

肝细胞癌的分子靶向治疗

张文杰, 禄韶英

张文杰, 禄韶英, 西安交通大学医学院第一附属医院普通外科 陕西省西安市 710061
禄韶英, 副教授, 副主任医师, 医学博士, 硕士生导师, 主要从事消化系统肿瘤和血管外科的临床工作。
通讯作者: 禄韶英, 副教授, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学第一附属医院普通外科, robertlu@mail.xjtu.edu.cn
电话: 029-85323875
收稿日期: 2010-11-12 修回日期: 2011-01-10
接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-08

Advances in molecularly targeted therapy of hepatocellular carcinoma

Wen-Jie Zhang, Shao-Yin Lu

Wen-Jie Zhang, Shao-Yin Lu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Associate Professor Shao-Yin Lu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. robertlu@mail.xjtu.edu.cn

Received: 2010-11-12 Revised: 2011-01-10

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a fatal disease that represents the fifth most common human cancer. Although remarkable progress has been achieved in HCC treatment in China, the overall incidence and mortality rates of HCC show no obvious changes. Pharmacological treatment can not improve the prognosis of patients with unresectable HCC. This emphasizes the need to identify new targets for early diagnosis, chemoprevention, and treatment of the disease. An effort to understand the molecular mechanisms responsible for tumor initiation and progression has led to the identification of several potential molecular targets for HCC. The majority of these targets are involved in receptor tyrosine kinase-activated pathways, such as the Raf/MEK/ERK, PI-3K/Akt/mTOR, and Jak/Stat pathways. Sorafenib is a multikinase inhibitor that has attracted wide attention. This review describes the potential targets for HCC and recent progress in targeted therapy of the disease.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Molecularly targeted therapy; Sorafenib; Sunitinib

Zhang WJ, Lu SY. Advances in molecularly targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 331-337

摘要

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是人类第5大恶性肿瘤, 死亡率极高。在我国, HCC的治疗已取得显著进展, 但总体发病率和死亡率尚无明显改观, 对于不适宜手术切除的晚期HCC, 现有的药物治疗并不能改善患者预后, 进一步提高疗效仍面临严峻挑战。所以, 发现新的靶向治疗药物或新的靶点对HCC的早期诊断、化学预防以及治疗显得尤为重要。目前从对HCC发生、发展的分子机制的研究中, 人类已发现了多个潜在分子靶点。这些靶点大部分为酪氨酸激酶受体激活的信号传导通路, 包括: Raf/MEK/ERK, PI-3K/Akt/mTOR和Jak/Stat等。以索拉菲尼、舒尼替尼等为药物代表的多靶点、多激酶抑制剂治疗HCC更是受到高度关注。本文主要介绍HCC潜在的分子靶点以及常用靶向药物的临床进展。

关键词: 肝细胞癌; 分子靶向治疗; 索拉菲尼; 舒尼替尼

张文杰, 禄韶英. 肝细胞癌的分子靶向治疗. *世界华人消化杂志* 2011; 19(4): 331-337

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/331.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)为常见肿瘤, 死亡率高、生存期短, 多数患者就诊时已进入晚期, 不适宜手术切除, 即使疾病发现在早、中期并能完成根治性手术, 其术后2年内的肿瘤复发率也高达50%以上, 且大多数复发者往往无法再次接受根治性手术。目前全身性化疗、内分泌治疗及射频等治疗手段已逐渐被应用于临床, 但诸多临床研究结果显示, 这些针对晚期HCC的治疗均属姑息治疗, 且远期疗效较差^[1,2]。因此, 晚期HCC在临床上往往陷入无药可

■背景资料

肝细胞癌(HCC)的形成、发展和转移与多种基因的突变、细胞信号传导通路和新生血管增生异常等密切相关, 其中存在的多个关键环节, 正是进行分子靶向治疗的理论基础和潜在靶点。

■同行评议者

代智, 副研究员, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所

■相关报道

调查表明,大部分患者对索拉菲尼和舒尼替尼均可耐受,最大耐受剂量分别约为400 mg/d 2次、75 mg/d,超出耐受剂量会产生限制毒性反应,继续减少用量后不良反应减少,但并未消失。

治的困境.在欧美,HCC的中位生存期(median survival time, MST)为6-9 mo;在我国,仅3-6 mo.目前,在美国HCC的平均5年存活率约11%,欧洲8%,亚洲不到10%,而发展中国家仅为5%.因此如何提高HCC的客观疗效和生存状况,是肿瘤学界面临的严峻挑战^[3-5].随着现代分子生物学、基因组学、蛋白组学的不断发展,肿瘤学分子靶向治疗逐渐兴起,并引起整个医学界的广泛关注和高度重视.分子靶向治疗是以肿瘤细胞特异性过表达分子标志物为靶点,选择相应的阻断剂,干预或彻底阻断受该标志分子调控和密切相关的信号传导通路,达到抑制肿瘤生长、进展及转移的效果.本文就HCC分子靶向治疗的机制、重点药物及其临床应用现状作一综述.

1 针对HCC新生血管及酪氨酸激酶受体的靶向治疗

肝脏为富血供器官,肝内丰富的血管分支产生的肿瘤血管生成促进因子诱导血管内皮细胞迁移、增殖,为生成肿瘤血管提供了良好的基础,同时残留在HCC组织内的血管通过“肿瘤化”而产生的肿瘤血管数目也明显增多^[6-9].HCC的发生发展通常与血管信号通路的激活密切相关.许多HCC的生长因子,包括表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、血小板衍生内皮生长因子(platelet derived-endothelial cell growth factor, PD-ECGF)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)等,酪氨酸激酶受体以及下游的信号传导通路都调控着HCC的发生、发展.通过激活的酪氨酸激酶受体,引发了下游一系列的信号传导通路的激活,包括: Ras/Raf/MEK/ERK、Jak/stat、P13K/Akt/mTOR等.以上这些因素与肿瘤的发生、侵袭力以及晚期肿瘤转移密切相关.有学者在HCC细胞及其周边的间质中也发现多种促血管生成的因子过度表达,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板相关生长因子(platelet associated growth factor, PDGF)、血管生成蛋白和间质金属蛋白酶等^[10-14].学者可以将这类生长因子的受体、肿瘤相关酪氨酸激酶受体作为肿瘤

靶向治疗的靶点,阻断受体的同时切断下游信号传导通路,从不同水平阻断肿瘤的发生^[15].

1.1 靶向VEGFR/FGFR/PD-ECGFR VEGF、FGF、PD-ECGF与肝脏肿瘤血管形成、HCC的侵袭力以及转移密切相关. VEGF分为两类: VEGF1和VEGF2,均位于血管内皮细胞的表面,激活血管内皮细胞,其中VEGF2在肿瘤新生血管中起着更重要的作用.研究表明HCC患者VEGF越高其术后越容易复发、预后也越差^[16-18].胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)也是VEGF家族中的一个成员,在正常组织里表达量较少,仅与VEGFR-1和neuropilin-1结合,促进肿瘤新生血管的形成^[19]. PD-ECGF是重要的血管生成因子,其作用是将血管内皮细胞聚集在周围,而PD-ECGFR的作用是将血管外皮细胞以及平滑肌细胞聚集在周围,参与肿瘤新生血管的形成.阻断PD-ECGFR可以使血管外皮细胞与内皮细胞分离,使内皮细胞表面的VEGF更容易被阻断.有研究表明HCC组织中VEGF与PD-ECGF表达均阳性的患者较均阴性者门静脉癌栓发病率明显增高,而门静脉癌栓是HCC术后发生复发、转移的最主要因素之一^[20,21],与HCC的预后密切相关. FGF主要是通过刺激HCC细胞内DNA的合成、调控内皮细胞表面胶原蛋白和整合素的释放,参与HCC细胞的发生、发展及转移.其中FGF1和FGF2在HCC组织中表达是下调的,而FGF8和FGF18是上调的,其通过自身内分泌机制以及与FGFR的相互作用,调控着早期HCC细胞的择优生长与分裂,但并非所有FGF家族均参与HCC细胞的生长,有研究表明FGF17对其生长无明显调控作用^[22].临床试验证实,FGF可能与肿瘤的“免疫逃避”机制密切相关,在切除的HCC组中FGF的表达越高其转移的可能性也越大^[23-25].

1.2 靶向EGFR-酪氨酸激酶 EGFR是erbB受体家族中的一种,为跨膜受体. EGFR的配体包括EGF、转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α)、双向调节因子(amphiregulin)、肝素结合表皮生长因子(heparin-binding epidermal growth factor)、乙胞素(betacellulin)、外调蛋白(epiregulin)^[26].在肝细胞中EGFR主要配体为EGF和TGF- α ,通过与EGF或TGF- α 结合形成二聚体激活EGFR,二聚体化后,受体的构象发生变化,导致受体偶联的胞内酪氨酸激酶活化,继而作用于下游的细胞信号传导(主要包括JAKs/STATs, Ras/MAPK, PI-3K和Ras/Raf/

MEK/ERK), 以及细胞增殖、凋亡调控和血管生成, 刺激HCC细胞的发生和增殖^[27,28]. EGFR与HCC关系密切, 其在HCC组织中阳性表达率>60%^[29,30], 考虑与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、TGF- α 、 β 及IGF等激活EGFR^[31,32], 从而促进了HCC的生长有关. 近年来针对HCC细胞EGFR与VEGF的基础与临床研究成果不菲, 单克隆抗体与酪氨酸激酶抑制剂类的多种靶向治疗药物也已相继被用于临床.

1.3 靶向IGFR HCC组织和癌旁肝组织中IGF-I、IGF-II及IGF-1R表达增高, IGF-I、IGF-II主要与IGF-1R结合, 其主要生物学功能是促进有丝分裂和细胞生长, 参与建立和维持细胞转化表型. 研究显示, 20%的HCC患者均可检测出IGF-1R表达高于正常, 可能与IGF途径的激活有关^[32,33]. 与此同时, 12%-44%的HCC患者IGF-II表达增高, 而胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factors binding protein, IGFBP)的表达下调, IGFBP的蛋白水解产物增高, 这可能与IGF活性增强有关. 以上这些均导致HCC患者IGFR信号通路的激活, 其激活的信号通路与EGFR类似, 包括Ras/Raf/MEK/ERK、JAKs/STATs、PI-3K/Akt/mTOR. 有研究表明, IGF-II与HCC分化程度有关, 在低分化癌中间强阳性表达信号, 体内IGF-II水平增高, 与肝病患者病情严重程度有关, 但其复杂的调控机制的阐明尚待研究^[34].

2 HCC分子靶向治疗的探索及靶向药物的应用

HCC的形成、发展和转移与多种基因的突变、细胞信号传导通路和新生血管增生异常等密切相关, 其中存在的多个关键环节正是进行分子靶向治疗的理论基础和潜在靶点. 由于肿瘤的信号传导是一个复杂的、多因素、多途径、交叉对话的蛋白网络系统, 理论上多靶点联合阻断信号传导和血管生成、抑制肿瘤生长要比针对某一靶点的治疗效果更好. 近年来, 分子靶向治疗药物治疗HCC已成为非常重要的治疗方法和新的研究热点^[35-40]. 以索拉菲尼(Sorafenib)、舒尼替尼(Sunitinib)等为药物代表的多靶点、多激酶抑制剂治疗HCC更是受到高度关注, 特别是索拉菲尼治疗HCC已经取得了突破性进展, 开创了HCC靶向治疗的新时代. HCC靶向治疗药物通常可以分为以下: (1)抗EGFR药物-吉非替尼(Gefitinib)和埃罗替尼(Erlotinib), 西妥昔单抗(Cetuximab)和尼妥珠单抗(Nimotuzumab);

(2)抗血管生成药物: 贝伐单抗、沙利度胺(反应停)、重组人血管内皮抑制素(Endostar, 恩度); (3)多靶点抑制剂: 索拉菲尼、舒尼替尼(表1)^[41-43]. 以下重点介绍两类多靶点抑制剂.

2.1 舒尼替尼 舒尼替尼是多靶点作用的小分子酪氨酸激酶受体抑制剂, 主要作用于VEGFR1-3的酪氨酸激酶受体、PDGFR-a, PDGFR-b, FLT3, c-Kit, RET和集落刺激因子受体1型(colony-stimulating factor receptor 1, CSF-1R), 以上受体大部分证实与肿瘤新生血管的生长、肿瘤转移有密切关系, 其主要通过破坏信号传导, 抑制肿瘤细胞分裂和生长. 舒尼替尼被证实可抗肿瘤血管生成, 并于2006-01、2007-11分别获得FDA、SFDA批准治疗GIST和晚期肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)^[44,45]. 与索拉菲尼作用相似, 均为多靶点抑制剂, 已有学者也将其列入晚期HCC的治疗. 美国、欧洲以及亚洲等国家对舒尼替尼剂量安全性调查表明, >75 mg/d会产生剂量限制不良反应, 主要表现为: 谷草转氨酶升高18%, 淋巴细胞减少15%, 粒细胞减少、血小板减少和疲乏12%, 手足综合征、皮疹、高胆红素血症和高血压各是6%. 减少至50 mg/d时, 主要不良反应为出血、血小板减少、水肿等, 继续减少用量后不良反应减少, 但并未消失^[46,47], 患者无恶化生存期为3.9 mo、疾病控制率为52%. 另一项欧洲和亚洲人群的II期临床实验调查发现, 舒尼替尼对无法接受手术或局部治疗的晚期HCC患者, 其疾病控制率为37.8%, 其中1例达到了部分缓解(partial remission, PR), 13例病情稳定(stabilization of disease, SD)超过3 mo, 该研究发现舒尼替尼可以通过降低肿瘤血管通透性和血清VEGF、PIGF水平, 起到抗肿瘤作用, 但总有效率不尽如人意. 目前没有临床研究将索拉菲尼与舒尼替尼的抗肿瘤作用、不良反应对比, 但临床II期实验研究发现, 与索拉菲尼相比, 舒尼替尼具有促进肿瘤组织坏死的作用^[38,48-50].

2.2 索拉菲尼 索拉菲尼也是一类具有多酶、多靶点的抑制剂, 作用于Raf丝氨酸/苏氨酸激酶、VEGFR1-3, PDGFR-b, c-Kit, Flt3和p38酪氨酸激酶, 阻断肿瘤新生血管^[51,52]. 临床研究中证实索拉菲尼可以通过阻断肿瘤新生血管、抑制磷酸化eIF4G和Mcl-1、激活mTOR信号传导通路, 抑制肿瘤细胞的生长, 并诱发HCC的凋亡, 抑制HCC细胞的生长. 大部分患者对索拉菲尼均可耐受, 最大耐受剂量约为400 mg/d 2次, 剂量限制毒性主要有: 乏力、厌食、腹泻、皮疹以及手足皮

■创新盘点

近年来, 分子靶向药物治疗HCC已成为非常重要的方法和新的研究热点.

■应用要点

在以后的肿瘤靶向性治疗中, 针对个体差异和遗传多态性, 积极寻找预测不同分子靶向药物疗效的分子生物学标记, 联合应用多种靶点制剂, 找准靶点、选对患者, 对特定的肿瘤患者实施“量体裁衣”的个体化治疗, 以最小的经济花费获得最佳的治疗效果。

表 1 常见分子靶向治疗药物的分子靶点及临床进展

| 商品 | 化学名 | 靶点 | 临床进展 |
|------------|----------|--|---|
| 舒坦 | 舒尼替尼 | 多靶点作用: VEGFRs1-3、PDGFR-a和b, FMS-like tyrosine kinase, c-KIT, RET和colony-stimulating factor receptor type 1 | 2006年FDA、2007年SFDA批准用于GIST和RCC; 临床研究用于多种肿瘤, 包括HCC的II期临床研究 |
| 易瑞沙 | 吉非替尼 | EGFR胞内区 | FDA批准用于胰腺癌和NSCLC, II期临床研究HCC: 单药或联合用药作用于效果不理想 |
| 特罗凯 | 厄洛替尼 | EGFR胞外区 | II期临床研究转移性结肠直肠癌 |
| 爱必妥 | 西妥昔单抗 | 多靶点作用: Raf 激酶和VEGFR 1-3, PDGFR-b, c-Kit Flt3 and p38 | 2005年FDA批准用于RCC; 2010年FDA批准用于HCC; II期临床研究评估多种肿瘤 |
| 多吉美 | 索拉菲尼 | 多酶抑制剂, 主要作用于: VEGFR-2 and FGFR-1 | 临床研究评估多种肿瘤(乳腺癌、肺癌、CRC), 包括III期HCC |
| BMS-582664 | Brivanib | | |
| SU 6668 | TSU-68 | 多靶点、多酶抑制剂: VEGFR, PDGFR-a和FGFR | 用于治疗多种实体性肿瘤, 包括CRC和HCC; II期临床研究评估HCC |
| Recentin | 西地尼布 | 多酶、多靶点抑制剂: VEGFR 1-3、PDGFR, c-Kit | II期临床研究单独或联合用药评估HCC |
| ABT-869 | ABT-869 | 抑制 VEGFR 和 PDGFR家族所有成员 | I期临床研究各种实体肿瘤; II期临床研究用于HCC |

肤反应。一项 I 期研究也表明HCC患者对索拉菲尼安全性和耐受性良好, 并有一定的抗肿瘤活性, 现索拉菲尼已成功进入III期临床研究。另一项研究结果表明使用索拉菲尼后, 一年生存率为44%, 对照组为33%, 死亡率也较对照组减少31%。这项数据与亚洲的III期临床实验结果相匹配^[49,53-56]。美国Memorial Sloan-Kettering 癌症中心、Abou-Alfa组织, 进行针对晚期HCC患者的国际多中心、非对照的II期临床研究(代号10874), 调查表明其适应性好, 不良反应极小且可预测、易处理; 该研究还发现治疗后, 肿瘤细胞磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, pERK)表达水平的TTP较前缩短, 表明pERK可能是索拉菲尼治疗有效的一种生物标志物。这些数据令人兴奋但多数癌症患者难以接受非联合用药, 因此索拉菲尼常联合化疗药物或其他靶点抑制剂使用。一项II期临床试验将阿霉素联合索拉菲尼与单独使用索拉菲尼做出了比较, 发现使用索拉菲尼联合阿霉素的患者中位生存期为13.7 mo, 而对照组为6.5 mo, 但该试验没将两组用药方法做出比较。其他联合用药包括: 联合mTOR阻滞剂(依维莫司或柔红霉素)或MEK阻滞剂。一项I期临床研究中, 将索拉菲尼与多柔比星联合用药治疗晚期肿瘤患者, 其中有4例HCC患者治疗的结果为SD, 并且SD维持的时间均达到1

年以上^[57,58]。总之, 索拉菲尼对HCC的治疗领域取得了令人欣喜的成效, 值得提出的是部分患者虽然肿瘤仍在缓慢、持续增大, 但肿瘤中心已出现明显坏死区域并增大, 这给传统肿瘤治疗评价体系提示出新的问题。

2.3 吉非替尼和厄洛替尼 厄洛替尼和吉非替尼是特异的EGFR酪氨酸激酶ATP竞争抑制剂, 体内外资料均表明岂能选择性抑制EGF介导的肿瘤细胞增殖, 具有显著的抑瘤活性。一项II期临床研究对晚期HCC患者进行厄洛替尼和贝伐单抗联合应用治疗, 其中10例达到了PR, 中位PFS和OR分别为39 wk和68 wk, 总有效率为25%^[42]。Thomas等^[43]在另一项II期临床试验中, 对40例无法手术的晚期HCC患者给予口服厄洛替尼, 发现17例患者在持续治疗16 wk中肿瘤无进展, 也证实了厄洛替尼对HCC的有效性。但吉非替尼在HCC中的应用仍需推敲, 一项临床研究对不能手术的31位晚期HCC患者给予吉非替尼治疗, 其中3%达到OR、22.6%病情稳定, 中位PFS是2.8 mo, 中位OS是6.8 mo, 完全缓解、部分缓解和稳定的患者例数分别是0、1和7。由于没有达到预期目标, 该研究已经停止^[59]。

2.4 西妥昔单抗 西妥昔单抗是目前临床上应用最广泛的抗ERGF单抗, 其主要应用于晚期结肠癌的治疗, 但对HCC的治疗效果却褒贬不一。Zhu等^[60]对晚期或已转移的HCC患者进行II期

临床研究发现西妥昔单抗治疗原发性HCC的效果不佳, 30例患者中无CR、PR, 其中位PFS和OS分别为1.4 mo和9.6 mo. 但在西妥昔单抗联合化疗药物治疗进展期HCC的II期临床实验研究中, 23%的患者获得了PR, 46%患者SD, 患者的中位PFS为4.7 mo, 中位OS为9.5 mo. 多个医学中心研究还发现在经过西妥昔单抗治疗后发生CRC转移的患者中, 可能发生比原发病更严重的4种西妥昔单抗相关不良反应: 注射反应、低镁血症、呼吸困难以及皮疹^[59].

3 结论

HCC的发生是一个复杂的过程, 通过激活多种信号传导通路、多种生长因子促进了HCC的发生发展. 目前, 多项研究以阻断肿瘤新生血管的生成作为晚期HCC患者治疗的靶点, 且多种针对HCC的多靶向药物正在研发, 但肿瘤的形成都有多个基因缺陷, 仅仅阻断酪氨酸激酶受体介导的信号传导通路也许远远不够, 即使是阻断肿瘤新生血管的生成, 也只能短期缓解肿瘤的发展, 并不能达到治愈. 目前的研究发现肿瘤对靶向肿瘤血管抑制剂耐药存在4种潜在机制: (1)激活或上调其他与肿瘤血管生成相关的信号传导通路; (2)补充骨髓源细胞上调血管生成信号传导通路; (3)增加外皮细胞的数量, 不依赖VEGF刺激新生血管的生成; (4)通过建立脉管系统而非刺激新生血管, 从而激活肿瘤细胞的浸润及转移机制^[61-64]. 上述机制可能导致恶性肿瘤对肿瘤血管抑制剂产生耐药性, 不仅如此, 由于酪氨酸激酶的突变、药物影响机制、受体下调机制以及酪氨酸受体抑制通路的丢失, 大部分肿瘤细胞也会对TKIs产生耐药性. 了解HCC的发生机制可以帮助我们寻找其对抗肿瘤药物产生耐药性的原因, 还可以找到一种能同时阻断所有信号通路的分子靶点, 但目前我们并未发现这一种阻滞剂. 因此, 在以后的肿瘤靶向性治疗中针对个体差异和遗传多态性, 积极寻找预测不同分子靶向药物疗效的分子生物学标记, 联合应用多种靶点制剂, 找准靶点、选对患者, 对特定的肿瘤患者实施“量体裁衣”的个体化治疗, 以最小的经济花费获得最佳的治疗效果. 分子靶向治疗的时代才刚刚开始, 在发展这些靶向抗肿瘤药物作用的同时, 学者还应该积极控制这些药物的不良反应, 在最佳使用方法、时机、不良反应和恰当的评价体系等方面填补空白.

4 参考文献

- 1 Lee JS, Thorgeirsson SS. Genetic profiling of human hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 125-132
- 2 Kim DG. Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol* 2006; 317: 141-155
- 3 Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol* 2006; 208: 372-380
- 4 Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 2047-2063
- 5 Colombo M. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1992; 15: 225-236
- 6 Guzman G, Cotler SJ, Lin AY, Maniotis AJ, Folberg R. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1776-1781
- 7 Rizell M, Andersson M, Cahlin C, Hafström L, Olausson M, Lindner P. Effects of the mTOR inhibitor sirolimus in patients with hepatocellular and cholangiocellular cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; 13: 66-70
- 8 Rizell M, Lindner P. Inhibition of mTOR suppresses experimental liver tumours. *Anticancer Res* 2005; 25: 789-793
- 9 Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954; 7: 462-503
- 10 Yang ZF, Poon RT. Vascular changes in hepatocellular carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291: 721-734
- 11 Borgström P, Gold DP, Hillan KJ, Ferrara N. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. *Anticancer Res* 1999; 19: 4203-4214
- 12 Rosen LS. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances. *Oncologist* 2005; 10: 382-391
- 13 Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, LeBlanc AC, Donovan DJ, Thung SN, Solé M, Tovar V, Alsinet C, Ramos AH, Barretina J, Roayaie S, Schwartz M, Waxman S, Bruix J, Mazzaferro V, Ligon AH, Najfeld V, Friedman SL, Sellers WR, Meyerson M, Llovet JM. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 6779-6788
- 14 Villanueva A, Toffanin S, Llovet JM. Linking molecular classification of hepatocellular carcinoma and personalized medicine: preliminary steps. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 444-453
- 15 Osada S, Kanematsu M, Imai H, Goshima S. Clinical significance of serum HGF and c-Met expression in tumor tissue for evaluation of properties and treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepato-gastroenterology* 2008; 55: 544-549
- 16 Miura H, Miyazaki T, Kuroda M, Oka T, Machinami R, Kodama T, Shibuya M, Makuuchi M, Yazaki Y, Ohnishi S. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27: 854-861
- 17 Torimura T, Sata M, Ueno T, Kin M, Tsuji R, Suzaku K, Hashimoto O, Sugawara H, Tanikawa K. In-

■同行评价

本文选题较好, 具有一定的新颖性和参考价值.

- creased expression of vascular endothelial growth factor is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 1998; 29: 986-991
- 18 Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Fan ST, Wong J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2001; 182: 298-304
- 19 Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009; 50: 604-620
- 20 Xu L, Cochran DM, Tong RT, Winkler F, Kashiwagi S, Jain RK, Fukumura D. Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res* 2006; 66: 3971-3977
- 21 陆清, 徐决, 周俭, 樊嘉, 纪元, 汤钊猷. 血管内皮生长因子和血小板衍化内皮生长因子的表达在甲胎蛋白阴性肝细胞癌根治性切除术后预后预测中的作用. *中华实验外科杂志* 2008; 25: 821-822
- 22 Chao Y, Li CP, Chau GY, Chen CP, King KL, Lui WY, Yen SH, Chang FY, Chan WK, Lee SD. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin in patients with resectable hepatocellular carcinoma after surgery. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 355-362
- 23 Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 28: 68-77
- 24 Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches. *Ann Surg* 2003; 238: 9-28
- 25 Jinno K, Tanimizu M, Hyodo I, Nishikawa Y, Hosokawa Y, Doi T, Endo H, Yamashita T, Okada Y. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 1998; 33: 376-382
- 26 Cerea G, Ricotta R, Schiavetto I, Maugeri MR, Sartore-Bianchi A, Moroni M, Artale S, Siena S. Cetuximab for treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2006; 17 Suppl 7: vii66-vii67
- 27 Harada K, Shiota G, Kawasaki H. Transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver* 1999; 19: 318-325
- 28 Hisaka T, Yano H, Haramaki M, Utsunomiya I, Kojiro M. Expressions of epidermal growth factor family and its receptor in hepatocellular carcinoma cell lines: relationship to cell proliferation. *Int J Oncol* 1999; 14: 453-460
- 29 Ito Y, Takeda T, Higashiyama S, Sakon M, Wakasa KI, Tsujimoto M, Monden M, Matsuura N. Expression of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Oncol Rep* 2001; 8: 903-907
- 30 Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama S, Noda K, Miyoshi E, Monden M, Matsuura N. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2001; 84: 1377-1383
- 31 Sweeney CJ, Chiorean EG, Verschraegen CF, Lee FC, Jones S, Royce M, Tye L, Liau KF, Bello A, Chao R, Burris HA. A phase I study of sunitinib plus capecitabine in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4513-4520
- 32 Scharf JG, Braulke T. The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis. *Horm Metab Res* 2003; 35: 685-693
- 33 Breuhahn K, Schirmacher P. Reactivation of the insulin-like growth factor-II signaling pathway in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1690-1698
- 34 姚登福. 细胞因子在肝细胞癌变中的作用与机制. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 378-379
- 35 Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3787-3800
- 36 Kin M, Sata M, Ueno T, Torimura T, Inuzuka S, Tsuji R, Sujaku K, Sakamoto M, Sugawara H, Tamaki S, Tanikawa K. Basic fibroblast growth factor regulates proliferation and motility of human hepatoma cells by an autocrine mechanism. *J Hepatol* 1997; 27: 677-687
- 37 Willett CG, Boucher Y, Duda DG, di Tomaso E, Munn LL, Tong RT, Kozin SV, Petit L, Jain RK, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Cohen KS, Scadden DT, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Shellito PC, Mino-Kenudson M, Lauwers GY. Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8136-8139
- 38 Zhu AX, Raymond E. Early development of sunitinib in hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9: 143-150
- 39 Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M, Naito M, Enomoto K, Watanabe S, Mak TW, Nakano T. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004; 113: 1774-1783
- 40 Zhang H, Burrows F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J Mol Med* 2004; 82: 488-499
- 41 Rossi L, Zoratto F, Papa A, Iodice F, Minozzi M, Frati L, Tomao S. Current approach in the treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2: 348-359
- 42 Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, Donehower RC, Fitch T, Picus J, Erlinichman C. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6657-6663
- 43 Thomas MB, Chadha R, Glover K, Wang X, Morris J, Brown T, Rashid A, Dancy J, Abbruzzese JL. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 1059-1067
- 44 Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 327-337
- 45 Murray LJ, Abrams TJ, Long KR, Ngai TJ, Olson

- LM, Hong W, Keast PK, Brassard JA, O'Farrell AM, Cherrington JM, Pryer NK. SU11248 inhibits tumor growth and CSF-1R-dependent osteolysis in an experimental breast cancer bone metastasis model. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 757-766
- 46 Bang YJ, Kang YK, Kang WK, Boku N, Chung HC, Chen JS, Doi T, Sun Y, Shen L, Qin S, Ng WT, Tursi JM, Lechuga MJ, Lu DR, Ruiz-Garcia A, Sobrero A. Phase II study of sunitinib as second-line treatment for advanced gastric cancer. *Invest New Drugs* 2010 May 12. [Epub ahead of print]
- 47 Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK. Development of sunitinib in hepatocellular carcinoma: rationale, early clinical experience, and correlative studies. *Cancer J* 2009; 15: 263-268
- 48 Hainsworth JD, Spigel DR, Burris HA 3rd, Waterhouse D, Clark BL, Whorf R. Phase II trial of bevacizumab and everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2131-2136
- 49 Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 2007; 25: 884-896
- 50 Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 115-124
- 51 Strumberg D, Clark JW, Awada A, Moore MJ, Richly H, Hendlisch A, Hirte HW, Eder JP, Lenz HJ, Schwartz B. Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *Oncologist* 2007; 12: 426-437
- 52 Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 835-844
- 53 Josephs DH, Ross PJ. Sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Br J Hosp Med (Lond)* 2010; 71: 451-456
- 54 Koerberle D, Montemurro M, Samaras P, Majno P, Simcock M, Limacher A, Lerch S, Kovács K, Inauen R, Hess V, Saletti P, Borner M, Roth A, Bodoky G. Continuous Sunitinib treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) and Swiss Association for the Study of the Liver (SASL) multicenter phase II trial (SAKK 77/06). *Oncologist* 2010; 15: 285-292
- 55 Huynh H, Ngo VC, Koong HN, Poon D, Choo SP, Toh HC, Thng CH, Chow P, Ong HS, Chung A, Goh BC, Smith PD, Soo KC. AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC). *J Hepatol* 2010; 52: 79-87
- 56 Höpfner M, Sutter AP, Huether A, Schuppan D, Zeitz M, Scherübl H. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 41: 1008-1016
- 57 Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 471-478
- 58 Huether A, Höpfner M, Sutter AP, Schuppan D, Scherübl H. Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics. *J Hepatol* 2005; 43: 661-669
- 59 Press OW, Unger JM, Brazier RM, Maloney DG, Miller TP, Leblanc M, Fisher RI. Phase II trial of CHOP chemotherapy followed by tositumomab/iodine I-131 tositumomab for previously untreated follicular non-Hodgkin's lymphoma: five-year follow-up of Southwest Oncology Group Protocol S9911. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4143-4149
- 60 Zhu AX, Stuart K, Blaszkowsky LS, Muzikansky A, Reitberg DP, Clark JW, Enzinger PC, Bhargava P, Meyerhardt JA, Horgan K, Fuchs CS, Ryan DP. Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 581-589
- 61 Arii S. Molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma from the basic and clinical aspects. *Int J Clin Oncol* 2010; 15: 234
- 62 Huynh H, Chow PK, Palanisamy N, Salto-Tellez M, Goh BC, Lee CK, Somani A, Lee HS, Kalpana R, Yu K, Tan PH, Wu J, Soong R, Lee MH, Hor H, Soo KC, Toh HC, Tan P. Bevacizumab and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008; 49: 52-60
- 63 Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24: 289-293
- 64 Breuhahn K, Schirmacher P. Signaling networks in human hepatocarcinogenesis-novel aspects and therapeutic options. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 97: 251-277

编辑 李军亮 电编 何基才

RUNX2-siRNA对胃癌细胞SGC7901增殖和凋亡的影响

向春香, 陈锋, 袁静萍, 黄晓东

■背景资料

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

向春香, 袁静萍, 武汉市中心医院病理科 湖北省武汉市 430014

陈锋, 襄樊市中心医院神经外科 湖北省襄樊市 441021

黄晓东, 武汉市中心医院消化内科 湖北省武汉市 430014

向春香, 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的分子生物学及病理学的研究。

作者贡献分布: 主要实验、数据分析、文章起草、病例选择、样本取材、临床资料整理和细胞培养由向春香与陈锋完成; 课题设计、文章修改和审阅由袁静萍与黄晓东完成。

通讯作者: 袁静萍, 副主任医师, 430014, 湖北省武汉市江岸区胜利街26号, 武汉市中心医院病理科。

yuanjingping2003@yahoo.com.cn

电话: 027-82211533 传真: 027-82211534

收稿日期: 2010-10-12 修回日期: 2010-12-14

接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-02-08

SiRNA-mediated silencing of the RUNX2 gene inhibits proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC7901

Chun-Xiang Xiang, Feng Chen, Jing-Ping Yuan, Xiao-Dong Huang

Chun-Xiang Xiang, Jing-Ping Yuan, Pathology Department of Pathology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China

Feng Chen, Department of Neurosurgery, the Central Hospital of Xiangfan, Xiangfan 441021, Hubei Province, China
Xiao-Dong Huang, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China

Correspondence to: Jing-Ping Yuan, Department of Pathology, the Central Hospital of Wuhan, 26 Shengli Avenue, Jiang'an District, Wuhan 430014, Hubei Province, China. yuanjingping2003@yahoo.com.cn

Received: 2010-10-12 Revised: 2010-12-14

Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To detect the expression of runt-related transcription factor gene 2 (RUNX2) in human gastric cancer cell line SGC7901 and to investigate the influence of small interfering RNA (siRNA)-mediated silencing of the RUNX2 gene on the proliferation and apoptosis of SGC7901 cells.

METHODS: SGC7901 cells were divided into three groups: blank control group, negative control group (transfected with an empty vector), and experiment group (transfected with RUNX2

siRNA). After SGC7901 cells were transfected with RUNX2 siRNA, the mRNA and protein expression of RUNX2 was examined by RT-PCR and Western blot, respectively; cell proliferation was evaluated by MTT assay; and cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM).

RESULTS: Compared with cells of the blank control group, the expression of RUNX2 mRNA (0.27 ± 0.068 vs 0.45 ± 0.058 , $F = 75.6$, $P < 0.01$) and protein ($F = 123.8$, $P < 0.001$) was down-regulated in cells transfected with RUNX2 siRNA. At 24, 48, and 72 h after transfection, the proliferation rates of SGC7901 cells transfected with RUNX2 siRNA were significantly lower than those of non-transfected cells (0.23 ± 0.039 vs 0.32 ± 0.012 ; 0.31 ± 0.037 vs 0.45 ± 0.074 ; 0.52 ± 0.021 vs 0.72 ± 0.006 ; $F = 173.744$, 14.012 , 253.145 ; all $P < 0.001$). The apoptosis rate of SGC7901 cells transfected with RUNX2 siRNA was significantly higher than those of cells of the blank control group and negative control ($45.65\% \pm 0.64\%$ vs $4.46\% \pm 0.27\%$, $4.23\% \pm 0.33\%$, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: RUNX2 expression was detected in SGC7901 cells. SiRNA-mediated silencing of the RUNX2 gene can inhibit proliferation and induce apoptosis in SGC7901 cells. RUNX2 may be a new gene therapy target for gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Runt-related transcription factor gene 2; Small interfering RNA; Apoptosis

Xiang CX, Chen F, Yuan JP, Huang XD. SiRNA-mediated silencing of the RUNX2 gene inhibits proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 338-343

摘要

目的: 研究胃癌细胞SGC7901中RUNX2的表达, 以及siRNA沉默RUNX2的表达后, 对人胃癌细胞SGC7901的RUNX2的表达、细胞增殖和凋亡的影响。

方法: 将细胞分为以下3组: 空白对照组、空载体组、实验组(即转染RUNX2 siRNA组)。

■同行评议者

杜雅莉, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科; 王鲁平, 主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院病理科

用针对RUNX2特异靶点的siRNA转染胃癌细胞SGC7901, 运用RT-PCR、Western blot检测RUNX2 mRNA和蛋白水平的变化; MTT检测细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测细胞凋亡的变化. 所有实验均重复3次.

结果: 在胃癌细胞SGC7901中存在RUNX2的表达, siRNA沉默RUNX2的表达后, 与空白对照组相比, RUNX2在mRNA(0.27 ± 0.068 vs 0.45 ± 0.058 , $F = 75.6$, $P < 0.01$)和蛋白水平($F = 123.8$, $P < 0.001$)的表达均下降, 差异有显著统计学意义. siRNA转染24、48、72 h, MTT检测胃癌细胞SGC7901的增殖率与空白对照组相比明显下降(0.23 ± 0.039 vs 0.32 ± 0.012 ; 0.31 ± 0.037 vs 0.45 ± 0.074 ; 0.52 ± 0.021 vs 0.72 ± 0.006 ; $F = 173.744$ 、 14.012 、 253.145 ; 均 $P < 0.001$), 流式细胞术检测RUNX2 siRNA组72 h细胞凋亡明显高于空白对照组及空载体组($45.65\% \pm 0.64\%$ vs $4.46\% \pm 0.27\%$, $4.23\% \pm 0.33\%$, 均 $P < 0.01$).

结论: 胃癌细胞SGC7901中存在RUNX2的表达, siRNA抑制RUNX2的表达可抑制胃癌细胞的增殖, 促进凋亡, RUNX2可望成为胃癌基因治疗的新的靶点.

关键词: 胃癌; 人类相关转录基因2; 小分子干扰核苷酸; 凋亡

向春香, 陈锋, 袁静萍, 黄晓东. RUNX2-siRNA对胃癌细胞SGC7901增殖和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 338-343

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/338.asp>

0 引言

胃癌作为严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 据估计, 其破坏力在世界范围内居恶性疾病的第2位^[1], 其发生具有明显的地理分布, 中国是高发的国家之一^[2,3]. 同其他肿瘤一样, 胃癌在发生、发展和转移的过程中与多种基因有关, 包括癌基因激活和抑癌基因失活^[4,5]. 迄今, 有关胃癌的发生与发展的机制尚未取得突破性的进展. 人类相关转录基因2(runt-related transcription factor 2, RUNX2), 又名核心结合因子(core binding factor 1, Cbfa 1)^[6], 是RUNX转录因子家族中的成员之一, 他调控骨组织的分化和形成^[7]及正常发育中T淋巴细胞的分化^[8,9]. 近来发现, 其在乳腺癌、黑色素瘤及前列腺癌中表达^[10-12], 但在胃癌组织中关于他的表达并未见相关文献报道. 本研究拟通过细胞生物学和分子病理学的方法,

观察胃癌细胞株SGC-7901中RUNX2的表达, 并研究其对胃癌细胞增殖和凋亡的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌SGC-7901细胞购自武汉大学细胞库, 由本实验室保存. RPMI 1640、小牛血清及DMEM培养基购自大连宝生物工程有限公司; TRIzol购自Invitrogen公司; RT-PCR试剂盒(TaKaRa)购自大连宝生物工程有限公司; TRANSfection转染试剂购自TIANGEN公司; siRNA及引物序列由赛百胜引物合成公司合成; RUNX2单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 持久型ECL化学发光显影试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司; 膜封闭液购自北京天为时代生物技术有限责任公司; MTT购自武汉凌飞科技有限公司; 凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养基及培养条件: 在37 °C、50 mL/L CO₂、饱和湿度条件下用含100 mL/L FBS的RPMI 1640培养基培养, 细胞传代采用2.5 g/L的胰酶+0.02%的EDTA, 每3-5 d传代1次.

1.2.2 分组: 本实验所有指标检测都按如下分组: 正常对照组, 空载体组, 实验组(即转染RUNX2 siRNA组), 转染上述研究对象的同时另转染一组FAM荧光标记的无义序列siRNA, 以测定转染效率. 所使用的RUNX2 siRNA序列为Sense: 5'-CAAGGACAGAGUCAGAU-UAAU-3'; Antisense: 5'-UAAUCUGACUCUGU-CCUUGUU-3'^[13].

1.2.3 siRNA的转染: 处于对数生长期的SGC-7901细胞常规消化后接种于6孔细胞培养板中, 在0.5 mL无血清, 不含抗生素的DMEM培养基中培养, 转染时细胞密度为70%-90%, 每孔细胞分别用50 μL无血清培养基稀释siRNA和TRANSfection试剂, 温和混匀, 室温放置5 min, 将稀释的siRNA和TRANSfection试剂混合在一起, 室温保温20 min后直接将100 μL混合物加入到每孔, 摇动培养板, 轻轻混匀, 在CO₂培养箱中37 °C培养4-6 h后更换正常含血清培养基培养24 h. 转染中, DNA(μg)与TRANSfection(μL)的比例为1 : 2.5, siRNA的工作浓度为100 nmol/L^[14].

1.2.4 细胞RNA的提取和引物设计: 用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA, 样品纯度和浓度经核酸测定仪测定, $A_{260/280} = 1.8-2.0$. 分别设计RUNX2和β-actin的上游和下游引物, 各引物序

■创新盘点

本文发现在胃癌细胞SGC7901中存在RUNX2的表达, 应用RUNX2-siRNA抑制胃癌细胞SGC7901中RUNX2的表达, 结果发现胃癌细胞的增殖率降低, 细胞凋亡增加, 说明RUNX2参与了胃癌细胞的发生发展.

