因如抑瘤基因、抗原肽、细胞因子等基因,并使有效表达,在裂解肿瘤细胞的同时,增强机体对肿瘤细胞的免疫反应,达到抗肿瘤治疗目的<sup>[39]</sup>。Bortolanza等<sup>[40]</sup>构建了一种含IL-12基因的依赖低氧诱导因子复制的溶瘤腺病毒,动物体内实验表明,在用包括BxPC-3、PANC-1、AsPC-1胰腺腺癌细胞系在内的多种肿瘤细胞系构建的移植瘤模型中,与对照组相比,这种溶瘤腺病毒能够选择性地肿瘤细胞中复制裂解细胞并高表达IL-12,抑制肿瘤的生长并增强机体的抗肿瘤免疫反应,具有强大的抗肿瘤效应,并具有较低的毒性,展示了极大的应用前景。

### 3 细胞因子和免疫调节剂

肿瘤的发生和发展过程中伴随着机体免疫功能状态细胞因子的改变,运用细胞因子调节免疫进行抗癌治疗在癌症的免疫治疗中具有重要地位,一般与其他疗法联合运用。将细胞因子或与细胞因子偶联的药物注射到患者全身或肿瘤局部,或将细胞因子基因转染到肿瘤细胞内,发挥免疫抗癌作用。目前常用的有IFN、IL-12、IL-2等<sup>[40-44]</sup>。细胞毒药物是肿瘤化疗的典型药物,研究表明,某些细胞毒药物具有免疫调节功能,恰当地与免疫药物共用,可以发挥他的细胞毒作用和免疫调节作用。如来自阿霉素杀死细胞的抗原可以比丝裂霉素杀死细胞的抗原更容易被DCs细胞摄取,诱导抗肿瘤免疫反应<sup>[45]</sup>。不同剂量和不同时间运用细胞毒性药物可以有不同的效果,大剂量的环磷酰胺具有细胞毒性,而低剂量的具有显著的免疫调节作用。目前认为,低剂量的环磷酰胺不仅减少调节淋巴细胞的数量而且减少他的功能。环磷酰胺通过下调GITR和FoxP3的表达来抑制调节性T淋巴细胞(the regulatory T cells, Tregs)的活性,可以诱生高活性的抗肿瘤T淋巴细胞,由于环磷酰胺是作用于Tregs,而不是肿瘤细胞本身,因此可以用于治疗各种肿瘤。大量的研究证实低剂量的环磷酰胺结合疫苗可以通过耗竭Tregs数量、抑制Tregs功能、改变肿瘤的微环境,减少对放疗药物的抵抗来增强抗肿瘤效果。研究表明,Tregs抑制剂比如环磷酰胺要在疫苗使用前使用,剂量过大会抑制疫苗诱导的抗肿瘤免疫反应,低剂量的环磷酰胺会使Tregs在48 h内减少50%,但在以

后的7-14 d有恢复正常, 长期使用会导致淋巴细胞减少和抑制疫苗的特异性反应, 间断使用似乎可以更有效发挥作用, 恰当的序贯治疗可以减少细胞毒药物的反应<sup>[17,46,47]</sup>. 其他如胸腺肽<sup>[48]</sup>、卡介苗、转移因子、还有具有中国特色的中草药等对患者机体的免疫功能状态具有特异性或非特异性的调节功能, 对胰腺癌的辅助治疗具有重要的作用, 在临床实践中已有一定运用.

#### 4 结论

尽管肿瘤的免疫治疗在近年来取得了较大的发展, 特别是在实验室, 但应用于临床中还有很长的路要走. 必须建立一套有效评价肿瘤免疫治疗效果的机制, 增加肿瘤疫苗的安全性, 简化生产流程, 提高可重复性和免疫治疗效应时间, 减低免疫治疗的不良反应等. 在治疗的过程中, 针对免疫调节机制, 实施多种免疫治疗策略, 并与传统的手术化疗优势互补, 将免疫治疗的广泛性与个体性有效的结合起来<sup>[49,50]</sup>, 相信在不久的将来, 胰腺癌的生存率会得到很大的提高.

#### 5 参考文献

- 1 Greer JB, Brand RE. New developments in pancreatic cancer. *Curr Gastroenterol Rep* 2011; 13: 131-139
- 2 Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331: 1565-1570
- 3 Morse MA, Hall JR, Plate JM. Countering tumor-induced immunosuppression during immunotherapy for pancreatic cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 331-339
- 4 de la Cruz-Merino L, Henao-Carrasco F, García-Manrique T, Fernández-Salguero PM, Codes-Manuel de Villena M. Role of transforming growth factor beta in cancer microenvironment. *Clin Transl Oncol* 2009; 11: 715-720
- 5 Yang L. TGFbeta, a potent regulator of tumor microenvironment and host immune response, implication for therapy. *Curr Mol Med* 2010; 10: 374-380
- 6 Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 263-274
- 7 Chames P, Kerfelec B, Baty D. Therapeutic antibodies for the treatment of pancreatic cancer. *Scientific World Journal* 2010; 10: 1107-1120
- 8 Hassan R, Cohen SJ, Phillips M, Pastan I, Sharon E, Kelly RJ, Schweizer C, Weil S, Laheru D. Phase I clinical trial of the chimeric anti-mesothelin monoclonal antibody MORAb-009 in patients with mesothelin-expressing cancers. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 6132-6138
- 9 Stadel D, Mohr A, Ref C, MacFarlane M, Zhou S, Humphreys R, Bachem M, Cohen G, Möller P, Zwacka RM, Debatin KM, Fulda S. TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5734-5749

- 10 Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960-1966
- 11 Yee C. Adoptive therapy using antigen-specific T-cell clones. *Cancer J* 2010; 16: 367-373
- 12 Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 299-308
- 13 Hassanin H, Serba S, Schmidt J, Märten A. Ex vivo expanded telomerase-specific T cells are effective in an orthotopic mouse model for pancreatic adenocarcinoma. *Clin Exp Immunol* 2009; 158: 125-132
- 14 Kondo H, Hazama S, Kawaoka T, Yoshino S, Yoshida S, Tokuno K, Takashima M, Ueno T, Hinoda Y, Oka M. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer using MUC1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes. *Anticancer Res* 2008; 28: 379-387
- 15 Kawaoka T, Oka M, Takashima M, Ueno T, Yamamoto K, Yahara N, Yoshino S, Hazama S. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer: cytotoxic T lymphocytes stimulated by the MUC1-expressing human pancreatic cancer cell line YPK-1. *Oncol Rep* 2008; 20: 155-163
- 16 Imai N, Takeda K, Utsunomiya S, Taga M, Kawata N, Ikeda T, Mizutani Y, Hirose K, Ishikawa T, Yoshida S. [A case of metastatic pancreatic cancer with a remarkable response to combination therapy of gemcitabine and adoptive immune cell therapy]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2010; 37: 527-529
- 17 Antonarakis ES, Carducci MA. Combining low-dose cyclophosphamide with GM-CSF-secreting prostate cancer immunotherapy enhances antitumor immune effects. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19: 311-314
- 18 Emens LA. GM-CSF-secreting vaccines for solid tumors. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 1315-1324
- 19 Laheru D, Lutz E, Burke J, Biedrzycki B, Solt S, Onners B, Tartakovsky I, Nemunaitis J, Le D, Sugar E, Hege K, Jaffee E. Allogeneic granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor immunotherapy alone or in sequence with cyclophosphamide for metastatic pancreatic cancer: a pilot study of safety, feasibility, and immune activation. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1455-1463
- 20 Lutz E, Yeo CJ, Lillemoie KD, Biedrzycki B, Kobrin B, Herman J, Sugar E, Piantadosi S, Cameron JL, Solt S, Onners B, Tartakovsky I, Choi M, Sharma R, Illei PB, Hruban RH, Abrams RA, Le D, Jaffee E, Laheru D. A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma. A Phase II trial of safety, efficacy, and immune activation. *Ann Surg* 2011; 253: 328-335
- 21 Dudek NL, Perlmutter P, Aguilar MI, Croft NP, Purcell AW. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 3149-3157
- 22 Kaida M, Morita-Hoshi Y, Soeda A, Wakeda T, Yamaki Y, Kojima Y, Ueno H, Kondo S, Morizane C, Ikeda M, Okusaka T, Takaue Y, Heike Y. Phase I

#### ■同行评价

本文有一定的临床指导意义, 具有一定的可读性.

- trial of Wilms tumor 1 (WT1) peptide vaccine and gemcitabine combination therapy in patients with advanced pancreatic or biliary tract cancer. *J Immunother* 2011; 34: 92-99
- 23 Nagayama H, Matsumoto K, Isoo N, Ohno H, Takahashi N, Nakaoka T, Shinozaki M, Watanabe M, Inoue Y, Nagamura F, Oyaizu N, Yamashita N. Gastrointestinal bleeding during anti-angiogenic peptide vaccination in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer. *Clin J Gastroenterol* 2010; 3: 307-308
- 24 Bei R, Scardino A. TAA polyepitope DNA-based vaccines: a potential tool for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 102758
- 25 Wu WC, Jin DY, Lou WH, Wang DS, Qin XY. Induction of antigen-specific CTL and antibody responses in mice by a novel recombinant tandem repeat DNA vaccine targeting at mucin 1 of pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1861-1868
- 26 Rong Y, Jin D, Wu W, Lou W, Wang D, Kuang T, Ni X, Qin X. Induction of protective and therapeutic anti-pancreatic cancer immunity using a reconstructed MUC1 DNA vaccine. *BMC Cancer* 2009; 9: 191
- 27 Shurin MR, Gregory M, Morris JC, Malyguine AM. Genetically modified dendritic cells in cancer immunotherapy: a better tomorrow? *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 1539-1553
- 28 Palucka K, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med* 2011; 269: 64-73
- 29 Aruga A. [Dendritic cell-based cancer immunotherapy]. *Nippon Rinsho* 2010; 68: 1107-1110
- 30 Nakamura M, Wada J, Suzuki H, Tanaka M, Katano M, Morisaki T. Long-term outcome of immunotherapy for patients with refractory pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 831-836
- 31 杨德红, 刘文佳, 陈敏. 经卡介苗活化的负载PANC1裂解产物的树突状细胞疫苗体外抗胰腺癌作用. *中华胰腺病杂志* 2010; 10: 267-271
- 32 Paterson Y, Guirnalda PD, Wood LM. Listeria and Salmonella bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Semin Immunol* 2010; 22: 183-189
- 33 Tangney M, Gahan CG. Listeria monocytogenes as a vector for anti-cancer therapies. *Curr Gene Ther* 2010; 10: 46-55
- 34 Tangney M, van Pijkeren JP, Gahan CG. The use of Listeria monocytogenes as a DNA delivery vector for cancer gene therapy. *Bioeng Bugs* 2010; 1: 284-287
- 35 Shahabi V, Maciag PC, Rivera S, Wallecha A. Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng Bugs* 2010; 1: 235-239
- 36 Maciag PC, Radulovic S, Rothman J. The first clinical use of a live-attenuated Listeria monocytogenes vaccine: a Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine* 2009; 27: 3975-3983
- 37 Giedlin M, Leong M, Luckett W, Bahjat K, Liu W, Gao Y, Bolton G, Allen H, Cook D, Brockstedt D, Dubensky T. Recombinant Listeria monocytogenes-based immunotherapy targeting mesothelin for the treatment of pancreatic and ovarian cancer. Presented at the 96th American Association for Cancer Research Annual Meeting Anaheim, California April 16-20, 2005
- 38 Hance KW, Rogers CJ, Zaharoff DA, Canter D, Schlom J, Greiner JW. The antitumor and immunoadjuvant effects of IFN-alpha in combination with recombinant poxvirus vaccines. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2387-2396
- 39 He XP, Su CQ, Wang XH, Pan X, Tu ZX, Gong YF, Gao J, Liao Z, Jin J, Wu HY, Man XH, Li ZS. E1B-55kD-deleted oncolytic adenovirus armed with canstatin gene yields an enhanced anti-tumor efficacy on pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2009; 285: 89-98
- 40 Bortolanza S, Bunuales M, Otano I, Gonzalez-Aseguinolaza G, Ortiz-de-Solorzano C, Perez D, Prieto J, Hernandez-Alcoceba R. Treatment of pancreatic cancer with an oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 in Syrian hamsters. *Mol Ther* 2009; 17: 614-622
- 41 Wagner K, Schulz P, Scholz A, Wiedenmann B, Menrad A. The targeted immunocytokine L19-IL2 efficiently inhibits the growth of orthotopic pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4951-4960
- 42 Angelini C, Bovo G, Muselli P, Mussi C, Crippa S, Caprotti R, Uggeri F. Preoperative interleukin-2 immunotherapy in pancreatic cancer: preliminary results. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 141-144
- 43 Naing A, Reuben JM, Camacho LH, Gao H, Lee BN, Cohen EN, Verschraegen C, Stephen S, Aaron J, Hong D, Wheeler J, Kurzrock R. Phase I Dose Escalation Study of Sodium Stibogluconate (SSG), a Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor, Combined with Interferon Alpha for Patients with Solid Tumors. *J Cancer* 2011; 2: 81-89
- 44 Tassi E, Braga M, Longhi R, Gavazzi F, Parmiani G, Di Carlo V, Protti MP. Non-redundant role for IL-12 and IL-27 in modulating Th2 polarization of carcinoembryonic antigen specific CD4 T cells from pancreatic cancer patients. *PLoS One* 2009; 4: e7234
- 45 Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, Schmitt E, Hamai A, Hervas-Stubbs S, Obeid M, Coutant F, Métévier D, Pichard E, Aucouturier P, Pierron G, Garrido C, Zitvogel L, Kroemer G. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005; 202: 1691-1701
- 46 de Vries IJ, Castelli C, Huygens C, Jacobs JF, Stockis J, Schuler-Thurner B, Adema GJ, Punt CJ, Rivoltini L, Schuler G, Coulie PG, Lucas S. Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 841-848
- 47 Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, Pfannenstiel LW, Armstrong TD, Machiels JP, Bieler JG, Emens LA, Reilly RT, Jaffee EM. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 2005; 201: 1591-1602
- 48 Wolf E, Milazzo S, Boehm K, Zwahlen M, Horneber M. Thymic peptides for treatment of cancer patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2011: CD003993
- 49 Jain KK. Personalized cancer vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10: 1637-1647
- 50 Sasada T, Komatsu N, Suekane S, Yamada A, Noguchi M, Itoh K. Overcoming the hurdles of randomised clinical trials of therapeutic cancer vaccines. *Eur J Cancer* 2010; 46: 1514-1519

# ERK1/2信号通路阻断剂PD98059对胃癌细胞MGC-803中RECK、MMP-9基因表达的影响

黄 靛, 李国庆, 毛振江, 钟 鹰, 殷清华

黄靛, 李国庆, 毛振江, 南华大学附属第二医院消化内科 湖南省衡阳市 421001

钟鹰, 南华大学附属湘潭医院 湖南省湘潭市 411100

殷清华, 南华大学附属第一医院 湖南省衡阳市 421001

黄靛, 硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 黄靛与李国庆对此文所作贡献均等; 此课题由黄靛设计; 李国庆教授指导; 研究过程由黄靛、毛振江及钟鹰操作完成; 研究用新试剂及分析工具由黄靛提供; 数据分析由黄靛与殷清华完成; 本论文写作由黄靛完成; 李国庆教授指导。

通讯作者: 李国庆, 教授, 主任医师, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学附属第二医院消化内科. ligq1970@yahoo.com.cn  
电话: 0734-8288962

收稿日期: 2011-05-07 修回日期: 2011-06-23

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-18

## Effect of the ERK1/2 kinase inhibitor PD98059 on the expression of RECK and MMP-9 in human gastric cancer cell line MGC-803

Liang Huang, Guo-Qing Li, Zhen-Jiang Mao, Ying Zhong, Qing-Hua Yin

Liang Huang, Guo-Qing Li, Zhen-Jiang Mao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Ying Zhong, the Affiliated Xiangtan Hospital of Nanhua University, Xiangtan 411100, Hunan Province, China

Qing-Hua Yin, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Professor Guo-Qing Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. ligq1970@yahoo.com.cn

Received: 2011-05-07 Revised: 2011-06-23

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the role of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 in the invasion and metastasis of gastric cancer by studying the impact of PD98059, an ERK1/2 inhibitor, on the expression of RECK and MMP-9 in human gastric cancer cell line MGC-803.

**METHODS:** The proliferation of MGC-803 cells was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. P-ERK expression was determined by Western blot to evaluate the activation of

ERK1/2. The expression of RECK and MMP-9 mRNAs and proteins was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

**RESULTS:** PD98059 inhibited the proliferation of MGC-803 cells in a concentration- and time-dependent manner. Treatment with PD98059 not only suppressed ERK1/2 phosphorylation but also up-regulated the expression of RECK mRNA and protein and down-regulated that of MMP-9 mRNA and protein in MGC-803 cells in a concentration- and time-dependent manner.

**CONCLUSION:** Treatment with PD98059 inhibited the proliferation of MGC-803 cells possibly by inhibiting ERK1/2 activation to up-regulate the expression of RECK and down-regulate that of MMP-9.

**Key Words:** ERK1/2 signal pathway; Human gastric cancer cells; RECK; Matrix metalloproteinase-9; PD98059

Huang L, Li GQ, Mao ZJ, Zhong Y, Yin QH. Effect of the ERK1/2 kinase inhibitor PD98059 on the expression of RECK and MMP-9 in human gastric cancer cell line MGC-803. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2097-2103

### 摘要

**目的:** 探讨ERK1/2信号通路在RECK基因抑制侵袭转移中的作用。

**方法:** 体外培养人胃癌MGC-803细胞, 采用MTT法观察胃癌细胞MGC-803增殖情况, Western blot检测P-ERK的蛋白表达, RT-PCR法和Western blot法检测RECK和基质金属蛋白酶9(MMP-9) mRNA和蛋白表达。

**结果:** MTT法显示PD98059在一定范围内能够明显抑制胃癌MGC803细胞增殖, 其作用具有时间依赖性及浓度依赖性, PD98059的有效浓度为25 μmol/L, 在此浓度下有效时间为24 h; Western blot法检测结果显示PD98059能够抑

### 背景资料

近年胃癌的治疗技术虽有明显提高, 但其5年生存率仍低于20%, 癌细胞侵袭转移是制约临床治疗效果的常见因素, 是涉及许多基因变化的一系列复杂过程。

### 同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

## ■ 研发前沿

目前,对于胃癌确切的病因学、发病机制仍未完全明了。RECK、MMP-9是否存在其他信号通路介导调控胃癌细胞侵袭转移有待进一步的研究。

制ERK1/2的磷酸化,即下调P-ERK1/2,从而使得ERK1/2信号传导途径失活;RT-PCR法和Western blot法检测结果显示PD98059能够浓度依赖性(25-100  $\mu\text{mol/L}$ )和时间依赖性(12-48 h)刺激培养的胃癌MGC803细胞RECK mRNA和蛋白表达增加,MMP-9 mRNA和蛋白表达下降。

**结论:** PD98059可以通过抑制ERK1/2信号途径,上调RECK的表达,下调MMP-9的表达,从而抑制人胃癌MGC-803细胞的增殖、生长。

**关键词:** ERK1/2信号通路;人胃癌细胞;RECK基因;基质金属蛋白酶9;PD98059

黄靓,李国庆,毛振江,钟鹰,殷清华. ERK1/2信号通路阻断剂PD98059对胃癌细胞MGC-803中RECK、MMP-9基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2097-2103  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2097.asp>

## 0 引言

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤,据统计,全球每年新发胃癌934 000例,且每年约700 000人死于胃癌,占据癌症死亡率第2位,几乎2/3的病例发生在发展中国家,其中中国占42%<sup>[1,2]</sup>。近年胃癌的治疗技术虽有明显提高,但其5年生存率仍低于20%<sup>[3]</sup>,癌细胞侵袭转移是制约临床治疗效果的常见因素,是涉及许多基因变化的一系列复杂过程<sup>[4]</sup>。大量研究表明,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)在肿瘤侵袭转移中发挥了重要作用<sup>[5-7]</sup>。在ERK1/2信号转导通路是调控细胞增殖的重要途径,与细胞增殖和某些恶性肿瘤的浸润转移密切相关,有研究表明ERK在MMP-9的基因表达中起作用<sup>[8,9]</sup>。研究证实<sup>[10]</sup>,Kazal基序逆向诱导半胱氨酸丰富蛋白(reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs, RECK)这种新型的膜表面锚定的MMPs抑制基因,是影响肿瘤转移及侵袭能力的独立因素,且其下降的幅度与肿瘤侵袭转移能力成明显正相关。RECK通过下调MMP-2、MMP-9、MT1-MMP、VEGF等,抑制肿瘤细胞的跨膜、远处转移以及肿瘤中血管生成<sup>[11]</sup>。根据上述特性,可将其作为判断患者预后新的分子标志物<sup>[12]</sup>。目前的研究表明,RECK基因的表达受到癌基因Ras的调控<sup>[13]</sup>,与细胞外信号调节激酶(ERK1/2)途径相关<sup>[14]</sup>。目前国内关于RECK下调胃癌细胞侵袭转移的机制以及信号转导通路的研究尚少。我们通过体外细胞培养技术,应用

ERK1/2特异性抑制剂PD98059作用于MGC-803细胞,检测RECK、MMP-9、P-ERK1/2的表达,进一步研究ERK1/2通路调控胃癌细胞侵袭转移的信号转导机制,以抑制肿瘤细胞的远处转移和局部复发。对于上调RECK为靶点的分子生物治疗的临床应用提供理论和实验依据,为胃癌的治疗提供新的思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胃癌细胞株MGC-803由中南大学湘雅医学院肿瘤研究所购得,其表型为低分化人胃腺癌细胞。PD98059购自江苏碧云天生物技术公司,RPMI 1640培养基购自Hyclone-Pierce公司,二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司,MMP-9基因、RECK基因及GAPDH引物设计与合成由上海生工生物技术公司合成,兔抗MMP-9单克隆抗体购自美国ABZOOM公司,兔抗RECK单克隆抗体购自美国Cell Signaling公司,鼠抗、兔抗 $\beta$ -Actin单克隆抗体购自江苏碧云天生物技术公司,HRP标记的羊抗兔IgG及HRP标记的羊抗鼠IgG购自江苏碧云天生物技术公司,鼠抗ERK1/2、鼠抗P-ERK1/2单克隆抗体购自美国ABZOOM公司,其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** MGC-803细胞在含有100 mL/L胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基中贴壁生长,置于37  $^{\circ}\text{C}$ ,95%饱和湿度、含50 mL/L  $\text{CO}_2$ 的孵箱中培养,每1-2 d换1次液,于细胞80%融合时,用0.25%的胰酶细胞消化液消化,1:2或1:3传代1次。根据细胞生长状态,有时加入青-链霉素双抗。

**1.2.2 MTT法检测细胞增殖:** 取对数生长期的胃癌MGC-803细胞用0.25%胰酶消化,含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640液配制成单细胞悬液。以 $1.0 \times 10^7$ 个/L接种于96孔培养板(每孔200  $\mu\text{L}$ ),观察细胞贴壁,70%-80%融合后,换不含胎牛血清的RPMI 1640培养液同步化24 h后,加入不同的处理因素继续培养,倒置显微镜下动态观察细胞生长情况。在孵育结束前4 h每孔加入5 g/L的MTT溶液20  $\mu\text{L}$ ,培养4 h后吸弃孔内培养液,每孔各加入DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min后振荡混匀,用酶联免疫检测仪测定吸光度值( $A_{570}$ ),通过与对照组相比得到实验组的增殖情况。实验重复3次,每组设6个复孔,统计数据取A值均值。

表 1 各基因引物序列及扩增引物长度

基因	引物序列	扩增产物(bp)
GAPDH	5'CATCCTGCGTCTGGACCT3'	480
	5'TCAGGAGGAGCAATGATCTTG3'	
MMP-9	5'TGGATGTGAGCATCCCTAGGG3'	267
	5'AGTGTCGAGGAAGATACTTG3'	
RECK	5'TGGAGTCACTGTACACCCTC3'	209
	5'CGGACATCCGCTAAACAGGT3'	

表 2 各基因PCR扩增反应条件

基因	反应条件					
	预变性	变性	退火	延伸	循环数	末次延伸
GAPDH	94 °C, 4 min	94 °C, 30 s	55 °C, 30 s	72 °C, 30 s	30	72 °C, 10 min
MMP-9	94 °C, 3 min	94 °C, 30 s	58 °C, 30 s	72 °C, 1 min	30	72 °C, 10 min
RECK	94 °C, 3 min	94 °C, 30 s	43 °C, 30 s	72 °C, 1 min	30	72 °C, 10 min

1.2.3 RT-PCR检测mRNA表达: 取对数生长期的胃癌细胞MGC-803于37 °C, 含50 mL/L CO<sub>2</sub>的孵箱中培养, 待细胞长至70%-80%融合状态时, 更换为无血清的RPMI 1640培养基同步化饥饿细胞24 h, 然后加入不同的处理因素继续培养至实验所需时间后, 收集细胞, TRIzol总RNA提取试剂提取细胞总RNA, 常规合成cDNA第一链, 以此第一链为模版, PCR扩增MMP-9及RECK mRNA片段, 同时扩增三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照, 目的基因和内参引物序列和反应条件见表1, 2, 扩增产物应用凝胶电泳检测. AlphaImager 2200凝胶分析系统图像分析各组目的产物及GAPDH灰度值, 以二者的比值代表目的产物的表达量. 每组实验重复3次.

1.2.4 Western blot检测蛋白定量表达: 取对数生长期的胃癌细胞MGC-803于37 °C, 含50 mL/L CO<sub>2</sub>的孵箱中培养, 待细胞长至70%-80%融合状态时, 更换为无血清的RPMI 1640培养基同步化饥饿细胞24 h, 然后按分组加入不同的处理因素继续培养至实验所需时间后, 收集细胞, 提取总蛋白, BCA法定测定蛋白含量, 每个泳道蛋白的溶液体积20 μL, 上样于SDS-PAGE进行电泳分离后, 转移至硝酸纤维素膜, 用5%无脂牛奶(用TBST配制), 在4 °C冷室中摇动封闭过夜. 一抗(MMP-9、RECK、P-ERK1/2、ERK1/2)效价均为1:500, β-actin效价为1:1 000室温下脱色摇床上摇动孵育2 h后, TBST洗膜4次, 每次15 min, 随后加HRP标记的二抗(羊抗小鼠效价为1:

2 000)室温下脱色摇床上摇动孵育1 h. 用TBST洗膜6次, 每次15 min. 加入化学发光剂显影. 将胶片进行扫描或拍照, 用凝胶图像处理系统分析目标带的相对分子质量和净光密度值. 每组实验重复3次.

**统计学处理** 各组实验数据以mean±SD表示, 采用SPSS16.0统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间均数比较采用LSD检验,  $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 PD98059对MGC-803细胞增殖的影响 用不同浓度的PD98059(终末浓度为5、10、25、50、100 μmol/L)处理人胃癌细胞MGC-803 24 h, 可见其增殖活性(A值)在25、50、100 μmol/L作用浓度点, 随着PD98059处理浓度的增高, 其抑制作用逐渐增强, 与空白对照组和阴性对照组相比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 用PD98059(25 μmol/L)处理人胃癌细胞MGC-803不同时间(2、4、12、24、48 h), 可见其增殖活性(A值)在24、48 h作用时间点, 随着PD98059处理时间的延长, 其抑制作用逐渐增加, 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 由此提示PD98059显著抑制胃癌MGC-803细胞的生长, 其作用的有效浓度为25 μmol/L, 在此浓度下处理有效时间为24 h, 其对癌细胞的抑制率随着作用浓度的升高和时间的延长而呈部分上升趋势(图1, 2).

2.2 PD98059对ERK1/2、P-ERK1/2蛋白表达的

## ■ 相关报道

RECK这种新型的膜表面锚定的MMP抑制基因, 是影响肿瘤转移及侵袭能力的独立因素, 且其下降的幅度与肿瘤侵袭转移能力成明显正相关. Kazal基序逆向诱导半胱氨酸丰富蛋白(reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs, RECK)基因, 是1998年Takahashi等在v-Ki-ras转染的细胞株NIH3T3中通过表达克隆的方法分离出来的一种转录抑制基因.

■应用要点

PD98059可以通过抑制ERK1/2信号途径,上调RECK的表达,下调MMP-9的表达,从而抑制人胃癌MGC-803细胞的增殖、生长。

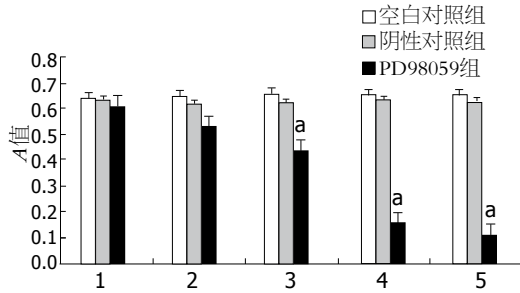


图1 不同浓度PD98059 24 h时对MGC-803细胞增殖的影响。1: PD98059 5 μmol/L; 2: PD98059 10 μmol/L; 3: PD98059 25 μmol/L; 4: PD98059 50 μmol/L; 5: PD98059 100 μmol/L。\*P<0.05 vs 空白对照组和阴性对照组。

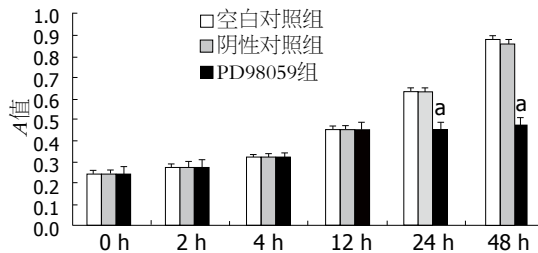


图2 PD98059(25 μmol/L)不同时间对MGC-803细胞增殖的影响。\*P<0.05 vs 空白对照组和阴性对照组。

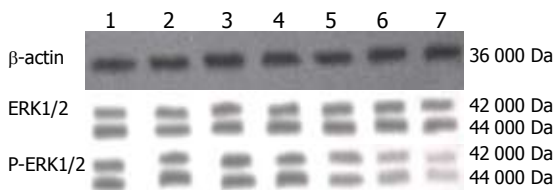


图3 不同浓度PD98059对MGC-803细胞P-ERK1/2及ERK1/2蛋白表达的影响。1: 正常组; 2: DMSO阴性对照组; 3: 5 μmol/L; 4: 10 μmol/L; 5: 25 μmol/L; 6: 50 μmol/L; 7: 100 μmol/L。

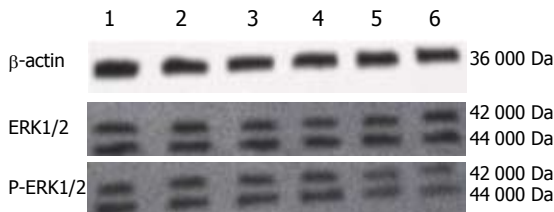


图4 PD98059(25 μmol/L)作用MGC-803不同时间对P-ERK1/2、ERK1/2蛋白表达的影响。1: 0 h; 2: 2 h; 3: 4 h; 4: 12 h; 5: 24 h; 6: 48 h。

影响 Western blot实验采用25 μmol/L PD98059作用于MGC-803细胞不同时间(2、4、12、24、48 h)和不同浓度的PD98059(5、10、25、50、100 μmol/L)作用24 h时,通过Western blot法检测,观察其对MGC-803细胞内P-ERK1/2和ERK1/2蛋白表达水平的影响,以ERK磷酸化程度作为

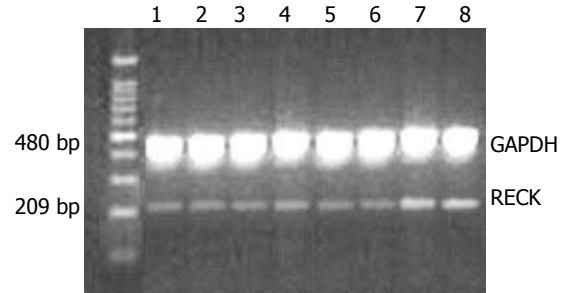


图5 PD98059(25 μmol/L)作用MGC-803细胞不同时间后对RECK mRNA表达的影响。1: 正常组; 2: DMSO阴性对照组; 3: 0 h; 4: 2 h; 5: 4 h; 6: 12 h; 7: 24 h; 8: 48 h。

衡量ERK1/2信号转导通路活性指标。读取各组P-ERK1/2、ERK1/2及内参β-actin蛋白的灰度值,以P-ERK1/2/β-actin、ERK1/2/β-actin灰度比值进行P-ERK1/2、ERK1/2蛋白表达水平的相对半定量分析。显示不同浓度PD98059(5、10、25、50、100 μmol/L)处理细胞24 h后,P-ERK1/2蛋白表达浓度依赖性下降,组间比较差异有统计学意义(P<0.05),其有效浓度为25 μmol/L。当PD98059浓度为100 μmol/L时,P-ERK1/2蛋白的表达抑制达到最大;而ERK1/2蛋白表达浓度变化不明显,组间比较差异无统计学意义(图3)。采用25 μmol/L PD98059分别处理细胞2、4、12、24和48 h后,P-ERK1/2蛋白表达浓度依赖性下降,组间比较差异有统计学意义(P<0.05),在25 μmol/L浓度下处理有效时间为24 h,其后对P-ERK1/2的抑制随着作用时间的延长而呈上升趋势;而ERK1/2蛋白表达浓度变化不明显,组间比较差异无统计学意义(图4)。

2.3 RECK和MMP-9 mRNA表达变化 RT-PCR法分析25 μmol/L PD98059处理胃癌MGC-803细胞不同时间后,RECK和MMP-9 mRNA表达的变化情况,灰度扫描定量分析显示25 μmol/L PD98059处理细胞不同时间后,RECK mRNA表达呈时间依赖性增加(12、24、48 h),与空白对照组及DMSO阴性对照组比较,差异有统计学意义(P<0.05,图5)。MMP-9 mRNA的表达呈时间依赖性下降(12、24、48 h),与空白对照组及DMSO阴性对照组比较,差异有统计学意义(P<0.05,图6)。

2.4 PD98059对RECK和MMP-9蛋白表达变化 Western blot法检测25 μmol/L PD98059处理胃癌MGC-803细胞不同时间后,MMP-9和RECK基因蛋白表达水平的变化情况,灰度扫描定量分析显示25 μmol/L PD98059处理细胞0、2、4、12、24和48 h后,RECK基因蛋白表达呈时间依

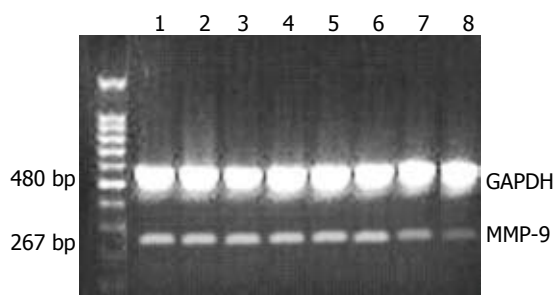


图 6 PD98059(25  $\mu\text{mol/L}$ )作用MGC-803细胞不同时间后对MMP-9 mRNA表达的影响. 1: 正常组; 2: DMSO阴性对照组; 3: 0 h; 4: 2 h; 5: 4 h; 6: 12 h; 7: 24 h; 8: 48 h.

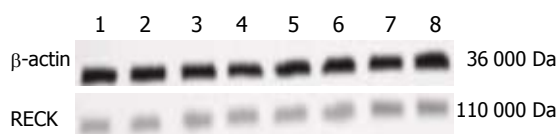


图 7 PD98059(25  $\mu\text{mol/L}$ )作用MGC-803细胞不同时间后对RECK蛋白表达的影响. 1: 正常组; 2: DMSO阴性对照组; 3: 0 h; 4: 2 h; 5: 4 h; 6: 12 h; 7: 24 h; 8: 48 h.

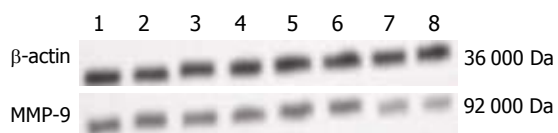


图 8 PD98059(25  $\mu\text{mol/L}$ )作用MGC-803细胞不同时间后对MMP-9蛋白表达的影响. 1: 正常组; 2: DMSO阴性对照组; 3: 0 h; 4: 2 h; 5: 4 h; 6: 12 h; 7: 24 h; 8: 48 h.

赖性增加(12-48 h), MMP-9蛋白表达呈时间依赖性下降(12-48 h), 与空白对照组及DMSO阴性对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图7, 8).

### 3 讨论

据《2009年中国卫生统计年鉴》统计, 2004-2005年胃癌的死亡率高达24.71/10万, 在前10位恶性肿瘤死亡率中排名第3, 其年患病率和死亡率均是世界平均水平的2倍多. 胃癌作为最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 缺乏特异性症状而早期就诊断困难, 单纯手术切除效果欠佳, 必须加以化疗及放化疗联合的综合治疗来提高患者的5年生存率. 化疗在改善胃癌患者预后, 降低术后复发率, 延长生存期等方面有特别重要的作用<sup>[15]</sup>. 从ERK1/2-RECK-MMP-9为靶点, 容易得到一个治疗胃癌的新思路-即通过抑制ERK1/2的表达和活性诱导RECK上调、抑制MMPs来治疗胃癌, 为寻找高效低毒性的化疗药物提供一些实验依据.

ERK1/2可调节蛋白或催化新陈代谢反应的关键酶, 是介导细胞反应的重要信号系统, 涉及

调节细胞的许多生物学行为<sup>[16]</sup>. 由Ras蛋白激活, 以磷酸化和去磷酸化的方式对外来刺激信号作出应答. PD98059是ERK1/2信号通路中的一种细胞渗透性和选择性的特异性阻断剂<sup>[17]</sup>.

我们采用不同浓度的PD98059对体外培养的胃癌MGC-803细胞的生长影响进行研究, 结果表明阻断ERK1/2信号转导途径可以显著抑制胃癌MGC-803细胞的生长增殖, 其作用的有效浓度为25  $\mu\text{mol/L}$ , 在此浓度下处理有效时间为24 h. 其对胃癌MGC-803细胞的抑制率随着作用浓度的升高和时间的延长而呈上升趋势. 鉴于以上研究, 我们可以证实Ras-Raf-MEK-ERK1/2通路是调控胃癌细胞增殖的主要信号传导途径. PD98059对ERK1/2活化的阻断作用存在剂量和时间上的依赖关系. 我们用Western blot法检测ERK1/2及P-ERK1/2作为衡量ERK1/2信号转导途径的活性指标. 结果显示P-ERK1/2蛋白水平表达下调, 并且呈部分剂量和时间上的依赖性, 组间比较差异有显著性( $P < 0.05$ ); 而ERK1/2蛋白表达浓度变化不明显, 组间比较差异无显著性( $P > 0.05$ ). 上述结果充分证明ERK1/2信号通路通过磷酸化活化转录因子而调控特定的下游基因的表达. PD98059只能抑制下游ERK的活化, 而不能下调其表达水平.

MMPs是一组锌离子依赖性内切酶, 能够降解细胞外基质中的各种蛋白成分, 是唯一已知的能够降解纤维胶原的酶类. 大量研究表明MMPs在细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分降解和调节肿瘤血管生成的过程中都发挥了重要作用<sup>[5-7]</sup>: (1)破坏局部组织结构, 促进肿瘤生长; (2)破坏基底膜屏障, 利于肿瘤转移; (3)通过对ECM的改建, 促进肿瘤新生血管的形成. 目前已发现并定性的人源MMPs有23种<sup>[18]</sup>, 其中MMP-9是引起ECM降解的最重要的酶类之一, 又称“明胶酶B”或“IV型胶原酶B”, 相对分子质量为92 000, 是已发现的MMPs中相对分子质量最大的酶. 其底物包括变性的I型胶原、天然IV、V、VII、X、和XI型胶原、纤维蛋白原、层粘连蛋白、巢蛋白、蛋白多糖连接蛋白及多功能蛋白聚糖等. 与其他MMPs家族成员相比, V型胶原样功能域为MMP-9所特有. 他的调节主要通过基因转录、酶原激活及MMP-9生理性抑制物(TIMPs)3个水平实现. MMPs的表达受多种机制的调控, 其中活化后的MAPK可通过调节转录因子活化蛋白-1(AP-1)和Ets转录因子而调控MMP-9基因的表达<sup>[19]</sup>.

**同行评价**  
本文设计合理, 逻辑性强, 结论中肯, 具有一定的理论意义.

RECK基因是新发现的一种MMPs抑制剂, 全称RECK基因, 是1998年Takahashi等<sup>[20]</sup>在v-Ki-ras转染的细胞株NIH3T3中通过表达克隆的方法分离出来的一种转录抑制基因. RECK基因在多种正常人体组织中均表达, 在前列腺、卵巢、睾丸、小肠中转录产物最丰富, 其次为肺、甲状腺、骨骼肌和胸腺, 在脑、心、胰腺中含量较少, 而在肿瘤组织中表达下降甚至不表达, 其表达可抑制肿瘤的侵袭转移能力<sup>[10]</sup>. 有研究表明, RECK中的K23基因序列能够非竞争性抑制MMP-9的分泌及活性, 抑制裸鼠肺癌模型中肿瘤的生长和转移<sup>[21]</sup>. 张勇等<sup>[22]</sup>的研究通过脂质体介导RECK真核表达载体转染人肝癌细胞株HepG2, 检测外源性的RECK基因抑制MMP-9的活性, 降低肝癌细胞HepG2的体外侵袭能力. 国内外多项研究证实, 结肠直肠癌<sup>[23]</sup>、脑垂体瘤<sup>[24]</sup>、肺癌<sup>[25]</sup>、胰腺癌<sup>[26]</sup>、骨肉瘤<sup>[27]</sup>、食管癌<sup>[28]</sup>、胃癌<sup>[29]</sup>、肝癌<sup>[30]</sup>、乳腺癌<sup>[31]</sup>等多种肿瘤中, RECK是影响肿瘤转移及侵袭能力的独立因素, 他负调节于MMP-2、MMP-9等, 抑制肿瘤细胞的跨膜和远处转移, RECK基因作为预测各类癌症预后的分子标志物有较大的临床意义. 目前的研究表明<sup>[14]</sup>, RECK基因的表达受到癌基因Ras的调控, 激活的Ras基因抑制RECK的表达, 从而促进侵袭和转移. Ras/Raf/MEK/ERK1/2通路(ERK1/2信号传导通路)是一个典型的将细胞外信号向细胞核内传递并刺激核内转录增加的级联反应, ERK1/2在该信号通路中具有枢纽作用.

本实验结采用Western blot法和RT-PCR法检测, 用PD98059阻断ERK1/2信号转导通路, 可以上调RECK蛋白及mRNA的表达, 并且在25-100  $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 对RECK的增长率随着剂量的增加和时间的延长呈上升趋势. 通过不同浓度的ERK1/2抑制剂PD98059处理体外培养的胃癌MGC-803细胞(不同时间)的RECK表达变化进行研究, 证实了RECK的表达受到ERK1/2信号转导途径在内的多种机制的调控. 不同浓度的MAPK(ERK1/2)特异性抑制剂PD98059对体外培养的胃癌MGC-803细胞的MMP-9表达变化进行研究, 结果表明, 阻断ERK1/2信号转导通路可以下调MMP-9蛋白及mRNA的表达, 并且在25-100  $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 对MMP-9的抑制率随着剂量的增加和时间的延长呈上升趋势. 我们的结果进一步证实了MMP的表达受到包括ERK1/2信号转导途径在内的多种机制的调控, 从而影响恶性肿瘤的生物学行为.

目前, 对于胃癌确切的病因学、发病机制仍未完全明了. 可以肯定的是, 胃癌的浸润和转移是患者主要的死亡原因. 总之, 我们认为在胃癌中, PD98059通过抑制ERK1/2的磷酸化来抑制细胞生长增殖, 在转录水平上调RECK表达和在转录后水平下调MMP-9表达, 从而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移, 并且找出PD98059作用于胃癌细胞的有效浓度是25  $\mu\text{mol/L}$ , 在这个浓度下处理的有效时间为24 h, 为RECK作为靶向治疗胃癌提供新的实验数据. 本实验研究进一步证实了ERK1/2信号转导通路是RECK的上游信号途径之一, ERK1/2信号通路的激活下调RECK基因的表达, 使得其对MMP-9表达的调控失衡, 引起恶性肿瘤侵袭和转移. 同时也证明了, ERK1/2抑制剂应该是非常有效的抗胃癌药物, 然如何降低其毒性、应用于临床仍然任重道远. RECK、MMP-9是否存在其他信号通路介导调控胃癌细胞侵袭转移有待进一步的研究.

#### 4 参考文献

- 1 Bulanov D. [Gastric cancer - current state of the problem. Part I. Epidemiology. Pathology. Classification. Staging]. *Khirurgiia* (Sofia) 2007; 48-59
- 2 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 3 Sutter AP, Fechner H. Gene therapy for gastric cancer: is it promising? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 380-387
- 4 Ghajar CM, George SC, Putnam AJ. Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008; 18: 251-278
- 5 Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 5-15
- 6 Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189: 300-308
- 7 Okada A. [Roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in cancer invasion and metastasis]. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999; 26: 2247-2252
- 8 Uzgar AR, Kaplan PJ, Greenberg NM. Differential expression and/or activation of P38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate* 2003; 55: 128-139
- 9 Menakongka A, Suthiphongchai T. Involvement of PI3K and ERK1/2 pathways in hepatocyte growth factor-induced cholangiocarcinoma cell invasion. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 713-722
- 10 Meng N, Li Y, Zhang H, Sun XF. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. *Histol Histopathol* 2008; 23: 1003-1010
- 11 Oshima T, Kunisaki C, Yoshihara K, Yamada R, Yamamoto N, Sato T, Makino H, Yamagishi S, Nagano Y, Fujii S, Shiozawa M, Akaike M, Wada N, Rino Y, Masuda M, Tanaka K, Imada T. Clinicopathological significance of the gene expression of matrix metalloproteinases and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in patients with colorectal cancer: MMP-2 gene expression is a

- useful predictor of liver metastasis from colorectal cancer. *Oncol Rep* 2008; 19: 1285-1291
- 12 Clark JC, Thomas DM, Choong PF, Dass CR. RECK-a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 675-683
- 13 Chang HC, Cho CY, Hung WC. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. *Cancer Res* 2006; 66: 8413-8420
- 14 Gysin S, Lee SH, Dean NM, McMahon M. Pharmacologic inhibition of RAF--&gt; MEK--&gt; ERK signaling elicits pancreatic cancer cell cycle arrest through induced expression of p27Kip1. *Cancer Res* 2005; 65: 4870-4880
- 15 Fatourou E, Papaziogas B. Double endoscopic intraluminal surgery: superior to ESD for early gastric cancer? *Surg Endosc* 2010; 24: 2349-2350
- 16 Black EJ, Walker M, Clark W, MacLaren A, Gillespie DA. Cell transformation by v-Jun deactivates ERK MAP kinase signalling. *Oncogene* 2002; 21: 6540-6548
- 17 Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1995; 270: 27489-27494
- 18 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839
- 19 Tsang KJ, Crowe DL. Retinoic acid and extracellular matrix inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression is mediated by the mitogen activated protein kinase pathway. *Int J Oncol* 2001; 18: 369-374
- 20 Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13221-13226
- 21 Chang CK, Hung WC, Chang HC. The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2781-2789
- 22 张勇, 郑启昌, 卢昕, 秦涛. 转染RECK基因对肝癌细胞生物学行为的影响. *中国普外基础与临床杂志* 2006; 13: 150-153
- 23 Asano T, Tada M, Cheng S, Takemoto N, Kuramae T, Abe M, Takahashi O, Miyamoto M, Hamada J, Moriuchi T, Kondo S. Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma. *J Surg Res* 2008; 146: 32-42
- 24 Yoshida D, Nomura R, Teramoto A. Regulation of cell invasion and signalling pathways in the pituitary adenoma cell line, HP-75, by reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK). *J Neurooncol* 2008; 89: 141-150
- 25 Takemoto N, Tada M, Hida Y, Asano T, Cheng S, Kuramae T, Hamada J, Miyamoto M, Kondo S, Moriuchi T. Low expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) indicates a shorter survival after resection in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2007; 58: 376-383
- 26 Lee H, Lim C, Lee J, Kim N, Bang S, Lee H, Min B, Park G, Noda M, Stetler-Stevenson WG, Oh J. TGF-beta signaling preserves RECK expression in activated pancreatic stellate cells. *J Cell Biochem* 2008; 104: 1065-1074
- 27 Kang HG, Kim HS, Kim KJ, Oh JH, Lee MR, Seol SM, Han I. RECK expression in osteosarcoma: correlation with matrix metalloproteinases activation and tumor invasiveness. *J Orthop Res* 2007; 25: 696-702
- 28 李晟磊, 刘宗文, 赵秋民, 于金霞, 赵志华, 高冬玲, 庞霞, 陈奎生, 张云汉. 食管鳞癌组织中RECK mRNA和蛋白的表达及意义. *中国肿瘤临床* 2007; 34: 1280-1286
- 29 Song SY, Son HJ, Nam E, Rhee JC, Park C. Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42: 101-108
- 30 Furumoto K, Arai S, Mori A, Furuyama H, Gorin Rivas MJ, Nakao T, Isobe N, Murata T, Takahashi C, Noda M, Imamura M. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. *Hepatology* 2001; 33: 189-195
- 31 Span PN, Sweep CG, Manders P, Beex LV, Leppert D, Lindberg RL. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 2710-2715

编辑 李薇 电编 张洋

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》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费. 审稿周期及发表周期不变. (编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

# ENT1在人肝癌细胞中的表达特征及临床意义

蒋星星, 傅华群, 巢映辉, 刘征宇

## ■背景资料

细胞膜核苷载体对核苷类化疗药物的细胞内外转运起着至关重要的作用, 细胞膜核苷载体的表达水平, 直接决定了细胞内核苷类药物的浓度, 从而影响肿瘤的化疗效果。ENT1对核苷类化疗药的转运作用最为突出。

蒋星星, 傅华群, 巢映辉, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省南昌市 330006

刘征宇, 南昌大学医学院实验教学部 江西省南昌市 330031  
蒋星星, 2008级硕士研究生, 主要从事肝胆外科基础与临床研究。

江西省卫生厅中医药科研基金资助项目, No. 2009021

作者贡献分布: 此课题由傅华群与蒋星星设计; 刘征宇为项目负责人, 指导实验; 数据分析由巢映辉完成; 本文撰写由蒋星星与傅华群完成。

通讯作者: 刘征宇, 330031, 江西省南昌市, 南昌大学医学院实验教学部, yunyucnc@sina.com

收稿日期: 2011-05-07 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-18

## Expression characteristics of ENT1 in human hepatocellular carcinoma cells

Xing-Xing Jiang, Hua-Qun Fu, Ying-Hui Chao, Zheng-Yu Liu

Xing-Xing Jiang, Hua-Qun Fu, Ying-Hui Chao, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Zheng-Yu Liu, Department of Experimental Teaching, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330031, Jiangxi Province, China

Supported by: the Chinese Medicine Research Foundation of the Health Bureau of Jiangxi Province, No. 2009021

Correspondence to: Zheng-Yu Liu, Department of Experimental Teaching, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330031, Jiangxi Province, China, yunyucnc@sina.com

Received: 2011-05-07 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression characteristics of equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines.

**METHODS:** Human HCC cell lines HuH-7, HepG2 and Hep3B, and the breast cancer cell line MCF7 were used in this study. ENT1 was localized by immunofluorescence staining. Before and after treatment with roscovitine, a cyclin-dependent kinase inhibitor, the expression of ENT1 mRNA in the above cell lines was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

## ■同行评议者

仇毓东, 副教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科

**RESULTS:** ENT1 could be detected on the membrane of the three human HCC cell lines. The expression levels of ENT1 mRNA in HCC cell lines were higher than that in the breast cancer cell line (HuH-7:  $0.756 \pm 0.019$ ; HepG2:  $0.469 \pm 0.041$ ; Hep3B:  $0.580 \pm 0.030$ ; MCF-7:  $0.356 \pm 0.029$ ). The expression level of ENT1 mRNA differed significantly among the three human HCC cell lines. Treatment with roscovitine increased the expression level of ENT1 mRNA ( $0.737 \pm 0.017$  vs  $0.345 \pm 0.027$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** ENT1 was localized to the membrane of HCC cells. The expression levels of ENT1 mRNA vary among different HCC cell lines. Treatment with roscovitine increased the expression level of ENT1 mRNA in HCC cell lines.

**Key Words:** Nucleoside transporters; Hepatocellular carcinoma cells; Equilibrative nucleoside transporter 1

Jiang XX, Fu HQ, Chao YH, Liu ZY. Expression characteristics of ENT1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2104-2108

## 摘要

**目的:** 探讨ENT1在人肝癌细胞株中的表达特征及其临床意义。

**方法:** 人肝癌细胞HuH-7、HepG2、Hep3B并选择人乳腺癌细胞MCF-7为对照, 采用免疫荧光法检测细胞中ENT1的定位表达; RT-PCR法检测细胞中ENT1 mRNA的表达; CDKs特异性抑制剂干预人肝癌细胞HuH-7的细胞周期, RT-PCR法检测细胞不同周期ENT1 mRNA的表达特征。

**结果:** 3株人肝癌细胞膜上均可见ENT1的表达; 肝癌细胞中ENT1 mRNA的表达水平均高于乳腺癌细胞; 不同肝癌细胞株中ENT1 mRNA的表达水平存在差异(HuH-7:  $0.756 \pm 0.019$ , HepG2:  $0.469 \pm 0.041$ , Hep3B:  $0.580 \pm 0.030$ , MCF-7:  $0.356 \pm 0.029$ ); 肝癌细胞被阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期后, ENT1 mRNA的表达水平明显上调( $0.737 \pm 0.017$  vs  $0.345 \pm 0.027$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 人肝癌细胞膜上普遍存在较高的ENT1表达, 不同的肝癌细胞及不同的细胞周期其表达均存在差异. ENT1在人肝癌细胞中的表达特征对临床化疗策略具有潜在的临床价值, 并为认识肝癌的耐药机制提供新的思路.

**关键词:** 核苷载体; 肝癌细胞; 平衡型核苷载体1

蒋星星, 蒋华群, 巢映辉, 刘征宇. ENT1在人肝癌细胞中的表达特征及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2104-2108

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2104.asp>

## 0 引言

核苷载体(nucleoside transporters, NTs)是分布在细胞膜上的一种载体蛋白, 对5-氟尿嘧啶、吉西他滨及阿糖胞苷等核苷类化疗药的细胞转运起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>. 细胞膜NTs的表达水平, 直接决定了细胞内核苷类化疗药物的浓度, 从而影响核苷类药物的化疗效果. 平衡型核苷载体(equilibrative nucleoside transporters, ENTs)是核苷载体的一大类, 目前ENTs有4种亚型基因已得到证实, 即ENT1、ENT2、ENT3、ENT4<sup>[2]</sup>. 本文通过检测人肝癌细胞株中ENT1的表达特征, 对临床化疗策略具有潜在的临床价值, 并为认识肝癌的耐药机制提供新的思路.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞株HuH-7、HepG2、Hep3B和人乳腺癌细胞株MCF-7购自中科院上海生物研究所细胞库; hENT1抗体购自Santa Cruz公司; TRIzol试剂购自Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司; CDKs抑制剂Roscovitine购自美国Sigma公司; hENT1与 $\beta$ -actin引物由上海生物试剂公司合成; 引物序列号hENT1: 上游5'-CCTTCGGCTACTTTATCACA-3', 下游5'-GTCACGGCTGGAAACATC-3',  $\beta$ -actin: 上游5'-CGGGAAATCGTGCGTGAC-3', 下游5'-TGG AAGGTGGACAGCGAGG-3'. 两者引物扩增后产物理论长度为: hENT1 319 bp,  $\beta$ -actin 434 bp.

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫荧光检测细胞膜hENT1的定位表达:** 按照细胞爬片、固定、封闭、抗体孵育、封片及荧光检测的实验步骤进行, 实验设阴性对照组, 其不加一抗.

**1.2.2 RT-PCR半定量检测细胞株hENT1 mRNA的表达:** 总RNA按TRIzol试剂盒说明书进行提取, 测定RNA浓度并调整各细胞株RNA浓度基

本一致后, 按TaKaRa公司试剂盒所提供的方法进行RT-PCR. RT-PCR的反应条件为: 94 °C预变性3 min, 94 °C变性40 s, 55 °C退火40 s, 72 °C延伸60 s, 共35个循环, 最后72 °C延伸5 min. 反应产物用1%琼脂糖凝胶进行电泳(电压95 V, 时间30 min), 通过Gene Genius全自动凝胶成像系统读取目的电泳条带的斑点密度扫描值, 以各组 $\beta$ -actin条带的扫描值来标化其相应组hENT1 mRNA表达量.

**1.2.3 流式细胞仪检测HuH-7细胞周期时相分布:** 选取对数生长期细胞, 将细胞接种于2个培养瓶中; 培养24 h后换含有不同浓度的Roscovitine(对照组浓度为0  $\mu$ mol/L, 实验组浓度为32  $\mu$ mol/L)的培养液处理细胞, 培养24 h后, 制成单细胞悬液; 取1 mL细胞悬液, 4 °C、1 000 r/min离心10 min, 弃上清; 加入1 mL冷PBS, 轻轻吹打使细胞悬浮, 4 °C、1 000 r/min离心10 min, 弃上清; 重复悬浮3次; 将细胞重悬于100  $\mu$ L PBS中加入Triton X-100 250  $\mu$ L, 室温孵育10 min; 加入RNA酶200  $\mu$ L, 室温孵育10 min; 加入碘化丙啶200  $\mu$ L 4 °C孵育10 min后立即上机检测.

**统计学处理** 数据采用SPSS13.0统计软件分析, 各组数据以mean  $\pm$  SD表示, 采用 $t$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 人肝癌细胞株Hep3B、HuH-7、HepG2和乳腺癌细胞株MCF-7中hENT1的定位表达** 通过荧光显微镜观察发现, 与阴性对照组相比, 3株肝癌细胞膜上均可见较强的荧光, 其中HuH-7细胞膜上的荧光最强, MCF-7细胞膜上的荧光相对较弱(图1).

**2.2 肝癌细胞株和乳腺癌细胞株中hENT1 mRNA的表达水平** 3株肝癌细胞中存在较高的ENT1 mRNA表达(图2), ENT1 mRNA在3株肝癌细胞中的表达量均比乳腺癌细胞株高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 3株肝癌细胞间ENT1 mRNA的表达水平存在差异, 以HuH-7中的表达水平最高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ).

**2.3 抑制细胞周期依赖性蛋白激酶活性后人肝癌细胞HuH-7细胞周期的变化** 对照组中G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞占58.50%  $\pm$  0.33%, S期占25.55%  $\pm$  0.15%, G<sub>2</sub>/M期占16.35%  $\pm$  0.31%; 实验组中G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞占76.29%  $\pm$  0.34%, S期占15.19%  $\pm$  0.34%, G<sub>2</sub>/M期占8.51%  $\pm$  0.41%. 与对照组相比, 实验组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例增多, S期、G<sub>2</sub>/M期细胞比例

### ■ 研发前沿

ENT1的表达水平与肿瘤患者的化疗效果的关系是目前研究的热点. 采用外源性干预肿瘤细胞膜上核苷载体的表达, 可能提高核苷类化疗药物在细胞内的浓度及持续时间, 增强抗癌效果. ENT1在人肝癌细胞中的表达及特征尚不清楚.

### ■ 相关报道

郑杰等研究发现ENT1是肿瘤细胞内核苷类化疗药物的主要反流通通道, 下调hENT1的表达水平, 可以提高细胞内核苷类化疗药物的浓度, 延长药物在细胞内的持续时间, 增强化疗效果.