■应用要点

本文通过分子生物学的方法研究在胃癌细胞SGC7901中RUNX2的表达,并探讨RUNX2在胃癌发生发展中的作用,可望为胃癌的个体化治疗提供新的思路和干预靶点。

表 1 RT-PCR使用的引物序列及产物长度

| 名称 | 正义 | 反义 | 产物长度(bp) |
|----------------|----------------------------|---------------------------|----------|
| β -actin | 5'-TGCTGTCCCTCTACGCCTCT-3' | 5'-GCTTCTCCTTGATGTCGC-3' | 234 |
| RUNX2 | 5'-ACCCACGAATGCACTATCCA-3' | 5'-CACAACTGCGACTACCTTG-3' | 332 |

列见表1。

1.2.5 RT-PCR及灰度分析: cDNA合成, 步骤如下: 取MgCl₂ 2 μ L, 10 \times RT Buffer 1 μ L, dNTP混合液(各10 mmol/L)1 μ L, RNase inhibitor 0.25 μ L, AMV逆转录酶0.5 μ L, Oligo(dT)0.5 μ L, RNA 1 μ L(\leq 500 ng), RNase Free dH₂O 3.75 mL, 总体积10 μ L, 离心后混匀, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min. 从上述反应体系中取2 μ L, 加5 \times PCR Buffer 4 μ L, TaKaRa Taq酶(5 U/ μ L)0.1 μ L, 50 mmol/L的上游、下游引物各0.5 μ L, 灭菌蒸馏水12.9 μ L, 总体积为20 μ L. 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性5 min后开始循环, 95 $^{\circ}$ C 变性30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸45 s, 30个循环, 最后72 $^{\circ}$ C 延伸5 min, 目的引物与 β -actin用一管法进行PCR. PCR产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测, RT-PCR结果经凝胶成像软件分析, 检测各组平均吸光度(A)值, 计算目的基因与 β -actin的比值, 得到目的基因的相对含量。

1.2.6 Western blot: 转染siRNA后48-72 h, 用预冷的PBS(0.01 mol/L, pH7.4)洗涤细胞2次, 加入100 μ L预冷的蛋白裂解液(0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-HCl pH7.6, 0.001 mol EDTA pH8.0, 1 mg/L Aprotinin, 100 mg/L PMSF, 1% NP40), 置冰浴中作用60 min, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min \times 15 min, 取上清20 μ L进行蛋白定量, 其余与等体积2 \times SDS上样缓冲液(Tris 100 mmol/L, DTT 200 mmol/L, SDS 4%, 溴酚蓝0.2%, 甘油20%)混合后煮沸10 min, 缓慢冷却后分装并在-80 $^{\circ}$ C冰箱中保存. 制备SDS-PAGE胶, 蛋白浓度80 μ g/泳道进行SDS-PAGE电泳; 将蛋白质电转移到NC膜上, 5%脱脂牛奶37 $^{\circ}$ C封闭1 h, 加入一抗(1:500, V/V)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 加入二抗(1:1 000, V/V), 室温下杂交1 h, 洗膜后用ECL试剂盒暗室显影。

1.2.7 MTT法分析细胞增殖活性: 处于对数生长期的SGC-7901细胞常规消化, 接种于96孔板, 接种量4 000个(200 μ L)/孔, 12 h后, 常规转染siRNA, 分别于转染前、转染后24、48、72 h行MTT检测: 将浓度为5 g/L的MTT(Sigma公司)以每孔20 μ L加入待测的96孔板内, 37 $^{\circ}$ C培养4 h, 弃上清液, 每孔加DMSO 200 μ L并振荡15 min,

最后用紫外分光光度计570 nm波长测定各孔的A值, 取每组8孔的均值. 肿瘤细胞增殖率计算方法: 用未转染siRNA的细胞作为对照, 求出实验组肿瘤细胞增殖率. 肿瘤细胞增殖率 = (转染细胞A值/空白对照细胞A值) \times 100%。

1.2.8 流式细胞术检测细胞增殖凋亡: 转染72 h后, 常规制备单细胞悬液, 用1 \times Buffer A洗涤细胞1次(离心2 000 r/min, 5 min), 收集并调整细胞浓度为1 \times 10⁶/mL, 加入9倍体积的700 mL/L乙醇, 于-20 $^{\circ}$ C固定12 h, 离心收集细胞后, 除去乙醇, 细胞重悬于500 μ L Buffer A中, 加入RNaseA使其终浓度为0.25 g/L, 37 $^{\circ}$ C, 反应30 min, 加入5 μ L PI 室温避光染色30 min, 按Annexin V-FITC PI染色试剂盒说明操作, 以Annexin V阳性/PI阴性判断为早期凋亡, Annexin V阳性/PI阳性判断为晚期凋亡。

统计学处理 用SPSS13.0统计软件进行统计学分析, 所有指标采用ANOVA单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞培养及siRNA转染率测定 培养的SGC-7901细胞贴壁生长, 在倒置显微镜下观察细胞呈不规则多边形, 折光性较强, 透明度大. 转染SGC-7901细胞后, 荧光显微镜下转染阳性细胞可看到绿色荧光; 在同一视野相差显微镜下可看到全部细胞. 转染率测定发现转染效率在70%以上, 完全可满足实验的要求。

2.2 RUNX2 siRNA转染后, RUNX2 mRNA和蛋白水平的改变 在胃癌细胞系SGC-7901中, 我们发现在SGC-7901中存在RUNX2的表达. 使用RUNX2 siRNA转染SGC-7901细胞72 h后, 我们发现在转染72 h后, 实验组RUNX2的mRNA表达和空白对照组及空载体组相比明显降低(图1A), 差异有显著统计学意义(0.27 \pm 0.068 vs 0.45 \pm 0.058, 0.46 \pm 0.041, $F = 75.6$, $P < 0.01$). 说明转染RUNX2 siRNA后, 在U251细胞中, RUNX2 siRNA直接反向作用于RUNX2转录因子, 并显著降低RUNX2的表达; 使用Western blot检测RUNX2

表 2 MTT法检测转染RUNX2 siRNA对SGC7901细胞增殖的影响

| 分组 | 24 h | 48 h | 72 h |
|-------|--------------|--------------|--------------|
| 空白对照组 | 0.32 ± 0.012 | 0.45 ± 0.074 | 0.72 ± 0.006 |
| 空载体组 | 0.34 ± 0.018 | 0.43 ± 0.015 | 0.71 ± 0.007 |
| 实验组 | 0.23 ± 0.039 | 0.31 ± 0.037 | 0.52 ± 0.021 |
| F值 | 173.744 | 14.012 | 253.145 |
| P值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

■同行评价

本文选题恰当, 论据充分, 具有一定的理论及预期临床意义。

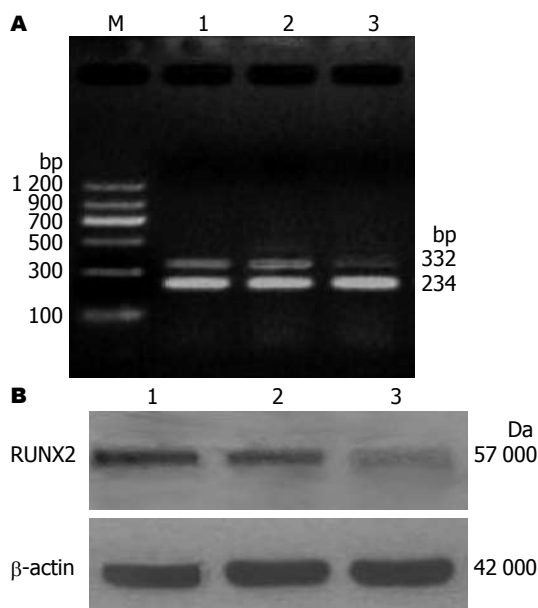


图 1 RUNX2 siRNA转染后, RUNX2 mRNA及蛋白的表达. A: mRNA; B: 蛋白. M: Marker; 1: 空白对照组; 2: 空载体组; 3: 实验组.

蛋白水平表达变化, 结果发现RUNX2蛋白表达也出现了下降(图1B), 且与空白对照组及空载体组相比, 差异有显著统计学意义($F = 123.8$, $P < 0.001$).

2.3 转染RUNX2 siRNA后, 胃癌细胞增殖能力的改变 转染24、48、72 h后, 空白对照组及空载体组细胞的生长未受到明显抑制, 而实验组细胞的生长在转染24 h后即出现明显抑制, 且随转染时间的延长, 抑制程度越明显. 与对照组、空载体组比较, 差异具有显著统计学意义($P < 0.001$, 表2). 说明降低RUNX2表达后, 可明显降低SGC-7901细胞增殖活性.

2.4 流式细胞术结果 流式细胞术检测用针对RUNX2特异靶点的siRNA转染SGC-7901细胞72 h后, Annexin V/PI标记双染色流式细胞仪检测显示, 空白对照组和空载体组的凋亡率无明显差异($P > 0.05$), 转染RUNX2 siRNA的SGC-7901细胞出现明显凋亡, 处理72 h后凋亡率达45.65% ± 0.64%, 与空白对照组(4.46% ±

0.27%)及空载体组(4.23% ± 0.33%)相比, 有显著性差异($P < 0.01$, 图2).

3 讨论

RUNX2是RUNX转录因子家族中的成员之一, 他调控骨组织的分化和形成及在正常发育中T淋巴细胞的分化. RUNX转录因子在肿瘤的生物行为中所起的作用是不同的, RUNX1表达失调可引起白血病^[15], 在小鼠实验中, RUNX2的表达增强可促进淋巴瘤的发生^[8], 而RUNX3在胃癌的发生中则起着肿瘤抑制子的作用^[16,17]. 作为一个支架蛋白, 他们可以和许多辅助因子及转录因子相互作用形成集合子, 但取决于他们的组成、启动基因的活化或基因阻遏^[18].

RUNX2纯合子缺失的小鼠在出生后很快就因呼吸衰竭而死亡, 其主要原因是由于缺乏骨及成骨细胞而导致骨骼畸形^[19,20]. 杂合子小鼠显示骨骼异常类似于观察到的人类遗传疾病, 如锁骨、颅骨发育异常, 这类疾病的发生是由于RUNX2基因突变引起^[21]. 同在成骨细胞发育早期RUNX2促进其形态形成相反, 在成骨细胞分化的晚期RUNX2对其起抑制作用^[22]. RUNX2最初是在胸腺T淋巴细胞的发育过程中出现的, 但他的出现是受限制的, 随后发现, 他在血细胞、骨及上皮的形成中起调控作用^[23]. 近来发现, 其在乳腺癌、黑色素瘤及前列腺癌中表达. 目前RUNX2在肿瘤方面的作用逐步被发现, RUNX2在不同的肿瘤中表现不同的作用, 如促进增殖、抑制凋亡、促血管生成、促进侵袭转移等. 在我们的研究中运用RT-PCR检测发现, 在胃癌细胞SGC-7901中存在RUNX2的表达, 但目前未见相关文献报道.

RNA干扰是自然界生物体的一种遗传现象, 可以诱导目的基因沉默, 高效、特异地抑制目的基因的表达. 小分子干扰RNA具有许多传统方法无法比拟的优势, 包括特异性、高效性和放大效应, 因此作为肿瘤术后化疗或放疗基础上的一种附加治疗, 是靶向封闭目的基因的最

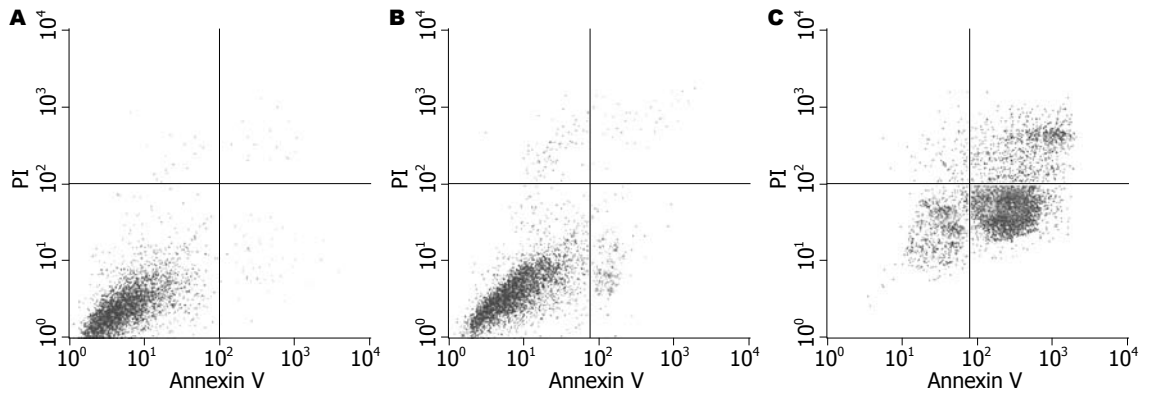


图 2 流式细胞检测SGC-7901细胞转染RUNX2 siRNA 72 h后的细胞凋亡. A: 空白对照组; B: 空载体组; C: 实验组.

佳选择, 具有广阔的应用前景^[24,25]. 目前国内外针对肝癌、胃癌、宫颈癌等恶性肿瘤特异性靶基因RNA干扰治疗研究已广泛展开^[26-28].

本研究应用RNA干扰技术, 将针对RUNX2特异靶点的小干扰RNA转染胃癌细胞株SGC-7901, 我们选用胃癌细胞系SGC-7901, 是1981年建立的一株胃癌淋巴结转移癌细胞系, 该细胞系凋亡率低^[29], 是非常符合本研究目的的材料. RUNX2 siRNA转染后, RUNX2的表达在mRNA和蛋白水平的表达均下降, 说明转染是成功的, RUNX2 siRNA能够抑制RUNX2的表达. 通过对胃癌细胞增殖活性和凋亡的检测, 发现转染RUNX2 siRNA组细胞增殖能力降低, 细胞生长受到抑制, 细胞凋亡增加. 这说明RUNX2可能参与了胃癌的发生发展, 但具体的发生机制仍有待进一步研究.

总之, RUNX2的表达在胃癌的发生中起重要作用, 利用RNA干扰技术, 将针对RUNX2的siRNA转染胃癌细胞后能明显降低RUNX2蛋白表达, 细胞生长被抑制, 凋亡增加, RUNX2可能成为胃癌靶向基因治疗的新选择.

4 参考文献

- NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. NCCN online, 2010, cited 2011. Available from: www.nccn.org
- Corley DA, Buffler PA. Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1415-1425
- 刘丽江, 张应天. 胃癌淋巴结微转移的组织学诊断及其间质反应的研究. *中华病理学杂志* 2000; 29: 339-341
- Hoshi T, Sasano H, Kato K, Yabuki N, Ohara S, Konno R, Asaki S, Toyota T, Tateno H, Nagura H. Immunohistochemistry of Caspase3/ CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res* 1998; 18: 4347-4353
- 秦斌, 张筱茵. 胃癌分子免疫学研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 115-119
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol* 2001; 155: 157-166
- Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* 2003; 88: 446-454
- Vaillant F, Blyth K, Andrew L, Neil JC, Cameron ER. Enforced expression of Runx2 perturbs T cell development at a stage coincident with beta-selection. *J Immunol* 2002; 169: 2866-2874
- Stock M, Schäfer H, Stricker S, Gross G, Mundlos S, Otto F. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. *J Biol Chem* 2003; 278: 17360-17367
- Barnes GL, Javed A, Waller SM, Kamal MH, Hebert KE, Hassan MQ, Bellahcene A, Van Wijnen AJ, Young MF, Lian JB, Stein GS, Gerstenfeld LC. Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/ AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 2631-2637
- Brubaker KD, Vessella RL, Brown LG, Corey E. Prostate cancer expression of runt-domain transcription factor Runx2, a key regulator of osteoblast differentiation and function. *Prostate* 2003; 56: 13-22
- Riminucci M, Corsi A, Peris K, Fisher LW, Chimenti S, Bianco P. Coexpression of bone sialoprotein (BSP) and the pivotal transcriptional regulator of osteogenesis, Cbfa1/Runx2, in malignant melanoma. *Calcif Tissue Int* 2003; 73: 281-289
- Zhang HY, Jin L, Stilling GA, Ruebel KH, Coonse K, Tanizaki Y, Raz A, Lloyd RV. RUNX1 and RUNX2 upregulate Galectin-3 expression in human pituitary tumors. *Endocrine* 2009; 35: 101-111
- Vladimirova V, Waha A, Lückereath K, Pesheva P, Probstmeier R. Runx2 is expressed in human glioma cells and mediates the expression of galectin-3. *J Neurosci Res* 2008; 86: 2450-2461
- Ito Y. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene* 2004; 23: 4198-4208
- 宋军民, 刘晓梅, 李岩, 韩成波. 人胃癌Runx3基因CpG岛甲基化的关键位点和演进. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 212-216
- 伏洁, 张煦, 王靖. 应用胃癌组织芯片研究RUNX3, VEGF与MVD的相关性及其意义. *世界华人消化杂志*

- 2009; 17: 321-325
- 18 Durst KL, Hiebert SW. Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing. *Oncogene* 2004; 23: 4220-4224
- 19 Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755-764
- 20 Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89: 765-771
- 21 Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997; 89: 773-779
- 22 Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21: 8001-8010
- 23 Levanon D, Groner Y. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 2004; 23: 4211-4219
- 24 Sledz CA, Williams BR. RNA interference in biology and disease. *Blood* 2005; 106: 787-794
- 25 Phalon C, Rao DD, Nemunaitis J. Potential use of RNA interference in cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* 2010; 12: e26
- 26 Davenport RJ. Gene silencing. A faster way to shut down genes. *Science* 2001; 292: 1469-1471
- 27 Downward J. RNA interference. *BMJ* 2004; 328: 1245-1248
- 28 Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 2002; 298: 2296-2297
- 29 李莹, 韩炯, 王立峰, 林树新, 药立波, 俞强, 刘新平. 人胃癌细胞株抗脱落凋亡特性的分析. *第四军医大学学报* 2003; 4: 105-108

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》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究人员服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

体外香菇多糖对顺铂抑制胃癌细胞增殖的促进作用

伍海鹰, 陈一明, 林龙, 林友刚, 邱庆安, 刘宁

■背景资料

香菇多糖主要成分为甘露糖甘肽, 目前在肿瘤特别是胃癌和结直肠癌治疗中, 能显著提高疗效, 但其抗肿瘤机制尚未清楚. 多药耐药基因是肿瘤发生耐药的主要机制, 可能与香菇多糖抗肿瘤作用有关.

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

伍海鹰, 副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤的发病机制与治疗方面的研究.

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: 2010-10-21 修回日期: 2010-12-14

接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-02-08

Lentianan enhances cisplatin-mediated inhibition of cell proliferation in human gastric cancer cell line SGC-7901

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: 2010-10-21 Revised: 2010-12-14

Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To investigate whether lentianan enhances cisplatin-mediated inhibition of cell proliferation in human gastric cancer cell line SGC-7901 and to explore its effect on the expression of multidrug resistance genes.

METHODS: SGC-7901 cells were divided into four groups: untreated cells (control group), those treated with lentianan alone (lentianan group), those treated with cisplatin alone (cisplatin group), and those treated with both lentianan and cisplatin (lentianan + cisplatin group). RT-PCR was applied to detect the mRNA expression of MDR1, MRP1, and LRP in SGC-7901 cells. The proliferation of SGC-7901 cells was detected using the Cell Counting Kit-8.

RESULTS: High expression of multidrug resistance genes MDR1, MRP1 and LRP was detected in untreated SGC-7901 cells. Treatment

with lentianan significantly decreased the mRNA expression of multidrug resistance genes but had no effect on cell proliferation ($P > 0.05$). Cisplatin treatment lessened cell proliferation and promoted the expression of multidrug resistance genes. Treatment with lentianan + cisplatin completely suppressed the mRNA expression of MDR1 and MRP1 and significantly decreased LRP expression and cell proliferation compared with the control group, lentianan group, and cisplatin group (10 d: 0.54 vs 1.90, 1.88, 0.92, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Lentianan combined with cisplatin can significantly inhibit the expression of multidrug resistance genes and strongly enhance cisplatin-mediated inhibition of the proliferation of SGC-7901 cells.

Key Words: Lentianan; Cisplatin; Gastric cancer; Multidrug resistance gene; Cell proliferation

Wu HY, Chen YM, Lin L, Lin YG, Qiu QA, Liu N. Lentianan enhances cisplatin-mediated inhibition of cell proliferation in human gastric cancer cell line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 344-348

摘要

目的: 研究体外香菇多糖(Lentianan)对多药耐药基因表达的影响和促进顺铂抑制胃癌细胞增殖的作用.

方法: 分别用顺铂(Cisplatin)、香菇多糖和顺铂联合香菇多糖处理SGC-7901胃癌细胞, 将其分为4组: 对照组(Con组), 香菇多糖组(Len组), 顺铂组(Cis组)和顺铂联合香菇多糖组(L+C)组. 应用RT-PCR检测多药耐药基因MDR1、MRP1和LRP基因mRNA表达; 应用CCK-8试剂盒检测Con组和药物处理组前后的胃癌细胞增殖状态.

结果: 正常SGC-7901胃癌细胞中多药耐药基因MDR1、MRP1和LRP均表达mRNA, 香菇多糖能显著降低多药耐药基因表达而对细胞增殖无明显影响; 顺铂明显增加多药耐药基因表达, 同时抑制细胞增殖($P < 0.05$); 香菇多糖联合顺铂作用后, MDR1和MRP1基因表达完全受

■同行评议者

张俊, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科; 王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

到抑制, LRP表达显著降低, 细胞增殖速度明显低于Con组、Len组和Cis组, 差异具有统计学意义(10 d: 0.54 vs 1.90, 1.88, 0.92, 均 $P < 0.05$).

结论: 香菇多糖联合顺铂后因抑制多药耐药基因表达而显著增强顺铂的抑制细胞增殖作用.

关键词: 香菇多糖; 顺铂; 胃癌; 多药耐药基因; 细胞增殖

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(4): 344-348
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/344.asp>

0 引言

香菇多糖(Lentinan)为担子菌纲伞菌目伞菌科香菇菌属香菇菌提取的有效成分, 主要成分为甘露糖甘肽, 其余为多种糖分和各种氨基酸等^[1,2]. 香菇多糖在治疗胃癌^[3-5]、结肠癌^[6]、肺癌^[7]等肿瘤具有良好的疗效, 特别在胃癌和结直肠癌治疗中, 能显著延长患者存活时间. 目前对香菇多糖的抗肿瘤机制尚未清楚, 认为与其典型的T淋巴细胞激活作用相关, 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, 增强免疫功能并促进抗体依赖性细胞毒作用^[8,9]. 国内研究表明香菇多糖能抑制肺癌细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达, 减少肿瘤组织周围血管增生, 在体外能抑制肿瘤细胞增殖^[10]. 研究表明肿瘤细胞通过表达多药耐药基因, 编码具有生物泵功能的蛋白质, 将进入肿瘤细胞的化疗药物不断地泵出细胞而产生耐药作用^[11-14]. 本文研究香菇多糖和顺铂(Cisplatin)对SGC-7901胃癌细胞多药耐药基因表达的影响, 并探讨对胃癌细胞增殖的作用, 探索香菇多糖增强抗癌药物抗肿瘤作用的可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 SGC-7901胃癌细胞购于美国标准生物制品收藏中心(ATCC); RPMI 1640和胎牛血清购于Hyclone公司; CCK-8试剂盒购于碧云天公司; RNA提取试剂盒和RT-PCR试剂盒购于天根公司; 香菇多糖采用南京康海药业有限公司的香菇多糖冻干粉剂(天地欣); 顺铂购于辉瑞公司; 引物由上海生工公司合成.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和药物处理: SGC-7901胃癌细胞

完全培养基为100 mL/L胎牛血清、89% RPMI 1640和1%双抗, 培养在37 °C、50 mL/L CO₂恒温培养箱中, 实验时取对数生长期细胞. 香菇多糖冻干粉剂采用生理盐水配制成1 mmol/L浓度工作液, 顺铂用生理盐水配制成200 mg/L浓缩存储液, 使用时加入完全培养基配制如下浓度处理液: Len组(单独香菇多糖, 终浓度0.05 μmol/L), Cis组(单独顺铂, 终浓度2 mg/L), L+C组(香菇多糖和顺铂, 终浓度分别为0.05 μmol/L和2 mg/L). 取约60%汇合度的对数生长期胃癌细胞分别加入3组处理液(Con组仅加入完全培养基作为对照), 药物处理24 h, PBS清洗后更换新鲜培养基, 部分细胞继续培养做细胞增殖实验, 部分细胞提取RNA进行RT-PCR.

1.2.2 RT-PCR检测多药耐药基因表达: 按照RNA提取试剂盒说明提取SGC-7901胃癌细胞总RNA, 以GAPDH作为内参照进行RT-PCR扩增, 引物序列见表1. PCR反应参数: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性1 min, 表1基因对应退火温度退火45 s, 72 °C延伸45 s, 共35个循环, 最后一轮72 °C延伸10 min, PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳后检测.

1.2.3 CCK-8检测SGC-7901胃癌细胞增殖: Len、Cis和L+C药物处理组及Con组的SGC-7901胃癌细胞以每孔1 000个细胞的密度接种于96孔板, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 以仅加入细胞培养液和CCK-8溶液但没有加入细胞的孔为空白对照, 每组均设置4个复孔. 在细胞培养箱内孵育1 h后, 450 nm条件下测定吸光度, 每天同一时间检测细胞吸光度(A值), 连续检测10 d. 每孔细胞绝对A值 = 每孔A值-空白对照孔A值, 每组细胞每天平均A值 = (主要孔绝对A值+4复孔绝对A值)/5, 所得数据以时间为横坐标、A值为纵坐标采用Excel 2010绘制细胞增殖曲线.

统计学处理 采用SPSS12.0进行数据处理与统计分析, 对SGC-7901胃癌细胞A值进行Friedman检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 RT-PCR检测结果 Con组SGC-7901胃癌细胞可检测到MDR1、MRP1和LRP基因mRNA表达. 单独香菇多糖处理后, MDR1、MRP1和LRP基因mRNA表达显著降低; 单独顺铂作用能显著提高多药耐药基因MDR1、MRP1和LRP表达; 顺铂联合香菇多糖作用后, SGC-7901胃癌细胞MDR1、MRP1和LRP基因表达显著降低(前2者完全受到抑制, 后者显著降低), 具体结果见图

■创新盘点

采用香菇多糖和顺铂体外作用胃癌细胞, 探索其对胃癌细胞多药耐药基因表达和细胞增殖的影响, 揭示了香菇多糖通过抑制多药耐药基因表达而抗肿瘤的作用机制.

应用要点

本实验揭示SGC-7901胃癌细胞表达多药耐药基因, 顺铂可诱导其表达增加, 香菇多糖能显著抑制多药耐药基因表达, 可能通过抑制多药耐药基因表达而增强顺铂的抗肿瘤作用。

表 1 MDR1、MRP1和LRP基因RT-PCR引物序列和退火温度

| 基因 | 引物序列 | 退火温度(°C) | PCR产物长度(bp) |
|------|-------------------------------------|----------|-------------|
| MDR1 | Sense: GTCATTGTGGAGAAAGGAAATCATG | 64 | 479 |
| | Antisense: ATCCAAGGGCTAGAAACAATAGTG | | |
| MRP1 | Sense: CTGTTTTGTTTCGGGTTCC | 62 | 498 |
| | Antisense: CCAAGGCCTCCAAATCTC | | |
| LRP | Sense: GAGGATAAAGATGGAGACAA | 58 | 467 |
| | Antisense: GAGAATCACGCAGTAGTTGTGG | | |

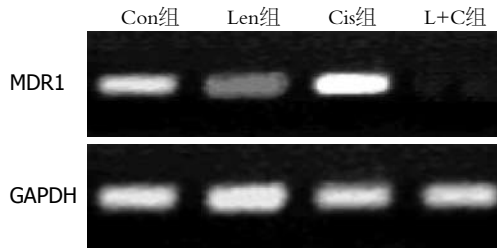


图 1 MDR1基因mRNA RT-PCR检测结果。

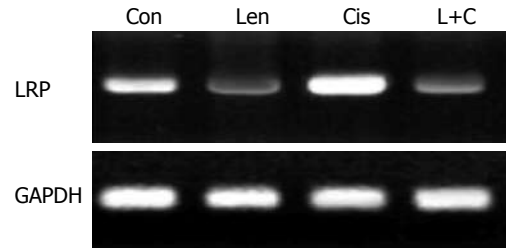


图 3 LRP基因mRNA RT-PCR检测结果。

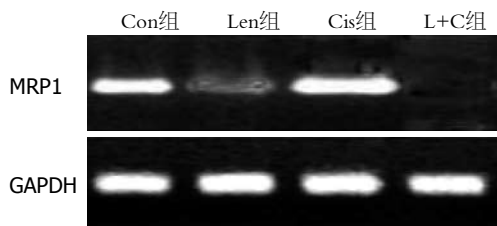


图 2 MRP1基因mRNA RT-PCR检测结果。

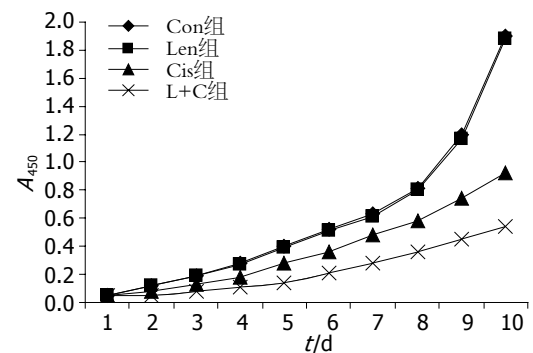


图 4 SGC-7901胃癌细胞增殖曲线。

1-3.

2.2 细胞增殖 对照未处理组SGC-7901胃癌细胞表现为对数增殖状态, 单独香菇多糖对胃癌细胞增殖无明显影响($P>0.05$); 顺铂能明显抑制胃癌细胞增殖, 细胞增殖速度较对照组降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 顺铂联合香菇多糖作用后, 胃癌细胞增殖速度显著降低, 细胞增殖曲线变平缓, 细胞增殖速度显著低于其他3组, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 表2, 图4)。

3 讨论

化疗是目前肿瘤治疗的主要方法之一, 临床上接受化疗的患者在首次或再次接受化疗时可出现耐药而导致疗效变差或完全无疗效现象^[15], 目前认为与肿瘤细胞获得性耐药机制主要和多药耐药基因高表达有关^[16-18]。多药耐药相关基因主要包括MDR1、MRP1和LRP, 在肿瘤耐药机制中扮演重要角色。MDR1基因编码的产物P-糖蛋白是一种跨膜蛋白, 由1 281个氨基酸组成的2个完全相同的单体构成, 每个单体均有6个跨膜区

和1个ATP结合位点, 跨膜区作为膜通道有利于药物转运, 而ATP结合位点与能量供应有关, 能将肿瘤药物逆浓度从细胞内泵出细胞外^[12,19-20]。MRP1基因编码的多药耐药相关蛋白1属于跨膜糖蛋白, 具有ATP依赖泵作用, 能将带负电荷的药物分子逆浓度泵到细胞外, 减少细胞内药物浓度, 导致肿瘤耐药的发生, 还可通过改变细胞质及细胞器的pH值, 使药物到达作用部位的靶位点时浓度减少, 从而产生肿瘤耐药, 并直接参与肿瘤的转移和复发^[21-26]。LRP广泛分布于正常组织, 阻止以胞核为效应点的药物转运到胞质中, 并将进入胞质的药物转运到运输囊泡中, 起隔绝药物作用, 并以胞吐的方式排出体外, 从而产生耐药现象^[27,28]。

顺铂作用于增殖细胞的DNA, 有类似烷化剂双功能基团的作用, 可以和细胞内的碱基结合, 使DNA分子链内和链间交叉键联, 失去功能

表 2 SGC-7901胃癌细胞增殖4值

| 分组 | 时间(d) | | | | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Con组 | 0.050 | 0.120 | 0.190 | 0.280 | 0.400 | 0.520 | 0.630 | 0.810 | 1.200 | 1.900 |
| Len组 | 0.050 | 0.118 | 0.187 | 0.270 | 0.390 | 0.510 | 0.610 | 0.800 | 1.170 | 1.880 |
| Cis组 | 0.050 | 0.085 | 0.130 | 0.179 | 0.280 | 0.360 | 0.480 | 0.580 | 0.740 | 0.920 ^{a,c} |
| L+C组 | 0.050 | 0.054 | 0.080 | 0.110 | 0.140 | 0.210 | 0.280 | 0.360 | 0.450 | 0.540 ^{a,c} |

^a $P < 0.05$ vs Con组; ^c $P < 0.05$ vs Len组.

而不能复制, 高浓度时也能抑制RNA及蛋白质的合成^[29,30]. 本研究表明SGC-7901胃癌细胞表达多药耐药基因MDR1、MRP1和LRP, 单独顺铂作用后, 3种多药耐药基因表达均增加, 可能是SGC-7901胃癌细胞接触顺铂后, 受刺激而诱导性表达增加. 有研究表明, 体外顺铂梯度浓度刺激胃癌细胞可产生顺铂耐受的胃癌细胞系^[31,32], 该现象可能与多药耐药基因诱导性高表达机制有关^[33]. 香菇多糖对胃癌细胞增殖无明显影响, 但能显著降低多药耐药基因表达, 甚至达到完全抑制状态; 联合顺铂共同作用后, SGC-7901胃癌细胞多药耐药基因表达受到抑制, 呈低表达或无表达状态, 细胞增殖缓慢, 增殖曲线变平缓, 其机制可能是香菇多糖抑制多药耐药基因表达而导致顺铂抗肿瘤作用增强. 对于香菇多糖降低多药耐药基因表达的具体机制目前仍然不清楚, 有待于进一步实验研究. 本研究的体外实验表明香菇多糖能显著改善肿瘤细胞对化疗药物的耐药作用, 提高抗肿瘤疗效, 为临床上香菇多糖联合化疗药物治疗肿瘤提供了理论依据.

4 参考文献

- 吕国英, 范雷法, 张作法, 潘慧娟. 香菇多糖研究进展. 浙江农业学报 2009; 21: 183-188
- 张玉军, 孔浩, 王清路. 香菇药用成分及其抗肿瘤作用的研究进展. 安徽农业科学 2008; 36: 13697-13699
- 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
- Oba K, Kobayashi M, Matsui T, Kodera Y, Sakamoto J. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 2739-2745
- 颜强, 张奕廷, 张运来, 黄志强. 香菇多糖对胃癌患者术后化疗毒副作用的保护作用. 南方医科大学学报 2008; 28: 147-148
- Ng ML, Yap AT. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *J Altern Complement Med* 2002; 8: 581-589

- Matsusaki K, Hirose N, Yamada T, Morita M, Okamoto F, Kawano T, Miura O, Okazaki Y, Toda T, Minamisono Y, Nagasaki S. [Case of gastric cancer with recurrence of carcinomatous lymphangiosis of the lung 7.6 years after surgery and successfully treated with S-1/low-dose CDDP/Lentinan combination therapy]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2008; 35: 995-997
- Hamuro J. [Anticancer immunotherapy with perorally effective lentinan]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2005; 32: 1209-1215
- 庞志东, 李文锋, 刘剑勇, 周任. DC联合香菇多糖激活TIL体外抗小鼠肝癌研究. 广西医科大学学报 2009; 26: 909-911
- 张鹏, 苗玉荣, 刘春英. 香菇多糖对Lewis肺癌小鼠VEGF的表达及MVD的影响. 宜春学院学报 2008; 30: 87-88
- Liu FS. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy--a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009; 48: 239-244
- Habibollahi P, Ghahremani MH, Azizi E, Ostad SN. Multi Drug Resistance-1 (MDR1) Expression in Response to Chronic Diazinon Exposure: An In vitro Study on Caco-2 Cells. *Bull Environ Contam Toxicol* 2011; 86: 105-109
- Li Y, Revalde JL, Reid G, Paxton JW. Modulatory effects of curcumin on multi-drug resistance-associated protein 5 in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010 Nov 30. [Epub ahead of print]
- Hoffmann K, Franz C, Xiao Z, Mohr E, Serba S, Büchler MW, Schemmer P. Sorafenib modulates the gene expression of multi-drug resistance mediating ATP-binding cassette proteins in experimental hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2010; 30: 4503-4508
- 邱红, 丁方勇, 熊慧华, 张明生, 李瑞超, 陈元. 胃癌耐药细胞株OCUM-2M/VP16的建立及其耐药机制. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1809-1814
- Zhang WX, Chen B, Chen H, Cai Q, Cai WM. Co-regulation of mRNA level of UDP glucuronosyltransferase 1A9 and multi-drug resistance protein 2 in Chinese human liver. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 119-121
- Tanaka M, Okazaki T, Suzuki H, Abbruzzese JL, Li D. Association of multi-drug resistance gene polymorphisms with pancreatic cancer outcome. *Cancer* 2010 Oct 4. [Epub ahead of print]
- Smith MG, Jordan D, Chapman TA, Chin JJ, Barton MD, Do TN, Fahy VA, Fairbrother JM, Trott DJ. Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. *Vet Microbiol* 2010; 145: 299-307

同行评价

本文设计合理, 新颖性较好, 对中药的肿瘤治疗作用提供了理论依据.

- 19 Kimura Y, Morita SY, Matsuo M, Ueda K. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. *Cancer Sci* 2007; 98: 1303-1310
- 20 Kugawa F, Suzuki T, Miyata M, Tomono K, Tamanoi F. Construction of a model cell line for the assay of MDR1 (multi drug resistance gene-1) substrates/inhibitors using HeLa cells. *Pharmazie* 2009; 64: 296-300
- 21 Cole SP, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 438-446
- 22 Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 216-237
- 23 Fischer S, Pietsch M, Schirmer K, Luckenbach T. Identification of multi-drug resistance associated proteins MRP1 (ABCC1) and MRP3 (ABCC3) from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Environ Res* 2010; 69 Suppl: S7-S10
- 24 Colabufo NA, Berardi F, Perrone MG, Cantore M, Contino M, Inglese C, Niso M, Perrone R. Multi-drug-resistance-reverting agents: 2-aryloxazole and 2-arylthiazole derivatives as potent BCRP or MRP1 inhibitors. *ChemMedChem* 2009; 4: 188-195
- 25 Matsunaga S, Asano T, Tsutsuda-Asano A, Fukunaga Y. Indomethacin overcomes doxorubicin resistance with inhibiting multi-drug resistance protein 1 (MRP1). *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 348-353
- 26 Friedrich RE, Punke C, Reymann A. Expression of multi-drug resistance genes (*mdr1*, *mpr1*, *bcrp*) in primary oral squamous cell carcinoma. *In Vivo* 2004; 18: 133-147
- 27 Langlois B, Emonard H, Martiny L, Dedieu S. [Multiple involvements of LRP-1 receptor in tumor progression]. *Pathol Biol (Paris)* 2009; 57: 548-554
- 28 Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RG, Mori BM, Tone LG. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J* 2004; 122: 166-171
- 29 Boulikas T. Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18: 1197-1218
- 30 Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf* 2009; 32: 1109-1122
- 31 潘洪明, 费洪新, 杜静平, 陈正华, 张涛. 人胃癌顺铂耐药细胞系的建立过程. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2009-2013
- 32 张敏, 李勇莉, 高建凯, 王国栋, 高福莲. 靶向*mdr1*不同位点的siRNA对两种耐药细胞MDR的逆转效果. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3387-3393
- 33 Leonhardt K, Gebhardt R, Mössner J, Lutsenko S, Huster D. Functional interactions of Cu-ATPase ATP7B with cisplatin and the role of ATP7B in the resistance of cells to the drug. *J Biol Chem* 2009; 284: 7793-7802

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》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)

白花丹醌对人肝星状细胞凋亡及相关蛋白表达的影响

韦燕飞, 钟振国, 黄仁彬, 彭岳, 谢海源, 段雪琳, 赵铁建

韦燕飞, 黄仁彬, 广西医科大学药理实验室 广西壮族自治区南宁市 530021

韦燕飞, 彭岳, 谢海源, 段雪琳, 赵铁建, 广西中医学院基础医学院生理教研室 广西壮族自治区南宁市 530001

钟振国, 广西中医学院新药开发中心 广西壮族自治区南宁市 530001

韦燕飞, 副教授, 在读博士, 主要从事中医药防治肝纤维化方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30760321

广西科学研究与技术开发基金资助项目, No. 0992003-1

作者贡献分布: 此课题由赵铁建、钟振国及黄仁彬设计主持; 由韦燕飞与彭岳操作完成并撰写论文; 由谢海源与段雪琳完成数据分析。

通讯作者: 赵铁建, 教授, 530001, 广西壮族自治区南宁市, 广西中医学院基础医学院生理教研室. ztj-nanning@163.com
电话: 0771-2214279

收稿日期: 2010-10-29 修回日期: 2010-12-27

接受日期: 2011-01-06 在线出版日期: 2011-02-08

Effects of plumbagin on apoptosis and expression of apoptosis-related proteins in human hepatic stellate cells

Yan-Fei Wei, Zhen-Guo Zhong, Ren-Bin Huang, Yue Peng, Hai-Yuan Xie, Xue-Lin Duan, Tie-Jian Zhao

Yan-Fei Wei, Ren-Bin Huang, Pharmacological Laboratory of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yan-Fei Wei, Yue Peng, Hai-Yuan Xie, Xue-Lin Duan, Tie-Jian Zhao, Department of Physiology, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Zhen-Guo Zhong, Center for New Drug Research, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China. No. 30760321; and the Scientific Research and Technological Development Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0992003-1

Correspondence to: Professor Tie-Jian Zhao, Department of Physiology, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. ztj-nanning@163.com

Received: 2010-10-29 Revised: 2010-12-27

Accepted: 2011-01-06 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of plumbagin on leptin-induced apoptosis and expression of apoptosis-related protein in human hepatic stellate cells (HSC-LX2) and to explore the anti-fibrotic mechanism of plumbagin.

METHODS: After HSC-LX2 cells were cultured

in vitro, stimulated with leptin for 24 h, and treated with different concentrations of plumbagin for 24 h, cell apoptosis was detected by flow cytometry; cell ultrastructure was observed by transmission electron microscopy; and the protein expression of P53, Bax, and Bcl-2 was determined by immunocytochemistry.

RESULTS: HSC-LX2 cells were divided into 6 groups: untreated cells (blank control group), those treated with 100 µg/L leptin (leptin control group), those treated with both leptin and colchicin (colchicin group), those treated with both leptin and 2, 8 or 16 µmol/L plumbagin (2, 8, 16 µmol/L plumbagin group). The apoptosis rate of HSC-LX2 cells was significantly increased in plumbagin groups. The apoptosis rates of cells treated with 8 or 16 µmol/L plumbagin or colchicine were significantly higher than those of the blank control group and leptin group (5.21% ± 0.41%, 8.10% ± 0.63%, 10.1% ± 1.08% vs 1.40% ± 0.13%, 2.85% ± 0.21%, all $P < 0.01$). Transmission electron microscopy revealed varying degrees of apoptosis in the leptin group or plumbagin groups. Immunocytochemistry analysis showed that the protein expression levels of P53 and Bax were higher and that of Bcl-2 was lower in plumbagin groups than in the leptin group (Bax: 85.24 ± 1.08, 86.35 ± 1.12, 91.13 ± 1.13 vs 56.63 ± 0.94; P53: 25.32 ± 0.6, 38.14 ± 0.71, 41.19 ± 0.72 vs 19.25 ± 0.46; Bcl-2: 32.12 ± 0.43, 27.71 ± 0.38, 21.46 ± 0.46 vs 44.51 ± 0.56, all $P < 0.05$ or 0.01).

CONCLUSION: Plumbagin can significantly accelerate leptin-induced apoptosis of HSC-LX2 cells possibly by up-regulating P53 and Bax expression and down-regulating Bcl-2 expression.

Key Words: Plumbagin; Hepatic stellate cells; Apoptosis; P53; Bax; Bcl-2

Wei YF, Zhong ZG, Huang RB, Peng Y, Xie HY, Duan XL, Zhao TJ. Effects of plumbagin on apoptosis and expression of apoptosis-related proteins in human hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 349-354

摘要

目的: 研究白花丹醌对瘦素(Leptin)刺激体外

■背景资料

肝星状细胞(HSC)在肝纤维化进程中起关键作用,是肝纤维化时细胞外基质合成的主要来源细胞,其活化增殖是肝纤维化发生机制的中心环节,逆转肝纤维化关键在于减少激活的HSC数量,凋亡是减少活化型HSC数量的最主要途径。

■同行评议者

黄昆, 教授, 华中科技大学同济药学院

■ 研究前沿

白花丹醌是白花丹的主要活性成分,是从植物白花丹中提取的一种小分子萜醌化合物,具有广泛的药理活性,包括抗菌消炎、抗增殖、抗凝等作用。研究发现白花丹对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤有抑制作用,白花丹醌体外明显抑制HSC-T6细胞的增殖,然而,白花丹醌是如何实现抑制HSC增殖活力,加速HSC凋亡,这是亟待解决的问题。

培养人肝星状细胞株HSC-LX2凋亡及相关蛋白表达的影响,以探讨其抗肝纤维化作用的机制。

方法: 体外培养HSC-LX2,将其分为以下几组:空白对照组、Leptin对照组、秋水仙碱组、2、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 白花丹醌组。瘦素刺激24 h,药物与细胞共孵育24 h后,应用流式细胞仪Annexin/PI双染方法检测细胞凋亡,透射电镜观察HSC-LX2凋亡形态学变化,免疫组织化学法检测HSC-LX2凋亡基因p53、Bax、Bcl-2的蛋白表达。

结果: 细胞流式术结果显示,白花丹醌作用HSC-LX2 24 h, HSC凋亡率明显增加,白花丹醌8、16 $\mu\text{mol/L}$ 组和秋水仙碱组HSC凋亡率均显著高于空白对照组和Leptin对照组($5.21\% \pm 0.41\%$, $8.10\% \pm 0.63\%$, $10.1\% \pm 1.08\%$ vs $1.40\% \pm 0.13\%$, $2.85\% \pm 0.21\%$, 均 $P < 0.01$)。透射电镜结果,空白对照组细胞形态清晰,细胞膜、核膜完整,胞质内细胞器清晰,染色质均匀,细胞表面微绒毛;药物组可见少量坏死细胞和许多不同程度的凋亡细胞,体积变小,核膜消失,胞质浓缩,胞质内出现大量空泡,细胞核染色质固缩,可见核碎裂,细胞表面微绒毛消失。免疫组织化学结果显示,受Leptin刺激后HSC-LX2胞质内表达少量的Bax、Bcl-2、P53,可见少量的棕黄色颗粒,经白花丹醌2、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 干预后,HSC-LX2促凋亡基因Bax、P53蛋白表达明显升高,抗凋亡基因Bcl-2蛋白表达显著降低,与Leptin刺激组相比,差异均有统计学意义(Bax: 85.24 ± 1.08 , 86.35 ± 1.12 , 91.13 ± 1.13 vs 56.63 ± 0.94 ; P53: 25.32 ± 0.6 , 38.14 ± 0.71 , 41.19 ± 0.72 vs 19.25 ± 0.46 ; Bcl-2: 32.12 ± 0.43 , 27.71 ± 0.38 , 21.46 ± 0.46 vs 44.51 ± 0.56 , $P < 0.05$ 或 0.01)。

结论: 白花丹醌能够促进活化的HSC-LX2凋亡,其促HSC-LX2凋亡机制可能与上调P53、Bax蛋白表达和下调Bcl-2蛋白有关。

关键词: 白花丹醌; 肝星状细胞; 细胞凋亡; P53; Bax; Bcl-2

韦燕飞, 钟振国, 黄仁彬, 彭岳, 谢海源, 段雪琳, 赵铁建. 白花丹醌对人肝星状细胞凋亡及相关蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 349-354

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/349.asp>

0 引言

肝纤维化是肝病研究领域的一大热点,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是参与肝纤维化

过程的重要细胞,其活化增殖是肝纤维化发生机制的中心环节,抑制HSC增殖,诱导其凋亡是抗纤维化的重要策略^[1-3]。大量研究^[4,5]已证明HSC凋亡受多种凋亡基因调控,例如死亡受体,Fas/FasL, P53, caspases和Bax/Bcl-2家族。其中Bcl-2家族成员在细胞凋亡的基因调控过程中起着至关重要的作用,尤其这一家族的两个代表性成员Bcl-2和Bax,分别是凋亡抑制和促进因子。白花丹醌(plumbagin)是白花丹的主要活性成分,是从植物白花丹中提取的一种小分子萜醌化合物,具有广泛的药理活性,包括抗菌消炎、抗增殖、抗凝等作用^[6]。本课题前期研究发现白花丹对CCl₄所致大鼠急性肝损伤有抑制作用^[7,8],白花丹醌体外明显抑制HSC-T6细胞的增殖,抑制转化生长因子- β 1和 α -平滑肌动蛋白表达^[9,10]。本研究以HSC-LX2细胞为体外模型,初步探讨白花丹提取物白花丹醌对HSC-LX2细胞凋亡的影响,从HSC-LX2凋亡相关蛋白表达角度来研究白花丹醌抗肝纤维化的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝星状细胞株(HSC-LX2),由湖南湘雅医学院医学实验中心提供。白花丹醌(lot: 20071028)购自Sigma公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配成0.1 mol/L储备液,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存;重组瘦素(Leptin, Protech公司,批号: 8110060R); DMEM(Gibco, Cat No. 12800-056);胎牛血清(Hyclone,批号: NTM0136);秋水仙碱(西双版纳药业公司,批号: 070205); Annexin V-PE细胞凋亡检测试剂盒为美国BD公司生产;鼠抗P53、Bax单克隆抗体和兔抗-Bcl-2多克隆抗体,均为Santa Cruz公司产品;免疫组织化学SP试剂盒, DAB显色试剂盒等,购自武汉博士德有限公司。CO₂培养箱(美国Thermo, Model 311);高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂, TGL-16G-A);相差倒置显微镜(德国Zeiss, XD-101型);酶标仪(美国Thermo, Model 450)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝星状细胞株(HSC-LX2),置于含100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养液,37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO₂条件下培养,隔天换液,当细胞呈单层致密状时,用2.5 g/L胰蛋白酶消化,每3-4 d传代1次,按1:2传代,每次实验均在呈指数生长的细胞中进行。

1.2.2 分组及处理: 空白对照组:加入含100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养液; Leptin对照组:在含100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养

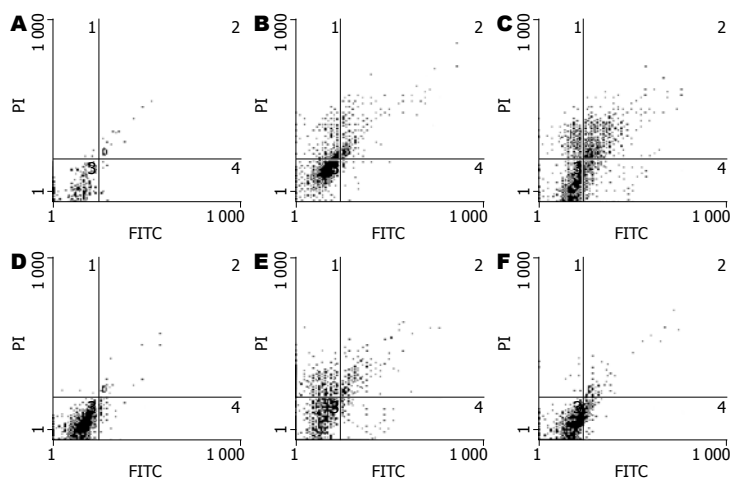


图1 Annexin V-FITC示各实验组HSC-LX2凋亡. A: 空白对照组; B: Leptin对照组; C: 秋水仙碱组; D: 白花丹醌2 $\mu\text{mol/L}$ 组; E: 白花丹醌8 $\mu\text{mol/L}$ 组; F: 白花丹醌16 $\mu\text{mol/L}$ 组.

■ 相关报道

Sugie等通过动物实验研究, 表明白花丹醌可显著抑制氧化偶氮甲烷诱发的小肠肿瘤; Sandur等研究表明其可能通过抑制NF- κ B通路达到抗肿瘤作用.

液中加Leptin(1 000 $\mu\text{g/L}$), 终浓度为100 $\mu\text{g/L}$; Leptin与药物不同质量浓度联用组, 秋水仙碱组: Leptin与秋水仙碱, 终浓度为6.25 mg/L; 药物组: 在Leptin刺激组基础上加入白花丹醌, 低、中、高剂量组终浓度分别为2、8、16 $\mu\text{mol/L}$.

1.2.3 流式细胞仪Annexin V-PE/7-AAD双染色法检测HSC-LX2的凋亡情况: 各组细胞依Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒说明操作, 各组以PBS洗涤1次, 胰酶消化后, 加入培养液中, 混匀, 离心后, 加入195 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞, 再加入5 μL Annexin V-FITC, 混匀. 加入190 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞, 再加入10 μL PI混匀, 随即用流式细胞仪检测凋亡率, 使用Flow max 2.4软件进行数据处理.

1.2.4 透射电镜观察HSC超微结构: 选用空白对照组、药物中剂量组, 处理同前, 共孵育24 h, 消化离心去上清. 加入100 mL/L牛血清白蛋白100 μL 重悬, 离心后吸去多余牛血清白蛋白, 向附着1 mm^3 左右大小细胞团的离心管中加入适量4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的2.5%戊二醛固定, 经1%四氧化锇预固定和后固定后, 酒精及丙酮逐级脱水, 环氧树脂包埋, 作0.5 μm 的薄片, 醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色, JEM-1200EX型透射电镜观察、拍照.

1.2.5 免疫细胞化学法检测P53、Bax、Bcl-2的蛋白表达: 将传代培养的HSC-LX2用含100 mL/L胎牛血清的DMEM接种于放有盖玻片的6孔培养板, 24 h后待细胞贴壁伸展后, 分组、干预同前. 药物与细胞共孵育24 h后取出盖玻片置于载玻片上, 用4%多聚甲醛固定, 3% H_2O_2 过氧化氢灭活, 抗原修复, 血清封闭后, 依次滴加P53、Bax、Bcl-2一抗、二抗试剂孵育后进行脱水、封片, 镜下观察. 检测方法严格按照试剂盒说明书进行操作, 胞质或胞膜被染成棕褐色为P53、Bax、Bcl-2表达阳性细胞. 结果判定标准: 阳性

信号为棕黄色或棕褐色, 位于胞质内、胞膜和核膜上, 运用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统细胞测定程序, 对各组HSC P53、Bax、Bcl-2阳性细胞进行显微图像分析, 每组随机检测4个视野细胞的吸光度, 计算其平均吸光度.

统计学处理 应用SPSS10.0软件进行统计学处理, 计量资料均采用mean \pm SD表示, 采用单因素方差分析.

2 结果

2.1 流式细胞仪Annexin V-FITC法检测细胞凋亡 与对照组比较, Leptin组HSC凋亡率升高 ($P > 0.05$), 白花丹醌作用HSC-LX2 24 h, HSC凋亡率明显增加, 中、高剂量组和阳性药组HSC-LX2细胞凋亡率均明显增高, 差异均有显著性 ($P < 0.05$, 图1, 表1).

2.2 白花丹醌对HSC-LX2细胞超微结构的影响 电镜下, 空白对照组细胞形态清晰, 细胞膜、核膜完整, 胞质内细胞器清晰, 染色质均匀, 细胞表面微绒毛(图2A, B); 白花丹醌8 $\mu\text{mol/L}$ 组可见少量坏死细胞和许多不同程度的凋亡细胞, 其细胞体积变小, 核膜消失, 胞质浓缩, 胞质内出现大量空泡, 细胞核染色质固缩, 可见核碎裂, 细胞表面微绒毛消失(图2C, D).

2.3 白花丹醌对人HSC凋亡基因Bax、Bcl-2、p53蛋白表达的影响 受Leptin刺激后, HSC胞内表达少量的Bax、Bcl-2、P53, 可见少量的棕黄色颗粒, 经白花丹醌2、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 干预后, HSC-LX2促凋亡基因Bax、P53蛋白表达明显升高, 抗凋亡基因Bcl-2蛋白表达显著降低, 与Leptin组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, 表2).

3 讨论

HSC在肝纤维化进程中起关键作用, 是肝纤维化

■ 创新盘点

白花丹醌是否能通过细胞凋亡通路阻断肝纤维化, 目前未见报道. 本实验研究白花丹醌对瘦素刺激体外培养HSC-LX2凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响, 以探讨其抗肝纤维化作用机制.

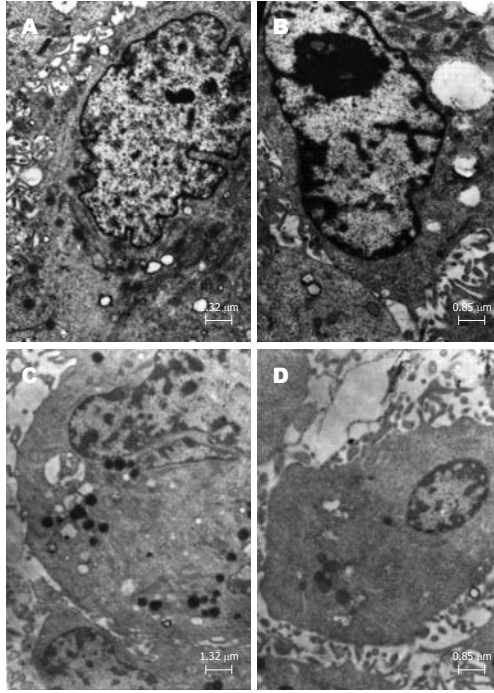


图2 各实验组HSC-LX2透射电镜图. A: 对照组(1:3800); B: 对照组(1:5900); C: 白花丹醌8 $\mu\text{mol/L}$ 组(1:3800); D: 白花丹醌8 $\mu\text{mol/L}$ 组(1:5900).

时细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成的主要来源细胞^[11]. 近来研究表明^[12], 逆转肝纤维化关键在于减少激活的HSC数量, 凋亡是减少活化型HSC数量的最主要途径. 在各种病因的刺激下, 静止的HSC可以活化、增殖, 合成并分泌大量的ECM, 活化增生后的HSC有两种命运: 一是回到静止状态, 二是可能通过凋亡途径等死亡. 最近的研究表明^[13-15], 肝纤维化恢复期, 活化的HSC减少主要通过凋亡途径, 而非表型的改变, 凋亡引起的HSC减少具有重要的意义: 一方面, HSC的减少使细胞基质的分泌减少, 还不引起溶酶体等细胞器的破坏, 凋亡的细胞可在数小时内被周围的细胞所吞噬, 很少引起微环境的炎症损伤, 是一种理想的清除活化HSC的方式; 另一方面, 由激活的HSC分泌的金属蛋白酶抑制物1(tissue inhibitors of metalloproteinase-1, TIMP-1)明显下降, 解除了对胶原酶活性的抑制, 胶原酶活性增强, 胶原降解增加. 因此, 诱导活化的HSC凋亡是肝纤维化治疗的重要靶向, 凋亡是有核细胞通过启动自身内部的遗传机制激活内源性DNA内切酶而发生的一种主动细胞死亡过程^[16]. 透射电镜是观察凋亡细胞形态的最好方法, 他可以同时反映细胞膜的完整性, 细胞质中细胞器的改变, 细胞核及染色质的改变, 凋亡小体的形成等.

表1 流式细胞学检测白花丹醌对HSC-LX2凋亡的影响 (mean \pm SD, $n = 4$)

| 分组 | 细胞凋亡率(%) |
|--------------------------|-------------------------------|
| 空白对照组 | 1.40 \pm 0.13 |
| Leptin对照组 | 2.85 \pm 0.21 |
| 秋水仙碱 | 10.10 \pm 1.08 ^b |
| 白花丹醌2 $\mu\text{mol/L}$ | 3.07 \pm 0.30 |
| 白花丹醌8 $\mu\text{mol/L}$ | 5.21 \pm 0.41 ^b |
| 白花丹醌16 $\mu\text{mol/L}$ | 8.10 \pm 0.63 ^b |

^b $P < 0.01$ vs Leptin对照组.

细胞凋亡受多种基因调控, 这一过程受多种促凋亡和抗凋亡的蛋白调节, 其中促凋亡基因Bax和凋亡抑制基因Bcl-2被认为与细胞凋亡关系密切^[17,18]. P53是一种核内的磷酸蛋白, 他在细胞凋亡中的作用: (1)降低内源性Bcl-2蛋白表达和抑制其功能; (2)激动Bax基因转录, 提高细胞内Bax蛋白的表达, 使Bcl-2/Bax蛋白比例改变而促进细胞凋亡; (3)增强Fas、FasL基因表达, 从而激活敏感的Fas/FasL信号传递途径. Apri-gliano等^[14]在随后的实验中发现, 在HSC激活后Fas/FasL表达增加, Bcl-2和Bcl-xL的表达下降及p53基因的上调共同促进HSC凋亡.

白花丹来源于蓝雪科蓝雪属, 主要分布于我国西南省份, 民间用于散疮、消肿、通经活络, 治疗蛇伤、风湿乳腺炎以及慢性气管炎等症^[19]. 现代药理学研究表明^[20,21], 白花丹具有抗肝纤维化作用, 白花丹醌是植物白花丹的主要活性成分, 具有很强的活血化瘀作用, 据测定白花丹根中的白花丹醌的含量多少与其活血化瘀功效的强弱相一致. 白花丹醌是一种小分子萘醌化合物, 为棕黄色结晶, 其分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_3$, 相对分子质量为188.18, 化学结构式是5-羟基-2-甲基-1, 4萘醌(5-hydroxy-2-methyl-1, 4-naphthoquinone). 研究发现^[6], 白花丹醌具有抗肿瘤、抗炎、抗细菌、抗真菌等多种作用. 目前大量研究表明^[22-25]其对多种肿瘤细胞系有抗肿瘤作用, Sugie等^[26]通过动物实验研究, 表明白花丹醌可显著抑制氧化偶氮甲烷诱发的小肠肿瘤; Sandur等^[27]研究表明其可能通过抑制NF- κ B通路达到抗肿瘤作用. Srinivas等^[28]研究了白花丹素诱导子宫癌细胞ME-180凋亡, 其可能机制与白花丹醌增加细胞内活性氧产生、损伤线粒体, 使其膜电位下降, 引起ME-180细胞凋亡, 而且ME-180细胞凋亡率与白花丹素浓度呈正相关性. 本课题前期研究发现白花丹对 CCl_4 所致大

同行评价
本文创新性较好, 对于治疗肝纤维化具有一定的临床参考价值.

表 2 白花丹醌对HSC-LX2中P53、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响 (mean ± SD, n = 4, A值)

| 分组 | P53 | Bax | Bcl-2 |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Leptin对照组 | 19.25 ± 0.46 | 56.63 ± 0.94 | 44.51 ± 0.56 |
| 白花丹醌2 μmol/L | 25.32 ± 0.68 ^a | 85.24 ± 1.08 ^b | 32.12 ± 0.43 ^a |
| 白花丹醌8 μmol/L | 38.14 ± 0.71 ^b | 86.35 ± 1.12 ^b | 27.71 ± 0.38 ^b |
| 白花丹醌16 μmol/L | 41.19 ± 0.72 ^b | 91.13 ± 1.13 ^b | 21.46 ± 0.46 ^b |

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs Leptin对照组.

鼠急慢性肝损伤有抑制作用^[7,8], 白花丹醌体外可以明显抑制HSC-T6细胞的增殖^[29]. 本实验研究发现实验中可见白花丹醌(8、16 μmol/L)作用HSC 24 h后HSC核膜消失, 染色质边集, 细胞核染色质固缩, 核碎裂, 呈明显的凋亡改变. 流式细胞仪能对细胞凋亡进行定量分析, 实验中白花丹醌作用24 h后, 凋亡的HSC显著增加. 表明白花丹醌促进活化的HSC凋亡, 使HSC数量明显减少, 这可能是该药抗肝纤维化的有效途径之一. 在进一步探讨白花丹醌诱导HSC凋亡具体机制的研究中发现白花丹醌可以上调活化的HSC中P53、Bax蛋白表达, 下调Bcl-2蛋白表达, 提示白花丹醌与通过促进P53、Bax蛋白表达有关. Jaiswal等^[30]在小鼠胚胎纤维母细胞研究中发现, 白花丹醌通过诱导周期蛋白依赖蛋白激酶抑制剂(CD KI)-P21的产生, 调节细胞周期阻滞于S-G₂/M期.

细胞凋亡的机制相当复杂, 目前对白花丹醌调控HSC增殖及凋亡确切机制尚未完全明了, 深入研究白花丹醌对HSC的影响, 将有助于进一步了解白花丹醌调控HSC增殖及凋亡的分子机制, 并为抗肝纤维化治疗提供新的思路.

志谢: 感谢广西医科大学实验中心李佳荃老师在本实验中给予的大力帮助.

4 参考文献

- 1 韦燕飞, 彭岳, 谢海源, 赵铁建. 基于肝星状细胞分子机制的抗肝纤维化研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1745-1748
- 2 张绪富, 吕志平, 刘晓燕. 以肝星状细胞为靶标的抗肝纤维化治疗进展. 中国药理学通报 2003; 19: 622-626
- 3 饶慧瑛, 魏来. 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 671-674
- 4 Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, Prokopowicz D. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6198-6202
- 5 席文娜, 孙水林, 李方春, 罗杰, 肖影群, 章萍, 张伟. α-2a干扰素对大鼠肝组织bcl-2基因表达的影响及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3237-3240
- 6 Krishnaswamy M, Purushothaman KK. Plumbagin: A study of its anticancer, antibacterial & antifungal properties. *Indian J Exp Biol* 1980; 18: 876-877

- 7 赵铁建, 钟振国, 方卓, 付杰军, 覃玉智, 段雪琳, 廖丹. 白花丹水煎液对四氯化碳慢性肝损伤小鼠肝组织脂质过氧化的影响. 广西医科大学学报 2006; 23: 725-726
- 8 赵铁建, 钟振国, 方卓, 付杰军, 廖丹, 段雪琳, 刘雪梅. 白花丹提取物抗小鼠肝纤维化作用的研究. 广西中医药 2005; 28: 50-52
- 9 韦燕飞, 刘雪梅, 唐爱存, 彭岳, 钟振国, 方卓, 赵铁建. 白花丹醌对瘦素刺激人肝星状细胞转化生长因子-β1表达的影响. 中国药理学通报 2010; 26: 421-424
- 10 刘雪梅, 韦燕飞, 彭岳, 谢海源, 方卓, 段雪琳, 赵铁建. 白花丹醌对瘦素诱导人肝星状细胞增殖与α-SMA表达的影响. 中国药理学通报 2010; 26: 1154-1157
- 11 Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 437-451
- 12 聂青和. 肝纤维化的逆转策略及研究现状. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1165-1174
- 13 张怡, 平洁, 汪晖. 肝星状细胞凋亡信号途径及其药物治疗的研究进展. 中国药理学通报 2009; 25: 16-18
- 14 Aprigliano I, Dudas J, Ramadori G, Saile B. Atorvastatin induces apoptosis by a caspase-9-dependent pathway: an in vitro study on activated rat hepatic stellate cells. *Liver Int* 2008; 28: 546-557
- 15 de Villiers WJ, Song Z, Nasser MS, Deaciuc IV, McClain CJ. 4-Hydroxynonenal-induced apoptosis in rat hepatic stellate cells: mechanistic approach. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 414-422
- 16 赵和平, 解燕茹. Bcl-2、Bax蛋白表达在非酒精性脂肪性肝病中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2409-2412
- 17 李继强, 柳峰, 刘文忠, 马雄, 朱红音, 陈晓宇, 彭延申. 依那普利对肝组织bax和bcl-2基因表达的影响. 中华消化杂志 2006; 26: 539-543
- 18 Ermak N, Lacour B, Drüeke TB, Vicca S. Role of reactive oxygen species and Bax in oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis of human monocytes. *Atherosclerosis* 2008; 200: 247-256
- 19 刘圆, 钟熠, 高泽文, 刘超. 白花丹药材的研究进展. 华西药理学杂志 2006; 22: 71-73
- 20 谭明雄, 王恒山, 陈振锋, 刘延成, 梁宏. 白花丹化学成分和药理活性研究进展. 中草药 2007; 38: 289-293
- 21 刘元, 李星宇, 莫海涛. 瑶药“猛老虎”的药理研究与临床应用概述. 内科杂志 2008; 3: 607-609
- 22 Ahmad A, Banerjee S, Wang Z, Kong D, Sarkar FH. Plumbagin-induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF-kappaB and Bcl-2. *J Cell Biochem* 2008; 105: 1461-1471
- 23 朱芳, 伍钢, 何远桥, 李振宇, 彭钢, 任精华. 白花丹醌对肝癌细胞HepG2增殖及血管内皮生长因子表达的影响. 中草药 2010; 41: 775-778
- 24 刘超, 刘圆, 颜晓燕. 白花丹醌对人乳腺癌细胞mda-

- mb-231的体外效应. 华西药理学杂志 2008; 23: 42-44
- 25 赵艳丽, 陆道培. 白花丹醌对人急性早幼粒细胞白血病细胞的体外效应. 中国实验血液学杂志 2006; 14: 208-211
- 26 Sugie S, Okamoto K, Rahman KM, Tanaka T, Kawai K, Yamahara J, Mori H. Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 1998; 127: 177-183
- 27 Sandur SK, Ichikawa H, Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-kappaB activation and NF-kappaB-regulated gene products through modulation of p65 and IkappaBalpha kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents. *J Biol Chem* 2006; 281: 17023-17033
- 28 Srinivas P, Gopinath G, Banerji A, Dinakar A, Srinivas G. Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. *Mol Carcinog* 2004; 40: 201-211
- 29 李荣华, 彭岳, 赵铁建, 韦燕飞, 谢海源, 廖丹, 方卓, 刘雪梅. 白花丹对大鼠肝星状细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1171-1177
- 30 Jaiswal AS, Bloom LB, Narayan S. Long-patch base excision repair of apurinic/aprimidinic site DNA is decreased in mouse embryonic fibroblast cell lines treated with plumbagin: involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21Waf-1/Cip-1. *Oncogene* 2002; 21: 5912-5922

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 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6 本期刊 被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6本期刊被PMC收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的. (常务副总编辑: 张海宁 2010-08-17)

缺血型胆道纤维化狭窄大鼠模型的建立

汪景洲, 曾勇, 蒋辉, 徐纓龙, 邱建国, 夏天

汪景洲, 曾勇, 蒋辉, 徐纓龙, 邱建国, 夏天, 四川大学华西医院肝胆胰外科 四川省成都市 610041

汪景洲, 在读硕士, 主要从事肝胆胰疾病的研究.

四川省青年科技基金资助项目, No. 08ZQ026-091

作者贡献分布: 此课题由夏天设计; 曾勇在课题的设计及论文写作中给予指导; 研究过程由汪景洲、蒋辉、徐纓龙及邱建国操作完成; 数据分析由汪景洲完成; 本论文写作由汪景洲完成.

通讯作者: 夏天, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院肝胆胰外科. summer@cd120.com

电话: 028-85422045

收稿日期: 2010-10-27 修回日期: 2010-12-05

接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-02-08

Establishment of a rat model of extrahepatic biliary ischemic stenosis

Jing-Zhou Wang, Yong Zeng, Hui Jiang, Ying-Long Xu, Jian-Guo Qiu, Tian Xia

Jing-Zhou Wang, Yong Zeng, Hui Jiang, Ying-Long Xu, Jian-Guo Qiu, Tian Xia, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by: the Youth Science Foundation of Sichuan Province, No. 074100510017

Correspondence to: Tian Xia, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. summer@cd120.com

Received: 2010-10-27 Revised: 2010-12-05

Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To develop a rat model of extrahepatic biliary ischemic stenosis.

METHODS: Forty-eight Sprague-Dawley rats were divided randomly and equally into four groups: rats undergoing sham operation and those subjected to clamping of the common bile duct with a clip for 60, 120, or 180 min. After scheduled clamping, the clip was removed to recover blood supply. The animals were killed 4 and 8 wk after operation. The survival, liver function, and histopathological changes were observed in rats of each group.

RESULTS: The survival rate was 100% in rats undergoing sham operation and those undergoing clamping for 60 or 120min, and 75% in those undergoing clamping for 180 min. At week 4,

the body weight of rats undergoing clamping for 60, 120 or 180 min was lower than that of rats undergoing sham operation (240.4 g \pm 11.5 g, 212.7 g \pm 13.6 g, 200.6 g \pm 11.8 g vs 260.6 g \pm 15.7 g, all $P < 0.05$). Liver function parameters were higher in rats undergoing clamping for 60, 120 or 180 min than in those undergoing sham operation (ALT: 55.3 IU/L \pm 5.3 IU/L, 215.6 IU/L \pm 26.8 IU/L, 245.5 IU/L \pm 38.5 IU/L vs 45.5 IU/L \pm 3.9 IU/L, all $P < 0.05$; AST: 161.3 IU/L \pm 15.9 IU/L, 645.3 IU/L \pm 50.5 IU/L, 698.8 IU/L \pm 46.7 IU/L vs 140.3 IU/L \pm 6.1 IU/L, all $P < 0.05$; TILB: 8.5 μ mol/L \pm 1.2 μ mol/L, 72.6 μ mol/L \pm 11.0 μ mol/L, 78.7 μ mol/L \pm 12.2 μ mol/L vs 6.1 μ mol/L \pm 1.2 μ mol/L, all $P < 0.05$; ALP: 202.4 IU/L \pm 20.7 IU/L, 815.4 IU/L \pm 68.1 IU/L, 902.9 IU/L \pm 96.6 IU/L vs 158.5 IU/L \pm 23.6 IU/L, all $P < 0.05$; GGT: 10.6 IU/L \pm 2.7 IU/L, 52.3 IU/L \pm 8.6 IU/L, 57.4 IU/L \pm 11.3 IU/L vs 7.6 IU/L \pm 1.4 IU/L, all $P < 0.05$). Histopathological examination showed that biliary stenosis was not apparent and wall fibrosis was milder in rats undergoing sham operation and those undergoing clamping for 60 min, while severe biliary stenosis and wall fibrosis were observed in those undergoing clamping for 120 or 180 min. At week 8, these lesions could not regress spontaneously.

CONCLUSION: An animal model of extrahepatic biliary ischemic stenosis is successfully established with the clamping method in rats, which provides a useful tool for basic and clinical research of the etiology, development and prophylaxis of extrahepatic biliary ischemic stenosis after liver transplantation.

Key Words: Biliary complications; Biliary ischemic stenosis; Animal model; Rat

Wang JZ, Zeng Y, Jiang H, Xu YL, Qiu JG, Xia T. Establishment of a rat model of extrahepatic biliary ischemic stenosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 355-361

摘要

目的: 探索建立大鼠缺血型胆道纤维化狭窄动物模型的方法.

背景资料

缺血型胆道病变 (ITBL) 是指肝移植术后非外科因素造成胆道并发症最主要的因素之一, 其发生率为 2%-19%, 他以泥沙样结石的形成、胆管狭窄、胆管树的损伤以及造成移植物的失功为特征, 目前对于其治疗方式主要为内镜及介入治疗为主, 但治疗效果欠佳, 因此寻找新的治疗方法成为当务之急.

同行评议者

薛东波, 教授, 哈尔滨医科大学附属第一医院微创胆道外科

■ 研究前沿

缺血型胆道病变(ITBL)因其发病原因复杂,临床处理困难,已成为影响肝移植患者长期存活及导致移植植物丢失的主要原因之一。为此,肝移植术后ITBL的研究已引起了全球移植专家的高度重视。

方法: 选取48只成年SD大鼠,随机分为假手术组、胆总管夹闭60、120和180 min组共4组,每组12只。假手术组只游离暴露胆总管,其他各组分别用两枚微血管夹夹闭游离的胆总管两端60、120和180 min后取出微血管夹,恢复夹闭处胆管的血供。4个实验组分别于术后4 wk随机选取8只大鼠行下腔静脉取血,分离血清进行肝功能测定。取胆总管及肝组织石蜡包埋,HE染色,观察组织病理变化并观察各组动物的存活率、体质量改变情况。剩余大鼠于术后8 wk处死,行肝功能的测定及组织病理学检查。

结果: 假手术组、60 min组和120 min大鼠的存活率为100%,180 min组大鼠的存活率为75%(9/12)。术后4 wk,60、120和180 min组大鼠体质量明显低于假手术组(240.4 g±11.5 g,212.7 g±13.6 g,200.6 g±11.8 g vs 260.6 g±15.7 g,均 $P<0.05$)。各组大鼠肝功能指标存在明显差异,60、120、180 min组与假手术组相比显著增高(ALT: 55.3 IU/L±5.3 IU/L,215.6 IU/L±26.8 IU/L,245.5 IU/L±38.5 IU/L vs 45.5 IU/L±3.9 IU/L,均 $P<0.05$; AST: 161.3 IU/L±15.9 IU/L,645.3 IU/L±50.5 IU/L,698.8 IU/L±46.7 IU/L vs 140.3 IU/L±6.1 IU/L,均 $P<0.05$; TILB: 8.5 μmol/L±1.2 μmol/L,72.6 μmol/L±11.0 μmol/L,78.7 μmol/L±12.2 μmol/L vs 6.1 μmol/L±1.2 μmol/L,均 $P<0.05$; ALP: 202.4 IU/L±20.7 IU/L,815.4 IU/L±68.1 IU/L,902.9 IU/L±96.6 IU/L vs 158.5 IU/L±23.6 IU/L,均 $P<0.05$; GGT: 10.6 IU/L±2.7 IU/L,52.3 IU/L±8.6 IU/L,57.4 IU/L±11.3 IU/L vs 7.6 IU/L±1.4 IU/L,均 $P<0.05$); 120与60 min组相比显著增高; 180 min与120 min相比升高不明显。组织病理检查显示:假手术组、60 min组缺血处胆管组织管腔狭窄不明显,管壁纤维化程度较轻。120和180 min组缺血处胆管管腔变小,管壁纤维增厚明显,管壁上皮细胞出现坏死脱落,夹闭处以上胆管扩张明显,管壁变薄。术后8 wk上述病变不能自行恢复。

结论: 采用微血管夹钳夹的方法可以建立稳定的大鼠缺血型胆道纤维化狭窄动物模型,为研究肝移植术后胆道的缺血型病变形成的机制及病因学研究提供可靠的研究方法。

关键词: 胆道并发症;缺血型胆道狭窄病变;动物模型;大鼠

汪景洲,曾勇,蒋辉,徐纛龙,邱建国,夏天. 缺血型胆道纤维化狭窄大鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 355-361

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/355.asp>

0 引言

自1963年Starzl开展首例原位肝移植以来,肝移植已成为治疗终末期肝病的重要方法。随着肝移植技术的日趋完善,肝移植术后并发症如感染、排斥反应、血管并发症、神经系统并发症等逐渐减少,而胆道并发症成为影响移植肝长期存活的重要因素,由此造成的胆管引流问题成了肝移植的致命弱点。肝移植术后胆道并发症是胆道外科长期以来所面临的严峻挑战,其发生率为5%-15%^[1],国外另有报道其发生率高达26%^[2],其死亡率约为19%^[3],再移植率为6%-13%^[4,5],是肝移植临床实践的“阿喀琉斯之踵”。随着对胆道系统认识的不断深入统一、手术操作技术的不断提高规范,由外科因素引起的吻合口狭窄、胆漏等发生率已呈下降趋势,但缺血性胆管损害、免疫性胆管损害与感染性胆管损害等非外科因素所致并发症的发生率仍可高达19%,是当前临床上导致肝移植术后移植植物丢失与受体死亡的主要原因。传统临床对其缺乏有效治疗手段,故被称为“阿喀琉斯之踵再现”^[6]。其中缺血型胆道病变(ischemic type biliary lesion, ITBL)因其发病原因复杂,临床处理困难,已成为影响肝移植患者长期存活及导致移植植物丢失的主要原因之一^[7]。为此,肝移植术后ITBL的研究已引起了全球移植专家的高度重视^[8]。因此探索建立缺血型胆道并发症的动物模型就成为当务之急,他对研究肝移植术后缺血型胆道并发症的病因、疾病的发生发展过程和探寻更加有效的治疗方法都将起到重要作用。本实验证明采用微血管夹夹闭SD大鼠胆总管120 min,可以成功建立肝外胆道缺血型狭窄的动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料 选取♂SD大鼠48只,体质量170-200 g(四川大学动物中心提供)。所有大鼠术前均饲养于22℃,55%相对湿度,12 h昼夜节律,自由进食水。适应1 wk后开始实验。48只大鼠随机分为4组(每组12只)包括:假手术组、胆总管夹闭60 min组、120 min组及180 min组。

1.2 方法

1.2.1 造模: 所有大鼠于术前12 h禁食,6 h禁水,6 mL/kg水合氯醛腹腔注射麻醉后备皮,麻醉满意后仰卧固定于实验台上,腹部剪毛备皮后消毒铺巾,取上腹正中切口约4 cm,常规检查肝、胰、胃、肠等腹内脏器无器质性病变后,按逆

时针方向依次离断肝周韧带, 显露肝门、肝蒂, 充分游离十二指肠水平的肝十二指肠韧带, 暴露胆总管、肝动脉、门静脉, 假手术组只游离胆总管、肝动脉、门静脉; 其余各组于左右肝管汇成肝总管处向下解剖一段长约1.5 cm完全游离的胆总管, 用两枚微血管夹分别夹闭游离胆管的远端分别为60、120和180 min后取下微血管夹恢复胆管的血供后, 以3-0号丝线间断缝合关闭腹腔。各组大鼠分别随机选取8只于术后4 wk处死, 剩余大鼠用于长时间观察。

1.2.2 观察指标: 存活率: 各组大鼠术后饲养于相同环境下4 wk, 观察各组大鼠的生存率。体质量变化: 各组大鼠于术后4 wk观察术前与术后体质量的变化情况。肝功能指标的测定: 各组大鼠每组随机选取8只于术后4 wk处死, 在处死前下腔静脉取血2 mL, 立即送华西医院检验科生化分析室行谷丙转氨酶(alanine amino transferase, ALT)、谷草转氨酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、谷氨酰转肽酶(glutamyl transpeptidase, GGT)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)的测定。同样剩余每组剩余的大鼠于术后8 wk行上述肝功能指标的测定。组织病理检测: 各组大鼠分别选取8只于术后4 wk取缺血部位的胆管及肝门处肝脏组织, 4%的多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, HE及Masson染色, 观察病理变化。剩余大鼠于术后8 wk取相应部位胆管及肝脏组织观察病理变化。

统计学处理 实验数据以mean±SD表示, 以SPSS18.0统计软件采用方差分析及多个均数间的两两比较的方法进行统计学处理分析, $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物的存活情况 假手术组、60及120 min组大鼠的存活率为100%, 180 min组于术后第5、7、10天各死亡1只, 存活率为75%。引起大鼠死亡的原因经尸检证实包括胆漏、腹腔感染、肝脏缺血性坏死所致。其中60、120和180 min实验组大鼠术后与假手术组大鼠比较出现精神萎靡、体毛干枯无光泽。

2.2 体质量的变化 120和180 min组术后4 wk体质量增长速度与假手术组和60 min组相比减慢($P<0.05$, 表1)。

2.3 各组大鼠术后肝功能指标的测定 在实验之前我们随机选择4只正常SD大鼠来测定上述

表1 各组动物实验前后体质量的变化(mean±SD, g)

| 分组 | n | 术前 | 术后4 wk |
|----------|----|------------|-------------------------|
| 假手术组 | 12 | 188.1±9.9 | 260.6±15.7 ^a |
| 60 min组 | 12 | 187.3±11.4 | 240.4±11.5 ^c |
| 120 min组 | 12 | 185.4±9.0 | 212.7±13.6 ^e |
| 180 min组 | 9 | 184.2±9.5 | 200.6±11.8 |

^a $P<0.05$ vs 60 min组; ^c $P<0.05$ vs 120 min组; ^e $P<0.05$ vs 180 min组。

指标的正常值范围(ALT: 40.3 IU/L±5.8 IU/L, AST: 132.1 IU/L±24.3 IU/L, ALP: 150.5 IU/L±37.1 IU/L, GGT: 6.1 IU/L±2.1 IU/L, TBIL: 5.5 IU/L±2.6 IU/L)。术后4 wk在120、180 min组所有观察的生化指标都存在不同程度的增高, 而在假手术组、60 min组上述生化指标较正常SD大鼠无明显差异, 尤其是反应胆道系统受损的酶类(ALP、GGT)较术前有明显增高, 而各组剩余大鼠在术后8 wk测量上述生化指标较术前也有所增高, 但ALT、AST, 较术后4 wk有明显降低, 而ALP、GGT仍旧维持在较高水平。考虑可能为肝脏储备代偿所致, 而胆系损坏没有得到恢复(表2, 3)。

2.4 病理学检测 术后4 wk 4组分别随机选取8只大鼠夹闭处胆总管及肝门处肝脏组织行病理学检查, 夹闭处胆总管病理结果显示: 假手术组: 胆总管管壁上皮细胞形态正常, 管腔无明显增厚, Masson染色较浅, 纤维化不明显。60 min组: 胆管上皮细胞形态基本正常, 管壁增厚不明显, 有轻度纤维化形成。120 min: 胆总管管壁明显增厚, 腔内有坏死细胞形成, Masson染色较深, 纤维化形成明显。180 min组: 胆管壁有大量胶原纤维形成, 胆管管腔变窄。术后4 wk各实验组肝脏组织病理结果显示: 假手术组肝内胆管上皮细胞无坏死脱落, 管腔形态正常。60 min组肝内胆管炎症增生明显, 但胆管形态基本正常。120 min组肝内胆管管壁增厚, 周围有胶原纤维组织形成。180 min肝内胆管管壁周围有大量胶原纤维形成, 管腔变窄。术后8 wk处死取剩余大鼠取夹闭处胆管组织及肝组织行病理学检查可以看到胆总管纤维化仍旧存在, 说明上述病变无法自行恢复(图1, 2)。

3 讨论

ITBL是指肝移植术后移植肝非吻合技术性的胆管树的破坏, 其发生率为2%-19%, 他以泥沙样结

■ 相关报道

Sheng等在建立兔子肝内胆管缺血性病变模型中选择术后4 wk观察病变的时间点发现肝内胆管上皮细胞缺血坏死明显, 正常上皮结构消失。

■应用要点

本实验证明采用微血管夹夹闭SD大鼠胆总管120 min, 可以成功建立肝外胆道缺血型狭窄的动物模型。

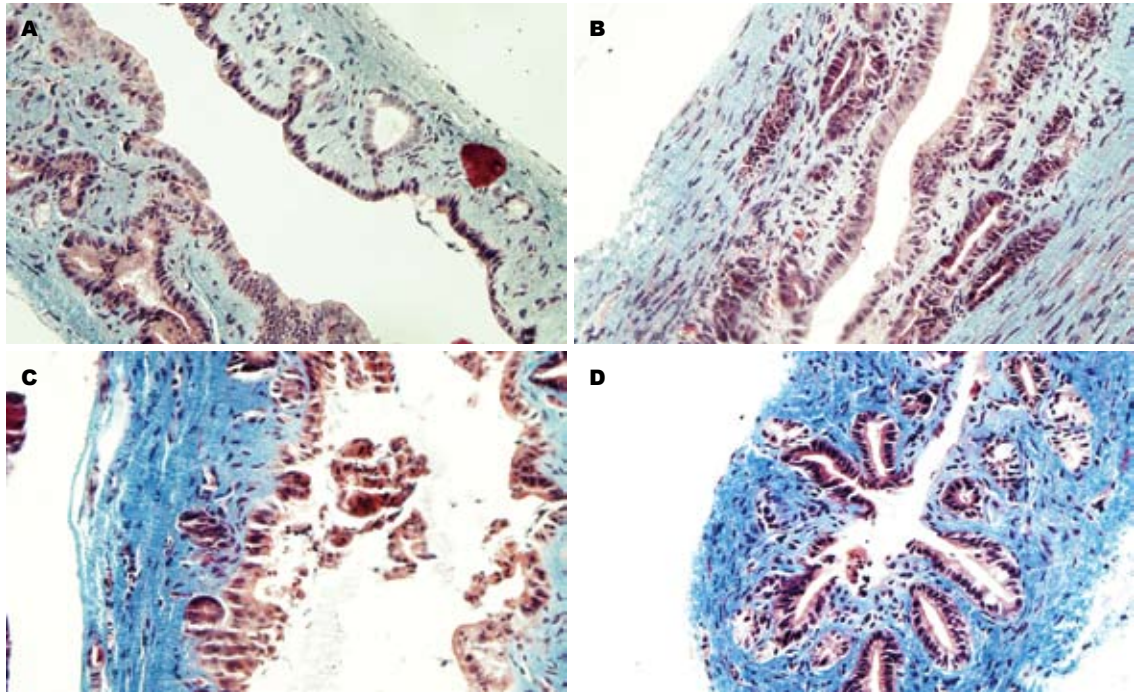


图 1 术后4 wk夹闭处胆管组织病理学检查(Masson染色 × 400). A: 假手术组; B: 60 min组; C: 120 min组; D: 180 min组.

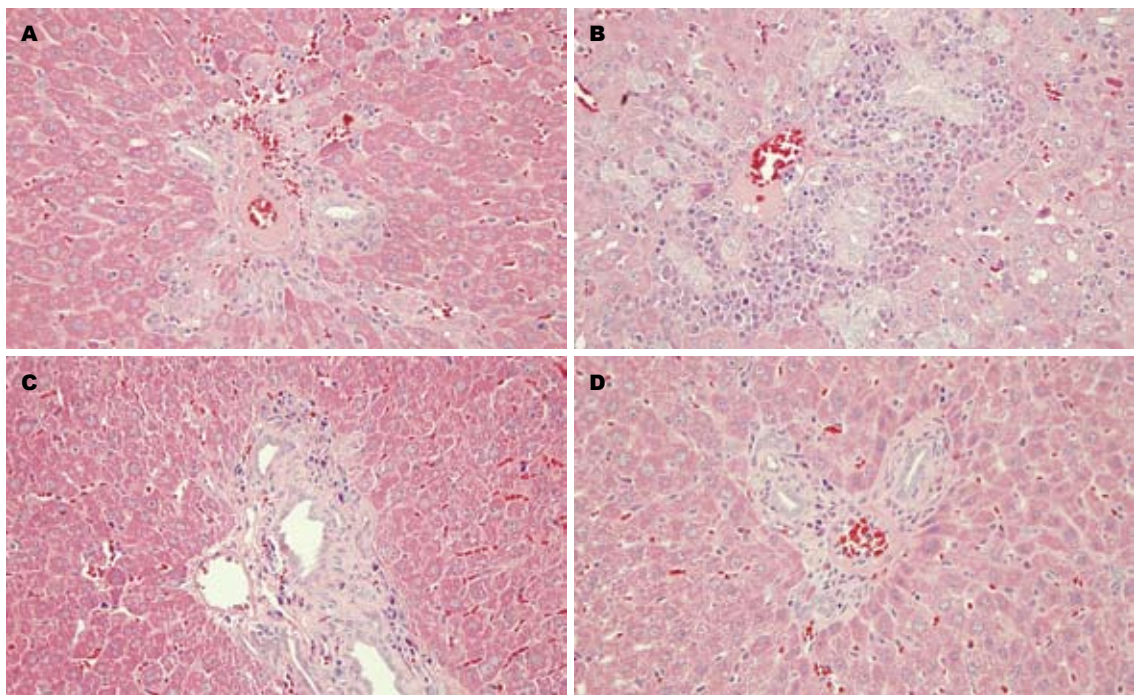


图 2 术后4 wk各实验组肝脏组织病理检查(HE染色 × 400). A: 假手术组; B: 60 min组; C: 120 min组; D: 180 min组.

石的形成、胆管狭窄、胆管树的损伤以及造成移植物的失功为特征^[9,10]. ITBL分为肝内胆管、肝外胆管和混合性病变三类. ITBL的确切病因现尚未清楚, 但随着研究的深入发现与移植器官冷缺血及热缺血时间的过长^[11,12]、缺血再灌注损伤^[13,14]、胆管周围动脉血供的破坏^[15]、ABO溶血^[16-18]、巨细胞病毒的感染^[19,20]、CC趋化因

子受体5 Δ 32^[2]、胆盐的沉积有关^[21], 其中胆管系统周围的动脉血管丛灌注不充分、微血管障碍是ITBL发生的主要原因^[22]. 据Schlitt等^[10]报道肝门部胆管狭窄是肝移植术后ITBL的高发部位, 其临床表现包括肝功能指标的升高, 特别是ALP、GGT的增高以及影像学检查表现为胆管的局限性及弥漫性狭窄. 目前对ITBL的诊断主

表 2 术后4 wk各组肝功能指标的变化 (mean ± SD, n = 8)

| 分组 | ALT (IU/L) | AST (IU/L) | TILB (μmol/L) | ALP (IU/L) | GGT (IU/L) |
|----------|-------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | 45.5 ± 3.9 ^a | 140.3 ± 6.1 ^a | 6.1 ± 1.2 ^a | 158.5 ± 23.6 ^a | 7.6 ± 1.4 ^a |
| 60 min组 | 55.3 ± 5.3 ^c | 161.3 ± 15.9 ^c | 8.5 ± 1.2 ^c | 202.4 ± 20.7 ^c | 10.6 ± 2.7 ^c |
| 120 min组 | 215.6 ± 26.8 | 645.3 ± 50.5 | 72.6 ± 11.0 | 815.4 ± 68.1 | 52.3 ± 8.6 |
| 180 min组 | 245.5 ± 38.5 | 698.8 ± 46.7 | 78.7 ± 12.2 | 902.9 ± 96.6 | 57.4 ± 11.3 |

^aP<0.05 vs 60 min组; ^cP<0.05 vs 120 min组.