■创新盘点

本研究发现,人肝癌细胞膜上存在ENT1的表达,不同肝癌细胞株中ENT1 mRNA的表达水平存在差异,处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的肝癌细胞,ENT1 mRNA的表达水平明显上调。

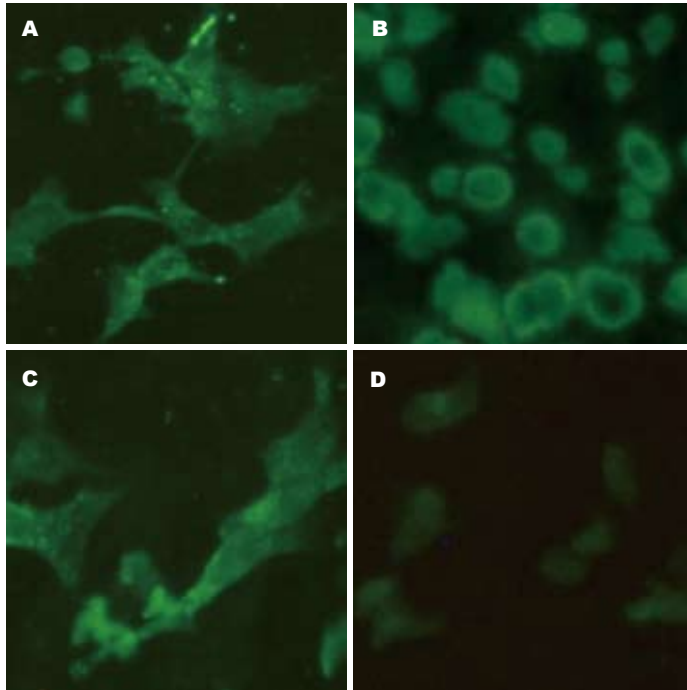


图1 人肝癌细胞株Hep3B、HuH-7、HepG2和乳腺癌细胞株MCF-7中hENT1的定位表达。A: Hep3B; B: HuH-7; C: HepG2; D: MCF-7。

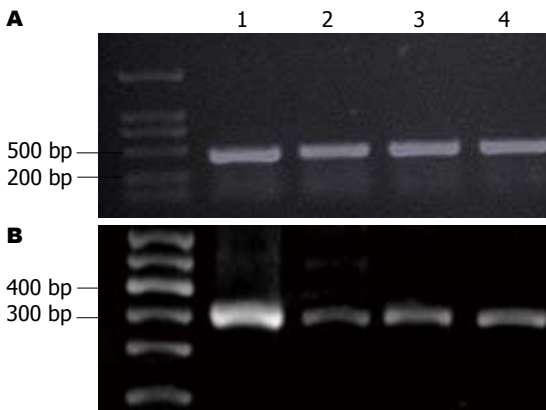


图2 半定量RT-PCR检测细胞株HuH-7、MCF-7、HepG2及Hep3B ENT1 mRNA的表达。A:  $\beta$ -actin; B: hENT1; 1: HuH-7; 2: MCF-7; 3: HepG2; 4: Hep3B。

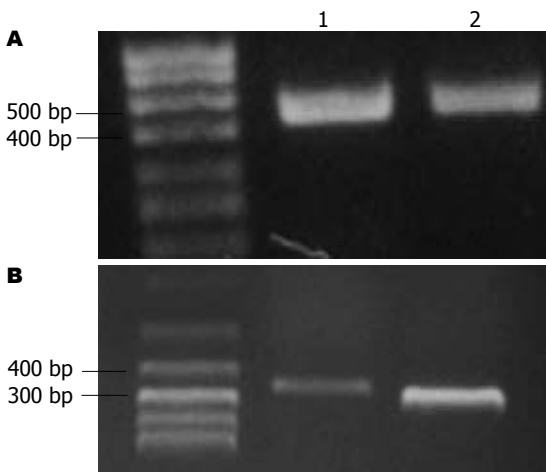


图3 半定量RT-PCR检测抑制CDKs活性后人肝癌细胞HuH-7中hENT1 mRNA的表达。A:  $\beta$ -actin; B: hENT1; 1: 对照组; 2: 实验组。

■应用要点

ENT1在人肝癌细胞中的表达特征对临床化疗策略具有潜在的临床价值,并为认识肝癌的耐药机制提供新的思路。调控肝癌细胞膜上ENT1的表达,可提高肝癌的化疗效果。

表1 抑制CDKs活性后人肝癌细胞HuH-7细胞周期的变化(mean  $\pm$  SD, %)

分组	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S期	G <sub>2</sub> /M期
对照组	58.50 $\pm$ 0.33	25.55 $\pm$ 0.15	16.35 $\pm$ 0.31
实验组	76.29 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	15.19 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	8.51 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组。

减少(均P<0.05, 表1)。

2.4 不同细胞周期人肝癌细胞HuH-7中hENT1 mRNA表达水平的比较 实验组与对照组相比(图3), hENT1 mRNA表达水平明显上调,两组间的差异有统计学意义(P<0.05)。

3 讨论

5-氟尿嘧啶、吉西他滨及阿糖胞苷等核苷类药物是很多抗肿瘤化疗方案的基础用药,通过影响DNA、RNA起到干扰肿瘤的生长、分裂,进而达到治疗肿瘤的目的<sup>[3]</sup>。该类药物需要NTs的转运才能进入细胞,发挥其抗肿瘤作用。至今已发现人类有两大类NTs,即hENTs和hCNTs<sup>[4-6]</sup>, hENTs对核苷及核苷类药物的跨膜转运原动力是细胞膜两侧的浓差,转运过程具有饱和特性,而且是易化扩散的过程,即核苷既可内流入细胞又可外流出细胞,最终使细胞内外底物浓度一致,其转运速度快、流量高<sup>[7-9]</sup>。hCNTs是一种主动转运蛋白,只能将细胞外底物转运至细胞内,即使逆浓度差转运,其方向也不变,从而使细胞

内达到较高的浓度<sup>[10,11]</sup>。基于ENTs和CNTs的转运功能和特性,以及hENT1对核苷类化疗药转运的突出作用,目前国内外关于核苷载体和肿瘤关系的研究,多数是关于hENT1表达水平与肿瘤化疗效果关系的研究,以及调控hENT1的表达水平对肿瘤化疗效果影响的研究,尤其是hENT1表达水平与胰腺癌化疗效果的报道较多。有研究表明,人肝细胞和乳腺癌细胞膜上存在ENT1的表达<sup>[12,13]</sup>,但是人肝癌细胞膜上ENT1的表达及特征尚不清楚,不同肝癌细胞株中hENT1的表达水平是否存在差异,以及不同细胞周期肝癌细胞中hENT1的表达水平又有何特点,均不清楚。

近年来研究发现,hENT1的表达水平与肿瘤患者的化疗效果和预后密切相关<sup>[14-17]</sup>。徐建敏等研究发现hENT1是肿瘤细胞内核苷类化疗药物的主要反流通道,下调hENT1的表达水平,可以提高细胞内核苷类化疗药物的浓度,延长药物在细胞内的持续时间,增强化疗效果<sup>[18,19]</sup>。

本研究结果显示,3株肝癌细胞膜上均可见较高的ENT1表达,ENT1在肝癌细胞株中的表达存在普遍性,说明治疗肝癌的核苷类化疗药物有一定的化疗效果。有研究表明,5-氟尿嘧啶及其衍生物用于治疗原发性肝癌的有效率、生存期及半年生存率较仅行对症支持治疗的对照组皆有明显的提高。吉西他滨与5-氟尿嘧啶联合化疗对原发性肝细胞癌远期疗效较好,具有一定的临床使用价值<sup>[20]</sup>。

ENT1 mRNA在3株肝癌细胞中的表达水平均较乳腺癌细胞中的高,说明人肝癌细胞中ENT1 mRNA的表达水平较人乳腺癌细胞出现普遍上调。由于hENT1是核苷类药物主要反流通道,从而不利于核苷类化疗药在肝癌细胞内积聚,药物在细胞内持续的时间相对较短,导致肝癌的化疗效果较乳腺癌差。据报道,5-氟尿嘧啶单药治疗肝癌的有效率多在20%以下,治疗乳腺癌的有效率可达30%-40%。3株肝癌细胞株之间ENT1 mRNA的表达水平存在差异,这说明不同肝癌患者ENT1 mRNA的表达水平存在差异,提示临床上不同肝癌患者对5-氟尿嘧啶化疗效果产生差异及耐药的原因可能与此有关。

Roscovotine是嘌呤类细胞周期依赖性蛋白激酶(cell cycle dependent kinases, CDKs)抑制剂,此化合物及其衍生物对CDKs有特异性的抑制作用而对其他蛋白激酶基本无作用,X射线晶体衍射测定结果表明,Roscovotine是通过与ATP竞争ATP结合位点起到抑制CDKs的作用。我们的

前期研究已证实,利用适宜浓度的CDKs抑制剂Roscovotine抑制CDKs的活性后发现,肝癌细胞周期时相的分布会发生改变<sup>[21]</sup>。因此,我们在前期的研究基础上利用对肝癌细胞生长抑制最有效的Roscovotine浓度(32  $\mu\text{mol/L}$ )作用人肝癌细胞HuH-7,将细胞阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,然后观察ENT1 mRNA的表达情况,结果发现ENT1 mRNA的表达水平明显上调,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示肝癌化疗时,处于G<sub>2</sub>/M期的肝癌细胞,核苷类化疗药更容易在细胞内积聚,药物在细胞内持续的时间更长,此时的化疗效果更好。我们知道,手术后的肝癌患者,大部分癌细胞处于增殖期,即G<sub>2</sub>/M期的细胞占多数,此时的化疗效果最好,提示肝癌术后患者提倡早期化疗。

目前,临床上5-氟尿嘧啶对肝癌的化疗效果并不理想。本研究证实了人肝癌细胞膜上存在ENT1的表达,进一步研究人肝癌细胞膜上CNTs的表达情况,通过调控ENT1的表达,或阻断ENT1的转运,防止细胞内的5-氟尿嘧啶向细胞外反流,同时保持CNTs对5-氟尿嘧啶向细胞内的单向转运功能,提高肝癌细胞内药物浓度是提高肝癌化疗效果的重要思路,有潜在的临床价值。

#### 4 参考文献

- Zhang J, Visser F, King KM, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 85-110
- Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T. Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 749-758
- Procházková A, Liu S, Friess H, Aebi S, Thormann W. Determination of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate in pancreatic cancer cell line and other biological materials using capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2001; 916: 215-224
- Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 2004; 447: 735-743
- Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 2004; 447: 728-734
- Kong W, Engel K, Wang J. Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 63-84
- Visser F, Zhang J, Raborn RT, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. Residue 33 of human equilibrative nucleoside transporter 2 is a functionally important component of both the dipyridamole and nucleoside binding sites. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 1291-1298
- Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, Barbacioru C, Shankavaram U, Dai Z, Reinhold WC, Papp A, Weinstein JN, Sadée W. Membrane transporters

#### ■同行评价

本文选题结合临床面临的问题,设计合理,方法可靠,数据完整,结果可信,具有较好的参考意义。

- and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* 2004; 64: 4294-4301
- 9 Rauchwerger DR, Firby PS, Hedley DW, Moore MJ. Equilibrative-sensitive nucleoside transporter and its role in gemcitabine sensitivity. *Cancer Res* 2000; 60: 6075-6079
  - 10 Smith KM, Ng AM, Yao SY, Labeledz KA, Knaus EE, Wiebe LL, Cass CE, Baldwin SA, Chen XZ, Karpinski E, Young JD. Electrophysiological characterization of a recombinant human Na<sup>+</sup>-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 2004; 558: 807-823
  - 11 Zhang J, Smith KM, Tackaberry T, Visser F, Robins MJ, Nielsen LP, Nowak I, Karpinski E, Baldwin SA, Young JD, Cass CE. Uridine binding and transportability determinants of human concentrative nucleoside transporters. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 830-839
  - 12 Govindarajan R, Endres CJ, Whittington D, LeCluyse E, Pastor-Anglada M, Tse CM, Unadkat JD. Expression and hepatobiliary transport characteristics of the concentrative and equilibrative nucleoside transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G570-G580
  - 13 Cano-Soldado P, Molina-Arcas M, Algueró B, Laráyoz I, Lostao MP, Grandas A, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Compensatory effects of the human nucleoside transporters on the response to nucleoside-derived drugs in breast cancer MCF7 cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 639-648
  - 14 Santini D, Perrone G, Vincenzi B, Lai R, Cass C, Altoni R, Rabitti C, Antinori A, Vecchio F, Morini S, Magistrelli P, Coppola R, Mackey JR, Tonini G. Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) protein is associated with short survival in resected ampullary cancer. *Ann Oncol* 2008; 19: 724-728
  - 15 Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, Lai R, Ammar A, Regine WF, Abrams R, Benson AB, Macdonald J, Cass CE, Dicker AP, Mackey JR. Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009; 136: 187-195
  - 16 Santini D, Vincenzi B, Fratto ME, Perrone G, Lai R, Catalano V, Cass C, Ruffini PA, Spoto C, Muretto P, Rizzo S, Muda AO, Mackey JR, Russo A, Tonini G, Graziano F. Prognostic role of human equilibrative transporter 1 (hENT1) in patients with resected gastric cancer. *J Cell Physiol* 2010; 223: 384-388
  - 17 Mori R, Ishikawa T, Ichikawa Y, Taniguchi K, Matsuyama R, Ueda M, Fujii Y, Endo I, Togo S, Danenberg PV, Shimada H. Human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with the chemosensitivity of gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma and biliary tract carcinoma cells. *Oncol Rep* 2007; 17: 1201-1205
  - 18 陈武强, 刘胜利, 郑杰. RNAi下调hENT1可增强5-氟尿嘧啶对胰腺癌细胞的毒性. *中国药科大学学报* 2007; 38: 360-364
  - 19 徐建敏, 张红刚, 费晓庆, 鞠焜先, 郑杰, 刘胜利. 干扰hENT1表达增加5-FU在胰腺癌SW1990细胞内浓度. *中国药理学通报* 2008; 24: 1351-1355
  - 20 何琼华, 罗健, 罗的的, 陈立军, 刘红兵, 许玉. 吉西他滨、氟尿嘧啶、亚叶酸钙联合羟喜树碱治疗原发性肝癌的初步研究. *中国临床医生* 2010; 38: 34-35
  - 21 马景胜, 王开洋, 邢宏松, 李慧珍, 傅华群. 细胞周期蛋白依赖激酶对肝癌细胞增殖及凋亡的影响. *新医学* 2009; 40: 288-291

编辑 李军亮 电编 张洋

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)

# Conophylline联合Betacellulin- $\delta$ 4对胎猪导管源胰腺干细胞体外诱导分化的促进作用

黄跃南, 郭欣

黄跃南, 哈尔滨医科大学附属二院普外三科 黑龙江省哈尔滨市 150086

郭欣, 哈尔滨医科大学附属一院普外五科 黑龙江省哈尔滨市 150001

黄跃南, 副教授, 副主任医师, 主要从事胰腺干细胞的基础与临床研究。

黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D2007-05

作者贡献分布: 黄跃南与郭欣对此文所作贡献均等; 此课题由黄跃南与郭欣设计; 研究过程由黄跃南与郭欣操作完成; 研究用新试剂及分析工具由黄跃南提供; 数据分析由郭欣完成; 本论文写作由黄跃南与郭欣完成。

通讯作者: 黄跃南, 副教授, 副主任医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属二院普外三科。

dr-huangyuanan@163.com

电话: 0451-86605575

收稿日期: 2011-05-08 修回日期: 2011-06-19

接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-18

## Alkaloid conophylline in combination with betacellulin- $\delta$ 4 promotes the differentiation of fetal porcine pancreatic duct stem cells

Yue-Nan Huang, Xin Guo

Yue-Nan Huang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Xin Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province of China, No. D2007-05

Correspondence to: Associate Professor Yue-Nan Huang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. dr-huangyuanan@163.com

Received: 2011-05-08 Revised: 2011-06-19

Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the impact of alkaloid conophylline (CnP) in combination with betacellulin- $\delta$ 4 (BTC $\delta$ 4) on the differentiation of porcine fetal pancreatic duct stem cells *in vitro*.

**METHODS:** For inducing cell differentiation, porcine fetal pancreatic duct stem cells were cultured in Medium 199 (M199) with CnP and BTC $\delta$ 4, alone or in combination. Then cell vi-

ability was assessed by the trypan blue dye exclusion assay. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry were used to measure the content of insulin released by islet-like cell clusters (ICCs). The expression of PDX-1, Neuro D/Beta2 and insulin mRNAs was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Insulin release in response to glucose was assessed by glucose load test.

**RESULTS:** Conophylline at concentrations below 0.1 g/L showed no marked toxicity toward the ICCs. Either CnP or BTC $\delta$ 4 weakly enhanced the content of insulin, while CnP in combination with BTC $\delta$ 4 synergistically increased cellular insulin content. The expression of PDX-1, insulin and Neuro D/Beta2 mRNAs could be detected in untreated ICCs. After treatment with CnP in combination with BTC $\delta$ 4, the ICCs exhibited a prompt response to 25.0 mmol/L glucose by increasing insulin secretion.

**CONCLUSION:** CnP in combination with BTC $\delta$ 4 potentiated the differentiation of porcine pancreatic duct stem cells in cluster cultures towards  $\beta$ -cells.

**Key Words:** Fetal pig; Pancreatic stem cells; Conophylline; Betacellulin- $\delta$ 4; Insulin

Huang YN, Guo X. Alkaloid conophylline in combination with betacellulin- $\delta$ 4 promotes the differentiation of fetal porcine pancreatic duct stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2109-2115

### 摘要

**目的:** 研究Conophylline(CnP)联合Betacellulin- $\delta$ 4(BTC $\delta$ 4)对胎猪导管源胰腺干细胞的体外诱导分化作用。

**方法:** 在培养基中加入CnP、BTC $\delta$ 4等诱导因子诱导胎猪导管源胰腺干细胞分化, 台盼蓝检测CnP对胰岛样细胞团(islet-like cell cluster, ICC)的毒性, ICC行ELISA、免疫组织化学检

### ■背景资料

随着胰腺干细胞的研究深入, 不仅可以为胰岛移植提供新的材料来源, 同时也能为治疗糖尿病提供新的思路和途径。胰腺导管中存在一类干细胞, 具有多向分化潜能, 通过特定的诱导, 例如添加适当的诱导剂, 可使其想胰岛分泌细胞分化。

### ■同行评议者

石毓君, 副研究员, 四川大学华西医院外科

### ■ 相关报道

研究证实, CnP作用于干细胞并且通过降低Ngn3的表达来将母细胞转化为内分泌细胞. 而BTC $\delta$ 4作用于那些已经分化为内分泌腺的细胞并且将其转化为胰岛素分泌细胞. 他们作用于 $\beta$ 细胞分化过程中的不同步骤, 联合使用产生的效果是可以叠加.

测, 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)检测胰岛素基因、PDX-1等在未诱导、诱导细胞中的表达. 葡萄糖刺激实验检测ICC分泌胰岛素的功能.

**结果:** 用0.1 g/L CnP诱导ICC不显示明显的细胞毒性. 诱导培养4-6 wk, ELISA和免疫组织化学显示CnP联合BTC $\delta$ 4提高了胰岛素分泌细胞量和胰岛素含量; RT-PCR显示提高了PDX-1, neuroD/Beta2, 胰岛素等在ICC中的表达. 葡萄糖刺激实验结果显示, 诱导后, ICC合成、分泌胰岛素的能力显著增强( $P < 0.05$ ).

**结论:** CnP联合BTC $\delta$ 4促进诱导胎猪导管源胰腺干细胞分化为胰岛素分泌细胞, 分化细胞表达 $\beta$ 细胞表面标志并能分泌胰岛素.

**关键词:** 胎猪; 胰腺干细胞; Conophylline; Betacellulin- $\delta$ 4; 胰岛素

黄跃南, 郭欣. Conophylline联合Betacellulin- $\delta$ 4对胎猪导管源胰腺干细胞体外诱导分化的促进作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2109-2115

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2109.asp>

## 0 引言

糖尿病是严重危害人类健康的内分泌代谢性疾病, 近年来其患病率在全球呈现快速增长的趋势, 在大多数国家已成为继心血管疾病和肿瘤之后的第三大疾病. 目前几乎所有 I 型糖尿病和部分 II 型糖尿病患者都需要长期注射胰岛素治疗, 常规治疗方案发生全身血管并发症的危险性较高, 而强化治疗方案虽可使糖尿病并发症的危险性降低, 但也存在容易出现低血糖反应甚至昏迷而危及生命等不容忽视的缺陷<sup>[1-3]</sup>. 2000年, 胰岛移植取得了突破性进展, 来自加拿大Edmonton的研究小组改良了抗免疫排斥的用药方案, 取得连续7例胰岛移植的成功<sup>[4]</sup>. 然而, Edmonton方案中每次移植的胰岛组织需要来自两个或两个以上的供体胰腺, 且移植后需要长期的抗免疫排斥治疗, 因而限制了胰岛移植的广泛开展. 随着胰腺干细胞的研究深入, 不仅可以为胰岛移植提供新的材料来源, 同时也能为治疗糖尿病提供新的思路和途径<sup>[5-7]</sup>. 从理论上讲, 这种方法可以克服目前胰岛移植面临的两大难题, 即供体来源不足和免疫排斥反应. 近年研究发现, 胚胎干细胞和成体多能干细胞均可在体外诱导分化为胰岛素分泌细胞<sup>[8]</sup>. 胰腺导管干细胞是一类存在于胰腺组织, 能自我

更新, 具有多分化潜能的发育早期细胞, 在特定的条件下, 可分化为胰岛细胞<sup>[9]</sup>. 已利用小鼠导管细胞诱导获得胰岛样结构<sup>[10]</sup>. 因为在体外成人胰岛细胞成长有限, 胰岛分离提纯后, 从富含导管的细胞培养为胰岛的能力提供了一个很重要的方法来用于 $\beta$ -cell的替代治疗<sup>[11]</sup>. 猪胰岛异种移植被作为一种治疗糖尿病的备选方案来研究, 他们的胰腺大小和抗原性与人胰腺相似. Conophylline(CnP)是从热带植物小叶狗牙花中提取出来的新的长春碱类衍生物, 在鼠胰腺腺泡癌细胞中, 这种生物碱诱导一种形态学改变, 并且诱导分化为 $\beta$ 细胞<sup>[12]</sup>. CnP促进胎鼠胰腺器官形成和胰腺祖细胞的转化, 并促进在体内体外 $\beta$ 细胞的形成<sup>[13]</sup>. 而且, 生物碱诱导在培养基里培养的胎儿小鼠胰腺组织分化为 $\beta$ 细胞, 并且降低链唑霉素治疗的胎儿小鼠的血糖水平<sup>[13,14]</sup>. 最近发现CnP和BTC $\delta$ 4联用可以较强的诱导胰岛素分泌细胞的分化<sup>[15]</sup>. BTC $\delta$ 4是一种Betacellulin基因的嫁接同种型, 缺少EGF基序的C-loop和跨膜区, 而含有外显子4“跳过”(exon 4 “skipping”)<sup>[16]</sup>. 很有意义的是, BTC $\delta$ 4提高胰岛素含量,  $\beta$ 细胞, ICC数量, 和PDX-1阳性导管细胞<sup>[16]</sup>. CnP作用于干细胞并且通过降低Neurogenin 3(Ngn3)<sup>[17,18]</sup>的表达来将母细胞转化为内分泌细胞. 而BTC $\delta$ 4作用于那些已经分化为内分泌腺的细胞并且将其转化为胰岛素分泌细胞. 他们作用于 $\beta$ 细胞分化过程中的不同步骤, 所以联合使用产生的效果是可以叠加. 本研究中, 我们联合添加CnP和BTC $\delta$ 4诱导胎猪导管源胰腺干细胞, 探索合适的诱导条件, 促使其向胰岛素分泌细胞分化, 并对诱导产物进行形态鉴定和功能检测.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胎猪胰腺, 从哈尔滨哈达屠宰场收集怀孕60-90日龄的长白母猪子宫, 打开怀孕母猪腹腔后结扎子宫两端, 摘取子宫, 尽快送回实验室无菌采集雄性胎猪胰腺组织置于TRIzol试剂中, -70 °C保存备用. Medium 199(Gibco)、胰蛋白酶(sigma美国)、谷氨酰胺glutamine(Merck)、丙酮酸钠、 $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -Me)(Sigma), bFGF、EGF(R&D公司), FBS(Hyclone), 牛血清白蛋白(BSA, Sigma, 美国), 尼克酰胺(nicotamide, NIC, Sigma, 美国), TRIzol试剂(美国Life Technologies公司), M-MLV逆转录试剂盒(Life Technologies, 美国), ELISA试剂盒(Mercodia, 瑞典), 抗猪胰岛素抗体(Mercodia, 瑞典), 鼠抗猪胰岛素抗体

(Dako Cytomation, 丹麦). Cnp参照文献[12]准备. Betacellulin(BTC, Sigma, 美国), 重组人BTC $\delta 4$ 参照文献[13]准备.

## 1.2 方法

1.2.1 细胞分离方法的建立: (1)培养基配制A液: M199加入100 mL/L FBS, 丙酮酸钠(1 mmol/L),  $\beta$ -巯基乙醇(71.5  $\mu$ mol/L), EGF(20  $\mu$ g/L), bFGF(20  $\mu$ g/L), 10 mmol/L NIC, 青霉素100 U/mL, 链霉素100 g/L, HEPES(2 380 mg/L), 碳酸氢盐(2 000 mg/L), *L*-谷氨酰胺(600 mg/L). B液: M199加入200 mL/L FBS, 其余同A液; (2)细胞的分离培养无菌采取胎猪胰腺, 置于0  $^{\circ}$ C的含双抗、无钙、镁磷酸盐缓冲液(PBS(-))中, 剪去周围的脂肪、血管、被膜以及结缔组织, 冲洗3-4遍, 剪为1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm左右的碎块, 用PBS(-)冲洗至溶液清澈后, 放入M199培养基, 然后用冷HBSS冲洗3次, 加入0.1%胶原酶IV 37  $^{\circ}$ C消化, 期间不时剧烈震荡, 用HBSS 4  $^{\circ}$ C条件下冲洗3次, 观察消化情况, 以形成多量直径50-100  $\mu$ m细胞团和单个细胞为宜, 加A液终止消化, 胶原酶IV消化约25-30 min. 再次更换培养A液培养24 h后, 对细胞进行连续的密度梯度离心<sup>[19]</sup>, 取上层(密度量程: 1.062-1.096)和中层(密度量程: 1.096-1.11)细胞备用. 然后, 在37  $^{\circ}$ C低于50 mL/L CO<sub>2</sub>的增湿条件下, 将细胞培养于B液中.

1.2.2 ICC的制备和检测: 配制诱导培养基(C液): M199加入100 mL/L FBS, 丙酮酸钠(1 mmol/L),  $\beta$ -巯基乙醇(71.5  $\mu$ mol/L), EGF(20  $\mu$ g/L), bFGF(20  $\mu$ g/L), 10 mmol/L NIC, Activin-A(10 nmol/L), BSA(1 g/L), 青霉素100 U/mL, 链霉素100 g/L, HEPES(2 380 mg/L), 碳酸氢盐(2 000 mg/L), *L*-谷氨酰胺(600 mg/L). 收集过夜培养的贴壁细胞, 如上述, 以3 $\times$ 10<sup>8</sup>个/L的密度接种于C液. 取200  $\mu$ L悬浮液接种到96孔圆底板在37  $^{\circ}$ C培养. 每3-4 d更换1次培养基. 4-7 d后, 细胞簇形成. 应用trypan blue(台盼蓝)染色检测细胞活力. 5份ICC接种到12孔圆底板. 然后, 分别在24 h和48 h添加各种生物碱浓聚物(CnP、BTC $\delta 4$ ), 随后台盼蓝染色. 每200个细胞计数染色细胞.

1.2.3 ELISA测量胰岛素: 胰岛素分泌实验分析, 接种5份ICC在含1.5 mL培养基的6孔平板里. 培养基分别添加1 nmol/L BTC $\delta 4$ (B), 0.1 g/L CnP(C), 1 nmol/L BTC $\delta 4$ (B)联合0.1 g/L CnP(BC). 每3 d更换1次培养基, 我们同时取上层清液和黏附细胞检测胰岛素分泌情况. 参照说明书, 我们应用ELISA试剂盒检测ICC和胰岛素分

泌量. 上层清液保存在-20  $^{\circ}$ C. 测量胰岛素, 用冰预冷的PBS冲洗, 然后用1 mL缓冲液冲洗. 用酸性的 EtOH(75% EtOH conc. HCl = 1 000 : 15)提取ICC的胰岛素再进行测量.

1.2.4 胰岛素免疫组织检测: 将ICC接种到含1.5 mL培养基的两腔载玻片上. 培养基分别添加1 nmol/L BTC $\delta 4$ (B), 0.1 g/L CnP(C组), 1 nmol/L BTC $\delta 4$ (B组)联合0.1 g/L CnP(BC组). 每3 d更换1次培养基, 每周收获1次细胞. 用40 g/L甲醛固定细胞3 h, 然后用含0.3% Triton X-100的PBS孵育10 min. 下一步, 添加50 mL的3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>阻断5 min. 然后, 载玻片用蒸馏水冲洗, 再用0.03% Triton X-100/PBS室温冲洗5 min. 在含有20%山羊血清/PBS的封闭液培养10 min, 然后, 将鼠抗猪胰岛素抗体置于0.1% BSA的PBS溶液里稀释添加到保温皿, 并将细胞培养在保温皿里150 min. 下一步, 细胞用0.03% Triton X-100/PBS冲洗5 min, 然后室温下与抗鼠抗体共培育1 h. 将DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>缓冲液加入细胞中, 然后室温培养5 min. 下一步, 样品浸泡在0.03% Triton X-100的PBS里以终止反应. PBS冲洗后镜检, 照相, 计算胰岛素阳性细胞在ICC细胞总数里的百分率.

1.2.5 葡萄糖刺激实验: 取诱5 wk后的细胞进行葡萄糖刺激试验. ICC用如上描述的添加化合物的培养方法培养5 wk后, 接种到6孔板. PBS冲洗2-3遍后, 在100 mL/L FBS/M199(5.5 mmol/L葡萄糖)培养3 h. 在含0.1% BSA的M199培养基再培养1 h. 最后, 分别培养在含0.1% BSA的M199的低糖刺激相(5.5 mmol/L葡萄糖)和高糖刺激相(25.0 mmol/L葡萄糖)的培养基里. 收获上层清液后, 用ELISA测量胰岛素释放量, 取未诱导细胞和诱导液做对照. 然后再培养1.5 h. 实验重复3次.

1.2.6 RT-PCR基因表达分析: 应用TRIzol试剂一步法提取胎猪胰腺组织对照、未诱导组、B组、C组、BC组细胞共5组的总RNA, 总RNA经DNase I 37  $^{\circ}$ C消化1 h, 以去除可能污染的痕量基因组DNA, 取2  $\mu$ g RNA用M-MLV逆转录试剂盒将RNA转录成cDNA. 取2  $\mu$ L逆转录产物进行RT-PCR检测. 检测各基因的引物序列为:  $\beta$ -actin基因为内参基因, 上游引物为5'-CCAAAGCCAACCGTGAGA-3', 下游引物为5'-CTCGTTGCCGATGGTGAT-3', 扩增片段长度: 425 bp; PDX-1上游引物为5'-AAGGCTCACGCGTGAAAAGG-3', 下游引物为5'-GTCCTCCTCCTTTTCCAC-3', 长度: 229 bp; 胰岛素上游引物为5'-AGGCTTCGTGAACCAGCAC-3', 下游引物为5'-GAGG

## ■创新亮点

本研究通过添加CnP联合BTC $\delta 4$ 对胎猪导管源胰腺干细胞体外诱导分化, 发现了联合作用促进了导管干细胞分化为胰岛素分泌细胞, 为阐明胰腺导管干细胞定向分化为 $\beta$ 细胞的机制奠定了基础.

### 应用要点

本研究发现了CnP联合BTC84促进胎猪导管源胰腺干细胞体外诱导分化为胰岛素分泌细胞, 选择性地扩增胰腺干细胞为治疗糖尿病患者胰岛素不足, 提供充足的有功能的 $\beta$ 细胞有着非常广阔的前景.

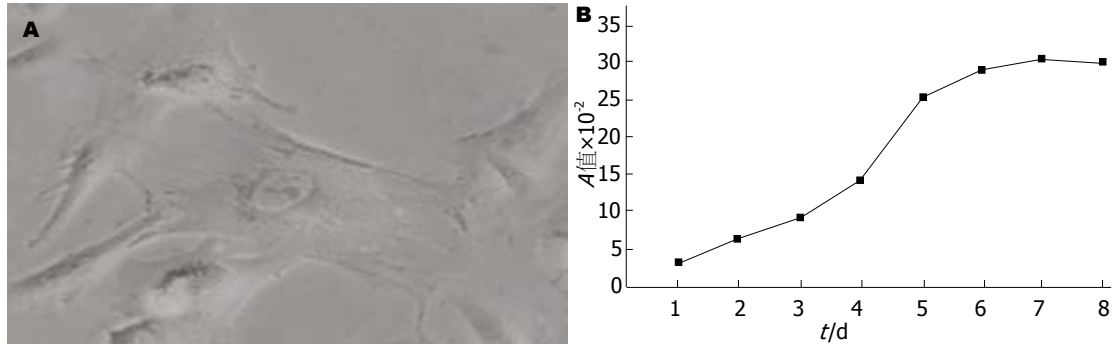


图1 胎猪胰腺干细胞生长特性. A: 胎猪胰腺干细胞呈多角形或梭形; B: 细胞生长曲线.

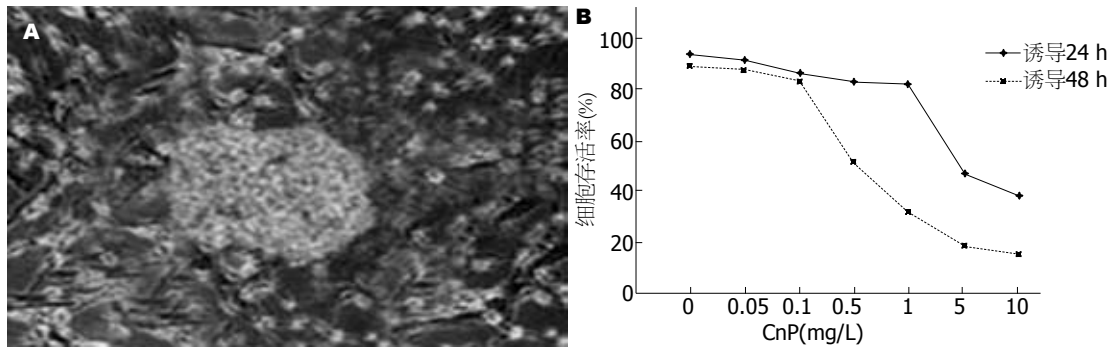


图2 ICC形成及毒性分析. A: 诱导2 wk后, ICC密集; B: CnP对ICC的细胞毒性检测.

GAACAGATGCTGGTGC-3', 长度: 233 bp; 葡萄糖转运体2(glucose transporter type 2, Glut-2)上游引物为5'-TGTGCCATCTTCATGTCCG-3', 下游引物为5'-AATTGCGGGTCCAGTTGCT-3', 长度: 208 bp; Ngn3上游引物为5'-CGTACCGGG AACAGCGCG-3', 下游引物为5'-GCGTCTCTA TCTTGGTGAGT-3', 长度: 251 bp; CK19上游引物: 5'-TGCTACCAGTTGACAAGAGC-3', 下游引物: 5'-GGCACCAAGAATCTTGTAACC-3', 长度: 299 bp; NeuroD/Beta2上游引物为5'-CTGTG CACCCCTACTTTAC-3', 下游引物为5'-TCTCA AACTCGGCGGACGG-3', 长度: 251 bp. PCR反应条件如下:  $\beta$ -actin, 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环35次; 胰岛素, PDX-1, Ngn3, CK19和 NeuroD/Beta2, 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环35次; Glut-2, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环35次; 所有反应均为94 °C 预变性4 min, 72 °C 延伸10 min. 取PCR扩增产物1.5%琼脂糖凝胶电泳分析, 照相并记录.

**统计学处理** 实验数据采用mean $\pm$ SD形式表示, 使用SPSS13.0统计软件进行数据分析, 统计学处理采用标准差分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义上的显著性差异.

## 2 结果

**2.1 胎猪胰腺干细胞的生长特性** 获取5只胎猪的导管源胰腺干细胞, 用于本实验. 胎猪胰腺干细胞形态为多角形或梭形(图1A), 每6-7 d传代1次; 生长曲线显示: 该细胞在接种后1-3 d生长缓慢, 3-6 d进入对数增长期, 随后进入平台期(图1B).

### 2.2 ICC形成及鉴定

**2.2.1 ICC的检测:** 胎猪胰腺干细胞传代培养后, 大量细胞在头4 d增殖, 形成悬浮细胞簇, 并且增殖形成正常组织、胰岛样结构. 待细胞生长至50%-60%融合时进行诱导分化, 诱导1 wk后, 开始出现具有立体三维结构的ICC, 然后将每个细胞簇接种到圆底平板再培养1 wk; 诱导至2 wk左右, ICC增多, 并且更加致密(图2A). 用不同浓度的CnP诱导ICC, 分别诱导24 h(菱形)和48 h(正方形). 然后, 应用台盼蓝染色检测细胞毒性. 重复3次计算平均值. 用0.1 g/L浓度以下的CnP诱导ICC 48 h后并未显示明显的细胞毒性(图2B). 因此, 以后的实验使用CnP的浓度为0.1 g/L.

**2.2.2 ELISA结果:** 在6 wk内, BTC84单独使用提高胰岛素分泌细胞的活性不明显; CnP单独使用提高胰岛素分泌细胞的活性较BTC84明显; 当联合使用时, 显著提高了ICC向胰岛素分泌细胞

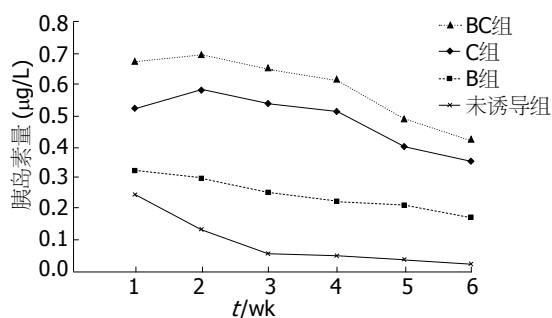


图3 胰岛素分泌。

分化的能力(图3)。

2.2.3 免疫组织化学结果: CnP和BTC $\delta 4$  1 wk 1次单独或联合诱导ICC, 直到第3周, 免疫组织化学检测ICC的胰岛素表达。细胞经CnP、BTC $\delta 4$ 联合诱导培养3 wk后, CnP单独诱导比BTC $\delta 4$ 单独诱导较强的促进了干细胞分化为胰岛素分泌细胞, 而联合作用比单独诱导作用更强。CnP、BTC $\delta 4$ 联合治疗3 wk的细胞里胰岛素阳性细胞平均数与正常对照组有显著差异( $P < 0.01$ )。而CnP、BTC $\delta 4$ 单独诱导3 wk后, 胰岛素阳性细胞与正常组无显著差异( $P > 0.05$ )。继续诱导3 wk后发现, 胰岛素分泌细胞的活性逐渐下降(图4)。

2.2.4 RT-PCR检测结果: 在CnP、BTC $\delta 4$ 联合诱导1 wk以后的细胞检测到胰岛素转录物弱阳性。我们进一步也检测了诱导2 wk后, 各基因的表达水平, 包括胰岛素、PDX-1、CK19、Ngn3、NeuroD/Beta2、Glut-2等。CnP、BTC $\delta 4$ 联合诱导的基因表达最强, 其次是CnP诱导治疗的, BTC $\delta 4$ 单独治疗的最弱(图5)。

2.2.5 糖刺激胰岛素释放反应: ICC在含有CnP、BTC $\delta 4$ 单独或联合诱导的无糖培养基里预培养5 wk, 然后暴露在葡萄糖(5.5 mmol/L或25.0 mmol/L)里。ELISA检测胰岛素分泌量。对照组培养基CnP、BTC $\delta 4$ 单独诱导的培养基里的细胞几乎对葡萄糖不反应, 几乎无胰岛素释放。然而, 在CnP、BTC $\delta 4$ 联合治疗后, ICC对25.0 mmol/L葡萄糖迅速反应(图6)。

### 3 讨论

糖尿病是一种常见的内分泌疾病, 是因为胰岛素绝对或相对不足或靶细胞对胰岛素敏感性降低引起以糖代谢紊乱为主, 继发脂肪、水、电解质代谢障碍<sup>[8]</sup>。糖尿病分为胰岛素依赖型糖尿病(IDDM又称I型)和非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM又称II型)。II型糖尿病的主要特征是: 周围组织的胰岛素抵抗和胰岛分泌胰岛素能力

降低<sup>[20]</sup>。 $\beta$ 细胞多半在胎儿时期分化而来, 而成人胰腺分化复制很慢。因此,  $\beta$ 细胞的分化能力恢复可能作为治疗II型糖尿病有用的方法<sup>[21,22]</sup>。另一方面, 胰岛素分泌细胞的移植可能是I型糖尿病再生治疗的方法。虽然 $\beta$ 细胞的移植是治疗糖尿病的重要希望, 但是人胰腺供体的缺乏和移植后的排斥反应限制了同种移植的临床应用。最近, 大量研究证实了多潜能细胞可以调控分化为再生治疗细胞。因为猪的胰腺大小和抗原性与人胰腺相似, 所以猪胰岛异种移植被作为一种治疗糖尿病的备选方案来研究。对于糖尿病治疗, 猪胰岛细胞已经被考虑作为最有可能的用于移植的胰岛素分泌细胞的潜在资源。

CnP具有诱导胰腺前体细胞模型-AR42J细胞体外分化成胰岛素分泌细胞的能力, 并且和activin A相比, CnP不会诱导细胞凋亡, 被认为是一种神奇的植物诱导剂<sup>[14]</sup>。由CnP、BTC $\delta 4$ 单独诱导或联合诱导产生的主要效果是由位于胰腺导管的干细胞产生的新生的 $\beta$ 细胞的刺激作用而不是已有 $\beta$ 细胞的应答<sup>[17,18,23]</sup>。CnP和BTC $\delta 4$ 单独诱导干细胞均能起一定诱导分化作用, 而这两种不同的因素的作用是可以相互叠加的。CnP和BTC $\delta 4$ 的作用点是不同的<sup>[17,18]</sup>。CnP作用于干细胞并且通过降低Ngn3的表达来将干细胞转化为内分泌细胞。而BTC $\delta 4$ 作用于那些已经分化为内分泌腺的细胞并且将其转化为胰岛素分泌细胞。他们分别作用于 $\beta$ 细胞分化过程中的不同步骤, 功效是可以叠加的, 故本实验设计CnP联合BTC $\delta 4$ 诱导胎猪导管源胰腺干细胞。NIC能协同CnP较大程度提高胰岛素分泌细胞生成<sup>[24]</sup>, HGF能增加胰岛素量, 促进胰岛增殖, 诱导细胞转分化产生胰岛素, 故本实验联合添加NIC、HGF。

本实验采用以M199为基础培养液, 联合添加CnP、BTC $\delta 4$ 、HGF、NIC等诱导因子, 诱导胎猪导管源胰腺干细胞定向分化为胰岛素分泌细胞; ELISA、免疫组织化学检测不同诱导组ICC内胰岛素含量, 并以不同浓度葡萄糖刺激胰岛素分泌细胞分泌胰岛素。结果证明在诱导14-18 d后细胞可达到最大程度的成熟, 诱导时间短于6 d达不到诱导效果, 但诱导时间过长细胞会大量漂浮死亡。Glut-2是存在于 $\beta$ 细胞膜内的一种特殊的跨膜转运蛋白, 可以将葡萄糖转运入细胞内, 故又称为“葡萄糖感受器”。细胞表达Glut-2, 显示细胞具有葡萄糖感受能力及潜在的分泌胰岛素的功能<sup>[25]</sup>。本实验Glut-2表达阳性, 说明所获得的细胞具有潜在的分泌胰岛素

■同行评价  
本文创新性较好, 有一定的理论和实际价值。

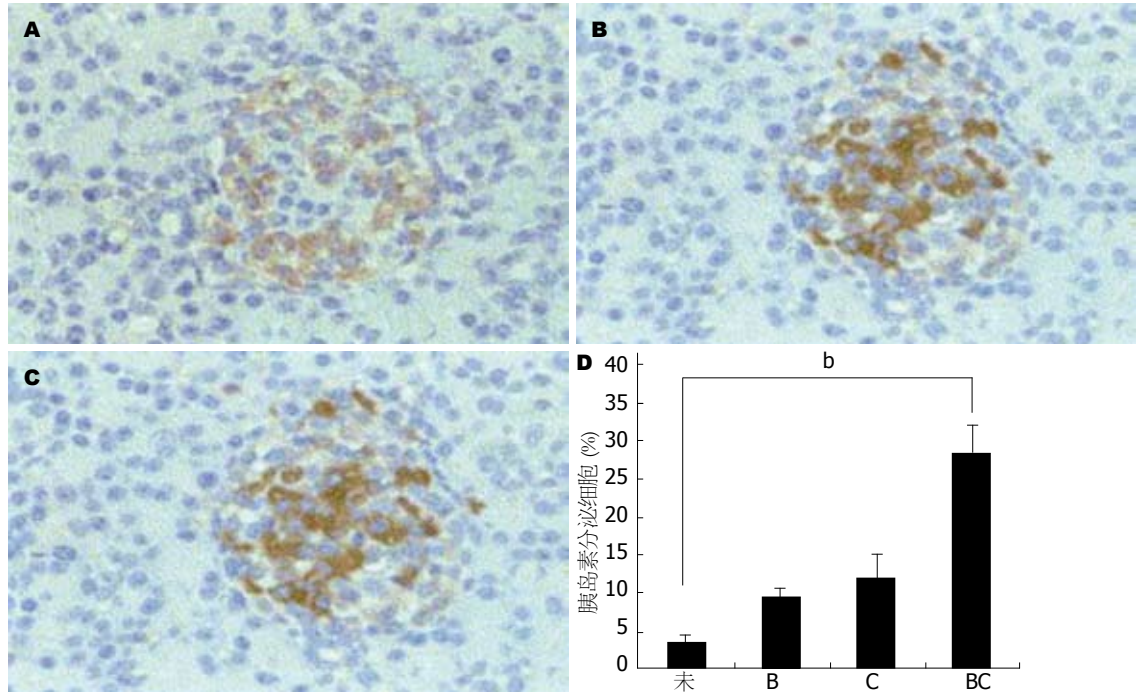


图 4 各组细胞免疫组织化学结果. A: CnP诱导组; B: BTCδ4诱导组; C: CnP联合BTCδ4诱导组; D: 各组胰岛素分泌细胞量; 未: 未诱导组; B组: BTCδ4诱导组; C组: CnP诱导组; BC组: CnP联合BTCδ4诱导组. <sup>b</sup>*P*<0.01.

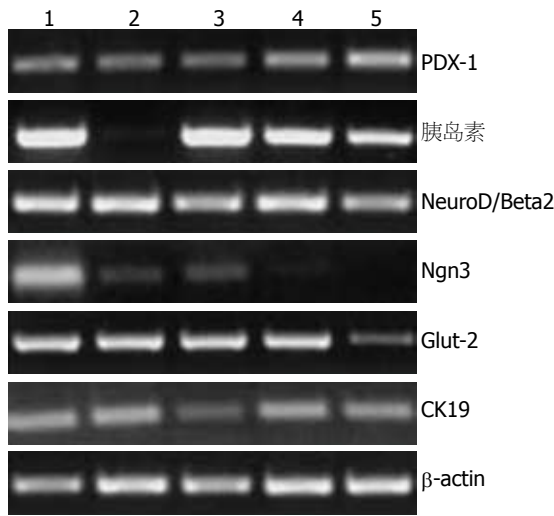


图 5 CnP、BTCδ4单独或联合诱导ICC 2 wk后的转录因子表达结果. 1: 胎猪胰腺组织对照; 2: 未诱导组; 3: B组; 4: C组; 5: BC组.

的功能. 应用RT-PCR检测分离获得的细胞, 胰岛素表达阴性, 证明我们所分离获得的细胞不含胰岛细胞. 检测诱导形成的胰岛素分泌细胞具有对不同浓度葡萄糖不同的反应性, 25.0 mmol/L葡萄糖刺激胰岛素释放敏感. 用CnP和BTCδ4进行诱导实际上增加了ICC的数目和大小, 但其大小仍小于正常值, 提示ICC的形成是非常有效的, 但他们并不能相应地成长为正常大小的β细胞岛. 可能有一些不清楚的因素参与ICC的形成, 仍需要进一步研究提高正常β细胞岛的成功率.

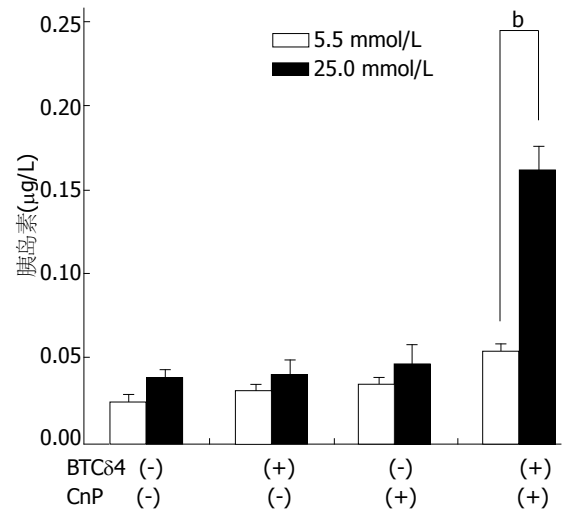


图 6 葡萄糖诱导后胰岛素分泌量检测结果. <sup>b</sup>*P*<0.01.

总之, CnP联合BTCδ4诱导胎猪导管源胰腺干细胞, 体外可分化为胰岛素分泌细胞, 提高其体外诱导分化效率, 对葡萄糖刺激敏感. 如能解决异种细胞移植时的免疫排斥问题, 便可作为一种理想的供体细胞来源, 解决胰岛细胞移植时供体细胞不足的问题, 从而使胰岛细胞移植治疗胰岛素依赖的糖尿病患者成为可能.

#### 4 参考文献

1 Yamada S, Kojima I. Regenerative medicine of the pancreatic beta cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 218-226

- 2 Páth G, Seufert J. [Current status and perspectives of stem cell therapy for the treatment of diabetes mellitus]. *Med Klin (Munich)* 2003; 98: 277-282
- 3 Minami K, Okuno M, Miyawaki K, Seino S. [Regenerative medicine of the pancreas]. *Nippon Rinsho* 2003; 61: 504-508
- 4 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238
- 5 Kume S. Stem-cell-based approaches for regenerative medicine. *Dev Growth Differ* 2005; 47: 393-402
- 6 Soria B, Roche E, Reig JA, Martin F. Generation of insulin-producing cells from stem cells. *Novartis Found Symp* 2005; 265: 158-167; discussion 167-173, 204-211
- 7 Soria B, Bedoya FJ, Martin F. Gastrointestinal stem cells. I. Pancreatic stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G177-G180
- 8 Brubaker PL, Drucker DJ. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology* 2004; 145: 2653-2659
- 9 郭欣, 李国立, 黄跃南, 吴德全, 于洪亮, 杨茂鹏, 关文增. 成体胰腺干细胞基础研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 422-428
- 10 Edlund H. Pancreas: how to get there from the gut? *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 663-668
- 11 Noguchi H, Naziruddin B, Jackson A, Shimoda M, Ikemoto T, Fujita Y, Chujo D, Takita M, Kobayashi N, Onaca N, Hayashi S, Levy MF, Matsumoto S. Characterization of human pancreatic progenitor cells. *Cell Transplant* 2010; 19: 879-886
- 12 Umezawa K, Hiroki A, Kawakami M, Naka H, Takei I, Ogata T, Kojima I, Koyano T, Kowithayakorn T, Pang HS, Kam TS. Induction of insulin production in rat pancreatic acinar carcinoma cells by conophylline. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 341-350
- 13 Ogata T, Li L, Yamada S, Yamamoto Y, Tanaka Y, Takei I, Umezawa K, Kojima I. Promotion of beta-cell differentiation by conophylline in fetal and neonatal rat pancreas. *Diabetes* 2004; 53: 2596-2602
- 14 Kojima I, Umezawa K. Conophylline: a novel differentiation inducer for pancreatic beta cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 923-930
- 15 Hisanaga E, Park KY, Yamada S, Hashimoto H, Takeuchi T, Mori M, Seno M, Umezawa K, Takei I, Kojima I. A simple method to induce differentiation of murine bone marrow mesenchymal cells to insulin-producing cells using conophylline and betacellulin-delta4. *Endocr J* 2008; 55: 535-543
- 16 Ogata T, Dunbar AJ, Yamamoto Y, Tanaka Y, Seno M, Kojima I. Betacellulin-delta4, a novel differentiation factor for pancreatic beta-cells, ameliorates glucose intolerance in streptozotocin-treated rats. *Endocrinology* 2005; 146: 4673-4681
- 17 Kitamura R, Ogata T, Tanaka Y, Motoyoshi K, Seno M, Takei I, Umezawa K, Kojima I. Conophylline and betacellulin-delta4: an effective combination of differentiation factors for pancreatic beta cells. *Endocr J* 2007; 54: 255-264
- 18 Watada H. Neurogenin 3 is a key transcription factor for differentiation of the endocrine pancreas. *Endocr J* 2004; 51: 255-264
- 19 Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7999-8004
- 20 Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15: 539-553
- 21 Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 102-110
- 22 Ritzel RA, Butler AE, Rizza RA, Veldhuis JD, Butler PC. Relationship between beta-cell mass and fasting blood glucose concentration in humans. *Diabetes Care* 2006; 29: 717-718
- 23 Kodera T, Yamada S, Yamamoto Y, Hara A, Tanaka Y, Seno M, Umezawa K, Takei I, Kojima I. Administration of conophylline and betacellulin-delta4 increases the beta-cell mass in neonatal streptozotocin-treated rats. *Endocr J* 2009; 56: 799-806
- 24 Kawakami M, Hirayama A, Tsuchiya K, Ohgawara H, Nakamura M, Umezawa K. Promotion of beta-cell differentiation by the alkaloid conophylline in porcine pancreatic endocrine cells. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 226-231
- 25 徐彩棉, 赵瑞景, 朱铁年. PDX-1及其对胰岛 $\beta$ 细胞的调控作用. *国际病理科学与临床杂志* 2006; 26: 55-58

编辑 曹丽鸥 电编 张洋

# DKK1在食管癌组织中的表达及其生物学功能

李书军, 和宇峥, 吕宝雷, 牛秀兰, 崔爱荣, 李永军, 张合林

## ■背景资料

Dkkopf 1(DKK1)是Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中重要的抑制因子,在肿瘤进程中的作用已引起广泛关注,DKK1在不同的肿瘤中表达水平有很大的差异,其作用机制尚未清楚.

李书军, 和宇峥, 吕宝雷, 李永军, 张合林, 河北医科大学第二医院胸外科 河北省石家庄市 050051

牛秀兰, 河北省涉县中医院肿瘤科 河北省邯郸市 056400  
崔爱荣, 河北医科大学第二医院病理科 河北省石家庄市 050051

李书军, 副教授, 主要从事肺癌、食管癌的临床和基础研究.

作者贡献分布: 此课题由李书军、和宇峥及张合林设计并撰写论文; 研究过程中由吕宝雷、牛秀兰及李永军操作完成, 并进行了数据的分析、处理; 课题中的免疫组织化学和免疫荧光由崔爱荣完成.

通讯作者: 张合林, 教授, 医学博士, 050051, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院胸外科. thoracic20081069@126.com  
电话: 0311-66002333

收稿日期: 2011-03-06 修回日期: 2011-05-26

接受日期: 2011-06-08 在线出版日期: 2011-07-18

## Expression and biological role of DKK1 in human esophageal cancer

Shu-Jun Li, Yu-Zheng He, Bao-Lei Lv, Xiu-Lan Niu, Ai-Rong Cui, Li-Yong Jun, Zhang-He Lin

Shu-Jun Li, Yu-Zheng He, Bao-Lei Lv, Li-Yong Jun, Zhang-He Lin, Department of Thoracic Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Xiu-Lan Niu, Department of Oncology, Shexian Chinese Medicine Hospital, Handan 056400, Hebei Province, China  
Ai-Rong Cui, Department of Pathology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Zhang-He Lin, Department of Thoracic Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China. thoracic20081069@126.com

Received: 2011-03-06 Revised: 2011-05-26

Accepted: 2011-06-08 Published online: 2011-07-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of dikkopf-1 (DKK1) in esophageal carcinoma tissue and four esophageal carcinoma cell lines and to explore the impact of DKK1 overexpression on cell cycle and invasion in EC9706 cell line.

**METHODS:** The expression of DKK1 in esophageal carcinoma tissues was detected by immunohistochemistry, and the distribution of DKK1 in esophageal carcinoma cell line TE13 was observed by immunofluorescence. Western blot was used to investigate the expression of DKK1 in esophageal carcinoma tissues and matched

normal esophageal tissues, as well as in four esophageal carcinoma cell lines. A eukaryotic expression vector of DKK1 was constructed and transfected into EC9706 cells to evaluate the impact of DKK1 overexpression on cell cycle by flow cytometry and on cell invasion by Boyden chamber assay.

**RESULTS:** DKK1 was highly expressed in esophageal carcinoma tissues and mainly distributed in the cytoplasm of TE13 cells. The expression of DKK1 protein in carcinoma was obviously higher than that in matched normal esophageal tissue. Differential expression of DKK1 was observed in four esophageal carcinoma cell lines. Overexpression of DKK1 in EC9706 cells decreased the percentage of cells in G0/G1 phase and increased the percentage of cells in S phase and the number of cells penetrating through the membrane of Boyden chamber ( $252 \pm 6.71$  vs  $99.18 \pm 3.02$ ;  $252 \pm 6.71$  vs  $112.33 \pm 3.21$ , all  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** DKK1 is overexpressed in esophageal carcinoma. Overexpression of DKK1 in EC9706 cells remarkably promoted cell invasion and progression from G1 phase to S phase.

**Key Words:** Esophageal carcinoma; Dikkopf-1; Eukaryotic expression vector; Invasion

Li SJ, He YZ, Lv BL, Niu XL, Cui AR, Li YJ, Zhang HL. Expression and biological role of DKK1 in human esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2116-2122

## 摘要

**目的:** 探讨Dikkopf-1(DKK1)对食管癌细胞周期、侵袭能力的影响.

**方法:** 采用免疫组织化学的方法检测DKK1在食管癌组织中的表达,并通过免疫荧光对DKK1在细胞中的分布进行定位分析;应用Western blot检测食管癌组织及其配对的正常食管组织和4株食管癌细胞系中DKK1蛋白表达水平.通过构建过表达DKK1的真核表达载体,将其转染到食管癌EC9706细胞中,观察细

## ■同行评议者

欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

胞周期和侵袭能力的改变.

**结果:** 免疫组织化学检测食管癌组织中DKK1阳性表达率为83.34%, 免疫荧光结果显示DKK1主要呈细颗粒状散在分布于细胞质中. Western blot检测表明DKK1在食管癌组织中的表达明显高于配对的正常食管组织; 在4株食管癌细胞系中均有不同程度的表达. 在食管癌细胞系EC9706中过表达DKK1, S期细胞所占比例明显升高(57.25% vs 45.87%,  $P < 0.05$ ), 在Boyden小室中穿透基底膜的细胞数目也明显增加( $252 \pm 6.71$  vs  $99.18 \pm 3.02$ ;  $252 \pm 6.71$  vs  $112.33 \pm 3.21$ , 均 $P < 0.01$ ).

**结论:** DKK1在食管癌组织中呈高表达, 并且在4个食管癌细胞系中均有表达, 在EC9706细胞中过表达DKK1后能够促进细胞由G0/G1期向S期转变, 同时能够增加细胞的侵袭能力.

**关键词:** 食管癌; Dkkopf-1; 真核表达载体; 侵袭

李书军, 和宇峥, 吕宝雷, 牛秀兰, 崔爱荣, 李永军, 张合林. DKK1在食管癌组织中的表达及其生物学功能. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2116-2122  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2116.asp>

## 0 引言

食管癌是发病率和死亡率较高的消化系恶性肿瘤之一, 尽管采用以手术为主的放疗、化疗等综合治疗已明显提高了患者的5年生存率, 食管癌转移仍是影响预后的主要因素, 研究肿瘤发生转移的分子机制成为当前的热点<sup>[1]</sup>. Dkkopf 1(DKK1)是Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中重要抑制因子, 在肿瘤进程中的作用已引起广泛关注, DKK1在不同的肿瘤中表达水平有很大的差异, 其作用机制尚未清楚<sup>[2-7]</sup>. 本研究在蛋白质水平对食管癌组织以及4株食管癌细胞株进行检测, 探讨其在食管癌转移过程中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 食管癌及配对的正常食管组织来自河北医科大学第二医院胸外科2006-06/2008-06手术切除的138例食管癌患者. 人食管癌细胞株由天津市胸科医院张逊教授惠赠, 包括KYSE-150、KYSE-510、EC9706和TE13. DKK1表达质粒pCMV-Tag-2b由河北医科大学病理教研室张祥宏教授惠赠. 限制性内切酶BamH I、EcoR I, T4 DNA连接酶, Taq DNA聚合酶、蛋白Marker和碘化丙啶(PI)购自Promega

公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自Qiagen公司; RPMI 1640、新生小牛血清(newborn calf serum, NBS)及Lipofectmine2000购自Gibco公司; DKK1兔抗人单克隆抗体及兔抗人 $\beta$ -actin多克隆抗体购自Invitrogen公司; Boyden小室购自美国Millipore公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 人食管癌细胞用含100 mL/L NBS、100 mg/L链霉素、100 kU/L青霉素的RPMI-1640培养, 在37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养. 细胞进入对数生长期后, 用PBS清洗2次, 0.25%胰酶消化, 制备成 $2.5 \times 10^8$ /L单细胞悬液, 接种到6孔板内培养.

**1.2.2 免疫组织化学和免疫荧光检测DKK1表达:** 组织化学检测食管癌石蜡切片中DKK1的表达. 石蜡切片抗原热修复后, 按照说明书采用SP免疫组织化学法进行操作, 用PBS代替一抗作阴性对照, 已知阳性片作阳性对照. 染色结果由2名病理科医生采用双盲原则评定. 浅黄至棕黄色为阳性细胞<sup>[8]</sup>.

在6孔板中水平置入载玻片进行细胞培养, 当细胞生长达40%-50%时取出载玻片, 4%多聚甲醛固定细胞, 用0.1% Triton X-100 PBS溶液浸透5 min, 然后加入含100 mL/L山羊血清的PBS室温封闭30 min. 用含有30% BSA的PBS 1:100稀释一抗, 室温下孵育60 min后用PBS洗5 min $\times$ 3次, 罗丹明标记的二抗在室温下反应60 min进行染色, 再用PBS洗5 min $\times$ 3次, 用DAPI对细胞核进行染色, 最后在激光共聚焦显微镜下进行观察.

**1.2.3 Western blot检测DKK1的表达:** 分析4例患者的食管癌组织与配对的正常组织中DKK1表达. 收集进入对数生长期的人食管癌细胞, 向6孔板中加入RIPA在冰上进行裂解(300  $\mu$ L/孔, 其中PMSF浓度为0.1%), 30 min后将其收集在1.5 mL EP管中, 4 °C, 15 000 r/min离心15 min, 收集上清液用BCA法测定蛋白浓度. 组织蛋白提取时, 首先在液氮中研磨成粉末状, 再加入RIPA裂解, 其余步骤同细胞蛋白提取. 每个样品取50  $\mu$ g蛋白进行10% SDS-PAGE胶电泳, 蛋白电转移到PVDF膜上; 5%脱脂奶粉4 °C过夜封闭, 用DKK1的兔抗人单克隆一抗(1:500)室温下孵育2 h, 然后用过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:5000稀释)室温下孵育30 min<sup>[7]</sup>, 以 $\beta$ -actin为内参, 用Bandscan5.0软件分析蛋白条带总灰度值, 检测表达差异.

### ■ 研发前沿

对于DKK1在不同肿瘤中的表达差异已有较多报道, 但对于在肿瘤中的具体作用机制及功能的研究报道较少, 尤其在食管癌中的报道较少.