表 3 术后8 wk各组肝功能指标的变化 (mean ± SD)

| 分组 | ALT (IU/L) | AST (IU/L) | TILB (μmol/L) | ALP (IU/L) | GGT (IU/L) |
|----------|-------------|--------------|---------------|--------------|------------|
| 假手术组 | 42.3 ± 6.5 | 142.3 ± 10.1 | 6.4 ± 1.3 | 157.3 ± 12.0 | 7.8 ± 1.5 |
| 60 min组 | 48.5 ± 8.1 | 148.5 ± 11.1 | 8.8 ± 1.5 | 178.8 ± 15.5 | 8.5 ± 2.4 |
| 120 min组 | 80.8 ± 12.1 | 200.6 ± 27.0 | 40.7 ± 6.7 | 500.5 ± 76.6 | 38.3 ± 9.9 |
| 180 min组 | 90.0 ± 0.0 | 242.0 ± 0.0 | 42.6 ± 0.0 | 605.0 ± 0.0 | 41.0 ± 0.0 |

ALT、AST、TILB等指标较术后第4 wk有明显降低, 而ALP、GGT等反应胆系损坏程度的指标下降幅度较小。

要依靠影像学诊断, 近年来研究发现磁共振胆管成像诊断胆道有较好的敏感性和特异性^[23,24]。目前对肝门部胆管狭窄的治疗方法较为局限主要包括放射介入治疗和内镜治疗^[25,26]。虽然通过包括球囊扩张及铸型与放置内支架可以暂时缓解胆道梗阻, 但是远期效果欠佳^[27], 往往需要多次介入治疗。反复介入治疗可以导致肝门部炎症加重, 甚至导致肝内、膈下、肝上下腔静脉吻合口附近的多发脓肿形成, 增加再次肝移植的难度。对于手术治疗目前采取较为谨慎的态度, 手术的方式主要采用肝外胆管狭窄处的切除以及高位肝胆管空肠吻合术, 由于肝门部二次手术的难度加大, 且有可能破坏已经形成的侧枝循环导致手术的失败。基于上述等原因现在更加强调对ITBL早期预防以及积极探索新的可靠的治疗方法。因此缺血性胆道狭窄模型的建立就成为当务之急, 出于上述考虑我们选取用微血管夹夹闭的方法造成大鼠夹闭处胆总管的缺血, 进而形成纤维化狭窄, 为进一步探索和寻求有效防治手段提供了实验模型。

本实验通过选择夹闭胆总管不同的时间点(不夹闭, 60、120、180 min)及对各个实验组大鼠实验前后体质量、肝功能以及组织病理学变化, 我们发现随着夹闭时间的延长, 各组肝功能指标出现不同程度增高, 其中以120、180 min两组较其他两组增高尤为明显(均P<0.01), 术后8 wk, ALT、AST与TILB等肝功能指标下降明

显, 考虑为肝脏的代偿适应功能所致, 而反映胆系破坏的ALP与GGT下降幅度较低, 考虑为胆管损伤的持续破坏存在有关; 组织病理学显示肝外胆管缺血性狭窄的程度不断增加, 在60 min组胆总管纤维化的程度较轻, 肝内胆管出现炎症性增生, 而在120及180 min组可以看到胆总管壁增厚, 管腔变窄, 胆总管上皮细胞出现坏死脱落。但是在180 min实验组大鼠术后4 wk的生存率为75%, 而在120 min组大鼠的生存率则为100%。所以我们认为选择夹闭胆总管120 min建立大鼠缺血型胆道纤维化狭窄动物模型是较为理想的夹闭时间点。

一般认为缺血性胆道纤维化狭窄往往发生在肝移植术后的1-3 mo^[3]。Sheng等^[28]在建立兔子肝内胆管缺血性病变模型中选择术后4 wk观察病变的时间点发现肝内胆管上皮细胞缺血坏死明显, 正常上皮结构消失。Zhao等^[29]在建立小鼠缺血型胆道纤维化模型同样选择4 wk为观察时限, 所以在本实验中我们也采用了术后4 wk为观察病变的时间点, 而且每个实验组我们都有剩余大鼠于术后8 wk再次行组织病理学观察, 没有发现病变存在显著变化。从而也说明上述病变不会因观察时间的延长而自行恢复。

本实验存在以下优点: (1)我们选择采用统一规格的微血管夹夹闭胆总管建立肝外胆管缺血性模型具有较高的可比性, 而且建立动物模型的稳定性较高; (2)该实验通过两枚微血管夹

同行评价

本文选题较好, 学术价值较高, 为进一步的实验奠定基础, 提供有益参考。

夹闭胆总管的两端造成夹闭处胆总管完全缺血,然后选择不同的时间点松开,可以较好反应热缺血以及缺血再灌注损伤在肝移植术后胆道缺血性损伤过程中作用;(3)本实验动物模型排除了其他手术因素的影响(胆管吻合、肝动脉吻合、T管引流)、移植器官的冷保存、药物因素的影响;(4)本实验具有操作简单、成功率高、动物模型稳定性高等特点而且选择大鼠做动物模型,具有价格低廉、经济实惠等优点。

总之,通过采用微血管夹夹闭的方法成功建立大鼠缺血型胆道纤维化狭窄动物模型可以为研究肝移植术后ITBL的病因学、发生发展过程以及探索更加有效可靠的治疗方法提供稳定的实验基础。

4 参考文献

- Buis CI, Hoekstra H, Verdonk RC, Porte RJ. Causes and consequences of ischemic-type biliary lesions after liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006; 13: 517-524
- Moench C, Uhrig A, Lohse AW, Otto G. CC chemokine receptor 5delta32 polymorphism-a risk factor for ischemic-type biliary lesions following orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2004; 10: 434-439
- Greif F, Bronsther OL, Van Thiel DH, Casavilla A, Iwatsuki S, Tzakis A, Todo S, Fung JJ, Starzl TE. The incidence, timing, and management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Ann Surg* 1994; 219: 40-45
- Osorio RW, Freise CE, Stock PG, Lake JR, Laberge JM, Gordon RL, Ring EJ, Ascher NL, Roberts JP. Nonoperative management of biliary leaks after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1993; 55: 1074-1077
- Letourneau JG, Castañeda-Zuñiga WR. The role of radiology in the diagnosis and treatment of biliary complications after liver transplantation. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1990; 13: 278-282
- Fisher A, Miller CH. Ischemic-type biliary strictures in liver allografts: the Achilles heel revisited? *Hepatology* 1995; 21: 589-591
- Wilson BJ, Marsh JW, Makowka L, Stieber AC, Koneru B, Todo S, Tzakis A, Gordon RD, Starzl TE. Biliary tract complications in orthotopic adult liver transplantation. *Am J Surg* 1989; 158: 68-70
- 董家鸿, 叶晟. 肝移植术后胆道并发症诊治. *中国实用外科杂志* 2002; 22: 428-431
- Hoffman A, Kiesslich R, Moench C, Bittinger F, Otto G, Galle PR, Neurath MF. Methylene blue-aided cholangioscopy unravels the endoscopic features of ischemic-type biliary lesions after liver transplantation. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 1052-1058
- Schlitt HJ, Meier PN, Nashan B, Oldhafer KJ, Boeker K, Flemming P, Raab R, Manns MP, Pichlmayr R. Reconstructive surgery for ischemic-type lesions at the bile duct bifurcation after liver transplantation. *Ann Surg* 1999; 229: 137-145
- 郭宏伟, 杨玉龙, 付维利, 谭文翔. 肝移植术后胆道缺血再灌注损伤的临床分析. *肝胆胰外科杂志* 2007; 19: 242-243
- 张宝良, 袁庆鑫, 刘彤. 供肝热缺血损伤对大鼠肝移植术后胆汁淤积的影响. *肝胆外科杂志* 2009; 17: 64-66
- 陈志宇, 李晓武, 董家鸿. 肝移植术后缺血型胆道病变. *肝胆外科杂志* 2005; 13: 75-76
- Vajdová K, Smreková R, Kukan M, Lutterová M, Wsólóvá L. Bile analysis as a tool for assessing integrity of biliary epithelial cells after cold ischemia-reperfusion of rat livers. *Cryobiology* 2000; 41: 145-152
- Grewal HP, Shokouh-Amiri MH, Vera S, Stratta R, Bagous W, Gaber AO. Surgical technique for right lobe adult living donor liver transplantation without venovenous bypass or portocaval shunting and with duct-to-duct biliary reconstruction. *Ann Surg* 2001; 233: 502-508
- Nakamura Y, Matsuno N, Iwamoto H, Yokoyama T, Kuzuoka K, Kihara Y, Taira S, Sagara T, Jojima Y, Konno O, Tashiro J, Akashi I, Hama K, Narumi K, Iwahori T, Uchiyama M, Tanaka K, Nagao T. Successful case of adult ABO-incompatible liver transplantation: beneficial effects of intrahepatic artery infusion therapy: a case report. *Transplant Proc* 2004; 36: 2269-2273
- Warner PR, Nester TA. ABO-incompatible solid-organ transplantation. *Am J Clin Pathol* 2006; 125 Suppl: S87-S94
- Yang JM, Zhu B. Intrahepatic cholestasis after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 176-178
- Halme L, Hockerstedt K, Lautenschlager I. Cytomegalovirus infection and development of biliary complications after liver transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1853-1858
- Hellinger WC, Bonatti H, Machicao VI, Yao JD, Brumble LM, Alvarez S, Weigand SD, Dickson RC, Harnois DM, Spivey JR, Stapelfeldt WH, Hughes CB, Nguyen JH, Steers JL. Effect of antiviral chemoprophylaxis on adverse clinical outcomes associated with cytomegalovirus after liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 1029-1033
- Barton P, Steininger R, Maier A, Mühlbacher F, Lechner G. Biliary sludge after liver transplantation: 2. Treatment with interventional techniques versus surgery and/or oral chemolysis. *AJR Am J Roentgenol* 1995; 164: 865-869
- 崔东旭, 刘臻, 刘宝林, 张小薄, 许维雪, 邓永林, 沈中阳. 原位肝移植术后胆道并发症诊治134例. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3045-3048
- 董其龙, 陈代文, 史震山, 钟群, 陈自谦. 肝移植术后胆系并发症影像学特点及对防治的提示. *中国组织工程研究与临床康复* 2008; 12: 3410-3414
- Boraschi P, Donati F, Gigoni R, Urbani L, Femia M, Cossu MC, Filippini F, Falaschi F. Ischemic-type biliary lesions in liver transplant recipients: evaluation with magnetic resonance cholangiography. *Transplant Proc* 2004; 36: 2744-2747
- Turrión VS, Alvira LG, Jiménez M, Lucena JL, Nuño J, Pereira F, Vicente E, Ardaiz J. Management of the biliary complications associated with liver transplantation: 13 years of experience. *Transplant Proc* 1999; 31: 2392-2393
- Patkowski W, Nycowski P, Zieniewicz K, Pawlak J, Michalowicz B, Kotulski M, Smoter P, Grodzicki M, Skwarek A, Ziolkowski J, Oldakowska-Jedynak U, Niewczas M, Paczek L, Krawczyk M. Biliary tract complications following liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35: 2316-2317
- 陆雷, 王轩, 仇毓东. ERCP干预移植肝胆道狭窄预后

- 的影响因素. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2822-2825
- 28 Sheng QS, Chen DZ, Lang R, He Q, Yang YJ, Qu ZW, Zhao DF, Zhang XS. Establishment of an animal model of ischemic type intrahepatic biliary lesion in rabbits. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 732-736
- 29 Zhao DF, Chen DZ, Lv JS, Lang R, Jin ZK, Qing H. Establishment of an animal model of biliary ischemic stenosis with clamping in mice. *Transplant Proc* 2008; 40: 1303-1305

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》入选北京大学图书馆
2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊(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)

高氧对肠上皮细胞表达分泌片的影响

刘冬妍, 苗佳宁

■背景资料

当前临床抢救新生儿呼吸衰竭最有效的方法是氧疗,即机械通入高浓度的氧,此疗法虽挽救患儿生命,但长时间高氧治疗会引起肺、脑、眼等近隔器官损伤,近年陆续报道长期高氧治疗还引起新生儿肾、肝、肠等远隔器官损伤。

刘冬妍, 苗佳宁, 中国医科大学附属盛京医院实验研究中心 卫生部小儿先天畸形重点实验室 辽宁省沈阳市 110004
刘冬妍, 副教授, 博士, 主要从事感染免疫和黏膜免疫方面的研究。国家自然科学基金资助项目, No. 30871158
辽宁省教委课题基金资助项目, No. 2008783
作者贡献分布: 此课题由刘冬妍设计; 研究过程由刘冬妍操作完成; 数据分析由刘冬妍完成; 苗佳宁对图片处理给予帮助; 论文写作由刘冬妍完成。
通讯作者: 刘冬妍, 副教授, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院实验研究中心, 卫生部小儿先天畸形重点实验室。dongyan.liu@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-08-13 修回日期: 2011-01-04
接受日期: 2011-01-11 在线出版日期: 2011-02-08

Effect of hyperoxia on the expression of secretory component in human intestinal epithelial Caco-2 cells

Dong-Yan Liu, Jia-Ning Miao

Dong-Yan Liu, Jia-Ning Miao, Experimental Research Center, Shengjing Hospital of China Medical University; Key Laboratory for Congenital Malformation Research, Ministry of Health, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30871158; and the Foundation of the Education Department of Liaoning Province, No. 2008783

Correspondence to: Associate Professor Dong-Yan Liu, Experimental Research Center, Shengjing Hospital of China Medical University; Key Laboratory for Congenital Malformation Research, Ministry of Health, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. dongyan.liu@yahoo.com.cn
Received: 2010-08-13 Revised: 2011-01-04
Accepted: 2011-01-11 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To explore the effect of hyperoxia on the expression of secretory component (SC) in human intestinal epithelial Caco-2 cells.

METHODS: The number of Caco-2 cells was counted with a hemacytometer, and cell division was determined by Giemsa staining. The changes in the expression levels of SC in Caco-2 cells were detected by immunocytochemistry.

RESULTS: Caco-2 cells exhibited exponential growth in air containing 400 mL/L O₂. Cell growth was partially inhibited when the proportion of oxygen in air was elevated to 600 mL/L,

and completely inhibited when elevated to 900 mL/L. The division index of treated cells was 2.5% in air, 3.3% in 400 mL/L O₂, and 1.3% in 600 mL/L O₂. Many cells died in 900 mL/L O₂. Compared with cells incubated in air, the expression of SC was up-regulated in 400 mL/L and 600 mL/L O₂. The ability of intestinal epithelial cells to express SC was limited in 900 mL/L O₂. Compared with cells incubated in 400 mL/L O₂, the expression of SC was down-regulated in 600 mL/L O₂.

CONCLUSION: Moderately high concentrations of oxygen promote cell growth and SC expression in Caco-2 cells, whereas extremely high concentrations of oxygen inhibit cell growth and SC expression. High levels of SC are beneficial to maintaining and balancing the intestinal mucosa and inhibiting bacterial invasion.

Key Words: Hyperoxia; Intestinal epithelial cells; Secretory component; Cell growth; Cell division

Liu DY, Miao JN. Effect of hyperoxia on the expression of secretory component in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 362-366

摘要

目的: 研究高氧对肠上皮细胞分泌片(SC)表达的影响。

方法: 采用细胞计数和Giemsa染色方法检测不同氧浓度对细胞生长和细胞分裂能力的影响,采用免疫组织化学方法检测不同氧浓度对Caco-2表达SC的影响。

结果: 细胞计数显示400 mL/L氧浓度利于细胞生长; 600、900 mL/L氧浓度导致细胞迅速死亡。不同氧浓度干预细胞3 d细胞分裂指数有明显不同,分裂细胞百分数分别为正常氧浓度2.5%; 400 mL/L氧浓度为3.3%; 600 mL/L氧浓度为1.3%; 900 mL/L氧浓度大部分细胞死亡。与正常氧浓度相比,氧浓度为400、600 mL/L时SC表达增强,900 mL/L氧浓度时SC表达明显减弱,甚为阴性,但600 mL/L氧浓度SC表达较400 mL/L氧浓度减弱。

■同行评议者

白雪巍, 副教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆胰外科

结论: 适度的高氧促进细胞生长和促进肠上皮细胞表达SC, 严重高氧则抑制肠上皮细胞SC表达及肠上皮细胞生长, 肠上皮细胞SC表达增多有助于保护肠黏膜及平衡肠黏膜作用, 阻滞细菌入侵肠道。

关键词: 高氧; 肠上皮细胞; 分泌片; 细胞生长; 细胞分裂

刘冬妍, 苗佳宁. 高氧对肠上皮细胞表达分泌片的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 362-366
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/362.asp

0 引言

单层Caco-2细胞来源于人体结肠癌细胞株, 此细胞类似正常人肠上皮细胞, 在形态学与人体肠上皮细胞相同, 并可分泌与人体相同的酶类、转化因子等^[1], 目前有文献报道高氧可影响新生儿肠道形态和屏障功能^[2,3], 本研究中我们利用高氧对体外培养的Caco-2细胞进行干预, 研究高氧对肠上皮细胞生长和表达分泌片(secretory component, SC)的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 Caco-2细胞株(上海生物研究所), 抗人SC抗体(Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 应用含有200 mL/L胎牛血清、青霉素-链霉素双抗液、pH值为7.2的DMEM培养液在37 °C、50 mL/L CO₂条件下培养Caco-2细胞, 每天换液1次。

1.2.2 采用细胞计数方法计数不同氧浓度对细胞生长影响: 当细胞生长达融合状态时, 消化传代, 计数, 均匀传代6瓶, 放入37 °C 50 mL/L CO₂孵箱培养24 h, 细胞贴壁后, 放入400 mL/L氧浓度孵箱后, 分别在第1、2、3、4、5、6天消化计数细胞, 重复上述方法分别将6瓶细胞放入600、900 mL/L氧浓度孵箱计数细胞。

1.2.3 采用Giemsa染色方法检测不同氧浓度对细胞分裂能力的影响: 取同代细胞接种于盖玻片上, 放入37 °C、50 mL/L CO₂孵箱培养24 h贴壁后, 放入400、600、900 mL/L氧浓度孵箱内, 分别于第3天、第6天用PBS漂洗数次, 用甲醇:冰乙酸(3:1)固定30 min, Giemsa染液染色10 min, 自来水冲洗, 晾干后镜检. 计算细胞分裂指数(细胞分裂指数 = 分裂细胞数/总细胞数 × 100%)。

1.2.4 免疫组织化学检测不同氧浓度对Caco-2表达SC影响: 取同代细胞接种于盖玻片上, 待细胞

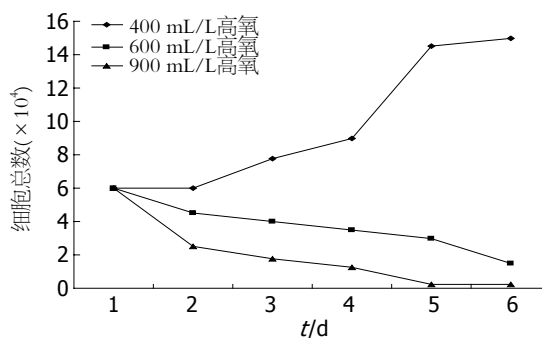


图1 高氧对肠上皮细胞生长的影响。

生长达融合状态时用上述不同氧浓度处理24 h, 取出盖玻片用甲醛固定, 然后依次加入H₂O₂、兔血清、抗SC抗体、生物素标记的IgG抗体、酶标记的卵白素, 最后用DAB显色。

2 结果

2.1 高氧对肠上皮细胞生长的影响 400 mL/L氧浓度时细胞于贴壁后第2天开始增多, 第4、5天呈指数增多, 第6天趋于平稳; 600 mL/L氧浓度时细胞随时间延长逐渐减少; 900 mL/L氧浓度时细胞随时间延长迅速死亡(图1)。

2.2 高氧对肠上皮细胞分裂能力的影响 不同氧浓度干预细胞3 d, 细胞分裂指数有明显不同, 正常氧浓度时细胞密集分布, 部分细胞正在分裂, 分裂细胞百分数为2.5%; 400 mL/L氧浓度时与正常氧浓度相比, 处于正分裂的细胞数增多, 分裂细胞百分数为3.3%; 600 mL/L氧浓度时与正常氧浓度相比, 处于正分裂的细胞数减少, 分裂细胞百分数为1.3%; 900 mL/L氧浓度时大部分细胞死亡, 存活细胞与正常氧浓度细胞相比, 处于正分裂的细胞数明显减少, 难见, 但可见大核细胞. 不同氧浓度干预6 d后细胞终止分裂, 400 mL/L氧浓度细胞分裂指数与正常氧比较无明显不同, 600 mL/L氧浓度细胞分裂指数与正常氧比较无明显不同, 但部分细胞核变大; 900 mL/L氧浓度时大部分细胞死亡, 存活细胞与正常氧浓度细胞相比, 处于正分裂的细胞数与正常氧比较无明显不同, 但部分细胞核变大(图2)。

2.3 高氧对肠上皮细胞表达SC的影响 SC主要位于Caco-2细胞的细胞质和细胞膜上, 在正常氧浓度中SC-阳性细胞数为0.1%-0.5%; 在400 mL/L氧浓度中SC-阳性细胞为0.4%-0.8%. 在600 mL/L氧浓度中 SC-阳性细胞数为0.2%-0.7%. 氧浓度>600 mL/L后SC的表达明显减少, 在900 mL/L氧浓度中不见SC阳性细胞(图3)。

■ 研究前沿

国内外研究新生儿呼吸衰竭高氧治疗对消化系统的影响重点集中在形态学变化、NOS和NO变化, 目前对肠道屏障的损伤成为研究的热点。

■相关报道

刘冬妍等报道高氧引起新生儿肠道SIgA变化; 国外Torbati等和Giannone等分别报道高氧对新生儿肠道造成损伤.

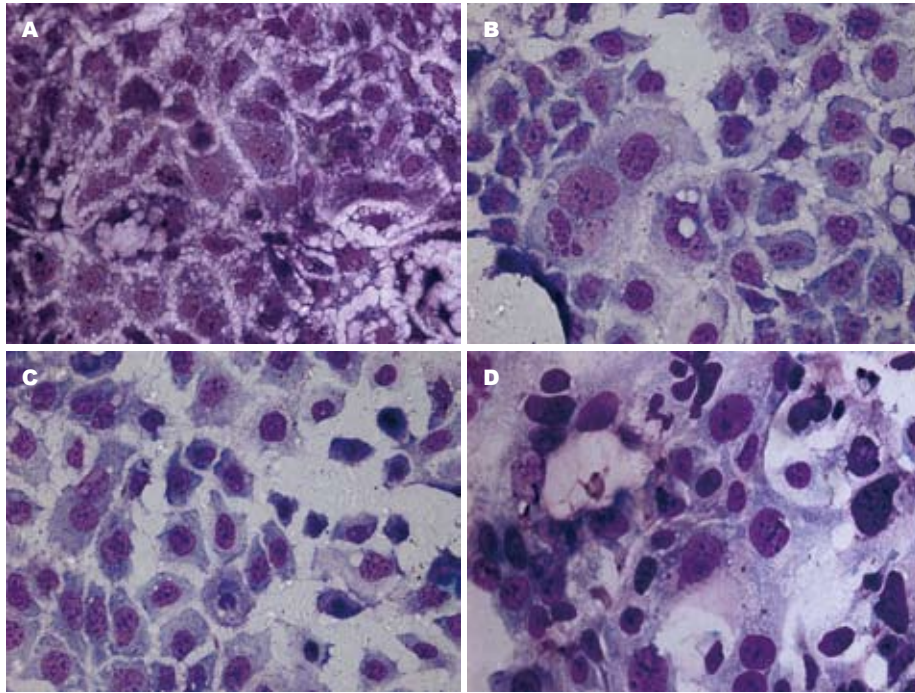


图 2 高氧对细胞分裂能力的影响(Giemsa $\times 40$). A: 正常氧浓度; B: 400 mL/L氧浓度; C: 600 mL/L氧浓度; D: 900 mL/L氧浓度.

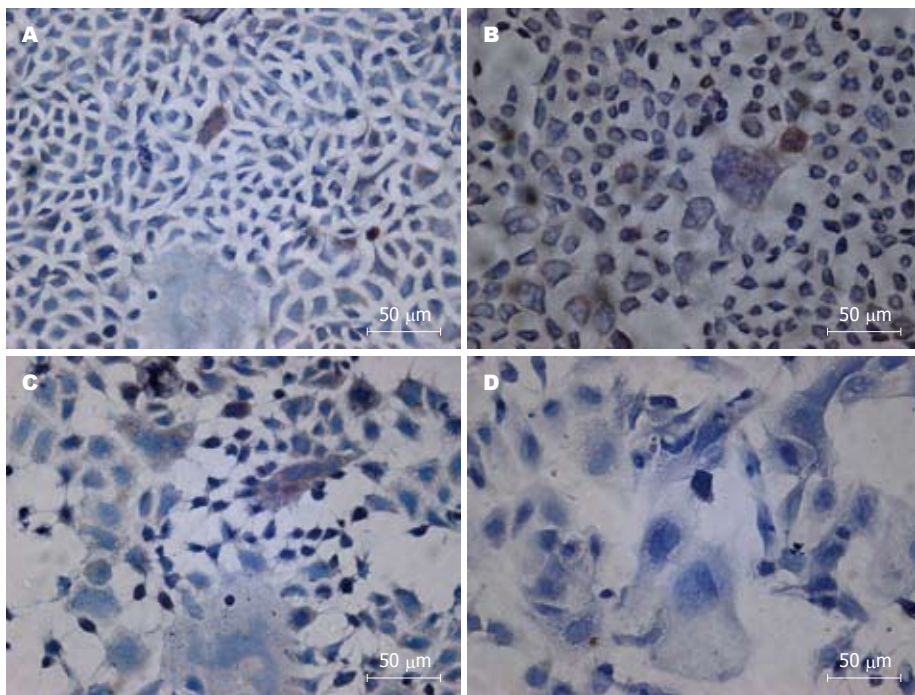


图 3 高氧对肠上皮细胞表达SC的影响(Giemsa $\times 40$). A: 正常氧浓度; B: 400 mL/L氧浓度; C: 600 mL/L氧浓度; D: 900 mL/L氧浓度.

3 讨论

SIgA是肠道第一线的免疫防御, 是肠道免疫屏障的重要组成部分, 他覆盖保护肠黏膜免受有害细菌入侵, 阻止慢性炎症发生^[4,5]. 当细菌黏附和入侵肠道时, 可激活黏膜免疫诱导SIgA大量分泌. SIgA在肠道主要是发挥免疫排除作用^[6,7]和免疫平衡作用^[8], 减少细菌易位, 限制细菌穿透肠上皮^[8]. 他由浆细胞产生的pIgA和J链与肠上皮细胞分泌的pIgR组成. pIgR细胞外部分称为SC, 是黏膜免疫系统的一种重要转膜糖蛋白, 对肠黏

膜有保护作用^[9]. SC可抵抗蛋白酶对SIgA的降解, 加强由SIgA提供的黏膜免疫. SC上有大量不同的糖基, 这是细菌的重要配体, 因此SC作为微生物的重要清除因子可保护上皮免受侵袭^[10]. 游离SC是防御细菌(大肠杆菌、梭状芽孢杆菌、肺炎球菌)、抵御原虫和中和霍乱毒素的重要因子^[11-15], 可作为微生物的非特异清除物和限制炎症过程起到保护肠黏膜及平衡肠黏膜作用^[16].

高氧有“双刃剑”的作用, 高氧可阻止细菌对上皮表面的入侵, 加强黏膜IgA的产生, 但

是长期高氧供应可引起一定的毒性作用, 使机体抵抗力下降, 如高氧可加重流感病毒对新生鼠的感染性^[17]. 长期高氧治疗在出现支气管肺炎发育异常的同时有生长迟缓现象, 该学者认为这是高氧影响肠空泡形成使吸收能力下降引起的, 并且高氧可影响其他器官, 如引起肾小管坏死、肿胀和再生, 以及肠浆膜和亚黏膜血管舒张^[18]. 高氧环境中能引起机体信号通路的改变^[2], 如激活NF- κ B信号通路^[19]等, 高氧还可使肠黏膜厚度变薄, 一氧化氮合酶II (nitric oxide synthase II, NOS II) 蛋白含量减少, 肠绒毛结构的改变和NOS调整可能影响新生鼠肠道屏障功能, 使肠道易遭细菌侵袭^[2]. 国内富建华等^[20]报道高氧使新生大鼠肠道自由基损伤, 本课题组亦报道高氧导致新生大鼠肠道SIgA发生变化^[3], 本研究中体外用不同浓度氧处理肠上皮细胞, 发现肠上皮细胞在40%氧浓度中细胞迅速生长, 分裂指数达3.3%; 在60%氧浓度中生长减慢, 分裂指数也降低; 在90%氧浓度中细胞生长受抑并死亡. 肠上皮细胞分泌SC受许多因素的影响, 如细胞因子^[21-26]、维生素A^[27,28]、NO^[29]、激素和微生物^[30]均影响SC的表达. 本研究发现适度的高氧(在40%氧浓度SC阳性细胞数为0.4%-0.8%, 在60%氧浓度SC阳性细胞数为0.2%-0.7%)可诱导肠上皮细胞分泌SC, 但是严重高氧(90%)限制SC的分泌. 这证明严重高氧抑制肠上皮细胞生长并杀伤肠上皮细胞, 这样导致肠黏膜受损, 肠道屏障削弱. 同时对肠道有保护作用的SC在高氧作用下表达减少, 进一步削弱肠道屏障, 使得细菌易于入侵肠道.

总之, 适度的高氧促进细胞生长和促进肠上皮细胞表达SC, 严重高氧则抑制肠上皮细胞SC表达及肠上皮细胞生长, 肠上皮细胞SC表达增多有助于保护肠黏膜及平衡肠黏膜作用, 阻滞细菌入侵肠道.

4 参考文献

- 1 Yokomizo A, Moriwaki M. Transepithelial permeability of myricitrin and its degradation by simulated digestion in human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 1774-1776
- 2 Giannone PJ, Bauer JA, Schanbacher BL, Reber KM. Effects of hyperoxia on postnatal intestinal development. *Biotech Histochem* 2007; 82: 17-22
- 3 刘冬妍, 陈旭芳, 李玖军. 高氧致新生大鼠肠黏膜SIgA的变化. *中国医科大学学报* 2009; 38: 45-46, 49
- 4 Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr* 2005; 93 Suppl 1: S41-S48
- 5 Shi HN, Walker A. Bacterial colonization and the

- development of intestinal defences. *Can J Gastroenterol* 2004; 18: 493-500
- 6 Boullier S, Tanguy M, Kadaoui KA, Caubet C, Sansonetti P, Corthésy B, Phalipon A. Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. *J Immunol* 2009; 183: 5879-5885
- 7 Corthésy B. Secretory immunoglobulin A: well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009; 31: 174-179
- 8 Macpherson AJ, Slack E. The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 673-678
- 9 Murthy AK, Dubose CN, Banas JA, Coalson JJ, Arulanandam BP. Contribution of polymeric immunoglobulin receptor to regulation of intestinal inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1372-1380
- 10 Perrier C, Sprenger N, Corthésy B. Glycans on secretory component participate in innate protection against mucosal pathogens. *J Biol Chem* 2006; 281: 14280-14287
- 11 de Araújo AN, Giugliano LG. Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiol* 2001; 1: 25
- 12 Dallas SD, Rolfe RD. Binding of *Clostridium difficile* toxin A to human milk secretory component. *J Med Microbiol* 1998; 47: 879-888
- 13 Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* 1997; 25: 1113-1124
- 14 Davids BJ, Palm JE, Housley MP, Smith JR, Andersen YS, Martin MG, Hendrickson BA, Johansen FE, Svård SG, Gillin FD, Eckmann L. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. *J Immunol* 2006; 177: 6281-6290
- 15 Uren TK, Wijburg OL, Simmons C, Johansen FE, Brandtzaeg P, Strugnell RA. Vaccine-induced protection against gastrointestinal bacterial infections in the absence of secretory antibodies. *Eur J Immunol* 2005; 35: 180-188
- 16 Phalipon A, Corthésy B. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol* 2003; 24: 55-58
- 17 O'Reilly MA, Marr SH, Yee M, McGrath-Morrow SA, Lawrence BP. Neonatal hyperoxia enhances the inflammatory response in adult mice infected with influenza A virus. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1103-1110
- 18 Torbati D, Tan GH, Smith S, Frazier KS, Gelvez J, Fakioglu H, Totapally BR. Multiple-organ effect of normobaric hyperoxia in neonatal rats. *J Crit Care* 2006; 21: 85-93; discussion 93-94
- 19 Wright CJ, Zhuang T, La P, Yang G, Dennery PA. Hyperoxia-induced NF- κ B activation occurs via a maturationally sensitive atypical pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296: L296-L306
- 20 富建华, 薛辛东. 高氧诱导慢性肺疾病早产鼠肝肠组织的自由基的变化. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 105-107
- 21 Liu DY, Wang XL, Liu P. Tumor necrosis factor- α upregulates the expression of immunoglobulin

■应用要点

本研究证实高氧影响肠上皮细胞生长和分泌功能, 为探讨高氧对肠道屏障的变化及其机制作了铺垫, 为进一步研究高氧对远隔器官影响奠定基础, 为深入探索防治氧疗后遗症新途径奠定实验基础.

■同行评价

本文学术价值较高, 具有较好的科研及临床意义。

- secretory component. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2007; 17: 101-106
- 22 Sollid LM, Kvale D, Brandtzaeg P, Markussen G, Thorsby E. Interferon-gamma enhances expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric immunoglobulins. *J Immunol* 1987; 138: 4303-4306
- 23 Kvale D, Løvhaug D, Sollid LM, Brandtzaeg P. Tumor necrosis factor-alpha up-regulates expression of secretory component, the epithelial receptor for polymeric Ig. *J Immunol* 1988; 140: 3086-3089
- 24 Phillips JO, Everson MP, Moldoveanu Z, Lue C, Mestecky J. Synergistic effect of IL-4 and IFN-gamma on the expression of polymeric Ig receptor (secretory component) and IgA binding by human epithelial cells. *J Immunol* 1990; 145: 1740-1744
- 25 Denning GM. IL-4 and IFN-gamma synergistically increase total polymeric IgA receptor levels in human intestinal epithelial cells. Role of protein tyrosine kinases. *J Immunol* 1996; 156: 4807-4814
- 26 Hayashi M, Takenouchi N, Asano M, Kato M, Tsurumachi T, Saito T, Moro I. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) in a human intestinal epithelial cell line is up-regulated by interleukin-1. *Immunology* 1997; 92: 220-225
- 27 Liu DY. TNF- α and VA Upregulate the Expression of Secretory Component in Caco-2 Cells. *Am Biotech Lab* 2008; 26: 34-38
- 28 Takenouchi-Ohkubo N, Asano M, Chihaya H, Chung-Hsuing WU, Ishikasa K, Moro I. Retinoic acid enhances the gene expression of human polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) by TNF-alpha. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 448-454
- 29 刘冬妍, 丁鹏, 刘沛. NO对肠上皮Caco-2细胞表达分泌片的影响. *中国医科大学学报* 2009; 38: 651-653, 656
- 30 Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 2005; 206: 83-99

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》修回稿须知

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

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

P53和Ki67在胃癌中的表达及其临床意义

刘伟, 余英豪, 欧阳学农, 王烈, 武一曼, 陈娟, 熊喜生

刘伟, 余英豪, 陈娟, 熊喜生, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025
欧阳学农, 中国人民解放军南京军区福州总医院肿瘤科 福建省福州市 350025
王烈, 中国人民解放军南京军区福州总医院普外科 福建省福州市 350025
武一曼, 福建中医药大学病理教研室 福建省福州市 350003
刘伟, 医师, 主要从事临床肿瘤病理诊断及消化系统肿瘤的基础应用研究。
作者贡献分布: 此课题由刘伟与余英豪设计; 技术操作由陈娟、熊喜生、欧阳学农、王烈及武一曼完成; 数据分析由刘伟完成; 本论文写作由刘伟与余英豪完成。
通讯作者: 余英豪, 主任医师, 教授, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科。yuyinghao0808@126.com
电话: 0591-83717703
收稿日期: 2010-11-04 修回日期: 2011-01-11
接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-08

Clinical significance of P53 and Ki67 expression in gastric cancer

Wei Liu, Ying-Hao Yu, Xue-Nong Ouyang, Lie Wang, Yi-Man Wu, Juan Chen, Xi-Sheng Xiong

Wei Liu, Ying-Hao Yu, Juan Chen, Xi-Sheng Xiong, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Xue-Nong Ouyang, Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Lie Wang, Department of General Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Yi-Man Wu, Department of Pathology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Correspondence to: Professor Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 North Xierhuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. yuyinghao0808@126.com
Received: 2010-11-04 Revised: 2011-01-11
Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation of P53 and Ki67 protein expression with the clinicopathological parameters in gastric cancer.

METHODS: A total of 1 107 surgical specimens of gastric cancer were collected from the Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command,

The expression of P53 and Ki67 was examined by immunohistochemistry in 775 gastric cancer specimens taken from patients with complete clinical data.

RESULTS: The positive rates of P53 and Ki67 protein expression were 46.84% and 78.97%, respectively. Higher positive rates of P53 and Ki67 protein expression were noted in intestinal-type gastric cancer than in diffuse-type gastric cancer (54.7% vs 38.0%, 86.0% vs 70.0%, both $P < 0.05$) and in well-differentiated cancer than in poorly-differentiated cancer (54.7 vs 35.4%, 87.0% vs 67.2%, both $P < 0.05$). A higher positive rate of P53 protein expression was noted in gastroesophageal junction (GEJ) cancer than in gastric cancer (53.7% vs 41.9%, $P < 0.05$) and in cancer without distant metastasis than in that with distant metastasis (49.0% vs 30.3%, $P < 0.05$). A higher positive rate of Ki67 protein expression was noted in invasive cancer than in less invasive cancer (80.3% vs 60.4%, $P < 0.05$) and in cancer with lymph node metastasis than in that without lymph node metastasis (81.4% vs 72.6%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: P53 and Ki67 protein expression might be associated with the development, invasion, and metastasis of gastric cancer, and can be used to evaluate the malignant behavior and prognosis of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; P53; Ki67; Her-2; Immunohistochemistry; Clinicopathological parameter

Liu W, Yu YH, Ouyang XN, Wang L, Wu YM, Chen J, Xiong XS. Clinical significance of P53 and Ki67 expression in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 367-373

摘要

目的: 探讨胃癌中P53和Ki67蛋白表达与临床病理参数的相关性及其临床意义。

方法: 收集在中国人民解放军南京军区福州总医院手术切除的胃癌组织标本1 107例, 采用EliVision™ plus免疫组织化学染色方法检测其中临床资料完整的775例胃腺癌标本中Ki67

■背景资料

目前胃癌的治疗以手术为主, 放化疗为辅, 总体疗效不理想, 5年生存率较低, 研究筛选有助于分析胃癌生物学行为的临床指标, 有效预测胃癌患者的预后情况, 并制定个体化的治疗方案是临床的迫切需要。

■同行评议者

钱睿哲, 教授, 复旦大学上海医学院生理与病理生理学系血管分子生物学实验室

■ 相关报道

Tzanakis等研究认为, Ki67和P53的过表达与肿瘤大小、TNM分期及淋巴结转移相关, 而且Ki67和P53单独表达或共表达的患者预后明显较阴性者差。

和P53蛋白表达。

结果: 在775例胃腺癌组织标本中, P53和Ki67蛋白的阳性表达率分别为46.84%和78.97%, 在非肿瘤性胃黏膜中均未见其阳性表达; P53和Ki67蛋白表达, 在肠型胃癌中显著高于弥漫型胃癌(54.7% vs 38.0%; 86.0% vs 70.0%, 均 $P<0.05$), 高中分化胃癌显著高于低分化胃癌(54.7% vs 35.4%; 87.0% vs 67.2%, 均 $P<0.05$); P53蛋白表达在胃食管连接部胃癌和无远处转移的胃癌中显著高于胃部胃癌和有远处转移的胃癌(53.7% vs 41.9%; 49.0% vs 30.3%, 均 $P<0.05$); Ki67蛋白表达随着浸润深度的增加而增高(80.3% vs 60.4%, $P<0.05$), 有淋巴结转移的患者显著高于无淋巴结转移的患者(81.4% vs 72.6%, $P<0.05$)。

结论: 联合检测P53和Ki67蛋白表达有助于阐释胃癌发生发展、浸润转移的机制, 并可作为评估胃癌恶性生物学行为及预后的参考指标。

关键词: 胃癌; P53; Ki67; 表皮生长因子受体-2; 免疫组织化学; 临床病理参数

刘伟, 余英豪, 欧阳学农, 王烈, 武一曼, 陈娟, 熊喜生. P53和Ki67在胃癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 367-373

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/367.asp>

0 引言

胃癌居消化系统肿瘤之首^[1], 其发生、发展机制颇为复杂, 涉及一系列遗传学改变, 包括癌基因的激活和抑癌基因的失活, 其中P53基因是至今为止发现的与人类肿瘤关系最为密切的抑癌基因, 其缺失或突变, 可导致细胞向恶性转化^[2], Ki67是反映细胞增殖活性的重要指标, 两者在肿瘤的发生、发展过程中有重要意义. 本研究采用大宗病例研究, 应用免疫组织化学方法检测775例胃癌组织中Ki67和P53蛋白表达, 分析二者的关系及其与胃癌生物学行为和预后的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-01/2009-08在中国人民解放军南京军区福州总医院手术切除的胃癌组织标本1 107例, 选择资料完整的胃腺癌病例775例进行研究, 手术标本经40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 3 μm厚连续切片, 分别进行HE和免疫组织化学染色; 所有病例术前均未行放化疗. 患者中男576例, 女199例, 年龄27-85(平均58.2)岁. 胃癌TNM分期采用AJCC标准(2002). 组织分型采用

Lauren分型, 分为肠型、弥漫型、混合型. 另外, 在775例胃腺癌病例中随机抽取100例癌旁(距癌灶距离>5 cm)非肿瘤性胃黏膜作为对照. 试剂均购自福州迈新生物技术开发公司, 一抗P53和Ki67均为鼠抗人单克隆抗体. 试剂盒选用EliVision™ plus试剂盒. 石蜡切片机(LEICA RM2245); 显微镜(OLYMPUS BX51); 电热恒温干燥箱(上海-恒科技有限公司). 所有标记均设阳性对照并用PBS缓冲液代替一抗做阴性对照。

1.2 方法

1.2.1 EliVision™ plus免疫组化染色: 石蜡切片脱蜡、水化, PBS冲洗3×3 min; 高温高压抗原修复; 加3%过氧化氢溶液, 室温下孵育10 min, 以阻断内源性过氧化物酶; PBS冲洗3×3 min; 加第一抗体, 室温下孵育60 min; PBS冲洗3×5 min; 加聚合物增强剂(试剂A), 室温下孵育20 min; PBS冲洗3×3 min; 加酶标抗鼠聚合物(试剂B), 室温下孵育30 min; PBS冲洗3×3 min; 加新配制的DAB显色液, 显微镜下观察, 阳性显色为棕黄色; 自来水冲洗, 苏木素复染, 0.1%盐酸分化, 自来水冲洗, PBS冲洗返蓝; 梯度酒精脱水干燥, 中性树脂封片。

1.2.2 Ki67和P53蛋白过表达的判定标准: P53和Ki67阳性染色呈棕黄色颗粒, 均定位于细胞核. P53和Ki67均以肿瘤细胞不着色/<10%的肿瘤细胞着色为阴性(-), ≥10%的肿瘤细胞着色为阳性^[3,4], 并根据肿瘤阳性细胞数所占比例分为: 10%-25%(+), 26%-50%(++), 51%-75%(+++), >75%(++++).

统计学处理 采用SPSS16.0软件进行 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 Ki67和P53蛋白在胃癌中的表达 P53、Ki67阳性染色呈棕黄色颗粒, 定位于细胞核(图1, 2). 其表达呈明显的异质性. 但癌旁非肿瘤性胃黏膜未见P53和Ki67的过表达(即肿瘤阳性细胞数所占比例均<10%).

2.2 胃癌中Ki67和P53蛋白表达与临床病理参数的关系 775例胃癌组织中P53阳性表达363例, 表达率为46.84%; Ki67阳性表达612例, 表达率为78.97%. P53蛋白过表达与患者性别、年龄、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移无相关性(均 $P>0.05$); 而与肿瘤部位、Lauren分型、分化程度及远处转移相关(均 $P<0.05$, 表1). Ki67蛋白过

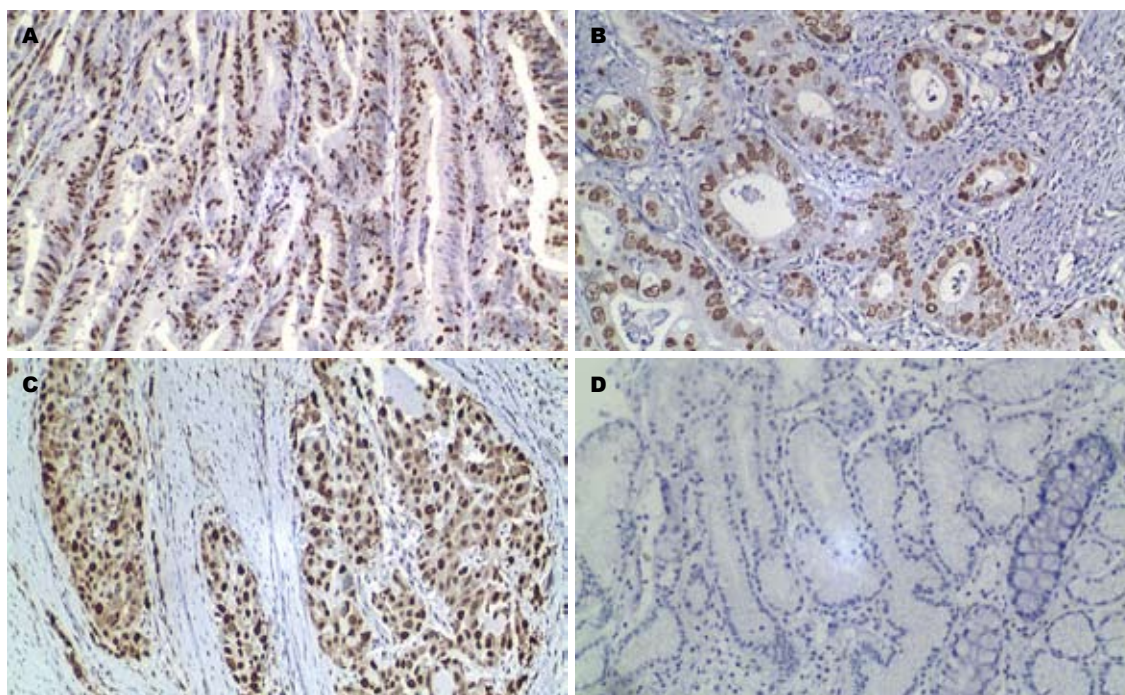


图 1 胃癌组织P53免疫组织化学染色(Elivision × 200). A: 高分化腺癌; B: 中分化腺癌; C: 低分化腺癌; D: 癌旁非肿瘤性胃黏膜.

■创新盘点
本文采用大宗病例研究, 综合分析P53和Ki67在胃癌中的表达情况及与胃癌生物学行为和预后的关系.

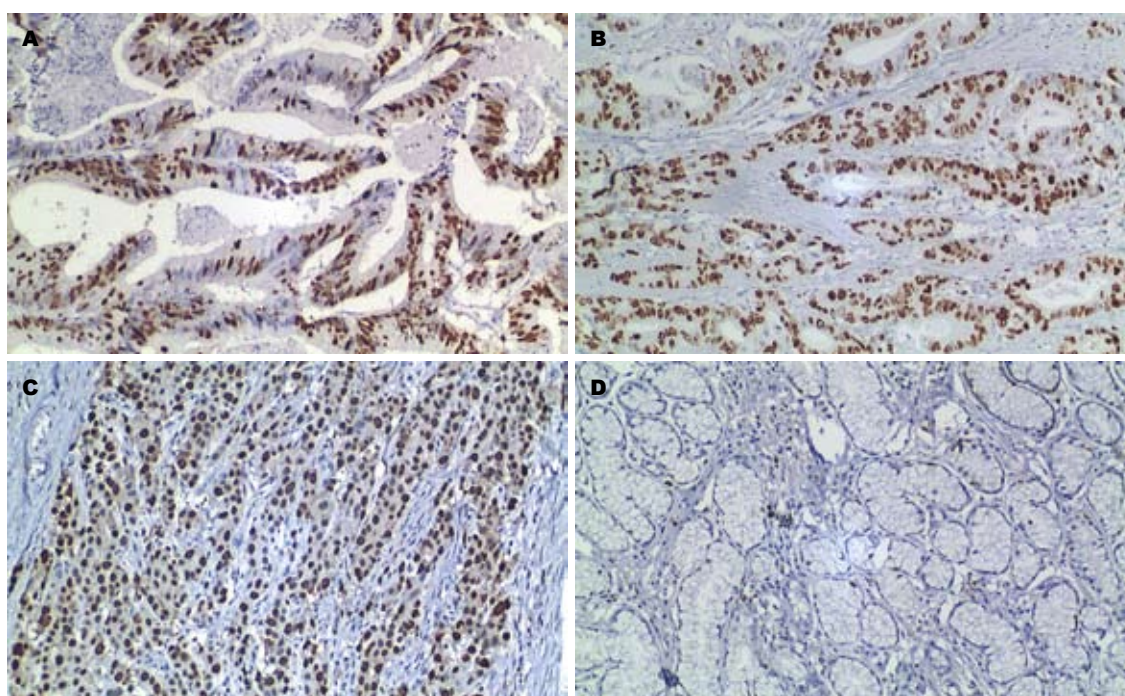


图 2 胃癌组织Ki67免疫组织化学染色(Elivision × 200). A: 高分化腺癌; B: 中分化腺癌; C: 低分化腺癌; D: 癌旁非肿瘤性胃黏膜阴性.

表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、TNM分期、远处转移无相关性(均 $P>0.05$); 而与Lauren分型、分化程度、浸润深度及淋巴结转移相关(均 $P<0.05$, 表2).

2.3 胃癌中Ki67、P53、Her-2、VEGF蛋白表达之间的关系 本课题组前期对同组胃癌病例进行了Her-2和VEGF蛋白检测, 发现胃癌组织中

存在Her-2和VEGF蛋白的过表达^[5,6], 将本研究中胃癌P53、Ki67过表达与前期同组胃癌病例Her-2、VEGF蛋白表达进行关联性检验分析发现, P53与Ki67的表达呈正相关($P<0.005$, Pearson列联系数 $C = 0.8290$), 而与Her-2、VEGF蛋白表达无相关性(均 $P>0.05$, 表3); P53与Her-2蛋白表达亦无相关性($P>0.05$, 表4).

■应用要点

本研究采用免疫组织化学的方法检测P53和Ki67蛋白在胃癌组织的表达情况,有助于阐释P53和Ki67在胃癌发生发展、浸润转移中的机制,并为判断预后提供了参考依据。

表 1 胃癌中P53蛋白表达与临床病理参数的关系

| 临床病理参数 | n | - | + | ++ | +++ | ++++ | 阳性率n(%) | P值 |
|---------------------|-----|-----|----|----|-----|------|-----------|-------|
| 性别 | | | | | | | | |
| 男 | 576 | 297 | 34 | 57 | 52 | 136 | 279(48.4) | >0.05 |
| 女 | 199 | 115 | 8 | 17 | 18 | 41 | 84(42.2) | |
| 年龄(岁) | | | | | | | | |
| <60 | 363 | 203 | 21 | 34 | 36 | 69 | 160(44.1) | >0.05 |
| ≥60 | 412 | 209 | 13 | 32 | 44 | 114 | 203(49.3) | |
| 肿瘤部位 | | | | | | | | |
| 胃食管连接部 ¹ | 324 | 150 | 14 | 38 | 34 | 88 | 174(53.7) | <0.05 |
| 胃部 | 451 | 262 | 25 | 37 | 37 | 90 | 189(41.9) | |
| Lauren分型 | | | | | | | | |
| 肠型 | 285 | 129 | 13 | 6 | 21 | 116 | 156(54.7) | <0.05 |
| 弥漫型 | 313 | 194 | 14 | 34 | 30 | 41 | 119(38.0) | |
| 混合型 | 177 | 89 | 13 | 17 | 16 | 42 | 88(49.7) | |
| 分化程度 | | | | | | | | |
| 高、中分化 | 461 | 209 | 28 | 20 | 41 | 163 | 252(54.7) | <0.05 |
| 低、未分化 | 314 | 203 | 12 | 30 | 29 | 40 | 111(35.4) | |
| TNM分期 | | | | | | | | |
| 0+ I + II | 351 | 187 | 26 | 30 | 32 | 76 | 164(46.7) | >0.05 |
| III、IV | 424 | 225 | 18 | 43 | 39 | 99 | 199(46.9) | |
| 浸润深度 | | | | | | | | |
| Tis+T1 | 53 | 31 | 2 | 7 | 6 | 7 | 22(41.5) | >0.05 |
| T2-T4 | 722 | 381 | 38 | 66 | 65 | 172 | 341(47.2) | |
| 淋巴结转移 | | | | | | | | |
| N0 | 215 | 110 | 21 | 17 | 19 | 48 | 105(48.8) | >0.05 |
| N1 | 322 | 169 | 22 | 36 | 36 | 59 | 153(47.5) | |
| N2 | 168 | 91 | 12 | 14 | 12 | 39 | 77(45.8) | |
| N3 | 70 | 42 | 2 | 5 | 7 | 14 | 28(40.0) | |
| 远处转移 | | | | | | | | |
| 有 | 89 | 62 | 2 | 9 | 2 | 14 | 27(30.3) | <0.05 |
| 无 | 686 | 350 | 47 | 65 | 65 | 159 | 336(49.0) | |

¹发生于胃食管连接部近端5 cm和远端5 cm之间的病变。

3 讨论

胃癌的发生演变是多阶段和多基因参与的极为复杂的过程,原癌基因的激活和抑癌基因的失活与肿瘤的发生发展密切相关。人类P53基因定位于染色体17号染色体短臂(17q13),长度约20 kb,由11个外显子和10个内含子组成,其蛋白质产物定位于细胞核,为一种含393个氨基酸的核蛋白,相对分子质量约为53 000 Da,即P53。野生型P53基因是细胞生长的负调节因子,其能够监视细胞基因组的完整性,修复各种因素导致的DNA损伤及清除各种有癌变倾向的细胞等作用而起抑癌作用^[7-9];当P53基因发生突变时,便失去了对细胞生长、凋亡、DNA修复等的调控作用,由抑癌基因转变成癌基因,引起细胞的转化和癌变,而相关资料显示:超过60%的胃癌表现

P53基因突变和17p上的P53位点的杂合性丢失;野生型P53蛋白的半衰期甚短,且极不稳定,用常规免疫组化方法很难检出,突变型P53蛋白稳定性增加,半衰期延长,故目前免疫组织化学测出的P53蛋白为突变型^[10-12]。研究表明,在胃癌、结直肠癌、肝癌、肺癌、乳腺癌等肿瘤中均存在突变型P53蛋白过表达,而且针对P53的基因治疗也得到了广泛应用^[11-16]。

本研究中,775例胃癌组织中P53阳性表达363例,表达率为46.84%,而在癌旁非肿瘤性胃黏膜中未见阳性表达,初步表明P53在胃癌组织中的过表达与胃癌的发生密切相关,P53基因突变是胃癌发生的一个重要影响因素。P53的过表达与患者性别、年龄、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移无相关性,而与肿瘤部位、Lauren分

表 2 胃癌中Ki67表达与临床病理参数的关系

| 临床病理参数 | n | - | + | ++ | +++ | ++++ | 阳性率n(%) | P值 |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----------|-------|
| 性别 | | | | | | | | |
| 男 | 576 | 126 | 75 | 147 | 130 | 98 | 450(78.1) | >0.05 |
| 女 | 199 | 37 | 33 | 38 | 52 | 39 | 162(81.4) | |
| 年龄(岁) | | | | | | | | |
| <60 | 363 | 83 | 53 | 94 | 71 | 62 | 280(77.1) | >0.05 |
| ≥60 | 412 | 80 | 51 | 95 | 108 | 78 | 332(80.6) | |
| 肿瘤部位 | | | | | | | | |
| 胃食管连接部 ¹ | 324 | 57 | 41 | 80 | 84 | 62 | 267(82.4) | >0.05 |
| 胃部 | 451 | 106 | 65 | 113 | 93 | 74 | 345(76.5) | |
| Lauren分型 | | | | | | | | |
| 肠型 | 285 | 40 | 32 | 62 | 58 | 93 | 245(86.0) | <0.05 |
| 弥漫型 | 313 | 94 | 51 | 74 | 63 | 31 | 219(70.0) | |
| 混合型 | 177 | 29 | 21 | 46 | 46 | 35 | 148(83.6) | |
| 分化程度 | | | | | | | | |
| 高、中分化 | 461 | 60 | 50 | 112 | 109 | 130 | 401(87.0) | <0.05 |
| 低、未分化 | 314 | 103 | 50 | 68 | 59 | 34 | 211(67.2) | |
| TNM分期 | | | | | | | | |
| 0+ I + II | 351 | 77 | 52 | 73 | 81 | 68 | 274(78.1) | >0.05 |
| III、IV | 424 | 86 | 55 | 119 | 96 | 68 | 338(79.7) | |
| 浸润深度 | | | | | | | | |
| Tis+T1 | 53 | 21 | 7 | 10 | 6 | 9 | 32(60.4) | <0.05 |
| T2-T4 | 722 | 142 | 104 | 178 | 170 | 128 | 580(80.3) | |
| 淋巴结转移 | | | | | | | | |
| N0 | 215 | 59 | 33 | 40 | 41 | 42 | 156(72.6) | <0.05 |
| N1 | 322 | 60 | 43 | 83 | 80 | 56 | 262(81.4) | |
| N2 | 168 | 26 | 25 | 41 | 46 | 30 | 142(84.5) | |
| N3 | 70 | 18 | 8 | 24 | 9 | 11 | 52(74.2) | |
| 远处转移 | | | | | | | | |
| 有 | 89 | 14 | 8 | 30 | 27 | 10 | 75(84.3) | >0.05 |
| 无 | 686 | 149 | 96 | 164 | 153 | 124 | 537(78.3) | |

■同行评价
本文可读性较好, 有一定的临床参考价值.

¹发生于胃食管连接部近端5 cm和远端5 cm之间的病变.

表 3 胃癌中Ki67与P53、Her-2、VEGF蛋白表达之间的关系

| | Ki67 | | 合计 | P值 |
|-------|------|-----|-----|--------|
| | - | + | | |
| P53 | | | | |
| + | 40 | 323 | 363 | <0.005 |
| - | 123 | 289 | 412 | |
| Her-2 | | | | |
| + | 15 | 73 | 88 | >0.050 |
| - | 148 | 539 | 687 | |
| VEGF | | | | |
| + | 36 | 161 | 197 | >0.050 |
| - | 127 | 451 | 578 | |
| 合计 | 163 | 612 | 775 | |

表 4 胃癌中P53和Her-2蛋白表达之间的关系

| P53 | Her-2 | | 合计 |
|-----|-------|----|-----|
| | - | + | |
| + | 320 | 43 | 363 |
| - | 367 | 45 | 412 |
| 合计 | 687 | 88 | 775 |

研究中发现, P53在胃癌中的阳性表达率分别为40.1%(295/736)和43%(362/841), P53的表达与年龄、肿瘤大小、分化程度、Lauren分型、临床分期等密切相关, 而且P53阳性患者的预后较阴性患者差. Lee等^[19]对105例胃癌患者的研究中亦发现, P53过表达率为34.1%, 而且其表达与Lauren分型、淋巴结转移及远处转移密切相关, P53阳性患者5年生存率为60%, 明显低于阴性患

型、分化程度及远处转移相关, 与相关文献报道基本一致. 在Song等^[17]和Lee等^[18]的大宗病例

者5年78%的生存率. 对于Lauren分型, 相关研究显示^[20-22], 弥漫型胃癌的P53蛋白表达率和突变率较肠型胃癌低, 与本研究一致(肠型54.7%, 混合型49.7%, 弥漫型38.0%); 在早期和进展期分化型胃癌与进展期的未分化型胃癌中P53基因突变率相似, 均约为40%, 但早期未分化型胃癌的P53基因突变率则非常低, 而且在肠型胃癌中, P53突变类型相对以无义突变、内含子突变、沉默突变多见; 国内的一些研究^[23,24]亦发现, P53的过表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、TNM分期无相关, 而与淋巴结转移密切相关; 而另一些研究^[25,26]则认为, P53蛋白表达除与分化程度、远处转移等相关外, 还与浸润深度密切相关. 本研究结果提示P53与浸润深度无关, 这可能与样本量的大小不同、检测方法及评分标准不同有关. 以上临床资料初步证实, P53的过表达参与了胃癌的发生, 促进了胃癌的浸润、转移, 可以作为评价胃癌患者预后的一项参考指标.

Ki67基因定位于第10号染色体, 其蛋白质产物定位于细胞核, 由相对分子质量为345 000 Da和395 000 Da两条多肽链组成, 其在G₁后期开始出现, 在S期和G₂期逐渐升高, M期达到高峰, 有丝分裂结束后迅速降解消失, G₀期无表达^[27]. 相关研究发现, Ki67在胃癌、肺癌、肝癌及恶性软组织肿瘤中均有过表达, 并且与肿瘤的发生发展、浸润转移及预后有关, Ki67表达的高低, 对评价评价细胞增殖活性, 研究肿瘤的生物学行为和预后具有重要意义^[28-30].

本研究中, 胃癌组织中Ki67阳性表达率为78.97%(612/775例), 在非肿瘤胃黏膜中未见过表达, 这表明胃癌细胞的增殖活性远远大于非肿瘤性胃黏膜, 这与胃癌的浸润性生长、转移等生物学行为密切相关. Ki67蛋白过表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、TNM分期、远处转移无相关性, 而与Lauren分型、分化程度、浸润深度及淋巴结转移相关, 而且随着浸润深度的增加和淋巴结转移, Ki67的阳性率逐渐升高, 这表明Ki67的阳性表达率越高, 其浸润、侵袭能力越强. Tzanakis等^[31]研究认为, Ki67和P53的过表达与肿瘤大小、TNM分期及淋巴结转移相关, 而且Ki67和P53单独表达或共表达的患者预后明显较阴性者差; 易伟等^[32]对232例胃癌组织的研究发现, Ki67、P53的阳性表达率分别为44.8%(104/232)、40.9%(95/232); 且两者的表达水均平均与胃癌淋巴结转移密切相关, 而与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、组织类

型、浸润深度、远处转移、TNM分期等无关; Ki67、P53蛋白表达阳性者3年生存率显著低于表达阴性者. 另外一些相关研究证实^[4], 胃癌组织中存在Ki67的过表达率且与浸润深度、淋巴结转移等相关. 这初步表明, Ki67过表达率越高, 提示胃癌细胞的生长越活跃, 侵袭、转移能力越强, 患者的预后越差.

本课题组前期对同组胃癌病例进行了Her-2和VEGF蛋白检测, 发现胃癌组织中存在Her-2和VEGF蛋白的过表达^[5,6], 将本研究中胃癌P53、Ki67过表达与前期同组胃癌病例Her-2、VEGF蛋白表达进行相关性检验分析发现, P53与Ki67的表达密切相关, 这表明具有P53基因突变的胃癌细胞具有更强的增殖活性, 更强的浸润转移能力, 而相关报道亦显示^[32], P53和Ki67蛋白表达呈显著正相关, 且两者均与胃癌的浸润转移有关, 阳性患者的预后较阴性者差. Ki67与Her-2、VEGF蛋白表达无相关性, 这初步表明虽然Her-2、VEGF基因在胃癌中有扩增, 促进了胃癌的浸润转移, 但Her-2、VEGF蛋白过表达并不意味着胃癌细胞有更强的增殖活性, 可能是通过其他机制促进了胃癌的发生发展、浸润转移. P53与Her-2蛋白表达亦无相关性, 但两者都与患者的预后密切相关, 可能与两者是通过相互独立的机制在胃癌的浸润转移中发挥作用有关.

总之, 联合检测胃癌组织中P53、Ki67、Her-2及VEGF蛋白表达有着重要的临床意义, 这不但有利于揭示胃癌发生发展、浸润转移的机制, 并能作为评价患者预后的参考指标, 同时Her-2和VEGF的表达也为胃癌的靶向治疗及个体化治疗提供了参考依据, 从而提高患者疗效, 延长患者生存期具有重要意义.

4 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 2 Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X, Du L, Wei ML, Wu XT. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *Int J Cancer* 2007; 121: 1481-1486
- 3 Zheng Y, Wang L, Zhang JP, Yang JY, Zhao ZM, Zhang XY. Expression of p53, c-erbB-2 and Ki67 in intestinal metaplasia and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 339-344
- 4 Al-Moundhri MS, Nirmala V, Al-Hadabi I, Al-Mawaly K, Burney I, Al-Nabhani M, Thomas V, Ganguly SS, Grant C. The prognostic significance of p53, p27 kip1, p21 waf1, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. *J Surg Oncol* 2005; 91: 243-252
- 5 陈娟, 李东石, 余英豪, 王烈, 欧阳学农, 谢飞来, 熊喜

- 生. Her-2蛋白在胃癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1375-1379
- 6 刘伟, 余英豪, 欧阳学农, 王烈, 武一曼, 陈娟, 熊喜生. VEGF在胃癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3366-3371
 - 7 Wiman KG. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 2010; 29: 4245-4252
 - 8 Farnebo M, Bykov VJ, Wiman KG. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 85-89
 - 9 Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a001107
 - 10 Machado-Silva A, Perrier S, Bourdon JC. p53 family members in cancer diagnosis and treatment. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 57-62
 - 11 Chari NS, Pinaire NL, Thorpe L, Medeiros LJ, Roubort MJ, McDonnell TJ. The p53 tumor suppressor network in cancer and the therapeutic modulation of cell death. *Apoptosis* 2009; 14: 336-347
 - 12 Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 979-987
 - 13 Tang NP, Wu YM, Wang B, Ma J. Systematic review and meta-analysis of the association between P53 codon 72 polymorphism and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 431-438
 - 14 Tam CW, Liu VW, Leung WY, Yao KM, Shiu SY. The autocrine human secreted PDZ domain-containing protein 2 (sPDZD2) induces senescence or quiescence of prostate, breast and liver cancer cells via transcriptional activation of p53. *Cancer Lett* 2008; 271: 64-80
 - 15 Oguztüzün S, Aydın M, Demirag F, Yazıcı U, Özhavzalı M, Kılıç M, Işcan M. The expression of GST isoenzymes and p53 in non-small cell lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48: 122-127
 - 16 Baker L, Quinlan PR, Patten N, Ashfield A, Birse-Stewart-Bell LJ, McCowan C, Bourdon JC, Purdie CA, Jordan LB, Dewar JA, Wu L, Thompson AM. p53 mutation, deprivation and poor prognosis in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102: 719-726
 - 17 Song HS, Kim IH, Sohn SS, Kwon KY, Lee WS. Prognostic significance of immunohistochemical expression of p53 and retinoblastoma gene protein (pRB) in curatively resected gastric cancer. *Korean J Intern Med* 2005; 20: 1-7
 - 18 Lee KE, Lee HJ, Kim YH, Yu HJ, Yang HK, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 173-179
 - 19 Lee HK, Lee HS, Yang HK, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in gastric cancer. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 518-525
 - 20 Luinetti O, Fiocca R, Villani L, Alberizzi P, Ranzani GN, Solcia E. Genetic pattern, histological structure, and cellular phenotype in early and advanced gastric cancers: evidence for structure-related genetic subsets and for loss of glandular structure during progression of some tumors. *Hum Pathol* 1998; 29: 702-709
 - 21 Shiao YH, Palli D, Buzard GS, Caporaso NE, Amorusi A, Saieva C, Fraumeni JF Jr, Anderson LM, Rice JM. Implications of p53 mutation spectrum for cancer etiology in gastric cancers of various histologic types from a high-risk area of central Italy. *Carcinogenesis* 1998; 19: 2145-2149
 - 22 Tamura G, Sato K, Akiyama S, Tsuchiya T, Endoh Y, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Motoyama T. Molecular characterization of undifferentiated-type gastric carcinoma. *Lab Invest* 2001; 81: 593-598
 - 23 蒙健军, 蓝东, 韦敏怡. P73、P53蛋白在胃癌中的表达及意义. 广西医学 2010; 39: 560-564
 - 24 周红凤, 吴瑾, 栾英红, 王雯, 付冬伟, 刘丹. VEGF、p53和MVD在胃癌中的表达及临床意义. 现代肿瘤医学 2008; 16: 760-764
 - 25 Seo YH, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Prognostic significance of p21 and p53 expression in gastric cancer. *Korean J Intern Med* 2003; 18: 98-103
 - 26 Oh SY, Kwon HC, Kim SH, Jang JS, Kim MC, Kim KH, Han JY, Kim CO, Kim SJ, Jeong JS, Kim HJ. Clinicopathologic significance of HIF-1 α , p53, and VEGF expression and preoperative serum VEGF level in gastric cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 123
 - 27 Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715
 - 28 Czyżewska J, Guzińska-Ustymowicz K, Lebelt A, Zalewski B, Kemonia A. Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers. *Rocz Akad Med Białymst* 2004; 49 Suppl 1: 64-66
 - 29 Han B, Lin S, Yu LJ, Wang RZ, Wang YY. Correlation of 18F-FDG PET activity with expressions of survivin, Ki67, and CD34 in non-small-cell lung cancer. *Nucl Med Commun* 2009; 30: 831-837
 - 30 Ma YL, Peng JY, Zhang P, Liu WJ, Huang L, Qin HL. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer. *Med Oncol* 2010; 27: 304-309
 - 31 Tzanakis NE, Peros G, Karakitsos P, Giannopoulos GA, Efstathiou SP, Rallis G, Tsigris C, Kostakis A, Nikiteas NI. Prognostic significance of p53 and Ki67 proteins expression in Greek gastric cancer patients. *Acta Chir Belg* 2009; 109: 606-611
 - 32 易伟, 胡志前, 龚振斌. Ki67抗原和p53蛋白在胃癌中的表达及其临床意义. 中国普通外科杂志 2006; 15: 664-667

编辑 李薇 电编 何基才

TRAF4在胃癌组织中的表达及意义

刘辉琦, 李菊英, 刘杰, 王生兰

■背景资料

TRAF4是一个新的具有调节细胞周期和基因转录功能的P70S6丝苏氨酸激酶的结合作用, 具有抑制Fas诱导细胞凋亡及激活NF- κ B、JNK等信号通路的功能, 在多数肿瘤中表达上调, 但在部分肿瘤中表达下调, 且核浆定位情况目前仍存在一定的争议。

刘辉琦, 刘杰, 王生兰, 青海大学医学院病理生理教研室 青海省西宁市 810001

李菊英, 青海大学医学院病理教研室 青海省西宁市 810001
刘辉琦, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤标志物方面的研究。

青海大学医学院中青年科技基金资助项目, No. qy-2008-03
作者贡献分布: 此课题由刘辉琦、李菊英及王生兰设计; 研究过程由刘辉琦与李菊英操作完成; 数据分析由刘辉琦与刘杰完成; 论文写作由刘辉琦与王生兰完成。

通讯作者: 王生兰, 教授, 810001, 青海省西宁市昆仑路16号, 青海大学医学院病理生理教研室. zlw6996@163.com

电话: 0971-6104094

收稿日期: 2010-10-26 修回日期: 2010-12-30

接受日期: 2011-01-06 在线出版日期: 2011-02-08

Significance of TRAF4 protein expression in gastric carcinoma

Hui-Qi Liu, Ju-Ying Li, Jie Liu, Sheng-Lan Wang

Hui-Qi Liu, Jie Liu, Sheng-Lan Wang, Department of Pathophysiology, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Ju-Ying Li, Department of Pathology, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Supported by: the Youth Science Foundation of the Medical College of Qinghai University, No. qy-2008-03

Correspondence to: Professor Sheng-Lan Wang, Department of Pathophysiology, Medical College of Qinghai University, 16 Kunlun Road, Chengzhong District, Xining 810001, Qinghai Province, China. zlw6996@163.com

Received: 2010-10-26 Revised: 2010-12-30

Accepted: 2011-01-06 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation between the expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 (TRAF4) protein and tumor onset and evolution in gastric carcinoma.

METHODS: Tissue microarray was used to detect the expression of TRAF4 in 45 gastric carcinoma specimens, 45 tumor-adjacent tissue specimens, and 10 normal gastric tissue specimens. Cell apoptosis in TRAF4-positive gastric carcinoma specimens and normal gastric tissue specimens was detected by TUNEL assay.

RESULTS: TRAF4 was expressed in both the cytoplasm and nucleus in normal gastric tissue and gastric carcinoma. The positive rate of cyto-

plasmic TRAF4 expression was 80% in normal gastric tissue, 93.3% in dysplasia, and 95.6% in gastric carcinoma ($P > 0.05$). The positive rate of nuclear TRAF4 expression was significantly higher in normal gastric tissue than in gastric carcinoma (70.0% vs 35.6%, $P < 0.05$), in highly differentiated carcinoma than in poorly differentiated carcinoma (71.4% vs 26.1%, $P < 0.05$), and in gastric carcinoma without lymphatic metastasis than in that with lymphatic metastasis (52.4% vs 20.8%, $P < 0.05$). The apoptosis rate in TRAF4-positive normal gastric tissue was significant higher than that in gastric carcinoma (75% vs 37.2%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The nuclear expression of TRAF4 in gastric carcinoma is suppressed. Decreased nuclear expression of TRAF4 was positively correlated with tumor differentiation but negatively with tumor metastasis in gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4; Immunohistochemistry; Apoptosis

Liu HQ, Li JY, Liu J, Wang SL. Significance of TRAF4 protein expression in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 374-378

摘要

目的: 探讨肿瘤坏死因子受体相关因子4(TRAF4)在胃癌发生、发展中的作用。

方法: 应用组织芯片采用免疫组织化学法检测10例正常胃组织、45例胃癌及癌旁组织中TRAF4的表达, TUNEL法检测TRAF4阳性胃癌及正常胃组织中细胞凋亡。

结果: TRAF4在正常胃组织中呈浆、核阳性表达。其浆阳性率在正常胃组织(80%)、不典型增生(93.3%)和胃癌(95.6%)中逐渐增高, 但差异无统计学意义。而核阳性率在正常胃组织中高于胃癌(70.0% vs 35.6%, $P < 0.05$), 在高分化胃癌中高于低分化胃癌(71.4% vs 26.1%, $P < 0.05$), 在无淋巴转移胃癌中高于伴有淋巴转移(52.4% vs 20.8%, $P < 0.05$)。TRAF4表达阳

■同行评议者

陈国忠, 副主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科

性正常胃组织细胞凋亡百分率高于胃癌组织(75% vs 37.2%, $P < 0.05$).

结论: TRAF4在胃癌中具有较低核表达, 且其核表达与胃癌分化程度呈正相关, 与胃癌转移呈负相关, 同时可能抑制胃癌凋亡.

关键词: 胃癌; 肿瘤坏死因子受体相关因子-4; 免疫组织化学; 凋亡

刘辉琦, 李菊英, 刘杰, 王生兰. TRAF4在胃癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 374-378
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/374.asp>

0 引言

胃癌是我国常见病和多发病, 位居消化系统肿瘤之首. 近年来, 发病率和死亡率不断升高, 每年胃癌新发病例及死亡率分别占全部恶性肿瘤的17%和20%^[1-3]. 青海是我国胃癌高发区, 其死亡率在全国最高^[4], 严重威胁着本地居民的健康. 胃癌是一类多基因疾病, 癌基因的活化是促使肿瘤发生的关键因素之一, 但抑癌基因的失活在肿瘤发生、发展过程中可能起着更加重要的作用^[5-8].

肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor associated factor, TRAF)家族成员是一大类在哺乳动物中发现的遗传学上保守的胞内接头蛋白^[9], 能直接或间接与多种TNF和IL-1/Toll-like受体家族成员结合^[10], 激活转录因子NF- κ B和JNK通路, 从而影响细胞的生存、增殖、分化和死亡, 并参与多个生物学过程的调控^[11,12]. 目前为止, 在哺乳动物中已发现7种TRAF蛋白: TRAF1-TRAF7. 研究报道TRAF4在肺癌、乳腺癌、直肠癌、膀胱癌、卵巢癌等大多数人类肿瘤中均高表达, 且主要定位于胞质, 部分肿瘤如肺癌、乳腺癌等存在浆核定位或单独核定位, 且定位与肿瘤的侵袭性等生物学特性相关^[13]. 本研究主要应用胃癌组织芯片通过免疫组织化学方法检测TRAF4在正常胃组织、癌旁组织及胃癌组织中的表达情况, 并检测正常胃组织、胃癌组织中的凋亡情况以初步探讨TRAF4在胃癌中表达的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌组织芯片购自西安艾丽娜生物科技有限公司, 货号BC01114. 芯片100点(胃癌45例, 癌旁组织45例, 正常组织10例, 每例1点). 胃癌中腺癌44例, 印戒细胞癌1例, II期37例, III期

8例. 非典型增生中轻度32例, 中度11例, 重度2例. TRAF4兔抗人多克隆抗体(SC-10776)购自美国Santa Cruz公司. SP超敏试剂盒(PV-9000), DAB酶底物显色试剂盒(ZLT-9018)及辣根酶标记第二抗体(ZB-2301)购自北京中杉金桥生物技术有限公司. 凋亡试剂盒购自Roche公司(Cat. No. 11684817910, 北京中杉金桥生物技术有限公司分装).

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 常规脱蜡水化, 以0.01 mol CB(pH6.0)高压2 min修复抗原, 滴加3% H₂O₂-甲醇封闭内源性过氧化物酶(室温10 min), 第一抗体(1:20, 4 °C过夜), 滴加酶标抗鼠/兔聚合物(室温孵育30 min), DAB显色, 蒸馏水洗终止显色, 苏木素复染、水洗、分化后充分水洗返蓝, 常规脱水透明, 中性树胶封片. PBS代替一抗作阴性对照.

1.2.2 凋亡检测: 二甲苯脱蜡, 100%、95%、90%、85%、80%梯度水化, 滴加蛋白酶K于37 °C温箱内消化30 min, 滴加新鲜配置3%甲醛过氧化氢封闭液(室温封闭10 min). 滴加新鲜配置的TdT酶反应标记60 min, 阴性对照组不加TdT酶. 滴加终止工作液30 min终止反应, DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封片.

1.2.3 结果判定: (1)免疫组织化学结果判定: TRAF4判定标准参见邢传平等^[14]的免疫组织化学反应结果的判断标准, 即阳性细胞数 $\leq 25\%$ 为(+), 25%-50%为(++), >50%为(+++), 无阳性细胞(-); 再结合染色强度, 浅黄色为(+), 棕黄色(++), 棕褐色(+++), 无着色细胞为(-). 两者合二为一进行分析判断, 取阳性细胞>50%, 即一半以上研究细胞阳性判断为最高级(+++); (2)凋亡结果判定: 以细胞核阳性为判定标准^[15]. 在相同组织切片5个高倍视野记数各组间阳性细胞百分比, 凋亡细胞阳性率<5%为(-), 5%-25%(+), 25%-50%(++), >50%(+++).

统计学处理 采用SPSS13.0统计分析软件, TRAF4在胃癌组织中的表达及凋亡采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 为有显著统计学意义.

2 结果

2.1 TRAF4在胃癌组织中的表达 TRAF4表达于正常胃组织上皮细胞和胃癌组织细胞胞质和核内(图1). TRAF4的浆阳性表达率在胃不典型增生中高于正常胃组织, 但差异无统计学意义

■ 相关报道

Glauner等研究表明, 全长度的TRAF4转入HeLa细胞后定位于胞质, 而突变型的TRAF4主要定位于胞核, 进一步研究证实, 可能是某种结合蛋白影响了TRAF4的浆核定位.

■创新盘点

本研究利用组织芯片对胃癌组织中TRAF4的表达、核浆定位情况进行了研究,探讨了TRAF4与胃癌生物学行为及凋亡之间可能存在的联系。

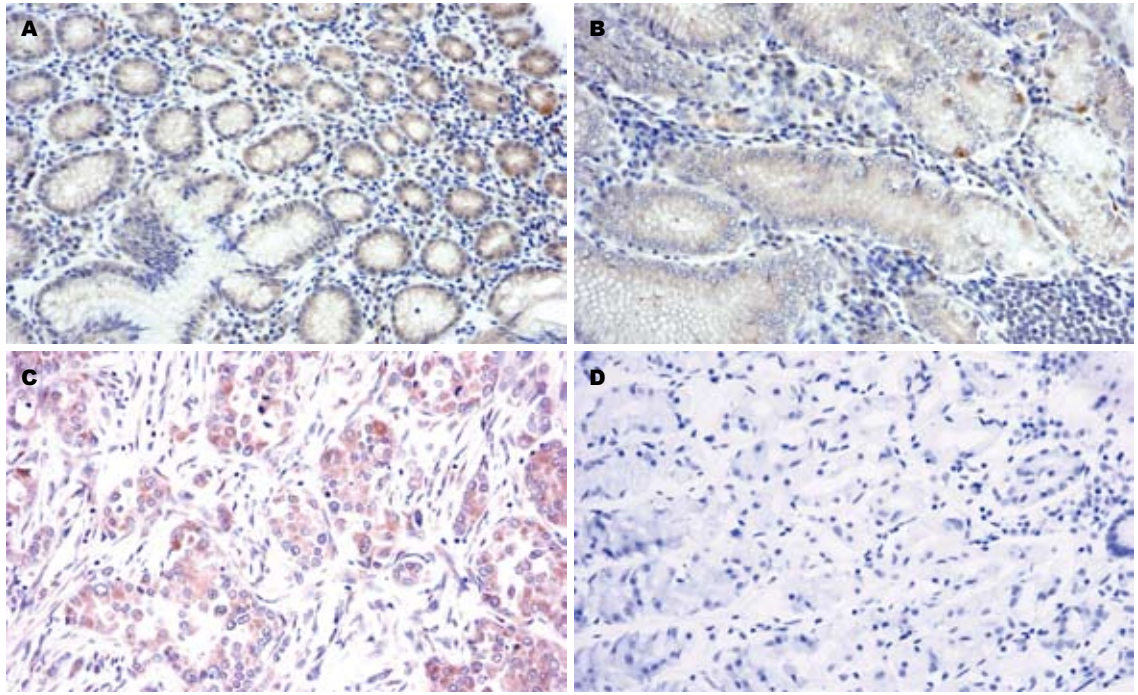


图1 TRAF4在胃癌组织中的表达(SP × 200)。A: 正常胃组织的胞质及胞核; B: 增生胃组织的胞质及胞核; C: 胃癌组织的胞质; D: 阴性对照。

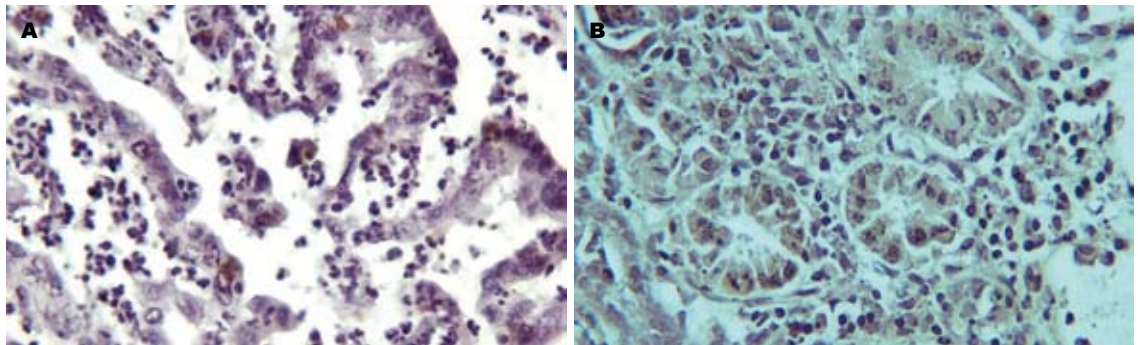


图2 TRAF4表达阳性正常细胞及胃癌细胞凋亡(SP × 200)。A: 胃癌组织; B: 正常胃组织。

($P>0.05$)。在胃癌组织中的浆阳性表达率高于正常胃组织,但差异无统计学意义($P>0.05$)。在胃癌组织中的浆阳性表达率高于胃不典型增生,但差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

TRAF4在正常胃组织中的核阳性表达率高于胃不典型增生,但差异无统计学意义($P>0.05$),在正常胃组织中的核阳性表达率明显高于胃癌组织($P<0.05$)。在胃不典型增生组织中的核阳性表达率高于胃癌组织,但差异无统计学意义($P>0.05$),TRAF4核表达与胃癌的发生呈负相关(表1)。

TRAF4在高分化胃癌组织中的核阳性表达率高于中分化胃癌组织,但差异无统计学意义($P>0.05$),在中分化胃癌组织中的核阳性表达率高于低分化胃癌组织,但差异无统计学意义

($P>0.05$),在高分化胃癌组织中的核阳性表达率明显高于低分化胃癌组织($P<0.05$)。TRAF4核表达与胃癌分化程度正相关(表2)。

TRAF4在无淋巴转移的胃癌组织中的核阳性表达率明显高于有淋巴转移的胃癌组织($P<0.05$)。TRAF4核表达与胃癌淋巴转移负相关(表3)。

2.2 TRAF4表达阳性在正常胃组织,胃癌组织中细胞凋亡 TRAF4表达阳性正常组织及胃癌组织中均有凋亡(图2),但正常胃组织中凋亡百分率显著高于胃癌组织($P<0.05$,表4)。

3 讨论

TRAF4是一个新的具有调节细胞周期和基因转录功能的P70S6丝苏氨酸激酶的结合子,具有抑

表 1 TRAF4在各组织中的表达

| | <i>n</i> | 胞质 | | | | 阳性率(%) | 胞核 | |
|---------|----------|----|----|----|-----|--------|----|-------------------|
| | | - | + | ++ | +++ | | + | 阳性率(%) |
| 正常胃组织 | 10 | 2 | 5 | 2 | 1 | 80.0 | 7 | 70.0 |
| 不典型增生组织 | 45 | 3 | 21 | 14 | 7 | 93.3 | 26 | 57.8 |
| 胃癌组织 | 45 | 2 | 22 | 15 | 6 | 95.6 | 16 | 35.6 ^a |

^a*P*<0.05 vs 正常胃组织.

表 2 TRAF4在不同分化程度胃癌组织中的表达

| | <i>n</i> | 胞核 | | |
|-----|----------|----|---|-------------------|
| | | - | + | 阳性率(%) |
| 高分化 | 7 | 2 | 5 | 71.4 |
| 中分化 | 15 | 10 | 5 | 33.3 |
| 低分化 | 23 | 17 | 6 | 26.1 ^a |

^a*P*<0.05 vs 高分化胃癌组织.

表 3 TRAF4在胃癌是否伴淋巴结转移中的表达

| | <i>n</i> | 胞核 | | |
|--------|----------|----|----|-------------------|
| | | - | + | 阳性率(%) |
| 有淋巴结转移 | 24 | 19 | 5 | 20.8 ^a |
| 无淋巴结转移 | 21 | 10 | 11 | 52.4 |

^a*P*<0.05 vs 无淋巴结转移胃癌组织.

制Fas诱导细胞凋亡的功能^[16]. 此外, TRAF4还能充当E3泛素连接酶的角色并通过作用于糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体胞质区TRAF结合位点, 诱导NF- κ B、JNK等信号转导通路的激活^[17-19]. 在胚胎时期, TRAF4通过与MEKK4结合激活JNK信号转导通路^[20].

近年研究显示TRAF4和一些复合体参与了内皮细胞迁移, 通过细胞迁移在肿瘤中的重要作用, 可以推断TRAF4的上调表达可能参与并/或促进肿瘤形成^[13]. 据统计, TRAF4可穿梭于不同细胞间隙, 他能出现在胞质中, 也能通过跨膜蛋白或膜依赖蛋白的联系进入到细胞膜中, 同时还可能与其他跨膜蛋白发生联系^[21,22]. Glauner等^[23]研究表明, 全长度的TRAF4转染入HeLa细胞后定位于胞质, 而突变型的TRAF4主要定位于胞核, 进一步研究证实, 可能是某种结合蛋白影响了TRAF4的浆核定位. 但目前对于TRAF4在肿瘤中的定位尚存争议, 如Régnier等^[24]通过原位杂交等方法发现TRAF4 mRNA高表达于乳腺癌

表 4 TRAF4表达阳性在胃癌、正常组织中的凋亡

| | TRAF4阳性 | 凋亡 | | |
|------|---------|----|----|-------------------|
| | | - | + | 凋亡率(%) |
| 正常组织 | 8 | 2 | 6 | 75.0 |
| 胃癌组织 | 43 | 27 | 16 | 37.2 ^a |

^a*P*<0.05 vs 正常组织.

组织中, 且定位于胞核并提出TRAF4可能是一种核蛋白的观点. 相反, Krajewska等^[25]通过免疫组织化学方法研究认为TRAF4蛋白高表达于正常乳腺组织, 定位于导管上皮细胞胞质, 而在浸润性导管癌和原位癌中阳性表达率很低. 国内代文博等^[26]研究发现TRAF4表达于正常乳腺组织, 呈浆、核阳性, 在乳腺癌中具有较低核表达, 且其核表达与乳腺癌侵袭性呈负相关.

胃癌免疫组织化学结果显示, TRAF4在正常胃组织中表达于腺上皮细胞, 呈浆、核阳性, 在胃癌组织中的浆表达与正常胃组织及胃不典型增生无明显差异, 但核表达则明显降低, 而TRAF4在低分化胃癌中的核表达明显低于高分化胃癌, 说明TRAF4核表达与胃癌分化程度呈正相关, 同时TRAF4在伴有淋巴转移胃癌中的核表达明显低于无淋巴转移胃癌, 表明TRAF4核表达同时与胃癌转移呈负相关, 这提示TRAF4可能通过核表达量的改变影响胃癌的分化、转移等生物学行为, 但其在胃癌中核表达明显降低的机制尚不清楚.

胃癌的发生不仅与抑癌基因失活有关, 还与细胞增生、凋亡抑制等因素有关^[27,28], 而诱导肿瘤细胞凋亡也是治疗方向之一^[29,30]. TRAF4阳性胃癌及正常组织凋亡检测显示, 正常组织中的凋亡高于胃癌组织, 但TRAF4在胃癌组织中的浆表达与正常胃组织无明显差异, 而核表达则明显降低, 这提示TRAF4核表达的下调可能会抑制

■应用要点

本研究初步探讨了TRAF4在胃癌发生、发展中的作用, 有望对胃癌发生的分子机制的进一步研究及分子诊断提供理论基础.