## ■ 相关报道

Sikandar最新报道了DKK1对细胞周期和细胞凋亡的调控作用。

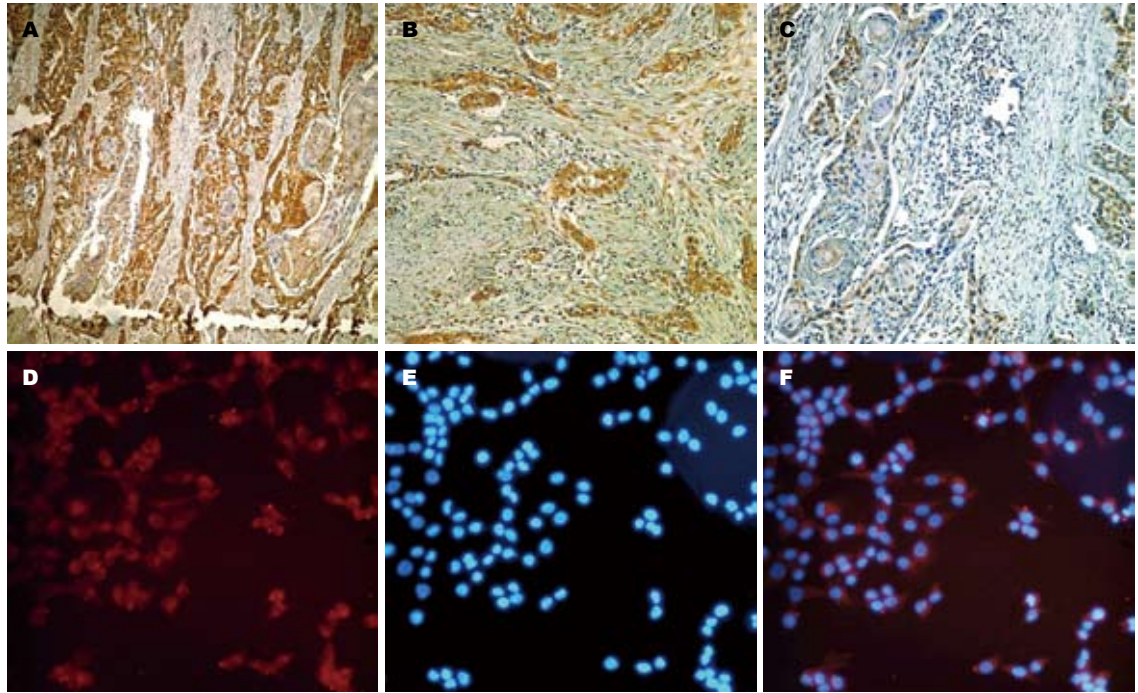


图1 免疫组织化学染色检测DKK1在食管癌组织中的表达( $\times 100$ )。A: DKK1在食管癌中强表达; B: DKK1在食管癌中弱表达; C: DKK1在食管癌中不表达; D: DKK1在食管癌中主要分布在细胞质中(罗丹明染色); E: 细胞核(DAPI染色); F: D+E。

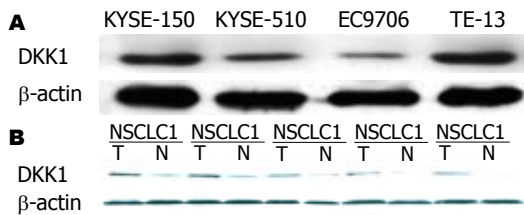


图2 Western blot检测DKK1在食管癌中的表达。A: DKK1在4株食管癌中的表达; B: DKK1在食管癌组织和配对的远癌正常组织中表达。T: 癌组织; N: 正常组织。

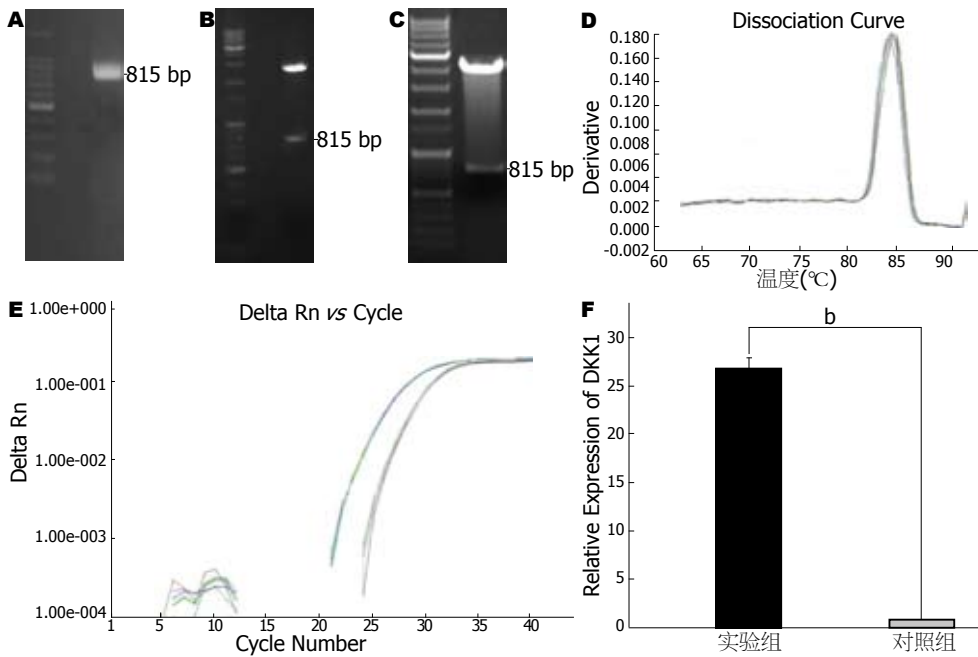
1.2.4 DKK1表达载体的构建: 根据DKK1在GeneBank中mRNA(NM: 012242.2)的序列, 设计PCR引物, Forward: 5'-TGGATCCATGATGGCTCTGGGCGCAGCGGGAG-3', Reverse: 5'-CGAATCTTCTAGTGTCTCTGACAAGTGTGAAGCCTA GAAG-3', 在5'端分别引入酶切位点*Bam*H I 和*Eco*R I, PCR产物的大小为815 bp。扩增的产物与pMD-18T载体连接, 构建的质粒进行*Bam*H I-*Eco*R I 双酶切鉴定, 插入正确的片段亚克隆到pCMV-Tag-2b载体上, 构建成DKK1表达载体pCMV-Tag-2b-DKK1, 再进行酶切鉴定和测序分析。

1.2.5 Real-time PCR检测DKK1的mRNA变化: 将构建的DKK1表达载体pCMV-Tag-2b-DKK1和空载体pCMV-Tag-2b分别转染食管癌细胞EC9706, 继续培养48 h后收集细胞, TRIzol法提取总RNA, 取1  $\mu$ g总RNA用随机引物反转录为

cDNA, Real-time PCR扩增DKK1基因, 引物序列: Forward 5'-CAACGCTATCAAGAACCTGC-3', Reverse: 5'-GATCTTGGACCAGAAGTGTC-3'; 内参GAPDH引物序列为: Forward: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3', Reverse: 5'-TGGXGTGTGAACCACGAGAA-3'。条件为: 95  $^{\circ}$ C, 10 min预变性, 95  $^{\circ}$ C变性5 s, 60  $^{\circ}$ C退火34 s, 74  $^{\circ}$ C荧光检测3 s, 重复40个循环。70  $^{\circ}$ C-95  $^{\circ}$ C绘制熔解曲线, 使用SYBR Green检测荧光改变, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值比较两组之间差异, 并进行数据分析。

1.2.6 流式细胞术分析细胞周期: 将人食管癌细胞EC9706接种到6孔板中, 分为转染pCMV Tag-2b-DKK1(实验组)和pCMV-Tag-2b(对照组)两组, 每组设3个复孔。细胞转染48 h后, 消化细胞制备成单细胞悬液, 4  $^{\circ}$ C, 1 000 r/min $\times$ 5 min离心后再悬浮2次, 400目滤网过滤细胞悬液, 离心后用750 mL/L乙醇1 mL固定细胞18 h, 之后用PBS重悬细胞, 4  $^{\circ}$ C, 1 000 r/min $\times$ 5 min离心后在悬浮2次, 200  $\mu$ L RNase A(1 g/L)在37  $^{\circ}$ C孵育30 min, 加入800  $\mu$ L PI染色液混匀后4  $^{\circ}$ C避光染色30 min。在流式细胞仪上检测各个时相的细胞分布。

1.2.7 DKK1对食管癌细胞侵袭能力的影响: 人食管癌EC9706细胞接种到12孔板中, 细胞融合度为80%时进行转染, 分为转染pCMV-Tag-2b-



**■ 创新盘点**  
本文主要对DKK1在食管癌细胞中增殖、细胞周期和侵袭能力进行了探讨。

图3 过表达DKK1重组质粒的构建. A: DKK1从基因组中扩增出的产物, 大小为815 bp; B: 扩增产物与T载体连接后进行EcoR I -BamH I 双酶切后电泳; C: 插入片段DKK1亚克隆到pCMV-Tag-2b后进行EcoR I -BamH I 双酶切后电泳; D: Real-time PCR检测食管癌EC9706细胞转染pCMV-Tag-2b后DKK1的表达; E: Real-time PCR检测食管癌EC9706细胞转染pCMV-Tag-2b-DKK1后DKK1的表达; F: Real-time PCR结果的统计学分析. <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

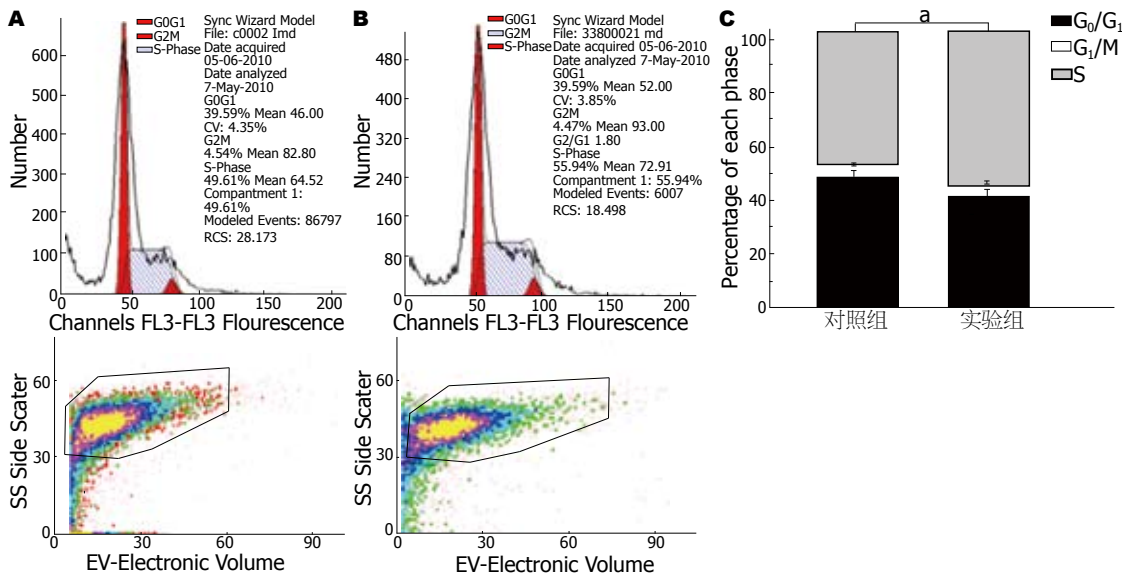


图4 DKK1对EC9706细胞周期的影响. A: 对照组; B: 实验组; C: S期细胞的统计学分析. <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

DKK1(实验组)、pCMV-Tag-2b(对照组)和没有转染载体的空白组. 实验前用300  $\mu$ L DMEM水化Boyden小室. 转染EC9706细胞18 h后用Opti-MEM重悬细胞, 调整浓度为 $3 \times 10^8$ /L, 取300  $\mu$ L单细胞悬液接种到上室内; 下室内为500  $\mu$ L的含100 mL/L NBS的RPMI-1640培养基, 37  $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内培养48 h. 取出Boyden小室, 移走上室内的培养液, 用棉棒将上室内未穿膜的细胞轻轻刮掉, 置于0.1%结晶紫染色液中30

min; 取出小室, 用蒸馏水漂洗干净<sup>[9]</sup>; 镜下观察并统计各组穿膜细胞数并进行统计分析.

## 2 结果

2.1 免疫组织化学和免疫荧光检测DKK1在食管癌组织和食管癌细胞系中表达 通过免疫组织化学分析了138例手术切除的食管癌标本中, DKK1强阳性表达88例(63.77%), 弱阳性表达27例(19.57%), 阴性表达23例(16.66%), DKK1在食

### 应用要点

本研究针对DKK1在食管癌中的表达做出了分析,并且在食管癌细胞株中进行了过表达后研究癌细胞增殖、细胞周期和侵袭能力的改变,今后的研究中其将深入探讨作用机制,有可能成为肿瘤生物治疗的靶点。

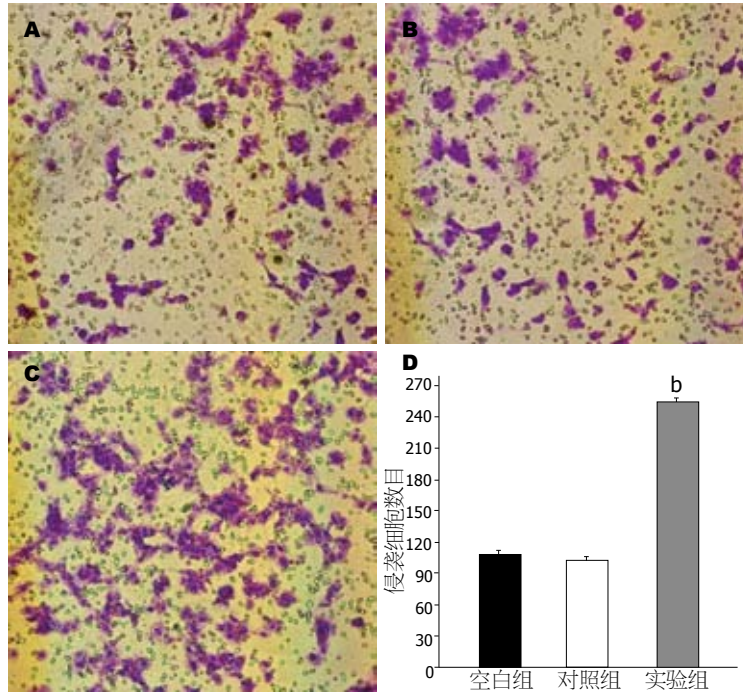


图 5 Boyden chamber检测EC9706细胞过表达DKK1后侵袭能力的改变(结晶紫染色 $\times 100$ )。A: 空白组; B: 对照组; C: 实验组; D: 穿过Boyden chamber细胞数目的统计学分析。 $^bP < 0.01$  vs 空白组和对照组。

管癌组织中的阳性表达率为83.34%(图1A-C)。免疫荧光检测食管癌细胞TE13中的DKK1的表达,结果显示DKK1主要分布在细胞质中,呈细颗粒状散在分布(图1D-F)。

**2.2 Western blot检测DKK1在食管癌组织和食管癌细胞系中的表达** DKK1在食管癌组织中呈高表达,在配对的远癌正常组织中呈低表达(图2A)。通过对4株食管癌细胞系中DKK1表达分析,结果表明DKK1在细胞系中有不同程度的表达,其中在TE13中表达最高,而在EC9706细胞中的表达很低(图2B)。

**2.3 DKK1表达质粒的构建** 应用真核表达载体pCMV-Tag-2b构建了DKK1表达质粒pCMV-Tag-2b-DKK1,经EcoRI-BamHI双酶切鉴定和测序分析表明构建的重组质粒正确(图3A-C)。将构建成的过表达DKK1质粒转染食管癌细胞系EC9706后,Real-time PCR检测DKK1在EC9706细胞中的表达,结果表明DKK1的表达能够增加27.15倍(图3D-E)。

**2.4 DKK1对食管癌EC9706细胞周期的影响** 人食管癌细胞系在转染pCMV-Tag-2b-DKK1的EC9706细胞中S期细胞所占的比例明显升高(57.25% vs 45.87%),而G0/G1期细胞所占的比例降低,表明DKK1参与细胞周期的调控(图4)。

**2.5 DKK1对食管癌细胞EC9706侵袭能力的影响** 通过转染pCMV-Tag-2b-DKK1的EC9706细胞通过Boyden小室基底膜的细胞数(112.33 $\pm$ 3.21)明显

地高于转染对照组(99.18 $\pm$ 3.02)和空白组的细胞数(252 $\pm$ 6.71),表明过表达DKK1的EC9706细胞侵袭能力有明显的增加(图5)。

### 3 讨论

Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的异常在肿瘤的发生发展过程中具有重要的作用<sup>[10-14]</sup>。DKK1是一种分泌性糖蛋白,能够与细胞膜上的Wnt受体LRP5和DKK1共受体Kremen1结合,形成内吞小体,从而阻断Wnt信号通路<sup>[15-18]</sup>。DKK1在不同的肿瘤中表达水平不一。在胃肠道肿瘤、乳腺癌、胶质瘤中DKK1的表达降低或缺失<sup>[19,19,20]</sup>,而在肝癌、食管癌、黑色素瘤等肿瘤中DKK1的表达明显的升高<sup>[21,22]</sup>,这种差异性的表达在肿瘤中的意义尚不完全清楚。

Yamabuki等<sup>[23]</sup>分析食管鳞癌的基因表达谱发现,DKK1在癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织,且与预后相关,可能成为临床上食管癌诊断及预后判断的标志物。Darlavoix等的研究表明DKK1在Barrett's食管中的过表达增加了转变为食管腺癌的风险。本研究通过对食管癌组织和食管癌细胞系的研究结果显示:DKK1在多数食管癌组织中高表达(83.34%),且在食管癌组织中的表达明显地高于配对的远癌正常食管组织;免疫组织化学和Western blot检测的结果一致。在4株食管癌细胞系中也有不同程度的表达,TE13中的表达最高,而在EC9706细胞中的表达量最低;免疫荧光检测DKK1在食管癌细胞中

主要分布于细胞质, 呈细颗粒状散在分布, 符合DKK1是一分泌型蛋白的特点<sup>[24]</sup>. 这些结果为我们研究DKK1在肿瘤中的作用提供了线索.

在研究DKK1对食管癌细胞的生物学作用时, 我们选择EC9706细胞进行研究, 该细胞系中内源性DKK1的表达水平很低. 细胞周期分析的结果显示DKK1能够促进EC9706细胞由静止期向DNA合成期转变, 这可能是与DKK1能够促进细胞的增殖有关. 有关DKK1与细胞增殖、细胞周期的关系已有相关的报道<sup>[25,26]</sup>, 具体的作用机制有待进一步深入的研究. Boyden小室实验结果表明: 过表达DKK1的EC9706细胞能够明显的增加穿过小室基底膜的细胞数, 因此, 我们认为DKK1能够提高食管癌细胞EC9706的侵袭能力, 在肿瘤发生转移的过程中具有促进作用. 本研究的结果与Kuang等<sup>[27]</sup>的研究结果相吻合, DKK1的过表达能够增加细胞的侵袭能力.

我们通过对DKK1在食管癌中的表达和功能水平上的研究, 证明其在食管癌发生发展过程中具有重要的作用, 具体在Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中的调控机制, 需要我们进一步深入探讨.

#### 4 参考文献

- Kim T, Grobmyer SR, Smith R, Ben-David K, Ang D, Vogel SB, Hochwald SN. Esophageal cancer--the five year survivors. *J Surg Oncol* 2011; 103: 179-183
- Johansson TA, Westin G, Skogseid B. Identification of Achaete-scute complex-like 1 (ASCL1) target genes and evaluation of DKK1 and TP11 expression in pancreatic endocrine tumours. *BMC Cancer* 2009; 9: 321
- Yu B, Yang X, Xu Y, Yao G, Shu H, Lin B, Hood L, Wang H, Yang S, Gu J, Fan J, Qin W. Elevated expression of DKK1 is associated with cytoplasmic/nuclear beta-catenin accumulation and poor prognosis in hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 2009; 50: 948-957
- Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kawamoto K, Kikuno N, Ueno K, Yamamura S, Zaman MS, Khatri G, Chen Y, Saini S, Majid S, Deng G, Ishii N, Dahiya R. Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128: 1793-1803
- Lemaire O, Attal M, Bourin P, Laroche M. DKK1 correlates with response and predicts rapid relapse after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2010; 84: 276-277
- Li Y, Lu W, King TD, Liu CC, Bijur GN, Bu G. Dkk1 stabilizes Wnt co-receptor LRP6: implication for Wnt ligand-induced LRP6 down-regulation. *PLoS One* 2010; 5: e11014
- Takahashi N, Fukushima T, Yorita K, Tanaka H, Chijiwa K, Kataoka H. Dickkopf-1 is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells and is involved in invasive growth. *Int J Cancer* 2010; 126: 1611-1620
- Darlarvoix T, Seelentag W, Yan P, Bachmann A, Bosman FT. Altered expression of CD44 and DKK1 in the progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2009; 454: 629-637
- Li S, Li Z, Guo F, Qin X, Liu B, Lei Z, Song Z, Sun L, Zhang HT, You J, Zhou Q. miR-223 regulates migration and invasion by targeting Artemin in human esophageal carcinoma. *J Biomed Sci* 2011; 18: 24
- Bafico A, Liu G, Goldin L, Harris V, Aaronson SA. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. *Cancer Cell* 2004; 6: 497-506
- 杨升, 卢辉山. Wnt信号通路与消化道肿瘤关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2880-2884
- Heider U, Kaiser M, Mieth M, Lamottke B, Rademacher J, Jakob C, Braendle E, Stover D, Sezer O. Serum concentrations of DKK-1 decrease in patients with multiple myeloma responding to anti-myeloma treatment. *Eur J Haematol* 2009; 82: 31-38
- Hoepfner LH, Secreto FJ, Westendorf JJ. Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 485-496
- 彭春伟, 燕敏, 于颖彦, 李建芳, 计骏, 蔡劬, 刘炳亚, 朱正纲. Wnt信号通路靶基因GS mRNA及蛋白在胃癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1777-1781
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stanek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 2002; 417: 664-667
- Smadja DM, d'Audigier C, Weiswald LB, Badoual C, Dangles-Marie V, Mauge L, Evrard S, Laurendeau I, Lallemand F, Germain S, Grelac F, Dizier B, Vidaud M, Bièche I, Gaussem P. The Wnt antagonist Dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2544-2552
- Dun X, Jiang H, Zou J, Shi J, Zhou L, Zhu R, Hou J. Differential expression of DKK-1 binding receptors on stromal cells and myeloma cells results in their distinct response to secreted DKK-1 in myeloma. *Mol Cancer* 2010; 9: 247
- Zhou Y, Liu F, Xu Q, Wang X. Analysis of the expression profile of Dickkopf-1 gene in human glioma and the association with tumor malignancy. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 138
- Maehata T, Taniguchi H, Yamamoto H, Noshio K, Adachi Y, Miyamoto N, Miyamoto C, Akutsu N, Yamaoka S, Itoh F. Transcriptional silencing of Dickkopf gene family by CpG island hypermethylation in human gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2702-2714
- Mikheev AM, Mikheeva SA, Maxwell JP, Rivo JV, Rostomily R, Swisshelm K, Zarbl H. Dickkopf-1 mediated tumor suppression in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112: 263-273
- Qin X, Zhang H, Zhou X, Wang C, Zhang H, Zhang X, Ye L. Proliferation and migration mediated by Dkk-1/Wnt/beta-catenin cascade in a model of hepatocellular carcinoma cells. *Transl Res* 2007; 150: 281-294
- Sheng SL, Huang G, Yu B, Qin WX. Clinical significance and prognostic value of serum Dickkopf-1 concentrations in patients with lung cancer. *Clin Chem* 2009; 55: 1656-1664
- Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N,

#### 同行评价

本文设计科学严谨, 数据可靠, 图像精美, 较高的研究价值.

- Kato T, Miyamoto M, Ito T, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, Fujita M, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y. Dickkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2007; 67: 2517-2525
- 24 Makino T, Yamasaki M, Takemasa I, Takeno A, Nakamura Y, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Matsuura N, Mori M, Doki Y. Dickkopf-1 expression as a marker for predicting clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 2058-2064
- 25 Sikandar S, Dizon D, Shen X, Li Z, Besterman J, Lipkin SM. The class I HDAC inhibitor MGCD0103 induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer initiating cells by upregulating Dickkopf-1 and non-canonical Wnt signaling. *Oncotarget* 2010; 1: 596-605
- 26 Macdonald LJ, Sales KJ, Grant V, Brown P, Jabbour HN, Catalano RD. Prokineticin 1 induces Dickkopf 1 expression and regulates cell proliferation and decidualization in the human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2011 May 5. [Epub ahead of print]
- 27 Kuang HB, Miao CL, Guo WX, Peng S, Cao YJ, Duan EK. Dickkopf-1 enhances migration of HEK293 cell by beta-catenin/E-cadherin degradation. *Front Biosci* 2009; 14: 2212-2220

编辑 李薇 电编 张洋

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.

# GRIM-19在肝细胞癌组织中的表达及临床意义

赵延大, 李菲菲, 任万华, 秦成勇

赵延大, 李菲菲, 任万华, 秦成勇, 山东大学附属省立医院消化科 山东省济南市 250021

赵延大, 在读硕士, 主要从事肝癌、病毒性肝炎、肝硬化等方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271667

作者贡献分布: 此课题由赵延大与李菲菲设计; 研究过程由赵延大与李菲菲操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由任万华与秦成勇提供; 数据分析由赵延大完成; 本论文起草由赵延大完成; 文章修改和审阅由李菲菲、任万华及秦成勇完成。

通讯作者: 任万华, 主任医师, 250021, 山东省济南市经五纬七路324号, 山东大学附属省立医院消化三科。ganbingzx@163.com  
电话: 0531-85186456

收稿日期: 2011-05-07 修回日期: 2011-06-26

接受日期: 2011-07-05 在线出版日期: 2011-07-18

## Clinical significance of GRIM-19 expression in hepatocellular carcinoma

Yan-Da Zhao, Fei-Fei Li, Wan-Hua Ren, Cheng-Yong Qin

Yan-Da Zhao, Fei-Fei Li, Wan-Hua Ren, Cheng-Yong Qin, Department of Digestive Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Correspondence to: Wan-Hua Ren, Department of Digestive Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, 324 Jingwuweiqi Road, Jinan 250021, Shandong Province, China. ganbingzx@163.com  
Received: 2011-05-07 Revised: 2011-06-26

Accepted: 2011-07-05 Published online: 2011-07-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the clinical significance of expression of gene associated with retinoid-interferon-induced mortality-19 (GRIM-19) in hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** The expression of GRIM-19 mRNA and protein in 40 cases of HCC tissues and matched non-cancerous tissues was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemistry and Western blot. The correlation between GRIM-19 expression and clinicopathologic features of HCC was analyzed statistically.

**RESULTS:** The expression of GRIM-19 mRNA was significantly lower in HCC than in matched non-cancerous tissue ( $0.40 \pm 0.31$  vs  $0.56 \pm 0.67$ ,  $P < 0.05$ ). The positive rate of GRIM-19 protein

expression in HCC was significantly lower than that in matched non-cancerous tissue ( $47.5\%$  vs  $80\%$ ,  $P < 0.05$ ). The expression level of GRIM-19 protein was also significantly lower in HCC than in matched non-cancerous tissue ( $0.30 \pm 0.29$  vs  $0.57 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ). GRIM-19 expression differed significantly between patients with stages I + II disease and those with stages III+IV disease ( $0.57 \pm 0.38$  vs  $0.30 \pm 0.20$ ,  $P < 0.05$ ) as well as between patients with and without portal vein thrombosis ( $0.04 \pm 0.02$  vs  $0.44 \pm 0.32$ ,  $P < 0.05$ ). The expression of GRIM-19 was negatively correlated with serum AFP ( $r = -0.352$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Decreased GRIM-19 expression is probably a significant event in the carcinogenesis of HCC and may be associated with tumor development, progression and invasion.

**Key Words:** Gene associated with retinoid-interferon-induced mortality-19; Hepatocellular carcinoma; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Immunohistochemistry

Zhao YD, Li FF, Ren WH, Qin CY. Clinical significance of GRIM-19 expression in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2123-2127

### 摘要

**目的:** 探讨GRIM-19在肝细胞癌组织中表达的临床意义。

**方法:** 用RT-PCR检测40例肝细胞癌及非癌组织中GRIM-19 mRNA表达水平, 用免疫组织化学pv二步法和Western blot检测40例肝细胞癌及非癌组织中GRIM-19蛋白的表达情况, 分析GRIM-19与临床病理特征的关系。

**结果:** GRIM-19 mRNA在肝细胞癌的表达明显低于非癌组织( $0.40 \pm 0.31$  vs  $0.56 \pm 0.67$ ,  $P < 0.05$ )。GRIM-19蛋白主要定位于细胞质, 肝细胞癌中的阳性率明显低于非癌组织( $47.5\%$  vs  $80\%$ ,  $P < 0.05$ )。GRIM-19蛋白在肝细胞癌的表达低于非癌组织( $0.30 \pm 0.29$  vs  $0.57 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ )。在肝细胞癌组织中, GRIM-19的表达在临床分期为I + II与III + IV组间、门脉有癌栓与无癌栓组间均有统计学差别( $0.57 \pm 0.38$

### ■背景资料

GRIM-19被认为是凋亡调节基因和抑癌基因, 在一些肿瘤中已有较为深入的研究, 但在肝细胞癌中的表达及意义尚未明确。

### ■同行评议者

于聪慧, 教授, 北京军区总医院肝胆外科

### ■ 研发前沿

GRIM-19在肿瘤中的研究尚属未成熟阶段,他在一些肿瘤中的表达及意义亟须阐明,他在各种肿瘤发生发展中的作用及与其他肿瘤相关因子的关系成为研究的重点.

$vs 0.30 \pm 0.20; 0.04 \pm 0.02 vs 0.44 \pm 0.32$ , 均  $P < 0.05$ ); GRIM-19的表达与AFP数值呈负相关 ( $r = -0.352, P < 0.05$ ).

**结论:** GRIM-19表达下降,是肝细胞癌发生过程的重要事件,可能与肝细胞癌的发生、发展、侵袭等有关.

**关键词:** 干扰素/维甲酸联合应用诱导凋亡的相关基因19; 肝细胞癌; 逆转录聚合酶链反应; 免疫组织化学

赵延大, 李菲菲, 任万华, 秦成勇. GRIM-19在肝细胞癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2123-2127  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2123.asp>

## 0 引言

干扰素/维甲酸联合应用诱导凋亡的相关基因19(genes associated with retinoid-interferon-induced mortality 19, GRIM-19)是一种凋亡调节基因,他可以提高细胞对干扰素(interferon, IFN)及全反式维甲酸(retinoic acid, RA)诱导的死亡的敏感性,从而抑制肿瘤细胞的增殖.促进凋亡<sup>[1]</sup>.研究证实,他在人类多种正常组织中均有表达<sup>[1]</sup>,而在肺癌、结直肠癌等肿瘤组织中的表达明显减低<sup>[2,3]</sup>. GRIM-19在肝细胞癌中表达情况的研究,国内、外尚未见报道,本研究通过检测40例肝细胞癌患者癌及其非癌组织中GRIM-19的表达及定位,分析其与临床病理特征的关系,并进一步探讨GRIM-19在肝细胞癌发生、发展中的意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集山东大学附属省立医院肝胆外科2010-04/2010-12经手术切除的、术后病理诊断为肝细胞癌的40例患者的癌及非癌组织(肉眼正常且距离肿瘤组织边缘5 cm以上),于手术切除后尽快采集,存于-80℃冰箱.患者年龄38-81岁,中位年龄58岁.肿瘤分级采用Edmondsrr steiner分级法:1、2级36例,3、4级4例.肿瘤分期根据国际抗癌联盟(UICC, 2003)的TNM分期, I、II期24例, III、IV期16例. GRIM-19鼠多抗(abcam, Hong Kong); 小鼠超敏二步法免疫组织化学检测试剂、DAB试剂盒、 $\beta$ -actin鼠单抗、辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(北京中杉金桥); RIPA裂解液、超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天); BCA-100蛋白质定量测定试剂盒(上海博彩); TRIzol RNA提取试剂(北京全式金); RT-PCR试

剂盒(TaKaRa); PCR引物(南京金瑞思).

### 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR:** 取约50 mg组织应用TRIzol法常规提取总RNA.测定RNA浓度后,取500 ng总RNA,随机引物法逆转录合成cDNA.以 $\beta$ -actin为内参照,进行PCR扩增, GRIM-19特异性引物上游序列: 5'-GACTACAAACGGAAGCTTGCC-3', 下游: 5'-GAGCCTCCTCTGTGGTGC-3', 扩增片段长度343 bp.  $\beta$ -actin特异性引物上游序列: 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3', 下游: 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3', 扩增片段长度564 bp. 反应条件: 95℃预变性2 min, 35个循环(94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 34 s), 72℃充分延伸10 min. 取扩增产物于2%琼脂糖凝胶中电泳,然后置于紫外光可见分析装置中拍照.

**1.2.2 免疫组织化学:** 组织经固定、脱水、浸蜡、包埋, 4  $\mu$ m厚切片.常规脱蜡和水化后,高温高压修复,加3%过氧化氢37℃孵育30 min,加一抗4℃过夜, 37℃复温30 min,加Poly Helper 37℃孵育30 min,加二抗37℃孵育30 min. DAB显色,苏木精复染,脱水、分化、封片观察.各步间用PBS冲洗3次,每次5 min.染色结果参照Fromowitz等综合分类法,阳性细胞按百分比分为0-3分,阳性信号强度分为0-3分,两项分值相加,总分0-1分为阴性(-), 2分为弱阳性(+), 3-4分为中度阳性(++), 5-6分为强阳性(+++)<sup>[4]</sup>.

**1.2.3 Western blot:** 取约50 mg组织研磨、裂解、离心,上清液用蛋白定量试剂盒测定浓度后,加热变性.取50  $\mu$ g总蛋白,行SDS-PAGE电泳分离(15%的分离胶),电转移于PVDF膜上,脱脂牛奶封闭,再分别加入GRIM-19鼠多抗(1:400)、内参 $\beta$ -actin(1:800), 4℃过夜,山羊抗小鼠二抗(1:8000)反应1 h.用ECL化学发光试剂盒检测杂交信号.

**统计学处理** RT-PCR及Western blot条带的灰度值用Image J软件分析.计量数据用mean  $\pm$  SD表示,用SPSS16.0软件进行统计分析,两组均数比较用t检验,关联性分析用Pearson相关检验.以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 肝细胞癌及非癌组织GRIM-19 mRNA的水平检测及其与临床病理特征的关系** GRIM-19、 $\beta$ -actin条带与DNA ladder约340 bp、560 bp处对应, GRIM-19/ $\beta$ -actin mRNA的灰度比值明显低于相应非癌组织( $0.40 \pm 0.31 vs 0.56 \pm 0.67, P < 0.05$ , 图1).

### ■ 相关报道

Hu等研究认为GRIM-19定位于细胞核; Huang等认为GRIM-19主要定位于线粒体.

表1 肝细胞癌组织中GRIM-19 mRNA表达与各临床病理特征的关系

临床病理特征	n	GRIM-19/ $\beta$ -actin (灰度比值)	P值
性别			
男	32	0.42 $\pm$ 0.34	0.903
女	8	0.34 $\pm$ 0.16	
肿瘤大小(cm)			
$\leq$ 5	24	0.45 $\pm$ 0.33	0.098
$>$ 5	16	0.29 $\pm$ 0.19	
肝硬化			
有	22	0.47 $\pm$ 0.36	0.094
无	18	0.32 $\pm$ 0.21	
门脉癌栓			
有	5	0.04 $\pm$ 0.02	0.001
无	35	0.44 $\pm$ 0.32	
转移			
有	8	0.32 $\pm$ 0.28	0.456
无	32	0.42 $\pm$ 0.32	
HBeAg			
阳性	15	0.43 $\pm$ 0.40	0.774
阴性	25	0.39 $\pm$ 0.27	
组织分级			
1+2	36	0.42 $\pm$ 0.31	0.219
3+4	4	0.14 $\pm$ 0.01	
临床分期			
I + II	24	0.57 $\pm$ 0.38	0.022
III + IV	16	0.30 $\pm$ 0.20	

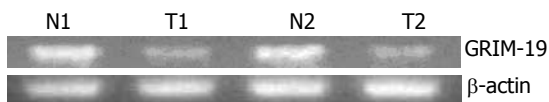


图1 GRIM-19 mRNA在肝细胞癌和非癌组织中的表达. T: 癌组织; N: 非癌组织.

临床分期为III、IV期的肝细胞癌GRIM-19 mRNA表达明显低于I、II期(0.30  $\pm$  0.20 vs 0.57  $\pm$  0.38,  $P < 0.05$ ), 有门脉癌栓者明显低于无门脉癌栓者(0.04  $\pm$  0.02 vs 0.44  $\pm$  0.32,  $P < 0.05$ ), 而与性别、肿瘤大小、肝硬化、转移、组织分级无关( $P > 0.05$ , 表1). 此外, 经Pearson检验, GRIM-19 mRNA表达与年龄无关( $r = 0.219$ ,  $P > 0.05$ ), 而与AFP数值大小呈负相关( $r = -0.352$ ,  $P < 0.05$ ).

2.2 免疫组织化学检测GRIM-19蛋白在肝细胞癌及非癌组织中的定位及表达 肝细胞癌和非癌组织中GRIM-19蛋白的表达主要定位于细胞质, 表现为不同染色程度的棕黄色颗粒. GRIM-19在非癌组织中的阳性率为80%(32/40), 在肝细胞癌中的阳性率为47.5%(19/40), 肝细胞癌中GRIM-19蛋白的阳性率明显低于其非癌组织( $P < 0.05$ , 图2).

2.3 Western blot检测GRIM-19蛋白的表达 40例肝细胞癌和非癌组织均有GRIM-19表达, 经曝光1 000 s, 16 000 Da位置有相应条带, 肝细胞癌组织中GRIM-19/ $\beta$ -actin灰度比值明显低于非癌组织(0.30  $\pm$  0.29 vs 0.57  $\pm$  0.10,  $P < 0.05$ , 图3). GRIM-19蛋白表达与肝细胞癌的临床分期、门脉癌栓、AFP有关( $P < 0.05$ ), 与其他临床病理特征无关.

### 3 讨论

原发性肝癌(绝大部分是肝细胞癌)是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 在东亚的发病率特别高<sup>[5]</sup>, 在我国为死亡率第二位的恶性肿瘤<sup>[6]</sup>. 完善肝细胞癌发病机制以更好地指导治疗显得尤为重要. GRIM-19等肿瘤相关基因及因子的发现, 为阐明肝细胞癌发病机制奠定了基础.

GRIM-19是2000年由Angell等<sup>[1]</sup>应用反义基因敲除的方法分离发现的一种细胞凋亡调节基因, 定位于人染色体19p13.2<sup>[7,8]</sup>, 可编码一种16 000 Da的小分子蛋白<sup>[9]</sup>. 有学者认为GRIM-19是一种抑癌基因<sup>[10,11]</sup>, 基于以下理由: (1)IFN/RA均能抑制肿瘤生长, 并被用于一些肿瘤的治疗<sup>[12-14]</sup>; (2)IFN/RA使乳腺癌细胞系中GRIM-19 mRNA及蛋白表达均增加, IFN/RA致GRIM-19过表达可引起细胞凋亡, GRIM-19抑制剂促进细胞生长<sup>[10]</sup>; (3)人染色体19p13.2是前列腺肿瘤抑制基因<sup>[8]</sup>及散发性、家族性甲状腺癌杂合性丢失的关键区域<sup>[15,16]</sup>. 另有研究表明, GRIM-19可以特异性地与STAT3结合, 阻断细胞质内的STAT3进入细胞核, 通过下调STAT3的转录激活活性, 抑制其靶基因的表达和细胞生长<sup>[17,18]</sup>; 同时参与病毒感染导致的癌变过程及多种肿瘤的形成<sup>[19]</sup>. 因此, 研究GRIM-19 mRNA、蛋白在肿瘤中的表达及作用, 具有重要的意义.

在GRIM-19 mRNA水平, 研究证实原发性肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、子宫颈癌等肿瘤中均有不同程度的表达降低甚至缺失<sup>[20-23]</sup>; 而在脑胶质瘤中的表达明显高于正常脑组织<sup>[24]</sup>. 在本实验中, RT-PCR检测的肝细胞癌组织中GRIM-19 mRNA表达水平明显低于非癌组织, 提示GRIM-19转录过程可能参与了肝细胞癌的发生、发展. 甲状腺肿瘤中已经发现了GRIM-19突变的现象<sup>[25]</sup>, 肝细胞癌中是否存在类似的突变, 需进一步的研究证实.

在GRIM-19蛋白水平, 其细胞学定位是一个重要的方面. GRIM-19在细胞中的定位存有

### ■创新盘点

本文首次揭示了GRIM-19在肝细胞癌中的表达及意义, 为进一步完善肝细胞癌发病机制奠定了基础.

### ■应用要点

肝细胞癌组织中GRIM-19表达减低, 其表达水平与肝细胞癌的临床分期、门脉癌栓、AFP有关.

■同行评价  
本文选题尚可,具有一定的新颖性和临床意义。

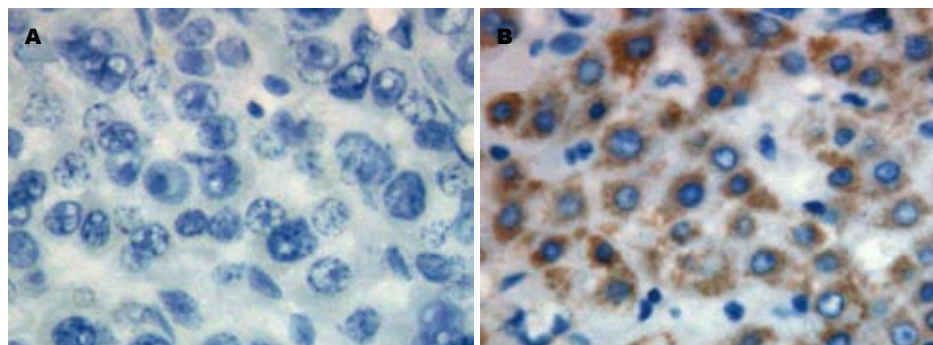


图 2 GRIM-19在肝细胞癌及其非癌组织中的表达(pv × 400). A: GRIM-19在癌组织中低表达或缺失; B: GRIM-19在非癌组织中表达较高。

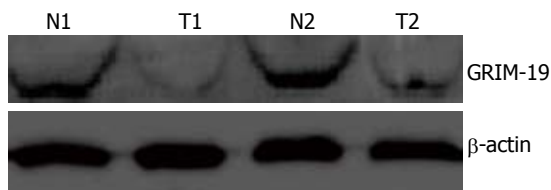


图 3 GRIM-19蛋白在肝细胞癌和非癌组织中的表达. T: 癌组织; N: 非癌组织。

争议, Hu等<sup>[26]</sup>研究认为GRIM-19定位于细胞核; Huang等<sup>[27]</sup>认为GRIM-19主要定位于线粒体; 在结直肠癌、乳腺癌的研究中发现胞质、胞核均有GRIM-19的表达, 但胞质多于胞核<sup>[3,28]</sup>; 本实验发现GRIM-19在肝细胞癌及非癌组织中的阳性定位于胞质, 这与“GRIM-19是线粒体复合物I的亚基<sup>[29]</sup>”是相符的. GRIM-19在肝细胞中定位与其他组织存在一定差异的具体机制需进一步研究。

在GRIM-19蛋白水平, 其表达变化亦非常重要. 研究表明, GRIM-19蛋白在非小细胞肺癌、肺腺癌、口腔癌等肿瘤中表达明显降低<sup>[30-32]</sup>, 而脑胶质瘤中表达升高<sup>[24]</sup>. 本实验中, 免疫组织化学检测的肝细胞癌中GRIM-19阳性率明显低于非癌组织; Western blot检测的肝细胞癌中GRIM-19表达水平明显低于非癌组织. 此结果提示: GRIM-19蛋白表达可能主要受其mRNA水平的影响, 亦可能存在上游调节子, 比如GW112, 他能与GRIM-19结合, 削弱通过干扰素/维甲酸通路诱导的细胞凋亡<sup>[33,34]</sup>.

GRIM-19 mRNA、蛋白不仅在肝细胞癌中的表达方面有较好的一致性, 而且在与肝细胞癌临床病理特征的关系上有相同的结论: 二者均与临床分期、门脉癌栓、AFP有关联. 临床分期为III、IV期者GRIM-19表达明显低于I、II期, 提示其与肝细胞癌的发生发展等生物学行为有关; 有门脉癌栓者GRIM-19表达明显减低, 说明其表达很可能与肝细胞癌的侵袭有关. AFP

是一种具有抑制免疫细胞生长、促进各种肿瘤细胞增生功能的糖蛋白<sup>[35]</sup>, 他在肝细胞癌中与GRIM-19的表达呈负相关, 提示二者可能共同参与了肝细胞癌的发生发展, 二者是否存在相互作用, 有待进一步研究。

总之, 本研究发现了GRIM-19 mRNA及蛋白在肝细胞癌组织中的表达减低, 探讨了其与肝细胞癌临床病理特征的关系, 为进一步研究肝细胞癌的致病机制奠定了基础, 同时GRIM-19有望成为肝细胞癌的诊断指标及其治疗的新靶标。

志谢: 感谢山东大学附属省立医院中心实验室人员的大力支持与帮助。

#### 4 参考文献

- 1 Angell JE, Lindner DJ, Shapiro PS, Hofmann ER, Kalvakolanu DV. Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach. *J Biol Chem* 2000; 275: 33416-33426
- 2 叶静, 赵继京, 刘荣玉, 肖卫华. GRIM-19及其靶基因产物STAT3与肺癌相关性的研究. *安徽医科大学学报* 2008; 43: 599-602
- 3 龚龙波, 罗学来, 刘双又, 陶德定, 龚建平, 胡俊波. GRIM-19及其靶基因产物STAT3与结直肠癌恶性程度的关系. *癌症* 2007; 26: 683-687
- 4 焦蕊丽, 徐素欣, 郝桂敏, 王振海, 张杰英, 晋生. 体外受精-胚胎移植足月妊娠胎盘中表皮生长因子受体的表达. *华北煤炭医学院学报* 2008; 10: 3-4
- 5 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 6 张伟东, 苗树军. 我国恶性肿瘤死亡率流行病学特征分析. *中国健康教育* 2009; 25: 246-248
- 7 Hofmann ER, Boyanapalli M, Lindner DJ, Weihua X, Hassel BA, Jagus R, Gutierrez PL, Kalvakolanu DV. Thioredoxin reductase mediates cell death effects of the combination of beta interferon and retinoic acid. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6493-6504
- 8 Chidambaram NV, Angell JE, Ling W, Hofmann ER, Kalvakolanu DV. Chromosomal localization of human GRIM-19, a novel IFN-beta and retinoic acid-activated regulator of cell death. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 661-665
- 9 Kalvakolanu DV. The GRIMs: a new interface between cell death regulation and interferon/retinoid induced growth suppression. *Cytokine Growth Fac-*

- tor Rev 2004; 15: 169-194
- 10 Moreira S, Correia M, Soares P, Máximo V. GRIM-19 function in cancer development. *Mitochondrion* 2011 Jun 2. [Epub ahead of print]
- 11 Kalvakolanu DV, Nallar SC, Kalakonda S. Cytokine-induced tumor suppressors: a GRIM story. *Cytokine* 2010; 52: 128-142
- 12 Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 181-193
- 13 Gresser I, Belardelli F. Endogenous type I interferons as a defense against tumors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 111-118
- 14 Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoeediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 95-109
- 15 Prazeres HJ, Rodrigues F, Soares P, Naidenov P, Figueiredo P, Campos B, Lacerda M, Martins TC. Loss of heterozygosity at 19p13.2 and 2q21 in tumours from familial clusters of non-medullary thyroid carcinoma. *Fam Cancer* 2008; 7: 141-149
- 16 Stankov K, Pastore A, Toschi L, McKay J, Lesueur F, Kraimps JL, Bonneau D, Gibelin H, Levillain P, Volante M, Papotti M, Romeo G. Allelic loss on chromosomes 2q21 and 19p 13.2 in oxyphilic thyroid tumors. *Int J Cancer* 2004; 111: 463-467
- 17 Lufe C, Ma J, Huang G, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Ong CT, Cao X. GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction. *EMBO J* 2003; 22: 1325-1335
- 18 Kalakonda S, Nallar SC, Lindner DJ, Hu J, Reddy SP, Kalvakolanu DV. Tumor-suppressive activity of the cell death activator GRIM-19 on a constitutively active signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res* 2007; 67: 6212-6220
- 19 周颖, 凌斌. GRIM-19的功能及与肿瘤的相关性. *医学分子生物学杂志* 2008; 5: 262-264
- 20 Alchanati I, Nallar SC, Sun P, Gao L, Hu J, Stein A, Yakirevich E, Konforty D, Alroy I, Zhao X, Reddy SP, Resnick MB, Kalvakolanu DV. A proteomic analysis reveals the loss of expression of the cell death regulatory gene GRIM-19 in human renal cell carcinomas. *Oncogene* 2006; 25: 7138-7147
- 21 赵继京, 叶静, 黄燕, 肖卫华, 刘荣玉. 肺癌中GRIM-19 mRNA的表达及其临床意义. *安徽医科大学学报* 2008; 43: 595-598
- 22 Liu YB, Shen WG, Ge H, Gai XD, Lu LL, Zhao XJ. [Expressions of survivin and GRIM-19 in prostate cancer]. *Zhonghua Nankexue* 2011; 17: 21-26
- 23 朱靖, 卫莹, 周颖, 王青元, 许乾乾, 肖卫华, 凌斌. 子宫颈癌组织中GRIM-19的表达及其意义. *临床与实验病理学杂志* 2010; 26: 681-683
- 24 Jin YH, Jung S, Jin SG, Jung TY, Moon KS, Kim IY. GRIM-19 Expression and Function in Human Gliomas. *J Korean Neurosurg Soc* 2010; 48: 20-30
- 25 Máximo V, Botelho T, Capela J, Soares P, Lima J, Taveira A, Amaro T, Barbosa AP, Preto A, Harach HR, Williams D, Sobrinho-Simões M. Somatic and germline mutation in GRIM-19, a dual function gene involved in mitochondrial metabolism and cell death, is linked to mitochondrion-rich (Hurthle cell) tumours of the thyroid. *Br J Cancer* 2005; 92: 1892-1898
- 26 Hu J, Angell JE, Zhang J, Ma X, Seo T, Raha A, Hayashi J, Choe J, Kalvakolanu DV. Characterization of monoclonal antibodies against GRIM-19, a novel IFN-beta and retinoic acid-activated regulator of cell death. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 1017-1026
- 27 Huang G, Lu H, Hao A, Ng DC, Ponniah S, Guo K, Lufe C, Zeng Q, Cao X. GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 8447-8456
- 28 荣国华, 李哲, 金广超, 马国辉, 孙涛, 田斌, 陈连胜, 刘惠萍, 王晓. GRIM-19蛋白在乳腺癌组织中的表达及其意义. *中国普通外科杂志* 2010; 19: 1242-1245
- 29 Murray J, Zhang B, Taylor SW, Oglesbee D, Fahy E, Marusich MF, Ghosh SS, Capaldi RA. The subunit composition of the human NADH dehydrogenase obtained by rapid one-step immunopurification. *J Biol Chem* 2003; 278: 13619-13622
- 30 周爱民, 赵继京, 叶静, Kalvakolanu DV, 肖卫华, 刘荣玉. GRIM-19蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义. *癌症* 2009; 28: 431-435
- 31 Wang T, Yan XB, Zhao JJ, Ye J, Jiang ZF, Wu DR, Xiao WH, Liu RY. Gene associated with retinoid-interferon-induced mortality-19 suppresses growth of lung adenocarcinoma tumor *in vitro* and *in vivo*. *Lung Cancer* 2011; 72: 287-293
- 32 Zhou Y, Li M, Wei Y, Feng D, Peng C, Weng H, Ma Y, Bao L, Nallar S, Kalakonda S, Xiao W, Kalvakolanu DV, Ling B. Down-regulation of GRIM-19 expression is associated with hyperactivation of STAT3-induced gene expression and tumor growth in human cervical cancers. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29: 695-703
- 33 Kalvakolanu DV. The GRIMs: a new interface between cell death regulation and interferon/retinoid induced growth suppression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 169-194
- 34 Zhang X, Huang Q, Yang Z, Li Y, Li CY. GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth. *Cancer Res* 2004; 64: 2474-2481
- 35 de Paulo GA, Ardengh JC, Nakao FS, Ferrari AP. Treatment of esophageal varices: a randomized controlled trial comparing endoscopic sclerotherapy and EUS-guided sclerotherapy of esophageal collateral veins. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 396-402; quiz 463

编辑 李薇 电编 张洋

# LRP-5、LRP-6在溃疡性结肠炎相关癌组织中表达的 临床意义

党彤, 田旭阳, 李慧艳, 陈言东, 孔洁, 杨莉

## ■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)发病率在国内外有增高趋势,且有发生癌变的可能性,UC背景下发生的结肠癌称为溃疡性结肠炎相关性癌(UCAC),有关其发病机制的研究报道较少,临床肠镜检查常造成漏诊,若能客观地发现一种生物学标志物来提示恶变可能,对其研究其发病机制及有效预防结肠癌(CRC)的发生将非常重要。

党彤, 陈言东, 包头医学院第二附属医院 内蒙古消化病研究所 内蒙古自治区包头市 014030

田旭阳, 李慧艳, 孔洁, 杨莉, 包头医学院第二附属医院 病理科 内蒙古自治区包头市 014030

党彤, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事消化系统疾病方面的研究。

内蒙古卫生厅医疗卫生科研项目基金资助项目, No. 20100068

作者贡献分布: 本课题由党彤与田旭阳设计; 研究过程由党彤、田旭阳及李慧艳完成; 肠镜活检工作由党彤与陈言东完成; 数据分析由李慧艳完成; 免疫组织化学实验由孔洁与杨莉完成; 结果的判读由田旭阳完成; 研究所用资金由党彤提供; 论文写作由党彤、田旭阳及李慧艳完成。

通讯作者: 党彤, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 014030, 内蒙古自治区包头市, 包头医学院第二附属医院, 内蒙古消化病研究所. dtong999@sina.com.cn

电话: 0472-3169902

收稿日期: 2011-03-05 修回日期: 2011-06-27

接受日期: 2011-07-05 在线出版日期: 2011-07-18

## Expression of LRP-5 and LRP-6 in ulcerative colitis-associated cancer

Tong Dang, Xu-Yang Tian, Hui-Yan Li, Yan-Dong Chen, Jie Kong, Li Yang

Tong Dang, Yan-Dong Chen, the Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College; Inner Mongolia Institute of Gastroenterology, Baotou 014030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Xu-Yang Tian, Hui-Yan Li, Jie Kong, Li Yang, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Supported by: the Research Project of Inner Mongolia Health Department, No. 20100068

Correspondence to: Professor Tong Dang, the Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College; Inner Mongolia Institute of Gastroenterology, Baotou 014030, Inner Mongolia Autonomous Region, China. dtong999@sina.com.cn

Received: 2011-03-05 Revised: 2011-06-27

Accepted: 2011-07-05 Published online: 2011-07-18

## Abstract

**AIM:** To explore the clinical significance of expression of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP-5) and LRP-6 in ulcerative colitis (UC)-associated cancer (UCAC).

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of LRP-5 and LRP-6 in 15 cases of UC-associated atypical hyperplasia

(UD), 5 cases of UCAC, 30 cases of UC and 20 cases of sporadic colorectal cancer (SCRC).

**RESULTS:** The positive rate of LRP-5 expression in UCAC was the same as that of LRP-6 (4/5, 80.00%). The positive rates of LRP-5 and LRP-6 were significantly higher in UCAC than in UC (LRP-5: 80.00% vs 23.33%, 40.00%; LRP-6: 80.00% vs 16.67%, 45.00%, all  $P < 0.01$ ). The positive rates of LRP-5 and LRP-6 expression in 15 cases of UD were 93.33% (14/15) and 86.67% (13/15), respectively, significantly higher than those in UC and SCRC (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** LRP5 and LRP6 may play a significant role in the development of UCAC and can be used as early markers to hint dysplasia.

**Key Words:** Lipoprotein receptor-related protein 5, 6; Ulcerative colitis; Ulcerative colitis-related dysplasia; Ulcerative colitis-associated colorectal cancer

Dang T, Tian XY, Li HY, Chen YD, Kong J, Yang L. Expression of LRP-5 and LRP-6 in ulcerative colitis-associated cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2128-2132

## 摘要

**目的:** 探讨脂蛋白受体相关蛋白5、6(LRP-5、LRP-6)在溃疡性结肠炎(UC)相关癌组织中的表达及意义。

**方法:** 以溃疡性结肠炎伴不典型增生(UD)和溃疡性结肠炎相关癌(UCAC)为病例组, 溃疡性结肠炎(UC组)和散发性大肠癌(SCRC组)为对照组, 应用免疫组织化学S-P法检测各组肠黏膜组织中LRP-5、LRP-6的表达。

**结果:** 5例UCAC中, LRP-5和LRP-6蛋白阳性表达率均明显高于对照组, 与对照UC、SCRC比较差异有统计学意义(LRP-5: 80.00% vs 23.33%, 40.00%; LRP-6: 80.00% vs 16.67%, 45.00%, 均 $P < 0.01$ )。在15例UD组中, LRP-5和LRP-6蛋白阳性表达分别为14例(93.33%)及13

## ■同行评议者

戈之铮, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

例(86.67%), 与对照组UC、SCRC比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ).

**结论:** LRP-5、LRP-6在UCAC的发病机制中可能起着较重要的作用, 并可能作为一个早期生物学标记物来提示癌变的可能.

**关键词:** 脂蛋白受体相关蛋白5, 6; 溃疡性结肠炎; 溃疡性结肠炎伴不典型增生; 溃疡性结肠炎相关性癌

党彤, 田旭阳, 李慧艳, 陈言东, 孔洁, 杨莉. LRP-5、LRP-6在溃疡性结肠炎相关癌组织中表达的临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2128-2132

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2128.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种主要累及直肠、结肠黏膜的慢性非特异性炎, 病因尚未完全清楚, 发病率在国内外有增高趋势, 且有发生癌变的可能性<sup>[1]</sup>, UC背景下发生的大肠癌称为溃疡性结肠炎相关性癌(ulcerative colitis-associated colorectal cancer, UCAC)<sup>[2]</sup>, 有关其发病机制的研究报道较少. 自Crohn等<sup>[3]</sup>首次报道UC并发结肠癌以来, UC与癌的关系引起人们的高度重视; 目前临床大多依靠肠镜活检偶然发现UC黏膜的异型增生及早期癌变, 常有漏诊病例, 若能客观地发现一种生物学标志物来提示癌变潜能, 有针对性的对高危患者进行肠镜活检变得越来越重要; 故本研究采用免疫组织化学方法, 通过设立对照探讨脂蛋白受体相关蛋白5, 6(lipoprotein receptor-related protein 5, 6, LRP-5, 6)在UD及UCAC中的表达, 一方面从分子水平上研究UCAC可能的发病机制, 另一方面对提示早期癌变, 及时采取措施预防癌的发生, 对提高患者的生存质量将具有非常重要的意义.

## 1 材料和方法

1.1 材料 病例组选自1995-2009年包头医学院第二附属医院由临床确诊的8年以上UC患者, 长期随访, 后经病理确诊为癌, 临床行大肠癌根治术标本5例设为UCAC组, 且手术根治标本未见淋巴结及远隔器官的转移; 其中男4例, 女1例, 年龄30-71(平均48.2)岁; 依病理诊断为UC伴有异型增生15例设为UD组, 其中男8例, 女7例, 年龄从27-70(平均48.4)岁. 对照组选取同期年龄、性别与病例组相似的30例UC患者(UC组), 其中男15例, 女15例, 年龄24-58(平均42.8)岁; 散发性

结肠癌20例(SCRC组), 其中男14例, 女6例, 年龄51-82(平均67.5)岁. UD组及UC组分别于肠黏膜病变处钳取粟粒大组织3-5块, 以上各组标本均用中性甲醛溶液固定, 临床排出了细菌性痢疾、阿米巴痢疾、慢性血吸虫病、肠结核等感染性结肠炎、缺血性结肠炎、放射性结肠炎等. 正常对照组无UC家庭史.

### 1.2 方法

1.2.1 UC的诊断标准<sup>[4]</sup>: 采用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.

1.2.2 免疫组织化学SP法检测LRP-5、LRP-6的表达: LRP-5、LRP-6分别购于香港Abcam公司及美国Santa Cruz公司, 两者的深度稀释比为1:100, 1:50, LRP-5、LRP-6定位于胞膜或胞质. 两种抗体阳性等级采用Sinicrope改良半定量法<sup>[5]</sup>, 显微镜下观察并记录各切片中阳性细胞的百分数, 按5级法计分: 0分: 阳性细胞数<5%; 1分: 阳性细胞数5%-25%; 2分: 阳性细胞数26%-50%; 3分: 阳性细胞数51%-75%; 4分: 阳性细胞数>75%. 同时将染色强度分为4级, 0分: 不显色或显色不清; 1分: 浅黄色; 2分: 棕黄色; 3分: 深棕色. 最后综合计分 = (染色细胞分数+染色强度分数)/2, 阴性: 所得分数<0.5分; 弱阳性(+): 0.5-1.5分; 中度阳性(++): 1.6-2.5分; 强阳性(+++): >2.5分.

**统计学处理** 采用SPSS13.0版软件包进行统计分析, 半定量资料采用等级资料的秩和检验法分析,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

LRP-5、LRP-6阳性表达定位于肠黏膜非典型细胞、癌细胞、腺上皮的胞膜、胞质内, 多呈浅黄色至深棕黄色(图1-4), LRP-5、LRP-6在UD组阳性表达率分别93.33%、86.67%, 高于UC组及SCRC组( $P<0.05$ ); 两者在UCAC组阳性表达率均为80.00%, 高于UC组及SCRC组( $P<0.01$ , 表1).

## 3 讨论

结肠直肠癌(colorectal cancer, CRC)是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)一个严重的并发症, 占IBD患者死亡率的10%-15%<sup>[6]</sup>. IBD的患者有发展成CRC的风险, 这种风险因素包括疾病持续的时间、病变范围、诊断时的年龄、炎症的严重度、结肠癌的家庭史等<sup>[7]</sup>. 不同的研究表明, UC确诊20年后, 其发生CRC的风险范围

### ■ 相关报道

Toshiaki等采用DNA微阵列检测53例UC患者, 其中8例为UCAC, 2例为UD, 研究结果表明LRP5、LRP6在两组中皆存在高表达.

### ■ 创新盘点

本研究在国内首次应用免疫组织化学SP法联合检测LRP5、LRP6蛋白在UCAC、UD及正常肠黏膜组织中的表达情况,从而在分子水平上探讨LRP5及LRP6蛋白在UCAC发病中的可能机制,同时为临床寻找一个从炎症-瘤变的生物学标志物,有针对性的肠镜活检,以早期发现、预防CRC的发生提供依据。

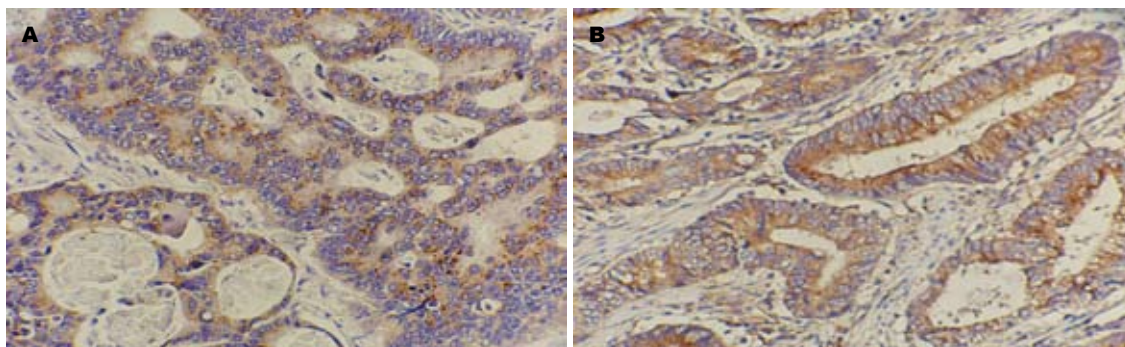


图 1 LRP-5和LRP-6在UCAC中的表达(免疫组织化学SP法×20). A: LRP-5; B: LRP-6.

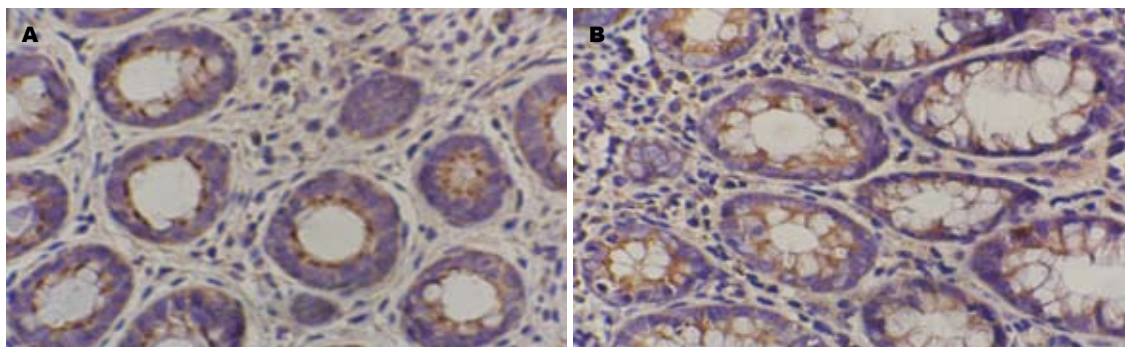


图 2 LRP-5和LRP-6在UD中的表达(免疫组织化学SP法×20). A: LRP-5; B: LRP-6.

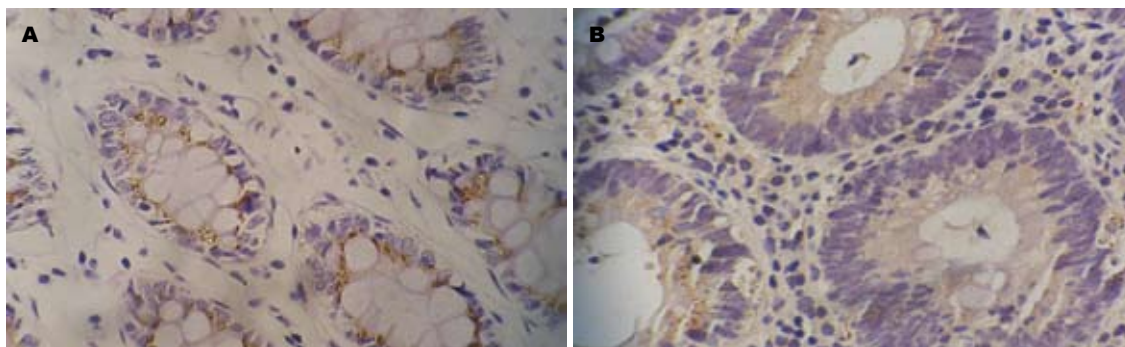


图 3 LRP-5和LRP-6在UC中的表达(免疫组织化学SP法×20). A: LRP-5; B: LRP-6.

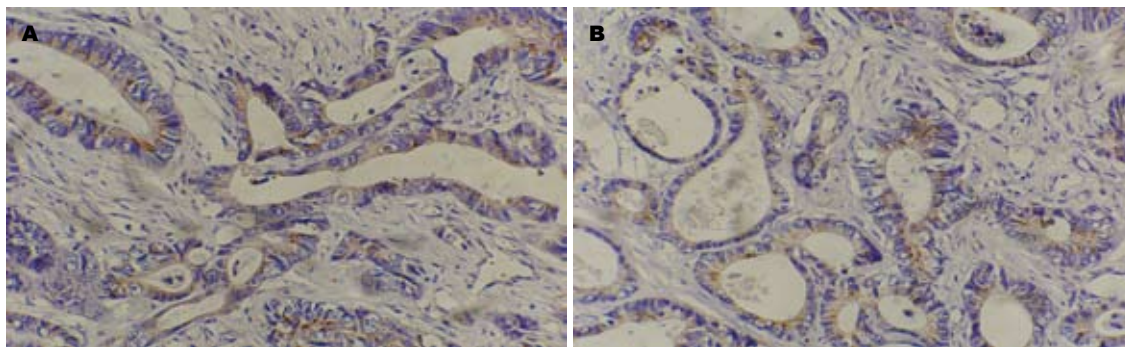


图 4 LRP-5和LRP-6在SCRC中的表达(免疫组织化学SP法×20). A: LRP-5; B: LRP-6.

从1%-34%各不相同<sup>[8-13]</sup>.最近更多的研究显示每年UC发展为CRC的发病率为0.06%-0.20%<sup>[14,15]</sup>.

尽管如此,但人们对UCAC发病机制研究较少,亟待进一步加以阐释。

**应用要点**  
本研究证实了LRP5、LRP6蛋白在UD及UCAC中存在高表达, 联合检测两种蛋白的表达, 为CRC的防治提供新的思路 and 理论依据。

表 1 LRP-5、LRP-6在各组中的表达

分组	n	LRP-5			LRP-6		
		+(n)	-(n)	阳性率(%)	+(n)	-(n)	阳性率(%)
UD组	15	14	1	93.33 <sup>a</sup>	13	2	86.67 <sup>a</sup>
UCAC组	5	4	1	80.00 <sup>b</sup>	4	1	80.00 <sup>b</sup>
UC组	30	7	23	23.33	5	25	16.67
SCRC组	20	8	12	40.00	9	11	45.00

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs UC组及SCRC组.

低密度LRP是Herz于1998年发现的, 经cDNA序列分析, 他含有与低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)受体相关的重复序列, 故称LRP; LRP-5、LRP-6是LRP家族成员之一, LRP-5是一种由1 615个氨基酸编码蛋白, 由胞外区、跨膜区和胞质区组成, LRP-6是一种由1 613个氨基酸编码蛋白, 所编码的蛋白在结构与LRP-5相似.

CRC的发生机制是控制细胞生长和存活信号转导途径被异常激活, 其中经典的Wnt信号转导途径是其中通路之一, 主要成分包括细胞外因子(Wnt)、跨膜受体(Fz)、辅助受体(LRP-5、LRP-6)、β-链蛋白(β-cat)等一系列蛋白质; 当Wnt信号存在时, Wnt蛋白与Fz的胞外区结合, 在辅助受体LRP-5、LRP-6的共同作用下, 胞质中的散乱蛋白被募集至胞膜下, 后者能将糖原合酶激酶3β磷酸化, 使其从轴蛋白上脱落, β-cat无法降解, 大量游离的β-cat在胞质中聚集并进入细胞核内和TCF转录因子结合, 导致Wnt靶基因的转录, 由于他们在细胞增殖及癌变过程中起重要作用, 当过度表达时将会影响到细胞的增值、分化, 促进肿瘤的发生.

目前有关UCAC发病机制研究甚少, 本研究采用免疫组织化学的方法研究LRP-5、LRP-6在各组中的表达情况, 研究结果发现, LRP-5、LRP-6在UD组阳性表达14例(14/15)、13例(13/14), 显著高于UC组及SCRC组, 差异有统计学意义(P<0.05); 提示在UD组已有LRP-5、LRP-6的过表达. LRP-5、LRP-6在UCAC组阳性表达均为4例(4/5), 高于UC组及UCAC组, 差异有统计学意义(P<0.01), 进一步提示LRP-5、LRP-6在UCAC的发病机制中可能起着起较重要的作用, 在单一信号转导相关的基因中, LRP-5和LRP-6作为Wnt途径的辅助受体, 可作为一个识别基因, 转导细胞内的Wnt信号, 促进上皮异型增生及癌的发生, 国外有关研究也支持我们

的观点<sup>[16,17]</sup>.

一组病例对照研究显示<sup>[18]</sup>, 从确诊UC到发展为CRC, 平均年龄为52.5岁, 本组病例表明UCAC平均年龄为48.2岁, 年龄分布偏小, 分析其原因可能与病变持续的时间、范围、炎症的程度、环境及饮食习惯等因素有关.

UCAC并发CRC的危险性较正常人群高20倍<sup>[19]</sup>, 多项研究分析结果表明<sup>[13,20-24]</sup>: UC患者10年发生结直肠癌的发生率为2%, 20年为8%, 而30年高达18%. UC易发癌变已经成为一个不争的事实. UCAC的发生遵循炎症-异型增生-癌的序列而不同于散发性CRC的腺瘤-癌的途径, 通过内镜来识别癌前病变会变得非常困难<sup>[25-27]</sup>, 故寻找一种揭示癌变的生物学标志物显得很重要, Velayos等<sup>[28]</sup>研究认为, 目前还没有一个很好的因子来预测、提示UCAC发生的可能性. 随着研究的不断深入, 人们逐步认识到, 利用分子生物学技术检测长期的UC患者, 从而筛选出可能癌变的高危人群, 进行有针对性的肠镜检查将具有重要的实用价值<sup>[29]</sup>. 通过本研究显示LRP-5、LRP-6这两种生物标志物的检测手段比较简便, 可客观反应肠道黏膜从炎症-上皮内瘤变的过程, 有利于临床进行实时监控, 对高表达的高危人群, 有针对性的肠镜活检以尽早发现UD, 提示恶变为UCAC的可能性, 有助于临床指导治疗, 对减少患者痛苦, 提高患者的生活质量有较重要的意义.

本研究UD及UCAC病例数有限, UD与UCAC间是否存在统计学意义, 还需大量前瞻性研究来确定, 但是, 本研究从分子水平上研究了UCAC的发病机制, 对未来的相关研究提供了一个可参考的研究方向.

#### 4 参考文献

1 王赫, 李岩, 张卫卫, 王学清. 溃疡性结肠炎相关性大肠癌P53、K-ras及hMSH2蛋白表达的研究. 中华消化杂志 2005; 25: 6-9

### ■同行评价

本文设计合理, 具有一定的临床借鉴意义.

- 2 平田一郎. 溃疡性结肠炎相关癌的临床监测研究进展. *医学研究生学报* 2008; 21: 449-450
- 3 Crohn BB, Rosenberg H. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis. *Am J Med Sci* 1925; 170: 220-228
- 4 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. *胃肠病学* 2007; 12: 488-495
- 5 Sinicrope FA, Hart J, Michelassi F, Lee JJ. Prognostic value of bcl-2 oncoprotein expression in stage II colon carcinoma. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1103-1110
- 6 Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Suppl 2: 1-5
- 7 Ahmadi A, Polyak S, Draganov PV. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: the search continues. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 61-66
- 8 Winther KV, Jess T, Langholz E, Munkholm P, Binder V. Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1088-1095
- 9 Prior P, Gyde SN, Macartney JC, Thompson H, Waterhouse JA, Allan RN. Cancer morbidity in ulcerative colitis. *Gut* 1982; 23: 490-497
- 10 Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323: 1228-1233
- 11 Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992; 103: 1444-1451
- 12 Kewenter J, Ahlman H, Hultén L. Cancer risk in extensive ulcerative colitis. *Ann Surg* 1978; 188: 824-828
- 13 Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: 526-535
- 14 Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001; 91: 854-862
- 15 Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, David G, Pandur T, Balogh M, Fischer S, Vargha P, Lakatos PL. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 205-211
- 16 Watanabe T, Kobunai T, Toda E, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, Tanaka T, Yamamoto Y, Hata K, Kojima T, Yokoyama T, Konishi T, Okayama Y, Sugimoto Y, Oka T, Sasaki S, Ajioka Y, Muto T, Nagawa H. Gene expression signature and the prediction of ulcerative colitis-associated colorectal cancer by DNA microarray. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 415-420
- 17 Brennan K, Gonzalez-Sancho JM, Castelo-Soccio LA, Howe LR, Brown AM. Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins. *Oncogene* 2004; 23: 4873-4884
- 18 Pinczowski D, Ekbohm A, Baron J, Yuen J, Adami HO. Risk factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology* 1994; 107: 117-120
- 19 Eaden JA, Mayberry JF. Guidelines for screening and surveillance of asymptomatic colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2002; 51 Suppl 5: V10-V12
- 20 Rozen P, Baratz M, Fefer F, Gilat T. Low incidence of significant dysplasia in a successful endoscopic surveillance program of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1995; 108: 1361-1370
- 21 Lennard-Jones JE, Melville DM, Morson BC, Ritchie JK, Williams CB. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 1990; 31: 800-806
- 22 Stonnington CM, Phillips SF, Zinsmeister AR, Melton LJ. Prognosis of chronic ulcerative colitis in a community. *Gut* 1987; 28: 1261-1266
- 23 Maratka Z, Nedbal J, Kociánová J, Havelka J, Kudrman J, Hendl J. Incidence of colorectal cancer in proctocolitis: a retrospective study of 959 cases over 40 years. *Gut* 1985; 26: 43-49
- 24 Gyde SN, Prior P, Allan RN, Stevens A, Jewell DP, Truelove SC, Lofberg R, Brostrom O, Hellers G. Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centres. *Gut* 1988; 29: 206-217
- 25 Lutgens MW, Vleggaar FP, Schipper ME, Stokers PC, van der Woude CJ, Hommes DW, de Jong DJ, Dijkstra G, van Bodegraven AA, Oldenburg B, Samsom M. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gut* 2008; 57: 1246-1251
- 26 Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G7-G17
- 27 Brackmann S, Andersen SN, Aamodt G, Roald B, Langmark F, Clausen OP, Aadland E, Fausa O, Rydning A, Vatn MH. Two distinct groups of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 9-16
- 28 Velayos FS, Loftus EV, Jess T, Harmsen WS, Bida J, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: A case-control study. *Gastroenterology* 2006; 130: 1941-1949
- 29 Risques RA, Rabinovitch PS, Brentnall TA. Cancer surveillance in inflammatory bowel disease: new molecular approaches. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 382-390

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 丙型肝炎病毒侵染机制的相关研究进展

杨文祥, 熊威, 杨洁, 樊柏林

杨文祥, 樊柏林, 湖北省疾病预防控制中心 湖北省武汉市 430079

熊威, 杨洁, 武汉大学生命科学院 病毒学国家重点实验室 湖北省武汉市 430079

作者贡献分布: 论文由杨文祥与熊威共同撰写完成; 论文审校由樊柏林与杨洁完成。

通讯作者: 樊柏林, 主任医师, 430079, 湖北省武汉市, 湖北省疾病预防控制中心. vanbolin@yahoo.com.cn

电话: 027-87652091

收稿日期: 2011-02-18 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-18

## Mechanism of hepatitis C virus infection

Wen-Xiang Yang, Wei Xiong, Jie Yang, Bo-Lin Fan

Wen-Xiang Yang, Bo-Lin Fan, Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Wei Xiong, Jie Yang, State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Correspondence to: Bo-Lin Fan, Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, Hubei Province, China. vanbolin@yahoo.com.cn

Received: 2011-02-18 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-18

## Abstract

About 170 million persons are infected with hepatitis C virus (HCV) around the world, and nearly 80% of infected patients develop chronic liver disease that may eventually lead to liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. The mechanisms underlying the life cycle of HCV in the host are still largely unknown and the efforts made by researchers have been hampered by the absence of a robust system reproducing HCV infection. Moreover, there are no effective vaccines or drugs available to defend or exclude viruses because of frequent viral mutation. In 2005, several research groups have successfully established cell culture systems for HCV, pushing the basic research on HCV to a new stage. This paper will focus on HCV genome diversity, progress in culture models, HCV life cycle, and protein function to highlight the mechanism of HCV infection.

Key Words: Hepatitis C virus; Infection mechanism;

Genome diversity; Research model; Virus life cycle

Yang WX, Xiong W, Yang J, Fan BL. Mechanism of hepatitis C virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2133-2140

## 摘要

丙型肝炎在全世界约有1.7亿的感染人群, 将近80%的患者会发展成慢性肝炎, 最终导致肝硬化和肝癌. 由于缺乏高效的细胞培养传代模型, 使得丙型肝炎病毒(HCV)的生命周期的研究一直处于瓶颈, 同时病毒自身高频突变, 使得目前没有有效的疫苗药物进行预防和治疗. 2005年Takaji Wakita, Charles M. Rice, Francis V. Chisari 3个研究组建立了HCV cell culture体系, 将HCV的研究推上新的阶段使得机制研究更加深入. 本文将就HCV的基因组多样性, 研究模型的进展, 病毒生活周期以及相关蛋白研究方面, 全面讲述HCV侵染机制的进展.

关键词: 丙型肝炎病毒; 侵染机制; 基因组多样性; 研究模型; 病毒生活周期

杨文祥, 熊威, 杨洁, 樊柏林. 丙型肝炎病毒侵染机制的相关研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(20): 2133-2140

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2133.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)作为一种世界范围内流行的病毒, 由于该病毒的高突变性, 缺乏有效地疫苗和体外培养研究模型, 使其已经严重影响了大众的健康, 因而对于他的研究刻不容缓. 据估计全球约有3%的人口感染了HCV. 而其中有将近50%-80%的感染患者逃避了宿主的免疫, 而由急性感染转入慢性感染, 进一步恶化为肝硬化直至肝癌<sup>[1]</sup>. 目前对于HCV唯一有效地治疗是聚乙二醇化IFN $\alpha$ 联合病毒唑, 但是其不良反应很大且对于1型病毒的治愈效率低下, 因此对于病毒的复制机制的研究将有助于针对该类药物的筛选和研发<sup>[2]</sup>. 在本篇文章中将介绍HCV的研究模型进展, HCV的复制周期以及各功能性蛋白的研究. 使读者对HCV有一

## ■背景资料

丙型肝炎在全世界约有1.7亿的感染人群, 将近80%的患者会发展成慢性肝炎, 最终导致肝硬化和肝癌. 由于缺乏高效的细胞培养传代模型, 使得丙型肝炎病毒的生命周期的研究一直处于瓶颈, 同时病毒自身高频突变, 使得目前没有有效的疫苗药物进行预防和治疗.

## ■同行评议者

黄缘, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科

## ■ 研发前沿

虽然HCVcc系统的建立有利于推动病毒装配和成熟机制的研究,但影响毒粒成熟和生化特性的关键因素依旧是研究的热点。

个全面的了解. 自1989从患者血清中通过免疫筛选的方法获得非甲非乙的HCV的cDNA以来已经有20年的时间了<sup>[3]</sup>, 但是对于病毒的机制还没有完全了解, 也没有针对病毒有效疫苗的研发成功, 而且对于HCV活体病毒的获得途径的缺乏和低的病毒滴度, 没有体外有效培养系统的支持, 大大延缓了研究的进程. 尽管存在的以上的阻碍, 仍然有许多令人振奋的进程推动的HCV的研究, 如, 从黑猩猩中获得全长的HCV基因组克隆, 亚基因复制子模型的建立<sup>[4]</sup>, 研究病毒入侵吸附HCV假颗粒模型<sup>[5]</sup>, 以及2005年的病毒细胞传代培养系统可以获得成熟的具感染性的病毒颗粒<sup>[6]</sup>, 还有就是2009年让转基因小鼠成为除黑猩猩以外第2个有效的候选体内研究模型<sup>[7]</sup>, 因此HCV的研究将会进入新的高峰.

## 1 病毒的分类学和基因组多样性

HCV是单链正义病毒, 隶属于黄病毒科肝病毒属, 与他同科的病毒还有瘟病毒属的病毒如: 黄热病毒、博尔那病毒、牛腹泻病毒等, 他们的基因组是由5'和3'端非翻译序列和一个开放性阅读框构成. 而值得一提的是由于基因组并没有帽子结构, 在5'端存在有4个颈环结构域组成的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES). 而紧邻的5'端的依次是作为结构蛋白的核心蛋白以及包膜蛋白1, 2. 而非结构蛋白有p7离子通道, NS2-3蛋白酶, NS3-4丝氨酸蛋白酶及解旋酶, NS4B, NS5A, RNA复制酶NS5B以及3'UTR.

HCV的感染增殖是一个迅速的过程, 在感染人类或者黑猩猩后约2 mo病毒复制数量将达到峰值<sup>[1]</sup>. 但是这种高的复制效率, 却由于RdRp缺乏有效地校检机制, 使得HCV的基因组表现的高突变率, 使得对HCV的研究和抗病毒药物的开发是个严峻的挑战. 根据HCV的序列的多样性国际上分类观点主要是采用simmonds系统<sup>[8]</sup>, 利用5UTR, core, NS5B的序列分析, 将其分为6个主要型和约12个亚型, 并且对于多样性的水平分为4个水平, >30%为型, >20%为亚型, >10%为分离株. 同时现在有效地干扰素治疗1型没有2, 3型来的疗效好. 另外还提出了准型的概念: 即是对感染HCV个人中存在的多种突变基因组的共存状态的表述(其中相似性>95%)<sup>[9]</sup>. 现在已经有将近40 000多病毒株获得并上传数据库, 同时对于机体的免疫CD8, CD4 T淋巴细胞表位分析也纳入进来.

## 2 研究模型

自1989年首个cDNA从患者血清中获得, 对病毒生活周期也一步一步, 但是有些复制系统不被学界所接受. 直到1997年全长的基因组才准确的获得. 但是由于缺乏允许的细胞系的支持, 感染性转录未获得, 只有通过接种黑猩猩而获得, 昂贵且受到道德和法律的限制. 尽管用于细胞传代培养的RNA复制模型的并没有成功, 但是一些替代的表达系统和生物信息方法, 生化分析, 对基因组, 蛋白加工, 蛋白功能了解了一些. 直到1999年1b型亚基因(con1)<sup>[4]</sup>复制子模型的建立, 使得这个双顺反子结构的转录本可以在Huh7人类肝癌细胞系中检测到复制并表达出相应的非结构蛋白. 但是其的缺点是并非全长的基因组, 只能支持病毒的复制而对于其他的过程却不能够介入. 但是在con1的基础上, 先天性免疫通路上的视黄酸诱导基因缺失的细胞系Huh7.5<sup>[10]</sup>的建立更加支持了病毒的复制. 但是在这些传代细胞中检测到HCV的序列却发现了主要集中在E2、NS3、NS4A等序列的适应性突变. 接着对NS5A的突变可以有效地提高病毒的复制水平<sup>[11]</sup>, 但是却不能产生成熟的毒粒, 这可能是毒粒产生的相关基因的突变而打破了复制和翻译的平衡.

虽然不能产生全长的成熟病毒, 但是利用截断的包膜E2蛋白C段来刷选得到了如CD81, SR-B1等病毒吸附的潜在受体. 但是最主要的成果是构建了利用逆转录病毒载体而表达产生了包含有HIV部分基因组却有着HCV包膜的假病毒颗粒(HCVpp)<sup>[5]</sup>. 其构建的策略是将: (1)HC-VE1E2; (2)HIV或者鼠源白血病病毒的气gag-pol; (3)带有报告基因逆转录载体共转染293T细胞. 产生的假毒粒就可以作为吸附受体检测的试金石.

就在2005年Wakita等<sup>[12]</sup>利用来自日本的JFH-1(2a型HCV恶性患者的全长克隆), 在不需适应性突变的情况下, 成功的转染了Huh7细胞系, 并能复制且产生具有侵染性的毒粒. 这是第1次可以用来了解HCV的全部复制周期的体外模型, 具有划时代的意义. 与此同时Rice工作组<sup>[6]</sup>利用JFH-1的NS3到NS5B片段嵌合另外一个2a型患者J6全长克隆的IRES到NS2的片段可以在Huh7.5.1(对于Huh7改造的亚系, 先天免疫RIG-1缺失)更有效地复制. 而从中获得的毒粒可以感染黑猩猩, 免疫缺陷小鼠和部分的人种. 因此利用传统病毒学方法, 全面的了解病毒的周期成为可能. 而分布更加广泛具有更强的IFN抵

抗能力的1a型感染型毒粒却得到较低滴度并且伴有5个适应性突变<sup>[13]</sup>, 所以建立所有型感染模型依旧存在挑战。

而在体内模型研究方面, 由于黑猩猩和人类有着超过98%的序列同源性, 无疑是人类疾病研究最好动物模型。人类和黑猩猩都可以在感染HCV几天后检测到HCV复制, 最大的病毒滴度可以达到 $10^5$ - $10^7$  copies/mL血液。感染的2-12 wk不会有明显的症状, 8 wk后血清中会检测到HCV特异性抗体<sup>[14]</sup>。就在研究病毒的早期, 黑猩猩就作为非甲非乙型肝炎病毒传播和建立持续性感染以及慢性肝炎发生的天然模型, 病毒的大小, 包膜蛋白的类型以及HCV克隆基因组数据都是在实验黑猩猩中获得<sup>[3,15,16]</sup>。由于人类在感染的早期现象不明显, 所以早期实时监测病毒动力学, 宿主免疫以及病理症状都依赖于黑猩猩的样本研究<sup>[17-19]</sup>。但是由于道德和经济的限制, 不可能将所有的实验应用于黑猩猩, 所以研究人员也在寻找其他的灵长类模型, 如食蟹猴、绿猴、恒河猕猴和日本猴等, 都被接种丙型肝炎病毒, 但这些物种都无法建立感染<sup>[20]</sup>。而做为攀缘目啮齿类动物的树鼩被认为是最有潜力感染动物小模型<sup>[21,22]</sup>, 有的课题组发现用患者血清和细胞培养上清感染都可以得到很高的滴度<sup>[23]</sup>, 也有人认为在20%-30%的群体有明显的感染体征, 而且体内只有较低的病毒载量<sup>[24]</sup>。因此树鼩作为黑猩猩的替代模型还需实验的证明。Wu等建立了新颖的大鼠模型, 是通过将肝细胞瘤细胞注射到怀孕母鼠子宫内, 当子代出生1 wk后感染病毒, 经检测RNA可以到达 $2 \times 10^4$  copies/mL, 但是由于人源和大鼠MHC的差异性而使得其不能成为获得性免疫的模式<sup>[25]</sup>。许多研究组也将丙型肝炎的各个蛋白或者全基因组利用胚胎微注射进入小鼠, 利用转基因来研究机体的影响, 如转入包膜E1、E2蛋白并不会诱导肝类疾病, 而当NS5A转入小鼠中会抑制TNF介导的肝细胞凋亡<sup>[26]</sup>。而时下嵌合人类肝脏的uPA-SCID小鼠可能是比较合适的丙肝病毒小动物模型, Kneteman等在2001年通过将人类肝脏异源移植入携带纤溶酶原激活物转基因的SCID小鼠免疫缺陷模型中, 感染丙型肝炎患者血清可以检测到高滴度的病毒水平, 并发现病毒蛋白定位于肝细胞根瘤处, 而且在正常传代下, 都可以检测到负链的表达和成熟毒粒的释放, 这标志着体内嵌合人源肝脏小鼠研究丙型肝炎病毒模型的建立<sup>[27]</sup>。这些体内模型的发展无疑将推动抗HCV药物的筛选

和肝脏毒性试验平台的建立。

### 3 病毒的复制周期

3.1 病毒的结构 HCV的颗粒在电镜下观察使约40-70 nm的颗粒<sup>[6]</sup>, 据推测其是由镶嵌着的包膜蛋白E1E2锚定于同源细胞表面的双分子脂层。而在脂层的内部包裹的多层拷贝的核心蛋白以及中心的病毒RNA基因组。而在体液循环中的毒粒往往是和低密度脂蛋白结合的形式存在<sup>[28]</sup>, 这也可以很好地解释了病毒的低浮力密度和异源性。

3.2 病毒的入侵 HCV作为仅仅侵染人和黑猩猩的病毒, 除去干细胞外, B淋巴细胞, 树突状细胞等等细胞也被报道可以被感染。而广泛存在于细胞表面的CD81<sup>[29]</sup>、低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)<sup>[30]</sup>、SR-B1<sup>[31]</sup>以及最近发现紧密连接蛋白-1<sup>[32]</sup>都被推测为HCV侵染所必须受体。LDLR作为受体可能是由于HCV病毒是往往和低密度脂蛋白结合, 而作为早期的吸附过程。另外DC-SIGN和L-SIGN均为3型钙依赖性植物凝集素, 分别表达与树突状细胞核肝窦内皮细胞表面, 但是不在肝细胞表面表达, 所以可能作为临近细胞受体协助病毒的入侵<sup>[33]</sup>。而CD81和SR-B1却是病毒进入的必要非充分条件, 在非肝源细胞系中表达CD-81等受体并不能使HCVpp和HCVcc感染, 而对于该受体的siRNA干扰或者特异抗体抑制将会降低允许细胞的感染率, 所以存在一定另外的细胞受体介导吸附。Rice研究组<sup>[6,34]</sup>分别在2005和2009年利用Huh7.5 cDNA文库和循环包装救援(cyclic packaging rescue, CPR)方法刷选到了介导病毒晚期入侵的两个关键受体claudin-1和occludin, 且均是细胞紧密连接的蛋白受体。至此在非允许性感染HCV的细胞系中表达上述4个基因将可以使细胞成为敏感性宿主。而这项研究同时也推动了转基因小鼠成为下一个动物体内模型的可能。受体的结合不但介导了吸附而且也引发了由网格蛋白所介导的胞吞作用进入到内涵体中<sup>[35]</sup>, 而内涵体中的低pH诱导了HCV包膜糖蛋白与内涵体的融合<sup>[36]</sup>, 从而释放核壳与胞质中, 这一过程与HCV同为黄病毒科的病毒类似。

3.3 翻译的起始 由于HCV的转录本并不存在5'端“帽子”结构, 因此在HCV定位于5'UTR的IRES介导了翻译的起始, 主要是由3个颈环结构(domain II, III, IV)组成。但在IRES的上游48

#### ■ 相关报道

已有研究组建立了HCV cell culture体系, 将丙型肝炎病毒的研究推上新的阶段使得机制研究更加深入。

### ■应用要点

本文中介绍HCV的研究模型进展, HCV的复制周期以及各功能性蛋白的研究, 使读者对HCV有一个全面的了解.

bp的domain I 发现与病毒复制相关, domain II 介导了60 s结合过程中eIF2的释放. 当前主流的翻译起始模型是首先40 s亚基IRES结合, 定位于P位点. 接着翻译起始因子eIF3和eIF2-MET-tRNA结合形成48 s复合体, 接着GTP水解60 s亚基结合IRES形成80 s核糖体结构<sup>[37]</sup>. 但是具体的机制还得需要冷冻电镜技术<sup>[38]</sup>的深入, 揭示IRES和核糖体结合中构象的改变, 来比较了与细胞内源mRNA翻译的不同. 同时在肝源细胞中发现了特异性的miR122<sup>[39]</sup>, 对于其的抑制将影响HCV RNA总量水平, 但对其与5'UTR位点结合区域的突变并不影响病毒蛋白的表达, 而另一项研究证明了其通过增强核糖体和RNA的结合来提高蛋白的翻译. 5'UTR与miR122(22-40 bp)配对区域同时也和core编码区碱基互补, 这种RNA相互作用将抑制IRES功能<sup>[40]</sup>.

**3.4 多聚蛋白的加工** 通过翻译HCV开放阅读框将会得到多聚体蛋白前体, 需要通过内质网上信号肽酶, NS2-3和NS3-4丝氨酸蛋白酶的切割成熟<sup>[1]</sup>.

**3.5 病毒复制复合体** 病毒蛋白翻译成熟后, 将组成病毒复制复合体进行复制, 而类似于其他正链RNA病毒<sup>[41]</sup>, 该过程和细胞内的膜性结构紧密相关, 据推测可能是为了支持高浓度的复合体的合适构象<sup>[42]</sup>, 并且保护合成的RNA免受内源酶切和RNA的干扰<sup>[43]</sup>. 通过超薄切片观察在huh-7亚克隆复制子中, 病毒的复制会引起名为membranous web膜性结构改变, 通过单蛋白表达发现是由于NS4B蛋白所引起, 且在感染猩猩后体内出现的“海绵状”融合大小相一致, 推测可能其中包含有复制复合体<sup>[44]</sup>.

另外, 发现病毒的复制是受宿主内脂肪代谢影响, 可能是病毒蛋白和宿主内通路蛋白相互作用的关系. 如在HCVcc中, 饱和脂肪酸和宿主内有些需要经过geranylgeranylation的修饰的蛋白将刺激病毒的复制, 而不饱和的则相反抑制. 拥有F-BOX和CAAX结构域的FBL2蛋白便是其中之一可以和NS5A相互作用, 利用干扰F-box的mRNA将大幅降低病毒的复制. 但是其中具体机制还不是很清楚, 但操控脂肪代谢可以作为药物治疗的可能途径<sup>[45,46]</sup>.

**3.6 病毒的装配、成熟与释放** 虽然HCVcc系统的建立有利于推动病毒装配和成熟机制的研究, 但影响毒粒成熟和生化特性的关键因素依旧是研究的热点. 首先, 细胞环境因素如在Huh7.5细胞比在Huh7中产生更高的感染滴度<sup>[6]</sup>, 且随着

细胞的传代, 会出现更多的适应性突变<sup>[11]</sup>, 而研究发现其中在E2蛋白位点G451R处的突变将增加病毒颗粒的产生但不影响病毒的复制<sup>[47]</sup>; 其次, 基于HCV多种型而成的多种嵌合全长克隆的感染颗粒效率的研究表明, NS2片段的N端第一个跨膜结构域将影响病毒的包装<sup>[48]</sup>, 类似的特点同科的黄病毒和瘟病毒中找到<sup>[49]</sup>; 再者, 关于成熟的病毒分泌是和脂类或脂蛋白密切相关, 通过胞内胞外颗粒分析表明胞外颗粒具有更低的浮力密度, 且在动物体内和在细胞传代培养中也得到了相似的结论, 动物体内具备更低的浮力密度, 由此推测病毒的成熟需要低密度脂蛋白<sup>[50,51]</sup>. 最近又研究表明了抑制低密度脂蛋白(载脂蛋白B和三酰甘油)的合成将降低HCV感染颗粒的分泌是进一步的证明<sup>[52]</sup>. 最后关于核壳的包装, 出芽机制, 成熟以及分泌途径仍旧不清楚, core蛋白在无细胞培养物系统中的组装起了一定的作用但是在HCVcc中是否结果类似还有待商榷, 而p7作为离子通道也参与了毒粒的释放<sup>[53]</sup>, 随着HCVcc的进一步研究所阐述.

## 4 病毒的基因组

HCV共计编码10个蛋白, 且均是定位于内质网膜上, 根据特性分为结构蛋白和非结构蛋白.

**4.1 结构蛋白 core**是基因组编码的第1个蛋白, 组成病毒的壳体. 其存在的信号肽序列位于C末端与E1连接处被信号肽酶sp切割, 而跨膜区被定为双层膜内的spp切割成熟为173-179 aa的序列<sup>[54]</sup>. 将成熟的core是个 $\alpha$ 螺旋蛋白, 可分为N端的D1和C的D2两个结构域, 定位与ER或者脂质小滴表面上. D1含有富含碱性氨基酸残基, 利于RNA的结合以及蛋白的聚合化. D2是一个疏水链接的2个单环结构, 通过突变表明两单环上的疏水残基表面与core结合脂质小滴相关, 且D2的疏水残基关系蛋白折叠和稳定<sup>[55]</sup>. 另外发现, core可以影响脂类代谢中相关因子(如微粒体三酰甘油转移蛋白MTP), 可能是诱导脂肪变性<sup>[56]</sup>, 转向肝硬化的原因. 而有人认为core是病毒免疫逃逸的核心, 如减少脾抗原递呈细胞pDC的数量从而抑制IFN $\alpha$ 的效力<sup>[57]</sup>, 以及降低SOCS的表达阻碍干扰素下游JAK-STAT抗病毒通路<sup>[58]</sup>.

E1, E2分别是192, 363个氨基酸的蛋白, 以非共价形式结合形成异源二聚体作为保护病毒以及作为入侵的识别配体<sup>[56]</sup>. 且他们均含有跨膜结构, 是由两段疏水残基连接而成, 并且信号肽定位于他们的第2段区. 在没有信号肽酶切割

时, 他们定位于ER上的转运子上, 而切割后, 将使得他们的拓扑学改变, 信号序列转向胞质形成跨膜的单通道. HCV糖蛋白的成熟及正确的折叠则需要ER的伴侣和二硫基化就系统<sup>[56]</sup>. E2可以抑制干扰素诱导蛋白激酶PKR的活化和抑制eIF2a磷酸化从而抑制宿主内蛋白的合成, 以达到免疫逃逸<sup>[59]</sup>. 另外E2参与了与CD81的结合, 介导了进一步的入侵<sup>[60]</sup>. 而包膜蛋白及其受体作为疫苗研究的靶点, 但是归咎于E2d的HVR的高突变率, 一直没有有效地疫苗研发, 但2007年Owsianka发现抗体CBH-5能够抑制E2于CD81结合, 体外的实验使得研究又有了新的曙光<sup>[61]</sup>.

4.2 非结构蛋白 P7是63个氨基酸的多肽形成的五聚体蛋白, 含有两个跨膜区由一个跨膜质环连接, 且朝向ER腔. P7影响病毒的感染并且寡聚化形成离子通道, 通过对其的2个保守碱性残基突变会发现其影响了病毒毒粒的成熟和释放. 因此p7可作为抗病毒的下一个方向<sup>[62]</sup>. 但是对于离子通道的具体意义还不是很清楚.

4.2.1 NS2-3: NS2是一个23 000 Da的疏水膜蛋白, 只有组成NS2-3时才执行自切割酶功能, 虽然不是RNA复制所必须但却影响着病毒的全部周期<sup>[4]</sup>, 是由NS2的C端与NS3 1/3的N端组成. 通过诱变表明His143、Glu163、Cys184是蛋白水解活性位点<sup>[63]</sup>. 而2006年Rice<sup>[64]</sup>研究组解析了其的催化结构域为一种新的半胱氨酸蛋白酶. 催化域是一个二聚体, 且每个单体中都含有催化活性的三联体, 只有在哺乳动物细胞中表达出复合结构时才表现其活性. 而另外通过研究HCV其他酶蛋白如NS3-4A, NS5B均存在受到PPI(脯氨酰顺-反异构酶)活PPI类似物的调控的现象, 因此是否也存在内源性PPI调节NS2蛋白酶也是一个热点.

4.2.2 NS3-4A: NS3-4A蛋白酶是病毒周期中比较重要的蛋白酶, 是多聚体蛋白成熟的关键所以也是药物研发的靶点. 其时一个多功能蛋白, 拥有的丝氨酸蛋白酶和NTP解旋酶功能, 而两个功能结构域分别位于N端和C端. 而NS4A作为协助因子结合N端是膜结合所必需的<sup>[44]</sup>. 所以NS3-4A一直作为药物开发的靶点<sup>[65]</sup>, 尤其是他的催化三联体位点(His57、Asp81、Ser139). 但是底物结合区需要一个比较大面积的接触位点, 这成为研究的瓶颈. 而且蛋白酶活性还阻断了先天免疫的TLR3和RIG-1通路切割TICAM-1和VISA两个关键的接头蛋白<sup>[66,67]</sup>. 而解旋酶的NS3-4A属于DExH/D-box解旋酶2型超家族, 利用

ATP水解活性解旋双链RNA, 其中据估计有11 bp的距离<sup>[68]</sup>, 但具体其的解旋是辅助复制中间体还是移除相关结合蛋白的原理还不是很清楚.

4.2.3 NS4B: 其是一个还有多重跨膜结构的27 000 Da蛋白, 经过棕榈酰化和多聚化得修饰和成熟<sup>[69]</sup>, 形成membranous web的结构<sup>[44]</sup>. 而这种膜性结构是来源于ER, 据推测起支撑RNA复制复合体的作用. 并且鉴定出其含有一个质环结构的核苷酸结合基序具有GTP水解酶活. 此外NS4B与初级胞内体蛋白Rab5有相互作用, 对Rab5干扰将抑制病毒的复制<sup>[70]</sup>. 更具吸引的是由于病毒的侵染导致内质网应激反应, NS4B蛋白参与了其中降解非折叠蛋白使细胞免于死亡间接地支持了膜性结构的完整<sup>[71]</sup>.

4.2.4 NS5A: 其是一个约56-58 000 Da的磷酸化蛋白, 生化分析表明细胞内源 $\alpha$ 蛋白激酶CKI异型体介导了其的磷酸化<sup>[72]</sup>, 但是是否有其他的蛋白参与还不是很清楚. 结构分析表明NS5A除有一个介导包膜锚定的N段兼性氨基酸螺旋镶嵌于双层脂膜<sup>[73]</sup>, 另外含有3个结构域, 其中保守的domain I 研究比较清楚, 包含一个介导NS5A折叠的锌原子, 而且是以二聚体的形式形成一个类似“夹子”的结构来与RNA结合<sup>[74]</sup>, 更倾向于RNA的富UG区, 据推测其的作用类似于一个“碱基轨道”用于RNA的复制滑动. 而domain II, III表现出更多的可变性可以忍耐碱基插入或者其他突变对病毒的复制所带来的影响. 总体来说NS5A的磷酸化是黄病毒科中保守的特征, 细胞传代中的突变往往集中在丝氨酸残基而提高病毒的复制效率<sup>[11]</sup>, 而其的过磷酸化将抑制与人源囊泡结合蛋白A(hVAP-A)相互作用<sup>[75]</sup>, 而影响到病毒的复制. 另外其还参与影响了细胞多条代谢途径和抗病毒通路如: NS5A抑制双链病毒RNA触发的PKR的激活, 而降低依赖IRF-1相关基因的表达<sup>[76]</sup>以及诱导IL-8的分泌而负调节干扰素系统<sup>[77]</sup>.

4.2.5 NS5B: NS5B是病毒的RNA复制聚合酶, 是一种尾部锚定质膜蛋白, 其C段约21个残基插入膜中而对蛋白的定位有决定作用, 但是却不影响酶活位点<sup>[78]</sup>. 和其他的RNA聚合酶类似含有经典的手指, 拇指以及手掌的亚结构域结构, 而手指和拇指两域形成一个密封的活性环境<sup>[79]</sup>, 而且与脊髓灰质炎病毒类似的RdRps类似<sup>[42]</sup>, 会形成寡聚体而影响关键的复制过程. 最近发现内源性亲环素A, 一类脯氨酰顺-反异构酶由于阻止了RdRp与亲环素B的相互结合, 而大幅降低了胞

■同行评价  
本文选题较好, 具有一定的可读性和科学价值.

内病毒RNA的总量,而广谱的敲除所有的亲环素也会带来这样的效应,进一步表明是亲环素B增加了聚合酶与RNA结合效率<sup>[80,81]</sup>.总的来说将一直作为热门药物的NS5B带来新的思路.

## 5 结论

HCV的感染是个极其复杂的过程,所带来的多重的病理学效应.由于缺乏高效的体外培养体系,在过去的十几年里,研究人员对于建立支持HCV进行体外复制的细胞模型做了大量努力,高效的转染系统成为研究的主流平台,对病毒自身的复制周期有了一个全新的认识,以上大多研究的结果就是基于先期的体外系统的研究结果而对于体外水平药物筛选也起了极大地促进.但在这里也出现了许多问题即体内体外的结果出现相悖的结果.因此HCV的研究将朝向更近于体内的系统出发,更加深刻的阐述病毒的增殖和致病机制.

## 6 参考文献

- Racanelli V, Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003; 24: 456-464
- De Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 2005; 436: 953-960
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362
- Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285: 110-113
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003; 197: 633-642
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309: 623-626
- Pietschmann T. Virology: Final entry key for hepatitis C. *Nature* 2009; 457: 797-798
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 11): 2391-2399
- 李伟琴, 徐光华, 吴殿磊, 袁致海. 丙型肝炎基因分型进展及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 589-593
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9294-9299
- Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290: 1972-1974
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11: 791-796
- Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2310-2315
- Bassett SE, Brasky KM, Lanford RE. Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J Virol* 1998; 72: 2589-2599
- Watanabe T, Katagiri J, Kojima H, Kamimura T, Ichida F, Ashida M, Hamada C, Shibayama T. Studies on transmission of human non-A, non-B hepatitis to marmosets. *J Med Virol* 1987; 22: 143-156
- Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Cook EH, Ebert JW, McCaustland KA, Schable CA, Fields HA. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *J Infect Dis* 1983; 148: 254-265
- Abe K, Inchauspe G, Shikata T, Prince AM. Three different patterns of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 1992; 15: 690-695
- Shimizu YK, Weiner AJ, Rosenblatt J, Wong DC, Shapiro M, Popkin T, Houghton M, Alter HJ, Purcell RH. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6441-6444
- Farci P, London WT, Wong DC, Dawson GJ, Valeri DS, Engle R, Purcell RH. The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: comparison of serologic responses measured with first- and second-generation assays and relationship to HCV viremia. *J Infect Dis* 1992; 165: 1006-1011
- Abe K, Kurata T, Teramoto Y, Shiga J, Shikata T. Lack of susceptibility of various primates and woodchucks to hepatitis C virus. *J Med Primatol* 1993; 22: 433-434
- Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J Virol* 2010; 84: 303-311
- Li Y, Dai JJ, Sun XM, Xia XS. [Progress in studies on HCV receptor of *Tupaia* as a potential hepatitis C animal model]. *Dongwuxue Yanjiu* 2011; 32: 97-103
- Xu X, Chen H, Cao X, Ben K. Efficient infection of tree shrew (*Tupaia belangeri*) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma. *J Gen Virol* 2007; 88: 2504-2512
- Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, Prieto J. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 1998; 244: 513-520
- Wu GY, Konishi M, Walton CM, Olive D, Hayashi K, Wu CH. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* 2005; 128: 1416-1423
- Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Zhou XY, Phillips NJ, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis,

- but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice. *Virology* 2002; 294: 94-105
- 27 Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001; 7: 927-933
- 28 André P, Perlemuter G, Budkowska A, Bréchet C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 93-104
- 29 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941
- 30 Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12766-12771
- 31 Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21: 5017-5025
- 32 Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007; 446: 801-805
- 33 刘媛, 丁惠, 戚中田. 丙型肝炎病毒的细胞入侵和相关受体. *生命的化学* 2008; 28: 36-39
- 34 Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009; 457: 882-886
- 35 Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillé Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2006; 80: 6964-6972
- 36 Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006; 80: 5308-5320
- 37 Fraser CS, Doudna JA. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 29-38
- 38 Valle M, Zavialov A, Sengupta J, Rawat U, Ehrenberg M, Frank J. Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* 2003; 114: 123-134
- 39 Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 2008; 27: 3300-3310
- 40 Kim YK, Lee SH, Kim CS, Seol SK, Jang SK. Long-range RNA-RNA interaction between the 5' non-translated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* 2003; 9: 599-606
- 41 Salonen A, Ahola T, Kääriäinen L. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 285: 139-173
- 42 Lyle JM, Bullitt E, Bienz K, Kirkegaard K. Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* 2002; 296: 2218-2222
- 43 Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* 2002; 9: 505-514
- 44 Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76: 5974-5984
- 45 Kapadia SB, Chisari FV. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2561-2566
- 46 Wang C, Gale M, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* 2005; 18: 425-434
- 47 Zhong J, Gastaminza P, Chung J, Stamataki Z, Isogawa M, Cheng G, McKeating JA, Chisari FV. Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *J Virol* 2006; 80: 11082-11093
- 48 Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 2002; 76: 4008-4021
- 49 Kümmerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* 2002; 76: 4773-4784
- 50 Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwoledge T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3805-3809
- 51 Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* 2006; 80: 11074-11081
- 52 Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Ye J. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5848-5853
- 53 Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 2007; 81: 8374-8383
- 54 McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 2002; 21: 3980-3988
- 55 Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratniner M, Targett-Adams P, Lavergne JP, Penin F, McLauchlan J. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 2006; 281: 22236-22247
- 56 Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 517-523
- 57 Lanford RE, Guerra B, Bigger CB, Lee H, Chavez D, Brasky KM. Lack of response to exogenous interferon-alpha in the liver of chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 2007; 46: 999-1008
- 58 Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Ehrhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Häussinger D. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein

- involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* 2003; 17: 488-490
- 59 Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285: 107-110
- 60 Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 2004; 78: 1448-1455
- 61 Owsianka AM, Tarr AW, Keck ZY, Li TK, Witteveldt J, Adair R, Fong SK, Ball JK, Patel AH. Broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Gen Virol* 2008; 89: 653-659
- 62 Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003; 535: 34-38
- 63 Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993; 67: 4665-4675
- 64 Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 2006; 442: 831-835
- 65 Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, Bös M, Cameron DR, Cartier M, Cordingley MG, Faucher AM, Goudreau N, Kawai SH, Kukulj G, Lagacé L, LaPlante SR, Narjes H, Poupert MA, Rancourt J, Sentjens RE, St George R, Simoneau B, Steinmann G, Thibeault D, Tsantirizos YS, Weldon SM, Yong CL, Llinàs-Brunet M. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003; 426: 186-189
- 66 Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2992-2997
- 67 Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 2005; 19: 727-740
- 68 Serebrov V, Pyle AM. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 2004; 430: 476-480
- 69 Yu GY, Lee KJ, Gao L, Lai MM. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* 2006; 80: 6013-6023
- 70 Stone M, Jia S, Heo WD, Meyer T, Konan KV. Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* 2007; 81: 4551-4563
- 71 Zheng Y, Gao B, Ye L, Kong L, Jing W, Yang X, Wu Z, Ye L. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *J Microbiol* 2005; 43: 529-536
- 72 Quintavalle M, Sambucini S, Di Pietro C, De Francesco R, Neddermann P. The alpha isoform of protein kinase CKI is responsible for hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation. *J Virol* 2006; 80: 11305-11312
- 73 Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 2004; 279: 40835-40843
- 74 Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, Raney KD, Cameron CE. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 36417-36428
- 75 Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13038-13043
- 76 Pflugheber J, Frederickson B, Sumpter R, Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4650-4655
- 77 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duvellie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001; 75: 6095-6106
- 78 Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004; 78: 13278-13284
- 79 Butcher SJ, Grimes JM, Makeyev EV, Bamford DH, Stuart DI. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 2001; 410: 235-240
- 80 Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 2005; 19: 111-122
- 81 Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, Kurosaki M, Maekawa S, Yamashiro T, Chen CH, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 42-47

编辑 李薇 电编 何基才

# 骨髓间充质干细胞治疗急性肝衰竭的研究进展

范敬静, 李东良

范敬静, 李东良, 中国人民解放军南京军区福州总医院肝胆内科 福建省福州市 350025

范敬静, 2008级研究生, 主要从事器官移植相关肝病的研究。

中国人民解放军南京军区医学科技创新基金资助项目, No. 联卫2007-534

作者贡献分布: 文献检索、资料分析和论文撰写主要由范敬静完成; 选题和审校由李东良完成。

通讯作者: 李东良, 教授, 主任医师, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院肝胆内科。dongliangli@gmail.com.cn

收稿日期: 2011-03-31 修回日期: 2011-05-24

接受日期: 2011-06-08 在线出版日期: 2011-07-18

## Bone marrow mesenchymal stem cells as a treatment for acute liver failure

Jing-Jing Fan, Dong-Liang Li

Jing-Jing Fan, Dong-Liang Li, Department of Hepatobiliary Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Supported by: the Medical Science and Technology Innovation Foundation of Nanjing Military Command of Chinese PLA, No. 2007534

Correspondence to: Professor Dong-Liang Li, Department of Hepatobiliary Medicine, Fuzhou General Hospital, 156 North Xierhuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. dongliangli@gmail.com.cn

Received: 2011-03-31 Revised: 2011-05-24

Accepted: 2011-06-08 Published online: 2011-04-08

### Abstract

Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) are a kind of multipotent stem cells that have the capacity to undergo self-renewal and multi-lineage differentiation. In an appropriate microenvironment, BM-MSCs can differentiate into bone, cartilage, fat, nerve, liver or other cells. Based on this characteristic, BM-MSCs might be used as new seed cells for orthotopic liver transplantation and bioartificial liver support system. This paper reviews the recent advances in research on the use of BM-MSCs as a treatment for acute liver failure.

Key Words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Cell differentiation; Cell transplantation; Acute liver failure

Fan JJ, Li DL. Bone marrow mesenchymal stem cells as a

treatment for acute liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2141-2145

### 摘要

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是干细胞中一类具有自我增殖和分化潜能的细胞。在适宜的微环境下, BMSCs可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、肝细胞等多种细胞, 基于此种特性使之成为原位肝移植或生物人工肝支持系统的新型种子细胞。本文就BMSCs的基础研究及其临床治疗急性肝衰竭的进展作一综述。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 细胞分化; 细胞移植; 急性肝衰竭

范敬静, 李东良. 骨髓间充质干细胞治疗急性肝衰竭的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(20): 2141-2145

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2141.asp>

### 0 引言

对于各种终末期肝病, 原位肝移植<sup>[1,2]</sup>一直被认为是最理想的方法, 但主要由于供肝缺乏、免疫排斥反应、手术风险大, 费用高昂等缺陷限制了其广泛应用<sup>[3]</sup>。于是, 生物人工肝和细胞移植<sup>[4,5]</sup>开始作为肝移植的辅助或替代疗法, 促进肝损伤后肝再生<sup>[6]</sup>。目前, 肝细胞虽然是理想供体, 但同样由于其来源缺乏, 并且肝细胞体外培养效果并不理想。在肝损伤的恢复过程中, 干细胞起着重要的作用。目前, 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)因其具有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点而日益受到人们的关注。在不同的诱导条件下, 其具有向中胚层和神经外胚层组织细胞分化的能力, 如向成骨细胞<sup>[7]</sup>、成软骨细胞<sup>[8]</sup>、脂肪细胞<sup>[9]</sup>、神经细胞<sup>[10]</sup>、心肌细胞<sup>[11]</sup>、肝细胞<sup>[12]</sup>等, 使干细胞成为新的理想的种子细胞, 为移植治疗急性肝衰竭等终末期肝病提供了新的思路。

### ■背景资料

对于各种终末期肝病, 原位肝移植一直被认为是最理想的方法, 但主要由于供肝缺乏、免疫排斥反应、手术风险大, 费用高昂等缺陷限制了其广泛应用。于是, 生物人工肝和细胞移植开始作为肝移植的辅助或替代疗法, 促进肝损伤后肝再生。

### ■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

## ■ 研发前沿

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs). 因其具有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点而日益受到人们的关注。

## 1 BMSCs的发现

1976年, Friedenstein等以确凿的证据表明, 骨髓中除含有造血干细胞外, 还含有梭形的成纤维样细胞集落形成单位, 这些细胞在体内处于休眠状态, 在体外适当条件的刺激下可以进入细胞周期, 从而形成类似于骨或软骨碎片的细胞集落. 1987年, Friedenstein等<sup>[1]</sup>发现在塑料培养皿中培养的贴壁的骨髓单个核细胞在一定条件下可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌肉细胞, 而且这些细胞扩增20-30代后仍能保持其多向分化潜能, 这类细胞被称BMSCs. 此研究不仅证实了BMSCs的存在, 而且为应用于临床提供了可靠的理论基础.

## 2 BMSCs的生物学特点

BMSCs最主要的生物学特点<sup>[4]</sup>是体外扩增容易和黏附贴壁性强, 快速的增殖能力是应用其进行细胞治疗的基础, 而黏附贴壁性有利于细胞的纯化培养.

2.1 表面标志 目前为止, 尚未发现BMSCs特有的表面标志<sup>[15,16]</sup>. 但可表达区别于造血干细胞的表面标志, 包括CD13、SH2、SH3、CD29、CD71、CD90、CD100、CD166、CD120a、CD124、CD49b等, 表达低水平的CD44、CDW90, 不表达造血系特征标志CD14、CD34、CD45、CD50, 也不表达与人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)识别有关的共刺激分子B7-1、B7-2及主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC) II类分子如HLA-DR抗原等.

2.2 分离培养 目前常用的分离BMSCs的方法主要有4种: (1)全骨髓贴壁培养法<sup>[17]</sup>: 此方法根据BMSCs具有贴壁生长而造血细胞悬浮生长的特性对其进行筛选. 应用贴壁培养法通过多次传代换液, 除去悬浮生长的造血细胞, 细胞增殖较快, 可短时间内获得大量细胞, 但所得细胞的纯度不足, 细胞均一性差, 但其分化诱导特性不受影响; (2)密度梯度离心法: 该法根据BMSCs与其他细胞的密度不同而采用Perco11分离液, 能有效地将红细胞、白细胞和BMSCs分离开来, 分离获得的细胞较为均一, 但多向分化及增殖力较差; (3)流式细胞仪分选法及免疫磁珠法: 此两种方法虽具有高度专一性, 但成本较高、步骤复杂、分选后的细胞不易贴壁, 对细胞的活性影响较大. 根据BMSCs有贴壁生长的特点, 在实际使用中往往更多地使用密度梯度离心法和贴

壁培养法联合分离BMSCs.

## 3 BMSCs的分化潜能

BMSCs可塑性已得到证实, 它具有定向分化或是横向分化为一些成体细胞的潜能. Petersen等<sup>[18]</sup>1999年首先报道, 用2-AFF(2-acetylaminofluorene)阻断大鼠肝细胞增殖, CCl<sub>4</sub>造成肝细胞损伤, 进行性别交叉骨髓细胞移植, 或者全肝移植, 在肝脏中发现来源于骨髓的肝细胞. Theise等<sup>[19]</sup>又报道了女性患者接受男性供体的骨髓移植后, 受体的一些肝细胞和胆管上皮细胞核内含有Y染色体. 两者均证明了骨髓干细胞或造血干细胞能够在鼠肝内转化为肝卵圆细胞甚至成熟的肝细胞和胆管细胞. Terai等<sup>[20]</sup>发现荧光蛋白阳性标记的骨髓细胞定植在肝小叶门脉周围, 4 wk后肝脏中有25%的细胞是骨髓细胞, 并横向分化为能分泌白蛋白的成熟肝细胞. 以上均表明, 体内环境和肝脏本身微环境是促进BMSCs向肝样细胞转化的关键因素, 分化的肝样细胞能够对损伤肝脏起到一定的修复作用. BMSCs在动物体内可以分化为肝样细胞得到了证实.

在体外诱导剂的作用下, BMSCs也可以向肝实质细胞转化<sup>[21-25]</sup>. 细胞因子和生长因子如肝细胞生长因子(hepatic growth factor, HGF)<sup>[26,27]</sup>、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)及肿瘤坏死因子-1(tumor necrosis factor-1, TNF- I)等在肝脏的发育和再生过程中起重要的作用, 单独和联合应用会在体外诱导骨髓干细胞增殖并向肝系细胞分化. Schwartz等<sup>[28]</sup>从人、大鼠及小鼠骨髓中分离出间充质干细胞, 在培养体系中加入FGF4、HGF等生长因子诱导后, 检测到CK18、AFP等一些肝细胞特有的表面标志. Lange等<sup>[29]</sup>用GFP标记BMSCs, 纤维连接蛋白为底物, 加入胎肝细胞共同培养, 流式细胞仪分离GFP(+)、GFP(-)细胞, RT-PCR发现2 wk后表达AFP、CK18、ALB, 提示BMSCs和胎肝细胞共同培养的微环境不但有利于BMSCs向肝细胞的分化扩增, 也利于胎肝细胞的分化. Chen等<sup>[30]</sup>将CCl<sub>4</sub>注射的小鼠肝脏进行培养, 收集肝损伤血清, 用于诱导小鼠骨髓单个核细胞分化. 诱导后细胞呈类圆形肝细胞样变化. RT-PCR示: 第7天AFP、CK19基因表达; 第14天ALB、CK18、HNF3 $\beta$ (肝细胞核因子3 $\beta$ )基因表达; 第21天TAT(酪氨酸氨基转移酶)表达. 免疫荧光: 第21天ALB、CK18、CK19、AFP基因表达.

Chivu等<sup>[31]</sup>也相继证实BMSCs暴露于体外诱导因素, 可向肝样细胞分化. 但是有关干细胞诱导的肝样细胞多是进行表型鉴定, 而没有在功能水平进行分析, 而肝样细胞的功能是细胞治疗的前提. 所以我们应该就进入肝中定植的BMSCs发挥的具体作用机制做进一步深入研究.