■同行评价

本文创新性较好, 具有较好的科学价值。

凋亡, 其机制可能是在胃癌中存在某种TRAF4结合蛋白或某种因子影响了TRAF4的核定位, 并进而影响到细胞凋亡, 这需要进一步研究。

总之, 本实验结果初步表明, TRAF4表达于正常胃组织, 呈浆、核阳性。TRAF4在胃癌中具有较低核表达, 且其核表达与胃癌分化程度呈正相关, 与胃癌转移呈负相关, 并且核表达的下调可能会抑制胃癌细胞的凋亡, 从而促进了胃癌的发生、发展。

4 参考文献

- 1 Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 17-20
- 2 周琦, 张琼, 魏来. 联合检测CA19-9、CEA、CA72-4、MG-Ag对胃癌的诊断价值. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2698-2701
- 3 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 4 赵久达, 李豪, 曹成珠, 贺菊香, 耿派力. 1962例胃癌流行病学分析. *现代预防医学* 2008; 35: 439-440
- 5 Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2003; 94: 360-364
- 6 Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004; 84: 479-484
- 7 Osaki M, Moriyama M, Adachi K, Nakada C, Takeda A, Inoue Y, Adachi H, Sato K, Oshimura M, Ito H. Expression of RUNX3 protein in human gastric mucosa, intestinal metaplasia and carcinoma. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 605-612
- 8 邱秀琴, 石巍. 胃癌相关抑癌基因甲基化研究进展. *国际病理科学与临床杂志* 2008; 28: 395-398
- 9 Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)-a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 1998; 12: 2821-2830
- 10 张万巧, 王建. 胞内接头蛋白TRAFs家族. *生命科学* 2008; 20: 611-617
- 11 Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis* 2000; 59 Suppl 1: i6-i16
- 12 苏剑东, 吴云飞. NF- κ B与细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1411-1416
- 13 Camilleri-Broët S, Cremer I, Marmey B, Comperat E, Viguié F, Audouin J, Rio MC, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Régnier CH. TRAF4 overexpression is a common characteristic of human carcinomas. *Oncogene* 2007; 26: 142-147
- 14 邢传平, 刘斌, 董亮. 免疫组织化学标记结果的判断方法. *中华病理学杂志* 2001; 30: 318
- 15 朱长乐, 赖仁胜. 原位细胞凋亡检测改良方法的比较. *实用医技杂志* 2007; 17: 2294-2296
- 16 Fleckenstein DS, Dirks WG, Drexler HG, Quentmeier H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 4 is a new binding partner for the p70S6 serine/threonine kinase. *Leuk Res* 2003; 27: 687-694
- 17 He JQ, Saha SK, Kang JR, Zarnegar B, Cheng G. Specificity of TRAF3 in its negative regulation of the noncanonical NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 2007; 282: 3688-3694
- 18 辛利军. TRAF: 一种重要的接头分子. *国外医学·免疫学分册* 2002; 25: 143-146
- 19 Esparza EM, Arch RH. TRAF4 functions as an intermediate of G1TR-induced NF-kappaB activation. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 3087-3092
- 20 Abell AN, Johnson GL. MEKK4 is an effector of the embryonic TRAF4 for JNK activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 35793-35796
- 21 江鹏程. TRAF4及其相关蛋白Eg5与肿瘤的关系. *医学信息(中旬刊)* 2010; 5: 1970-1971
- 22 Kedinger V, Rio MC. TRAF4, the unique family member. *Adv Exp Med Biol* 2007; 597: 60-71
- 23 Glauner H, Siegmund D, Motejadedd H, Scheurich P, Henkler F, Janssen O, Wajant H. Intracellular localization and transcriptional regulation of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 4 (TRAF4). *Eur J Biochem* 2002; 269: 4819-4829
- 24 Régnier CH, Tomasetto C, Moog-Lutz C, Chenard MP, Wendling C, Basset P, Rio MC. Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J Biol Chem* 1995; 270: 25715-25721
- 25 Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, Van Arsdale T, Gascoyne RD, Berern K, McFadden D, Shabaik A, Hugh J, Reynolds A, Clevenger CV, Reed JC. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol* 1998; 152: 1549-1561
- 26 代文博, 郑英伟, 米小轶, 刘楠, 林红, 闫俊. TRAF4蛋白在乳腺癌组织中的表达及意义. *癌症* 2007; 26: 1095-1098
- 27 Tritz R, Hickey MJ, Lin AH, Hadwiger P, Sah DW, Neuwelt EA, Mueller BM, Kruse CA. FAPP2 gene downregulation increases tumor cell sensitivity to Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383: 167-171
- 28 Benchabane H, Ahmed Y. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2009; 656: 75-84
- 29 刘永衡, 孙桂芝, 张培彤. 中药诱导人胃癌MGC-803细胞凋亡研究近况. *天津中医药* 2009; 26: 522-523
- 30 吴昊, 李薇, 葛红梅, 刘平. 芍药苷抑制NF- κ B的活性促进人胃癌细胞凋亡. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2008; 28: 161-165

编辑 李薇 电编 何基才

TSLC1和MPP3在胰腺癌中的表达及其意义

刘志清, 刘修莉, 龚发良, 任习芳, 陈畅, 李玲, 潘志红, 袁玲莉, 陈蓉

刘志清, 刘修莉, 龚发良, 任习芳, 陈畅, 李玲, 潘志红, 袁玲莉, 陈蓉, 宜昌市第一人民医院 三峡大学人民医院消化内科 湖北省宜昌市 443000

作者贡献分布: 此课题由刘修莉、龚发良及刘志清设计; 研究过程由刘志清、陈畅、任习芳及李玲操作完成; 数据分析由刘志清、潘志红、袁玲莉及陈蓉完成; 本论文写作由刘志清与刘修莉完成。

通讯作者: 刘修莉, 副主任医师, 443000, 湖北省宜昌市湖堤街4号, 宜昌市第一人民医院, 三峡大学人民医院. yr1989@163.com 电话: 0717-6287670

收稿日期: 2010-10-19 修回日期: 2010-12-09

接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-02-08

Clinical significance of the expression of TSLC1 and MPP3 in pancreatic cancer

Zhi-Qing Liu, Xiu-Li Liu, Fa-Liang Gong, Xi-Fang Ren, Chang Chen, Ling Li, Zhi-Hong Pan, Ling-Li Yuan, Rong Chen

Zhi-Qing Liu, Xiu-Li Liu, Fa-Liang Gong, Xi-Fang Ren, Chang Chen, Ling Li, Zhi-Hong Pan, Ling-Li Yuan, Rong Chen, the First People's Hospital of Yichang, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Sanxia University, Yichang 443000, Hubei Province, China

Correspondence to: Xiu-Li Liu, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Sanxia University, 4 Hutu Avenue, Yichang 443000, Hubei Province, China. yr1989@163.com

Received: 2010-10-19 Revised: 2010-12-09

Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of the expression of TSLC1 (tumor suppressor in lung cancer 1) and MPP3 (membrane protein, palmitoylated 3) in pancreatic cancer.

METHODS: Immunohistochemistry was used to measure the expression of TSLC1 and MPP3 in 10 normal pancreatic tissue specimens, 12 pancreatitis specimens, and 37 pancreatic cancer specimens.

RESULTS: The positive rates of TSLC1 and MPP3 expression in pancreatic carcinoma were significantly lower than those in normal pancreatic tissue and pancreatitis (21.62% vs 70.00%, 75.00%; 27.03% vs 80.00%, 66.67%, all $P < 0.05$ or 0.01). The expression of TSLC1 and MPP3 was significantly correlated with tumor differentia-

tion, lymph node metastasis, and TNM stage in pancreatic cancer (all $P < 0.05$), but not with gender, age, tumor location, and pathological type (all $P > 0.05$). A significant positive correlation was found between the expression of TSLC1 and MPP3 in pancreatic cancer ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Down-regulated expression of TSLC1 and MPP3 may be involved the pathogenesis, progression, and metastasis of pancreatic carcinoma.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Tumor suppressor in lung cancer 1; Membrane protein, palmitoylated 3; Immunohistochemistry

Liu ZQ, Liu XL, Gong FL, Ren XF, Chen C, Li L, Pan ZH, Yuan LL, Chen R. Clinical significance of the expression of TSLC1 and MPP3 in pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 379-383

摘要

目的: 探讨TSLC1和MPP3两种蛋白在胰腺癌中的表达和临床病理意义。

方法: 采用免疫组织化学S-P法检测37例胰腺癌组织、12例胰腺炎组织和10例正常胰腺组织中TSLC1和MPP3两种蛋白的表达。

结果: TSLC1、MPP3蛋白在胰腺癌组织中的阳性表达率均明显低于在正常胰腺组织和胰腺炎组织中的表达(21.62% vs 70.00%, 75.00%; 27.03% vs 80.00%, 66.67%, $P < 0.05$ 或0.01)。TSLC1和MPP3蛋白的异常表达均与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移和TNM分期相关(均 $P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、部位和病理分型无关。在37例胰腺癌中TSLC1与MPP3蛋白表达呈显著正相关($r_s = 0.715$, $P < 0.01$)。

结论: 胰腺癌中存在TSLC1和MPP3基因的失活和蛋白表达下调, 两者可能通过TSLC1-MPP3级联反应共同参与胰腺癌的发生、发展和转移。

关键词: 胰腺癌; 肺癌抑制基因1; 膜蛋白, 棕榈酰化

■背景资料

TSLC1作为一种新的抑癌基因参与细胞间黏附、细胞运动、信号转导及免疫调节, 在多种肿瘤中呈现异常表达, 并与肿瘤的多种生物学特性密切相关, 其作用的分子机制尚待进一步研究。

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■相关报道

Kuramochi等报道在约17%的胰腺癌中检测到TSLC1的杂合子缺失(LOH), 72.7%的胰腺癌细胞系中有TSLC1表达缺失.

3; 免疫组织化学

刘志清, 刘修莉, 龚发良, 任习芳, 陈畅, 李玲, 潘志红, 袁玲莉, 陈蓉. TSLC1和MPP3在胰腺癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 379-383

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/379.asp>

0 引言

肺癌抑制基因1(tumor suppressor in lung cancer-1, TSLC1)是2001年由Kuramochi等在人类非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)中发现的一种抑癌基因, 定位于染色体11q23.2, 翻译生成442个氨基酸残基的跨膜糖蛋白. 该基因的突变与失活与人类多种肿瘤, 包括胰腺癌的发生发展密切相关^[1,2]. 膜蛋白, 棕榈酰化3(membrane protein, palmitoylated 3, MPP3)蛋白是由585个氨基酸组成一种膜蛋白, 属于膜相关鸟苷酸激酶类似物(membranes-associated guanylate kinase, MAGUK)家族, 与果蝇肿瘤抑制基因discs large(dlg)高度同源^[3]. Fukuhara等^[4]用酵母双杂交筛选技术发现TSLC1与MPP3密切相关, 认为MPP3可能是NSCLC的一个抑癌基因. 国内迄今尚无关于TSLC1-MPP3信号通路的相关研究, 我们应用免疫组织化学方法检测TSLC1和MPP3蛋白在胰腺癌组织中的表达情况, 旨在探讨TSLC1和MPP3蛋白表达与胰腺癌的发生、发展和临床病理学特征及预后的意义, 并进一步证实TSLC1与MPP3的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 收集三峡大学人民医院2000-01/2009-06手术切除的胰腺癌标本37例, 其中男25例, 女12例, 年龄18-72岁. 淋巴结转移: 阳性者18例, 阴性者19例. TNM分期: I - II期20例, III-IV期17例. 分化程度: 按WHO分类, 高分化腺癌10例, 中分化腺癌15例, 低分化腺癌12例. 取12例胰腺炎组织标本和10例正常胰腺组织标本作对照. 所有标本均经40 g/L缓冲中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 5 μm厚度连续切片, 1张行常规HE染色, 供组织学观察并行病理分型和诊断, 另3张制成涂胶白片作免疫组织化学染色用. 兔抗人多克隆抗体TSLC1购自Santa Cruz Biotechnology USA, 羊抗人多克隆抗体MPP3购自Abcam公司, 免疫组织化学SP试剂盒和DAB显色试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 SP法染色: (1)脱蜡和水化; (2)内源性过氧

化物酶阻断溶液37 °C孵育20 min; (3)高温高压抗原修复; (4)非免疫性动物血清37 °C孵育30 min; (5)第一抗体4 °C下孵育过夜, 一抗稀释比为: TSLC1(1 : 100)、MPP3(1 : 1 000); (6)生物素标记的第二抗体37 °C孵育30 min; (7)链霉菌素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液37 °C孵育30 min; (8)新配制的DAB溶液显色; (9)苏木素复染, 中性树胶封片. 以上步骤间均用0.01 mol/L PBS缓冲液(pH7.4)冲洗5 min×3次. 同时用已知阳性片作阳性对照, 用PBS代替一抗作阴性对照.

1.2.2 TSLC1染色结果的判断标准: 与阴性对照片相比, TSLC1蛋白以细胞膜或细胞质内出现棕黄色颗粒判断为阳性细胞, 采用双盲法, 高倍镜下随机选取10个视野, 每个视野计数200个细胞, 按照国外文献^[5]方法计算阳性细胞数<30%为阴性(-), 阳性细胞数≥30%为阳性(+).

1.2.3 MPP3染色结果判断标准: MPP3蛋白以胞质和胞膜有棕黄色颗粒判断为阳性细胞. 染色结果判断标准方法: 先按染色强度计分: 0分为无色, 1分为浅黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色; 再在高倍镜下(×400倍)对每张切片随机选取5个高倍镜视野, 计数500个细胞/视野, 共计2 500个, 按阳性细胞所占的百分比计分: 0分为阴性, 1分为阳性细胞<10%, 2分为10%-50%, 3分为>50%, 染色强度与阳性细胞百分比的乘积≥2分为免疫组织化学阳性(+), 否则计为免疫组织化学阴性(-).

统计学处理 采用SPSS13.0 for Windows统计软件进行 χ^2 检验和四格表的精确概率法判断TSLC1和MPP3蛋白表达与各病理指标的相互关系, 运用Spearman相关系数来判断TSLC1和MPP3蛋白表达之间的相关关系, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 TSLC1在正常胰腺组织, 胰腺炎与胰腺癌组织中的表达 应用免疫组织化学SP法检测了TSLC1在37例胰腺癌、12例胰腺炎和10例正常胰腺组织中的定位及表达情况. 结果显示: TSLC1表达定位于细胞膜或细胞质内, 呈棕黄色颗粒(图1). 9例正常胰腺组织中有7例呈阳性表达, 阳性率为70.00%; 12例胰腺炎组织中有9例呈阳性表达, 阳性率为75.00%; 在37例胰腺癌中有例呈阳性表达, 阳性率为21.62%. TSLC1在胰腺癌与胰腺炎之间, 以及胰腺癌与正常胰腺组织中的表达存在显著性差异($P<0.05$, 表1). 对

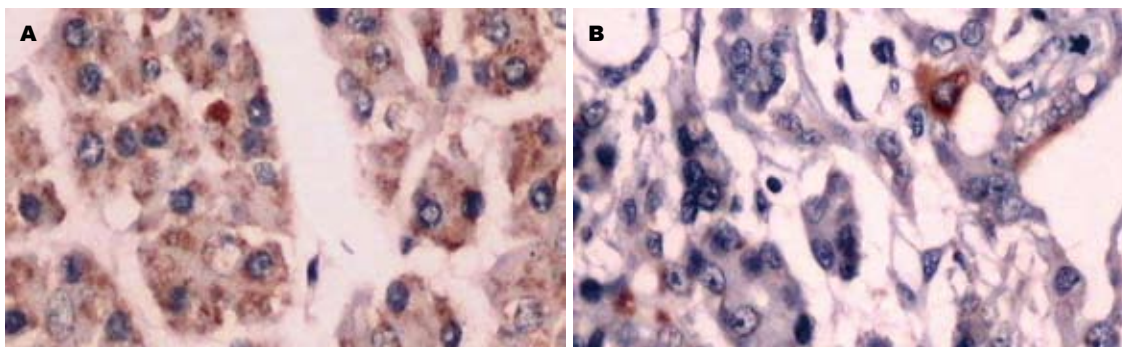


图 1 TSLC1蛋白在正常胰腺组织和胰腺癌组织中的表达(SP法 × 400). A: 阳性; B: 阴性.

■创新盘点
 本文检测了抑癌基因TSLC1在胰腺癌中的表达, 分析其与胰腺癌临床病理因素间的关系及与MPP3蛋白表达的相关性, 探讨TSLC1基因在胰腺癌发生发展中的作用及可能的分子机制.

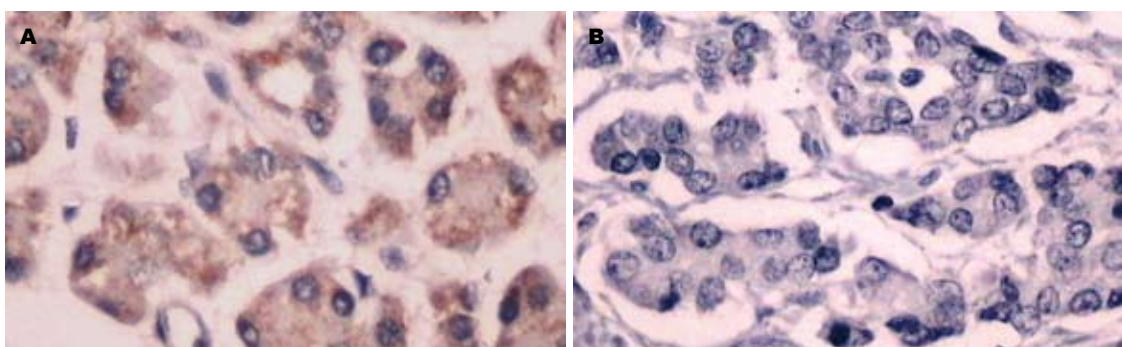


图 2 MPP3蛋白在正常胰腺组织和胰腺癌组织中的表达(SP法 × 400). A: 阳性; B: 阴性.

TSLC1在胰腺癌组织中的表达与临床病理特征进行卡方检验, 结果发现其表达在肿瘤分化程度、淋巴结转移和TNM分期存在显著性差异(均 $P < 0.05$, 表2), 而与年龄、性别、部位和病理分型无关(均 $P > 0.05$, 表2).

2.2 MPP3在正常胰腺组织、胰腺炎与胰腺癌组织的表达 应用免疫组织化学SP法检测了37例人胰腺癌、12例胰腺炎和10例正常胰腺组织中MPP3的定位及表达情况. 结果显示: MPP3定位于细胞膜和细胞质内, 呈棕黄色颗粒(图2). 在10例正常胰腺组织中有8例呈阳性表达, 阳性率为80.00%; 12例胰腺炎组织中有8例呈阳性表达, 阳性率为66.67%; 在37例胰腺癌中有10例呈阳性表达, 阳性率为27.03%. MPP3在胰腺癌与胰腺炎之间, 以及胰腺癌与正常胰腺组织中的表达存在显著性差异($P < 0.05$, 表1). 对TSLC1在胰腺癌组织中的表达与临床病理特征进行卡方检验, 结果发现其表达在肿瘤分化程度、淋巴结转移和TNM分期存在显著性差异(均 $P < 0.05$, 表2), 而与年龄、性别、部位和病理分型无关(均 $P > 0.05$, 表2).

2.3 TSLC1及MPP3在胰腺癌组织中表达的关系 胰腺癌组织中TSLC1蛋白阳性率为18.92(7/37), 与MPP3蛋白的表达阳性率27.03(10/37), 相关性

表 1 TSLC1和MPP3在正常胰腺组织、胰腺炎和胰腺癌组织中的表达

| 分组 | n | TSLC1阳性表达率 | MPP3阳性表达率 |
|--------|----|------------------------|-------------------------|
| 正常胰腺组织 | 10 | 7(70.00) | 8(80.00) |
| 胰腺炎组织 | 12 | 9(75.00) | 8(66.67) |
| 胰腺癌组织 | 37 | 8(21.62) ^{ad} | 10(27.03) ^{ad} |

^a $P < 0.05$ vs 胰腺炎组织; ^d $P < 0.01$ vs 正常胰腺组织.

($r_s = 0.715, P < 0.01$).

3 讨论

TSLC1蛋白属于免疫球蛋白超家族, 由胞外区、跨膜区和胞质区三部分组成. 其中胞质区域是TSLC1发挥作用所必需的, 其结构与血型糖蛋白C类似, 包括一个FERM(protein 4.1/ezrin/radixin/moesin)结合模体和一个PDZ(PSD-95/Dlg/ZO-1)结合模体, 并能与相应蛋白DAL-1/4.1B和(或)MAGUK结合发挥特殊功能^[6]. Kuramochi等^[1]报道在约17%的胰腺癌中检测到TSLC1的杂合子缺失(loss of heterozygosity, LOH), 72.7%的胰腺癌细胞系中有TSLC1表达缺失. 另外, Jansen等^[7]研究发现在胰导管上皮癌, 胰腺上皮内瘤变(PinIN), 以及多种胰腺癌细胞株中如ASPC-1、

■应用要点

本文对TSLC1和MPP3在胰腺癌中的相关性作出了初步探讨,为深入了解TSLC1信号通路在肿瘤进展中的作用奠定了基础。

表 2 TSLC1和MPP3在胰腺癌组织中的表达与临床病理指标的关系

| 临床病理特征 | n | TSLC1 | | MPP3 | |
|-----------|----|----------|-------|----------|-------|
| | | 阳性n(%) | P值 | 阳性n(%) | P值 |
| 性别 | | | | | |
| 男 | 25 | 5(20.00) | >0.05 | 7(28.00) | >0.05 |
| 女 | 12 | 3(25.00) | | 3(25.00) | |
| 年龄(岁) | | | | | |
| ≤45 | 9 | 2(22.22) | >0.05 | 1(11.11) | >0.05 |
| >45 | 28 | 6(21.43) | | 9(32.14) | |
| 肿瘤部位 | | | | | |
| 胰头癌 | 17 | 2(11.76) | >0.05 | 5(29.41) | >0.05 |
| 胰体癌 | 14 | 5(35.71) | | 4(28.57) | |
| 胰尾癌 | 6 | 1(16.67) | | 1(16.67) | |
| 分化程度 | | | | | |
| 高分化 | 10 | 5(50.00) | <0.01 | 7(70.00) | <0.01 |
| 中分化 | 15 | 3(20.00) | | 3(20.00) | |
| 低分化 | 12 | 0(0.00) | | 0(0.00) | |
| 淋巴结转移 | | | | | |
| 有 | 18 | 1(5.56) | <0.05 | 2(11.11) | <0.05 |
| 无 | 19 | 7(36.84) | | 8(42.11) | |
| 病理分型 | | | | | |
| 管状腺癌 | 35 | 6(17.14) | >0.05 | 8(22.86) | >0.05 |
| 其他 | 2 | 1(50.00) | | 1(50.00) | |
| TNM分期 | | | | | |
| I - II期 | 20 | 7(35.00) | <0.05 | 9(45.00) | <0.01 |
| III - IV期 | 17 | 1(5.88) | | 1(5.88) | |

Miapaca、PL-3内,均可发生TSLC1较高频度的甲基化,说明胰腺癌的发生与5'CpG岛的甲基化导致的TSLC1转录受抑,进而表达缺失密切相关。TSLC1失活见于包括胰腺癌在内的多种肿瘤组织或细胞,尤其多见于癌组织的浸润和转移部位^[2]。因此我们推测作为一种抑癌基因, TSLC1的失活在胰腺癌中发挥了重要作用。TSLC1可能与胰腺癌的生物行为,包括侵袭和转移有关。本研究显示, TSLC1表达与胰腺癌分化程度,淋巴结转移, TNM分期有关(均 $P<0.05$),而与患者的性别、年龄、肿瘤部位以及病理分型无关(均 $P>0.05$),研究结果与国外现有文献报道一致,说明TSLC1可能影响胰腺癌的发生、发展、转移, TSLC1蛋白可以作为判断胰腺癌恶性程度的一个重要的生物学指标。

MPP3基因定位于17q21, MPP3蛋白由一对Lin/Lin7结构域(L27), 一个PDZ结构域、一个丝氨酸同源结构域(SH3), 和一个鸟苷酸激酶同源结构域(GuK)组成, 该蛋白与果蝇抑癌蛋白Dlg高度同源。研究表明DLG在控制果蝇上皮及神经细胞的细胞极性形成及细胞生长中发挥关

键作用^[9-11];与Dlg结果相似的含有PDZ结构域的蛋白在哺乳动物中称为MAGUK, 主要位于细胞连接处, 参与细胞构建和信号传导功能^[8]。CASK, MPP3和Pals2和syntenin是MAGUK中目前认为与TSLC1结合的蛋白, 可调控细胞极性^[4,12-14]。Fukuhara等^[4]在NSCLC中用酵母双杂交筛选技术发现并通过体内及体外试验证实TSLC1与MPP3通过TSLC1的PDZ结构域相互作用, 参与相邻细胞间正常黏附结构, 当其中的一种蛋白表达缺失时, 就会影响正常细胞黏附而导致癌的转移。迄今为止, 国内外没有MPP3和胰腺癌的相关报道, 本研究首次研究了MPP3在胰腺癌组织的表达情况。结果显示MPP3表达与胰腺癌分化程度, 淋巴结转移, TNM分期有关(均 $P<0.05$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤部位以及病理分型无关(均 $P>0.05$), 说明MPP3可能影响胰腺癌的发生、发展、转移, 进一步证实了MPP3是一种广泛存在的抑癌基因。

TSLC1、MPP3和DAL-1在细胞黏附位置相互作用, 值得注意的是一种红细胞抗原血型糖蛋白C与TSLC1胞质结构极度相似, 该蛋白与MPP1和蛋白4.1形成三元复合物参与与红细胞的变形^[15]; 另一种跨膜蛋白果蝇NeurexinIV基因与TSLC1胞质区结构相似, 与Dlg和蛋白4.1分子结构相似的Coracle相互作用^[16]。这些复合物参与分隔连接, 是果蝇中一种普遍存在的连接装置, 普遍存在于脊椎动物的紧密连接中, 因此我们推测TSLC1, DAL-1/4.1B和MPP3可能组成三元复合物, 共同参与与细胞黏附有关的上皮样细胞机构形成。我们用免疫组织化学方法研究了胰腺癌中两种基因的表达及其相互关系, 结果显示TSLC1与MPP3在胰腺癌组织中表达呈正相关($P<0.01$)。

总之, TSLC1与MPP3在胰腺癌组织表达下调或缺失, 两者基因表达失活均与胰腺癌的分化程度、淋巴结转移及TNM分期有关, 并且两者具有相关性。TSLC1蛋白可能与MPP3蛋白共同参与胰腺癌的发生、发展和转移, 二者的作用机制有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 2001; 27: 427-430
- 2 Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer*

- Sci* 2005; 96: 543-552
- 3 Smith SA, Holik P, Stevens J, Mazoyer S, Melis R, Williams B, White R, Albertsen H. Isolation of a gene (DLG3) encoding a second member of the discs-large family on chromosome 17q12-q21. *Genomics* 1996; 31: 145-150
 - 4 Fukuhara H, Masuda M, Yageta M, Fukami T, Kuramochi M, Maruyama T, Kitamura T, Murakami Y. Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of Drosophila tumor suppressor Dlg. *Oncogene* 2003; 22: 6160-6165
 - 5 Goto A, Niki T, Chi-Pin L, Matsubara D, Murakami Y, Funata N, Fukayama M. Loss of TSLC1 expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, sex and prognostic significance. *Cancer Sci* 2005; 96: 480-486
 - 6 Mao X, Seidlitz E, Ghosh K, Murakami Y, Ghosh HP. The cytoplasmic domain is critical to the tumor suppressor activity of TSLC1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 7979-7985
 - 7 Jansen M, Fukushima N, Rosty C, Walter K, Altink R, Heek TV, Hruban R, Offerhaus JG, Goggins M. Aberrant methylation of the 5' CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 293-296
 - 8 Harris BZ, Lim WA. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 2001; 114: 3219-3231
 - 9 Ohshiro T, Yagami T, Zhang C, Matsuzaki F. Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of Drosophila neuroblast. *Nature* 2000; 408: 593-596
 - 10 Peng CY, Manning L, Albertson R, Doe CQ. The tumour-suppressor genes Igl and dlG regulate basal protein targeting in Drosophila neuroblasts. *Nature* 2000; 408: 596-600
 - 11 Bellaïche Y, Radovic A, Woods DF, Hough CD, Parmentier ML, O'Kane CJ, Bryant PJ, Schweisguth F. The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in Drosophila. *Cell* 2001; 106: 355-366
 - 12 Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Südhof TC. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 2002; 297: 1525-1531
 - 13 Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, Satoh K, Takeuchi M, Imai T, Monden M, Takai Y. Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 35421-35427
 - 14 Bachmann A, Schneider M, Theilenberg E, Grawe F, Knust E. Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* 2001; 414: 638-643
 - 15 Marfatia SM, Morais-Cabral JH, Kim AC, Byron O, Chishti AH. The PDZ domain of human erythrocyte p55 mediates its binding to the cytoplasmic carboxyl terminus of glycophorin C. Analysis of the binding interface by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem* 1997; 272: 24191-24197
 - 16 Fehon RG, Dawson IA, Artavanis-Tsakonas S. A Drosophila homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development* 1994; 120: 545-557

■同行评价
本文探讨TSLC1和MPP3在胰腺癌组织中的表达, 有重要的临床意义。

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2009 年 WJG 影响因子 2.092

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

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

FGFR2: 进展期胃癌的关键分子

陈刚, 邱红, 于世英

■背景资料

成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2)作为酪氨酸激酶受体分子与肿瘤血管的形成、肿瘤的分期、转移、预后及化疗疗效密切相关, 日益受到大家的广泛关注。

陈刚, 邱红, 于世英, 华中科技大学同济医学院附属同济医院 湖北省武汉市 430030
国家自然科学基金资助项目, No. 81001067
作者贡献分布: 此课题由陈刚、邱红及于世英设计; 论文由陈刚撰写; 于世英审定完成。
通讯作者: 于世英, 教授, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院. syyu@tjh.tjmu.edu.cn
收稿日期: 2010-11-23 修回日期: 2011-01-14
接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-08

FGFR2: a key molecule in the progression of gastric cancer

Gang Chen, Hong Qiu, Shi-Ying Yu

Gang Chen, Hong Qiu, Shi-Ying Yu, Tongji Hospital Affiliated to Tongji College of Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81001067
Correspondence to: Professor Shi-Ying Yu, Tongji Hospital Affiliated to Tongji College of Huazhong University of Science & Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. syyu@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2010-11-23 Revised: 2011-01-14
Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is a tyrosine kinase receptor of the FGFR family and plays an important role in the progression of gastric cancer. FGFR2 expression is closely associated with pathological type, clinical stage, lymph node metastasis, and distant metastasis in advanced gastric cancer. Monoclonal antibodies directed against FGFR2 can inhibit the proliferation of gastric cancer cells and, when used in combination with chemotherapy, has a synergistic effect against gastric cancer, suggesting that FGFR2 is a potential therapeutic target for advanced gastric cancer.

Key Words: Gastric neoplasms; Fibroblast growth factor receptor 2; Molecularly targeted therapy

Chen G, Qiu H, Yu SY. FGFR2: a key molecule in the progression of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 384-388

摘要

成纤维细胞生长因子受体2(fibroblast growth

factor receptor 2, FGFR2)作为人成纤维细胞生长因子受体酪氨酸激酶受体家族成员之一, 是进展期胃癌侵袭特性的基础, 与胃癌的病理类型、临床分期、淋巴结及远处转移密切相关。围绕FGFR2分子进行的大量研究表明, 针对FGFR2的单克隆抗体对FGFR2高表达或活化的胃癌细胞具有明显的抑制作用, 联合化疗应用对胃癌的抑制具有协同作用, 显示出以FGFR2为治疗靶点治疗进展期胃癌具有良好的应用前景。

关键词: 胃肿瘤; 成纤维细胞生长因子受体2; 分子靶向治疗

陈刚, 邱红, 于世英. FGFR2: 进展期胃癌的关键分子. *世界华人消化杂志* 2011; 19(4): 384-388
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/384.asp>

0 引言

近十年来我国胃癌发病率仍远高于世界平均水平, 胃癌死亡率仅低于肺癌及肝癌, 高居癌症死亡率第3位^[1]。长期以来包括手术切除及放化疗的综合性治疗的应用, 并未明显改善生存率, 总的5年生存率仅为10%-15%。随着肿瘤分子生物学的不断深入, 肿瘤的药物治疗为我们提供了一种新的模式: 分子靶向治疗。近年来, 与胃癌密切相关的信号通路引起了广泛关注, 并有部分与之相关的分子靶向药物如针对表皮生长因子受体2(epidermal growth factor receptor 2, HER-2)特异性靶向治疗药物曲妥珠单抗治疗开始进入HER-2高表达胃癌治疗的III临床试验, 结果显示出了良好的应用前景。成纤维细胞生长因子受体2(fibroblast growth factor receptor 2, FGFR2)作为酪氨酸激酶受体分子与肿瘤血管的形成、肿瘤的分期、转移、预后及化疗疗效密切相关。本文将结合FGFR2的结构与功能特点综述其作为靶向治疗的分子靶点在胃癌治疗中的作用。

1 FGFR2的结构与功能特点

人成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth

■同行评议者

张青云, 研究员, 北京大学临床肿瘤医院北京肿瘤医院检验科; 陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

factor receptors, FGFRs)是一类具有自身磷酸化活性的酪氨酸激酶受体家族。目前该家族中共发现了4个成员, 分别是FGFR-1(flg)、FGFR-2(bek)、FGFR-3(flg-2)和FGFR-4(fgfr-3)。他们基本结构包括胞外区、疏水跨膜区及酪氨酸激酶的胞内区, 其中胞外区由3个免疫球蛋白(Ig)功能区(分别命名为D1, D2和D3)组成^[2]。FGFR的分布有组织特异性。其中FGFR-1主要是在中胚层起源的组织中表达; 而FGFR-2则是在内胚层起源的组织中表达; FGFR-3是在神经发育和神经组织中有高表达; FGFR-4是在小鼠发育时的内胚层高表达, 同时还分布于肌肉、肝、胆、肺和肾等组织中。他们与包括促进细胞增殖、分化以及增强细胞活性等在内的多种生物活性有关。近些年来FGFRs在肿瘤发生发展中的作用日益受到大家的广泛关注^[3]。

FGFR2是癌基因**bek**的表达产物, 是与多种成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor FGFs)FGFs具有高度亲和力的跨膜酪氨酸激酶受体。FGFR2的D3区由3个外显子编码, 其mRNA的选择性剪接使D3区的C端成为高度可变区, 产生具有跨膜结构的高亲和力FGFR2-IIIb或FGFR2-IIIc两种亚型^[4]。FGFR2-IIIb主要在上皮细胞中表达, FGFR2-IIIc主要在间质细胞中表达。间质细胞表达的FGF7和FGF10能特异性的激活FGFR2-IIIb, 而FGF2、FGF4、FGF6、FGF8和FGF9则特异性激活FGFR2-IIIc^[5,6]。FGFs和受体结合后使受体胞内段酪氨酸残基或靶蛋白酪氨酸残基磷酸化激活, 继而通过多种胞内信号传导分子活化相关传导途径。目前阐明FGF诱导的下游级联信号通路有: (1)PKC路径; (2)Ras/Raf/MEK/Erk路径; (3)JAK/STAT路径; (4)PI3K途径。有趣的是, FGF信号可激活蛋白激酶Erk1和Erk2, 且激酶活性持续时间明显长于表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)诱导的磷酸化激酶持续时间^[7]; 不同路径的活化还能够磷酸化Myc、Fos等早期转录因子, 促使相关靶基因转录^[8,9]; 同时FGFR磷酸化后还可直接转入细胞核内发挥作用^[10,11]。

FGFR2在多种人类恶性肿瘤都出现高表达, 基因扩增或错义突变的FGFR2在胃癌, 肺癌, 乳腺癌, 卵巢癌和子宫内膜癌等恶性肿瘤中普遍存在, 这些因子的高表达是肿瘤细胞增生、侵袭特性的基础^[12]。在慢性炎症、吸烟, 过高的热量摄取、运动减少的过程中, FGFR2的信号失控导致表观遗传修饰与基因变异的积累致使癌

症的发生。表皮选择性的FGFR2b敲除, 导致更多巨噬细胞浸润至真皮和脂肪组织中, 导致表皮增厚伴有基底层增生和角化从而促进化学诱导鳞癌的发生^[13]。而针对FGFR2为治疗靶点的相关研究显现出明显的治疗效果。Bai等^[14]应用FGFR2-IIIb的特异性抗体GP369, 通过体内和体外实验来探讨FGFR2信号在肿瘤中的作用。体内和体外实验结果表明GP369能抑制FGFR2配体的磷酸化水平及其下游的信号通路并抑制FGFR2导致的细胞增殖, 研究结果表明异常调控的FGFR2信号在肿瘤的发生和维系中具有重要作用, 以FGFR2为靶点的抗体对那些FGFR2信号异常活化的患者具有潜在的治疗作用^[15]。

2 FGFR2与胃癌生物学行为之间的关系

胃癌的发生发展是一个诸多因素如幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染、摄盐过多等导致癌基因或其表观遗传不断蓄积最终获得如正常增殖黏附失控、对凋亡、监视及药物抵抗等恶性特征的多阶段过程。FGF7由间质成纤维细胞分泌, 刺激胃癌细胞增殖, 尤其是对来源于胃底腺的浸润性胃癌。*H.pylori*感染时胃黏膜上皮细胞的FGF及FGFR-2的过度表达可能与*H.pylori*感染致胃黏膜上皮细胞的癌变有关^[16]。在多种胃癌细胞系中如MKN74, MKN45, MKN7和MKN1中均存在高表达的FGFR2^[17]。

FGFR2的过度表达是诸多肿瘤的致病因素之一, 尤其对低度分化的胃癌关系更为密切。FGFR和FGF为特征的旁分泌及自分泌信号环路是胃癌恶性增殖的重要条件。研究发现胃间质细胞分泌来源的FGF7可促进胃癌细胞生长, 细胞恶性程度越高, FGFR2-IIIb表达程度越高, 而胃间质纤维细胞未发现FGFR表达^[18]。进一步离体及在体实验进一步证实, 抑制FGFR2磷酸化活性后, 胃癌细胞生长明显受抑^[19]。

在进展期胃癌中与FGF7有高度亲和力的FGFR2高表达, 表明在浸润性胃癌的进展过程中FGF7/FGFR2通路发挥着重要的作用。Peng等^[20]研究亦发现FGFR2及KRAS、MDM2伴随染色体拷贝数量的改变在胃癌进展过程中存在蓄积效应, 在晚期进展胃癌中表达更为明显。并且FGFR2与胃癌的分期、转移密切相关。马爱玲等^[21]对胃癌及癌旁组织FGF2和FGFR2表达水平进行分析, 结果示胃癌组织中两者的表达量明显高于癌旁组织, 且与淋巴结转移相关, 提示FGF2和FGFR2的表达与胃癌的侵袭及转移

■ 相关报道

李琳琳等的研究表明FGFR2在胃癌组织中的阳性表达率为77.4%, 并且FGFR2蛋白表达与浸润深度及病理分期有关。

■创新盘点

结合FGFR2的结构与功能特点及其在胃癌进展中发挥的作用,综述针对这一靶点进行的最新研究,提供一个全面认识FGFR2在胃癌中地位的视角。

有关。覃山羽等^[22]根据Correa胃癌发生模式分组,研究bFGF及其受体FGFR2在胃黏膜不同病变中的表达,结果显示bFGF与FGFR2在慢性浅表性胃炎、肠上皮化生、不典型增生及胃癌胃黏膜上皮组织中逐渐增加,两者表达呈正相关性,FGFR2表达与胃癌的浸润深度、有无淋巴结转移、有无远处转移及TMN分期有关。Kato等^[18]则报道,在弥漫性胃癌中,常有FGFR2基因的扩增和过度表达。同时李琳琳等^[23]的研究表明FGFR2在胃癌组织中的阳性表达率为77.4%,并且FGFR2蛋白表达与浸润深度及病理分期有关($P<0.05$)。这与Hattori等^[24]报道在38例未分化的进展期胃癌中有20例高表达FGFR2的比例相近。

3 FGFR2与胃癌分子靶向治疗

针对FGFR2的单克隆抗体的研究显示对FGFR2高表达或活化的胃癌细胞具有明显的抑制作用。在胃癌细胞系KatoIII, Snu16和OCUM-2中存在FGFR2的过度表达和过度酪氨酸磷酸化。特定的FGFR2小分子抑制剂导致对FGFR2扩增细胞系产生选择性的和有效的抑制作用,使KatoIII生长停滞,而在Snu16和OCUM-2细胞中则明显诱导细胞凋亡。Zhao等^[25]针对FGFR2位点GAL-FR21, GAL-FR22和GAL-FR23制备了3种单克隆抗体,与FGFR2-IIIb和FGFR2-IIIc亚单位结合,从而阻止FGF7和FGFR2的结合;在SNU-16和OCUM 2M细胞系建立的裸鼠抑制瘤模型中,显示出了明显的抑制作用。

针对FGFR2单抗联合化疗体外研究也显示出了良好的应用前景。FGFR2抑制剂Ki23057与S1联合运用在体外实验中显现出对胃癌细胞具有协同一致作用。S1作为一种5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的类似物,临床上运用于晚期胃癌的化疗。Yashiro等^[26]以胃硬癌(scirrhous gastric carcinoma, SGC)来源的细胞系OCUM-2MLN和KATOIII以及来源于非硬癌的胃癌细胞系MKN-7和MKN-74为研究对象,采用MTT法检测5个小分子合成物包括Ki23057, 舒尼替尼, 格列卫, 拉帕替尼或SU11274联合5-FU对胃癌细胞生长的抑制作用,结果显示Ki23057和5-FU联合使用能下调OCUM-2MLN和KATOIII细胞的二氢吡啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)的表达,并增加细胞凋亡率和p21基因的表达,进一步CalcuSyn软件分析结果显示Ki23057联合5-FU对OCUM-2MLN和KATOIII细胞具有协同抗肿瘤作用,而舒尼替尼, 格列

卫, 拉帕替尼和SU11274却没有协同作用;采用原位接种OCUM-2MLN的小鼠模型观察S1和/或Ki23057的作用, Ki23057在100 nmol/L水平显示出对胃硬癌细胞OCUM-2MLN的增殖和FGFR2磷酸化水平具有显著的抑制作用,而在非硬癌细胞系中却没有产生该作用,联合S1和Ki23057较单独使用S1而言更加显著抑制原位肿瘤及淋巴结转移肿瘤的生长。这些结果表明联合使用5-FU和Ki23057对高表达FGFR2的SGC而言是一个有前途的治疗手段。Kim等^[27]的研究同样表明FGFR2与Myc及EGFR是进展期胃癌患者顺铂加5-FU组成的CF方案化疗后独立的预后因素。

更令人鼓舞的是FGFR2可能是EFGR家族的调控基因。Kunii等^[28]研究发现在FGFR2扩增细胞系同时存在EFGR HER-2和ErbB3的高度磷酸化, EFGR磷酸化升高能被FGFR2的单克隆抗体所抑制,但不能被吉非替尼或埃罗替尼所抑制,提示EFGR家族激酶是过度扩增的FGFR2的下游目标基因。而在2009年的美国临床肿瘤学会(American Society of Clinical Oncology, ASCO)年会上,韩国学者报告的一项多中心随机对照III期临床试验(ToGA)显示,对于HER-2阳性胃癌患者, HER-2特异性靶向治疗药物曲妥珠单抗的治疗可使其临床获益显著。结果显示,与单纯接受化疗组患者相比,曲妥珠单抗联合标准化疗方案组患者的死亡风险降低26%,总生存期延长2.7 mo(13.8 mo vs 11.1 mo, $P = 0.0048$),客观有效率提高12.8%(47.3% vs 34.5%, $P = 0.0017$)。亚组分析表明, HER-2强阳性表达者可获更大的生存益处,总生存期延长到16 mo,死亡风险降低35%。由此针对FGFR2的靶向药物可能会使FGFR2高表达,甚至是EGFR高表达的患者都能从中获益。

此外,在高表达的胃癌细胞系中FGFR2通路可能与血管内皮生长因子信号通路和c-Met之间存在交叉作用。AZD2171是一口服的高效选择性血管内皮生长因子信号抑制剂,他能抑制所有血管内皮生长因子受体的酪氨酸激酶。Takeda等^[29]通过体外和体内试验观察了AZD2171对8种胃癌细胞系的作用。结果表明AZD2171能直接抑制KATOIII和OCUM2M细胞系,半数抑制量 IC_{50} (50% concentration of inhibition, IC_{50})分别为0.15和0.37 $\mu\text{mol/L}$,优于EGFR酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼,逆转录PCR和免疫印迹的检测结果表明敏感细胞系高表达FGFR2, AZD2171

在0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时完全抑制了FGFR2的磷酸化及其下游信号蛋白, 包括成纤维生长因子受体底物2(fibroblast growth factor receptor substrate 2, FRS2)、丝/苏氨酸激酶(ser-threonine kinase, AKT)和促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK), 相较其他低表达细胞系, 这个浓度低于其1/10. 体外试验表明, 对KATOIII和OCUM2M细胞系建立的胃癌原位小鼠模型, 口服量为1.5或6 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的AZD2171, 明显抑制了肿瘤的生长, 并呈现出剂量依赖性, 结果表明AZD2171对高表达FGFR2的胃癌细胞显示出潜在的抗癌活性. 而MK-2461作为一种针对活化的c-Met多靶点酪氨酸酶抑制剂, 对FGFR2亦具有抑制作用^[30], c-Met、FGFR2的过度扩增在胃癌进展中发挥着重要作用^[31].

4 结论

FGFR2作为进展期胃癌的关键分子, 与胃癌的进展转移有着密切的关系. 从FGFR2的分子靶向治疗着手, 针对高表达FGFR2胃癌进行的相关研究取得了可喜结果. 但大多研究尚停留于临床前的实验研究, 并且大都为体外研究, 动物的体内实验尤其是与临床运用相关的试验鲜有报道. 体外、体内试验均证实FGFR2分子的抑制物与化疗药物5-FU及S1联合运用具有协同作用, 其机制如何? 有研究表明FGFR信号通路的异常活化可以导致肿瘤干细胞及前体细胞化疗耐药, 避免凋亡产生^[32]; Pardo等^[33]发现FGF导致小细胞肺癌的化疗耐药, 是通过蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)途径, 由B-Raf、PKCepsilon和S6K2组成的特异多蛋白复合物介导的. 这种协同作用是否与逆转耐药有关? 还有FGFR2分子与其他酪氨酸激酶分子如EGFR、血管内皮生长因子受体、肝细胞生长因子受体等之间的关系如何? 各自信号转导通路之间的交叉作用又如何? 这些问题的进一步阐明势必将有利于进一步明确FGFR2及其信号转导通路在胃癌进展中的作用, 为开展相关临床研究以期提高胃癌患者尤其是高表达FGFR2的胃癌患者的治疗效果打下坚实的基础.

5 参考文献

- 1 杨玲, 李连弟, 陈育德, D.M. Parkin. 中国2000年及2005年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测. *中国卫生统计* 2005; 22: 218-222
- 2 Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 235-253

- 3 Katoh M. Genetic alterations of FGF receptors: an emerging field in clinical cancer diagnostics and therapeutics. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10: 1375-1379
- 4 Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 139-149
- 5 Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996; 271: 15292-15297
- 6 Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 2006; 281: 15694-15700
- 7 Thottassery JV, Sun Y, Westbrook L, Rentz SS, Manuvakhova M, Qu Z, Samuel S, Upshaw R, Cunningham A, Kern FG. Prolonged extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation during fibroblast growth factor 1- or heregulin beta1-induced antiestrogen-resistant growth of breast cancer cells is resistant to mitogen-activated protein/extracellular regulated kinase kinase inhibitors. *Cancer Res* 2004; 64: 4637-4647
- 8 Lee T, Yao G, Nevins J, You L. Sensing and integration of Erk and PI3K signals by Myc. *PLoS Comput Biol* 2008; 4: e1000013
- 9 Guan X, Hu J, Li S. Involvement of extracellular signal-regulated protein kinase in acute cocaine-induced c-fos in nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 2008; 438: 155-158
- 10 Maher PA. Nuclear Translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptors in response to FGF-2. *J Cell Biol* 1996; 134: 529-536
- 11 Stachowiak EK, Maher PA, Tucholski J, Mordechaj E, Joy A, Moffett J, Coons S, Stachowiak MK. Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors in human glial cells--association with cell proliferation. *Oncogene* 1997; 14: 2201-2211
- 12 Katoh Y, Katoh M. FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *Int J Mol Med* 2009; 23: 307-311
- 13 Katoh M. FGFR2 abnormalities underlie a spectrum of bone, skin, and cancer pathologies. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1861-1867
- 14 Bai A, Meetze K, Vo NY, Kollipara S, Mazsa EK, Winston WM, Weiler S, Poling LL, Chen T, Ismail NS, Jiang J, Lerner L, Gyuris J, Weng Z. GP369, an FGFR2-IIIb-specific antibody, exhibits potent antitumor activity against human cancers driven by activated FGFR2 signaling. *Cancer Res* 2010; 70: 7630-7639
- 15 李信, 姜海行, 陈昱, 雷琳, 覃山羽. 幽门螺杆菌与胃黏膜bFGF、FGFR-2表达的关系及意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 964-969
- 16 Gong J, Morishita A, Kurokohchi K, Tani J, Kato K, Miyoshi H, Inoue H, Kobayashi M, Liu S, Murota M, Muramatsu A, Izuishi K, Suzuki Y, Yoshida H, Uchida N, Deguchi K, Iwama H, Ishimaru I, Masaki T. Use of protein array to investigate receptor tyrosine kinases activated in gastric cancer. *Int J Oncol* 2010; 36: 101-106
- 17 Nakamura K, Yashiro M, Matsuoka T, Tendo M, Shimizu T, Miwa A, Hirakawa K. A novel molecular targeting compound as K-samII/FGF-R2 phosphorylation inhibitor, Ki23057, for Scirrhus gastric cancer. *Gastroenterology* 2006; 131: 1530-1541

■应用要点

明确FGFR2及其信号转导通路在胃癌进展中的作用, 将为提高胃癌患者尤其是高表达FGFR2的胃癌患者的治疗效果打下坚实的基础.