#### 4 应用于急性肝衰竭的治疗

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是多种因素引起的严重肝脏损害, 导致其合成、解毒、排泄和生物转化等功能发生严重障碍或失代偿, 出现以凝血机制障碍、黄疸、肝性脑病和腹水等为主要表现的一组临床症候群, 是临床治疗的难点<sup>[32]</sup>. 常规药物治疗疗效差, 是一种病死率极高的临床综合征, 在我国主要由病毒性肝炎引起<sup>[33]</sup>. Dahlke等<sup>[34]</sup>也报道了全骨髓细胞对治疗急性肝衰竭引起的CCl<sub>4</sub>和倒千里光碱的影响. 治疗试验虽然不是很成功, 可能是由于BMSCs有限的生长和分化能力的骨髓干细胞未发挥充分的作用. 姚鹏等<sup>[35]</sup>利用自体骨髓干细胞通过肝动脉插管注入30例肝硬化患者的肝脏, 在以后的临床试验观察中发现这些患者均取得了一定的疗效. Miyazaki等<sup>[36]</sup>通过切除动物肝脏的90%建立建立ALF模型, 并体外诱导BMSCs向肝样细胞分化后, 治疗动物取得了良好的效果. 结果表明: BMSCs可能成为急性肝功能衰竭的桥梁支持<sup>[37]</sup>, 直到等到肝源进行肝移植. 目前, 越来越多的证据表明BMSCs可以参与肝损伤后肝脏再生, 如CCl<sub>4</sub>或部分切除损伤<sup>[38,39]</sup>.

#### 5 BMSCs的应用前景及存在的问题

虽然临床应用BMSCs治疗ALF尚处于初始阶段, 但其应用前景十分广阔. 我国是肝病大国, 慢性乙型肝炎患者占全国总人数的1/10, 约30%的肝炎患者最终因肝功能衰竭而死亡, 虽然肝移植手术在临床上已有了广泛的开展, 因供肝缺乏, 费用昂贵, 尚存在免疫排斥问题, 严重限制了肝移植的开展<sup>[3,40]</sup>, 故其临床价值受限, 受益者极少. 目前主要采取维持和支持疗法治疗各种急慢性肝病, 生物人工肝和肝细胞移植因肝细胞来源所限而不能在临床上发挥更大作用, 故应用BMSCs治作为新型的种子细胞治疗终末期肝病具有很多优点: 其体外分离、纯化、扩增、定向诱导分化技术及相应的分子调控机制等方面取得一定进展; 取材于患者本人, 传代扩增并定向分化为靶细胞后再回输给患者本人, 安全性高;

没有异体排斥反应, 并且避免了胚胎干细胞研究的伦理学争论, 故临床应用前景非常突出<sup>[41]</sup>.

同时, BMSCs也存在一些不足: (1)由于人骨髓中具有能分化为肝细胞的BMSCs数量很少, 约占骨髓中有核细胞数量的1/100 000, 5 mL骨髓中仅能得到300-1 000个, 所以原代获得的BMSCs数量远不能满足肝组织工程的需要; (2)BMSCs体外扩增纯化速度较慢, 尚无法在短时间内获得足够数量的肝干细胞, 来满足急性肝衰竭患者的急迫需要; (3)种植后的干细胞是否能够持续数代的有效分裂和存活, 并发挥相应的功能; (4)移植数量需达到临床需要的移植要求; (5)选择合适的移植部位以避免肺栓塞的发生, 以及进入受体体内细胞数量的多少均有待于进一步探讨; (6)干细胞的归巢和定位及体内增值情况: 目前常用的细胞追踪定位方法多为GFP绿色荧光蛋白及菲力磁等, 但此类方法只表明细胞进入定植部位, 但对定植体内后细胞的分化增值及功能活性状态尚缺乏进一步的了解.

#### 6 结论

骨髓中确实存在能分化为肝细胞的干细胞, 直接将其移植到肝脏, 在肝脏微环境调节下可分化为肝细胞<sup>[42,43]</sup>, 将BMSCs作为肝细胞移植的细胞来源有重要的临床意义<sup>[44]</sup>. BMSCs的可塑性已在体内外实验中获得许多证据, 部分研究成果甚至已在临床治疗中发挥一定作用, 显示出良好的应用前景<sup>[45,22]</sup>. 但是, 若要在临床上广泛应用BMSCs治疗终末期肝病, 还需要进一步确定体外及体内诱导转化证据, 不断完善分离纯化、扩增和诱导分化的技术方法, 并促进这种BMSCs在肝内实现完全意义上的转化<sup>[46]</sup>, 以更有效地改善病变肝组织的结构和功能等将成为今后研究的重要内容<sup>[47,48]</sup>.

#### 7 参考文献

- 1 Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med* 2011; 9: 52
- 2 Ng KK, Lo CM. Liver transplantation in Asia: past, present and future. *Ann Acad Med Singapore* 2009; 38: 322-310
- 3 Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl* 2010; 16: 118-129
- 4 Kawashita Y, Guha C, Yamanouchi K, Ito Y, Kamohara Y, Kanematsu T. Liver repopulation: a new concept of hepatocyte transplantation. *Surg Today* 2005; 35: 705-710
- 5 Stieger B, Peters R, Sidler MA, Meier PJ. Hepatocyte transplantation: potential of hepatocyte progenitor

#### ■ 相关报道

Terai等发现荧光蛋白阳性标记的骨髓细胞定植在肝小叶门脉周围, 4 wk后肝脏中有25%的细胞是骨髓细胞, 并横向分化为能分泌白蛋白的成熟肝细胞.

### 同行评价

本文论点清楚, 逻辑性较强, 内容较新颖, 对临床及基础研究有一定的参考价值。

- cells and bone marrow derived stem cells. *Swiss Med Wkly* 2007; 137 Suppl 155: 55S-59S
- 6 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487
  - 7 Yang Y, Tao C, Zhao D, Li F, Zhao W, Wu H. EMF acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Bioelectromagnetics* 2010; 31: 277-285
  - 8 Hu J, Feng K, Liu X, Ma PX. Chondrogenic and osteogenic differentiations of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold with designed pore network. *Biomaterials* 2009; 30: 5061-5067
  - 9 Allan EH, Ho PW, Umezawa A, Hata J, Makishima F, Gillespie MT, Martin TJ. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem* 2003; 90: 158-169
  - 10 Alberti E, Los M, García R, Fraga JL, Serrano T, Hernández E, Klonisch T, Macías R, Martínez L, Castillo L, de la Cuétara K. Prolonged survival and expression of neural markers by bone marrow-derived stem cells transplanted into brain lesions. *Med Sci Monit* 2009; 15: BR47-BR54
  - 11 Yoon J, Choi SC, Park CY, Choi JH, Kim YI, Shim WJ, Lim DS. Bone marrow-derived side population cells are capable of functional cardiomyogenic differentiation. *Mol Cells* 2008; 25: 216-223
  - 12 Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, Zummo G, Farina F, La Rocca G. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 423-438
  - 13 Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20: 263-272
  - 14 Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cell Rev* 2011 Jan 20. [Epub ahead of print]
  - 15 Poliseti N, Chaitanya VG, Babu PP, Vemuganti GK. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol India* 2010; 58: 201-208
  - 16 Hasebe Y, Hasegawa S, Hashimoto N, Toyoda M, Matsumoto K, Umezawa A, Yagami A, Matsunaga K, Mizutani H, Nakata S, Akamatsu H. Analysis of cell characterization using cell surface markers in the dermis. *J Dermatol Sci* 2011; 62: 98-106
  - 17 Li W, Liu SN, Luo DD, Zhao L, Zeng LL, Zhang SL, Li SL. Differentiation of hepatocytoid cell induced from whole-bone-marrow method isolated rat myeloid mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4866-4869
  - 18 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
  - 19 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
  - 20 Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134: 551-558
  - 21 司煜安, 许文荣, 严永敏, 钱辉, 朱伟, 周忠海, 徐静, 周洪兴, 曹慧玲, 李继刚. 体外诱导人骨髓间质干细胞分化为肝细胞样细胞. *江苏大学学报* 2008; 18: 6-11
  - 22 Shi XL, Qiu YD, Wu XY, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, Li L, Ding YT. In vitro differentiation of mouse bone marrow mononuclear cells into hepatocyte-like cells. *Hepatol Res* 2005; 31: 223-231
  - 23 Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3479-3484
  - 24 Snykers S, Vanhaecke T, Papeleu P, Lutun A, Jiang Y, Vander Heyden Y, Verfaillie C, Rogiers V. Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: the key for in vitro differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Toxicol Sci* 2006; 94: 330-341; discussion 235-239
  - 25 Xie JM, Chen JF, Gao Y, Yao KH. [Hepatocyte growth factor and fibroblast growth factor-4-induced differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in vitro]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2006; 26: 1439-1442
  - 26 Defrances MC, Wolf HK, Michalopoulos GK, Zarnegar R. The presence of hepatocyte growth factor in the developing rat. *Development* 1992; 116: 387-395
  - 27 Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, Luk JM. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 712-716
  - 28 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
  - 29 Lange C, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2394-2397
  - 30 Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, Shao JZ, Xiang LX. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem* 2007; 102: 52-63
  - 31 Chivu M, Dima SO, Stancu CI, Dobrea C, Uscatescu V, Necula LG, Bleotu C, Tanase C, Albulescu R, Ardeleanu C, Popescu I. In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors. *Transl Res* 2009; 154: 122-132
  - 32 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 643-646
  - 33 Nguyen NT, Vierling JM. Acute liver failure. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 289-296
  - 34 Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, Aselmann H, Jäger MD, Neipp M, Piso P, Klempnauer J, Schlitt HJ. Liver regeneration in a retrorsine/CCl<sub>4</sub>-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* 2003; 39: 365-373
  - 35 姚鹏, 王帅, 胡大荣, 闻炜, 周一鸣, 龚雨娟. 肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化30例. *世界华*

- 人消化杂志 2005; 13: 1639-1640
- 36 Miyazaki M, Hardjo M, Masaka T, Tomiyama K, Mahmut N, Medina RJ, Niida A, Sonegawa H, Du G, Yong R, Takaiishi M, Sakaguchi M, Huh NH. Isolation of a bone marrow-derived stem cell line with high proliferation potential and its application for preventing acute fatal liver failure. *Stem Cells* 2007; 25: 2855-2863
- 37 Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007; 2: e941
- 38 Sharma AD, Cantz T, Manns MP, Ott M. The role of stem cells in physiology, pathophysiology, and therapy of the liver. *Stem Cell Rev* 2006; 2: 51-58
- 39 am Esch JS, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, Piechaczek C, Burchardt ER, Feifel N, Stoldt V, Stockschröder M, Stoecklein N, Tustas RY, Eisenberger CF, Peiper M, Häussinger D, Hosch SB. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005; 23: 463-470
- 40 Serralta A, Donato MT, Martinez A, Pareja E, Orbis F, Castell JV, Mir J, Gómez-Lechón MJ. Influence of preservation solution on the isolation and culture of human hepatocytes from liver grafts. *Cell Transplant* 2005; 14: 837-843
- 41 Kasai S, Sawa M. [Hepatocyte transplantation for the treatment of hepatic failure]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2000; 45: 2301-2306
- 42 Li J, Wu W, Xin J, Guo J, Jiang L, Tao R, Cao H, Hong X, Li L. Acute Hepatic Failure-Derived Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Express Hepatic Progenitor Cell Genes. *Cells Tissues Organs* 2011 Feb 2. [Epub ahead of print]
- 43 Li J, Tao R, Wu W, Cao H, Xin J, Guo J, Jiang L, Hong X, Demetriou AA, Farkas D, Li L. Transcriptional profiling and hepatogenic potential of acute hepatic failure-derived bone marrow mesenchymal stem cells. *Differentiation* 2010; 80: 166-174
- 44 何金秋. 骨髓间充质干细胞的研究现状及其在肝衰竭治疗中的应用. *传染病信息* 2008; 21: 275-277
- 45 邢全台, 孙启龙, 李栋, 邢培祥, 马瑞萍, 陈丰哲, 邵美英, 姚永远, 关彦彦. 骨髓间充质干细胞向肝细胞样细胞的诱导分化. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2654-2661
- 46 Bird TG, Lorenzini S, Forbes SJ. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 283-300
- 47 Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 2111-2121, 2121. e1-3. Epub 2008 Mar 12
- 48 Yagi K, Kojima M, Oyagi S, Ikeda E, Hirose M, Iso-da K, Kawase M, Kondoh M, Ohgushi H. [Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine]. *Yakugaku Zasshi* 2008; 128: 3-9

编辑 李薇 电编 张洋

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,用与正文同角的数字并排,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.

# 细胞因子与内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎关系的研究进展

李荣, 韩真

## ■背景资料

ERCP术后胰腺炎(PEP)是ERCP术后最常见、最严重的并发症之一,常导致住院时间的延长,费用增加,甚至危及患者的生命.但其发病机制仍未完全阐明,针对细胞因子介导的炎症级联反应是近年来研究的热点,有助于早期预测及时治疗PEP,为临床防治PEP提供新的思路.

李荣, 韩真, 皖南医学院弋矶山医院消化内科 安徽省芜湖市 241001

作者贡献分布: 本文综述由李荣完成; 韩真审校.

通讯作者: 韩真, 副教授, 主任医师, 241001, 安徽省芜湖市, 皖南医学院弋矶山医院消化内科. hanzhen1028@hotmail.com

电话: 0553-5739316

收稿日期: 2011-05-22 修回日期: 2011-06-27

接受日期: 2011-07-05 在线出版日期: 2011-07-18

## Advances in understanding the role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography

Rong Li, Zhen Han

Rong Li, Zhen Han, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital Affiliated to Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China

Correspondence to: Associate Professor Zhen Han, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital Affiliated to Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China. hanzhen1028@hotmail.com

Received: 2011-05-22 Revised: 2011-06-27

Accepted: 2011-07-05 Published online: 2011-07-18

## Abstract

Endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) is an important tool for the diagnosis and treatment of pancreatobiliary disease. Acute pancreatitis (AP) is the most common complication of ERCP. The pathogenesis of post-ERCP AP has not been completely elucidated. Recent studies suggest that inflammatory cytokines play an important role in the evolution of AP from mild to severe form. Identification of specific proinflammatory markers that can rapidly and reliably predict the progression of post-ERCP pancreatitis has been a major focus of research. Attempts to block the inflammatory cascade have been carried out by using an anti-inflammatory cytokine in some clinical trials. In this article, we will review the recent advances in understanding the role of cytokines in the pathogenesis of post-ERCP AP.

Key Words: Cytokine; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Acute pancreatitis

Li R, Han Z. Advances in understanding the role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2146-2152

## 摘要

内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)是当前诊治肝、胆、胰疾病的重要手段之一.急性胰腺炎是ERCP术后最常见、最严重的并发症,目前其发病机制仍未完全阐明.近年来研究的普遍共识是炎性细胞因子在轻症胰腺炎向重症胰腺炎演进过程中发挥了重要作用,特异性的检测指标用于预测ERCP术后胰腺炎成了研究的热点,试图通过阻断炎症级联反应的抗炎因子用于预防治疗ERCP术后胰腺炎已进入临床试验阶段,本文对这方面的研究进展作一综述.

关键词: 细胞因子; 内镜逆行胰胆管造影; 急性胰腺炎

李荣, 韩真. 细胞因子与内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(20): 2146-2152  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2146.asp>

## 0 引言

内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)自1968年首次报道以来,是当前诊治肝、胆、胰疾病的重要手段之一.而ERCP术后胰腺炎(post-ERCP pancreatitis, PEP)是ERCP术后最常见、最严重的并发症之一,文献报道发病率在1%-40%,随着ERCP的广泛开展及操作技术的成熟,在多项前瞻性研究中其发生率在5%-7%<sup>[1-5]</sup>. PEP的发生导致患者住院日的延长,费用的增加,甚至危及患者的生命,造成医患纠纷,成为困扰内镜医生的一大难题.目前PEP的确切发病机制仍未完全阐明,近年来研究的普遍共识是炎性细胞因子在轻症胰腺炎向重症胰腺炎演进过程中具有重要作用,本文将对这方面的研究进展作一综述.

## 1 PEP定义

PEP的定义至今仍有争议,尤其对于有胰性腹痛

## ■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

但血清淀粉酶位于临界高限或者有血清淀粉酶的升高但腹痛轻微, 不能明确是否为胰性腹痛者来说, 临床上判断较困难. 目前被多数学者采用的为1991年Cotton等<sup>[6]</sup>建议使用的PEP: ERCP术后当患者有持续24 h以上的胰性腹痛, 同时伴有血清淀粉酶超过正常水平3倍以上时, 便可诊断. PEP的严重程度可根据患者住院治疗的天数或出现的并发症及进行的干预手段来判断. 轻度: 腹痛并伴有血清淀粉酶在24 h后超过正常值3倍以上, 需要治疗或延长住院时间2-3 d; 中度: 住院4-10 d; 重度: 住院超过10 d, 形成坏死或假性囊肿, 需引流治疗或外科介入.

## 2 炎症介质或细胞因子在PEP中的作用

1991年美国危重病医学及胸科学会(ACCP/SCCM)正式提出了全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的概念<sup>[7]</sup>. 人们逐渐认识到免疫异常在胰腺炎的病情恶化中起着关键作用. 近年来大量的研究表明<sup>[8,9]</sup>, PEP时病损的胰腺组织作为抗原或炎症刺激物激活巨噬细胞等炎症细胞, 释放大细胞因子, 并进而通过扳机样作用, 触发炎症介质瀑布样级联反应. 细胞因子网络和免疫功能紊乱很可能是PEP易从局部病变迅速发展为SIRS和多器官功能衰竭综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的实质所在. 同时SIRS的基本病理变化不仅是过度炎症反应, 而且还伴有内源性抗炎因子过度释放的代偿性抗炎反应综合征(compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS). 促炎因子与抗炎因子过量均可加重炎症损害, 导致SIRS失控, 对机体产生危害.

## 3 促炎因子

3.1 肿瘤坏死因子 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是一种具有广泛生物学活性的非特异性炎症介质, 主要分为由活化T淋巴细胞产生的TNF- $\beta$ (又称淋巴毒素, lymphotoxin)和活化的单核细胞产生的TNF- $\alpha$ (又称恶病质素, cachectin). 虽然二者来源不同, 却具有相似的生物学活性. 急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)时, 胰酶入血, 胰腺及胰周组织的破坏及继发感染等原因引起机体免疫系统的激活, 大量炎症介质的释放. 大鼠和小鼠实验性胰腺炎证实, TNF- $\alpha$ 是最早出现水平增高的炎症介质, 血清中TNF- $\alpha$ 活性的高低与胰腺组织损害程度密切相关. 其

作用机制包括: (1)参与IL-1 $\beta$ 、IL-6及TNF- $\alpha$ 自身的生成; (2)促使白细胞活化、黏附、诱导其脱颗粒, 释放溶酶体; (3)作用于血管内皮, 增加毛细血管通透性, 导致局部缺血和血栓形成, 损伤微循环; (4)激活炎症细胞, 上调细胞间黏附分子1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule, VCAM), 刺激NO和氧自由基生成; (5)诱导腺泡细胞凋亡, 促使胰腺组织坏死. 血浆TNF- $\alpha$ 水平与AP严重程度呈正相关. 进一步研究发现, TNF- $\alpha$ 可通过2条信号转导途径参与AP的发病过程: 一是通过酪氨酸激酶-2信号转导途径, 使富含脯氨酸的酪氨酸激酶-2磷酸化, 从而破坏细胞骨架结构, 引起胰腺腺泡细胞凋亡; 二是通过蛋白激酶C信号转导途径, 使核因子 $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)活化, 进而引起一系列的炎症反应<sup>[10,11]</sup>. 多项动物实验研究认为, TNF- $\alpha$ 拮抗剂如依那普西、英夫利昔单抗可使大鼠实验性AP的严重程度减轻改善预后, 可用于治疗AP<sup>[12,13]</sup>. 而Buscaglia等<sup>[14]</sup>对8只犬分两组, 实验组4只术前1 d使用依那普西进行ERCP, 对照组4只只进行ERCP, 另有3只犬设为空白对照, 结果发现仅依那普西组1只犬分别在术后2 h和术后2 d出现TNF- $\alpha$ 轻微的上升, 其余均在基线, 故认为TNF- $\alpha$ 作为早期判断PEP严重程度的指标不如IL-6、IL-8、IL-10等细胞因子敏感. Kilciler等<sup>[15]</sup>研究发现ERCP术后12 h患者血清TNF- $\alpha$ 在并发PEP组较未并发PEP组明显升高, 而术前、术后24 h两组差异无显著性. 与此前Chen等<sup>[16]</sup>报道的术后8、24 h并发PEP组TNF- $\alpha$ 均显著升高相悖. 因此TNF- $\alpha$ 拮抗剂用于预防PEP仍有待进一步研究.

3.2 IL-6 IL-6是单核巨噬细胞和血管内皮细胞产生的重要炎症介质之一. 血清IL-6水平与胰腺的病理损害程度明显相关, 可作为预测胰腺病理变化的重要指标, 他的升高程度可以预示AP的严重性和预后. IL-6能使信号转导子及转录激活子-3(signal transducer and activator of transcription-3, STAT-3)磷酸化, 使之进入细胞核与DNA结合, 从而调节各种炎症介质(如细胞因子、黏附分子、NO合成酶和环氧合酶等)的转录, 在胰腺细胞的凋亡和肺损伤中发挥重要的作用. IL-6可以促进单核细胞和中性粒细胞的氧呼吸爆发; 可以刺激肝细胞产生急性期蛋白, 包括C反应蛋白、纤维蛋白原; 通过改变胞内G蛋白活性及上调多形核中性粒细胞(polymorphonuclear

## ■ 相关报道

Kilciler等研究显示, 血清抗炎细胞因子IL-4在ERCP术后显著降低, 可与炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6一起作为预测PEP的指标.

### ■创新盘点

本文阐述了PEP发病过程中炎症因子和抗炎因子的变化水平,探讨了如何在发病早期维持二者的平衡,从而阻断瀑布样炎症反应,达到预防和治理PEP的作用。

neutrophils, PMN)功能参与局部胰腺和全身多器官的损伤<sup>[17,18]</sup>。实验证实降低IL-6水平可显著改善实验动物胰腺的组织学评分。另外,血中IL-6的水平 and 心血管的功能关系密切。动物PEP模型中也证实IL-6的升高水平与病情严重程度呈正相关<sup>[14]</sup>。Oezcueruemez-Porsch等<sup>[19]</sup>评估了94位行ERCP的患者,12位发生了PEP,评价指标有TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-10、IL-6等,发现只有IL-10、IL-6与临床症状如疼痛评分、病程有明显关系。而Kaw等<sup>[20]</sup>的研究进一步证实PEP患者的CRP水平和IL-6水平与PEP的严重程度正相关。

3.3 IL-8 AP患者血清IL-8浓度升高,在伴全身并发症的急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患者尤为明显,故又称为中性粒细胞激活因子或粒细胞趋化因子。IL-1和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是刺激IL-8分泌的主要诱导剂,IL-2, IL-7, 细胞集落刺激因子等细胞因子对IL-8的产生有正调节作用。IL-8的主要功能为趋化多种细胞参与炎症反应,特别是能趋化和激活中性粒细胞,促使中性粒细胞释放弹力蛋白酶和呼吸爆发,产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),释放超氧化物、弹性蛋白酶和溶酶体酶等多种活性物质,引起组织损伤,并发症发生。Dambrauskas等<sup>[21]</sup>进行的一项前瞻性调查显示,IL-8在AP患者较健康对照组升高,差异有显著性,但其显著性不如IL-6和巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)。Blanchard等<sup>[22]</sup>提出假设细胞因子主要由胰腺实质产生,胰管上皮细胞是最有可能被有害因素造成损伤的细胞。ERCP、胆石通过时均会造成其损伤。他们将CAPAN-1、CAPAN-2细胞与内毒素或TNF- $\alpha$ 一起培养孵育,取上清液用ELISA分析,发现其产生的主要细胞因子有IL-1、IL-6、IL-8电泳迁移率分析证明细胞NF- $\kappa$ B的活性增强。研究者发现细胞产生的IL-1并不多。内毒素与TNF- $\alpha$ 刺激后CAPAN-1细胞均能产生IL-6与IL-8,并且呈浓度相关性,而CAPAN-2细胞只对TNF- $\alpha$ 反应产生浓度依赖性的IL-6与IL-8。从这些发现可以推测胰管细胞通过产生大量的细胞因子在胰腺炎的发病机制中起着重要的作用。另外,Novovic等<sup>[23]</sup>在酒精和胆结石诱导的AP炎症介质的研究中发现,胆结石诱导的AP患者,轻症AP(mild acute pancreatitis, MAP)患者IL-8水平远远低于SAP患者;而在MAP,酒精性AP要比胆石症诱导的AP患者拥有更高的IL-8水平。以此为依据,以人群为基础的调查研

究发现IL-8血清值对病因学存在显著影响,即个体循环中增加的IL-8水平与其酒精消耗量水平成比例关系,因此也就能解释为何酒精性AP患者拥有更高的IL-8水平,也证实了IL-8与急性肝损伤有关。我国台湾学者对78例行ERCP治疗的患者进行了前瞻性的研究发现,并发PEP的患者血清IL-6、IL-8水平在ERCP术后8、24 h较未并发AP组显著升高,但其预测病情严重程度不如IL-6<sup>[16]</sup>。

3.4 IL-18 IL-18是驱使辅助性T淋巴细胞(helper lymphocyte 1, Th1)细胞反应的细胞因子,主要由单核巨噬细胞产生,IL-18通过CD8+淋巴细胞浸润胰腺表达,利用白细胞黏附内皮,因而刺激ICAM-1和E选择素,其主要功能之一是刺激Th1细胞因子的合成,特别是IL-1 $\beta$ 、IL-8和TNF- $\alpha$ 的合成,可以与IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 相互诱导,上调黏附分子ICAM-1、VCAM的表达;诱导IL-8、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和巨噬细胞炎性蛋白-1(macrophage inflammatory protein, MIP-1)的表达;上调NF- $\kappa$ B的表达和活性,并能特异抑制IL-10的释放,引起炎症级联反应,参与中性粒细胞的黏附、渗出,加重炎症反应并引起内皮细胞损伤,导致毛细血管渗漏,间质水肿和微循环障碍,造成肺部及全身性组织损害。在此过程中,也启动了抗炎细胞因子的释放,形成代偿性抗炎反应综合征。他们之间的对抗决定着SAP中多脏器功能不全发生与否。在SAP的早期,炎性细胞因子的增高更为明显,更容易发生SIRS,导致MODS的发生。SAP与脓毒症都有SIRS这一病理生理过程,国内学者在对脓毒症的研究中发现IL-18水平可作为早期判断SIRS的指标,是一种有价值的免疫学监测指标,并且在AP相关肝损伤时表达上调<sup>[24-26]</sup>。AP时,ICAM-1在中性粒细胞和单核巨噬细胞的表达增加,黏附分子数量的增加先于呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)肺部浸润的发展,可以导致内皮功能障碍,决定中性粒细胞和单核细胞在毛细血管表面的渗透性。Kast等<sup>[27]</sup>研究认为,IL-18是AP时胰腺损伤和全身并发症,如低血压和多脏器功能障碍的炎症介质之一。因此IL-18是胰腺炎时非常重要的指标之一,主要表现在:(1)许多其他炎症介质是继IL-18之后产生的;(2)许多药物前临床试验和实验研究显示能降低活化IL-18的形成;(3)AP早期死亡的原因多是由于SIRS,而IL-18是一个重要的驱动力。同时,AP患

者同慢性胰腺炎患者相比, IL-18值呈5倍增加, 且腹水含有大量的IL-18, 胰腺组织免疫组织化学也显示IL-18增加. 随着IL-18水平升高, 多器官功能障碍变得越来越普遍, 其水平大致与AP的严重性成比例. 但目前难确定的是IL-18的增高是否预示着临床病情恶化及其与PEP的关系仍有待进一步研究.

**3.5 血小板活化因子** 很多血管活性物质如血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)、内皮素(endothelin, ET)、缓激肽等均在胰腺微循环障碍中发挥着重要作用. PAF作为AP最关键的强效脂质性炎症介质, 在加重胰腺微循环障碍, 诱导胰腺持续缺血、坏死的同时, 又在促进急性炎症反应中起到了中心枢纽的作用. PAF介导AP的机制可能是: (1)活化血小板, 促使血小板黏附、聚集和血栓形成, 导致胰腺的血流灌注不足, 胰腺微循环障碍, 继而缺血、缺氧、坏死; (2)刺激其他细胞因子及炎症介质, 并形成细胞因子间网络调控, 加重组织破坏; (3)导致胰腺内游离Ca<sup>2+</sup>水平升高, 损伤细胞, 促进胰酶分泌和活化; (4)损伤肠道屏障, 导致细菌易位, 诱发肠源性感染和内毒素血症; (5)启动和促进中性粒细胞与内皮细胞间的相互作用, 促进中性粒细胞和淋巴细胞进入组织间隙; (6)与中性粒细胞表面受体结合, 激活其氧化代谢功能, 释放超氧化物, 促进白细胞黏附和聚集; (7)具有类似乙酰胆碱的作用, 增加胰酶分泌<sup>[28]</sup>. AP时PAF增加血管的通透性, 液体渗出, 导致浆膜腔积液, 血容量不足, 引起低血压、休克, 循环障碍, 肾脏血流量减少, 导致肾前性急性肾衰; 肺脏毛细血管通透性增加, 液体渗出, 导致肺间质水肿, ARDS的发生; 脑血管通透性增加, 引起脑水肿, 颅内压增高, 诱发胰性脑病的发生; 肠道的微循环屏障破坏, 导致细菌易位, 菌群失调; 微循环障碍又进一步刺激PAF的产生, 加重病情的发展. 实验研究发现血小板活化因子受体拮抗剂(platelet-activating factor receptor antagonists, PAF-RA)可减少局部器官和全身炎症反应, 预防性使用PAF-RA可减轻PAF介导的炎症损伤和改善AP预后<sup>[29]</sup>. 可能也是NSAIDs用于预防PEP作用机制之一<sup>[30]</sup>. 而一项多中心的随机双盲安慰剂对照实验却发现, 使用重组的血小板活化因子N-乙酰水解酶(recombinant PAF acetylhydrolase, rPAF-AH)并不能使高危患者PEP发生率减少<sup>[31]</sup>.

**3.6 MIF** MIF在1966年作为来源于活化的T淋巴细胞的具有阻止巨噬细胞在炎症部位自由移

动功能的细胞因子被首次发现. 一些研究表明, MIF在严重感染性疾病(如败血症)的发病过程中发挥着重要作用, 是先天性免疫和获得性免疫的重要调节因子, 是宿主抵抗致病微生物免疫防御系统和应激反应系统中不可缺少的成员, 且MIF具有细胞因子、激素、酶三重功能, 在各种细胞如单核细胞、巨噬细胞、T淋巴细胞、垂体促肾上腺皮质细胞及上皮细胞中表达, 对糖皮质激素具有拮抗调节作用, 参与宿主免疫及炎症反应<sup>[32,33]</sup>. 最近, MIF在许多炎症性疾病发病过程中的作用被陆续发现, 在许多疾病如败血症、风湿性关节炎、支气管哮喘中血清MIF含量升高, 而且有报道发现MIF含量在ARDS患者的血清及气管肺泡灌洗液中升高, 给予抗MIF抗体可提高实验动物败血症模型的生存率<sup>[34,35]</sup>. MIF作为先天性免疫和获得性免疫的重要调节因子, 在免疫过程中, 不仅有抑制巨噬细胞游走、黏附、吞噬和聚集的功能, 还促进其在炎症局部浸润、增生、激活, 通过调节细胞信号转导, 促进某些细胞因子的表达同时使NO释放增加和A2的表达增强, 产生促炎作用. Sakai等<sup>[36]</sup>在研究MIF与急性胰腺炎关系时发现: 在牛磺胆酸大鼠胰腺炎模型(TCA胰腺炎)的血清及腹水中MIF含量迅速升高后缓慢下降, 蛙皮素所致大鼠胰腺炎模型的腹水中MIF低水平升高, MIF含量在TCA胰腺炎肺组织中升高, 但在胰腺和肝脏含量无变化, 用预防性的抗MIF治疗可明显TCA胰腺炎大鼠生存率, SAP患者的血清MIF水平明显高于MAP患者及健康人群, 因此他们认为MIF与重症急性胰腺炎及其肺损伤相关. 梁勇等<sup>[37]</sup>比较了急性水肿性胰腺炎(acute edematous pancreatitis, AEP)大鼠与急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)大鼠血清MIF水平发现各时点ANP组血清MIF水平都明显高于AEP组, 表明MIF水平可能与疾病严重程度相关. Dambrauskas等<sup>[21]</sup>对108例发病72 h内的诊断为AP的患者进行了前瞻性的研究, 检测了25种不同的炎症因子或炎症介质的mRNA的表达并与18名健康人作对照, 发现AP时多种炎症介质升高, 而IL-6和MIF在两组中差异最显著, 提出了可将IL-6和MIF作为早期评价AP严重程度的指标的设想. 但MIF在PEP中的表达目前知之甚少, 有待我们进一步研究.

**3.7 其他促炎因子** 如黏附分子、内皮素、NO、IL-12、干扰素- $\gamma$ 等均在AP的发生发展过程中发挥不同的作用, 而他们在PEP中的作用也将是我

#### ■应用要点

结合其他临床指标, 细胞因子可作为敏感指标早期预测PEP, 进而对高危人群早期干预. 而且, 炎症因子拮抗剂及抗炎因子也是未来防治PEP的方向.

### ■同行评价

本文选题新颖,思路表达清晰,具有一定的临床和科研价值。

们今后研究的方向。

## 4 抗炎因子

4.1 IL-10 IL-10是一种单链糖蛋白,主要由Th2细胞产生,是一种重要的内源性抗炎细胞因子,能抑制单核巨噬细胞合成和表达TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6及IL-8等,减轻组织炎症;并能抑制Th1细胞产生干扰素- $\gamma$ ,抑制免疫反应。在SAP时,IL-10主要功能是抑制单核-巨噬细胞释放促炎细胞因子,在阻止该病发展、判断预后及治疗中发挥着重要作用。Kaya等<sup>[38]</sup>的研究结果表明,血清IL-10浓度能够反映AP的严重程度,IL-10是一个早期预测AP预后的有用变量。SAP患者血清IL-10浓度降低提示免疫系统应答反应减弱,增强IL-10的释放是AP早期治疗的一种方法。康迎新等<sup>[39]</sup>的研究证实,在AP患者,血清TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-18均于起病第1天内升至较高水平,随着治疗呈下降趋势。MAP组于第10天降至正常水平。血清IL-10在MAP组中最高,血清TNF- $\alpha$ 、IL-18在SAP组中最高。在SAP组中,作为促炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-18释放过度,而作为抗炎性细胞因子IL-10相对不足,更易导致炎症反应综合征的发生;而在MAP组中,IL-10在初期即达到高峰,在促炎与抗炎中更易达到平衡状态。炎症反应综合征发生的几率降低。Devière等<sup>[40]</sup>的研究发现使用IL-10可以减轻PEP的发生率,而Sherman等<sup>[41]</sup>则认为IL-10不能用于预防PEP且使风险增加,导致免疫抑制,出现二次感染。

4.2 IL-4 IL-4主要由Th2细胞产生,是一种抗炎细胞因子,能够阻止巨噬细胞的聚集和激活,阻止TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的产生,增强IL-1 $\beta$ 受体拮抗剂的表达。Zhang等<sup>[42]</sup>发现,在大鼠SAP造模前给予IL-4能增强胰腺衰变加速因子(decay accelerating factor, DAF)和同源性限制因子(homologous restriction factor, HRF)的表达,造模后给予IL-4能增强DAF表达,无论在SAP造模前还是造模后给予IL-4,胰腺坏死程度均显著减轻,提示IL-4能通过增强胰腺内DAF和HRF的表达来控制SAP的恶化和减少胰腺坏死。Shen等<sup>[43]</sup>监测了62例SAP患者入院第3、7、14 d的促抗炎因子水平,发现出现感染及MODS患者血清IL-4、IL-10水平在第3、7天缓慢上升,第14天达峰值,而TNF- $\alpha$ 、IL-6在第3、7天显著上升,第14天几乎耗尽,因而认为,IL-4、IL-10等抗炎因子的大量释放导致SAP后期免疫失衡,致使CARS的发

生,二次感染的出现。Kilciler等<sup>[15]</sup>监测了45例行ERCP治疗患者(其中7例并发了术后胰腺炎)的血清IL-4、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-2水平,发现术后24 h并发PEP组IL-4水平较未并发PEP组显著降低,而IL-2在术前术后无显著差别,并认为IL-4可以同TNF- $\alpha$ 、IL-6一起用于实验室监测PEP的指标。

4.3 其他抗炎介质 其他如瘦素、血晶素、IL-2、IL-11等均在AP发生发展过程中发挥着重要的抗炎作用,而在PEP发病及治疗过程中的作用,目前研究甚少,仍有待于进一步探讨。

## 5 结论

虽然PEP的发病机制尚未明确,但细胞因子所介导的炎症级联反应发挥了重要的作用,并由此产生了炎症放大效应导致SIRS和MODS的发生以及促抗炎因子的失衡导致CARS,二次打击的出现。目前促炎因子拮抗剂以及抗炎因子预防治疗PEP疗效以及能否用来预测PEP仍有争议,主要可能是由于不同的病理阶段不同的细胞因子起主导作用,而且各种因子之间的相互作用十分微妙、复杂,单单针对一种因子的监测和治疗,无法平衡整个细胞因子网络,以及如何选择合适的监测及治疗时机也是问题。因此,如何维护促抗炎因子的平衡及其在PEP中的作用仍有待进一步研究。

## 6 参考文献

- Freeman ML, DiSario JA, Nelson DB, Fennerty MB, Lee JG, Bjorkman DJ, Overby CS, Aas J, Ryan ME, Bochna GS, Shaw MJ, Snady HW, Erickson RV, Moore JP, Roel JP. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective, multicenter study. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 425-434
- Frank CD, Adler DG. Post-ERCP pancreatitis and its prevention. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 680-688
- Cooper ST, Slivka A. Incidence, risk factors, and prevention of post-ERCP pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2007; 36: 259-276, vii-viii
- Andriulli A, Clemente R, Solmi L, Terruzzi V, Suriani R, Sigillito A, Leandro G, Leo P, De Maio G, Perri F. Gabexate or somatostatin administration before ERCP in patients at high risk for post-ERCP pancreatitis: a multicenter, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 488-495
- Cheng CL, Sherman S, Watkins JL, Barnett J, Freeman M, Geenen J, Ryan M, Parker H, Frakes JT, Fogel EL, Silverman WB, Dua KS, Aliperti G, Yakshe P, Uzer M, Jones W, Goff J, Lazzell-Pannell L, Rashdan A, Temkit M, Lehman GA. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 139-147
- Cotton PB, Lehman G, Vennes J, Geenen JE, Russell RC, Meyers WC, Liguory C, Nickl N. Endoscopic

- sphincterotomy complications and their management: an attempt at consensus. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 383-393
- 7 American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874
- 8 Sharif S, Broman M, Babcock T, Ong E, Jho D, Rudnicki M, Helton WS, Espat NJ. A priori dietary omega-3 lipid supplementation results in local pancreatic macrophage and pulmonary inflammatory response attenuation in a model of experimental acute edematous pancreatitis (AEP). *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 271-276
- 9 Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007; 34: 1-14
- 10 Satoh A, Gukovskaya AS, Edderkaoui M, Daghighian MS, Reeve JR, Shimosegawa T, Pandolfi SJ. Tumor necrosis factor-alpha mediates pancreatitis responses in acinar cells via protein kinase C and proline-rich tyrosine kinase 2. *Gastroenterology* 2005; 129: 639-651
- 11 张超贤, 郭晓凤, 秦咏梅. 黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠NF- $\kappa$ B活性、NF- $\kappa$ B及TNF- $\alpha$  mRNA表达的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1051-1055
- 12 Malleo G, Mazzon E, Genovese T, Di Paola R, Muià C, Centorrino T, Siritwardena AK, Cuzzocrea S. Etanercept attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice: a comparison with TNF-alpha genetic deletion. *Shock* 2007; 27: 542-551
- 13 Oruc N, Ozutemiz AO, Yukselen V, Nart D, Celik HA, Yuce G, Batur Y. Infliximab: a new therapeutic agent in acute pancreatitis? *Pancreas* 2004; 28: e1-e8
- 14 Buscaglia JM, Simons BW, Prosser BJ, Ruben DS, Giday SA, Magno P, Clarke JO, Shin EJ, Kallou AN, Kantsevov SV, Gabrielson KL, Jagannath SB. Etanercept, a TNF-alpha binding agent, is ineffective in the prevention of post-ERCP pancreatitis in canines. *JOP* 2008; 9: 456-467
- 15 Kilciler G, Musabak U, Bagci S, Yesilova Z, Tuzun A, Uygun A, Gulsen M, Oren S, Oktenli C, Karaeren N. Do the changes in the serum levels of IL-2, IL-4, TNFalpha, and IL-6 reflect the inflammatory activity in the patients with post-ERCP pancreatitis? *Clin Dev Immunol* 2008; 2008: 481560
- 16 Chen CC, Wang SS, Lu RH, Lu CC, Chang FY, Lee SD. Early changes of serum proinflammatory and anti-inflammatory cytokines after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Pancreas* 2003; 26: 375-380
- 17 Chao KC, Chao KF, Chuang CC, Liu SH. Blockade of interleukin 6 accelerates acinar cell apoptosis and attenuates experimental acute pancreatitis in vivo. *Br J Surg* 2006; 93: 332-338
- 18 Severgnini M, Takahashi S, Rozo LM, Homer RJ, Kuhn C, Jung JW, Perides G, Steer M, Hassoun PM, Fanburg BL, Cochran BH, Simon AR. Activation of the STAT pathway in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L1282-L1292
- 19 Oezcueruemez-Porsch M, Kunz D, Hardt PD, Fadgyas T, Kress O, Schulz HU, Schnell-Kretschmer H, Temme H, Westphal S, Luley C, Kloer HU. Diagnostic relevance of interleukin pattern, acute-phase proteins, and procalcitonin in early phase of post-ERCP pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1763-1769
- 20 Kaw M, Singh S. Serum lipase, C-reactive protein, and interleukin-6 levels in ERCP-induced pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 435-440
- 21 Dambrauskas Z, Giese N, Gulbinas A, Giese T, Berberat PO, Pundzius J, Barauskas G, Friess H. Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1845-1853
- 22 Blanchard JA, Barve S, Joshi-Barve S, Talwalker R, Gates LK. Cytokine production by CAPAN-1 and CAPAN-2 cell lines. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 927-932
- 23 Novovic S, Andersen AM, Ersbøll AK, Nielsen OH, Jorgensen LN, Hansen MB. Proinflammatory cytokines in alcohol or gallstone induced acute pancreatitis. A prospective study. *JOP* 2009; 10: 256-262
- 24 刘京衢, 何志杰, 林洪远, 姚永明, 盛志勇. 创伤患者外周白细胞介素-18水平与脓毒症演变规律的相关分析. *中华急诊医学* 2004; 13: 90-91
- 25 Sun RQ, Zhang SL. The value of serum interleukin-18 and 10 in the evaluation of severity and prognosis in the early stage of sepsis. *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 2011; 23: 299-301
- 26 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
- 27 Kast RE. Ritonavir and disulfiram may be synergistic in lowering active interleukin-18 levels in acute pancreatitis, and thereby hasten recovery. *JOP* 2008; 9: 350-353
- 28 Xia SH, Hu CX, Zhao ZL, Xia GD, Di Y. Significance of platelet activating factor receptor expression in pancreatic tissues of rats with severe acute pancreatitis and effects of BN52021. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2992-2998
- 29 Chen C, Xia SH, Chen H, Li XH. Therapy for acute pancreatitis with platelet-activating factor receptor antagonists. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4735-4738
- 30 王钧, 白飞虎, 周毅. NSAIDs预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1356-1359
- 31 Sherman S, Alazmi WM, Lehman GA, Geenen JE, Chuttani R, Kozarek RA, Welch WD, Souza S, Pribble J. Evaluation of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase for reducing the incidence and severity of post-ERCP acute pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 462-472
- 32 Brenner T, Hofer S, Rosenhagen C, Steppan J, Lichtenstern C, Weitz J, Bruckner T, Lukic IK, Martin E, Bierhaus A, Hoffmann U, Weigand MA. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and manganese superoxide dismutase (MnSOD) as early predictors for survival in patients with severe sepsis or septic shock. *J Surg Res* 2010; 164: e163-e171
- 33 Han C, Lin Y, Shan G, Zhang Z, Sun X, Wang Z, Wei C, Deng Y, Zhang L, Bu L, Shao D, Wang H. Plasma concentration of malaria parasite-derived macrophage migration inhibitory factor in uncomplicated malaria patients correlates with parasitemia and disease severity. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 1524-1532
- 34 Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hültner L, Heumann D, Männel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 2000; 6: 164-170
- 35 Zhang ZH, Chen XH, Lin PY, Jiang HL, Xiong XM, Zhu YC. [Role of macrophage migration inhibitory

- factor in mice with sepsis and after effect of its intervention]. *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 2009; 21: 481-484
- 36 Sakai Y, Masamune A, Satoh A, Nishihira J, Yamagiwa T, Shimosegawa T. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 725-736
- 37 梁勇, 周总光, 金晶, 李石沙, 王蓉. 急性胰腺炎大鼠模型巨嗜细胞移动抑制因子(MIF)表达变化规律的研究. *华西医学* 2005; 20: 84-85
- 38 Kaya E, Dervisoglu A, Polat C. Evaluation of diagnostic findings and scoring systems in outcome prediction in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3090-3094
- 39 康迎新, 王先坤, 李培武, 张代成. 血清白细胞介素10、白细胞介素18在急性胰腺炎中的变化及意义. *兰州大学学报(医学版)* 2007; 33: 24-26
- 40 Devière J, Le Moine O, Van Laethem JL, Eisendrath P, Ghilain A, Severs N, Cohard M. Interleukin 10 reduces the incidence of pancreatitis after therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastroenterology* 2001; 120: 498-505
- 41 Sherman S, Cheng CL, Costamagna G, Binmoeller KF, Puespoek A, Aithal GP, Kozarek RA, Chen YK, Van Steenberg W, Tenner S, Freeman M, Monroe P, Geffner M, Deviere J. Efficacy of recombinant human interleukin-10 in prevention of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis in subjects with increased risk. *Pancreas* 2009; 38: 267-274
- 42 Zhang C, Ge CL, Guo RX, He SG. Effect of IL-4 on altered expression of complement activation regulators in rat pancreatic cells during severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6770-6774
- 43 Shen Y, Cui N, Miao B, Zhao E. Immune dysregulation in patients with severe acute pancreatitis. *Inflammation* 2011; 34: 36-42

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》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l/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t<sub>1/2</sub>或T, V<sub>max</sub>不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et Arn.var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, 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.

# 内镜在溃疡性结肠炎诊治中的作用

牛俊坤, 缪应雷

牛俊坤, 缪应雷, 昆明医学院第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650032

作者贡献分布: 本文由牛俊坤综述; 缪应雷审阅.

通讯作者: 缪应雷, 副教授, 650032, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院消化内科. myldu@sina.com.cn

电话: 0871-5324888-2532

收稿日期: 2011-05-22 修回日期: 2011-07-01

接受日期: 2011-07-03 在线出版日期: 2011-07-18

## Endoscopic diagnosis and treatment of ulcerative colitis

Jun-Kun Niu, Ying-Lei Miao

Jun-Kun Niu, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Associate Professor Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. myldu@sina.com.cn

Received: 2011-05-22 Revised: 2011-07-01

Accepted: 2011-07-03 Published online: 2011-07-18

## Abstract

Ulcerative colitis (UC), one of non-specific chronic inflammatory conditions of the gastrointestinal tract with unknown complex etiology, is a chronic inflammatory bowel disorder characterized by diffuse mucosal inflammation of the colorectum with exacerbations and remissions. Nowadays, the diagnosis of UC is based mainly on symptoms, endoscopic findings, and histopathologic grading of biopsy specimens. However, there is a lack of a gold standard for the diagnosis of UC. Endoscopy is the cornerstone for diagnosis and evaluation of UC and plays a significant role in diagnosis, evaluating disease activity, malignancy surveillance and treatment. Over recent decades, the emergence of new imaging techniques, including endoscopic ultrasonography, chromoendoscopy, magnification endoscopy, narrow-band endoscopic imaging, and laser scanning confocal microendoscopy, has provided a great boost to endoscopic diagnosis and treatment of UC. In this article, we will review the recent advances in endoscopic diagnosis and treatment of UC.

Key Words: Ulcerative colitis; Endoscopy; Diagnosis; Treatment

sis; Treatment

Niu JK, Miao YL. Endoscopic diagnosis and treatment of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2153-2159

## 摘要

溃疡性结肠炎是一种病因尚未明确的肠道非特异性炎症性疾病,病情可反复发作、迁延不愈,其临床表现无特异性.目前溃疡性结肠炎的诊断是基于临床表现、内镜、组织学等检查,尚无诊断的金标准.内镜在溃疡性结肠炎的诊治中占有重要的地位,对该病的诊断、疾病活动性、癌变监测以及治疗均有重要意义.近年来超声内镜、放大色素内镜、窄谱内镜及激光共聚焦显微内镜等新的内镜技术为溃疡性结肠炎的诊治开阔了新的天地.本文就内镜在溃疡性结肠炎诊治中的应用进行综述.

关键词: 溃疡性结肠炎; 内镜; 诊断; 治疗

牛俊坤, 缪应雷. 内镜在溃疡性结肠炎诊治中的作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(20): 2153-2159

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2153.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因尚未明确的肠道非特异性炎症性疾病,与克罗恩病(Crohn's disease, CD)统称为炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD). UC是一种慢性进展性疾病,病情可反复发作、迁延不愈,其临床表现无明显的特异性,临床诊断和治疗较为复杂,被世界卫生组织公认为难治愈的疾病之一,亦是结肠肿瘤发生的主要威胁因子之一.在过去的几十年里,IBD的发病率发生了许多改变,以往西欧和北美地区发病率较高<sup>[1]</sup>,其UC和CD每年发病率分别为10-20/10万和5-10/10万患病率100-200/10万和50-100/10万.但现在这些地区的发病率趋于稳定甚至有所降低<sup>[2]</sup>.然而,在以往低发的东欧及亚洲地区的发病率却在逐年上升<sup>[3]</sup>.我国从1990年至今,IBD的发病率增高了近4倍<sup>[4]</sup>.1981-2000年共计报道UC病例10 218

## ■背景资料

近年来UC的发病率逐渐上升,其已成为消化系统常见疾病和慢性腹泻的主要病因.内镜在UC诊断、UC相关性肿瘤的监测及治疗中起着至关重要的作用.超声内镜、窄带成像系统及激光共聚焦内镜等新兴内镜技术的发展为UC的诊治开阔了新的天地.

## ■同行评议者

关晓辉, 主任医师, 吉林北华大学附属医院

## ■ 研发前沿

日新月异的新内镜诊治技术改变了传统的理念和促进了跨领域的实践。内镜作为诊断和治疗手段将会越越广泛地被应用于临床,尤其是新内镜技术会更广泛地应用于消化系统肿瘤的早期诊断和内镜下微创治疗、小肠疾病的诊治以及中晚期恶性肿瘤的内镜下微创姑息治疗等极为广阔的领域。

例,近10年该病报道数上升3.1倍,2003年总住院患者中UC患者构成比为1990年的2.8倍<sup>[5]</sup>。欧阳钦在回顾了3 354篇相关文献后发现,在报道的143 511例次IBD中,以UC占明显优势,UC:CD = 42.1:1<sup>[6]</sup>。近年来UC已成为消化系统常见疾病和慢性腹泻的主要病因,患者多为青壮年,给社会生产力和个人生活质量带来极大影响,引起了各界高度重视。目前UC的诊断是基于临床表现、内镜、组织学的结果,尚无诊断的金标准<sup>[7]</sup>。内镜在UC诊治中占有重要的地位,应用肠镜作全结肠和回肠末段检查,并取活组织检查,可确定病变的范围和评价其严重性。其次,肠镜还可以监测UC相关性肿瘤的发生发展。另外,在息肉及肿瘤的切除等治疗中也起着至关重要的作用。近年来超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)、放大色素内镜,窄谱内镜(narrow-band endoscopic imaging, NBI)及激光共聚焦显微内镜(laser scanning confocal microendoscopy, LSCM)等新内镜技术的发展为UC的诊治开阔了新的天地。本文就肠镜在UC的诊治中的应用进行综述。

### 1 内镜在UC诊断中的应用

虽然生物化学分析,蛋白质组学及基因检测正在成为IBD的诊断热点<sup>[8]</sup>,而且肠镜所获得的信息在UC的诊断中不能起到确诊的作用,但UC在内镜下仍有一定的特点,内镜在UC的诊断中仍然具有重要的价值。

1.1 普通电子结肠镜下UC的表现 电子肠镜在UC的诊断依据中占有重要的地位,应用肠镜作全结肠和回肠末段检查,并取活组织检查,可确定病变的范围和评价其严重性<sup>[9]</sup>,并可根据结肠镜下表现将病变进行分级:0级为黏膜正常;1级为黏膜血管充血、水肿、血管模糊;2级为接触性出血;3级为自发性出血;4级为溃疡形成<sup>[10]</sup>。

1.2 超声内镜 肠镜、钡灌肠及活检等诊断方法只能观察UC累及肠黏膜表面的变化,而不能细致评价由于炎症、水肿、萎缩或纤维化而导致的肠壁结构的变化。EUS能清晰地显示消化系管壁的内部结构,其影像表现与很多消化系疾病在解剖学上及病理组织学方面有很高的一致性<sup>[11]</sup>。UC在EUS上呈现的连续、对称、均匀的肠壁增厚特点,明显有别于CD、肿瘤等所引起的肠壁改变,是一个非常有价值的鉴别诊断征象<sup>[12]</sup>。在Yoshizawa等<sup>[13]</sup>的研究表明EUS诊断UC肠壁的炎症波及深度与组织学所见符合率高达90%(45/50),因而认为EUS是一种有效的诊断工

具。EUS不仅可以从水平方向显示UC的病变广度范围,还可以显示病变侵袭肠壁垂直方向的深度范围,其对炎症侵袭肠壁程度的判断与病变的严重程度相一致,因而有助于临床对病情及预后的判断和治疗方案的选择<sup>[14]</sup>。

1.3 放大和染色内镜 放大肠镜结合色素内镜对于微小病变的诊断价值明显优于普通肠镜。近年来由于变焦放大肠镜技术的进步,放大倍数可提高到100倍,结合色素已能清晰地观察病变表面微细结构和腺管开口,根据腺管开口的变化可得到一种客观的诊断依据。Fujiya等<sup>[15]</sup>的研究显示,根据Matts分型<sup>[16]</sup>,普通肠镜检查中,Matts 1级和Matts 3级或Matts 4级区域,肠镜评级与病理分级相符,但Matts 2级的肠镜评级却与病理分级相差甚远,病理检查有静止期也有活动期。普通肠镜能清楚分辨正常和受损黏膜,但在现实微小病变方面却略显不足<sup>[17]</sup>。相比之下,对于微小病变放大肠镜有更高的检查率(82.2%)而且与病理检查有更高的符合度(普通肠镜 $r = 0.665$ ,放大肠镜 $r = 0.807$ )<sup>[15]</sup>。

1.4 黏膜活检 内镜活检作为肠镜大体形态的补充有较大价值,尤其是多块、深凿活检及靶向活检可能会提供更多有利于UC的诊断信息,并弥补内镜检查可能会漏诊的一些黏膜病变,随着结肠镜对UC窥视下和活检病理形态改变的认识不断加深,人们开始重视肠黏膜活检病理诊断应用价值,并倾向将结肠黏膜活检列为诊断UC的标准之一<sup>[18]</sup>。

### 2 肠镜在评价疾病的活动性和程度中的作用

UC是一种慢性进展性疾病,病情可反复发作,迁延不愈。因此,影响治疗方案选择的一个重要因素是对疾病活动性的评价。因其简便性及无创性,据患者症状的临床标准被广泛应用。然而单以临床标准评估处于静止期的患者,有40%的患者在一年内复发<sup>[19]</sup>。因此,更为客观的评价标准需要被应用以确保评估的准确性。黏膜病理检查分级作为评估的金标准能较好的反映出UC的临床特征和内镜下表现,能较好地评估疾病的严重性和活动性<sup>[16]</sup>。虽然肠镜检查是一种简便有效的评价方法,但其与病理检查的符合度仍存在诸多争议。在临床上,患者症状表现不明显或经治疗后症状缓解的患者其肠道黏膜的炎症仍可持续存在,普通肠镜检查可能无阳性发现但病理检查仍提示疾病处于活动期<sup>[20]</sup>。Fujiya等<sup>[15]</sup>提出了一种关于UC的放大肠镜分类标准

在评估疾病活动性和预测复发中有很好的实用性, 其中上皮细胞微小病变(minute defects of epithelium, MDE)预示着UC在短期(6 mo)内可能复发, 是一个独立的危险因素( $OR = 0.24$ , 95% CI: 0.072-0.801), 早期诊断为MDE的患者比未诊断为MDE的有更高的累及复发率( $P < 0.01$ )。相似的, 在Nishio等<sup>[21]</sup>的一项涉及113例缓解期UC患者的研究表明放大肠镜的分级评估在预测疾病复发中有重要作用, 在1年的随访期内放大肠镜分级为1、2、3、4级患者的复发率分别为6%、21%、43%、60%。

NBI和LSCM检查在UC活动性评估中也有参考价值。窄带内镜可依据炎性反应累及的深度对UC进行临床评估: 疾病轻度活动期时, 炎性改变的肠黏膜在NBI下显示为茶褐色, 这种颜色的改变与活动期黏膜或出血在窄波光照射下被血红蛋白强烈吸收有关。缓解期时NBI可清晰观察到绿色深层血管和褐色浅层血管, 或浅层黏膜微血管不清楚, 血管呈蜂窝状<sup>[22]</sup>。激光共聚焦内镜检查中, 正常结肠黏膜的隐窝小而圆, 排列有序, 黏膜腺体呈小圆状; UC缓解期黏膜隐窝小而圆, 排列轻度紊乱, 隐窝黏膜腺体固有层可见少量炎症细胞和微血管; 活动期UC隐窝较大, 形态各异, 排列明显异常, 有时不易辨认, 黏膜固有层可见大量炎症细胞和微血管<sup>[23]</sup>。

### 3 肠镜在监测UC相关性结肠肿瘤的作用

**3.1 UC相关性肿瘤的发生率** 自从Crohn和Rosenberg<sup>[24]</sup>在1925年报道了首例UC并发结肠癌之后, UC与结肠癌的关系逐渐引起人们的重视并进行了大量的相关研究。UC相关性结肠癌(ulcerative colitis associated colorectal cancer, UCACRC)发生发展过程中的分子生物学变化目前仍不清楚, *p53*, *k-ras*基因突变, 微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)在其发展中可能是一早期事件, 炎症活动可能是启动或促进肿瘤发生的因素之一<sup>[25]</sup>。Eaden等<sup>[26]</sup>开展的Meta分析发现UC发生结肠直肠癌的危险是其他疾病的4-10倍, 比例约为3.7%。危险因素主要有病程长短、病变累及范围、初发年龄、炎症严重程度、合并原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)、吸烟等, 病程和累及范围是最确定的因素。病程少于8-10年的UC很少发生结肠直肠癌, 超过8-10年的每年危险增加0.5%-2%, 病程超过10年的每年危险增加2%, 超过20年每年危险增加9%, 超过30年每年危险增

加19%。广泛性结肠炎的癌变危险率高于直肠炎, 炎症仅局限于直肠时癌变发生率为1.7%、炎症波及左半结肠时癌变发生率上升至2.8%、而当炎症波及全结肠时癌变发生率高达14.8%, 炎症波及的范围与癌变的危险性成正比<sup>[27]</sup>。一项回顾性病例对照研究发现结肠镜及组织学炎症积分与结肠直肠癌形成有较高的一致性, 认为UC炎症严重程度是结肠直肠癌形成的重要决定因素<sup>[28]</sup>。但Lakatos等<sup>[29]</sup>在2008年关于UCACRC的危险因素的研究中指出UC炎症严重程度在肿瘤形成上的重要性尚无定论。多数研究证实合并PSC的UC有较高形成结肠直肠癌的危险, 随访研究报告UC伴发PSC发生结肠肿瘤的累计危险率10年为25%<sup>[30]</sup>。Rutter等<sup>[28]</sup>研究也支持PSC是独立危险因素。发病年龄也是一个存在争议的危险因素, Ekbohm等<sup>[27]</sup>认为起病年龄小于15岁是一个独立的危险因素, 起病小于15的患者病程持续35年发生CRC的累积危险率为40%, 但起病年龄为15-39岁, 累积的危险率只有25%。Eaden的Meta分析也支持这一结论。但Lakatos等和Karvellas等研究却不赞同这一观点<sup>[31,32]</sup>。

**3.2 UC相关性结肠直肠癌的结肠镜监测的意义** 减少UC相关性结肠癌的关键是通过肠镜监测早期发现和治疗癌前病变或者预防性结肠切除及药物预防。对于存在结肠直肠癌危险因素的UC患者结肠镜监测是阻止UC发生结肠直肠癌的有效手段, 早期诊断和治疗结肠癌前病变能阻止其向浸润性癌发展, 使发生结肠癌的危险性降低50%-90%<sup>[33]</sup>。未行结肠镜监测的UC患者发生UC相关结肠直肠癌5年生存率与散发性结肠直肠癌相似, 而进行监测者可延长其存活期。Lim和Axon<sup>[34]</sup>的研究也支持对长期广泛的缓解期UC患者进行结肠镜监测, 认为早期发现和切除异型增生相关病变/包块(dysplasia-associated lesion or mass, DALM)或高度异型增生(high-grade dysplasia, HGD)可改善患者的预后。目前监测的效果仍然受到置疑, 在一项涉及1 916例UC患者的检测研究中, 发现的92例CRC, 几乎一半是Dukes'C或Dukes'D, 只有12% CRC在监测的早期被发现<sup>[35]</sup>。尽管如此, 近年来流行病学资料证实UCACRC发病率逐渐降低, 广泛的缓解期内镜监测可能是引起这种变化的一个原因<sup>[36]</sup>。

**3.3 UC相关性结肠直肠癌的肠镜监测方法** 总结美国<sup>[37]</sup>和欧洲<sup>[38]</sup>炎症性肠病协会的监测建议将UC患者结肠镜监测的指南要点如下: (1)应

#### ■ 相关报道

国内有多项研究进行内镜下喷洒混合药物治疗UC, 如锡类散、云南白药、激素、抗生素或其他中药等混合液, 认为有一定的疗效, 但缺乏严格的随机对照研究, 没有证据说明是否比传统的用药途径更优。

### ■创新盘点

本文着重介绍近年来新兴发展出现的内镜技术在UC诊治中应用,从诊断、癌变监测及治疗等不同角度介绍超声内镜、放大色素内镜、窄谱和激光共聚焦内镜的应用研究前沿。

在疾病的缓解期进行结肠镜筛查;(2)应在发病后的8-10年进行结肠镜的筛查并且明确病变的范围;(3)乙状结肠炎8-10年后、左侧结肠炎在15-20年后进行监测,监测期限为全结肠炎8年,左半结肠炎12-15年;(4)由于癌症发生的危险随着时间呈现指数变化,因此监测的间隔应该随时间而缩短。比如乙状结肠炎,在第2个10年应每3年1次,第3个10年应每2年1次,第4个10年应每年1次;(5)可疑结肠病变区域应每10 cm随机取2-4块活检标本,活检位点越多发现异型增生的敏感性就越高;(6)伴有PSC的患者有高度的危险,应该每年进行结肠镜筛查。在最近的一项Meta分析中发现低度增生不良的患者有比正常人群高9倍的风险发展为CRC,12倍风险发展为的腺瘤<sup>[39]</sup>。日本Abe等<sup>[40]</sup>的研究分别对平坦型、凹陷型、隆起型结直肠息肉的临床病理学特征进行了描述,发现平坦型病变和凹陷型病变较隆起型病变更易发生癌变,因此平坦型低度增生不良的患者需要进行3-6 mo每次重复活检或者预防性结肠切除,而高度平坦型增生不良或者腺瘤应实施预防性结肠切除术。隆起型病变被认为是DALM,他是预防性结肠切除的绝对适应证<sup>[41]</sup>。

### 3.4 肠镜检查方法在监测中的应用

3.4.1 放大及染色内镜:部分结直肠癌可能原位发生于扁平或凹陷型病灶的基础上<sup>[42]</sup>。在普通内镜下往往仅有不明显的微细改变,放大色素内镜的应用有助于提高其检出率。Fu等<sup>[43]</sup>报道同时使用放大内镜和色素内镜鉴别肿瘤性和非肿瘤性结直肠病变的准确性高达95.6%,而仅使用色素内镜和常规内镜的准确性分别为89.3%和84.0%。Matsumoto等<sup>[44]</sup>的研究表明放大色素内镜对判断病灶性质及其浸润深度有更高的准确性,能提高活检病理诊断的准确性。目前随机活检受到越来越多的质疑。Rutter等<sup>[45]</sup>和Rubin等<sup>[46]</sup>的研究证实,未合并PSC的患者肠镜检查能发现77.1%-77.3%的增生不良和88.9%-100.0%的癌,另外随机活检的覆盖面也只占整个肠道的1.0%,因此增加随机活检难以接受。Hurlstone等<sup>[47]</sup>在比较放大染色内镜指导的靶向活检或随机活检的准确性的研究中发现,在350例患者中,靶向活检发现了69例增生不良,而随机活检只发现了24例( $P<0.001$ ),靶向活检的准确性提高了3-4.5倍。Rutter等<sup>[48]</sup>的研究也证实了靶向活检比随机活检有更高的准确性。事实上Marion倾向于将放大染色指导下的靶向活检作为增生不良的标准

监测技术<sup>[49]</sup>。因此,随着放大色素内镜的普及应用,活检病理诊断的准确性有望进一步提高。

3.4.2 NBI和LSCM: NBI是一种对黏膜表浅病变的诊断具有潜在应用前途的新技术,是一种新颖的、非侵入性的光学技术,该系统适用于检测早期黏膜病变<sup>[50]</sup>。Machida等<sup>[51]</sup>在一项队列研究中测试了结肠NBI的可行性,腺体分型使用Kudo分型<sup>[52]</sup>,证明NBI比传统内镜可以更好的显示腺体类型,但不如色素内镜。但NBI内镜通过更好的观察黏膜颜色和血管网,在区分肿瘤性病变和非肿瘤性病变的敏感性和特异性与色素内镜相等(敏感性100%,特异性75%),明显优于传统结肠镜(敏感性83%,特异性44%)。NBI和放大色素内镜的腺体分型的总体一致性高达84%,尤其在II、III、IV和V型病变中有高度一致性<sup>[44]</sup>。

LSCM技术作为一种全新的诊断工具,因可逐层获得组织光学横断面的共聚焦图像,常被称为“光活检”<sup>[53]</sup>。Kiesslich等<sup>[54]</sup>首先开展了在结直肠癌患者体内进行LSCM研究,采集69例患者390处病灶的13 020帧共聚焦图像,与病理活检相比,其对结直肠黏膜肿瘤性病变的预测准确率达99.2%,敏感性97.4%,特异性99.4%,说明LSCM检测结直肠肿瘤病变的准确性和可行性较高。Hurlstone等<sup>[55]</sup>的研究中40例患者先行色素内镜定位后接受LSCM检查,结果显示共检出39例患者的162个病变组织,与活检结果相比,其对上皮内瘤变的诊断敏感性97.4%,特异性99.3%,准确性99.1%。表明LSCM在UCACRC监测中有较高的应用价值。

## 4 息肉及肿瘤的内镜下治疗

近年来随着内镜技术的进步,内镜下黏膜切除术(endoscopy mucosal resection, EMR)和内镜黏膜下层剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)逐渐成为一种切除消化系癌前病变与早期癌的一种标准微创治疗手段,随着癌前病变与早期癌检出率的升高,同时用于EMR与ESD的附件与技术也在不断的完善与提高,这为内镜下肿瘤的治疗提供了广泛前景。Kita等<sup>[56]</sup>开展的一项对于大肠侧向发育肿瘤的ESD研究显示,对于>2.0 cm的肿瘤,ESD的完整切除率为77%。当病变范围较大时(>2.0 cm),ESD切除的结直肠侧向发育肿瘤和局部肿瘤残留率优于EMR分次逐块切除,ESD和EMR复发率分别为2%和35%<sup>[57]</sup>。意大利学者Kurihara等<sup>[58]</sup>总结250例内镜下息肉电凝切除术的经验,也认为内镜治疗是最佳手

段, 安全有效, 并发症少, 对一些早期癌通过内镜技术可治愈. 目前普遍认为几乎所有结直肠癌均通过腺瘤演变而来, 结直肠腺瘤作为一种癌前病变已经得到公认<sup>[59]</sup>. 早期发现结直肠息肉癌变, 是改善结直肠癌预后的有效途径. Meta分析<sup>[60]</sup>证实EMR是治疗结直肠腺瘤的有效的手段( $OR = 0.5866$ ,  $95\%CI: 47.14-69.71$ ), 可免行外科手术而达到根治的目的. EMR和ESD的主要并发症为出血和穿孔, 均可在内镜下处理<sup>[61,62]</sup>. EMR术前常规应用EUS探查消化系浅表肿瘤, 特别是早期恶性肿瘤浸润深度, 能较准确的判定病变的分期, 排除不适宜切除的黏膜下浸润病变, 预测EMR治愈早期癌的可能性并提高了EMR操作的安全性<sup>[63]</sup>.

## 5 结论

内镜在UC的诊治中占有重要的地位其对该病的诊断、疾病活动性判断、癌变监测及治疗均有重要意义. 新的内镜技术在UC的诊治中也发挥了积极的作用. 内镜检查黏膜愈合是判断药物治疗有效的重要手段. 然而, 内镜检查诊断与病理学诊断的符合度仍然受到广泛争议, 需要引入更准确的内镜下病变评分系统. 发现癌前病变后内镜切除成为首选, 但是受到位置、形状、大小和深度的制约, 安全有效的工具和技术需要逐步发展完善. 近年来消化内镜技术的迅速发展, 日新月异的新内镜诊治技术改变了传统的理念和促进了跨领域的实践. 内镜作为诊断和治疗手段将会越越多越广地被应用于临床, 尤其是新内镜技术会更广地应用于消化系肿瘤的早期诊断和内镜下微创治疗、小肠疾病的诊治以及中晚期恶性肿瘤的内镜下微创姑息治疗等极为广阔的领域, 随着内镜的更进一步发展, 有望开辟更加微创, 简便和安全治疗的新篇章.

## 6 参考文献

- Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53 Suppl 5: V1-V16
- Molinié F, Gower-Rousseau C, Yzet T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, Lerebours E, Dupas JL, Colombel JF, Salomez JL, Cortot A. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* 2004; 53: 843-848
- Thia KT, Loftus EV, Sandborn WJ, Yang SK. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 3167-3182
- Jiang L, Xia B, Li J, Ye M, Yan W, Deng C, Ding Y, Luo H, Hou W, Zhao Q, Liu N, Ren H, Hou X, Xu H. Retrospective survey of 452 patients with inflammatory bowel disease in Wuhan city, central China. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 212-217
- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 欧阳钦. 我国炎症性肠病研究的概况和策略. *四川医学* 2005; 26: 355-356
- Ouyang Q, Tandon R, Goh KL, Pan GZ, Fock KM, Fiocchi C, Lam SK, Xiao SD. Management consensus of inflammatory bowel disease for the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1772-1782
- Kok K, Stokkers P, Reitsma PH. Genomics and proteomics: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10 Suppl 1: S1-S6
- Zhong YQ, Huang HR, Zhu ZH, Chen QK, Zhan J, Xing LC. Effects of sulfasalazine on biopsy mucosal pathologies and histological grading of patients with active ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4435-4438
- Barom JH, Connell AM, Lennard-Jones JE. Variation between observers in describing mucosal appearances in proctocolitis. *Br Med J* 1964; 1: 89-92
- Rampado S, Bocus P, Battaglia G, Ruol A, Portale G, Ancona E. Endoscopic ultrasound: accuracy in staging superficial carcinomas of the esophagus. *Ann Thorac Surg* 2008; 85: 251-256
- Higaki S, Nohara H, Saitoh Y, Akazawa A, Yanai H, Yoshida T, Okita K. Increased rectal wall thickness may predict relapse in ulcerative colitis: a pilot follow-up study by ultrasonographic colonoscopy. *Endoscopy* 2002; 34: 212-219
- Yoshizawa S, Kobayashi K, Katsumata T, Saigenji K, Okayasu I. Clinical usefulness of EUS for active ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 253-260
- Dağlı U, Over H, Tezel A, Ulker A, Temuçin G. Transrectal ultrasound in the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *Endoscopy* 1999; 31: 152-157
- Fujiya M, Saitoh Y, Nomura M, Maemoto A, Fujiya K, Watari J, Ashida T, Ayabe T, Obara T, Kohgo Y. Minute findings by magnifying colonoscopy are useful for the evaluation of ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 535-542
- MATTS SG. The value of rectal biopsy in the diagnosis of ulcerative colitis. *Q J Med* 1961; 30: 393-407
- Powell-Tuck J, Day DW, Buckell NA, Wadsworth J, Lennard-Jones JE. Correlations between defined sigmoidoscopic appearances and other measures of disease activity in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1982; 27: 533-537
- Shepherd NA. Pathological mimics of chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 1991; 44: 726-733
- Riley SA, Mani V, Goodman MJ. Why do patients with ulcerative colitis relapse? *Gut* 1991; 32: 832
- Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Dutt S, Herd ME. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991; 32: 174-178
- Nishio Y, Ando T, Maeda O, Ishiguro K, Watanabe O, Ohmiya N, Niwa Y, Kusugami K, Goto H. Pit patterns in rectal mucosa assessed by magnifying colonoscopy are predictive of relapse in patients with quiescent ulcerative colitis. *Gut* 2006; 55: 1768-1773
- Hirata M, Tanaka S, Oka S, Kaneko I, Yoshida S, Yoshihara M, Chayama K. Magnifying endoscopy

## ■应用要点

随着内镜技术的不断进步, 其高分辨图像及内镜引导下的靶向活检能提高UC的诊断水平. 先进的内镜将广泛的应用于UC相关性肿瘤的检测及内镜下微创治疗.

### ■同行评价

本文科学性强, 有较好可读性, 对临床有较好的指导意义。

- with narrow band imaging for diagnosis of colorectal tumors. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 988-995
- 23 Watanabe O, Ando T, Maeda O, Hasegawa M, Ishikawa D, Ishiguro K, Ohmiya N, Niwa Y, Goto H. Confocal endomicroscopy in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 2: S286-S290
- 24 Crohn BB, Rosenberg H. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). *The American Journal of the Medical Sciences* 1925; 170: 220-227
- 25 Willenbucher RF, Aust DE, Chang CG, Zelman SJ, Ferrell LD, Moore DH, Waldman FM. Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *Am J Pathol* 1999; 154: 1825-1830
- 26 Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: 526-535
- 27 Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323: 1228-1233
- 28 Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, Williams C, Price A, Talbot I, Forbes A. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 451-459
- 29 Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3937-3947
- 30 Kornfeld D, Ekobom A, Ihre T. Is there an excess risk for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis and concomitant primary sclerosing cholangitis? A population based study. *Gut* 1997; 41: 522-525
- 31 Karvellas CJ, Fedorak RN, Hanson J, Wong CK. Increased risk of colorectal cancer in ulcerative colitis patients diagnosed after 40 years of age. *Can J Gastroenterol* 2007; 21: 443-446
- 32 Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, David G, Pandur T, Balogh M, Fischer S, Vargha P, Lakatos PL. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 205-211
- 33 Müller AD, Sonnenberg A. Prevention of colorectal cancer by flexible endoscopy and polypectomy. A case-control study of 32,702 veterans. *Ann Intern Med* 1995; 123: 904-910
- 34 Lim CH, Axon AT. Low-grade dysplasia: nonsurgical treatment. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 270-272; discussion 273-275
- 35 Lynch DA, Lobo AJ, Sobala GM, Dixon MF, Axon AT. Failure of colonoscopic surveillance in ulcerative colitis. *Gut* 1993; 34: 1075-1080
- 36 Siew C. Changing Epidemiology and Future Challenges of Inflammatory Bowel Disease in Asia. *Intestinal Research* 2010; 8: 1-8
- 37 Itzkowitz SH, Present DH. Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 314-321
- 38 Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, Feakins R, Fléjou JF, Herfarth H, Hommes DW, Kupcinskis L, Lakatos PL, Mantzaris GJ, Schreiber S, Villanacci V, Warren BF. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2008; 2: 1-23
- 39 Thomas T, Abrams KA, Robinson RJ, Mayberry JF. Meta-analysis: cancer risk of low-grade dysplasia in chronic ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 657-668
- 40 Abe S, Terai T, Sakamoto N, Beppu K, Nagahara A, Kobayashi O, Ohkusa T, Ogihara T, Hirai S, Kamano T, Miwa H, Sato N. Clinicopathological features of nonpolypoid colorectal tumors as viewed from the patients' background. *J Gastroenterol* 2006; 41: 325-331
- 41 Kudo S, Kashida H, Tamura T, Kogure E, Imai Y, Yamano H, Hart AR. Colonoscopic diagnosis and management of nonpolypoid early colorectal cancer. *World J Surg* 2000; 24: 1081-1090
- 42 Kudo S, Tamura S, Hirota S, Sano Y, Yamano H, Serizawa M, Fukuoka T, Mitsuoka H, Nakajima T, Kusaka H. The problem of de novo colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1118-1120
- 43 Fu KI, Sano Y, Kato S, Fujii T, Nagashima F, Yoshino T, Okuno T, Yoshida S, Fujimori T. Chromoendoscopy using indigo carmine dye spraying with magnifying observation is the most reliable method for differential diagnosis between non-neoplastic and neoplastic colorectal lesions: a prospective study. *Endoscopy* 2004; 36: 1089-1093
- 44 Matsumoto T, Kudo T, Jo Y, Esaki M, Yao T, Iida M. Magnifying colonoscopy with narrow band imaging system for the diagnosis of dysplasia in ulcerative colitis: a pilot study. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 957-965
- 45 Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, Kamm MA, Williams CB, Forbes A. Most dysplasia in ulcerative colitis is visible at colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 334-339
- 46 Rubin DT, Rothe JA, Hetzel JT, Cohen RD, Hanauer SB. Are dysplasia and colorectal cancer endoscopically visible in patients with ulcerative colitis? *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 998-1004
- 47 Hurlstone DP, Sanders DS, Lobo AJ, McAlindon ME, Cross SS. Indigo carmine-assisted high-magnification chromoscopic colonoscopy for the detection and characterisation of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis: a prospective evaluation. *Endoscopy* 2005; 37: 1186-1192
- 48 Rutter MD, Saunders BP, Schofield G, Forbes A, Price AB, Talbot IC. Pancolonic indigo carmine dye spraying for the detection of dysplasia in ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 256-260
- 49 Marion JF, Wayne JD, Present DH, Israel Y, Bodian C, Harpaz N, Chapman M, Itzkowitz S, Steinlauf AF, Abreu MT, Ullman TA, Aisenberg J, Mayer L. Chromoendoscopy-targeted biopsies are superior to standard colonoscopic surveillance for detecting dysplasia in inflammatory bowel disease patients: a prospective endoscopic trial. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2342-2349
- 50 Gono K, Obi T, Yamaguchi M, Ohyama N, Machida H, Sano Y, Yoshida S, Hamamoto Y, Endo T. Appearance of enhanced tissue features in narrow-band endoscopic imaging. *J Biomed Opt* 2004; 9: 568-577
- 51 Machida H, Sano Y, Hamamoto Y, Muto M, Koza T, Tajiri H, Yoshida S. Narrow-band imaging in the diagnosis of colorectal mucosal lesions: a pilot study. *Endoscopy* 2004; 36: 1094-1098
- 52 Kudo S, Hirota S, Nakajima T, Hosobe S, Kusaka H, Kobayashi T, Himori M, Yagyuu A. Colorectal tumours and pit pattern. *J Clin Pathol* 1994; 47: 880-885
- 53 Wang TD, Van Dam J. Optical biopsy: a new fron-

- tier in endoscopic detection and diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 744-753
- 54 Kiesslich R, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W, Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004; 127: 706-713
- 55 Hurlstone DP, Baraza W, Brown S, Thomson M, Tiffin N, Cross SS. In vivo real-time confocal laser scanning endomicroscopic colonoscopy for the detection and characterization of colorectal neoplasia. *Br J Surg* 2008; 95: 636-645
- 56 Kita H, Yamamoto H, Miyata T, Sunada K, Iwamoto M, Yano T, Yoshizawa M, Hanatsuka K, Arashiro M, Omata T, Sugano K. Endoscopic submucosal dissection using sodium hyaluronate, a new technique for en bloc resection of a large superficial tumor in the colon. *Inflammopharmacology* 2007; 15: 129-131
- 57 Tanabe S, Koizumi W, Mitomi H, Nakai H, Murakami S, Nagaba S, Kida M, Oida M, Saigenji K. Clinical outcome of endoscopic aspiration mucosectomy for early stage gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 708-713
- 58 Kurihara M, Matsukawa M, Fujimori M, Sato A, Endo W, Yamazaki T, Chiba T, Yamasaki T, Shimada K, Kouda T, Nakamachi M, Shimizu K, Kumagai K. [Advances in endoscopic therapies for cancers of the digestive tract]. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999; 26 Suppl 1: 42-50
- 59 Gupta S. Colorectal polyps: the scope and management of the problem. *Am J Med Sci* 2008; 336: 407-417
- 60 Puli SR, Kakugawa Y, Gotoda T, Antillon D, Saito Y, Antillon MR. Meta-analysis and systematic review of colorectal endoscopic mucosal resection. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4273-4277
- 61 Gotoda T. Endoscopic resection of early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2007; 10: 1-11
- 62 Uedo N, Iishi H, Tatsuta M, Ishihara R, Higashino K, Takeuchi Y, Imanaka K, Yamada T, Yamamoto S, Yamamoto S, Tsukuma H, Ishiguro S. Longterm outcomes after endoscopic mucosal resection for early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; 9: 88-92
- 63 de Paulo GA, Ardengh JC, Nakao FS, Ferrari AP. Treatment of esophageal varices: a randomized controlled trial comparing endoscopic sclerotherapy and EUS-guided sclerotherapy of esophageal collateral veins. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 396-402; quiz 463

编辑 曹丽鸥 电编 张洋

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

# 膜联蛋白A1与消化系统肿瘤关系的研究进展

张晓娜, 张学彦, 曹秀红

## ■背景资料

Annexin A1是膜联蛋白超家族中的一员,他在生物体内发挥着重要的生物学功能,参与细胞信号转导、细胞增殖、分化及凋亡等多种生命过程,其表达在多种类型组织的癌前病变及肿瘤组织中与相应的正常组织中相比均有明显差异,与肿瘤的发生、发展以及侵袭转移等密切相关。

张晓娜, 张学彦, 曹秀红, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

作者贡献分布: 本文由张晓娜完成; 张学彦与曹秀红对文章进行审校。

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

zxyxw@sina.com

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2011-05-08 修回日期: 2011-06-20

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-18

## Advances in understanding the relationship between annexin A1 and gastrointestinal cancer

Xiao-Na Zhang, Xue-Yan Zhang, Xiu-Hong Cao

Xiao-Na Zhang, Xue-Yan Zhang, Xiu-Hong Cao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xue-Yan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zxyxw@sina.com

Received: 2011-05-08 Revised: 2011-06-20

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-18

## Abstract

Annexin A1 is a member of the annexin family of calcium-dependent phospholipid-binding proteins and participates in many important life processes, such as cellular signal transduction, proliferation, differentiation and apoptosis. Recent studies have shown that the expression levels of annexin A1 vary among different tumor tissues and different tumor subtypes and may be associated with the development, invasion and metastasis of malignant tumors. Understanding the relationship between annexin A1 and tumors has important implications for the early diagnosis and treatment of tumors.

Key Words: Annexin A1; Gastrointestinal cancer; Invasion

Zhang XN, Zhang XY, Cao XH. Advances in understanding the relationship between annexin A1 and gastrointestinal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2160-2165

## ■同行评议者

庄林, 主任医师, 昆明市第三人民医院肝病科

## 摘要

膜联蛋白A1(annexin A1)是钙依赖性磷脂结合蛋白超家族中的一员,他参与细胞信号转导、细胞增殖、分化及凋亡等多种重要的生命过程。近年来的研究表明其表达水平在不同肿瘤组织中有差异,在同一肿瘤的不同类型中有显著变化,可能与肿瘤的发生以及侵袭转移相关。因此,了解其与肿瘤关系的最新进展将会为肿瘤的早期诊断和治疗提供新的思路。

关键词: 膜联蛋白A1; 消化系统肿瘤; 侵袭

张晓娜, 张学彦, 曹秀红. 膜联蛋白A1与消化系统肿瘤关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(20): 2160-2165  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2160.asp>

## 0 引言

膜联蛋白A1(annexin A1)早期又被称为脂皮素-1(lipocotin I)、依钙蛋白-2(calpactin II)、磷脂酶A2抑制蛋白或p35,是膜联蛋白多基因家族的成员之一。Annexin A1参与了生物体内多种生理变化过程,如细胞内外信号传导,细胞的分化、增殖及凋亡,炎症与免疫反应等。近年来越来越多的研究表明Annexin A1也参与了组织恶变的过程,在多种肿瘤中表达异常,其与肿瘤的发生、发展以及侵袭转移等密切相关。本文将对Annexin A1的生物学特性及其与消化系统肿瘤相关性的研究进展作一综述。

## 1 生物学特性

1.1 结构 Annexins作为一个Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白家族,广泛地存在于真核生物细胞中,目前可分为A、B、C、D、E 5个家族<sup>[1]</sup>。A族主要分布于高等脊椎动物中,其中Annexin A1是annexins超家族中第一个被描述的成员,Annexin A1基因定位于人染色体9q12-q21.2上,由13个外显子和12个内含子组成,其蛋白质相对分子质量为37 000 Da。在结构上,Annexin A1具有其家族成员所共有的相似结构:一个高度保守的中心结构域和一个承担各自独特功能的N端序列<sup>[2]</sup>,前

者是由70个氨基酸残基组成、结构高度相似、被称为“annexin repeat”的4个同源重复序列, 每个重复序列含有5个 $\alpha$ 螺旋. 这些重复序列排列成一个紧凑的稍有凹凸的盘状, 在其凸面具有 $\text{Ca}^{2+}$ 与膜的结合位点, 能够以钙离子依赖的方式可逆地和细胞膜磷脂结合; 后者由32-42个氨基酸残基组成, 含有钙结合位点、蛋白水解作用位点, 以及磷酸化、糖化、乙酰化位点, 有调控AnnexinA1与其他蛋白配体及膜相互作用的功能<sup>[3,4]</sup>.

1.2 功能 不同的膜联蛋白具有不同的N端序列、独特的基因表达方式和组织特异性, 这表明每种膜联蛋白在机体的不同组织和部位执行着不同的生物学功能. AnnexinA1在人体组织中广泛参与炎症反应的调控、细胞内外信号的传导、细胞的增生、分化及凋亡等多种细胞生命活动.

AnnexinA1是一个重要的炎症调控蛋白, 在炎症代谢产物产生、中性粒细胞/单核细胞与内皮细胞黏附的过程中起重要作用<sup>[5]</sup>, 其功能可被糖皮质激素诱导, 并能反过来调节糖皮质激素的功能<sup>[6]</sup>. 在炎症反应中AnnexinA1具有抑制中性粒细胞和单核巨噬细胞迁移的作用, 且这一作用与甲酰基肽受体(FPR)和LipoxinA4受体(ALXR)的激活、L-选择素(L-selectin)的脱落、整合素(integrin) $\alpha 4\beta 1$ 的竞争性结合及N-聚糖羧化有关<sup>[7-9]</sup>. 外源性AnnexinA1以及外化的内源性AnnexinA1和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)竞争与整合素 $\alpha 4\beta 1$ 结合, 抑制单核细胞与血管内皮细胞的黏附, 参与早期炎症反应的调节<sup>[10]</sup>. 此外, AnnexinA1也通过抑制磷脂酶A2(phospholipase A2, PLA2)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、诱导型一氧化氮合酶等一些参与炎症反应的酶的表达和活性来调控炎症反应<sup>[11,12]</sup>.

AnnexinA1蛋白存在多个潜在的磷酸化位点, 是多种信号转导酶的底物, 可以在酶的作用下发生磷酸化而参与相应的信号转导. 如: AnnexinA1蛋白N端第21位Tyr残基和第27位Ser残基能分别被表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)型酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, TPK)和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)磷酸化而参与TPK-Ras-MAPK信号转导途径和 $\text{Ca}^{2+}$ -磷脂依赖性蛋白激酶信号转导途径<sup>[13]</sup>. 类似的转导酶还有血小板原性生长因子受体激酶、肝细胞生长因子受体激酶等. 另

外AnnexinA1蛋白的C端结构域具有结合 $\text{Ca}^{2+}$ 和磷脂的功能, 而N端具有与SH2(Scr homology 2)识别结构域序列相似的区域, 因此, AnnexinA1可以与那些含有SH2结构域的蛋白质形成蛋白复合体, 参与细胞间信号传递<sup>[14]</sup>.

AnnexinA1是细胞增殖、分化和凋亡的调节物. 体内外研究表明AnnexinA1能够抑制细胞生长, 抗增殖, 调节分化, 促进凋亡. AnnexinA1抗增殖作用主要表现在: 通过与不同生长因子蛋白结合, 在丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)信号通路上游影响蛋白质复合物的形成和活性来激活ERK1/2MAPK信号级联反应, 抑制细胞周期蛋白D1(cyclin D1)表达, 从而减少细胞生成<sup>[5,15]</sup>; 作为EGFR型酪氨酸激酶的底物, 能够被磷酸化而参与相应的信号转导, 抑制EGF介导的增殖反应<sup>[14]</sup>. AnnexinA1还能够通过影响细胞凋亡蛋白酶(caspase-3)的活化和 $\text{Ca}^{2+}$ 的释放, 参与激活p38和JNK信号转导, 从而促进细胞凋亡<sup>[16]</sup>. 外源性的AnnexinA1可通过提高胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度和Bcl-2/Bcl-xL相关凋亡促进因子(Bcl-2/Bcl-xL-2-associated death promoter, BAD)的去磷酸化而诱导细胞凋亡<sup>[17]</sup>. 再者, AnnexinA1还可以通过调控PLA2的活性, 抑制具有抗凋亡作用的前列腺素类因子(如PGE2)的产生, 从而促进过氧化氢诱导的细胞凋亡<sup>[14]</sup>.

## 2 AnnexinA1与消化系肿瘤的关系

2.1 食管癌 食管癌是原发于食管的恶性肿瘤, 其组织学分类包括: 鳞癌和腺癌. 临床上以鳞癌多见, 但近数十年腺癌在食管癌中占的比例有所上升. 目前研究报道AnnexinA1在两种组织类型的食管癌中表达情况不同. Wang等<sup>[18]</sup>在对食管及胃-食管交界处的腺癌进行分析发现, AnnexinA1在食管腺癌中高表达, 且其与肿瘤的病理分期、远处转移等密切相关. 即临床分期越高, 伴有远处淋巴结转移的, AnnexinA1的表达水平越高, 肿瘤的复发率越高, 患者的生存率越低. 然而, 研究表明在食管鳞癌中AnnexinA1的表达降低<sup>[19-25]</sup>, 并且从正常食管组织到癌前病变组织以至鳞状细胞癌组织中, AnnexinA1表达呈逐渐降低趋势, 说明其与食管鳞癌的早期癌变相关. 另外, Liu等<sup>[25]</sup>在对食管鳞癌的研究中发现在正常食管鳞状细胞和鳞癌细胞中AnnexinA1的定位明显不同. 在正常食管上皮中其主要定位于质膜并且互相连接形成一个网状结构, 分散表达于细胞质和细胞核, 但是核膜上没有表达, 而在

### ■ 研发前沿

由于分子生物学理论及技术方法的迅速发展, 基因诊断及治疗已成为目前关注的热点. 近年来越来越多的研究表明AnnexinA1参与了组织恶变的过程, 其与肿瘤的发生、发展以及侵袭转移等密切相关, 但确切的作用和分子机制尚不十分清楚, 有待于进一步研究和探索.

### ■ 相关报道

葛慧娟等研究发现AnnexinA1表达水平与结直肠癌的恶性程度及侵袭转移等密切相关, 伴随着细胞转移潜能的提高, AnnexinA1的表达呈上调趋势。崔杰峰等对转移潜能不同的肝癌细胞系进行研究, 发现AnnexinA1在高转移潜能的肝癌细胞系中表达明显上调, 其具有促进肿瘤细胞侵袭转移的作用。

食管鳞癌中其在质膜上的表达急剧下降, 呈现细胞核膜的特异表达, 提示AnnexinA1细胞定位的改变也参与了肿瘤的发生。

**2.2 胃肠癌** 关于AnnexinA1在胃癌中的表达情况存在分歧: 早期报道指出, 正常情况下AnnexinA1在胃肠道腺上皮中不表达或弱表达<sup>[26]</sup>, 在胃癌组织中高表达<sup>[27]</sup>; 而最近一些学者研究得出的结论截然不同, 与AnnexinA1在食管鳞癌中的表达情况类似, 即相对于正常胃黏膜组织, AnnexinA1在胃癌组织中表达下调或者呈现出特异性的核表达, 且其表达水平或亚细胞定位的改变与疾病的分期及远处转移等临床病理参数呈负相关<sup>[28-30]</sup>。

有关AnnexinA1在结直肠癌中的表达情况, 目前研究结果一致表明相对于正常结直肠上皮组织, AnnexinA1在结直肠癌中表达增强<sup>[31,32]</sup>, 且其与肿瘤的恶性程度及侵袭转移等密切相关, 即伴随着细胞转移潜能的提高, AnnexinA1的上调是其表达变化的主要趋势<sup>[33-36]</sup>。周家鹏等<sup>[37]</sup>应用EnVision™二步免疫组织化学法对直肠癌及癌旁组织进行研究, 发现直肠癌中AnnexinA1的表达阳性率明显高于癌旁组织, 阳性表达的癌旁组织均呈中至重度不典型增生; 高分化腺癌、未侵犯浆膜层、未见淋巴结转移及Dukes分期A+B的病例AnnexinA1的表达阳性率明显地低于中+低分化腺癌、侵犯浆膜层、淋巴结转移及Dukes分期C+D的病例, 说明AnnexinA1表达水平可能是反映直肠癌发生、进展、生物学行为及预后的重要生物学标记物。Babbin等<sup>[38]</sup>以高表达AnnexinA1的结直肠癌细胞系SKCO-15为模型, 用siRNA阻断AnnexinA1的表达, 能显著降低SKCO-15细胞的侵袭能力, 应用抗AnnexinA1抗血清也能得到相似的结果, 而在系统中加入重组AnnexinA1和AnnexinA1 N末端肽Ac2-26时, SKCO-15细胞的侵袭能力可增大2倍, 充分证明AnnexinA1具有促进SKCO-15细胞侵袭转移的作用。此外有研究证实人直肠癌细胞的分化程度不仅与AnnexinA1的表达水平有关而且与其亚细胞定位有关<sup>[39]</sup>, 说明AnnexinA1细胞定位的改变也与直肠癌的发生发展相关。

**2.3 肝癌** 原发性肝癌是指由肝细胞或肝内胆管上皮细胞发生的恶性肿瘤, 其死亡率在消化系统恶性肿瘤中仅次于胃癌和食管癌, 是我国常见恶性肿瘤之一。肝癌组织学分型可分为肝细胞型、胆管细胞型、混合型。越来越多的研究

证实AnnexinA1与肝癌的发生发展、浸润转移相关。AnnexinA1在正常肝组织和慢性肝炎组织中表达很少, 在肝细胞癌及癌旁组织中则过表达, 且癌组织比癌旁组织表达更强, 其主要表达在分化较差的癌细胞中, 表明AnnexinA1在肝细胞恶变过程中起重要作用并与肿瘤细胞分化程度有关<sup>[40]</sup>。此外, 对转移潜能不同的肝癌细胞系进行研究显示AnnexinA1在高转移潜能的肝细胞癌中表达明显上调, 提示其在肝癌细胞侵袭转移过程中发挥重要作用<sup>[41,42]</sup>。de Coupade等<sup>[43]</sup>用转肝癌基因的小鼠研究AnnexinA1与肝再生及恶变的关系, 结果与上述一致, 也发现正常小鼠分离的肝细胞不表达AnnexinA1, 而转肝癌基因的小鼠肝细胞在肝癌发展过程中强表达, 且进一步将转基因小鼠的肝细胞稳定转染AnnexinA1反义DNA后可抑制细胞增殖。另有对胆管癌的研究结果显示, AnnexinA1在肝内胆管癌中的表达也明显高于正常肝组织<sup>[44]</sup>, 但在肝门部胆管癌中表达下调<sup>[45]</sup>。

**2.4 胰腺癌** 正常情况下AnnexinA1在胰腺外分泌腺上皮中不表达或弱表达, 而在胰腺癌中呈现高表达。Bai等<sup>[46]</sup>运用Western blot和免疫组织化学方法对13例胰腺导管腺癌, 42例胰腺癌, 38例正常胰腺组织进行分析发现, 84.6%(11/13)胰腺导管腺癌组织中AnnexinA1明显高表达, 71.4%(30/42)胰腺癌组织中AnnexinA1明显高表达, 而正常胰腺组织中AnnexinA1阳性表达率为18.4%(7/38), 说明AnnexinA1过表达是胰腺癌的生物标记。另外有研究表明AnnexinA1在胰腺癌的发展过程中起到了调控肿瘤细胞周期、促进肿瘤细胞生长增殖和抑制凋亡的重要作用。敲除AnnexinA1基因, 胰腺癌细胞形态会发生显著的变化, 呈现多形性、空泡样变性以及脂滴形成等, G<sub>1</sub>期也明显延长, 出现明显的凋亡<sup>[47]</sup>。此外, 倪晓光等<sup>[48,49]</sup>对AnnexinA1在胰腺癌中的表达及其与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和细胞核相关抗原Ki67(反应肿瘤增殖的标志物)的相关性进行了研究, 结果显示在胰腺癌组织中(尤其是低分化和转移性胰腺导管腺癌中)AnnexinA1与PCNA及Ki67的表达存在明显的正相关, 提示增殖能力强和恶性程度高的胰腺癌细胞中AnnexinA1的表达明显增强。

**2.5 胆囊癌** 实验证实胆囊癌的发生发展亦与AnnexinA1的异常表达相关。胆囊腺癌组织中AnnexinA1的阳性表达率及其评分均高于癌旁

组织、胆囊腺瘤性息肉组织和慢性胆囊炎组织, 且与肿瘤的临床病理特征有一定的相关性. 高分化腺癌、肿瘤最大径 $<2$  cm、淋巴结未转移及未侵犯周围组织的胆囊腺癌患者AnnexinA1的阳性表达率, 均明显低于中或低分化腺癌、肿瘤最大径 $\geq 2$  cm、有淋巴结转移及侵犯周围组织者<sup>[50]</sup>.

总之, 在正常情况下, AnnexinA1的表达具有组织特异性, 似乎在食管鳞状上皮细胞中高表达, 而在肝细胞、胰腺外分泌腺及胃肠道腺上皮中不表达或弱表达. 在不同消化系肿瘤中AnnexinA1的表达亦存在差异性, 在肝癌、胰腺癌、结直肠癌、食管腺癌及胆囊癌中AnnexinA1表达上调, 而在食管鳞癌中表达下调. 两者比较可发现AnnexinA1表达程度高的组织发生恶变后其表达呈现不同程度的降低或缺失, 而通常不表达或表达极低的组织恶变后AnnexinA1的表达却呈现出增加的趋势. 这提示AnnexinA1的组织分布差异可能与不同组织恶变过程中AnnexinA1的表达差异有关, 也说明不同肿瘤组织中AnnexinA1表达量的上调或下调与肿瘤的发生密切相关. 另外, 在一些消化系肿瘤中, AnnexinA1呈现出特异性核表达, 说明AnnexinA1细胞定位的改变也是其导致肿瘤发生的原因之一. 再者, AnnexinA1的表达情况与组织分化、淋巴结转移等临床病理特征存在相关性, 可判断疾病的预后. 在AnnexinA1表达明显增强的肿瘤组织中, AnnexinA1表达水平与临床病理因素呈正相关, 即其表达越高组织分化越差, 临床分期越高, 侵袭能力越强, 越易发生转移. 相反, 在AnnexinA1表达减低的肿瘤组织中, AnnexinA1高表达者多分化好, 侵袭能力弱, 不易发生转移, 预后较好.

### 3 结论

不同肿瘤组织中AnnexinA1表达的变化趋势不一致, 说明其在不同来源的肿瘤发生过程中发挥作用的方式及调控机制可能不同, 目前确切的作用和分子机制尚不十分清楚, AnnexinA1在消化系各肿瘤细胞中表达量及亚细胞定位的改变可能与其在肿瘤中受到表观遗传修饰、基因突变或缺失等机制的调控有关. 随着基因技术的推进, 人们将进一步揭示AnnexinA1与肿瘤发展进程的相关性, 进一步探索和拓展其在肿瘤的发生、浸润、转移过程中的具体作用机制. AnnexinA1作为一种特殊的多能分子, 在肿瘤中

的表达特异性使其有望成为肿瘤早期诊断和肿瘤患者预后的标志物. 鉴于AnnexinA1在机体不同组织部位所发挥的生物学功能, 他有被开发为基因治疗靶点的潜在价值, 调控其表达或其介导的信号转导通路将有可能成为抗肿瘤新途径.

### 4 参考文献

- 1 Fatimathas L, Moss SE. Annexins as disease modifiers. *Histol Histopathol* 2010; 25: 527-532
- 2 Monastyrskaya K, Babychuk EB, Draeger A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2623-2642
- 3 Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002; 82: 331-371
- 4 Rescher U, Gerke V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 2004; 117: 2631-2639
- 5 Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res* 2004; 53: 125-132
- 6 Sawmynaden P, Perretti M. Glucocorticoid upregulation of the annexin-A1 receptor in leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 1351-1355
- 7 Gastardelo TS, Damazo AS, Dalli J, Flower RJ, Perretti M, Oliani SM. Functional and ultrastructural analysis of annexin A1 and its receptor in extravasating neutrophils during acute inflammation. *Am J Pathol* 2009; 174: 177-183
- 8 Perretti M, Chiang N, La M, Fierro IM, Marullo S, Getting SJ, Solito E, Serhan CN. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. *Nat Med* 2002; 8: 1296-1302
- 9 Solito E, Romero IA, Marullo S, Russo-Marie F, Weksler BB. Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. *J Immunol* 2000; 165: 1573-1581
- 10 Araujo LP, Truzzi RR, Mendes GE, Luz MA, Burdmann EA, Oliani SM. Interaction of the anti-inflammatory annexin A1 protein and tacrolimus immunosuppressant in the renal function of rats. *Am J Nephrol* 2010; 31: 527-533
- 11 D'Acquisto F. On the adaptive nature of annexin-A1. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 521-528
- 12 Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 62-70
- 13 Futter CE, Felder S, Schlessinger J, Ullrich A, Hopkins CR. Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 1993; 120: 77-83
- 14 Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J* 2007; 21: 968-975
- 15 Alldridge LC, Bryant CE. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. *Exp Cell Res* 2003; 290: 93-107
- 16 Hsiang CH, Tunoda T, Whang YE, Tyson DR, Ornstein DK. The impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction

### ■创新盘点

本文创新性地综述了AnnexinA1的生物学特性及其在消化系肿瘤发生发展以及浸润转移中所发挥的作用, 为消化系肿瘤早期诊断及治疗提供了新的思路. AnnexinA1有被开发为基因治疗靶点的潜在价值, 调控其表达或其介导的信号转导通路将有可能成为抗肿瘤新途径.

### ■同行评价

本文选题很好,符合当前的研究热点,目的明确,能较好地反映相关领域基础和临床研究的先进水平。

- pathways in prostate cancer cells. *Prostate* 2006; 66: 1413-1424
- 17 Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S, Perretti M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J* 2003; 17: 1544-1546
- 18 Wang KL, Wu TT, Resetkova E, Wang H, Correa AM, Hofstetter WL, Swisher SG, Ajani JA, Rashid A, Hamilton SR, Albarracin CT. Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4598-4604
- 19 Xia SH, Hu LP, Hu H, Ying WT, Xu X, Cai Y, Han YL, Chen BS, Wei F, Qian XH, Cai YY, Shen Y, Wu M, Wang MR. Three isoforms of annexin I are preferentially expressed in normal esophageal epithelia but down-regulated in esophageal squamous cell carcinomas. *Oncogene* 2002; 21: 6641-6648
- 20 Zhou G, Li H, DeCamp D, Chen S, Shu H, Gong Y, Flaig M, Gillespie JW, Hu N, Taylor PR, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Petricoin EF, Zhao Y. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 117-124
- 21 Xia SH, Hu H, Hu LP, Xu X, Cai Y, Han YL, Chen BS, Wei F, Ying WT, Qian XH, Cai YY, Shen Y, Wu M, Wang MR. [Analysis of proteins with altered expression in human esophageal squamous cell carcinomas]. *Ai Zheng* 2002; 21: 11-15
- 22 Hu N, Flaig MJ, Su H, Shou JZ, Roth MJ, Li WJ, Wang C, Goldstein AM, Li G, Emmert-Buck MR, Taylor PR. Comprehensive characterization of annexin I alterations in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6013-6022
- 23 Luo A, Kong J, Hu G, Liew CC, Xiong M, Wang X, Ji J, Wang T, Zhi H, Wu M, Liu Z. Discovery of Ca<sup>2+</sup>-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene* 2004; 23: 1291-1299
- 24 谭婉燕,熊枝繁. AnxA1在食管鳞状细胞癌组织中的表达及意义. *胃肠病学和肝病学杂志* 2010; 19: 823-825
- 25 Liu Y, Wang HX, Lu N, Mao YS, Liu F, Wang Y, Zhang HR, Wang K, Wu M, Zhao XH. Translocation of annexin I from cellular membrane to the nuclear membrane in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 645-649
- 26 Dreier R, Schmid KW, Gerke V, Riehemann K. Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 137-148
- 27 Sinha P, Hütter G, Köttgen E, Dietel M, Schaden-dorf D, Lage H. Increased expression of annexin I and thioredoxin detected by two-dimensional gel electrophoresis of drug resistant human stomach cancer cells. *J Biochem Biophys Methods* 1998; 37: 105-116
- 28 Yu G, Wang J, Chen Y, Wang X, Pan J, Li Q, Xie K. Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 695-702
- 29 Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res* 2001; 61: 889-895
- 30 Zhu F, Xu C, Jiang Z, Jin M, Wang L, Zeng S, Teng L, Cao J. Nuclear localization of annexin A1 correlates with advanced disease and peritoneal dissemination in patients with gastric carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; 293: 1310-1314
- 31 Duncan R, Carpenter B, Main LC, Telfer C, Murray GI. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008; 98: 426-433
- 32 Roth U, Razawi H, Hommer J, Engelmann K, Schwientek T, Müller S, Baldus SE, Patsos G, Corfield AP, Paraskeva C, Hanisch FG. Differential expression proteomics of human colorectal cancer based on a syngeneic cellular model for the progression of adenoma to carcinoma. *Proteomics* 2010; 10: 194-202
- 33 Singh P, Wu H, Clark C, Owlia A. Annexin II binds progastrin and gastrin-like peptides, and mediates growth factor effects of autocrine and exogenous gastrins on colon cancer and intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2007; 26: 425-440
- 34 曲利娟,丁彦青,梁莉,余英豪. 利用2-DE和MALDI-TOF-MS在人大肠癌高低转移潜能细胞株中筛选转移相关蛋白. *福州总医院学报* 2008; 5: 365-368
- 35 葛慧娟,杨晓群,余宏宇,何金,刘惠敏. 结直肠癌及其淋巴结转移灶内Annexin I和Annexin II的表达及意义. *第二军医大学学报* 2009; 30: 340-341
- 36 He ZY, Wen H, Shi CB, Wang J. Up-regulation of hnRNP A1, Ezrin, tubulin  $\beta$ -2C and Annexin A1 in sentinel lymph nodes of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4670-4676
- 37 周家鹏,舒国顺,刘栋才,周建平,任峰,袁联文,杨竹林. 直肠癌组织中膜联蛋白A1和A2表达水平及临床病理意义. *医学临床研究* 2010; 27: 1654-1656
- 38 Babbitt BA, Lee WY, Parkos CA, Winfree LM, Akyildiz A, Perretti M, Nusrat A. Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors. *J Biol Chem* 2006; 281: 19588-19599
- 39 Guzmán-Aránguez A, Olmo N, Turnay J, Lecona E, Pérez-Ramos P, López de Silanes I, Lizarbe MA. Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem* 2005; 94: 178-193
- 40 Masaki T, Tokuda M, Ohnishi M, Watanabe S, Fujimura T, Miyamoto K, Itano T, Matsui H, Arima K, Shirai M, Maeba T, Sogawa K, Konishi R, Taniguchi K, Hatanaka Y, Hatase O, Nishioka M. Enhanced expression of the protein kinase substrate annexin in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 24: 72-81
- 41 Dai Z, Liu YK, Cui JF, Shen HL, Chen J, Sun RX, Zhang Y, Zhou XW, Yang PY, Tang ZY. Identification and analysis of altered alpha1,6-fucosylated glycoproteins associated with hepatocellular carcinoma metastasis. *Proteomics* 2006; 6: 5857-5867
- 42 崔杰峰,刘银坤,代智,周海君,宋海燕,张丽君,张予,孙瑞霞,陈洁,汤钊猷. 转移潜能不同人肝癌细胞系差异蛋白Annexin1的功能解析. *生物化学与生物物理进展* 2005; 32: 1141-1149
- 43 de Coupade C, Gillet R, Bennoun M, Briand P, Russo-Marie F, Solito E. Annexin 1 expression and phosphorylation are upregulated during liver regeneration and transformation in antithrombin III SV40 T large antigen transgenic mice. *Hepatology* 2000; 31: 371-380
- 44 Wang AG, Yoon SY, Oh JH, Jeon YJ, Kim M, Kim

- JM, Byun SS, Yang JO, Kim JH, Kim DG, Yeom YI, Yoo HS, Kim YS, Kim NS. Identification of intrahepatic cholangiocarcinoma related genes by comparison with normal liver tissues using expressed sequence tags. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 1022-1032
- 45 Wang D, Zhang H, Fang Z, Yu G. Annexin-1 down-regulation is associated with clinical outcome in Chinese patients with hilar cholangiocarcinoma. *Eur Surg Res* 2010; 45: 151-157
- 46 Bai XF, Ni XG, Zhao P, Liu SM, Wang HX, Guo B, Zhou LP, Liu F, Zhang JS, Wang K, Xie YQ, Shao YF, Zhao XH. Overexpression of annexin 1 in pancreatic cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1466-1470
- 47 刘骞, 王成锋, 周转, 胡海, 赵东兵, 倪晓光, 白晓枫, 高纪东, 田艳涛, 赵平. annexin I基因在胰腺癌中的表达及其对胰腺癌细胞生物学行为的影响. *中华肿瘤杂志* 2007; 29: 738-741
- 48 倪晓光, 白晓枫, 王贵齐, 刘尚梅, 郭冰, 赵平. 膜联蛋白A1和增殖细胞核抗原在胰腺癌组织中的表达及其相互关系. *中国胰腺病杂志* 2010; 10: 326-328
- 49 倪晓光, 白晓枫, 王贵齐, 刘尚梅, 郭冰, 赵平. 膜联蛋白A1和Ki67抗原在胰腺癌组织中的表达及其相互关系. *中国肿瘤* 2010; 19: 549-552
- 50 Yang LP, Yang ZL, Tan XG, Miao XY. [Expression of annexin A1 (ANXA1) and A2 (ANXA2) and its significance in benign and malignant lesions of gallbladder]. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2010; 32: 595-599

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)

# NF- $\kappa$ B和RBP-J $\kappa$ 在大鼠肝再生过程中的作用及苦参碱的调节机制

杨志云, 王莉, 侯艺鑫, 王宪波

## ■背景资料

肝脏受到严重损伤时表现出强大的再生能力, 但机制尚不十分清楚。近年来对中药及其单体在促进肝再生中的作用研究已受到广泛关注。

杨志云, 王宪波, 首都医科大学附属北京地坛医院中西医结合中心 北京市 100015

王莉, 侯艺鑫, 北京中医药大学 北京市 100029

国家自然科学基金资助项目, No. 30873423

作者贡献分布: 此课题由杨志云与王宪波设计; 实验过程由杨志云、王莉及侯艺鑫完成; 数据分析由杨志云与王宪波完成; 本论文写作由杨志云与王宪波完成。

通讯作者: 杨志云, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院中西医结合中心. yangzhiyun6@yahoo.com.cn  
电话: 010-84722313

收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-18

## Matrine promotes hepatic regeneration by negatively regulating the Notch-RBP-J $\kappa$ -NF- $\kappa$ B signal pathway in rats

Zhi-Yun Yang, Li Wang, Yi-Xin Hou, Xian-Bo Wang

Zhi-Yun Yang, Xian-Bo Wang, Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Li Wang, Yi-Xin Hou, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30873423

Correspondence to: Zhi-Yun Yang, Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, 8 East Jingshun Avenue, Chaoyang District, Beijing 100015, China. yangzhiyun6@yahoo.com.cn

Received: 2011-04-27 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-18

## Abstract

**AIM:** To explore the role that NF- $\kappa$ B and RBP-J $\kappa$  play during matrine-promoted hepatic regeneration.

**METHODS:** Sixty SD rats were equally and randomly divided into two groups: model group and matrine group. Both groups of rats underwent 2/3 partial hepatectomy. The matrine group was intragastrically administered with matrine. Hepatic histology, ultramicrostructure and the expression of NF- $\kappa$ B protein and RBP-J $\kappa$  mRNA were evaluated by hematoxylin-eosin staining, transmission electron microscopy, immunohistochemistry and RT-PCR at different time points (1, 3, 7, 14, and 21 d) after operation.

**RESULTS:** The number of oval cells increased on day 1 after operation in the model group, reached the peak on days 7-14, but decreased on days 14-21. Treatment with matrine decreased the number of oval cells. Desmosome junctions were observed in hepatic oval cells by transmission electron microscopy. The expression of NF- $\kappa$ B protein and RBP-J $\kappa$  mRNA reached the peak 14 d after operation in the model group. Treatment with matrine decreased the expression of NF- $\kappa$ B protein and RBP-J $\kappa$  mRNA on day 21.

**CONCLUSION:** Matrine promotes hepatic regeneration by negatively regulating the Notch-RBP-J $\kappa$ -NF- $\kappa$ B signal pathway, inhibiting the proliferation of oval cells, and promoting the differentiation of oval cells.

**Key Words:** Matrine; Hepatic regeneration; Notch-RBP-J $\kappa$ -NF- $\kappa$ B signal pathway

Yang ZY, Wang L, Hou YX, Wang XB. Matrine promotes hepatic regeneration by negatively regulating the Notch-RBP-J $\kappa$ -NF- $\kappa$ B signal pathway in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2166-2170

## 摘要

**目的:** 探讨肝再生过程中NF- $\kappa$ B、RBP-J $\kappa$ 的作用及苦参碱对其调节机制, 揭示苦参碱参与肝再生启动的分子机制。

**方法:** 60只SD大鼠随机分为2组, 每组30只。肝大部分切除组: 建立2/3肝切除模型; 苦参碱/肝大部分切除组: 建立2/3肝切除模型, 同时以苦参碱灌胃。观察点为术后1、3、7、14、21 d, 通过苏木精-伊红染色、透射电镜、免疫组织化学、RT-PCR方法, 在不同时间点检测各实验组肝脏组织学、超微结构、NF- $\kappa$ B蛋白、RBP-J $\kappa$  mRNA的表达。

**结果:** 苏木精-伊红染色可见肝大部分切除组术后第1天出现少量卵圆细胞增生, 7-14 d为高峰, 14-21 d卵圆细胞增生逐渐减少, 部分出现小肝细胞结节。苦参碱/肝大部分切除组卵

## ■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科; 郑素军, 副主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心; 汤朝晖, 副主任医师, 上海交大医学院附属新华医院普外科

圆细胞增生减少. 透射电镜观察到卵圆细胞桥粒连接等特征性结构. 肝大部分切除术后14 d NF- $\kappa$ B蛋白、RBP-J $\kappa$  mRNA为表达高峰, 21 d表达降低. 苦参碱/肝大部分切除组NF- $\kappa$ B蛋白、RBP-J $\kappa$  mRNA表达均较低.

**结论:** 苦参碱通过下调Notch-RBP-J $\kappa$ -NF- $\kappa$ B信号, 抑制卵圆细胞增生, 并促进其向小肝细胞分化参与肝再生启动.

**关键词:** 苦参碱; 肝再生; Notch-RBP-J $\kappa$ -NF- $\kappa$ B信号通路

杨志云, 王莉, 侯艺鑫, 王宪波. NF- $\kappa$ B和RBP-J $\kappa$ 在大鼠肝再生过程中的作用及苦参碱的调节机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2166-2170  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2166.asp>

## 0 引言

大鼠肝组织具有很强的修复及再生能力, 当肝脏受到严重损伤时, 成熟肝细胞增殖受限, 肝干细胞再生是成熟肝细胞增殖的一种补充. 中药诱导干细胞定向分化是近年来一个新兴的研究领域, 中药强调多靶点体系协同作用, 相关诱导机制尚不十分清楚. 苦参碱为豆科植物苦参的主要成分, 具有调节免疫、抗炎、抗病毒、抑制肿瘤细胞生长及诱导肿瘤细胞分化等作用. 本实验观察了在大鼠肝大部分切除后肝再生过程中核转录因子NF- $\kappa$ B、Notch信号途径转录因子RBP-J $\kappa$ 等信号分子的表达, 苦参碱的干预作用, 以期阐明苦参碱参与肝再生的相关作用机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 SPF级 $\delta$  SD大鼠, 周龄6 wk, 体质量120-150 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号SCXK(京)2007-0001. 苦参碱标准品购自中国药品生物制品检定所(批号: 110780-200402). 山羊抗大鼠NF- $\kappa$ B抗体购自Santa Cruz公司. SP免疫组织化学染色试剂盒均购自DaKo试剂公司. RBP-J $\kappa$ 引物由上海生物工程公司合成, RNA提取试剂TRIzol Reagent为Invitrogen公司产品、逆转录酶(M-MLV Reverse Transcriptase)为Promega公司产品, 核糖核酸酶抑制剂(Ribonuclease Inhibitor)、Taq DNA聚合酶(Taq DNA polymerase)、随机引物(Random primers)均为TaKaRa公司产品.

### 1.2 方法

1.2.1 分组及建立2/3肝切除模型: 实验动物饲养于中日友好医院临床研究所国家二级实验动物中心, 饲养环境、实验动物、饲料、饮用水均无菌, 环境温度18 $^{\circ}$ C-24 $^{\circ}$ C, 湿度40%-60%. 60只SD大鼠随机分为2组, 每组30只. 肝大部分切除组: 建立2/3肝切除模型; 苦参碱/肝大部分切除组: 建立2/3肝切除模型, 同时以苦参碱用生理盐水配成2.5 g/L浓度, 按10 mL/kg灌胃. 建立2/3肝切除模型: 1%戊巴比妥麻醉后开腹, 游离肝左叶、中叶、尾状叶, 从根部结扎, 剪断游离端, 留下右叶及三角叶, 止血, 缝合切口. 分别于手术后第1、3、7、14、21天处死大鼠, 取肝组织进行检测.

1.2.2 苏木素-伊红染色: 石蜡切片二甲苯脱蜡, 600-1 000 mL/L乙醇依次脱苯, 苏木素浸泡5 min, 蒸馏水冲洗, 浸1%盐酸酒精、1%氨水各1-2S'伊红浸泡5 min, 蒸馏水冲洗3-4次, 700、800、900 mL/L乙醇各脱水1次, 1 000 mL/L乙醇脱水2次, 二甲苯透明, 中性树脂封片.

1.2.3 透射电镜观察肝再生细胞超微结构: 肝组织先经包埋剂环氧树脂Epon618和纯丙酮1:1浸透1 h, 3:1浸透过夜, 纯包埋剂浸透5 h以上后包埋, 聚合固化, 染色观察.

1.2.4 免疫组织化学观察NF- $\kappa$ B蛋白表达: 蜡块组织切片高温高压热修复2 min, 待冷却后, 自来水洗2遍, 蒸馏水洗1遍, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中浸泡10 min, 消灭内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗1遍, PBS浸泡5 min, 晾干, 放入湿盒中, 滴加50  $\mu$ L封闭血清, 室温孵育50 min, 甩掉血清, 加50  $\mu$ L一抗山羊抗大鼠NF- $\kappa$ B(1:200)多克隆抗体37 $^{\circ}$ C孵育40 min, PBS洗3 $\times$ 5 min, 加50  $\mu$ L生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育40 min, PBS洗3 $\times$ 5 min, 50  $\mu$ L链亲和素-过氧化物酶溶液, 37 $^{\circ}$ C, 15 min, PBS洗3 $\times$ 5 min, 加入100  $\mu$ L新配制的DAB溶液, 显色5-10 min; 自来水冲洗, 苏木素复染30 s, 梯度脱水, 中性树脂封片, 显微镜下观察, 细胞质胞膜染成棕色为阳性. 彩色图文分析系统对染色阳性部位灰度值进行定量分析.

1.2.5 RT-PCR检测RBP-J $\kappa$  mRNA表达: 按试剂盒说明提取肝组织总RNA、反转成cDNA、PCR扩增. RBP-J $\kappa$ 的PCR引物为: 5'-CCA ATT TCA GGC CAC TCC A-3'(上游), 5'-CTC TAC ATC CCC AAA CCA CAC TC-3'(下游), 以 $\beta$ -actin为内参. 扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶(含EB)上电泳, 用凝胶图像分析系统(Gel-Pro Analyzer Version 3.0)进行吸光度半定量分析.

## ■ 研究前沿

RBP-J $\kappa$ 是Notch信号通路的重要调控分子, 该通路途径与肝干细胞增殖分化的关系备受学者关注, 但上述两者在肝再生修复中的作用机制尚缺乏报道.

### ■相关报道

有研究表明,在应激及炎症状态下,核转录因子NF- $\kappa$ B激活后调控基因的表达特别是TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ ,是引起肝细胞炎症性凋亡的两个重要因素.

表 1 各组大鼠再生肝组织不同时间点NF- $\kappa$ B表达的灰度值比较 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD)

时间(d)	肝大部分切除组	苦参碱/肝大部分切除组
1	79.92 $\pm$ 7.32	78.02 $\pm$ 6.51
3	85.51 $\pm$ 9.86	81.37 $\pm$ 9.03
7	106.64 $\pm$ 13.24 <sup>b</sup>	93.18 $\pm$ 4.17 <sup>bd</sup>
14	131.81 $\pm$ 16.33 <sup>b</sup>	117.86 $\pm$ 14.42 <sup>bd</sup>
21	118.22 $\pm$ 11.37 <sup>b</sup>	102.50 $\pm$ 12.63 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 1, 3 d; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 肝大部分切除组.

**统计学处理** 应用SPSS13.0统计软件进行统计学分析,组间比较采用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异显著意义.

## 2 结果

**2.1 肝组织病理变化** 肝大部分切除组:术后第1天可见少量卵圆细胞沿小胆管周围增生,卵圆细胞体积约为成熟肝细胞的1/2,核较大,胞质少,核质比高.10-14 d为卵圆细胞大量增生的高峰,以汇管区为中心向肝小叶内伸展,至21 d卵圆细胞增生逐渐减少.苦参碱/肝大部分切除组:可见在多个实验观察点卵圆细胞增生较肝大部分切除组均减少,尤其以14 d观察点更明显.