■同行评价

本文可读性较好,具有一定的科学价值,为胃癌的治疗提供理论依据。

- 18 Katoh M, Katoh M. FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review). *Int J Oncol* 2006; 29: 163-168
- 19 Nakazawa K, Yashiro M, Hirakawa K. Keratinocyte growth factor produced by gastric fibroblasts specifically stimulates proliferation of cancer cells from scirrhous gastric carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 8848-8852
- 20 Peng DF, Sugihara H, Mukaiho K, Tsubosa Y, Hattori T. Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas: metaphase- and array-based comparative genomic hybridization analyses of multiple samples from individual tumours. *J Pathol* 2003; 201: 439-450
- 21 马爱玲, 张建中, 黄永清, 郭凤英. 胃癌组织中碱性成纤维细胞生长因子-2及其受体表达的研究. *宁夏医学院学报* 2004; 26: 88-91
- 22 覃山羽, 姜海行, 李信, 唐国都, 陈罡, 雷琳. 胃癌及癌前病变中bFGF FGFR-2及Hpa的表达及其意义. *中国实用内科杂志* 2007; 17: 1379-1383
- 23 李琳琳, 刘云鹏, 侯柯佐, 曲秀娟, 李强, 董茜, 宋娜. FGFR2和c-Cbl在胃癌组织中的表达及其临床意义. *中国癌症杂志* 2009; 19: 609-614
- 24 Hattori Y, Itoh H, Uchino S, Hosokawa K, Ochiai A, Ino Y, Ishii H, Sakamoto H, Yamaguchi N, Yanagihara K, Hirohashi S, Sugimura T, Terada M. Immunohistochemical detection of K-sam protein in stomach cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1373-1381
- 25 Zhao WM, Wang L, Park H, Chhim S, Tanphanich M, Yashiro M, Kim KJ. Monoclonal antibodies to fibroblast growth factor receptor 2 effectively inhibit growth of gastric tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5750-5758
- 26 Yashiro M, Shinto O, Nakamura K, Tendo M, Matsuoka T, Matsuzaki T, Kaizaki R, Miwa A, Hirakawa K. Synergistic antitumor effects of FGFR2 inhibitor with 5-fluorouracil on scirrhous gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 126: 1004-1016
- 27 Kim HK, Choi IJ, Kim CG, Kim HS, Oshima A, Yamada Y, Arao T, Nishio K, Michalowski A, Green JE. Three-gene predictor of clinical outcome for gastric cancer patients treated with chemotherapy. *Pharmacogenomics* 2010 Dec 21. [Epub ahead of print]
- 28 Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di Bacco A, Elbi C, Lutterbach B. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer Res* 2008; 68: 2340-2348
- 29 Takeda M, Arao T, Yokote H, Komatsu T, Yanagihara K, Sasaki H, Yamada Y, Tamura T, Fukuoka K, Kimura H, Saijo N, Nishio K. AZD2171 shows potent antitumor activity against gastric cancer over-expressing fibroblast growth factor receptor 2/keratinocyte growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3051-3057
- 30 Pan BS, Chan GK, Chenard M, Chi A, Davis LJ, Deshmukh SV, Gibbs JB, Gil S, Hang G, Hatch H, Jewell JP, Kariv I, Katz JD, Kunii K, Lu W, Lutterbach BA, Paweletz CP, Qu X, Reilly JF, Szwczak AA, Zeng Q, Kohl NE, Dinsmore CJ. MK-2461, a novel multitargeted kinase inhibitor, preferentially inhibits the activated c-Met receptor. *Cancer Res* 2010; 70: 1524-1533
- 31 Asaoka Y, Tada M, Ikenoue T, Seto M, Imai M, Miyabayashi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Kudo Y, Mohri D, Isomura Y, Ijichi H, Tateishi K, Kanai F, Ogawa S, Omata M, Koike K. Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394: 1042-1046
- 32 Katoh M, Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1059-1064
- 33 Pardo OE, Wellbrock C, Khanzada UK, Aubert M, Arozarena I, Davidson S, Bowen F, Parker PJ, Filonenko VV, Gout IT, Sebire N, Marais R, Downward J, Seckl MJ. FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKCepsilon, B-Raf and S6K2. *EMBO J* 2006; 25: 3078-3088

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》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)

乙型肝炎病毒基因型

陈秀丽, 孙殿兴, 张晓岚

陈秀丽, 孙殿兴, 中国人民解放军白求恩国际和平医院 河北省石家庄市 050082

陈秀丽, 张晓岚, 河北医科大学第二医院消化科 河北省消化病重点实验室 河北省消化病研究所 河北省石家庄市 050000

国家“十一五”“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-011

作者贡献分布: 资料分析和论文撰写以及文献检索由陈秀丽完成; 选题和审校由孙殿兴与张晓岚完成。

通讯作者: 孙殿兴, 主任医师, 050082, 河北省石家庄市, 中国人民解放军白求恩国际和平医院. sundianxing@hotmail.com
电话: 0311-87978434

收稿日期: 2010-10-28 修回日期: 2011-01-14

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-08

Hepatitis B virus genotypes

Xiu-Li Chen, Dian-Xing Sun, Xiao-Lan Zhang

Xiu-Li Chen, Dian-Xing Sun, Bethune International Peace Hospital of Chinese PLA, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Xiu-Li Chen, Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Supported by: the National Science and Technology Key Project on “Major Infectious Diseases such as HIV/AIDS, Viral Hepatitis Prevention and Treatment”, No. 2008ZX10002-011

Correspondence to: Dian-Xing Sun, Bethune International Peace Hospital of Chinese PLA, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China. sundianxing@hotmail.com

Received: 2010-10-28 Revised: 2011-01-14

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) is a member of the hepadnavirus family and can lead to severe liver disease. HBV has a very high genetic variability. Currently, eight genotypes of HBV have been recognized, and most genotypes are now divided into subgenotypes with distinct virological and epidemiological properties. In addition, recombination among HBV genotypes increases the variability of HBV. This review summarizes current knowledge of the epidemiology of genetic variability in hepadnaviruses and, due to rapid progress in the field, updates several recent reviews on HBV genotypes and subgenotypes.

Key Words: Orthohepadnavirus; Avihepadnavirus; Hepatitis B virus; Genotype; Subgenotype; Recombinant genotype

binant genotype

Chen XL, Sun DX, Zhang XL. Hepatitis B virus genotypes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 389-393

摘要

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是嗜肝DNA病毒家族的重要成员,所引起的慢性乙型病毒性肝炎及肝衰竭、肝硬化、肝癌等是严重危害人民健康的疾病。据统计,目前我国有慢性乙型肝炎患者2 000万人,是我国现阶段最为突出的公共卫生问题之一。HBV遗传变异率很高,有8个基因型,由于独特的流行病学特性,多数又可以分为不同的基因亚型。另外DNA基因型的高度异质性使重组基因型也增加了。有研究证实HBV基因型与疾病进展关系密切。不同基因型HBV的流行病学特征不同,同时其临床感染特点和致病性也有差异。本文综述了本领域研究进展,包括HBV生物学特性、基因型与基因亚型、重组基因型、HBV基因型的流行病学特点以及HBV基因型与临床等方面。

关键词: 人嗜肝DNA病毒属; 禽嗜肝DNA病毒属; 乙型肝炎病毒; 基因型; 基因亚型; 重组基因型

陈秀丽, 孙殿兴, 张晓岚. 乙型肝炎病毒基因型. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 389-393

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/389.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是嗜肝DNA病毒属家族的一个典型成员。嗜肝DNA病毒属可感染哺乳动物和鸟类^[1]。人嗜肝DNA病毒有8个基因型,全基因组核苷酸序列的差异超过8%,分为A、B、C、D、E、F、G、H^[2-6]。由于DNA遗传多样性,又发现很多基因亚型^[7],其序列差异>4%^[8]。不同的HBV基因型和基因亚型有明显的地域分布特点,亚洲是HBsAg的高流行区,有证据显示HBV基因型影响疾病进展。近年来研究发现,HBV的基因型更能准确地反映原病毒株之间的自然异质性,基因型的研究成

■背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝DNA病毒属家族的一个典型成员。嗜肝DNA病毒属可感染哺乳动物和鸟类。人嗜肝DNA病毒有8个基因型,全基因组核苷酸序列的差异超过8%。由于DNA遗传多样性,又发现很多基因亚型,其序列差异>4%。

■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

■ 研发前沿

近年来研究发现, HBV的基因型更能准确地反映原型病毒株之间的自然异质性, 基因型的研究成为该研究领域的热点.

为该研究领域的热点. 以下作一综述.

1 生物学特性

HBV是部分双链的逆转录病毒, 由正负两条链组成. HBV的4个开放读码框(open reading frame, ORF)分别为P, X, C, S, 他们编码至少8种不同功能的蛋白. HBV基因组被克隆和测序后, 在旱獭(土拨鼠属)、地松鼠(掘地小栗鼠属)和北京鸭^[9]中发现了几种相关病毒. 5种新的肝DNA病毒从野生鸭和鹅中分离克隆. 序列比较显示其中4种与鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, DHBV)密切相关^[10].

灵长类是肝DNA病毒的天然宿主. 从类人猿分离HBV, 根据宿主命名HBVcpz(chimpanzee), -oru(orang-utan), -gor(gorilla)和-gbn(gibbon)^[11]. 禽嗜肝DNA病毒属与人HBV同源序列只有40%. 土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)和地松鼠肝炎病毒(ground squirrel hepatitis virus, GSHV)与人HBV最接近, 序列差异只有17%. 从GenBank中得知WHV和GSHV的基因组高度同源, 属同一基因型. 然而, 用简并引物序列测定几个野生旱獭WHV变异株, 显示高度变异^[12]. DHBV有两个基因型, 宿主范围窄而且有地理分布特征, 在世界上许多国家不同鸟类中可分离.

2 HBV基因型和基因亚型

根据HBV基因组核苷酸序列的差异超过8%时, 被定义为一个基因型, 分为A-H 8个基因型. 应用系统进化分析法可将HBV基因型进一步细分基因亚型, 基因亚型非同源序列>4%. 除E和G基因型之外, 其他HBV基因型均可分为不同亚型^[11,13-16]. A基因型分为A1(Aa)、A2(Ae)、A3亚型, 基因亚型A3是A型与HBV/E型的逆转录聚合酶区特异序列发生整合而成. B基因型分为B1、B2、B3、B4亚型, B1是B型在核心区核心基因与C基因型发生整合, 而B2未发生整合. B1又称为Bj, 而B2、B3、B4统归为Ba; 其中Bj主要分布在日本, Ba分布在亚洲其他地区. C型C1、C2、C3、C4亚型也有明确的地理分布^[17-19]. 还发现了不同基因型之间的重组或嵌合, 如基因型Ba就是由C基因型的部分基因型重组入B基因型. 在我国还发现了C基因型和D基因型的重组, 这些毒株在前S2/S发生重组, 使得依赖S基因的分析结果为基因型D而依赖前C/C和X基因的分析结果为基因型C. 基因型D分为D1、D2、D3、D4. 基因型F可分为F1、F2两型^[20]. 在B, C, F和H基因型, HBV

基因组全长3 215 nt. 由于删除和插入, 其他基因型基因组全长稍有差别, HBV G基因型3 248 nt. D基因型3 182 bp. 从非洲大猩猩、黑猩猩分离的肝DNA病毒为一个基因型HBVcpz. 从东南亚类人猿、长臂猿中分离的肝DNA病毒为两个基因型, 分别为HBVgbn(gibbon)和HBVoru(orang-utan).

3 双重感染和重组体

自从HBV基因分型以后, 就可检测出两个不同基因型的双重感染. 随后发现, HBV双重感染导致病情急性加重^[21]. 通过对干扰素应用观察, A基因型患者治疗后复发者, 转换为D基因型^[22]. A、B和C基因型三重感染在静脉药瘾者中约占0.9%^[23]. G基因型感染常常伴随A基因型. 同时感染2个基因型可能导致两株间遗传物质转录水平的转换^[24].

最近有两项研究报道, 87%的重组体是B/C和A/D. 其他的还包括A/B/C, A/C, A/E, A/G, C/D, C/F, C/G, C/U(U为不明基因型)和B/C/U重组体. A/C重组体发生率高于其他基因型. 重组断裂点邻近DR1区(nt 1 640-1 900), preS1/S2区(nt 3 150-100), C基因3'端(nt 2 330-2 450)和S基因3'端(nt 650-830)^[25,26]. 也有报道人与长臂猿HBV重组体, 和来自3个基因型的嵌合基因组^[27,28]. 一些HBV重组体形成一定地区内的主要流行株. B/C重组体有独特的地理分布, 非重组B基因型发现于日本(B1), B/C重组体可见于亚洲各地(B2), 但极少见于日本^[29]. C/D重组体见于西藏^[30].

HBV具有每天释放 10^{13} 病毒颗粒的高复制能力, 加之RNA多聚酶高错误率, 导致每个核苷酸单突变或双突变. Bowyer和Sim提出了镶嵌现象的假说, 指出大多数HBV基因型的标准基因组, 表现为不同HBV基因型小片段的组合, 进一步观察发现由许多不同特性的等位基因组成, 例如转录因子或抗原表位的结合部位. 这些部位一定的组合形成一个基因型, Fischer等^[31]的发现支持这个观点, 提出通过转录因子COUP-TF1的前基因组启动子及增强子II活化或阻遏, 形成特定的HBV基因型.

4 流行病学

不同基因型HBV存在典型的地域分布差异. A基因型主要分布在北欧、西欧、美国、印度及中部非洲; Aa主要分布于非洲, Ae主要分布于欧洲和美国. B型和C型明显分布于亚洲及太平洋地区, 如中国、日本、印度尼西亚、越南; B1主要

流行于日本、B2主要流行于中国和越南, B3主要流行于印度尼西亚, B4主要流行于越南. C1亚型主要见于我国南方地区、越南、缅甸和泰国; C2亚型主要分布于日本、韩国和我国北方等远东亚国家和地区; C3分布于太平洋地区的新西兰到波利尼西亚区域; C4发现于澳大利亚东北部的土著居民. D型分布在南欧、中东及印度; D1、D2、D3、D4广泛流行于欧洲、非洲和亚洲. D3亚型多见于亚洲(东印度)、南非和欧洲(塞尔维亚). HBV在非洲撒哈拉地区大多为A、E两个基因型, 有基因亚型和变异株. E基因型遗传变异低(1.75%), 基本分布于非洲西部, 起源于委内瑞拉和巴西, 在过去的200年中逐渐增加, 在美洲偶发^[32]. F型分布在美洲中部和南部及玻利尼西亚地区; G基因型更少见, 最初发现于美国、法国、德国和墨西哥, 然而, 地理起源还不明确^[33]. 迄今为止G基因型还没有分基因亚型. H型由F型转化而来, 主要分布在美国中部印第安人居住地区.

我国主要流行毒株为B和C基因型(分别为41%和53%), B型主要分布于南方, 而C型则多见于北方、中原和华东地区, 兼有少量A型和D型和B/C基因型混合感染. 在香港、广州等南部地区也有少部分D型分布. 另外, 华北、新疆地区有A型存在.

5 HBV基因型与肝脏病变

不同基因型HBV的流行病学特征有所不同, 同时其临床感染特点和致病性也有一定差异. 感染多种型别HBV与单一感染的临床过程也有所变化. 由于HBV基因型A、B、C、D的广泛流行和发现较早, HBV基因型的临床意义主要还是对这4个基因型研究的结果, 特别是主要流行于亚洲的B、C基因型. Kato等^[34]的研究结果表明, B基因型常表现出温和的肝纤维化, C基因型比B基因型更易引起浸润性的严重肝脏疾病, 并发展成为肝硬化和肝癌, C基因型的基本核心启动子(basal core promoter, BCP)突变率比B基因型高. 中国台湾和内地以及日本学者均得出类似结论, 认为C基因型感染往往有较高的HBeAg阳性率和较低的HBeAg转换率, 炎症活动频繁, 易于发生肝硬化和肝癌. Thakur等^[35]研究发现, D型更易发生多种严重肝病如肝硬化及肝细胞癌, 年轻患者肝癌的发生率高.

一项来自西班牙的研究发现, A基因型患者较D基因型患者有更高的生化学改善及HBV

DNA清除率. 另外, 该研究还首次发现A基因型较D基因型患者有更高的HBsAg转阴率. HBVAa感染者较HBVAe感染者HBV DNA血清滴度和HBeAg阳性率均较低, 但其导致的肝细胞癌的发生率较高. A型和F型经常天然存在拉米夫定天然耐药双突变: M552V和V528M, 有BCP突变者比无BCP突变者更易发生HCC^[36]. Sugauchi等^[37]认为Ba比Bj基本核心启动子T1762、A1764突变率更高, 同时具有更高的致病率. Ae型HBV急性感染慢性化率更高, 而暴发性肝炎转为慢性感染的患者在Bj型多见. D基因型感染者多无症状且HBeAg血清转换较早. F基因型感染者多为HBeAg阴性. A基因型或D基因型疫苗产生的保护性抗体对F型不具有免疫力. G基因型较少见, 对他的研究多集中在与A型混合感染上. 单纯G基因型感染后一般无临床症状, 仅血清ALT升高.

6 HBV基因型与抗病毒治疗

HBV感染人体后, 感染者具有不同的临床经过和预后, 对抗病毒治疗的应答也不尽相同, 可能与感染者的免疫状态和病毒的基因型有关. 对干扰素和核苷类似物的疗效与耐药性等特点与基因型的关系研究较多. 核苷类似物的研究主要集中于拉米夫定. Kao等^[38]报道, A和B基因型感染者对干扰素有较高的应答, 而D和C基因型感染者应答率较低, C基因型比B基因型更易发生BCP突变, 并且对干扰素治疗敏感性降低. 对于亚洲患者来说, 相比感染了C基因型HBV的患者, 感染了HBV B基因型患者可以在较早的年龄发生HBeAg血清转换, 较少发生严重肝脏疾病, 且对干扰素治疗有更好的反应^[39]. 对于欧美患者来说, 干扰素治疗后的疗效, HBV基因型C型较B型差, 基因型A型要比D型要好, HBeAg血清转换后有较高的HBV清除率, 且可获得较高的持续应答, 并有较好的组织学炎症改善^[40]. 国外学者研究发现在干扰素治疗复发的部分CHB患者中发生了HBV基因型的漂移, 主要有基因型C转变为基因型A. 在另一研究中发现, 急性乙型肝炎在HBeAg血清转换过程中, 出现C基因型转变为B基因型^[41]. 接受拉米夫定治疗的C基因型患者反应性以及停药后的抗病毒疗效持续时间均低于B基因型. Zöllner等^[42]报告, A基因型比D基因型发生拉米夫定耐药的危险性增加20倍. Kao等^[43]报告, 对31例HBeAg阳性的慢性肝炎进行拉米夫定治疗, B和C基因型的HBeAg血清转换率分别为23%和11%, 耐药发生率分别为15%和

■ 相关报道

Thakur等研究发现, D型更易发生多种严重肝病如肝硬化及肝细胞癌, 年轻患者肝癌的发生率高.

■同行评价
本文有一定的临
床参考意义。

22%。基因亚型Ba较Bj更易出现BCP变异。A基因型的YMDD变异明显高于B和C基因型。C基因型的YMDD变异高于基因型Ba和Bj。Bj基因型患者对拉米夫定的反应性高于Ba基因型患者。A基因型比D基因型患者更易发生拉米夫定耐药,而B、C基因型之间无明显差别^[44-46]。研究显示不同基因型对阿德福韦酯反应无差别。对恩替卡韦等药物与基因型的关系研究较少。

7 结论

HBV是感染哺乳动物和鸟类的原型病毒株。由于其高复制能力和逆转录酶高错配率,产生了人HBV的8种基因型,分为至少24种基因亚型,以后还会出现更多亚型以及重组体。当今,HBV基因型仍然是科学研究领域热点,在不远将来,有可能像HCV基因分型那样,对临床具有同样的指导意义。

8 参考文献

- Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 14-21
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- Devesa M, Pujol FH. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res* 2007; 127: 177-184
- Lusida MI, Nugrahaputra VE, Soetjipto, Handajani R, Nagano-Fujii M, Sasayama M, Utsumi T, Hotta H. Novel subgenotypes of hepatitis B virus genotypes C and D in Papua, Indonesia. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2160-2166
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10): 2575-2583
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289-309
- Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004; 14: 3-16
- Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 1980; 36: 829-836
- Guo H, Mason WS, Aldrich CE, Saputelli JR, Miller DS, Jilbert AR, Newbold JE. Identification and characterization of avihepadnaviruses isolated from exotic anseriformes maintained in captivity. *J Virol* 2005; 79: 2729-2742
- Sánchez LV, Maldonado M, Bastidas-Ramírez BE, Norder H, Panduro A. Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains. *J Med Virol* 2002; 68: 24-32
- Huang Z, Buckwold VE. A TaqMan PCR assay using degenerate primers for the quantitative detection of woodchuck hepatitis virus DNA of multiple genotypes. *Mol Cell Probes* 2005; 19: 282-289
- Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Kato T, Sugihara K, Hasegawa I, Sakurai M, Ito K, Ozasa A, Sakamoto Y, Arita I, El-Gohary A, Benoit A, Ogoundele-Akplogan SI, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M. Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin: phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6410-6415
- Huy TT, Ishikawa K, Ampofo W, Izumi T, Nakajima A, Ansah J, Tetteh JO, Nii-Trebi N, Aidoo S, Ofori-Adjei D, Sata T, Ushijima H, Abe K. Characteristics of hepatitis B virus in Ghana: full length genome sequences indicate the endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol* 2006; 78: 178-184
- Kramvis A, Restorp K, Norder H, Botha JF, Magnius LO, Kew MC. Full genome analysis of hepatitis B virus genotype E strains from South-Western Africa and Madagascar reveals low genetic variability. *J Med Virol* 2005; 77: 47-52
- Mulders MN, Venard V, Njayou M, Etorh AP, Bola Oyefolu AO, Kehinde MO, Muyembe Tamfum JJ, Nebie YK, Maiga I, Ammerlaan W, Fack F, Omilabu SA, Le Faou A, Muller CP. Low genetic diversity despite hyperendemicity of hepatitis B virus genotype E throughout West Africa. *J Infect Dis* 2004; 190: 400-408
- Banerjee A, Kurbanov F, Datta S, Chandra PK, Tanaka Y, Mizokami M, Chakravarty R. Phylogenetic relatedness and genetic diversity of hepatitis B virus isolates in Eastern India. *J Med Virol* 2006; 78: 1164-1174
- Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luen-grojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 2004; 85: 283-292
- Tanaka Y, Orito E, Yuen MF, Mukaide M, Sugauchi F, Ito K, Ozasa A, Sakamoto T, Kurbanov F, Lai CL, Mizokami M. Two subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotype C: A novel subtyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *Hepatol Res* 2005; 33: 216-224
- Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA, Shrestha SM, Gamutan MT, Khan M, Gish RG, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol* 2004; 85: 811-820
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Acute exacerbations of chronic hepatitis B are rarely associated with superinfection of hepatitis B virus. *Hepatology* 2001; 34: 817-823
- Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J Infect Dis* 2002; 186: 752-759
- Chen BF, Kao JH, Liu CJ, Chen DS, Chen PJ. Genotypic dominance and novel recombinations in HBV genotype B and C co-infected intravenous drug users. *J Med Virol* 2004; 73: 13-22
- Kato H, Orito E, Gish RG, Bzowej N, Newsom M, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M.

- kami M. Hepatitis B e antigen in sera from individuals infected with hepatitis B virus of genotype G. *Hepatology* 2002; 35: 922-929
- 25 Simmonds P, Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. *J Virol* 2005; 79: 15467-15476
- 26 Yang J, Xing K, Deng R, Wang J, Wang X. Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing. *J Gen Virol* 2006; 87: 2203-2215
- 27 Magiorkinis EN, Magiorkinis GN, Paraskevis DN, Hatzakis AE. Re-analysis of a human hepatitis B virus (HBV) isolate from an East African wild born Pan troglodytes schweinfurthii: evidence for interspecies recombination between HBV infecting chimpanzee and human. *Gene* 2005; 349: 165-171
- 28 Olinger CM, Venard V, Njyou M, Oyefolu AO, Maïga I, Kemp AJ, Omilabu SA, le Faou A, Muller CP. Phylogenetic analysis of the precore/core gene of hepatitis B virus genotypes E and A in West Africa: new subtypes, mixed infections and recombinations. *J Gen Virol* 2006; 87: 1163-1173
- 29 Zeng AZ, Deng H, Yang C, Xin XJ, Li QL, Guo JJ, Lu P, Huang AL. Hepatitis B virus genotype-associated variability in antiviral response to adefovir dipivoxil therapy in Chinese Han population. *Tohoku J Exp Med* 2008; 216: 205-211
- 30 Zeng G, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J, Tan D, Xiao F, Ma S, Li W, Luo K, Naoumov NV, Hou J. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. *J Viral Hepat* 2005; 12: 609-617
- 31 Fischer SF, Schmidt K, Fiedler N, Glebe D, Schüttler C, Sun J, Gerlich WH, Repp R, Schaefer S. Genotype-dependent activation or repression of HBV enhancer II by transcription factor COUP-TF1. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6054-6058
- 32 Andernach IE, Hübschen JM, Muller CP. Hepatitis B virus: the genotype E puzzle. *Rev Med Virol* 2009; 19: 231-240
- 33 Lindh M. HBV genotype G-an odd genotype of unknown origin. *J Clin Virol* 2005; 34: 315-316
- 34 Kato H, Orito E, Sugauchi F, Ueda R, Koshizaka T, Yanaka S, Gish RG, Kurbanov F, Ruzibakiev R, Kramvis A, Kew MC, Ahmad N, Khan M, Usuda S, Miyakawa Y, Mizokami M. Frequent coinfection with hepatitis B virus strains of distinct genotypes detected by hybridization with type-specific probes immobilized on a solid-phase support. *J Virol Methods* 2003; 110: 29-35
- 35 Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 165-170
- 36 Rodríguez-Nóvoa S, Gómez-Tato A, Aguilera-Guirao A, Castroagudín J, González-Quintela A, Garcia-Riestra C, Regueiro BJ. Hepatitis B virus genotyping based on cluster analysis of the region involved in lamivudine resistance. *J Virol Methods* 2004; 115: 9-17
- 37 Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Gish RG, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 2003; 124: 925-932
- 38 Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000; 33: 998-1002
- 39 Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1756-1762
- 40 Halfon P, Bourlière M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, Renou C, Pénaranda G, Saadoun D, Thibault V, Serpaggi J, Varastet M, Tainturier MH, Poynard T, Cacoub P. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat* 2006; 13: 329-335
- 41 Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. Evolution of Hepatitis B virus in an acute hepatitis B patient co-infected with genotypes B and C. *J Gen Virol* 2006; 87: 39-49
- 42 Zöllner B, Petersen J, Schröter M, Laufs R, Schoder V, Feucht HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet* 2001; 357: 934-935
- 43 Kao JH, Liu CJ, Chen DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002; 36: 303-304
- 44 Orito E, Fujiwara K, Tanaka Y, Yuen MF, Lai CL, Kato T, Sugauchi F, Kusakabe A, Sata M, Okanou T, Niitsuma H, Sakugawa H, Hasegawa I, Mizokami M. A case-control study of response to lamivudine therapy for 2 years in Japanese and Chinese patients chronically infected with hepatitis B virus of genotypes B_j, B_a and C. *Hepatol Res* 2006; 35: 127-134
- 45 Palumbo E. Hepatitis B genotypes and response to antiviral therapy: a review. *Am J Ther* 2007; 14: 306-309
- 46 Akuta N, Kumada H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 139-142

编辑 李薇 电编 何基才

肠黏膜细胞的紧密连接与肠壁通透性的研究进展

韦志坤, 程爱国

■背景资料

肠黏膜机械屏障主要由肠上皮细胞和相邻细胞间的连接构成, 位于肠上皮细胞间的连接方式有紧密连接、黏附连接、桥粒等, 其中紧密连接在维持肠壁通透性中作用最大. 紧密连接结构的破坏, 可导致肠壁通透性增高, 进而引起一系列病理生理变化.

韦志坤, 程爱国, 华北煤炭医学院附属医院骨外科 河北省唐山市 063000

作者贡献分布: 本文综述由韦志坤完成; 程爱国审校.

通讯作者: 韦志坤, 063000, 河北省唐山市, 华北煤炭医学院附属医院骨外科. ncmcweizhikun@163.com

收稿日期: 2010-11-29 修回日期: 2011-01-16

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-08

Advances in research of intestinal epithelial tight junctions and intestinal permeability

Zhi-Kun Wei, Ai-Guo Cheng

Zhi-Kun Wei, Ai-Guo Cheng, Department of Orthopedic Surgery, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Zhi-Kun Wei, Department of Orthopedic Surgery, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China. ncmcweizhikun@163.com

Received: 2010-11-29 Revised: 2011-01-16

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

Intestinal epithelial tight junctions are a structural basis for the intestinal barrier and play an important role in the regulation of intestinal permeability. Increased intestinal permeability caused by the destruction of tight junctions may result in bacterial translocation, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction syndrome. In this paper, we review the structure and function of tight junctions, factors affecting intestinal permeability, and measures for improving the dysfunction in intestinal permeability.

Key Words: Tight junction; Intestinal permeability; Cytokine

Wei ZK, Cheng AG. Advances in research of intestinal epithelial tight junctions and intestinal permeability. *Shi-jie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 394-399

摘要

肠黏膜细胞的紧密连接是构成肠黏膜屏障的重要结构基础, 在调节肠黏膜通透性中发挥着

重要的作用. 其结构的破坏, 可导致肠壁通透性增高, 引起细菌移位、全身炎症反应及多器官功能受损. 本文就肠黏膜紧密连接的结构和功能、与通透性的影响因素及改善措施进行了综述.

关键词: 紧密连接; 肠壁通透性; 细胞因子

韦志坤, 程爱国. 肠黏膜细胞的紧密连接与肠壁通透性的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(4): 394-399

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/394.asp>

0 引言

肠黏膜机械屏障主要由肠上皮细胞和相邻细胞间的连接构成, 位于肠上皮细胞间的连接方式有紧密连接、黏附连接、桥粒等, 其中紧密连接在维持肠壁通透性中作用最大^[1,2]. 近年来, 有关紧密连接与肠壁通透性的研究已成为热点. 下面就国内外有关的研究进展作一综述.

1 肠黏膜细胞紧密连接的构成与生理功能

1.1 紧密连接的构成 肠黏膜紧密连接存在于黏膜细胞膜的边缘和顶部, 控制着细胞间通道开放, 是细胞旁途径的第一道防线^[3,4]. 在正常生理情况下, 紧密连接是完整的. 但在病理情况下, 其结构和功能则被破坏, 如氧化应激、NO等均可损伤紧密连接, 引起肠壁通透性增高, 导致肠道细菌的移位^[5,6]. 紧密连接是由超过50种蛋白质组成的复合体, 结构十分复杂. 不同于黏附连接和桥粒(黏膜细胞间存在15-20 nm的间隔), 是通过吻合点封闭细胞间隙^[7]. 紧密连接主要由4种跨膜蛋白组成: occludin、claudins、junctional adhesion molecules (JAMs)和tricellulin. 他们与连接复合物蛋白(ZO-1、ZO-2、ZO-3、p130、7H6、Symplekin)、细胞骨架结构(微管、中丝、微丝)共同构成紧密连接复合物^[8]. 跨膜蛋白通过连接复合物蛋白与细胞骨架连接在一起.

occludin蛋白是紧密连接中最早发现的蛋白, 大小为60 000-82 000 Da, 作为膜蛋白的必要成分, 细胞外有两个环, 细胞内有一个短的N端

■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

和一个长的C端^[9,10]. occludin蛋白在紧密连接中的定位主要是由磷酸化水平决定的^[11]. 研究显示, occludin蛋白的胞外环型结构及跨膜结构主要参与肠壁通透性的调节^[12]. Der p1的变应原能够水解occludin蛋白, 导致紧密连接结构破坏, 细胞旁路通透性增高^[13].

JAMs属于免疫球蛋白超家族, 可表达于许多细胞^[14,15]. 与其细胞外区域相连的配体, 可调节细胞旁路通透性^[16]. JAM-A在紧密连接中的作用至关重要, Laukoetter等^[17]对JAM-A缺失大鼠的肠黏膜分析, 发现白细胞渗透及淋巴细胞聚集增多, 肠壁通透增高.

诸多紧密连接蛋白中, claudin蛋白尤为重要^[18]. 至今已发现有24种异构体^[19]. claudin蛋白之间的链锁连接形成了细胞旁路途径, 是影响紧密连接通透性的主要因素. 最近研究发现, 在相邻细胞间, claudin-claudin连接方式可以发生在同源蛋白之间, 也可以发生在非同源蛋白之间. 这些连接方式成为肠黏膜屏障组织特异性的基础^[20,21]. 除claudin-2、5、6表达增加能降低肠壁屏障功能外, 其他claudin蛋白的缺失能增加肠壁的通透性, 如claudin16蛋白突变可引起肾脏高镁血症^[22]. claudin3、4缺失导致细菌性毒素的产生^[23]. 最近研究发现, claudin蛋白可以根据物质的大小、电荷调节通透性^[24]. 大多数claudin蛋白是通过羧基端与ZO-1、ZO-2、ZO-3的C端连接在一起的^[25]. 在连接复合体下方是肌动蛋白环, 肌动蛋白丝将连接复合体与肌动蛋白环相连, 他的收缩可以调节肠壁的通透性^[26].

最重要的紧密连接调节通路是zonulin通路, 许多实验证实, zonulin的增加可致肠壁通透性增加^[27,28]. Drago等^[29]观察肠黏膜暴露于gliadin后, Caco-2细胞将zonulin释放于细胞表面. Zonulin通过与细胞表面的特殊受体结合, 活化了磷脂酶C, 然后水解磷脂酰纤维醇并释放纤维醇1、4、5磷酸盐以及甘油二酯. 细胞内Ca²⁺离子释放, PKC α 被激活, 活化的PKC α 靶蛋白的磷酸化, 随后聚合肌动蛋白G和肌动蛋白F. 这种聚合作用促使肌动蛋白丝重排, 细胞骨架被调整, 包括ZO-1在内的蛋白从连接复合体移位, 肠黏膜紧密连接松弛, 黏膜通透性增加^[29]. 一旦zonulin信号通路结束, 紧密连接又重新稳固^[8].

1.2 紧密连接的生理功能

1.2.1 通透性屏障功能: 紧密连接调节着离子和大分子物质的跨细胞旁路的被动转运(允许离子及小分子可溶性物质通过, 而不允许毒性大分

子及微生物通过).

1.2.2 维持细胞极性功能: 上皮细胞的顶部和基底膜之间由于蛋白质和脂质的构成不同, 紧密连接结构可将细胞顶部和基底部分为不同的液性空间. 在相邻细胞的外侧浆膜可见连续的融合点, 即紧密连接线, 这些融合点可限制细胞的不同液性空间脂质和完整膜蛋白的自由扩散. 有研究学者认为, occludin参与该功能的形成与调控, Ebnet等^[30]认为, 细胞极性的形成与JAM及极性蛋白PAR-3有关.

2 肠黏膜细胞的紧密连接与肠壁通透性

紧密连接与肠上皮细胞共同构成肠道的选择性屏障, 紧密连接一旦受损, 肠上皮细胞间隙通透性就会增加, 细菌或毒素借此进入体循环, 引起肠道感染, 甚至SIRS而危及生命. 以下就影响紧密连接及肠壁通透性的因素分别讨论.

2.1 细菌及毒素 大肠杆菌的致病性与肠上皮细胞间紧密连接结构的破坏有关. 国外学者通过实验发现, 致病性大肠杆菌(enteropathogenic *E. coli*, EPEC)可作用于紧密连接, 减少ZO-1、occludin和claudin-1蛋白的表达^[31,32]. 产气荚膜杆菌通过与claudin-3、4的胞外成分结合, 形成的复合物使得黏膜形成孔道, Ca²⁺内流, 触发宿主黏膜细胞凋亡, 导致通透性增高^[33]. 还可通过其肠毒素改变claudin蛋白的再分布, 调节紧密连接的结构, 从而影响紧密连接通透性. 霍乱弧菌通过释放毒素HA/P, 破坏occludin与ZO-1的连接, 导致细胞骨架结构的瓦解, 紧密连接破坏, 引起肠壁通透性增高^[34].

2.2 细胞因子和炎症介质 肠黏膜受损时, 可激发上皮细胞、巨噬细胞等产生大量炎症细胞因子作用于细胞间的紧密连接结构, 导致肠道屏障的破坏, 肠黏膜通透性升高. 如TNF- α 、INF- γ 可降低紧密连接蛋白ZO-1和occludin的表达, 导致紧密连接的瓦解, 增加黏膜通透性^[35,36]. 爆发性肝脏疾病时, TNF- α 增多, 通过下调occludin启动子表达, 从而使occludin蛋白表达下降, 致使肠壁通透性增加^[37]. INF- γ 通过微胞饮的方式重新排列紧密连接蛋白, 使occludin表达失控, 引起通透性的增加^[38]. 体外研究还发现, TNF- α 、INF- γ 在破坏紧密连接方面具有协同作用^[39]. IL-4和IL-13可导致细胞凋亡并破坏claudin-2从而增加黏膜通透性. 有研究学者通过实验证实了这点^[40,41]. 内毒素可使诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)合成增加, 导致NO产生过

■ 研发前沿

为了防治肠黏膜细胞紧密连接所导致的肠壁通透性的增加, 国内外学者从多方面研究, 正致力于找到更有效、更全面的治理措施, 这已成为近几年肠壁通透性研究的一大热点.

■相关报道

杨俊等报道乳酸菌可改善EIEC感染后Caco-2的细胞骨架结构,增加紧密连接相关蛋白表达,从而起到降低肠壁通透性,保护肠屏障的作用。

量, NO与过氧化物反应, 形成过氧化亚硝酸盐, 可通过氧化铁-硫中心、蛋白质羟基、破坏细胞肌动蛋白骨架、松解肠上皮细胞间的紧密连接等方式破坏肠上皮细胞屏障功能, 增加肠壁通透性^[42]。

2.3 其他因素 生冷食物和多脂饮食通过抑制紧密连接蛋白occludin、claudin-1、claudin-3以及JAM-1的表达增加肠壁的通透性^[43,44]。最近研究表明, 辣椒素也可以影响肠黏膜通透性, Tsukura等^[45]通过实验证实, 分子大小在(100-200 μm)的辣椒素对Caco-2细胞结构和功能有破坏作用, 导致肠壁通透性增加。Lammers等^[46]在探索gliadin与肠黏膜作用后引起肠壁功能障碍的机制时, 发现gliadin与CXCR-3结合形成复合物并将其与MyD88联系在一起, 增加zonulin的释放从而增加肠壁的通透性。热休克蛋白可改善温度增高对肠壁通透性的影响, 其可能的机制是热休克蛋白对occludin蛋白的表达调控作用^[47]。另外, 用乙醛干预的细胞增殖后, 肠壁通透性增加, 可能与ZO-1络氨酸磷酸化有关^[48]。

3 改善肠黏膜细胞的紧密连接与肠壁通透性的措施

近些年来, 关于防治紧密连接破坏所致的肠壁通透性增加方法学的研究包括营养支持、抗氧化剂、益生菌、中草药等。

3.1 营养支持 谷氨酰胺(Gln)是肠道黏膜细胞代谢所必须的物质, 对维持肠道黏膜上皮结构的完整性起着重要的作用^[49]。Gln可直接或间接地影响肠道上皮细胞内的介质, 如cAMP和Ca²⁺, 以增加细胞间紧密连接程度、改变紧密连接对流动物质的选择性和降低乳糖跨紧密连接的弥散率。动物实验及临床研究均证实, Gln可有效维持肠道黏膜结构, 防止肠道通透性改变^[50,51]。但是van den Berg等^[52]在对极低体质量出生新生儿的实验中应用谷氨酸盐并不能改善肠壁通透性的增高, 其机制还未清楚。另有研究发现, 精氨酸也可降低肠梗阻鼠血浆中内毒素含量, 减少肠道屏障紧密连接破坏和降低通透性, 减少内毒素对机体免疫功能的损害^[53-55]。

3.2 抗氧化自由基、细胞因子、炎症介质的治疗 一些细胞因子抗体可抑制iNOS表达, 减少NO生成。Francés等^[56]就报道TNF-α抗体可明显减少自由基生成, 一定程度上缓解了肠壁通透性。Akyürek等^[57]还试图应用血小板激活因子的拮抗剂-BN52021修复损伤肠黏膜, 以缓解肠上

皮增高的通透性。胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)是体内普遍存在的多肽, IGF-1改善肠壁通透性的机制可能是抑制了TNF-α及COX-2等细胞因子表达释放, 从而避免了NO增加。体内研究已发现给肝硬化大鼠补充IGF-1可以保护肠壁黏膜细胞、减少细菌易位^[58,59]。Hadjiyanni等^[60]通过对1-型糖尿病大鼠研究, 观察得出胰高血糖素样肽-2虽不能改变1-型糖尿病的发生但他可却降低肠壁通透性。研究显示前列腺素可以保护肠黏膜细胞之间紧密连接复合体, 阻挡肠道中有害物质穿透肠黏膜, 从而保护肠黏膜通透性^[61]。

3.3 益生菌 补充益生菌可恢复肠道微生物平衡, 抑制外源性致病菌过度增长, 促进肠上皮细胞黏蛋白及sIgA的分泌, 修复肠道黏膜屏障等作用。Resta-Lenert等^[62]研究发现, 乳酸菌和双歧杆菌通过维护细胞骨架和ZO-1蛋白及occludin表达, 对表皮生长因子刺激作用增强。修复EPEC引起的破坏作用。Puthenedam等^[63]也证实了这点。国内学者杨俊等^[64]报道, 乳酸菌应用于侵袭性大肠杆菌(enteroinvasive *E. coli*, EIEC)感染后的肠上皮细胞, 表现为细胞骨架表达增多, 紧密连接相关蛋白(claudin, occludin, JAM-1, ZO-1)表达亦增加, 肠壁通透性较感染后明显改善。White等^[65]报道乳酸杆菌属(LP299)在防止肠壁通透性的发展中起到了重要的作用, 但其机制尚不十分清楚。Anderson等^[66]最新研究发现, 乳酸菌MB452能够保护肠屏障, 其机制可能是提高了紧密连接相关基因的表达。

3.4 中草药 大黄、参附注射液、四君子汤等对内毒素的生物活性有一定的拮抗作用, 能消除氧自由基、减少TNF-α、IL-6、NO等细胞因子和炎症介质的合成与释放、阻止细菌及毒素进入血循环、维持跨膜电位差等保护黏膜屏障, 降低肠壁通透性^[67]。

3.5 锌、钙 Zhang等^[68]通过对断奶后仔猪应用锌后, 发现肠通透性降低, 且occludin和ZO-1表达增加, 说明锌降低肠壁通透性的主要机制可能是增加了occludin和ZO-1的表达, 从而能够解释在临床上应用锌可起到对腹泻的改善作用。Schepens等^[69]对炎症性肠病大鼠应用钙可改善肠黏膜屏障, 降低通透性。其机制可能与减少黏膜刺激有关。

3.6 其他途径 Temmesfeld-Wollbrück等^[70]通过实验证实肾上腺髓质素(adrenomedullin, AM)能够改善肠壁屏障功能和全身炎症反应, 其主要是

通过增加cAMP来保护肠屏障, 但是AM并不能引起Caco-2细胞cAMP的增加. PDE可降低cAMP的含量, 应用PDE抑制物也不能使AM引起的cAMP增加, 说明AM是通过独立的途径作用于Caco-2细胞的cAMP, 从而起到保护肠黏膜的作用的. Park等^[71]对神经节苷脂(ganglioside, GGS)研究显示, GGS饮食能够增加IL-10的含量, 减少NO及肠紧密连接蛋白的下降, 进而降低肠壁通透性. Suzuki等^[72]通过实验证实Kaempferol能促使肌动蛋白骨架与紧密连接蛋白结合, 从而提高肠屏障功能.

4 结论

肠上皮细胞的紧密连接在肠壁通透性中发挥着重要的作用, 许多因素影响紧密连接的结构, 导致肠壁通透性的增加, 从而引起细菌移位, 全身炎症反应等. 因而可从改善紧密连接的角度出发, 寻求改善肠壁通透性的方法, 为临床治疗提供新思路.