**2.2 透射电镜结果** 再生肝组织中卵圆细胞超微结构提示:直径约6-10  $\mu$ m,核较大,线粒体、内质网等细胞器较少,胞质内可见张力微丝(图1),细胞间有桥粒连接,以上两点被认为是卵圆细胞的特征性结构.

**2.3 再生肝组织NF- $\kappa$ B的蛋白表达** 肝大部分切除组再生肝组织中术后第3天可见NF- $\kappa$ B蛋白以汇管区周围高表达,逐渐向肝小叶内延伸,为胞浆和胞膜着色.观察术后1、3、7、14、21 d,14 d为表达高峰,与术后3 d相比汇管区周围表达渐减少,再生肝小叶内表达渐增多,21 d表达渐减少.苦参碱/肝大部分切除组NF- $\kappa$ B蛋白各时间点观察较肝大部分切除组均低(表1).

**2.4 再生肝组织RBP-J $\kappa$  mRNA表达** 肝大部分切除组再生肝组织各时间点均有RBP-J $\kappa$  mRNA表达,术后14 d为表达高峰,21 d表达减少,苦参碱/肝大部分切除组各时间点RBP-J $\kappa$  mRNA表达较肝大部分切除组低(图2).

## 3 讨论

肝再生是指肝脏受到病毒、化学物质、手术等作用,导致肝脏功能严重受损,肝脏表现出强大

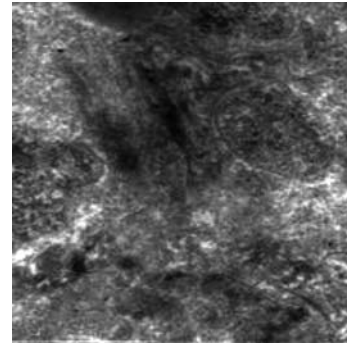


图 1 透射电镜示肝卵圆细胞内张力微丝( $\times 8000$ ).

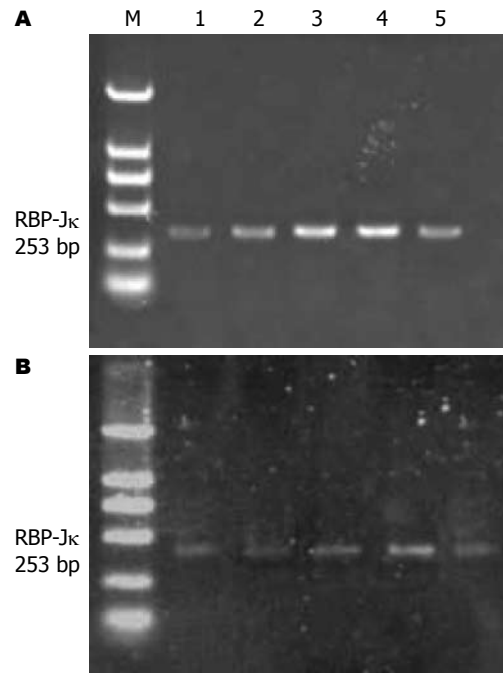


图 2 2组大鼠各时间点再生肝组织RBP-J $\kappa$  mRNA表达. A: 肝大部分切除组; B: 苦参碱/肝大部分切除组; M: Marker; 1: 术后1 d; 2: 术后3 d; 3: 术后7 d; 4: 术后14 d; 5: 术后21 d.

的自我修复能力,肝细胞大量增殖实现肝组织补偿.在肝再生的启动、进展、终止3个阶段中有2类细胞参与:一类是成熟肝细胞通过有丝分裂进行肝细胞再生;另一类是肝内干细胞可分化为前体肝细胞,参与细胞更新.苦参碱是临床治疗各种急慢性肝病的常用药物,其具有抗炎、抗病毒、抗纤维化等多种临床疗效.本课题组在前期工作基础上,建立2/3肝切除模型,研究苦参碱对肝再生及修复的作用机制.

肝大部分切除模型中术后第1天即可见少量卵圆细胞在小胆管周围增生,核较大,胞质少,体积为成熟肝细胞的1/2;14 d为增生高峰,向肝小叶内延伸;21 d增生减少.经苦参碱干预后,各时间点卵圆细胞增殖均较模型组少,初步提示苦参碱在一定程度上抑制卵圆细胞增生.通过透射电镜观察卵圆细胞的超微结构提示:细

胞内线粒体、内质网等细胞器较成熟肝细胞少, 并见到胞质内张力微丝及细胞与细胞之间的桥粒连接, 被认为是卵圆细胞的特有结构<sup>[1]</sup>.

NF- $\kappa$ B蛋白是进化上高度保守的一种免疫反应介质, 病毒、氧化剂、炎症细胞因子等均可激活该转录因子, 从而参与细胞的生长、分化、发育、凋亡、黏附及炎症反应<sup>[2-4]</sup>. 有研究表明, 在应激及炎症状态下, 核转录因子NF- $\kappa$ B激活后调控基因的表达特别是TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ , 是引起肝细胞炎症性凋亡的2个重要因素<sup>[5-7]</sup>. 有人发现NF- $\kappa$ B的持续激活在肝细胞发生癌变中发挥重要作用<sup>[8]</sup>. 本实验中观察到肝大部分切除模型大鼠再生肝组织中有NF- $\kappa$ B蛋白表达, 术后14 d为表达高峰, 21 d表达下降. 苦参碱干预后NF- $\kappa$ B表达均减少. 提示苦参碱通过降低NF- $\kappa$ B的活性来减轻炎症反应引起的肝损伤.

RBP-J $\kappa$ 是Notch信号通路的重要调控分子. Notch/Delta信号通路是一条在胚胎发育中起调控作用的保守通路. 近年来, 该通号途径与肝干细胞增殖分化的关系备受学者关注<sup>[2,9,10]</sup>. RBP-J $\kappa$ 是一种DNA结合蛋白, 其一方面与Notch受体细胞内特定结构域结合, 另一方面与核内特定的DNA序列结合, 而该序列位于Notch诱导基因的启动子上, 从而激活转录过程<sup>[6]</sup>. 本实验结果显示肝大部分切除模型大鼠再生肝组织中有RBP-J $\kappa$  mRNA表达, 术后14 d为表达高峰, 21 d表达下降. 苦参碱干预后RBP-J $\kappa$  mRNA表达均减少. 提示苦参碱通过下调RBP-J $\kappa$  mRNA从而抑制Notch信号通路激活参与肝损伤修复的. 有证据表明NF- $\kappa$ B家族是Notch信号通路的目的基因之一, Notch可通过蛋白-蛋白之间作用和基因转录水平调节靶基因NF- $\kappa$ B的表达<sup>[11-14]</sup>. 本实验证实了上述理论, 苦参碱可同时下调Notch信号通路关键分子RBP-J $\kappa$ 及NF- $\kappa$ B, 我们推测苦参碱参与肝再生作用机制可能为抑制Notch-RBP-J $\kappa$ 信号通路激活减轻NF- $\kappa$ B引起的炎症反应.

总之, 本实验成功复制了肝大部分切除致肝损伤模型, 观察到肝损伤后再生过程中卵圆细胞的增殖及其超微结构, 并证实苦参碱在肝损伤修复中抑制卵圆细胞增殖, 同时抑制Notch-RBP-J $\kappa$ 信号通路激活减轻NF- $\kappa$ B引起再生肝组织的炎症反应, 即从而揭示了苦参碱参与肝再生的部分作用机制, 这为探讨

肝损伤的修复机制及中医药治疗提供了有益的思路.

#### 4 参考文献

- 1 De Vos R, Desmet V. Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction. *Am J Pathol* 1992; 140: 1441-1450
- 2 Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 320-328
- 3 Schmid JA, Birbach A. IkappaB kinase beta (IKK-beta/IKK2/IKBKB)--a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 157-165
- 4 Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1647-1653
- 5 Spahr L, Giostra E, Frossard JL, Bresson-Hadni S, Rubbia-Brandt L, Hadengue A. Soluble TNF-R1, but not tumor necrosis factor alpha, predicts the 3-month mortality in patients with alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2004; 41: 229-234
- 6 Trinh DV, Zhu N, Farhang G, Kim BJ, Huxford T. The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA. *J Mol Biol* 2008; 379: 122-135
- 7 Williams LM, Lali F, Willetts K, Balague C, Godesart N, Brennan F, Feldmann M, Foxwell BM. Rac mediates TNF-induced cytokine production via modulation of NF-kappaB. *Mol Immunol* 2008; 45: 2446-2454
- 8 Qiao L, Zhang H, Yu J, Francisco R, Dent P, Ebert MP, Röcken C, Farrell G. Constitutive activation of NF-kappaB in human hepatocellular carcinoma: evidence of a cytoprotective role. *Hum Gene Ther* 2006; 17: 280-290
- 9 Fre S, Pallavi SK, Huyghe M, Laé M, Janssen KP, Robine S, Artavanis-Tsakonas S, Louvard D. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 6309-6314
- 10 Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, Robert-Moreno A, Fernández-Majada V, Grilli A, López-Bigas N, Bellora N, Albà MM, Torres F, Duñach M, Sanjuan X, Gonzalez S, Gridley T, Capella G, Bigas A, Espinosa L. Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 6315-6320
- 11 Oswald F, Liptay S, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2077-2088
- 12 Shimizu T, Kagawa T, Inoue T, Nonaka A, Takada S, Aburatani H, Taga T. Stabilized beta-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 7427-7441
- 13 Schouwey K, Larue L, Radtke F, Delmas V, Beer-mann F. Transgenic expression of Notch in melanocytes demonstrates RBP-Jkappa-dependent signaling. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23:

#### ■应用要点

本研究观察到苦参碱在肝损伤修复中抑制卵圆细胞增殖, 同时抑制Notch-RBP-J $\kappa$ 信号通路激活, 减轻NF- $\kappa$ B引起再生肝组织的炎症反应, 即从而揭示了苦参碱参与肝再生的部分作用机制, 这为探讨肝损伤的修复机制及中医药治疗提供了有益的思路.

### ■同行评价

本文创新性较好, 有一定的科学价值, 对于了解苦参碱对肝再生的作用, 有一定意义.

134-136  
14 Souilho C, Cormier S, Tanigaki K, Babinet C, Cohen-Tannoudji M. RBP-Jkappa-dependent

notch signaling is dispensable for mouse early embryonic development. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 4769-4774

编辑 李军亮 电编 何基才

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

### • 消息 •

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

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

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

(总编辑: 马连生2011-05-30)

# COX-2与GCS在胃癌组织中的表达及意义

王俊先, 张开光, 李 诚, 李祥春, 王晓秋, 丁 敏

王俊先, 李诚, 安徽省立友谊医院消化内科 安徽省合肥市 230041  
张开光, 李祥春, 安徽医科大学附属省立医院消化内科 安徽省合肥市 230001  
王晓秋, 丁敏, 安徽医科大学附属省立医院病理科 安徽省合肥市 230001  
作者贡献分布: 本课题思路由张开光与王俊先设计; 实验过程由王俊先、李祥春及王晓秋完成; 数据收集由丁敏与王俊先完成; 论文写作由王俊先、李诚、张开光、李祥春、王晓秋及丁敏共同完成。  
通讯作者: 王俊先, 230041, 安徽省合肥市北二环汤山路1868号, 安徽省立友谊医院消化内科. ahwjx168@sina.com  
收稿日期: 2011-05-08 修回日期: 2011-06-21  
接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-18

## Significance of expression of COX-2 and GCS in gastric cancer

Jun-Xian Wang, Kai-Guang Zhang, Chen Li, Xiang-Chun Li, Xiao-Qiu Wang, Min Ding

Jun-Xian Wang, Chen Li, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Friendship Hospital, Hefei 230001, Anhui Province, China  
Kai-Guang Zhang, Xiang-Chun Li, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China  
Xiao-Qiu Wang, Min Ding, Department of Pathology, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China  
Correspondence to: Jun-Xian Wang, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial Friendship Hospital, 1868 Dangshan Road, North Erhuan, Hefei 230041, Anhui Province, China. ahwjx168@sina.com  
Received: 2011-05-08 Revised: 2011-06-21  
Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and glucosylceramide synthase (GCS) in gastric cancer and to analyze their clinical significance.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to investigate the expression of COX-2 and GCS in 63 cases of gastric cancer tissues and 30 cases of non-gastric cancer tissues. The correlation of COX-2 and GCS expression with patient's age, sex, tumor histological type, differentiation, and lymph node metastasis was analyzed.

**RESULTS:** The positive rate of COX-2 expres-

sion in gastric cancer was higher than that in non-cancerous tissue (87.3% vs 36.7%,  $P < 0.05$ ). The positive rate of GCS expression in gastric cancer was also higher than that in non-cancerous tissue (49.2% vs 23.3%,  $P < 0.05$ ). Neither COX-2 nor GCS expression was related with age, sex, tumor differentiation, depth of invasion or histological type (all  $P > 0.05$ ). The positive rate of COX-2 in patients with lymph node metastasis was significantly higher than that in patients without lymph node metastasis (100% vs 69.2%,  $P < 0.05$ ), whereas the positive rate of GST- $\pi$  was not related with lymph node metastasis ( $P > 0.05$ ). There is a significant correlation between the expression of COX-2 and that of GST- $\pi$  in gastric cancer ( $r = 0.724, P = 0.004$ ).

**CONCLUSION:** GCS is highly expressed in gastric cancer and may be involved in tumor drug resistance. COX-2 may mediate drug resistance by influencing the expression of GCS in gastric cancer.

**Key Words:** Cyclooxygenase-2; Glucosylceramide synthase; Gastric carcinoma; Multidrug resistance; Correlation

Wang JX, Zhang KG, Li C, Li XC, Wang XQ, Ding M. Significance of expression of COX-2 and GCS in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2171-2175

## 摘要

**目的:** 研究环氧合酶2(COX-2)与多药耐药基因葡萄糖神经酰胺合成酶(GCS)在胃癌组织中的表达及其相关性, 初步探讨COX-2参与胃癌多药耐药的可能机制。

**方法:** 采用免疫组织化学法对经手术切除的63例胃癌组织标本及30例非癌性胃组织标本中COX-2及GCS的表达情况进行研究, 并且对COX-2与GCS在胃癌组织中的表达进行相关性分析。

**结果:** COX-2、GCS在胃癌组织中的阳性表达均高于非癌性胃组织(87.3% vs 36.7%; 49.2% vs 23.3%, 均 $P < 0.05$ )。在有淋巴结转移的胃癌组织中COX-2阳性表达率高于无淋巴结转移

## ■背景资料

环氧合酶-2 (COX-2)与肿瘤的发生发展有密切的关系, 同时也被证明参与肿瘤耐药的发生, 可以调节多种耐药基因的表达, 选择性COX-2抑制剂已被证明可以降低某些耐药基因的表达。

## ■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁集团有限责任公司总医院 消化内科

## ■研究前沿

实验证实COX-2可以影响肿瘤耐药基因的表达,进而影响肿瘤对化疗药物的敏感性,围绕COX-2对肿瘤耐药基因表达的影响机制及以COX-2为靶点减低或逆转肿瘤耐药成为目前医学科研的一个热点。

的胃癌组织(100% vs 69.2%,  $P < 0.05$ ),在不同年龄、性别、不同分化程度、不同的癌肿浸润深度中COX-2的阳性表达率无明显差异;GCS在胃癌组织中的阳性表达率与有无淋巴结转移、年龄、性别、分化程度、不同的侵犯深度等均无明显关系。在胃癌组织中,COX-2与GCS的表达正相关( $r = 0.724$ ,  $P = 0.004$ )。

**结论:** GCS在胃癌组织中存在高表达,可能是引起胃癌原发性多药耐药的耐药基因之一;在胃癌组织中,COX-2与GCS的表达存在正相关,COX-2介导胃癌耐药可能与影响GCS在胃癌组织中的表达有关。

**关键词:** 环氧合酶-2; 葡萄糖神经酰胺合成酶胃癌; 胃癌; 多药耐药; 相关性

王俊先, 张开光, 李诚, 李祥春, 王晓秋, 丁敏. COX-2与GCS在胃癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2171-2175  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2171.asp>

## 0 引言

化疗是综合治疗胃癌的重要手段,但肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)限制了化疗药物的进一步应用。研究MDR的发生及影响机制,对指导临床合理化疗有重要的意义。MDR的产生机制较为复杂,其中耐药基因的激活与表达增加,被认为是MDR的主要原因。葡萄糖神经酰胺合成酶(glucosylceramide synthase, GCS)是近年来发现的一种重要的MOR基因,在恶性肿瘤组织或细胞株中有较高表达,被认为是引起肿瘤MOR的重要基因之一<sup>[1-3]</sup>。有研究表明,COX-2参与肿瘤MOR的发生<sup>[4]</sup>,而选择性COX-2抑制剂可以增加肿瘤对化疗药物的敏感性<sup>[5]</sup>,其具体机制尚不清楚,围绕以COX-2为靶点逆转肿瘤耐药成为目前这一领域的研究热点。本试验对COX-2及多药耐药基因GCS在胃癌组织中的表达进行研究,同时对他们在胃癌组织中的表达进行相关性分析。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2008-06-10在安徽省立医院外科手术切除并被病理证实为腺癌的胃癌组织标本63例,所有标本来源患者术前均未接受任何形式的抗肿瘤治疗。其中男47例,女16例;患者年龄26-79(平均年龄59)岁,其中 $\geq 55$ 岁者44例, $< 55$ 岁者19例;高、中分化腺癌25例,低分化腺癌38

例;伴有淋巴结转移者37例,无淋巴结转移者26例。癌肿仅限于黏膜及黏膜下(早期胃癌)者14例,侵犯肌层者9例,侵及全层或侵及浆膜外者40例。同时收集同期手术切除并被病理证实为非癌性胃组织标本30例为对照组,胃癌组与非胃癌组标本来源患者在年龄、性别、用药等可能影响试验观察结果的情况没有明显差异,以保证资料的可比性。即用型COX-2单克隆一抗,即用型二抗试剂盒PV-6000, DAB显色剂等试剂均购自北京中杉金桥生物有限公司;GCS多克隆一抗原液(粉针剂,使用时临时配制,本试验所用浓度为1:200),购自北京博奥森生物科技有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学法检测COX-2和GCS在胃癌组织和非癌性胃组织中的表达:** 所有标本经标本均用40 g/L的中性甲醛固定,石蜡包埋,4  $\mu\text{m}$ 连续切片,每份标本切3张,1张行HE染色,另2张行免疫组织化学染色,试验步骤严格按照试剂说明书提供的操作步骤进行。以PBS代替一抗作阴性对照,以已知阳性表达的胃组织标本作为阳性对照。

**1.2.2 结果判断:** COX-2和GCS均为胞质表达为主。试验采用的评分标准如下<sup>[6]</sup>:以胞质表达颗粒的着色深浅及着色的阳性细胞数进行评分:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。无细胞着色为0分,着色细胞 $< 10\%$ 为1分,10-25%为1分,25-50%为2分,50-75%为3分, $> 75\%$ 为4分。以二者的分值得积作为最终评分数值。 $\leq 3$ 分者为阴性,4-6分为+,7-9为++,9-12为+++ (以上由两位病理科医生盲法操作);另外用显微照相机将所有免疫组织化学玻片在相同的工作条件下一次性进行拍摄,所有照片均保存为TIFF格式,用Image-pro plus(IPP)6.0图像分析软件,采用积分吸光度(integrated absorbance, IA)对所拍照片阳性部位进行图像分析,收集图像数据。

**统计学处理** 用SPSS13.0软件进行统计学分析,胃癌组与对照组中COX-2与GCS阳性表达率的差异,采用卡方检验进行分析;胃癌组织中COX-2与GCS之间表达的相关性用两变量(IA值)相关性进行分析。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 COX-2、GCS在胃癌组织中的表达** COX-2及GCS在胃癌组织中的阳性表达率均高于非癌性胃组织(87.3% vs 36.7%, 49.2% vs 23.3%, 均

## ■相关报道

Senzaki等报道COX-2可增加肿瘤对化疗药物的敏感性,但未对其机制进行进一步阐述,有报道称COX-2选择性抑制剂可以增加降低肿瘤组织中经典耐药蛋白P-gp的表达,关于COX-2与GCS在胃癌组织中的关系未见相关报道。

表 1 COX-2、GCS在胃癌及非癌性胃组织中的表达

组织	n	COX-2(n)		$\chi^2$ 值	P值	GCS(n)		$\chi^2$ 值	P值
		+	-			+	-		
胃癌	63	55	8	25.289	0.000	31	32	5.930	0.023
非胃癌	30	11	19			7	23		

表 2 COX-2、GST- $\pi$ 在胃癌组织中的表达 (n)

	n	COX-2				GCS			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
年龄(岁)									
≥55	44	6	14	16	8	23	15	6	0
<55	19	2	9	4	4	9	8	1	1
性别									
男	47	6	19	13	9	24	18	5	0
女	16	2	4	7	3	8	5	2	1
分化程度									
高中分化腺癌	25	1	9	12	3	12	10	2	1
低分化腺癌	38	7	14	8	9	20	13	5	0
浸润深度									
黏膜及黏膜下层	14	1	7	4	2	6	5	2	1
肌层	9	1	3	4	1	4	5	0	0
全层及浆膜外	40	6	13	12	9	22	13	5	0
淋巴结转移									
有	37	0	12	17	8	19	14	3	1
无	26	8	11	3	4	19	9	4	0

$P < 0.05$ , 表1, 图1). 在有淋巴结转移的胃癌组织中COX-2阳性表达率高于无淋巴结转移的胃癌组织(100% vs 69.2%,  $P < 0.05$ ); GCS在有淋巴结转移的胃癌组织中的阳性表达率无明显差别(48.6% vs 50.0%,  $P > 0.05$ , 图2); COX-2与GCS在胃癌组织中的阳性表达率与年龄、性别、肿瘤的分化程度、胃癌组织侵犯深度等均无明显关系(表2).

2.2 与COX-2与GCS在胃癌组织中的表达相关性  
将同一组织切片的两种蛋白表达的IA值作为配对资料, 用两变量相关性的分析方法, 分析COX-2及GCS在胃癌组织中表达的相关性. 结果显示: 在胃癌组织中, COX-2与GCS的表达存在明显的正相关性( $r = 0.724, P = 0.004$ ).

### 3 讨论

MDR<sup>[7]</sup>是指肿瘤细胞可耐受结构、功能及杀伤机制不同的多种药物的致死量, 一旦肿瘤细胞对某种药物产生耐受, 即可以同时多种作用机制不同的药物产生耐受. 肿瘤细胞在治疗的初始阶段就对多种化疗药物无反应, 称之为原

发性耐药或内在耐药(intrinsic drug resistance); 如果在化疗初期疗效很好, 经过几个疗程后, 肿瘤细胞对所用药物产生了耐药性, 则称之为获得性耐药(acquired drug resistance). 肿瘤多药耐药的产生机制较为复杂, 目前已经证实耐药基因的激活与表达增加肯定与恶性肿瘤包括胃癌的多药耐药性有明显的关系<sup>[8]</sup>.

GCS属于糖基转移酶家族成员, 可以催化尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphoglucose, UDPG)上的葡萄糖基以 $\beta$ 型糖苷键与神经酰胺结合<sup>[9]</sup>, 使神经酰胺糖基化为葡萄糖神经酰胺(glucosylceramide, GlcCer). 神经酰胺是细胞凋亡过程中的重要的第二信使, 可以通过与其下游蛋白激酶如神经酰胺活化蛋白激酶(ceramide-activated protein kinase, CAPK)、Bcl-2、半胱天冬酶(caspases)级联活化等途径参与调节细胞的凋亡<sup>[10,11]</sup>, 许多化疗药物(如阿霉素、长春新碱)等可以使细胞内的神经酰胺水平增高<sup>[12]</sup>. GCS则催化神经酰胺糖基化, 生成GlcCer, 从而抑制细胞凋亡, 进而拮抗化疗药引起的促细胞凋亡作用, 从而使肿瘤产生多药耐药. GCS参与肿瘤

### ■创新盘点

本文首次报道GCS在胃癌组织中的表达, 并对COX-2和GCS在胃癌组织中的表达进行相关性研究, 从分子生物学角度对COX-2介导胃癌耐药的可能机制进行初步探讨.

### ■应用要点

本文对COX-2和GCS在胃癌组织中的相关性表达初步探讨, 为从GCS面上进一步研究COX-2介导胃癌耐药机制和以COX-2为靶点逆转胃癌耐药提供理论依据.

### ■同行评价

本文选题较新颖,可读性和学术性较好,为探讨胃癌的耐药性机制提供了一定的理论依据。

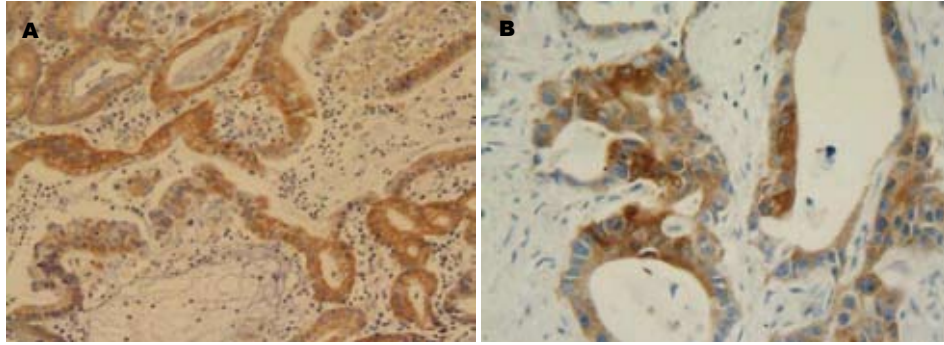


图1 COX-2在胃癌组织中的表达. A: SP × 100; B: SP × 400.

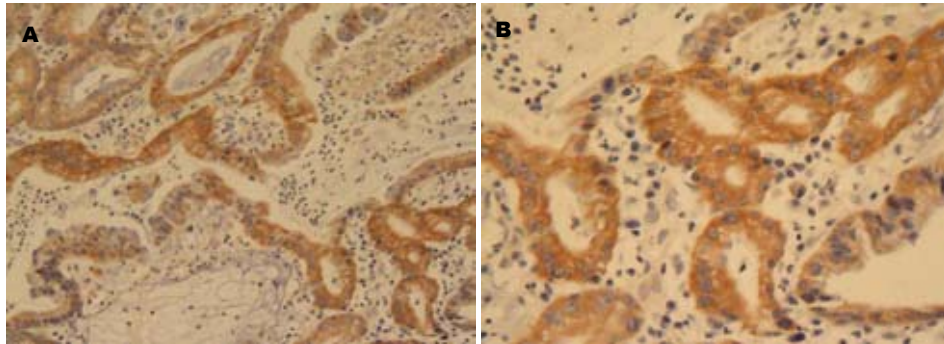


图2 GCS在胃癌组织中的表达. A: SP × 100; B: SP × 400.

多药耐药还可能与其调节经典耐药基因 $p-gp$ 的表达有关<sup>[13,14]</sup>,也可能与调控凋亡基因 $p53$ 及其他与凋亡相关的基因有关<sup>[15,16]</sup>.关于GCS与胃癌多药耐药的研究,现在尚处于初始阶段,到目前为止尚未见GCS在胃癌组织中表达的研究报道,张艳等<sup>[3]</sup>在对耐药胃癌细胞株进行研究时发现,GCS的表达增多,并且认为GCS是引起耐药细胞株耐药的重要基因。

本研究发现,在未经任何治疗胃癌患者的胃癌组织中,其阳性表达也明显高于非胃癌胃组织,并且GCS的阳性表达与患者的年龄、性别、分化程度、临床分期等无明显关系,表明GCS可能是引起胃癌原发性MDR的耐药基因之一,且其介导胃癌MDR可能在胃癌发病时即可伴随出现。

大量研究表明,COX-2是一种诱导性酶,对胃癌的发生与发展起重要作用. COX-2还参与胃癌的多药耐药的产生<sup>[17,18]</sup>. 本研究表明,在胃癌组织中,COX-2存在高表达,并且与淋巴结转移有明显关系,进一步证实COX-2对胃癌发生与发展的作用,同时本研究还发现,COX-2与GCS在胃癌组织中的表达存在正相关,表明COX-2可能对胃癌耐药基因GCS的表达有一定的影响,COX-2介导胃癌耐药可能与影响胃癌组织中GCS的表达有关. COX-2可以促进抗凋亡基因Bcl-2的表达<sup>[19]</sup>,而GCS与Bcl-2也存在一定的联系<sup>[11]</sup>; COX-2参与肿瘤MDR与 $p-gp$ 有关,而

GCS参与肿瘤耐药也与 $p-gp$ 有关<sup>[4]</sup>,是否存在以Bcl-2或 $p-gp$ 为中间环节将COX-2与GCS建立关系的可能,将是我们下一步研究的内容之一。

### 4 参考文献

- 1 Ruckhäberle E, Karn T, Hanker L, Gätje R, Metzler D, Holtrich U, Kaufmann M, Rody A. Prognostic relevance of glucosylceramide synthase (GCS) expression in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 81-90
- 2 Gouazé V, Yu JY, Bleicher RJ, Han TY, Liu YY, Wang H, Gottesman MM, Bitterman A, Giuliano AE, Cabot MC. Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 633-639
- 3 张艳, 刘宗文, 贾丹辉, 乐晓萍, 张钦宪. 葡萄糖神经酰胺合成酶基因在人胃癌细胞SGC-7901及SGC-7901/VCR的表达和意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1008-1011
- 4 Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2002; 277: 38915-38920
- 5 Senzaki M, Ishida S, Yada A, Hanai M, Fujiwara K, Inoue S, Kimura T, Kurakata S. CS-706, a novel cyclooxygenase-2 selective inhibitor, prolonged the survival of tumor-bearing mice when treated alone or in combination with anti-tumor chemotherapeutic agents. *Int J Cancer* 2008; 122: 1384-1390
- 6 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
- 7 Gianni L. Anthracycline resistance: the problem and its current definition. *Semin Oncol* 1997; 24: S10-

- 11-S10-17
- 8 Zhang D, Fan D. Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 1369-1378
- 9 Bleicher RJ, Cabot MC. Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 172-178
- 10 Lin CF, Chen CL, Lin YS. Ceramide in apoptotic signaling and anticancer therapy. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1609-1616
- 11 刘艳, 谢平, 谢可鸣, 白小明, 穆会君, 张滨. GCS通过影响凋亡相关基因致白血病细胞耐药的分子病理机制探讨. *苏州大学学报* 2009; 29: 74-77
- 12 Modrak DE, Gold DV, Goldenberg DM. Sphingolipid targets in cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 200-208
- 13 Chai L, McLaren RP, Byrne A, Chuang WL, Huang Y, Dufault MR, Pacheco J, Madhiwalla S, Zhang X, Zhang M, Teicher BA, Carter K, Cheng SH, Leonard JP, Xiang Y, Vasconcelles M, Goldberg MA, Copeland DP, Klinger KW, Lillie J, Madden SL, Jiang YA. The chemosensitizing activity of inhibitors of glucosylceramide synthase is mediated primarily through modulation of P-gp function. *Int J Oncol* 2011; 38: 701-711
- 14 Liu YY, Gupta V, Patwardhan GA, Bhinge K, Zhao Y, Bao J, Mehendale H, Cabot MC, Li YT, Jazwinski SM. Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and beta-catenin signaling. *Mol Cancer* 2010; 9: 145
- 15 Liu YY, Patwardhan GA, Bhinge K, Gupta V, Gu X, Jazwinski SM. Suppression of glucosylceramide synthase restores p53-dependent apoptosis in mutant p53 cancer cells. *Cancer Res* 2011; 71: 2276-2285
- 16 Liu Y, Xie KM, Yang GQ, Bai XM, Shi YP, Mu HJ, Qiao WZ, Zhang B, Xie P. GCS induces multidrug resistance by regulating apoptosis-related genes in K562/AO2 cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 433-439
- 17 Nardone G, Rocco A, Vaira D, Staibano S, Budillon A, Tatangelo F, Sciulli MG, Perna F, Salvatore G, Di Benedetto M, De Rosa G, Patrignani P. Expression of COX-2, mPGE-synthase1, MDR-1 (P-gp), and Bcl-xL: a molecular pathway of H pylori-related gastric carcinogenesis. *J Pathol* 2004; 202: 305-312
- 18 郑文斌, 王春晖, 强鸥, 唐承薇. 塞来昔布联合奥曲肽对人胃癌多药耐药细胞生长的影响. *癌症* 2004; 23: 1628-1632
- 19 Huang DS, Shen KZ, Wei JF, Liang TB, Zheng SS, Xie HY. Specific COX-2 inhibitor NS398 induces apoptosis in human liver cancer cell line HepG2 through BCL-2. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 204-207

编辑 曹丽鸥 电编 张洋

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

• 消息 •

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

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

## 香菇多糖增强DCF方案治疗晚期胃癌40例

伍海鹰, 陈一明, 林龙, 林友刚, 邱庆安, 刘宁

### ■背景资料

胃癌细胞分泌细胞因子抑制免疫细胞增殖、分化和成熟, 诱导免疫耐受状态, 因此提高机体免疫对清除肿瘤细胞具有重要意义。

伍海鹰, 陈一明, 林龙, 林友刚, 邱庆安, 刘宁, 海南省人民医院普外科 海南省海口市 570311

作者贡献分布: 此课题由伍海鹰与刘宁设计; 研究过程由刘宁完成; 数据分析由陈一明、林龙、林友刚及邱庆安完成; 论文写作由伍海鹰与刘宁完成。

通讯作者: 刘宁, 570311, 海南省海口市, 海南省人民医院普外科. liuning1232002@163.com

收稿日期: 2011-05-13 修回日期: 2011-06-29

接受日期: 2011-07-05 在线出版日期: 2011-07-18

### Lentinan enhances the efficacy of the DCF regimen in patients with advanced gastric cancer: an analysis of 40 cases

Hai-Ying Wu, Yi-Ming Chen, Long Lin, You-Gang Lin, Qing-An Qiu, Ning Liu

Hai-Ying Wu, Yi-Ming Chen, Long Lin, You-Gang Lin, Qing-An Qiu, Ning Liu, Department of General Surgery, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China

Correspondence to: Ning Liu, Department of General Surgery, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China. liuning1232002@163.com

Received: 2011-05-13 Revised: 2011-06-29

Accepted: 2011-07-05 Published online: 2011-07-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate whether lentinan enhances the curative effects of the DCF (docetaxel, cisplatin and fluorouracil) regimen in patients with advanced gastric cancer.

**METHODS:** Eighty patients with stages III and IV gastric cancer who were treated at our hospital between January 2007 and December 2008 were randomly divided into two groups to receive DCF chemotherapy alone or DCF chemotherapy in combination with lentinan. The curative effects, routine blood parameters, lymphocyte subsets and quality of life were compared between the two groups.

**RESULTS:** The disease control rate was significantly higher in the lentinan plus DCF group than in the DCF group (87.5% vs 75.0%,  $P < 0.05$ ), while the incidence of side effects (including neutropenia, leukopenia, anemia, thrombocytopenia and infection) was significantly lower

in the lentinan plus DCF group than in the DCF group ( $P < 0.05$ ). No significant differences were noted in routine blood parameters, lymphocyte subsets and quality of life before chemotherapy between the two groups (all  $P > 0.05$ ). After chemotherapy, the numbers of WBC, lymphocytes, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK cells and quality of life were significantly improved in the lentinan plus DCF group compared to the DCF group (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Lentinan significantly enhanced the efficacy and safety of the DCF regimen in patients with advanced gastric cancer.

**Key Words:** Lentinan; DCF chemotherapy; Gastric cancer; Chemotherapy

Wu HaiY, Chen YMin, Lin L, Lin YG, Qiu QA, Liu N. Lentinan enhances on the efficacy of the DCF regimen in patients with advanced gastric cancer: an analysis of 40 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2176-2180

### 摘要

**目的:** 探讨香菇多糖对DCF方案(多西他赛, 顺铂和5-氟尿嘧啶)治疗晚期胃癌疗效的影响。

**方法:** 将2007-01/2008-12诊治的80例III-IV期晚期胃癌患者随机分成2组, 分别给予DCF方案(DCF组)和香菇多糖联合DCF方案(Len+DCF组)治疗, 分析2组患者的疗效、血常规、淋巴细胞亚群和生存质量差异。

**结果:** DCF组患者疾病控制率为75.0%, Len+DCF组为87.5%。Len+DCF组化疗的不良反应均低于DCF组, 其中在中性粒细胞减少、淋巴细胞减少、贫血、血小板减少和感染方面的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。两组患者化疗前的血常规、淋巴细胞亚群和生存质量无明显差异。化疗后, Len+DCF组的WBC、Lym、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、NK细胞及生存质量显著高于DCF组( $P < 0.05$ ), 而Hb和Plt无明显差异。

**结论:** 香菇多糖能显著提高晚期胃癌患者免

### ■同行评议者

宛新建, 副教授, 上海市第一人民医院消化内科

免疫功能, 减少不良反应, 提高生存质量, 显著增强DCF方案治疗晚期胃癌的疗效。

关键词: 香菇多糖; DCF方案; 胃癌; 化疗

伍海鹰, 陈一明, 林龙, 林友刚, 邱庆安, 刘宁. 香菇多糖增强DCF方案治疗晚期胃癌40例. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2176-2180

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2176.asp>

## 0 引言

机体免疫功能低下导致无法清除癌变细胞而发生恶性肿瘤, 目前认为细胞免疫在抗肿瘤发生中扮演重要角色, 其中淋巴细胞在肿瘤免疫中起着中心调控作用<sup>[1-3]</sup>. 研究表明, 胃癌细胞分泌细胞因子抑制免疫细胞增殖、分化和成熟, 诱导免疫耐受状态<sup>[4]</sup>, 因此提高机体免疫对清除肿瘤细胞具有重要意义<sup>[5,6]</sup>. 香菇多糖作为典型的T淋巴细胞激活剂, 可显著增强机体免疫功能, 提高化疗药物的抗肿瘤作用<sup>[7,8]</sup>. 本研究采用香菇多糖联合DCF方案治疗晚期胃癌, 探讨其对患者疗效、血常规、淋巴细胞亚群和生存质量的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 研究对象为2007-01/2008-12本科室诊治的80例III-IV期初治晚期胃癌患者, 按照随机对照原则分为DCF组(40例)和香菇多糖联合DCF方案(Len+DCF组)(40例). 患者均经影像学、病理组织学检查确诊为晚期胃癌, 预计生存期>3 mo, 无心、肝、肺等重要器官功能异常而不能耐受化疗, Karnofsky评分 $\geq$ 70分. DCF组患者男24例, 女16例, 年龄55-80(平均 $67.9 \pm 8.1$ )岁, III期19例, IV期21例; Len+DCF组患者男25例, 女15例, 年龄56-78(平均 $67.5 \pm 7.2$ )岁, III期20例, IV期20例. 2组患者在性别、年龄和TNM分期的差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ).

### 1.2 方法

1.2.1 各组用药方案: 80例晚期胃癌患者在常规支持对症治疗的基础上接受化疗治疗. DCF组: 多西他赛75 mg/m<sup>2</sup>, 静脉注射, d1; 顺铂100 mg/m<sup>2</sup>, 静脉滴注, d1; 5-氟尿嘧啶1 000 mg/(m<sup>2</sup>·d), 静脉滴注, d1-d5, 每4 wk为一个疗程. Len+DCF组患者在DCF方案治疗的基础上, 给予香菇多糖(天地欣)1 mg加入250 mL生理盐水静脉滴注, 2次/wk.

1.2.2 疗效及毒性评价: 疗效评价参考国际抗癌

表 1 两组患者化疗药物毒性不良反应

不良反应	DCF组(n)		Len+DCF组(n)		P值
	I-II级	III-IV级	I-II级	III-IV级	
中性粒细胞减少	23	12	15	7	0.023
淋巴细胞减少	11	9	8	3	0.037
贫血	8	5	5	2	0.018
血小板减少	5	3	2	1	0.024
胃肠道反应	19	18	21	11	0.575
口腔黏膜炎	9	7	7	6	0.432
嗜睡	7	5	6	4	0.614
感染	7	3	4	1	0.003
周围神经炎	5	2	4	2	0.872

联盟(UICC)实体瘤的疗效评价标准RECIST, 测量瘤体最大径计算肿瘤大小. 完全缓解(complete remission, CR): 肿瘤完全消失或无新的肿瘤出现, 肿瘤指标下降到正常; 部分缓解(partial remission, PR): 单一或数个最长直径总数减少 $\geq$ 30%; 病情稳定(stable disease, SD): 肿瘤有缩小, 但没到PR程度; 肿瘤长大, 还没到PD程度; 疾病进展(progressive disease, PD): 单一或数个肿瘤最长直径总数增加 $\geq$ 20%, 或有新的肿瘤出现. 疾病控制率为CR+PR+SD. 化疗药物毒性不良反应按照WHO抗癌药急性及亚急性毒性分级标准分为I-IV级, 在化疗疗程结束后, 根据临床观察和实验室检查结果对不良反应进行全面评价.

1.2.3 观察指标: 在化疗前、化疗1、3和6 mo检测患者外周血白细胞(white blood cell, WBC)、淋巴细胞(lymphocyte, Lym)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)和血小板(platelet, Plt)、T淋巴细胞亚群(CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>和NK细胞). 采用欧洲癌症研究与治疗组织研制的生命质量测定量表EORTC QLQ-STO22对患者进行生存质量评价.

**统计学处理** 采用SPSS12.0进行数据处理和统计学分析. 计量资料采用mean $\pm$ SD表示, 采用t检验, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验. 采用Kaplan-Meier法进行生存分析, Log-rank法检验差异. 检验水准 $\alpha=0.05$ ,  $P<0.05$ 差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 疗效及不良反应 80例患者均完成治疗计划, 无病例死亡. DCF组患者CR 5例, PR 11例, SD 14例, PD 10例, 疾病控制率为75.0%; Len+DCF组患者CR 9例, PR 17例, SD 9例, PD 5例, 疾病控制率为87.5%, Len+DCF组的疾病控制率高于

### ■创新盘点

本文采用香菇多糖联合DCF方案治疗晚期胃癌, 探讨其对患者疗效、血常规、淋巴细胞亚群和生存质量的影响, 从增强患者免疫角度探讨香菇多糖增强DCF治疗晚期胃癌疗效的机制。

■应用要点

本研究揭示香菇多糖可显著提高晚期胃癌患者淋巴细胞数目,减少DCF化疗药物的不良反应,显著提高患者的生存质量和时间,为香菇多糖治疗恶性肿瘤提供客观证据。

表 2 两组患者化疗前后血常规结果

指标	分组	化疗前	化疗1 mo	化疗3 mo	化疗6 mo
WBC( $\times 10^9$ )	DCF组	6.7 $\pm$ 1.6	5.3 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	4.6 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	Len+DCF组	6.6 $\pm$ 1.5	5.8 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.9	5.4 $\pm$ 1.2
Lym( $\times 10^9$ )	DCF组	3.0 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
	Len+DCF组	3.0 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.7
Hb(g/L)	DCF组	146.7 $\pm$ 5.7	141.3 $\pm$ 8.5	136.3 $\pm$ 6.5	130.1 $\pm$ 4.6
	Len+DCF组	146.1 $\pm$ 5.4	145.1 $\pm$ 7.6	140.1 $\pm$ 5.6	136.2 $\pm$ 6.2
Plt( $\times 10^9$ )	DCF组	205.1 $\pm$ 23.3	184.5 $\pm$ 15.7	164.2 $\pm$ 11.2	144.6 $\pm$ 9.2
	Len+DCF组	208.2 $\pm$ 19.7	193.3 $\pm$ 11.4	173.5 $\pm$ 10.8	150.8 $\pm$ 11.5

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Len+DCF组.

表 3 两组患者化疗前后淋巴细胞亚群结果 (%)

淋巴细胞亚群	分组	化疗前	化疗1 mo	化疗3 mo	化疗6 mo
CD3 <sup>+</sup>	DCF组	67.5 $\pm$ 3.5	62.3 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	57.3 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	52.4 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>
	Len+DCF组	67.4 $\pm$ 3.6	65.1 $\pm$ 1.9	60.1 $\pm$ 2.2	56.3 $\pm$ 2.1
CD4 <sup>+</sup>	DCF组	35.2 $\pm$ 2.2	30.1 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	26.1 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	25.7 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
	Len+DCF组	35.4 $\pm$ 2.8	32.9 $\pm$ 2.1	29.5 $\pm$ 1.5	28.4 $\pm$ 2.4
CD8 <sup>+</sup>	DCF组	29.2 $\pm$ 3.4	25.3 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	18.3 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	12.7 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>
	Len+DCF组	29.5 $\pm$ 3.1	27.8 $\pm$ 1.6	21.2 $\pm$ 2.2	17.2 $\pm$ 3.6
NK	DCF组	18.7 $\pm$ 1.3	14.3 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	10.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
	Len+DCF组	18.9 $\pm$ 1.4	15.5 $\pm$ 0.6	13.8 $\pm$ 0.6	10.5 $\pm$ 1.4

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Len+DCF组.

DCF组。Len+DCF组化疗的不良反应均低于DCF组,其中在中性粒细胞减少、淋巴细胞减少、贫血、血小板减少和感染等方面的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),而在胃肠道反应、口腔黏膜炎、嗜睡和周围神经炎等方面的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表1)。

2.2 血常规和淋巴细胞亚群 两组患者化疗前的血常规和淋巴细胞亚群无明显差异(均 $P > 0.05$ )。化疗后的各指标均降低,Len+DCF组的WBC、Lym、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>和NK细胞均显著高于DCF组( $P < 0.05$ ),而Hb和Plt无明显差异( $P > 0.05$ ,表2,3)。

2.3 生存质量 2组患者化疗前的生存质量无明显差异( $P > 0.05$ ),Len+DCF组患者化疗1、3和6 mo的生存质量评分均低于DCF组,Len+DCF组患者生活质量显著高于DCF组( $P < 0.05$ ,表4)。

2.4 生存分析 DCF组患者肿瘤进展时间为5.5 mo,中位总生存期为9.3 mo;Len+DCF组患者肿瘤进展时间为7.2 mo,中位总生存期为11.6 mo,Len+DCF组患者肿瘤进展时间和中位总生存期均显著高于DCF组患者( $P < 0.05$ ,图1)。

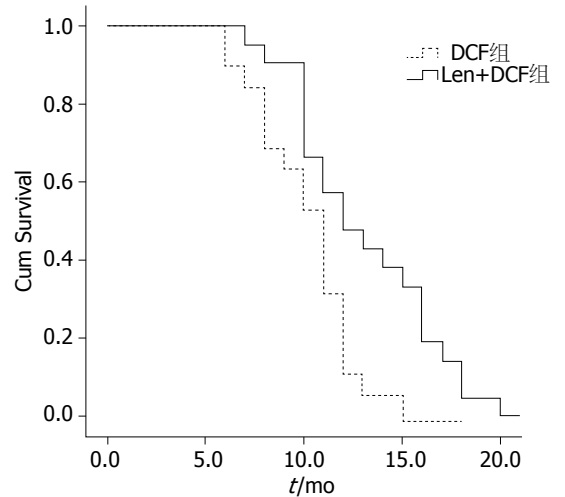


图 1 DCF组和Len+DCF组患者生存函数。

3 讨论

肿瘤细胞与宿主免疫系统相互作用在肿瘤的发生、发展和转移过程中起到关键作用。免疫系统可清除发生癌变的细胞或抑制肿瘤的发展及转移,肿瘤自身和其标志物可诱发机体抗肿瘤的细胞免疫和体液免疫,而肿瘤细胞的基因突变和

表 4 两组患者化疗前后生存质量

分组	化疗前	化疗后(mo)		
		1	3	6
DCF组	67.1±3.5	56.4±2.6	45.3±2.1	36.4±3.8
Len+DCF组	67.0±3.1	51.2±2.8	37.6±2.7	28.1±3.2
t值	0.135	8.607	14.237	10.567
P值	0.893	<0.001	<0.001	<0.001

<sup>a</sup>P<0.05 vs Len+DCF组.

免疫原性改变形成局部组织抑制性微环境<sup>[9,10]</sup>. 这种平衡一旦受到破坏, 肿瘤细胞增殖失去调控, 宿主免疫系统受抑, 导致患者的免疫功能进一步降低, T淋巴细胞介导的细胞免疫受到抑制, 主要表现为CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞数目降低<sup>[11]</sup>. 因此, 在肿瘤的治疗中应用免疫增强剂, 可显著减少化疗药物相关的免疫抑制, 提高机体的免疫功能, 增强对肿瘤细胞的清除作用, 显著提高化疗疗效<sup>[12,13]</sup>.

香菇多糖的主要成分为甘露糖甘肽, 其余为多种糖分和各种氨基酸等, 是典型的T淋巴细胞激活剂, 促进T、B淋巴细胞增殖, 提高NK细胞活性, 体内外均能促进细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的产生, 提高CTL细胞杀伤力, 增强正常或免疫功能低下小鼠的迟发型超敏反应, 提高抗体依赖性细胞毒作用, 同时能结合到人单核细胞上激活内源性信号传导通路<sup>[14]</sup>. 作为免疫增强的辅助药物, 香菇多糖体外可促进顺铂对胃癌细胞增殖的抑制作用<sup>[15]</sup>, 与化疗药物联合使用有减毒增效的作用, 在治疗胰腺癌<sup>[16]</sup>、肝癌<sup>[17]</sup>、结肠癌<sup>[18]</sup>等肿瘤具有良好疗效, 显著延长肿瘤患者的生存时间. 目前认为香菇多糖的免疫调节功能是抗肿瘤作用的基础.

目前对晚期胃癌尚无疗效显著的化疗药物, 减少患者痛苦及提高生存质量为主要治疗目的. 本研究表明, 香菇多糖对晚期胃癌患者的淋巴细胞亚群具有显著的促进增殖作用, DCF化疗方案能显著降低胃癌患者淋巴细胞亚群的数目, 而香菇多糖能显著改善该状况, 减少了升白细胞药物的使用. 与DCF组患者相比, Len+DCF组患者化疗后的WBC、Lym、CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>和NK细胞均显著高于DCF组(P<0.05), 而化疗毒性不良反应降低, 特别是免疫相关的不良反应显著降低, 极大纠正化疗对患者外周血白细胞和淋巴细胞的抑制作用, 提高患者的生存质量和生存期, 疗效高于Van Cutsem等<sup>[19]</sup>报道

的DCF方案治疗晚期胃癌的疗效.

总之, 香菇多糖作为一种免疫增强剂, 与DCF方案联合应用可显著提高机体免疫功能, 提高患者对化疗药物毒性的耐受力, 减少化疗毒性不良反应, 提高晚期胃癌的综合治疗效果, 在治疗晚期胃癌方面具有广阔的应用前景, 但本研究病例数较少, 有待于大规模临床试验验证.

#### 4 参考文献

- Speiser DE, Romero P. Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity. *Semin Immunol* 2010; 22: 144-154
- Yaqub S, Aandahl EM. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. *Crit Rev Oncog* 2009; 15: 43-63
- Rubin B. Natural immunity has significant impact on immune responses against cancer. *Scand J Immunol* 2009; 69: 275-290
- 赵敬柱, 张汝鹏, 津浦, 李慧, 王刚, 王学军, 薛强, 昉璇, 任秀宝. 胃癌微环境中免疫活性细胞与患者预后的关系. *中国肿瘤临床* 2010; 37: 1290-1292
- He S, Wang L, Wu Y, Li D, Zhang Y. CCL3 and CCL20-recruited dendritic cells modified by melanoma antigen gene-1 induce anti-tumor immunity against gastric cancer ex vivo and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 37
- Li YL, Wu YG, Wang YQ, Li Z, Wang RC, Wang L, Zhang YY. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor lysates induce anti-tumor immunity against gastric cancer ex vivo. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7127-7132
- 赵军. 香菇多糖联合奥沙利铂治疗恶性胸腔积液疗效观察. *实用医学杂志* 2010; 26: 2631-2632
- 朱江, 周桂萍. 香菇多糖联合化疗治疗中晚期肺癌疗效观察. *中国中西医结合急救杂志* 2011; 18: 37
- Preston CC, Goode EL, Hartmann LC, Kalli KR, Knutson KL. Immunity and immune suppression in human ovarian cancer. *Immunotherapy* 2011; 3: 539-556
- Sanchez CJ, Le Treut T, Boehrer A, Knoblauch B, Imbert J, Olive D, Costello RT. Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60: 1-13
- Palucka K, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med* 2011; 269: 64-73
- Gattinoni L, Ji Y, Restifo NP. Wnt/beta-catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4695-4701
- Yoshino S, Watanabe S, Imano M, Suga T, Nakazawa S, Hazama S, Oka M. Improvement of QOL and prognosis by treatment of superfine dispersed lentinan in patients with advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 172-177
- Kurita K, Matsumura Y, Takahara H, Hatta K, Shimojoh M. Synthesis and Macrophage Activation of Lentinan-Mimic Branched Amino Polysaccharides: Curdlans Having N-Acetyl-d-glucosamine Branches. *Biomacromolecules* 2011; 12: 2267-2274
- 伍海鹰, 陈一明, 林龙, 林友刚, 邱庆安, 刘宁. 体外香菇多糖对顺铂抑制胃癌细胞增殖的促进作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 344-348

#### ■同行评价

本文选题密切结合临床实践, 设计较合理, 病例资料较丰富, 统计学基本符合要求, 有一定的临床指导意义.

- 16 Shimizu K, Watanabe S, Watanabe S, Matsuda K, Suga T, Nakazawa S, Shiratori K. Efficacy of oral administered superfine dispersed lentinan for advanced pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 240-244
- 17 Isoda N, Eguchi Y, Nukaya H, Hosho K, Suga Y, Suga T, Nakazawa S, Sugano K. Clinical efficacy of superfine dispersed lentinan (beta-1,3-glucan) in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 437-441
- 18 Hazama S, Watanabe S, Ohashi M, Yagi M, Suzuki M, Matsuda K, Yamamoto T, Suga Y, Suga T, Nakazawa S, Oka M. Efficacy of orally administered superfine dispersed lentinan (beta-1,3-glucan) for the treatment of advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 2611-2617
- 19 Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Risse ML, Ajani JA. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4991-4997

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 •

## WJG 成功通过评审被 PMC 收录

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

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

# 胃的胃肠间质瘤114例

张鹏, 陶凯雄

张鹏, 陶凯雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 此研究由张鹏与陶凯雄共同设计; 病例收录、数据分析由张鹏完成; 论文写作由张鹏与陶凯雄完成。

通讯作者: 陶凯雄, 教授, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科. tao\_kaixiong@163.com

收稿日期: 2011-05-03 修回日期: 2011-06-19

接受日期: 2011-06-21 在线出版日期: 2011-07-18

## Gastric gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 114 cases

Peng Zhang, Kai-Xiong Tao

Peng Zhang, Kai-Xiong Tao, Department of Laparoscopic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

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

Received: 2011-05-03 Revised: 2011-06-19

Accepted: 2011-06-21 Published online: 2011-07-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the clinical characteristics, diagnosis, treatment and prognosis of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of the stomach.

**METHODS:** The clinical and pathological data for 114 patients with GISTs of the stomach who were treated from January 2005 to September 2010 at Wuhan Union Hospital were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** GISTs of the stomach were mainly located in the cardia or fundus (53.5%) and the stomach body (36.8%). The common presenting symptoms included gastrointestinal hemorrhage and abdominal pain. EUS and CT had a high accuracy of preoperative diagnosis. Pathological and immunohistochemical examinations were necessary for a clear diagnosis. All but one patient received complete surgical resection. Immunohistochemistry demonstrated that tumor cells were positive for CD117 in 112 cases (98.2%) and for CD34 in 105 cases (92.1%). The follow-up period ranged from 3 to 68 months, with a

mean value of 26.2 months. Twenty-four cases received imatinib mesylate after surgery. The 5-year survival rate and tumor-free survival rate were 100% and 98.0%, respectively.

**CONCLUSION:** Gastric GISTs have atypical clinical features. EUS and CT are effective diagnostic methods. Surgery is the main therapy and targeted therapy can significantly improve the survival of patients with gastric GISTs.

**Key Words:** Gastrointestinal stromal tumors; Stomach; Surgical procedure; Imatinib mesylate; Prognosis

Zhang P, Tao KX. Gastric gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 114 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2181-2184

### 摘要

**目的:** 总结发生于胃的胃肠间质瘤(GISTs)的临床病理特征、诊治及预后。

**方法:** 回顾分析2005-1/2010-9华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科收治的114例胃GISTs患者的临床病理资料。

**结果:** 胃GISTs最常见于贲门胃底部(53.5%)和胃体部(36.8%), 常见的临床表现包括消化道出血与腹部胀痛。内镜超声与CT在术前诊断方面准确率较高, 确诊则需要病理组织学与免疫组织化学检查。除1例患者外其余均行手术完整切除, 免疫组织化学示CD117阳性率98.2%(112/114), CD34阳性92.1%(105/114)。术后随访3-68 mo(平均随访26.2 mo), 共有24例服用甲磺酸伊马替尼治疗, 本组98例随访患者5年生存率为100%, 无瘤生存率达到98.0%。

**结论:** 胃GISTs临床表现没有特异性, 内镜超声与CT是术前有效的诊断方法。手术仍是胃GISTs治疗的主要方法, 术后给予靶向治疗可显著改善患者预后。

**关键词:** 胃肠间质瘤; 胃; 外科手术; 甲磺酸伊马替尼; 预后

### 背景资料

胃肠间质瘤(GISTs)作为一种概念上较新的肿瘤类型在十余年被重新认识, 其中约60%的GISTs原发于胃。因此提高对该类肿瘤的认识显得尤为重要。

### 同行评议者

戴冬秋, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

## ■研发前沿

近十余年间GISTs的研究与治疗尽管取得了长足的进步,但在术前靶向药物治疗的时间及剂量、靶向药物耐药机制以及新的靶向药物研发等方面仍有待于进一步研究。

张鹏,陶凯雄. 胃的胃肠间质瘤114例. 世界华人消化杂志 2011; 19(20): 2181-2184  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2181.asp>

## 0 引言

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)是消化系最常见的间叶组织源性的肿瘤,可发生于胃肠道的任何部位,但以胃GISTs最为多见<sup>[1]</sup>. 2005-01/2010-09华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科共诊治GISTs 221例,其中114例为胃GISTs. 本研究对114例患者的临床病理资料、诊断治疗以及预后进行回顾性分析,以期为提高胃GISTs的诊治水平提供参考,报道如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 114例胃GISTs患者均为初治病例,其中男50例(43.9%),女64例(56.1%),男女比为1:1.28. 年龄24-79(平均年龄57.2)岁,中位年龄57岁,小于40岁者仅10例(8.8%). 肿瘤发生于胃底及贲门部61例,胃体42例,胃窦7例,2个部位多发间质瘤3例,另有1例位于残胃吻合口. 全组患者中有5例存在2个及2个以上胃GISTs. 临床表现方面以消化道出血就诊的患者有46例,其中便血29例,呕血6例,二者兼有11例,上腹部腹胀不适、疼痛34例,体检偶然发现17例,其他术中偶然发现6例,腹部包块4例,反酸嗝气4例,吞咽困难、呕吐、腰背部疼痛各1例. 另有4例患者同时合并有胃癌发生.

### 1.2 方法

1.2.1 辅助检查: 本组114例患者中有91例行电子胃镜检查; 57例行内镜超声(endoscopic ultrasonography, EUS)检查; 37例患者行CT检查; 18例行腹部超声检查; 4例行MRI检查; 另有10例行钡餐以及血管造影等检查. 此外,有37例患者行CEA、CA125、CA19-9、AFP等肿瘤标志物检测,均未发现明显升高.

1.2.2 治疗: 本组患者均行手术治疗,除1例为不完全切除外其余均为完全切除,包括局部切除61例,近端胃大部切除32例,远端胃大部切除11例,全胃切除8例,1例为残胃切除,其中有27例在腹腔镜下完成手术. 全部患者中有12例行联合脏器切除.

1.2.3 肿瘤生物学行为判断标准: GISTs的生物学行为的评价按大多数学者认可的Fletcher评价标准<sup>[2]</sup>,以肿瘤直径和每50个高倍镜下的核分裂象计数将GISTs的侵袭行为分为4类: 极低度危

险、低度危险、中度危险和高度危险.

1.2.4 随访: 通过电话以及门诊形式对患者进行随访,末次随访日期为2011-03-26. 随访内容包括患者的生存、复查结果、肿瘤有无复发转移以及有无辅助治疗(靶向治疗或放化疗)及其不良反应等. 生存日期定义为自手术治疗之日到死亡之日或末次随访日所经历的时间,以月为单位计算.

## 2 结果

2.1 术前诊断结果 91例行电子胃镜检查,其中84例发现存在黏膜下隆起病灶; 57例行EUS检查,有55例(96.5%)诊断考虑为GISTs,大多表现为起源于固有肌层的低回声病变,内部回声多不均匀; 37例行CT检查,26例诊断考虑为GISTs,表现为软组织密度影,密度多不均匀,多数境界清楚光整; 18例行腹部超声检查,仅有5例发现肿物起源于胃,3例表现为囊实性混合回声肿物,轮廓较为清晰,形状较规则,考虑为GISTs; 另外有12例行腹部超声检查也发现存在肿物,但来源考虑为胃以外的其他器官.

2.2 病理及免疫组织化学 肿瘤最大径0.3-15(平均4.9) cm. 肉眼观切面大多灰白、质韧或呈鱼肉样,且有24例(21.1%)同时伴有坏死、出血及囊性变等继发性改变. 镜下细胞类型96例(84.2%)为梭形细胞型,10例(8.8%)上皮样细胞型,8例(7.0%)混合细胞型. 行淋巴结清扫28例,共清扫淋巴结279个,其中有2个淋巴结存在肿瘤转移. 按Fletcher分级,29例为极低危组,33例为低危组,30例为中危组,22例为高危组. 免疫组织化学染色示CD117阳性率98.2%(112/114),CD34阳性率92.1%(105/114),DOG-1阳性率100% (17/17),SMA阳性率13.2%(15/114),S-100阳性率2.6%(3/114).

2.3 随访结果 本组患者共有99例获随访,15例失访,随访率86.8%. 随访时间3-68 mo,平均随访26.2 mo. 1例不完全切除者目前带瘤生存. 获得随访的98例完全切除患者术后有1例复发转移,为局部复发合并腹腔和肝脏转移,行3次手术后目前带瘤生存; 1例于术后3 mo死亡,死于同时伴发的胃癌转移; 其余患者均无瘤生存. 术后共有24例服用甲磺酸伊马替尼治疗,服用时间1-66(平均服用时间为17.7) mo.

## 3 讨论

GISTs是最常见的消化系间叶源性肿瘤,过去

## ■相关报道

Miettinen等报道的1765例胃GISTs中有124例病灶小于2 cm且术后随访均未发生肿瘤复发与转移. 因此,对胃小GISTs的早期诊断与手术切除是改善预后的重要手段.

曾被普遍诊断为平滑肌肿瘤和神经源性肿瘤。1983年Mazur和Clark<sup>[3]</sup>首次提出了胃肠间质瘤的概念, 1998年日本的Hirota等<sup>[4]</sup>报道了GISTs中存在*c-kit*基因功能获得性突变, 此突变在GISTs发病中发挥着极为关键的作用。进一步研究发现GISTs对CD117和CD34呈阳性反应。2003年Heinrich等<sup>[5]</sup>发现在某些缺乏*c-kit*突变的GISTs中存在血小板衍生生长因子受体 $\alpha$ (platelet-derived growth factor receptor alpha, PDGFR $\alpha$ )的突变, 是GISTs发生的另一重要原因。至此, GISTs的诊断才真正进入了标准化阶段。

GISTs虽可发生于整个消化系统, 但以胃部最为多见。国内赵加玲等<sup>[6]</sup>对上海市2003-2008年713例GISTs患者进行了总结分析, 其中有419例(58.8%)发生于胃。本组114胃GISTs占同期协和医院外科收治GISTs的51.6%, 与文献报道相符<sup>[1,6]</sup>。胃GISTs临床表现多样, 并无特异性。本组患者主要表现为消化系出血与腹部胀痛, 另有23例(20.2%)患者无明显症状, 为体检或在其他手术中偶然发现。GISTs确诊需要依靠病理组织学以及免疫组织化学检查特别是CD117阳性, CD117在GISTs中阳性率大约为95%<sup>[7]</sup>。CD34为造血前体细胞抗原, 可在GISTs或血管内皮细胞中表达, 而SMA与S-100则分别在平滑肌细胞以及神经鞘膜细胞中表达。本组患者中CD117与CD34阳性率分别为98.2%与92.1%, SMA与S-100的阳性率分别为13.2%与2.6%, 提示有一小部分的胃GISTs存在平滑肌分化与神经分化。此外, 有17例患者进行了DOG-1检测, 全部呈现阳性, 说明DOG-1是GISTs敏感且特异性的诊断标志物, 对于GISTs诊断也具有极高的价值。

胃镜、EUS、CT及B超是胃GISTs常用的辅助检查方法。胃镜作为胃GISTs术前最常用方法, 本组84例患者行胃镜检查时发现存在黏膜下隆起病灶, 但是仍有7例在行胃镜时未发现肿瘤, 说明胃镜在诊断外生性肿瘤方面具有较大局限性。而EUS则可以发现直径<2 cm的肿瘤且能清晰区分胃肠道的各层结构, 对肿瘤来源的更为判断准确, 因此对胃GISTs诊断具有较大的意义, 是当前诊断胃GISTs的首选方法<sup>[8,9]</sup>。本组57例行EUS检查患者中有55例(96.5%)诊断考虑为GISTs, 也证实了这一观点。而作为腹部疾病一线诊断方法的腹部超声, 虽有简便、无创、快速等优势, 但对胃GISTs的早期诊断和判断病变组织来源及肿瘤与周围组织关系的意义不大。本组18例行超声检查, 17例发现存在占位性病

变, 但仅有5例发现肿物起源于胃, 3例考虑为胃GISTs。本组患者中37例行CT检查, 26例诊断考虑为GISTs, CT虽然在确诊率方面较EUS低, 但却能清晰显示肿瘤的大小、生长方式、肿块与周围组织的关系及有无转移等, 既弥补了胃镜检查对于腔外型肿瘤诊断的不足, 又对术式选择以及估计预后有一定的指导意义。

随着内镜技术的发展, 近年来也有较多对直径2 cm以下的胃GISTs实施内镜下切除的报道<sup>[10,11]</sup>。但由于大多数胃GISTs位于固有肌层, 内镜下切除发生穿孔的概率明显增高, 所以当前NCCN指南对胃GISTs内镜下切除还处于谨慎的态度, 手术切除仍是胃GISTs首选的治疗方法。同时, GISTs的淋巴结转移率较低(本组仅为0.72%), 在进行肿瘤切除时并不需要进行常规的淋巴结清扫。一般而言对直径相对较小、无浸润坏死的胃GISTs患者行局部完整切除即可, 这样可以同时保证患者生存率和生存质量; 对于直径超过5 cm、伴有溃疡的肿瘤, 往往需要行胃大部切除术甚至全胃切除; 而对一些外生型GISTs, 如侵及周围脏器时甚至需要联合切除。本组病例有12例患者行联合脏器切除, 术后恢复良好。此外, 随着一系列回顾性研究<sup>[12-14]</sup>发现腹腔镜下行GISTs手术的效果与复发率方面与开腹组相似, 甚至优于开腹组, NCCN指南也已从不推荐在腹腔镜下行GISTs手术变为直径5 cm以下的GISTs可由腹腔镜经验丰富的医师操作完成。本组共有27例患者在腹腔镜下完成手术, 手术过程顺利, 无中转开腹者。在行腹腔镜GISTs切除时, 操作应该更加细心, 严格遵循外科无瘤原则, 避免肿瘤破裂, 引起腹腔和腹壁转移。近年来, 随着以甲磺酸伊马替尼为代表的靶向药物的临床应用, GISTs的治疗方法也发生了重大的变化, 由原先单一的手术治疗逐步转为手术、药物的联合治疗。詹文华等<sup>[15]</sup>进行的国内多中心临床试验证实了对已行GISTs完全切除但又有高度恶性倾向的患者每日口服400 mg甲磺酸伊马替尼, 肿瘤转移率和复发率将显著降低。本组有24例中危及高危患者(包括1例不完全切除患者)术后接受了甲磺酸伊马替尼治疗, 目前均未发现原发耐药及继发耐药者, 2例患者带瘤生存, 其余患者均未发现存在肿瘤复发或转移。此外, 研究还发现对于GISTs患者进行*c-kit*和PDGFR $\alpha$ 基因突变的检测对靶向药物的选择及预后判断都有极其重要的作用。因此, 在临床工作中对GISTs患者常规进行基因突变的检测已

#### ■应用要点

本文详细总结了近年手术治疗的114例胃GISTs患者的临床病理资料, 发现随着对GISTs研究认识的深入, 对胃GISTs患者采取手术切除、甲磺酸伊马替尼辅助的联合治疗方法, 可使肿瘤复发和转移显著减少, 生存率提高。

### ■同行评价

本文中有27例尝试用腹腔镜治疗, 具有微创优势, 有一定的临床参考价值。

刻不容缓。

预后方面, 文献报道胃GISTs的预后显著好于小肠及其他部位来源的GISTs。Fujimoto等<sup>[16]</sup>报道胃GISTs患者5年生存率可达86.0%, 国内王刚、伍小军等报道的胃GISTs 5年生存率为56.6%与79.3%<sup>[17,18]</sup>。本组共有99例随访患者, 其中1例因伴随胃癌转移死亡。剔除此例因胃癌死亡的患者, 本组98例胃GISTs患者随访均未死亡, 5年生存率为100%, 无瘤生存率达到98.0%, 与国内外相关报道相比生存率较高。原因可能有以下几个方面: (1)本组患者均为2005年以后收治的患者, 而国内之前的胃GISTs研究报道的患者大多为最近15年的病例, 在GISTs的认识与治疗方面本组较之前各研究报道有较大进步; (2)本组患者中极低危与低危患者占54.4%, Fletcher分级中极低危组与低危组在生存方面本身预后较好, 且中危与高危胃GISTs患者中有24例系统服用甲磺酸伊马替尼, 获益较为显著; (3)本组平均随访时间为26.2 mo, 还需要进一步随访观察。总之, 对于胃GISTs患者采取手术切除、甲磺酸伊马替尼辅助的联合治疗方法, 可以显著减少肿瘤的复发和转移, 提高生存率。

### 4 参考文献

- 1 Tran T, Davila JA, El-Serag HB. The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 162-168
- 2 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
- 3 Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 507-519
- 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 赵加玲, 余勇夫, 鲍萍萍, 吴春晓, 顾凯, 赵耐青. 上海市胃肠道间质瘤的临床调查及预后分析. *中国医院统计* 2010; 17: 197-199
- 7 胃肠道间质瘤中国专家组. 胃肠道间质瘤诊断与治疗中国专家共识. *中华胃肠外科杂志* 2009; 12: 536-539
- 8 Fusaroli P, Caletti G. Endoscopic ultrasonography: current clinical role. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 293-301
- 9 Ji F, Wang ZW, Wang LJ, Ning JW, Xu GQ. Clinicopathological characteristics of gastrointestinal mesenchymal tumors and diagnostic value of endoscopic ultrasonography. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e318-e324
- 10 Waxman I, Saitoh Y, Raju GS, Watari J, Yokota K, Reeves AL, Kohgo Y. High-frequency probe EUS-assisted endoscopic mucosal resection: a therapeutic strategy for submucosal tumors of the GI tract. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 44-49
- 11 Bai J, Wang Y, Guo H, Zhang P, Ling X, Zhao X. Endoscopic resection of small gastrointestinal stromal tumors. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1950-1954
- 12 Novitsky YW, Kercher KW, Sing RF, Heniford BT. Long-term outcomes of laparoscopic resection of gastric gastrointestinal stromal tumors. *Ann Surg* 2006; 243: 738-745; discussion 745-747
- 13 Choi SM, Kim MC, Jung GJ, Kim HH, Kwon HC, Choi SR, Jang JS, Jeong JS. Laparoscopic wedge resection for gastric GIST: long-term follow-up results. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 444-447
- 14 王震宇, 秦鸣放, 赵宏志, 蔡旺, 王光霞, 张莉, 李焕喜. 胃间质瘤的内镜早期诊断及腹腔镜手术治疗. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 927-930
- 15 詹文华, 王鹏志, 邵永孚, 伍晓汀, 顾晋, 李荣, 万德森, 丁克峰, 师英强, 于吉人, 卢辉山, 邹小明, 毕建威, 孙益红, 陆云飞, 陈道达, 张信华. 伊马替尼术后辅助治疗胃间质瘤的多中心前瞻性临床试验中期报告. *中华胃肠外科杂志* 2006; 9: 383-387
- 16 Fujimoto Y, Nakanishi Y, Yoshimura K, Shimoda T. Clinicopathologic study of primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the stomach, with special reference to prognostic factors: analysis of results in 140 surgically resected patients. *Gastric Cancer* 2003; 6: 39-48
- 17 王刚, 张汝鹏, 赵敬柱, 王学军, 柯彬. 132例胃的胃肠间质瘤治疗及预后分析. *中华胃肠外科杂志* 2010; 13: 492-496
- 18 伍小军, 方涓靖, 卢震海, 林俊忠, 万德森, 丁培荣, 陈功, 李力人, 孔令亨, 潘志忠. 140例胃间质瘤的外科治疗分析. *中华胃肠外科杂志* 2010; 13: 417-420

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

## 经皮内镜胃造瘘患者的循证治疗

刘启胜, 董卫国

刘启胜, 咸宁市中心医院消化内科 湖北省咸宁市 437100  
董卫国, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
作者贡献分布: 刘启胜与董卫国对此文所作贡献均等; 此课题由刘启胜与董卫国设计; 研究过程由刘启胜操作完成; 本论文写作由刘启胜与董卫国完成。  
通讯作者: 刘启胜, 主治医师, 437100, 湖北省咸宁市金桂路, 咸宁市中心医院消化内科. liuqisheng99@yahoo.com.cn  
电话: 0715-8896215  
收稿日期: 2011-05-11 修回日期: 2011-06-21  
接受日期: 2011-07-03 在线出版日期: 2011-07-18

### Evidence-based treatment by percutaneous endoscopic gastrostomy

Qi-Sheng Liu, Wei-Guo Dong

Qi-Sheng Liu, Department of Gastroenterology, Central Hospital of Xianning, Xianning 437100, Hubei Province, China

Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Qi-Sheng Liu, Department of Gastroenterology, Central Hospital of Xianning, Jingui Road, Xianning 437100, Hubei Province, China. liuqisheng99@yahoo.com.cn

Received: 2011-05-11 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-07-03 Published online: 2011-07-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate common clinical problems of percutaneous endoscopic gastrostomy and create an individualized treatment plan by means of evidence-based medicine to control symptoms and reduce mortality.

**METHODS:** After clinical problems were put forward, systematic reviews and randomized controlled trials were collected from the Cochrane Library (online), MEDLINE (1990-2010), EMBase (1990-2010), SCIE (1990-2010) and CNKI (2000-2010). Treatment protocol was developed by combining the evidence and the wishes of the patient.

**RESULTS:** A total of 39 RCTs and 10 systematic reviews were identified. A rational treatment plan was made upon a serious evaluation of the data and wishes of patients.

**CONCLUSION:** An individualized treatment plan developed based on evidence-based method can improve the efficacy of percutaneous endoscopic gastrostomy.

**Key Words:** Percutaneous endoscopic gastrostomy; Evidence-based therapy; Treatment protocols

Liu QS, Dong WG. Evidence-based treatment by percutaneous endoscopic gastrostomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2185-2189

### 摘要

**目的:** 探讨经皮内镜胃造瘘临床上常见问题, 并为患者制定合理的治疗方案, 以控制患者症状, 降低死亡率。

**方法:** 在充分评估患者的情况后, 提出临床问题, 从Cochrane图书馆(1995-2010)、MEDLINE(1990-12/2010)、EMBASE(1990-12/2010)、SCIE(1990-12/2010)、中国知网(1990-2010)中分别检索有关经皮内镜胃造瘘的诊疗及临床常见问题的随机对照试验和系统评价, 对所获证据进行评价, 并结合患者及家属意愿制定治疗方案。

**结果:** 共检索出与不同问题相关的随机对照试验39篇, 系统评价/Meta分析10篇。分析证据并结合患方意愿, 最终为患者制定了合理的治疗方案。

**结论:** 采用循证治疗的方法, 为患者制定合理的治疗方案, 以达到控制症状, 提高生存率的目的。

**关键词:** 经皮内镜胃造瘘术; 循证治疗; 治疗方案

刘启胜, 董卫国. 经皮内镜胃造瘘患者的循证治疗. *世界华人消化杂志* 2011; 19(20): 2185-2189

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2185.asp>

### 0 引言

经皮内镜胃造瘘术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG)是一项无需外科手术及全身

### ■背景资料

经皮内镜胃造瘘术是一项无需外科手术及全身麻醉的造口技术, 自1980年应用于临床以来, 在美国每年约有16-20万例次的临床操作, 近年来在国内已逐步开展。

### ■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

## ■相关报道

Sharma等的Meta分析结果显示,使用抗生素后感染的相对风险和绝对风险分别减少73%和17.5%,术前30 min静脉使用广谱抗生素可降低感染总发生率。

表 1 经皮内镜胃造瘘治疗检索结果

临床问题	系统评价或Meta分析/篇	随机对照研究/篇
PEG、PFG、传统手术3种方法比较	2	21
术后何时开始进食	2	6
是否需要预防性使用抗生素	3	10
不同的瘘管材料	0	2
成本效益分析	3	0

麻醉的造口技术,自1980年应用于临床以来,在美国每年约有16-20万例次的临床操作<sup>[1]</sup>,近年来在国内已逐步开展.通过PEG为丧失吞咽功能或吞咽梗阻患者进行肠内营养,既符合生理状态,与传统开腹胃造瘘的手术相比,又具有安全、便捷、费用低廉的优点,避免了手术风险和创伤,同时其置管时间可长达4年以上.其主要适用于因各种原因导致的不能经口进食、需要长期营养支持及留置鼻胃管超过1 mo,或不耐受鼻胃管患者,包括各种颅脑外伤、脑血管意外、老年性痴呆及脊髓疾病患者。

## 1 材料和方法

1.1 材料 患者,男,58岁,工人,因“车祸后昏迷3年余”入院.患者3年前因车祸致颅脑损伤,行开颅手术清理淤血.术后处于深昏迷状态,丧失意识活动,由专人护理,营养以静脉支持和鼻胃管支持结合,在鼻饲管营养过程中患者曾出现咽炎、鼻窦部感染,出现4次鼻胃管滑脱,考虑患者将长期卧床,不能自行进食,而患者长期静脉营养支持可能导致静脉炎、注射部位感染等并发症,同时鼻饲喂养并发症多,现考虑PEG喂养可能.患者术后体质量下降约15 kg,大小便无明显异常.查体:生命体征稳定,昏迷状态,呼之不应,全身皮肤黏膜无黄染,浅表淋巴结未触及肿大,双肺呼吸音清,未及干湿性罗音,心律齐,各瓣膜区无杂音,腹软,肝脾未触及,肠鸣音正常,双下肢无水肿.辅助检查示血红蛋白87 g/L,肝、肾功能、电解质等无明显异常,胸片无异常。

### 1.2 方法

1.2.1 评估患者的情况并提出问题:患者长期处于昏迷状态,无法自行进食,长期鼻饲喂养容易导致鼻咽喉道黏膜糜烂出血和吸入性肺炎等多种并发症.考虑患者肠道无明显器质性病变,有实施肠内营养的条件,结合患者情况,该患者下一步将采取何种措施支持营养,根据PICO原则,将患者问题转换成可以回答的临床问题形式:(1)哪类患者需要使用胃造瘘?(2)哪种胃造瘘方法

(PEG、PFG、传统手术3种方法)成功率最高,哪种并发症最少?(3)PEG术后何时进食最佳?(4)PEG术前术后是否需要使用抗生素预防感染?(5)哪种有最好的成本效果?

1.2.2 检索策略:按照目前公认的证据强度高,首先查找有关的临床指南、系统评价、Meta分析、多中心大样本随机对照试验.若没有则逐级降低查找单个大样本RCT结果、有对照但未用随机方法分组的研究、无对照的系列病例观察和单个病案等,最后检索有无专家意见.语种限制为英文,研究对象限制为人类.其中系统评价首选Cochrane系统评价并参考疗效评价文献库对系统评价的整理评价,并按照牛津循证医学中心对系统评价的评价标准进行筛选.检索词:percutaneous endoscopic gastrostomy、antibiotic prophylaxis、randomized controlled trials、treatment outcome、time factors、costs and cost analysis、cost-minimization analysis.限定词:human; meta-analysis; randomized controlled trials(RCT); systematic review; practice guideline.

## 2 结果

共检索出与不同问题相关的随机对照试验39篇,系统评价/Meta分析10篇(表1).检索结果如表1所示。

## 3 讨论

根据循证医学的原则,对所有证据的真实性,重要性和实用性进行评价,主要指标包括是否随机、随机分配方案是否隐藏、是否采用盲法及基线情况等,所检索到的证据中绝大部分为高质量的RCT及其SR,混杂因素少,产生偏倚小,因此证据强度高,结论可靠.参照2001年牛津循证医学中心证据分级标准将证据分级.将证据质量分为:A级证据为基于随机对照实验的Meta分析、系统评价和大型随机对照实验;B级证据为高质量病例对照或队列研究及其系统评价;C

级证据为病例对照或队列研究; D级证据为病例报告、系列病例分析和专家意见。

该患者处于深昏迷状态, 不能自主进食, 初期曾给予静脉营养和留置鼻胃管营养(nasogastric tubes, NGT), 但3年内多次出现静脉炎、电解质紊乱及鼻咽、食管黏膜糜烂出血等并发症。结合患者病情, 考虑给予胃造瘘营养支持, 但具体造瘘方法及方案尚待研究。一个纳入高质量随机对照试验的系统评价<sup>[1]</sup>对是否使用胃造瘘进行了研究, 参考指标包括患者生活质量、费用、营养支持效果, 结果显示施行胃造瘘术营养支持比单纯鼻胃管营养支持更为安全, 并取得更好的营养支持效果, 生活质量亦高于单纯使用鼻胃管。Corry等<sup>[2]</sup>进行的一项RCT研究对PEG和NGT的营养支持效果、并发症、患者耐受度、费用进行了比较, 结果显示PEG的营养供应效果、耐受时间及生活质量显著高于NGT( $P < 0.01$ ), 并发症发生率和感染率两者间无显著差别。胃造瘘手术目前可分为传统手术胃造瘘(surgical gastrostomy, SG)、X线透视引导下经皮胃造瘘(radiologically inserted gastrostomy, RIG)和PEG。Wollman等<sup>[3]</sup>的1项纳入5 752例患者的Meta分析对RIG、PEG、SG 3种方法进行了比较, 结果显示RIG的成功率高于PEG(99.2% vs 95.7%,  $P < 0.001$ ), 操作相关死亡率SG显著高于RIG、PEG (2.5% vs 0.3%, 0.53%;  $P < 0.001$ )。Ljungdahl等<sup>[4]</sup>对PEG和SG的安全性和营养支持效果进行了RCT分析, 结果显示PEG操作时间少于SG手术时间(15 min vs 35 min,  $P < 0.001$ ); PEG并发症的发生率低于SG手术(42.9% vs 74.3%,  $P < 0.01$ ); 术后30 d死亡率两组无显著性差异(5.7% vs 14.3%,  $P > 0.05$ )。Hoffer等<sup>[5]</sup>1项RCT研究对RIG和PEG的效果及并发症进行了比较, 结果显示RIG和PEG的成功率分别为100%和91%( $P = 0.014$ ), 操作时间分别为53 min和24 min( $P = 0.001$ ), 在30 d的随访期中, RIG和PEG分别发生33和45例并发症, PEG术后肺炎的发生率高于RIG组( $P = 0.013$ ), 在长期随访中, RIG组瘘管相关并发症发生17例, PEG组发生4例( $P = 0.007$ ), RIG的单个操作和处理费用多于PEG。我们认为RIG和PEG在长期营养支持中各有优劣, RIG有更高的成功率和更少肺炎并发症发生, 但PEG操作时间短、总体费用较低, 而且后期需要更少的瘘管护理。

SG主要适用于在胃肠部施行其他手术的同时留置造瘘管, 单纯开腹造瘘已不常见, RIG和PEG已成为目前胃部造瘘管手术的主流方式, 两

者各有优劣, RIG有更高的成功率和更少肺炎并发症发生, 但PEG操作时间短、总体费用较低, 而且后期需要更少的瘘管护理。鉴于患者病情及经济条件, 建议其行PEG术。

常规认为PEG术后24 h内应行静脉营养支持, 待患者未出现出血、呕吐、窦道渗漏等并发症方可经造瘘管进食, 近年来有人提出应在术后尽早进食, 这样不仅能有效的提高机体的营养状态, 而且可尽早促进消化液和胃肠道激素的分泌, 增加内脏血流, 促进胃肠黏膜生长。究竟术后何时开始初次进食目前争议较多。McCarter等<sup>[6]</sup>进行的RCT实验将患者随机分成术后4 h进食组(A组)和术后24 h进食组(B组), 所有患者术前均预防性使用抗生素, 每4 h喂养1次, 第1天共输入1 000 mL营养物质, 第2天共输入2 200 mL, 当发生胃潴留时停止喂食1次(胃残留物容量>50%胃容积视为胃潴留)。结果显示在开始进食后第1天A组胃潴留发生率为25%, B组为9%( $P = 0.029$ ), 第2天胃潴留率两者无区别, 所有胃潴留在暂停进食后均缓解。在10 d观察期中, 误吸、腹膜炎、出血、造瘘管渗漏等并发症总发生率两组间无显著差异。Stein等<sup>[7]</sup>进行的RCT试验将各40例患者随机分配到术后1 h进食组和术后24 h进食组, 进食方式选择为微泵控制持续输入, 逐日增加输入量, 第1天的输入速度控制为30 mL/h, 第2天为70 mL/h, 第3天为100 mL/h, 观察期间随时观察各种并发症发生情况, 每6 h检查1次胃残留物容积。结果显示: 两组间的最大胃残留物容积无显著差别, 出血、呕吐、呕吐、渗漏等并发症发生率两组间无差别。1篇纳入5个高质量RCT试验的Meta分析<sup>[8]</sup>(Szary)对术后3 h以内进食和术后24 h进食进行了比较, 共355名患者纳入分析, 结果显示两组的术后并发症发生率无显著差( $OR = 0.78$ ; 95%CI: 0.39-1.53;  $P = 0.47$ ), 24 h内胃残留容积无差别( $OR = 1.46$ ; 95% CI: 0.75-2.84;  $P = 0.27$ ), 两者72 h死亡率无差别( $OR = 0.60$ ; 95%CI: 0.18-1.99;  $P = 0.40$ )。Bechtold等<sup>[9]</sup>对术后4 h进食和术后24 h进食进行了Meta分析, 共有6个RCT试验和467例患者纳入该研究, 结果显示两组患者并发症发生率无统计学差异( $OR = 0.86$ ; 95%CI: 0.47-1.58;  $P = 0.63$ ), 72 h内死亡率无统计学差异( $OR = 0.56$ ; 95%CI: 0.18-1.74;  $P = 0.31$ ), 24 h内胃残留容积4 h进食组高于24 h进食组( $OR = 1.80$ ; 95%CI: 1.02-3.19;  $P = 0.04$ )。我们认为4 h内进食和24 h左右进食在并发症和死亡率方面无差异。

#### ■应用要点

采用循证治疗的方法, 为患者制定合理的治疗方案, 以达到控制症状, 提高生存率的目的。

**同行评价**

本文选题新颖, 内容丰富, 结果可靠, 结论正确, 对临床医疗有较好的指导价值。

术后早期进食是一种安全、有效、可耐受的选择, 早期和24 h后进食在并发症发生率上无显著差别, 他在更早恢复肠道功能的同时, 还可减少住院时间和降低费用。建议患者在术后3-4 h即可少量进食。

近年来随着各种耐药现象的出现, 抗生素的使用指征也受到了更多关注, 有学者认为在某些操作前预防性使用抗生素不仅增加了费用, 而且可能导致耐药现象的出现, 在PEG术前是否需要预防性使用抗生素同样存在着争议。胃造瘘最常见的并发症是口缘端感染, Gossner等<sup>[10]</sup>进行的RCT研究将347例患者随机分到3组, 第1组为术前预防性使用2 g头孢噻肟, 第2组预防性使用4 g哌拉西林和0.5 g他唑巴坦, 第3组不使用抗生素, 口缘端感染程度分为4级, I-III度为轻度感染, IV度为严重感染。结果显示抗生素组的总感染评分显著低于未使用抗生素组( $P < 0.01$ )。第3组中III度感染发生率显著高于第1组和第2组( $P < 0.001$ )。第3组中有3例患者发生腹膜炎, 而抗生素使用组无腹膜炎发生。Radhakrishnan等<sup>[11]</sup>的RCT试验将患者随机分为3组, A组术前静滴头孢唑啉750 mg, 术后8 h和术后16 h分别再次静滴1次, B组患者仅在切开部位行聚维酮碘喷洒消毒, C组患者结合使用A组合B组的处理措施。结果显示3 d后B组总感染率为32%, A组为6%, C组为9%(3组间比较 $P = 0.0114$ ), 1 wk后B组总感染率为43%, A组为11%, C组为3%( $P = 0.003$ )。作者认为使用抗生素效果好于单纯聚维酮碘喷洒, 两者结合效果最好。1篇Meta分析<sup>[12]</sup>(含10篇高质量RCT研究, 1 059例患者)对是否预防性使用抗生素进行了评价, 结果表明预防性使用抗生素可使感染相对风险降低64%, 绝对风险降低15%, 其中预防性使用头孢菌素可使相对风险降低64%, 绝对风险降低10%, 使用青霉素可使相对风险降低62%, 绝对风险降低13%。Lipp的1篇Meta分析共纳入1 100名患者, 结果显示预防性使用抗生素可显著性减少造瘘口的感染( $OR = 0.31$ ; 95%CI: 0.22-0.44), 感染率可降低19%。Sharma等<sup>[13]</sup>的Meta分析结果显示, 使用抗生素后感染的相对风险和绝对风险分别减少73%和17.5%, 术前30 min静脉使用广谱抗生素可降低感染总发生率。

因此, 术前静脉使用抗生素可降低感染总发生率, 建议在术前及术后3 d静滴抗生素, 以广谱三代头孢类抗生素为主。

目前使用最为广泛的造瘘管材质是硅酮聚合物和聚氨基甲酸乙酯, Blacka等<sup>[14]</sup>对使用硅

酮聚合物造瘘管和聚氨基甲酸乙酯造瘘管效果进行比较, 共有138例患者纳入该研究, 结果显示两组平均置管期分别为377.2 d(CI: 326-428)和436.8 d(CI: 383-490;  $P = 0.13$ ); 硅酮聚合物管的真菌感染率高于聚氨基甲酸乙酯管(61.8% vs 29%,  $P < 0.001$ ); 硅酮聚合物管的管道变形率高于聚氨基甲酸乙酯管(40.8% vs 6.5%,  $P < 0.005$ ); 硅酮聚合物管的可逆性管道堵塞发生率高于聚氨基甲酸乙酯管(30% vs 16.1%,  $P < 0.005$ ); 硅酮聚合物管的不可逆性管道堵塞发生9例, 堵塞率显著高于聚氨基甲酸乙酯管的1例( $P < 0.001$ )。硅酮聚合物管组有69.7%患者出现瘘口附近皮肤红斑和粗大肉芽组织形成, 聚氨基甲酸乙酯管组为41.9%( $P = 0.002$ )。我们认为硅酮聚合物管比聚氨基甲酸乙酯管在使用中更易于出现真菌感染和管道堵塞, 需要进行更多次的管道更换和其他医学处理。Van等<sup>[15]</sup>进行的RCT对使用不同材料的造瘘管进行了比较, 其中50例患者使用聚氨基甲酸乙酯, 56例患者使用聚硅酮, 术后1 wk各有两名患者出现严重并发症(RS = 1.1; 95%CI: 0.11-11), 总并发症前者出现4次, 后者出现17次(RS = 3.8; 95%CI: 1.37-10.5)。长期随访显示使用聚氨基甲酸乙酯患者无并发症时间为916 d, 使用聚硅酮患者无并发症时间为354 d( $P = 0.24$ ), 我们认为, 使用聚氨基甲酸乙酯造瘘管短期内总并发症发生率较低, 但严重并发症和长期效果两者无显著差别。

少量的RCT试验显示聚氨基甲酸乙酯材质的造瘘管具有真菌感染率低、变形率低、不易堵塞、置管时间长的优点, 虽然价格较硅酮聚合物高, 但综合考虑建议使用聚氨基甲酸乙酯材质造瘘管。

Barkmeier等<sup>[16]</sup>对SG、RIG、PEG 3种置管方式进行了成本研究, 结果显示3组成本分别为3 694美元、1 985美元、1 862美元( $P = 0.02$ )。SG成本显著高于RIG和PEG( $P = 0.0001$ )。Callahan对患者PEG术后的成本进行了1年前瞻性队列研究, 共纳入105例患者, 置管后每日平均成本为87.21美元(中位数33.5), 置管后1年内的营养成本约为31 832美元(中位数12 227美元), 其中置管手术成本占29.4%, 营养成本占24.9%, 各种并发症的处理成本占33.4%。Sartori等<sup>[17]</sup>对34例头颈部肿瘤患者进行PEG术后的成本进行了研究, 成本分为3大部分, 一为手术期间材料、麻醉、抗感染、抗分泌药物成本; 二为营养成本; 三为护理成本。对患者随访至患者停止

使用PEG, 操作过程中未出现死亡及严重并发症, 术后60 d有3名患者因原发性疾病死亡, 17例患者进行门诊护理, 11例患者转为家庭护理, 平均PEG使用时间为180 d(47-639), 2例患者在随访期出现伤口感染, 抗生素处理后治愈, 每日平均成本24.06马克(其中处置费为2.08马克, 营养费为20.42马克, 护理费为1.56马克), 总成本稍高于经鼻胃管营养法(每天约22.78马克), 两者无统计学差异。结合PEG法可显著改善生活质量, 作者认为是对肿瘤患者行PEG营养支持具有最佳的成本效果。

目前仅有少数国外的初步研究报道经皮内镜胃造瘘术的成本效果比, 而国内尚无相关研究报道。由于国情不同, 价格水平和医疗保险体制等方面均存在差异, 这些结果对我国OGIB患者的诊治仅具有一定的参考价值, 尚须进行进一步的相关研究。

根据上述证据, 为该患者制定如下治疗方案: (1)麻醉状态下行经PEG。术中选用聚氨酯甲酸乙酯管材质胃造瘘管; (2)术前禁食8 h, 术前1 h给予头孢噻肟2 g静滴, 术后继续使用3 d预防感染(每日静滴1次, 2 g/次); (3)术后4 h经造瘘管给予流质营养, 从少许等渗温葡萄糖盐水开始, 逐步增加肠内营养的质和量, 每次注入量不宜太多, 5 d后开始每天进食4次, 每次注入营养液250 mL, 生理盐水或温开水50 mL; (4)术后3 d常规行止血、护胃治疗。监测生命体征。患者采纳医院制定的治疗方案, 每次进食前后都用50 mL清水冲洗造瘘管, 每日应用长棉签清洁官腔的碎屑。每日用2%碘伏消毒造瘘管周围皮肤2次。

#### 4 参考文献

- 1 Paleri V, Patterson J. Use of gastrostomy in head and neck cancer: a systematic review to identify areas for future research. *Clin Otolaryngol* 2010; 35: 177-189
- 2 Corry J, Poon W, McPhee N, Milner AD, Cruickshank D, Porceddu SV, Rischin D, Peters LJ. Randomized study of percutaneous endoscopic gastrostomy versus nasogastric tubes for enteral feeding in head and neck cancer patients treated with (chemo)radiation. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2008; 52: 503-510
- 3 Wollman B, D'Agostino HB, Walus-Wigle JR, Easter DW, Beale A. Radiologic, endoscopic, and surgical gastrostomy: an institutional evaluation and meta-analysis of the literature. *Radiology* 1995; 197: 699-704
- 4 Ljungdahl M, Sundbom M. Complication rate lower after percutaneous endoscopic gastrostomy than after surgical gastrostomy: a prospective, randomized trial. *Surg Endosc* 2006; 20: 1248-1251
- 5 Hoffer EK, Cosgrove JM, Levin DQ, Herskowitz MM, Sclafani SJ. Radiologic gastrojejunostomy and percutaneous endoscopic gastrostomy: a prospective, randomized comparison. *J Vasc Interv Radiol* 1999; 10: 413-420
- 6 McCarter TL, Condon SC, Aguilar RC, Gibson DJ, Chen YK. Randomized prospective trial of early versus delayed feeding after percutaneous endoscopic gastrostomy placement. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 419-421
- 7 Stein J, Schulte-Bockholt A, Sabin M, Keymling M. A randomized prospective trial of immediate vs. next-day feeding after percutaneous endoscopic gastrostomy in intensive care patients. *Intensive Care Med* 2002; 28: 1656-1660
- 8 Szary NM, Arif M, Matteson ML, Choudhary A, Puli SR, Bechtold ML. Enteral feeding within three hours after percutaneous endoscopic gastrostomy placement: a meta-analysis. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: e34-e38
- 9 Bechtold ML, Matteson ML, Choudhary A, Puli SR, Jiang PP, Roy PK. Early versus delayed feeding after placement of a percutaneous endoscopic gastrostomy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2919-2924
- 10 Gossner L, Keymling J, Hahn EG, Ell C. Antibiotic prophylaxis in percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG): a prospective randomized clinical trial. *Endoscopy* 1999; 31: 119-124
- 11 Radhakrishnan NV, Shenoy AH, Cartmill I, Sharma RK, George R, Foster DN, Quest L. Addition of local antiseptic spray to parenteral antibiotic regimen reduces the incidence of stomal infection following percutaneous endoscopic gastrostomy: A randomized controlled trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 1279-1284
- 12 Jafri NS, Mahid SS, Minor KS, Idstein SR, Hornung CA, Galandiuk S. Meta-analysis: antibiotic prophylaxis to prevent peristomal infection following percutaneous endoscopic gastrostomy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 647-656
- 13 Sharma VK, Howden CW. Meta-analysis of randomized, controlled trials of antibiotic prophylaxis before percutaneous endoscopic gastrostomy. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3133-3136
- 14 Blacka J, Donoghue J, Sutherland M, Martincich I, Mitten-Lewis S, Morris P, Meredith G. Dwell time and functional failure in percutaneous endoscopic gastrostomy tubes: a prospective randomized-controlled comparison between silicon polymer and polyurethane percutaneous endoscopic gastrostomy tubes. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 875-882
- 15 Van Den Hazel SJ, Mulder CJ, Den Hartog G, Thies JE, Westhof W. A randomized trial of polyurethane and silicone percutaneous endoscopic gastrostomy catheters. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1273-1277
- 16 Barkmeier JM, Trerotola SO, Wiebke EA, Sherman S, Harris VJ, Snidow JJ, Johnson MS, Rogers WJ, Zhou XH. Percutaneous radiologic, surgical endoscopic, and percutaneous endoscopic gastrostomy/gastrojejunostomy: comparative study and cost analysis. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1998; 21: 324-328
- 17 Sartori S, Trevisani L, Tassinari D, Gilli G, Nielsen I, Maestri A, Abbasciano V. Cost analysis of long-term feeding by percutaneous endoscopic gastrostomy in cancer patients in an Italian health district. *Support Care Cancer* 1996; 4: 21-26

编辑 李军亮 电编 张洋

# 经胃内镜肝囊肿开窗术治疗肝囊肿1例

陈世耀, 曾晓清, 马丽黎, 高虹, 王剑, 周平红, 徐美东, 王萍, 王红美, 姚礼庆

## ■背景资料

经自然腔道内镜下手术在动物实验中证明了其可行性和安全性, 在人体中也初步证实是一种可行的操作方法。

陈世耀, 曾晓清, 高虹, 王剑, 复旦大学附属中山医院消化科上海市 200032

陈世耀, 马丽黎, 周平红, 徐美东, 王萍, 王红美, 姚礼庆, 复旦大学附属中山医院内镜诊疗研究所 上海市 200032

作者贡献分布: 研究过程由陈世耀与姚礼庆操作完成; 陈世耀与曾晓清负责文章的撰写; 马丽黎、高虹、王剑、周平红及徐美东负责文章材料的收集与整理; 王萍与王红美负责内镜操作器械准备与操作配合。

通讯作者: 姚礼庆, 主任医师, 200032, 上海市, 复旦大学附属中山医院内镜诊疗研究所. yao.liqin@zs-hospital.sh.cn  
电话: 021-64041990

收稿日期: 2011-04-06 修回日期: 2011-05-28

接受日期: 2011-06-10 在线出版日期: 2011-07-18

## Transgastric endoscopic fenestration of a hepatic cyst: a report of one case

Shi-Yao Chen, Xiao-Qing Zeng, Li-Li Ma, Hong Gao, Jian Wang, Ping-Hong Zhou, Mei-Dong Xu, Ping Wang, Hong-Mei Wang, Li-Qing Yao

Shi-Yao Chen, Xiao-Qing Zeng, Hong Gao, Jian Wang, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Shi-Yao Chen, Li-Li Ma, Ping-Hong Zhou, Mei-Dong Xu, Ping Wang, Hong-Mei Wang, Li-Qing Yao, Endoscopy Center, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Li-Qing Yao, Endoscopy Center, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China. yao.liqin@zs-hospital.sh.cn

Received: 2011-04-06 Revised: 2011-05-28

Accepted: 2011-06-10 Published online: 2011-06-28

## Abstract

We present a case of transgastric endoscopic fenestration of a symptomatic simple hepatic cyst in the left lobe. After per-oral intubation, the anterior wall of the stomach was punctured with a needle. After the anatomic location was defined by intraperitoneal endoscopic ultrasound, fenestration was performed by gastric endoscopy. The procedure was successfully performed without any difficulties. The patient had an uncomplicated postoperative course. This method is technically feasible and represents a potential new approach to the treatment of simple hepatic cysts.

Key Words: Hepatic cyst; Fenestration; Gastric endoscopy

## ■同行评议者

邱伟华, 副主任医师, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

Chen SY, Zeng XQ, Ma LL, Gao H, Wang J, Zhou PH, Xu MD, Wang P, Wang HM, Yao LQ. Transgastric endoscopic fenestration of a hepatic cyst: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2190-2193

## 摘要

本例患者肝囊肿位于肝左叶, 我们采用经胃镜胃壁切开、腹腔内超声内镜明确诊断和解剖关系、肝囊肿开窗引流、缝合胃壁切口, 最终获得预期效果。应用自然腔道内镜下手术(NOTES)处理肝囊肿, 为肝囊肿处理提供了新的可供选择的手段, 为NOTES处理诸多争议积累了一份证据。

关键词: 肝囊肿; 开窗术; 经胃内镜

陈世耀, 曾晓清, 马丽黎, 高虹, 王剑, 周平红, 徐美东, 王萍, 王红美, 姚礼庆. 经胃内镜肝囊肿开窗术治疗肝囊肿1例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(20): 2190-2193

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2190.asp>

## 0 引言

经自然腔道内镜下手术(natural orifice transluminal endoscopic surgery, NOTES)是一项内镜技术的突破。目前已经在动物实验取得广泛成功。本文报道1例经胃内镜肝囊肿开窗术, 为肝囊肿提供一种新的治疗方式。

## 1 病例报告

女, 46岁。因“反复中上腹隐痛3 wk”入院。患者3 wk前出现中上腹痛, 至当地医院就诊, 查胃镜提示: 胃黏膜下肿瘤。复旦大学附属中山医院查超声胃镜见胃底胃壁外无回声占位, 考虑肝脏左叶囊肿。查体T: 36.9 °C, BP: 118/80 mmHg。全身皮肤无黄染。腹部平软, 肝脾肋下未及, 无包块。辅助检查: 血常规、凝血功能、肝功能、血AFP均正常。B超: 肝囊肿(肝右叶膈顶见14 mm × 14 mm无回声区, 肝左外叶后缘见29 mm × 24 mm无回声区)。CT: 肝囊肿(肝脏左叶外侧段及右后上叶低密度灶, 直径分别为3.6 cm, 1.4 cm), 增强未见明显强化。

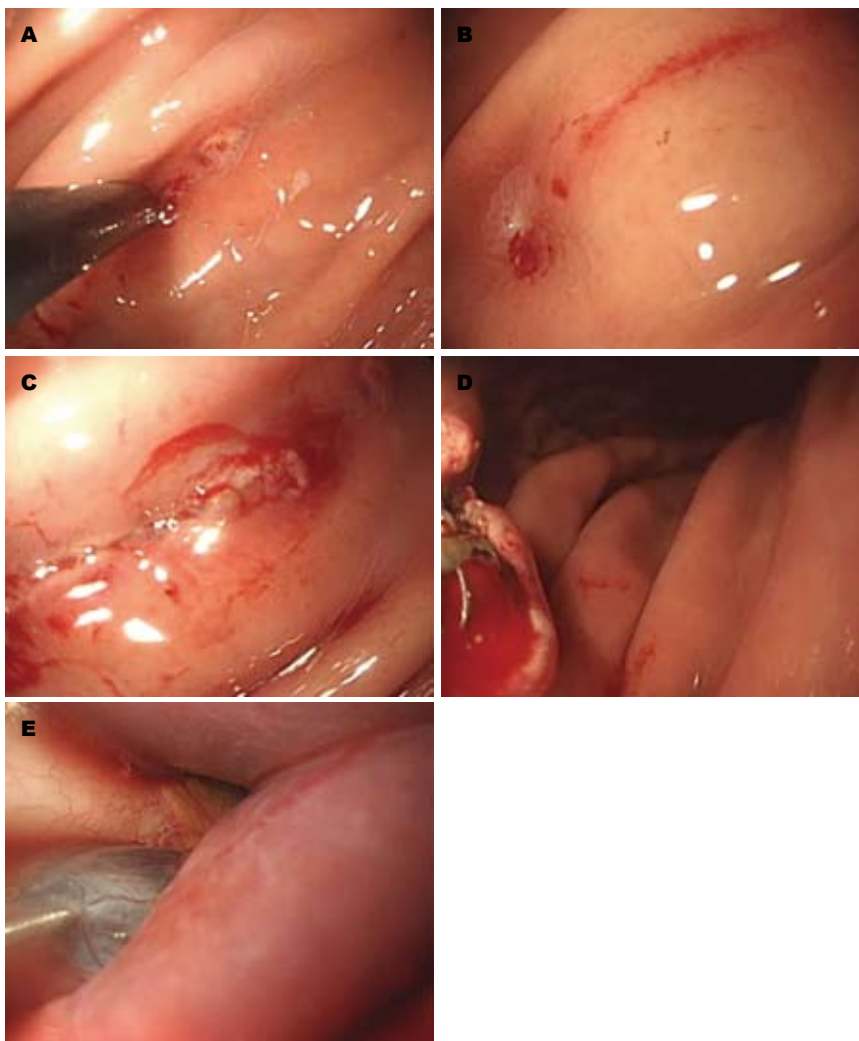


图1 经胃内镜肝囊肿开窗术. A: 选择切开部位: 胃体前壁; B: 标记切开位置; C: 电刀切开胃壁; D: 创面止血; E: 穿刺囊肿, 抽出清亮囊液.

■相关报道  
国内已有报道成功采用经胃内镜行胃窦至胃体上部前壁外巨大肝囊肿的开窗术.

经伦理委员会讨论通过同意行经胃内镜肝囊肿开窗术. 向患者详细叙述手术步骤, 充分解释各项可能意外与并发症, 同时说明可供选择的其他治疗方法. 患者与家属慎重考虑, 签署知情同意书, 决定行经胃镜肝囊肿开窗术. 术前常规胸片、心电图、血常规、血生化及凝血功能等检查, 明确无手术及麻醉禁忌. 术前12 h禁食水. 术前30 min予罗氏芬、奥硝唑预防感染治疗.

手术内镜为Olympus GIF-2TQ260M型, 内镜主机为Olympus 260主机, 超声内镜为EUS2000型, 采用带球囊小探头. 操作配件包括透明帽、注射针、钩刀、热活检钳、金属镊等配件. 非一次性器械均经戊二醛10 h或环氧乙烷严格灭菌处理. 使用器械均为有SDA批号的现有内镜器械.

手术在腹腔镜检查室进行, 术前腹腔镜检查室紫外灯照射消毒. 患者取仰卧位, 常规气管插管全身麻醉, 给予阿托品减少分泌物和胃腔蠕动, 先行胃镜常规检查, 吸尽食管胃残留液体和分泌物, 应用生理盐水充分清洗食管与胃腔.

更换内镜, 进入胃腔后选择胃体大弯偏前壁作为切开点(图1A), 相距2 cm予氩气刀标志, 钩刀切开标志点之间1.5 cm(图1B), 黏膜切开后直接全程切开(图1C), 热活检钳处理渗血(图1D). 切开足够后通过插入和旋转将内镜推入腹腔, 充分注气后直接观察肝脏表面和周围结果, 发现肝左外叶圆形囊性隆起, 大小约3.5 cm. 置入带球囊超声小探头(频率20 MHz)置于隆起表面, 可探及无回声占位, 与肝脏组织分界处囊壁清晰. 采用注射针抽取囊液(图1E), 呈清亮状. 更换钩刀切开表面囊肿壁, 清亮液体流出, 引流通畅, 囊肿萎缩. 吸尽腹腔内残留血液和液体, 检查无出血, 吸尽腹腔内气体, 将胃镜退出胃壁至胃腔内, 以金属镊完全缝合切口, 注气检查创面无渗血和漏气, 吸尽胃腔气体退出内镜, 置入鼻胃管, 手术结束. 操作全程耗时40 min, 术中无明显出血, 未输血制品.

术后患者安返消化科病房, 胃肠减压48 h拔除, 罗氏芬、奥硝唑预防感染, 奥美拉唑抑酸治疗、营养支持治疗3 d. 术后第3天停静脉补液,

### ■应用要点

本文运用NOTES处理肝囊肿,为肝囊肿处理提供了新的可供选择的手段,为NOTES手术诸多争议积累了一份证据。随着研究的深入、技术的革新和临床经验的积累,NOTES临床应用将更具前景。

改口服抑酸治疗。

术后疼痛评估1分(0-10分主观疼痛评分系统),未使用止痛药。术后3 d进食流质,7 d出院。术后生化检查:术后第2、3、4天随访白细胞、血沉、CRP无明显改变。术后7 d复查CT示肝左叶囊肿消失。术后随访至今(60 d),无中上腹痛,生活质量佳,复查B超肝左叶囊肿消失。

## 2 讨论

肝囊肿是一种较常见的肝脏良性疾病,分为寄生虫性和非寄生虫性,前者肝棘球蚴病较为多见,后者又可以分为先天性、创伤性、炎症性和肿瘤性。临床常见的是先天性肝囊肿,其发生可能是肝内迷走胆管与淋巴管在胚胎期的发育障碍或局部淋巴管因炎性上皮增生阻塞,导致管腔内分泌物潴留所致。可分为单发性和多发性两种。肝囊肿可发生于任何年龄,多见于20-50岁。男女发生率为1:4,多数发生于肝右叶。囊肿大小不等,囊壁一般较薄,囊壁内层上皮细胞为柱状、立方、扁平或缺如,外层为胶原样组织。囊液一般澄清透明,不含胆汁。先天性肝囊肿在正常人群中检出率为2.5%-5.0%,生长缓慢,大多数肝囊肿患者没有症状,多通过超声、CT等影像学或手术中发现。然而,15%的患者当囊肿逐渐增大,压迫肝脏及邻近脏器时出现症状,包括腹部不适、腹痛、腹部肿块、黄疸、门脉高压等。

一般认为直径 $\leq 4.5$  cm的单发性肝囊肿可暂不予治疗,因单发性肝囊肿恶变可能性很小,可采用B超随访。直径 $\geq 4.5$  cm或有症状患者可予治疗。临床上治疗非寄生虫性肝囊肿目前的主要治疗方法有两种:一种是在B超或CT引导下行囊肿穿刺抽液治疗,囊肿抽液术创伤小,但仅能暂时缓解症状,且容易复发,据报道肝囊肿穿刺抽液后复发率高达100%。近年来更常用方法是在抽吸囊液的同时注入硬化剂或无水乙醇等,以此破坏具有分泌功能的囊壁上皮细胞,从而减少复发率至20%左右<sup>[1]</sup>。而且此方法可以反复多次操作以增强治疗效果。另一种是手术治疗,分为腹腔镜手术和开腹手术,手术方式有囊肿开窗术、内引流术、囊肿切除术或肝部分切除术。开窗术通过去除一部分囊肿壁,使囊内液体可以流入腹腔,通常适用于位于肝脏表面的囊肿。腹腔镜下肝囊肿开窗手术因其创伤小,且保证治疗效果,目前已经成为代替手术治疗的手段之一。

20世纪90年代末Anthony Kalloo教授提出了“经口经胃壁腹腔镜技术”的观念。2005年美国消化内镜学会和美国胃肠内镜外科学会的专家小组正式提出了NOTES的新概念。目前绝大多数自然开口腔内镜的手术案例限于动物实验研究。国内已有报道成功采用经胃内镜行胃窦至胃体上部前壁外巨大肝囊肿的开窗术<sup>[2]</sup>。但关于这项技术仍有许多问题存在争议:如对空腔脏器及切开部位如何选择<sup>[3]</sup>。采用何种方式确切关闭空腔脏器的切口,术中如何精确操作、充分暴露及严密止血,如何避免内镜或手术标本对自然腔道的损伤,如何预防和控制感染,对于漏的发生如何有效预防等<sup>[4-6]</sup>。

选择切口位置进入腹腔时需要考虑离手术区域近,避免损伤邻居器官以及切口闭合难度。经胃手术大部分研究者借鉴经皮内镜胃造瘘术(percutaneous endoscopic gastrostomy-like, PEG)<sup>[7]</sup>,经胃前壁大弯进入腹腔,先行穿刺,再使用气囊将穿刺点扩张至18 mm。该部位,其壁外为腹壁,没有肝脏或其他脏器覆盖。本例手术选择胃体大弯前壁作为切开部位,使用钩刀切开胃壁,热活检钳止血。

肝囊肿切开时最常见问题是出血和胆瘘。出血常常是肝脏损伤的表现,胆汁性腹膜炎是囊肿与胆管相通的结果。本例患者首先穿刺抽吸囊液清亮,无血性囊性和胆汁,采用切开刀开窗手术,直接引流到腹腔。一旦术中发现穿刺液为黄色,考虑囊肿与胆管相通,可以采用与B超引导下穿刺注射无水酒精相同的办法在抽吸完囊液后注射无水酒精破坏囊壁,达到根治的目的,需要注意无水酒精不能流入腹腔,注射后放置5-10 min后抽出。另一种办法为采用氩气刀彻底处理囊壁,或者更换为腹腔镜手术切除囊壁。

预防感染是NOTES面临的主要问题之一。胃壁切开前胃腔清洗、内镜器械和附件的消毒、减少或者避免术中腹腔内灌注、术中术后抗生素应用等可有效预防术后感染的发生。本例NOTES中我们对所有器械和操作场地进行严格消毒,术中保持无菌操作,手术前30 min开始静脉滴注头孢曲松2.0 g及奥硝唑500 mg,术后患者未发生腹腔及胃壁切口的感染。

动物实验显示经胃和经结肠NOTES腹腔镜和腹膜内超声相结合(NOTES-EUS)的方法是安全的、可行的、并可提供足够的视野<sup>[8]</sup>。在2010 DDW会议上分别有两项动物研究在NOTES中,分别对胰腺及肝脏组织进行超声探查。通过

EUS-NOTES可以到达胰腺前后区域, 从而能更好地提高腹腔疾病的诊断和内镜治疗<sup>[9,10]</sup>. 本例患者中通过带水囊的小探头进入腹腔评估肝囊肿的诊断及与肝脏及周围血管的关系.

NOTES手术作为新兴的微创技术具有痛苦小、恢复快等优点. EUS可以作为NOTES的一种补充设备. 目前大多为动物实验, 人体开展仍需积累更多经验. 本例NOTES处理肝囊肿, 为肝囊肿处理提供了新的可供选择的手段, 为NOTES手术诸多争议积累了一份证据. 随着研究的深入、技术的革新和临床经验的积累, NOTES临床应用将更具前景.

### 3 参考文献

- 1 Erdogan D, van Delden OM, Rauws EA, Busch OR, Lameris JS, Gouma DJ, van Gulik TM. Results of percutaneous sclerotherapy and surgical treatment in patients with symptomatic simple liver cysts and polycystic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3095-3100
- 2 王东, 陈丹磊, 于恩达, 吴仁培, 杨丽, 郑永志, 李兆申. 经胃内镜肝囊肿开窗术. *中国实用外科杂志* 2009; 29: 440-443
- 3 Ko CW, Shin EJ, Buscaglia JM, Clarke JO, Magno P, Giday SA, Chung SS, Cotton PB, Gostout CJ, Hawes RH, Pasricha PJ, Kalloo AN, Kantsevov SV. Preliminary pneumoperitoneum facilitates transgastric access into the peritoneal cavity for natural orifice transluminal endoscopic surgery: a pilot study in a live porcine model. *Endoscopy* 2007; 39: 849-853
- 4 Swanstrom LL, Kozarek R, Pasricha PJ, Gross S, Birkett D, Park PO, Saadat V, Ewers R, Swain P. Development of a new access device for transgastric surgery. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1129-1136; discussion 1129-1136
- 5 Hochberger J, Lamadé W. Transgastric surgery in the abdomen: the dawn of a new era? *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 293-296
- 6 郑永志, 王东, 李兆申. 经自然腔道内镜手术. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1753-1758
- 7 Kantsevov SV, Jagannath SB, Niiyama H, Isakovich NV, Chung SS, Cotton PB, Gostout CJ, Hawes RH, Pasricha PJ, Kalloo AN. A novel safe approach to the peritoneal cavity for per-oral transgastric endoscopic procedures. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 497-500
- 8 Voermans RP, van Berge Henegouwen MI, Bemelman WA, Fockens P. Feasibility of transgastric and transcolonic natural orifice transluminal endoscopic surgery peritoneoscopy combined with intraperitoneal EUS. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: e61-e67
- 9 Saftoiu A, Vilmann P, Surlin V, Fleming JB, Uthamanthil RK, Rimbis M, Singh H, Bektas M, Bhutani MS. Feasibility study of EUS-NOTES as a novel approach for pancreatic cancer staging and therapy: an international collaborative study. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: AB222-AB223
- 10 Fyock C, Kirtane T, Forsmark C, Wagh M. Intraoperative NOTES Endosonography and Identification of Mock Hepatic Lesions. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: AB321

### ■同行评价

本文学术性较好, 为NOTES的临床应用提供了有力的证据.

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》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

# 《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (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。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册,免费获取PDF等格式的全文,切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具,编委、作者和读者利益的最大化的目标,努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元,全年2016.00元,邮发代号82-262,由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章,具体内容涉及:食管疾病,如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等;胃部疾病,胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等;肠道疾病,如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等;肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等;胰腺疾病,如胰腺炎和胰腺癌等;全身性疾病涉及消化系统,如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等;以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等);除以上外,本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和

中国知识资源总库收录。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。

1.2 栏目 述评,基础研究,临床研究,焦点论坛,文献综述,研究快报,临床经验,病例报告,会议纪要。文稿应具有科学性、先进性、可读性及实用性,重点突出,文字简练,数据可靠,写作规范,表达准确。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式,GB6447文摘编写规则,GB7714文后参考文献著录规则,GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求;同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中fengstroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$ , WBC数用 $1 \times 10^9/L$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量 $\gamma$ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wcyj@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希腊文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希腊文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则<sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01; 第三套为<sup>e</sup>*P*<0.05, <sup>f</sup>*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

### 3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcyj@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上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. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

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。期刊: 序号, 作者(列出全体作者)。文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

## 6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2011年国内国际会议预告

- 2011-07-22/24  
第四届全国脂肪肝病专题研讨会  
会议地点: 重庆市  
联系方式: 010-85867619
- 2011-07-25/29  
2011年第四届全国糖尿病及其并发症营养治疗新进展学习班  
会议地点: 上海市  
联系方式: tangyan8503@yahoo.cn
- 2011-07-29/30  
肝脏疾病转化医学论坛(长春)暨第三届长春国际肝病高峰论坛  
会议地点: 长春市  
联系方式: gbgflt@yahoo.cn
- 2011-08-04/07  
第五届中国肿瘤内科大会  
会议地点: 北京市  
联系方式: 010-87788701
- 2011-08-20/22  
第十五次全国中西医结合儿科学术会议  
会议地点: 兰州市  
联系方式: zxyek@sina.com
- 2011-08-31/09-02  
腹腔间室综合症的护理进展  
会议地点: 延吉市  
联系方式: qiyan68@126.com
- 2011-09  
中华医学会超声医学分会第十一次全国超声医学学术会议  
会议地点: 青岛市  
联系方式: <http://www.nccsum.org/>
- 2011-09-14/17  
第六届全国疑难及重症肝病大会  
会议地点: 兰州市  
联系方式: office@cnsld.org
- 2011-09-14/18  
第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会  
会议地点: 福州市  
联系方式: 010-67726451
- 2011-09-16/18  
第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会  
会议地点: 济南市  
联系方式: xiaohuahuiyi@126.com
- 2011-09-24  
2011中国消化病学大会  
会议地点: 北京  
联系方式: 010-51292005-105
- 2011-09-25/26  
2011北京消化内镜节  
会议地点: 北京市  
联系方式: 010-51292005-105
- 2011-10-07/09  
第八届亚太肝病学会主题会议  
会议地点: 北京市  
联系方式: info@apaslstc.org
- 2011-10-13/16  
2011年亚太地区国际肿瘤生物学和医学学术会议  
会议地点: 上海市  
联系方式: clinimmunchina@yahoo.com
- 2011-10-14/16  
中华医学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国热带病学术会议  
会议地点: 重庆市  
联系方式: www.nccsid.org
- 2011-10-21/23  
中华医学会病理学分会第十七次学术会议  
会议地点: 杭州市  
联系方式: leighdai@cma.org.cn
- 2011-11-18/23  
第十一届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2011年全国内镜/介入/放疗新技术国际论坛  
会议地点: 北京市  
联系方式: doctor302@163.com
- 2011-11-25/27  
2011年全国消化道静脉曲张及其伴发消化疾病内镜诊治研讨会  
会议地点: 西安市  
联系方式: 2011varices@sina.com
- 2011-12-08/11  
第11次全国消化系疾病学术会议  
会议地点: 杭州市  
联系方式: csgdabstract@126.com
- 2011-12-09/11  
江苏省第四次胃肠外科学术会议  
会议地点: 南京市  
联系方式: jswwk@yahoo.com.cn

## 志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈国忠 副主任医师

广西中医学院第一附属医院消化内科

陈钟 主任医师

南通大学附属医院普外科

单云峰 副主任医师

温州医学院附属第一医院肝胆外科

葛海燕 教授

同济大学附属第十人民医院普通外科

郭晓钟 教授

中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

郝立强 副教授

上海长海医院普外二科

何晓顺 教授

中山大学附属第一医院器官移植科

黄晓东 主任医师

武汉市中心医院消化内科

李淳 副教授

汕头大学医学院病理教研室

李华山 主任医师

中国中医科学院广安门医院肛肠科

李永翔 主任医师

安徽医科大学第一附属医院普外科

陆云飞 教授

广西医科大学第一附属医院胃肠外科

吕宾 教授

浙江中医学院附属医院消化科

朴云峰 教授

吉林大学第一附属医院消化科

谭晓冬 副教授

中国医科大学盛京医院胰腺甲状腺外科

汤朝晖 副主任医师

中山大学附属第一医院肝胆外科

汤恢煊 教授

湖南省长沙市中南大学湘雅医院普外科

唐世刚 教授

大连大学附属中山医院内科

田晓峰 教授

大连医科大学附属第二医院普通外科

王炳元 教授

中国医科大学附属第一医院消化内科

王德盛 副教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

王志刚 副主任医师

上海市第六人民医院普外科

王忠裕 教授

大连医科大学附属第一医院普通外科二科

魏继福 副研究员

江苏省人民医院中心实验室

吴君 主任医师

贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

徐辉雄 教授

同济大学附属第十人民医院超声科

徐泱 副教授

上海复旦大学附属中山医院肝肿瘤外科

张进祥 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院急诊外科

张力为 主任医师

新疆医科大学第一附属医院胸外科