5 参考文献

- Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1213-C1228
- Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 55-70
- Terry S, Nie M, Matter K, Balda MS. Rho signaling and tight junction functions. *Physiology* (Bethesda) 2010; 25: 16-26
- 白爱平. 炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3187-3191
- Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP, Grieco A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1877-1887
- Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Louvros E, Vagianos CE, Nikolopoulou VN, Thomopoulos KC, Charonis A, Scopa CD. Intestinal epithelial cell proliferation, apoptosis and expression of tight junction proteins in patients with obstructive jaundice. *Eur J Clin Invest* 2011; 41: 117-125
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 285-293
- Visser J, Rozing J, Sapone A, Lammers K, Fasano A. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 195-205
- Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 660-669
- Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1206-1237
- Suzuki T, Elias BC, Seth A, Shen L, Turner JR, Giorgianni F, Desiderio D, Guntaka R, Rao R. PKC eta regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 61-66
- Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G250-G254
- Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, Stewart GA, Taylor GW, Garrod DR, Cannell MB, Robinson C. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 1999; 104: 123-133
- Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 2004; 117: 19-29
- Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 13): 2363-2374
- Bazzoni G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 525-530
- Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbitt BA, Williams IR, Koval M, Peatman E, Campbell JA, Dermody TS, Nusrat A, Parkos CA. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007; 204: 3067-3076
- Koval M. Claudins--key pieces in the tight junction puzzle. *Cell Commun Adhes* 2006; 13: 127-138
- Amasheh S, Fromm M, Günzel D. Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 201: 133-140
- Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 2004; 117: 2435-2447
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 631-645
- Cereijido M, Contreras RG, Flores-Benitez D, Flores-Maldonado C, Larre I, Ruiz A, Shoshani L. New diseases derived or associated with the tight junction. *Arch Med Res* 2007; 38: 465-478
- Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 1999; 147: 195-204
- Gupta IR, Ryan AK. Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet* 2010; 77: 314-325
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999; 147: 1351-1363
- Anderson JM. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci* 2001; 16: 126-130
- Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000; 113 Pt 24: 4435-4440
- Smecuol E, Sugai E, Niveloni S, Vázquez H, Pedreira S, Mazure R, Moreno ML, Label M, Mauriño E, Fasano A, Meddings J, Bai JC. Permeability,

■创新盘点

改善肠屏障功能的措施已有很多学者总结报道, 但从改善紧密连接的角度出发, 改善肠壁通透性的报道比较少, 本文就这方面结合近几年的研究进行了总结.

■应用要点

通过本文可以了解目前紧密连接与肠壁通透性的研究进展,为广大学者今后深入的研究提供帮助,为临床治疗提供新的思路。

- zonulin production, and enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 335-341
- 29 Drago S, El Asmar R, Di Piero M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, Thakar M, Iacono G, Carroccio A, D'Agate C, Not T, Zampini L, Catassi C, Fasano A. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 408-419
- 30 Ebnet K, Iden S, Gerke V, Suzuki A. Regulation of epithelial and endothelial junctions by PAR proteases. *Front Biosci* 2008; 13: 6520-6536
- 31 Muza-Moons MM, Schneeberger EE, Hecht GA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 2004; 6: 783-793
- 32 Shifflett DE, Clayburgh DR, Koutsouris A, Turner JR, Hecht GA. Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure in vivo. *Lab Invest* 2005; 85: 1308-1324
- 33 Chakrabarti G, McClane BA. The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell Microbiol* 2005; 7: 129-146
- 34 Wu Z, Nybom P, Magnusson KE. Distinct effects of *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol* 2000; 2: 11-17
- 35 Patrick DM, Leone AK, Shellenberger JJ, Dudowicz KA, King JM. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate epithelial barrier function in Madin-Darby canine kidney cells through mitogen activated protein kinase signaling. *BMC Physiol* 2006; 6: 2
- 36 崔巍, 刘沛. 肿瘤坏死因子受体1在暴发性肝衰竭肠黏膜屏障功能损害中的作用. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 542-543
- 37 崔巍, 马力, 闻颖, 刘沛. 暴发性肝衰竭时肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3008-3012
- 38 Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, Parkos CA, Nusrat A. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5040-5052
- 39 张强, 李秋荣, 王萌, 马健, 黎介寿. 肿瘤坏死因子和干扰素对肠上皮紧密连接的破坏作用. *肠内与肠外营养* 2006; 13: 335-337
- 40 Ceponis PJ, Botelho F, Richards CD, McKay DM. Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement. *J Biol Chem* 2000; 275: 29132-29137
- 41 Madden KB, Whitman L, Sullivan C, Gause WC, Urban JF Jr, Katona IM, Finkelman FD, Shea-Donohue T. Role of STAT6 and mast cells in IL-4- and IL-13-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. *J Immunol* 2002; 169: 4417-4422
- 42 Han X, Fink MP, Yang R, Delude RL. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* 2004; 21: 261-270
- 43 Polimeno L, Loiacono M, Pesetti B, Mallamaci R, Mastrodonato M, Azzarone A, Annoscia E, Gatti F, Amoroso A, Ventura MT. Anisakiasis, an underestimated infection: effect on intestinal permeability of Anisakis simplex-sensitized patients. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7: 809-814
- 44 Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7: 19
- 45 Tsukura Y, Mori M, Hirofani Y, Ikeda K, Amano F, Kato R, Ijiri Y, Tanaka K. Effects of capsaicin on cellular damage and monolayer permeability in human intestinal Caco-2 cells. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 1982-1986
- 46 Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 2008; 135: 194-204.e3
- 47 Dokladny K, Moseley PL, Ma TY. Physiologically relevant increase in temperature causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G204-G212
- 48 Hamada K, Shitara Y, Sekine S, Horie T. Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 1031-1038
- 49 宋怀宇, 杨建荣. 肝病患者肠黏膜屏障功能的变化及谷氨酰胺干预的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2798-2802
- 50 邓志云, 郭光华, 杨毅. 早期肠内谷氨酰胺补给对烫伤大鼠肠黏膜细胞紧密连接的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2031-2036
- 51 Fukatsu K, Kudsk KA, Zarzaur BL, Wu Y, Hanna MK, DeWitt RC. TPN decreases IL-4 and IL-10 mRNA expression in lipopolysaccharide stimulated intestinal lamina propria cells but glutamine supplementation preserves the expression. *Shock* 2001; 15: 318-322
- 52 van den Berg A, Fetter WP, Westerbeek EA, van der Vegt IM, van der Molen HR, van Elburg RM. The effect of glutamine-enriched enteral nutrition on intestinal permeability in very-low-birth-weight infants: a randomized controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 408-414
- 53 Fan J, Meng Q, Guo G, Xie Y, Li X, Xiu Y, Li T, Ma L. Effects of early enteral nutrition supplemented with arginine on intestinal mucosal immunity in severely burned mice. *Clin Nutr* 2010; 29: 124-130
- 54 Tan B, Yin Y, Kong X, Li P, Li X, Gao H, Li X, Huang R, Wu G. L-Arginine stimulates proliferation and prevents endotoxin-induced death of intestinal cells. *Amino Acids* 2010; 38: 1227-1235
- 55 Viana ML, Santos RG, Generoso SV, Arantes RM, Correia MI, Cardoso VN. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. *Nutrition* 2010; 26: 218-223
- 56 Francés R, Chiva M, Sánchez E, González-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, Muñoz C, Balanzó J, Pérez-Mateo M, Song XY, Guarner C, Such J. Bacterial translocation is downregulated by anti-

- TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol* 2007; 46: 797-803
- 57 Akyürek N, Salman B, İrkörücü O, Tezcaner T, Azili C, Erdem O, Akca G, Akin O, Tatlicioglu E. The effect of platelet activating factor antagonist BN 52021 on bacterial translocation and ICAM-I expression in experimental obstructive jaundice. *J Invest Surg* 2005; 18: 247-256
- 58 Lorenzo-Zúñiga V, Rodríguez-Ortigosa CM, Bartolí R, Martínez-Chantar ML, Martínez-Peralta L, Pardo A, Ojanguren I, Quiroga J, Planas R, Prieto J. Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut* 2006; 55: 1306-1312
- 59 Conchillo M, de Knecht RJ, Payeras M, Quiroga J, Sangro B, Herrero JL, Castilla-Cortazar I, Frystyk J, Flyvbjerg A, Yoshizawa C, Jansen PL, Scharschmidt B, Prieto J. Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol* 2005; 43: 630-636
- 60 Hadjiyanni I, Li KK, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-2 reduces intestinal permeability but does not modify the onset of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Endocrinology* 2009; 150: 592-599
- 61 Flores-Benitez D, Rincon-Heredia R, Razgado LF, Larre I, Cerejido M, Contreras RG. Control of tight junctional sealing: roles of epidermal growth factor and prostaglandin E2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297: C611-C620
- 62 Resta-Lenert S, Smitham J, Barrett KE. Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed *mdr1a*^{-/-} mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G153-G162
- 63 Puthenedam M, Williams PH, Lakshmi BS, Balakrishnan A. Modulation of tight junction barrier function by outer membrane proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*: role of F-actin and junctional adhesion molecule-1. *Cell Biol Int* 2007; 31: 836-844
- 64 杨俊, 张中伟, 秦环龙. 乳酸菌对肠上皮细胞侵袭性大肠杆菌损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3394-3399
- 65 White JS, Hoper M, Parks RW, Clements WD, Diamond T, Bengmark S. The probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* species 299 reduces intestinal permeability in experimental biliary obstruction. *Lett Appl Microbiol* 2006; 42: 19-23
- 66 Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol* 2010; 10: 316
- 67 张英谦, 刘建华, 李佃贵, 孙波. 大黄对脓毒症幼猪肠屏障保护作用及机制研究. *中华中医药杂志* 2007; 22: 843-847
- 68 Zhang B, Guo Y. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. *Br J Nutr* 2009; 102: 687-693
- 69 Schepens MA, Schonewille AJ, Vink C, van Schothorst EM, Kramer DJ, Hendriks T, Brummer RJ, Keijer J, van der Meer R, Bovee-Oudenhoven IM. Supplemental calcium attenuates the colitis-related increase in diarrhea, intestinal permeability, and extracellular matrix breakdown in HLA-B27 transgenic rats. *J Nutr* 2009; 139: 1525-1533
- 70 Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, zu Dohna C, Dorenberg M, Hocke AC, Martens H, Klar J, Sutorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin reduces intestinal epithelial permeability in vivo and in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G43-G51
- 71 Park EJ, Thomson AB, Clandinin MT. Protection of intestinal occludin tight junction protein by dietary gangliosides in lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 50: 321-328
- 72 Suzuki T, Tanabe S, Hara H. Kaempferol enhances intestinal barrier function through the cytoskeletal association and expression of tight junction proteins in Caco-2 cells. *J Nutr* 2011; 141: 87-94

■同行评价

本文科学性和可读性较好,能较好的反映目前领域的水平,具有很好的参考价值。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

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)

类泛素FAT10高表达肝癌细胞株Hep3B酵母双杂交cDNA文库的构建

余新, 刘天, 德洪波, 李国惠, 邵江华

■背景资料

泛素/类泛素系统为体内细胞蛋白降解的一个重要途径, 大量的研究表明泛素/类泛素系统功能失调将导致癌基因与抑癌基因的表达异常, 其在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用。

余新, 刘天, 德洪波, 李国惠, 邵江华, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省南昌市 330006
教育部科学技术研究重点基金资助项目, No. 208070
江西省教育厅科学技术研究重点基金资助项目, No. GJJ08003
江西省卫生厅一般基金资助项目, No. 2008411
作者贡献分布: 此课题由余新与邵江华设计; 研究过程由余新、刘天德及洪波操作完成; 数据分析由余新与李国惠完成; 本文撰写由余新与邵江华完成。
通讯作者: 邵江华, 教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院肝胆外科, shao5022@163.com
收稿日期: 2009-08-19 修回日期: 2010-03-29
接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2011-02-08

Construction and characterization of a yeast two-hybrid cDNA library from a FAT10-overexpressing human hepatic carcinoma cell line Hep3B

Xin Yu, Tian Liu, Hong-Bo De, Guo-Hui Li, Jiang-Hua Shao

Xin Yu, Tian Liu, Hong-Bo De, Guo-Hui Li, Jiang-Hua Shao, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the Key Scientific and Technological Project of the Ministry of Education of China, No. 208070; the Key Scientific and Technological Project of the Education Department of Jiangxi Province, No. GJJ08003; and the Foundation of the Health Department of Jiangxi Province, No. 2008411

Correspondence to: Professor Jiang-Hua Shao, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. shao5022@163.com

Received: 2009-08-19 Revised: 2010-03-29

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To construct a yeast two-hybrid cDNA library from a FAT10-overexpressing human hepatic carcinoma cell line Hep3B.

METHODS: Total RNA was prepared from Hep3B cells and used to purify poly (A) mRNA. Double-stranded cDNA was synthesized from the purified mRNA, ligated to *EcoR* I adaptor, digested with *EcoR* I/*Xho* I enzymes, and then

cloned into the pGADT7 vector. The recombinant vector was transformed into *E. coli* DH10B to obtain a primary cDNA library. The primary library was amplified and used to determine the size of cDNA inserts through enzyme digestion.

RESULTS: The primary cDNA library contained 1.03×10^6 independent clones. The titer of the cDNA library was estimated to be 2.50×10^6 cfu/mL, and that of the amplified library was 3.60×10^9 cfu/mL. The size of the inserts varied from 0.5 to 3.5 kb, with an average value of about 2.0 kb.

CONCLUSION: A yeast two-hybrid cDNA library has been successfully generated from FAT10-overexpressing Hep3B cells and can be used for future screening of proteins interacting with FAT10.

Key Words: Human hepatic carcinoma Hep3B cells; Yeast two-hybrid cDNA library; FAT10

Yu X, Liu T, De HB, Li GH, Shao JH. Construction and characterization of a yeast two-hybrid cDNA library from a FAT10-overexpressing human hepatic carcinoma cell line Hep3B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 400-403

摘要

目的: 构建类泛素FAT10高表达肝癌细胞株Hep3B的酵母双杂交cDNA文库。

方法: 从肝癌细胞Hep3B中提取总RNA, 分离mRNA. 利用反转录酶M-MLV与Oligo(dT) Anchor Primer合成1st Strand cDNA, 用*E. coli* DNA Polymerase与*E. coli* DNA Ligase将RNA链置换成DNA链, 合成2nd Strand cDNA. 将双链cDNA与*EcoR* I Adaptor连接, 然后用*EcoR* I/*Xho* I进行酶切. 使用Spin Column除去短链cDNA与pGADT7载体连接, 转化入*E. coli* DH10B, 建成原始文库. 然后对其进行扩增并随机挑取单菌落, 酶切鉴定重组子插入片段大小。

结果: 提取的总RNA降解少且分子完整; RNA纯度高, 相对分子质量为400-5000 bp; 成功

■同行评议者

王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

合成双链cDNA, 均符合建库要求; 库容量达到 1.03×10^6 克隆, 原始文库滴度为 2.50×10^9 cfu/L, 扩增后的文库滴度为 3.60×10^{12} cfu/L. 插入片段大小分布为0.5-3.5 kb, 平均长度约为2.0 kb.

结论: 所构建文库的各项指标均达到要求, 为筛选FAT10作用蛋白奠定了重要基础.

关键词: 人肝癌细胞Hep3B; 酵母双杂交cDNA文库; FAT10

余新, 刘天, 德洪波, 李国惠, 邵江华. 类泛素FAT10高表达肝癌细胞株Hep3B酵母双杂交cDNA文库的构建. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 400-403

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/400.asp>

0 引言

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是严重危害人类健康的恶性肿瘤, 其发生与发展是一个多步骤、多基因的参与过程. 泛素/类泛素系统为体内细胞蛋白降解的一个重要途径, 大量的研究表明泛素/类泛素系统功能失调将导致癌基因与抑癌基因的表达异常, 其在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用. 类泛素基因有着同泛素类似的结构域, 作为信号使者控制着多种细胞功能, 如细胞增殖、凋亡、细胞周期及DNA修复. 其功能的异常可导致许多疾病的产生, 包括肝癌. FAT10作为类泛素家族成员, 被发现肝癌等恶性肿瘤中表达增高, 而被认为在肝癌的形成中起着重要作用, 但具体作用机制尚不清楚. 本研究通过构建类泛素FAT10高表达肝癌细胞株Hep3B酵母双杂交cDNA文库, 为研究FAT10相互作用蛋白与FAT10基因的结构及功能奠定了重要基础.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株Hep3B购自中科院上海细胞库; 大肠杆菌DH10B为本实验室保存; 胎牛血清为Hyclone产品; DMEM培养基为Gibco产品; TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit、One Shot LA PCRTM Mix、RNAisoTM Plus、cDNA Library Construction Kit、OligotexTM-dT30<Super> mRNA Purification Kit、 λ -EcoT14 I Marker以及pHY Marker均为TaKaRa公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 各组细胞置于DMEM培养液(含100 mL/L胎牛血清), 在37 °C、50 mL/L CO₂条件下培养.

1.2.2 总RNA提取与鉴定: 按照RNAisoTM Plus操作手册说明书进行. 提取RNA 经1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定.

1.2.3 mRNA提取: 按照OligotexTM-dT30<Super> mRNA Purification Kit操作手册说明书进行. 将RNA、bind buffer及OligotexTM-dT30<Super>混合, 然后70 °C加热3 min, 室温放置10 min, 离心. 去除上清后加入350 μ L Wash Buffer, 将OligotexTM-dT30<Super>充分悬浮, 再加入至Spin Column Set的Column Cup中, 离心后加入wash buffer重悬, 重复离心, 最后用50 μ L 70 °C预热的DEPC H₂O充分悬浮OligotexTM-dT30<Super>, 离心, 重复2次后回收mRNA.

1.2.4 cDNA合成与文库构建: 根据mRNA浓度确定mRNA模板量. 按TaKaRa的cDNA Library Construction Kit使用手册进行. 利用反转录酶M-MLV与Oligo(dT) Anchor Primer合成1st Strand cDNA(1st Strand cDNA合成时使用5-methyl dCTP); *E. coli* RNase H使mRNA-1st Strand cDNA杂合体中的RNA形成Nick, 再用*E. coli* DNA Polymerase和*E. coli* DNA Ligase将RNA链置换成DNA链, 合成2nd Strand cDNA. T4 DNA Polymerase将双链cDNA末端平滑化再与*Eco*R I Adaptor连接, *Xho* I 酶切; Spin Column除去短链cDNA后与*Eco*R I/*Xho* I 酶切的pGADT7载体进行连接(Directional Cloning). Oligo(dT)Anchor Primer: 5'-(GA)10ACTAGTCTCGAG(T)18V-3'(V: A or C or G); *Eco*R I Adaptor序列: 5'-OH-AATTCGGCACGAGG-3', 3'-GCCGTGCTC-Cp-5'.

1.2.5 文库质量鉴定: 将原始文库分别稀释 10^{-3} 与 10^{-6} 倍, 称为A液与B液, 取1 μ L A液加到50 μ L的LB液体培养基中, 混匀; 取50 μ L与100 μ L的B液, 分别涂布于含100 mg/L氨苄青霉素的LB平板上, 室温吸收20 min, 37 °C培养过夜. 单菌落计数, 确定文库滴度, 公式如下: cfu/mL = A液平板上单菌落数 $\times 10^3 \times 10^3$, cfu/mL = (B液平板上单菌落数 \times 涂板体积) $\times 10^3 \times 10^3 \times 10^3$ 根据文库滴度, 估算进行文库扩增所需平板数. 从原始文库中取10 μ L菌液加到15 mL LB液体培养基中, 混匀; 分别取150 μ L菌液涂布于100个直径150 mm含100 mg/L氨苄青霉素的LB平板上. 室温吸收1 h, 37 °C培养18-20 h. 收集菌落加到500 mL LB甘油混合液中, 最后分装于10个50 mL离心管中, 即扩增文库. 将原始文库做1:10 000和1:1 000 000稀释, 转化宿主菌后铺平板, 测定扩增

■ 相关报道

Hipp等在研究FAT10作用机制中发现他同泛素一样, 通过标记底物而被特异性识别, 最后被降解, 但又不同于泛素的作用通路.

同行评价

本文选题较好,设计合理,结果可信,具有较好的参考价值.

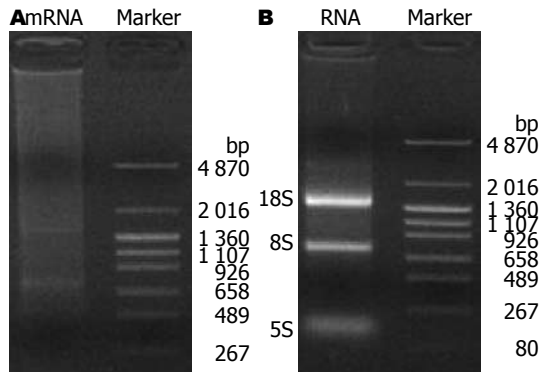


图1 电泳鉴定mRNA和RNA纯度. A: mRNA; B: RNA.

文库的滴度,其滴度计算,方法与原始文库滴度计算方法相同.

1.2.6 文库的PCR鉴定:随机挑选了16个菌落单克隆进行扩增,提取质粒作为模板,以引物正义:5'-GGAGTACCCATACGACGTACC-3',反义:5'-TATCTACGATTCATCTGCAGC-3'进行PCR扩增,共30个循环.用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测.

2 结果

2.1 总RNA与mRNA提取 所提总RNA经变性胶电泳显示2条明显的带:28S与18S,说明总RNA提取较好,降解少且分子完整. $RNA A_{260} = 0.120$,其浓度为0.96 g/L, $A_{280} = 0.063$, $A_{260}/A_{280} = 1.9$,表明所提RNA纯度高;电泳结果显示成功分离mRNA,相对分子质量为:400-5 000 bp,符合建库要求(图1).

2.2 cDNA合成质量鉴定结果 合成的双链cDNA,5 μ L PCR产物进行琼脂糖电泳分析,结果0.3-5 kb呈弥散状条带,中间有几条与组织特异性高丰度mRNA相对应的亮带,短片段去除后,弥散范围更加集中,成功合成双链cDNA,符合建库要求(图2).

2.3 文库质量鉴定 文库容量达到 1.03×10^6 克隆,原始文库滴度为 2.50×10^6 cfu/mL,扩增后的文库滴度为 3.60×10^9 cfu/mL.插入片段大小分布为0.5-3.5 kb,平均长度约为2.0 kb(图3).

3 讨论

HCC是我国乃至世界上常见且极具危害性的恶性肿瘤之一.研究表明,作为多步骤、多途径肿瘤发生的典型,肝癌的发生、发展是癌基因的激活与抑癌基因的失活共同作用结果.泛素/类泛素系统为体内细胞蛋白降解的一个重要途径,大量的研究表明泛素/类泛素系统功能失调将导致癌基因与抑癌基因的表达异常,其在肿瘤的

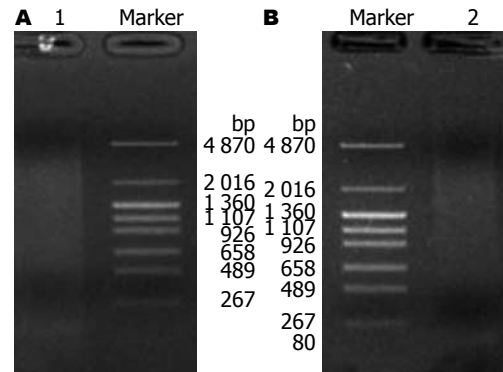


图2 合成的双链cDNA电泳图. 1: 合成的双链cDNA; 2: 短片段去除后的双链cDNA.

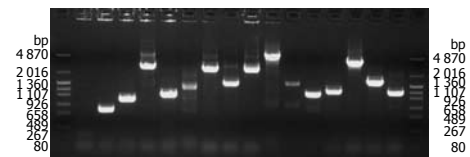


图3 插入片段检测电泳结果.

发生发展中起着重要作用^[1-3].

近年来随着对泛素的研究发现,真核细胞中也广泛存在着一些同泛素有着部分相同序列或功能相近的蛋白,他们同样发挥着转录后的修饰作用,这一类蛋白被称为类泛素家族,其主要分为两类:类泛素调节子(ubiquitin-like modifiers, UBLs)与泛素区域蛋白(ubiquitin-domain proteins, UDPs). FAT10属于泛素相关蛋白的生长集落,参与各种基本的细胞发展,包括信号转导、蛋白易位及细胞周期调控. Hipp等^[4]在研究FAT10作用机制中发现他同泛素一样,通过标记底物而被特异性识别,最后被降解,但又不同于泛素的作用通路.有研究表明^[5]FAT10能与人类纺锤体聚集检测点蛋白(MAD2)非共价结合,学者们利用这一特点,发现FAT10的过度表达会导致MAD2功能受到抑制,而MAD2蛋白负责在有丝分裂时保持纺锤体的完整性,他的功能受到抑制则引起染色体不稳定^[6,7],这正是许多肿瘤发生的重要特征. Lee等^[8]在肝癌、胃癌以及其他类型的肿瘤中发现FAT10的蛋白表达要远高于其癌旁和正常组织,指出FAT10可能在肝癌等恶性肿瘤的形成中起着重要作用. Canaan等^[9]通过对FAT10基因缺失小鼠的研究发现, FAT10的缺失会增加肿瘤凋亡的易感性. Zhang等^[10]通过对肝癌细胞的体外研究发现,在野生型p53(wild type p53, wtp53)缺失的Hep3B细胞中FAT10的蛋白表达量要高于含wtp53的HepG2与KB3-1细胞

中的FAT10蛋白表达量, 当在Hep3B细胞中导入外源性wtp53后会导致FAT10转录表达能力和启动子活性降低; 反之, 通过RNA干扰减低wtp53的表达量, 则会增强FAT10的启动子活性和蛋白表达. 因此, FAT10在肝癌等恶性肿瘤形成中的作用引起了许多研究者的极大兴趣. 为了研究FAT10的作用通路, 利用酵母双杂交技术, 以FAT10基因作为“诱饵”, 以肝癌细胞株Hep3B的cDNA文库作为“猎物”, 筛选出FAT10作用通路蛋白与同FAT10作用的底物蛋白.

本研究通过构建肝癌细胞株Hep3B的cDNA文库, 为下一步酵母双杂交筛选提供基础. 在本实验中, 用RNAiso™ Plus试剂与Oligotex™-dT30<Super>磁珠法分别分离提取总RNA和mRNA, 经过电泳证实所获取的mRNA相对分子质量分布范围较广, 无明显降解. 合成的双链cDNA经电泳分析也显示所合成的cDNA是合格的, 这为成功构建cDNA文库打下了良好基础. 一个好的cDNA文库的质量标准应是: 原始文库的重组子数 $>5 \times 10^5$ - 5×10^7 ; 插入的cDNA片段 ≥ 300 bp, 平均 >1000 bp. 此外, 根据Clare-Carbon公式, 要从文库中以99.0%的几率选到一低丰度克隆, 所要求的文库至少应包括 1.7×10^5 个克隆数. 本研究构建的肝癌细胞株Hep3B的cDNA库容量达到 1.03×10^6 克隆, 原始文库滴度为 2.50×10^6 cfu/mL, 扩增后的文库滴度为 3.60×10^9 cfu/mL. 插入片段大小分布为0.5-3.5 kb, 平均长度约为2.0 kb, 完全达到了构库要求.

4 参考文献

- 1 Hoeller D, Hecker CM, Dikic I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 776-788
- 2 Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 159-180
- 3 Kirkin V, Dikic I. Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 199-205
- 4 Hipp MS, Kalveram B, Raasi S, Groettrup M, Schmidtke G. FAT10, a ubiquitin-independent signal for proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 3483-3491
- 5 Liu YC, Pan J, Zhang C, Fan W, Collinge M, Bender JR, Weissman SM. A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 4313-4318
- 6 Ren J, Kan A, Leong SH, Ooi LL, Jeang KT, Chong SS, Kon OL, Lee CG. FAT10 plays a role in the regulation of chromosomal stability. *J Biol Chem* 2006; 281: 11413-11421
- 7 Lim CB, Zhang D, Lee CG. FAT10, a gene up-regulated in various cancers, is cell-cycle regulated. *Cell Div* 2006; 1: 20
- 8 Lee CG, Ren J, Cheong IS, Ban KH, Ooi LL, Yong Tan S, Kan A, Nuchprayoon I, Jin R, Lee KH, Choti M, Lee LA. Expression of the FAT10 gene is highly upregulated in hepatocellular carcinoma and other gastrointestinal and gynecological cancers. *Oncogene* 2003; 22: 2592-2603
- 9 Canaan A, Yu X, Booth CJ, Lian J, Lazar I, Gamfi SL, Castille K, Kohya N, Nakayama Y, Liu YC, Eynon E, Flavell R, Weissman SM. FAT10/diubiquitin-like protein-deficient mice exhibit minimal phenotypic differences. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 5180-5189
- 10 Zhang DW, Jeang KT, Lee CG. p53 negatively regulates the expression of FAT10, a gene upregulated in various cancers. *Oncogene* 2006; 25: 2318-2327

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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.

HBcAg特异性CTL在急性乙型肝炎与慢性乙型肝炎急性发作患者外周血中的数量差异

闫杰, 谢雯, 冯鑫, 蔺亚辉, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军

■背景资料

HBV特异性CTL应答在乙型肝炎发病机制中的作用已受到广泛关注。急性乙型肝炎的自限性经过与强烈的特异性CTL反应密切相关, 而CHB急性发作时多为非特异性CTL反应。

闫杰, 谢雯, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军, 首都医科大学附属北京地坛医院 北京市 100015
蔺亚辉, 中国医学科学院基础医学研究所 北京市 100005
首都医学发展科研基金资助项目, No. 2003-3066
作者贡献分布: 此课题由闫杰、谢雯、成军设计; 实验研究过程由冯鑫、蔺亚辉、王蓓蓓及肖江操作完成; 数据分析由闫杰、欧蔚妮及王艳斌完成; 本论文写作由闫杰与谢雯完成。
通讯作者: 谢雯, 主任医师, 100015, 北京朝阳区京顺东街8号, 首都医科大学附属北京地坛医院。xiewen6218@163.com
收稿日期: 2010-11-05 修回日期: 2011-01-12
接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-08

Difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific cytotoxic T cells between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B

Jie Yan, Wen Xie, Xin Feng, Ya-Hui Lin, Bei-Bei Wang, Jiang Xiao, Wei-Ni Ou, Yang-Bin Wang, Jun Cheng

Jie Yan, Wen Xie, Xin Feng, Bei-Bei Wang, Jiang Xiao, Wei-Ni Ou, Yang-Bin Wang, Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Ya-Hui Lin, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China
Supported by: the Capital Medical Science Foundation, No. 2003-3066

Correspondence to: Wen Xie, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, 8 East Jingshun Avenue, Chaoyang District, Beijing 100015, China. jieyan@bnn.cn
Received: 2010-11-05 Revised: 2011-01-12
Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To compare the difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B.

METHODS: Seventeen HLA-A2-positive patients with acute hepatitis B and 13 patients with acute episodes of chronic hepatitis B were included in the study. The frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs was determined by HLA-A2/peptide tetramer staining.

RESULTS: The frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs ranged from 0.071% to 31.610%. There was a significant difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B (9.601% ± 10.425% vs 0.259% ± 0.193%, $P = 0.002$).

CONCLUSION: There is a significant difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B. The frequency of peripheral blood HBcAg-specific CTLs might be a useful parameter to distinguish the above two types of illness.

Key Words: Acute hepatitis B; Chronic hepatitis B; Cytotoxic T lymphocyte; MHC class I-peptide tetramer

Yan J, Xie W, Feng X, Lin YH, Wang BB, Xiao J, Ou WN, Wang YB, Cheng J. Difference in the frequency of peripheral blood HBcAg-specific cytotoxic T cells between patients with acute hepatitis B and those with acute episodes of chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 404-406

摘要

目的: 研究急性乙型肝炎(AHB)与慢性乙型肝炎(CHB)急性发作患者外周血中HBcAg特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的数量差异。

方法: 选择HLA-A2阳性的AHB患者17例和CHB患者13例作为研究对象, 应用Tetramer流式细胞技术检测其外周血单个核细胞(PBMC)中的HBcAg特异性CTL细胞频率。

结果: 30份PBMC标本中测得HBcAg特异性CTL为0.071%-31.610%, 而阴性对照的健康者PBMC标本检测值仅为0.003%。AHB患者的HBcAg特异性CTL显著高于CHB患者(9.601% ± 10.425% vs 0.259% ± 0.193%, $P = 0.002$)。

结论: 外周血中HBcAg特异性CTL的数量在AHB与CHB急性发作患者之间存在显著性差异, 有望成为早期鉴别上述两种疾病状态的实验方法。

■同行评议者

陈建杰, 主任医师, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

关键词: 急性乙型肝炎; 慢性乙型肝炎; 细胞毒性T淋巴细胞; MHC-I-肽四聚体

闫杰, 谢雯, 冯鑫, 蔺亚辉, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军. HBcAg特异性CTL在急性乙型肝炎与慢性乙型肝炎急性发作患者外周血中的数量差异. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 404-406 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/404.asp>

0 引言

一般认为, 在免疫力正常的急性乙型肝炎(acute hepatitis B, AHB)患者体内存在适度的特异性细胞免疫水平; 这是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)急性感染得以清除的关键. 而在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者, 往往存在T淋巴细胞的低反应^[1,2], 使病毒清除相当困难; 现有研究结果提示, CHB患者体内的高病毒载量和高抗原量的抑制作用可能是其重要原因之一^[3]. 但如何检测针对HBV的特异性细胞免疫状态, 成为证实以上假说的技术障碍. 本文拟采用了MHC-I限制的HLA-A2病毒抗原表位的四聚体技术, 建立体外直接检测特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的方法, 并用该方法研究AHB与CHB急性发作患者外周血中HBcAg特异性CTL的数量差异.

1 材料和方法

1.1 材料 50例AHB患者和50例CHB急性发作患者为2006-2009年北京地坛医院肝病中心住院患者, 诊断符合2000年《病毒性肝炎防治方案》中AHB和CHB的诊断标准^[4]. 每例患者均保留入院次日晨起采集的空腹静脉全血标本(肝素抗凝)4 mL, 用于特异性CTL检测.

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞的分离: 将临床采集的全血标本在4 h内用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 于-80 °C保存, 待测.

1.2.2 HLA-A2型别鉴定: 应用顺序特异引物聚合酶链反应技术(polymerase chain reaction-sequence special primer, PCR-SSP)^[5]对全部病例进行筛选, 将鉴定获得的HLA-A2阳性患者的PBMC用于特异性CTL检测.

1.2.3 Tetramer流式细胞术检测HBcAg特异性CTL: HBcAg特异性HLA-肽四聚体(Tetramer)购自美国Sanquin生物技术有限公司, 其特异性肽段为HBVcore18-27短肽(氨基酸序列为FLPS-DFFPSV), 以藻红蛋白(PE)标记, 用于流式细胞术检测. 将每份PBMC标本融化复苏后, 用PE标记的Tetramer和APC标记的CD8抗体(BD公司产

品)双染色后应用流式细胞仪进行检测, 以淋巴细胞设门, 计数50 000个CD8+阳性细胞, 同时计数CD8+和Tetramer双阳性细胞为特异性CD8+细胞, 并以占总计数CD8+细胞的百分比表示. 为进行质量控制, 应用健康人PBMC标本作为阴性对照.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 治疗前后均数比较采用独立样本t检验, 使用SPSS10.0软件进行统计学分析.

2 结果

2.1 人口学及临床资料 50例AHB患者中鉴定获得HLA-A2型17例, 其中男12例, 女5例, 平均年龄32(19-46)岁; 50例CHB患者中鉴定获得HLA-A2型13例, 其中男9例, 女4例, 平均年龄36(23-44)岁. HBV血清标志物、HBV病毒载量及肝功能情况见表1.

2.2 流式细胞术检测效果 自上述AHB患者中筛得HLA-A2阳性17例, CHB患者为13例; 故本次实验共检测PBMC标本30份, 测得HBcAg特异性CTL范围为0.071%-31.610%; 而作为阴性对照的健康人PBMC标本检测值仅为0.003%(图1).

2.3 AHB与CHB急性发作患者外周血中HBcAg特异性CTL的数量 17例AHB患者的HBcAg特异性CTL(%)为9.601±10.425, 13例CHB患者为0.259±0.193; 二者存在显著性差异($P=0.002$).

3 讨论

AHB同CHB首次急性发作在临床表现、生化检查方面极为相似, 只有借助病史、流行病学史、既往史以及HBV血清学标志物和血清病毒载量的动态变化进行鉴别. 但两者的临床预后大不相同, 且CHB的抗病毒治疗时机, 尤其是应用干扰素 α 的治疗效果同急性发作关系密切, 因此早期鉴别对于CHB意义重大.

通常认为, 特异性CTL应答是机体清除肝细胞内HBV的主要途径; 但是不充分的特异性CTL应答不仅不能清除病毒, 反而却通过介导非特异性T淋巴细胞应答引起肝脏损害^[6-11]. 因此, 检测CHB患者特异性CTL水平可能是鉴别AHB与CHB急性发作的一种有效手段. 但是由于HBV感染者外周血中特异性CTL水平极低, 应用传统免疫学研究技术难以进行准确检测. 1992年Garboczi等^[12]建立了MHC-抗原肽四聚体技术, 并将该技术同流式细胞术相结合, 使得准确检测PBMC中极低细胞频率的特异性CTL成为可能. 我们选用已经证实为MHC I类分子关键结合序列的HBcAg18-27肽段^[13]与HLA-A2构建四聚体, 用于PBMC中HBV特异性CTL细胞频

■ 研发前沿

HBV体内清除很大程度上依赖于活化表位肽特异性CTL, CTL通过T细胞受体特异性识别病毒肽段并通过MHC-I类分子提呈引起感染细胞融解, 是宿主清除HBV的关键.

■ 相关报道

王洪等应用HLA-表位肽四聚体技术直接检测慢性HBV感染患者外周血中抗原特异性CTL, 发现: 在CHB患者肝炎突发时抗原特异性CTL数量明显增加; 陈小华等应用PTD-HBcAg融合蛋白免疫HBV转基因小鼠, 检测其在体内诱导特异性CTL及抑制HBV复制的能力, 为慢性乙型肝炎患者的免疫治疗提供了新的思路.

同行评价

本文能较好的反映我国在胃肠病临床和基础研究的先进水平,为鉴别AHB和CHB奠定实验基础。

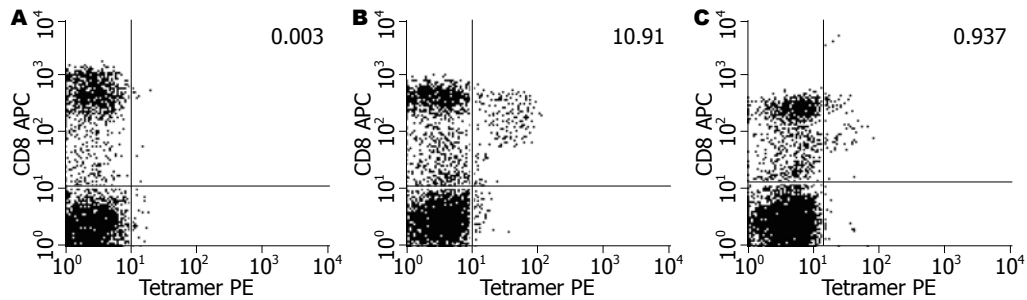


图1 各组HbCag特异性CTL检测结果. A: 健康人PBMC(tetramer/CD8 = 0.003%); B: AHB患者(tetramer/CD8 = 10.91%); C: CHB患者(tetramer/CD8 = 0.937%).

表1 AHB与CHB患者的人口学资料及临床情况

| | AHB(n = 17) | CHB(n = 13) | P值 |
|--|-----------------|-----------------|--------|
| 性别(男/女) | 12/5 | 9/4 | 0.936 |
| 年龄(岁) | 32.0 ± 12.2 | 36.0 ± 9.6 | 0.339 |
| ALT(U/L) | 583.00 ± 498.45 | 574.45 ± 473.15 | 0.962 |
| AST(U/L) | 490.46 ± 550.37 | 546.36 ± 443.07 | 0.767 |
| TBIL(μmol/L) | 227.63 ± 233.73 | 216.56 ± 177.26 | 0.888 |
| ALB(g/L) | 44.22 ± 6.87 | 46.96 ± 5.23 | 0.242 |
| eAg ⁺ /eAb ⁺ (n) | 5/12 | 9/4 | 0.030 |
| IgHBV DNA(Ig10) | 4.59 ± 1.84 | 7.04 ± 1.26 | <0.001 |

率的检测. 结果显示, 该方法可检测到细胞频率低至0.071%的HbCag特异性CTL, 而阴性对照(未受HBV感染的健康人PBMC标本)结果仅为0.003%, 表明四聚体技术联合流式细胞术检测CHB患者特异性CTL的灵敏度和特异度均较高, 适于低水平细胞频率的检测.

以往研究揭示, 急性乙型肝炎的自限性经过与强烈的特异性CTL反应密切相关^[2], 而CHB急性发作时多为非特异性CTL反应^[14], 故而难以清除HBV, 只会造成反复肝脏损伤^[15]. 本研究对17例AHB和13例CHB的PBMC进行Tetramer流式细胞术的检测结果显示, AHB患者外周血中的HbCag特异性CTL数量远高于CHB患者, 与既往研究结果一致, 表明该技术有望成为早期鉴别AHB与CHB急性发作的一种实验方法.

4 参考文献

- Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60
- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 215-229
- Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50
- 中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 谭建明, 唐孝达, 谢桐. 人类白细胞抗原-I类抗原的DNA分型与临床应用. *中华医学杂志* 1998; 78: 763-767
- 闫杰, 谢雯, 藺亚辉, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王

- 艳斌, 成军. 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者外周血HbCag特异性CTL的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1996-1999
- 张恒辉, 郭芳, 费然, 马慧, 王雪艳, 丛旭, 魏来, 陈红松. CD4+CD25+调节性T细胞在慢性乙型肝炎患者免疫发病机制中的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2225-2230
- 王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明. 慢性HBV感染肝炎患者外周血病毒抗原表位肽特异性CTL的数量研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 85-88
- 张静波, 陈思源, 杨志清, 李廷荣, 陈安, 吴玉章. 慢性乙型肝炎患者表位特异性CTL定量检测的评价. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1069-1072
- 王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明. 抗原表位特异性CTL在慢性HBV感染肝损伤和抗病毒中的作用研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1030-1033
- 陈小华, 潘庆春, 汤正好, 余永胜, 臧国庆. PTD-HBcAg融合蛋白诱导特异性CTL抑制转基因小鼠HBV复制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2972-2977
- Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3429-3433
- Penna A, Chisari FV, Bertolotti A, Missale G, Fowler P, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991; 174: 1565-1570
- 黄晓刚, 苏毅, 林世德, 龙骏, 陈应华, 刘士荣. 慢性HBV感染者外周血Vα24 NKT细胞数量变化及其与肝脏损害程度的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 601-605
- Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269-1280

大柴胡汤加减方治疗急性重症胰腺炎25例

梅礼强, 周世骥, 唐先斌, 岳红

梅礼强, 唐先斌, 岳红, 重庆市綦江县人民医院外科 重庆市 401400

周世骥, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 重庆市 400010

作者贡献分布: 此课题由梅礼强、周世骥及岳红设计; 研究过程由梅礼强、周世骥、唐先斌及岳红共同完成; 研究所用分析工具由岳红提供; 数据分析由梅礼强、周世骥、唐先斌及岳红完成; 本论文写作由梅礼强、周世骥及岳红完成。

通讯作者: 岳红, 副主任医师, 401400, 重庆市綦江县, 重庆市綦江县人民医院外科. zhoushiji2002@163.com

电话: 023-63693521

收稿日期: 2010-11-05 修回日期: 2010-12-30

接受日期: 2011-01-06 在线出版日期: 2011-02-08

Efficacy and safety of modified Dachaihu Decoction in the treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 25 cases

Li-Qiang Mei, Shi-Ji Zhou, Xian-Bing Tang, Hong Yue

Li-Qiang Mei, Xian-Bing Tang, Hong Yue, Department of Surgery, the People's Hospital of Qijiang County, Chongqing 401400, China

Shi-Ji Zhou, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China

Correspondence to: Hong Yue, Department of Surgery, the People's Hospital of Qijiang County, Chongqing 401400, China. zhoushiji2002@163.com

Received: 2010-11-05 Revised: 2010-12-30

Accepted: 2010-01-06 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of modified Dachaihu Decoction in the treatment of severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Forty-seven SAP patients were randomly divided into two groups: patients undergoing conventional therapy alone ($n = 22$) and those undergoing conventional therapy plus treatment with modified Dachaihu Decoction ($n = 25$). The rate of complications, duration of hospital stay, and hospitalization cost were compared between the two groups. Therapeutic effect was assessed using the APACHE II system.

RESULTS: Of the patients undergoing treatment with modified Dachaihu Decoction, 23 sur-

vived and 2 died. In contrast, 5 died among the patients undergoing conventional therapy alone. The APACHE II score of surviving patients was significantly lower in patients undergoing treatment with modified Dachaihu Decoction than in those undergoing conventional therapy alone (all $P < 0.05$). There were significant differences in the rate of complications, recovery time of blood amylase and white blood cells, duration of hospital stay, and hospitalization expense between the two groups (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Treatment with modified Dachaihu Decoction can reduce hospital stay, hospitalization cost, and the rate of complications in patients with SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Traditional Chinese medicine; Efficacy; Safety

Mei LQ, Zhou SJ, Tang XB, Yue H. Efficacy and safety of modified Dachaihu Decoction in the treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 25 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 407-409

摘要

目的: 探讨大柴胡汤加减方对急性重症胰腺炎(SAP)预后的影响及安全性。

方法: SPA患者47例随机分为两组, 中药+常规治疗组25例, 常规治疗组22例。观察两组在并发症、继发感染、死亡率、住院时间和住院费用的差异; 临床疗效评估采用APACHE II评分系统。

结果: 中药+常规治疗组25例患者中, 存活23例, 死亡2例; 常规治疗组22例患者中, 存活17例, 死亡5例; APACHE II评分在中药+常规治疗组中下降显著, 与常规治疗组在各时间点比较均具有统计学意义(均 $P < 0.05$); 中药+常规治疗组在继发感染并发症、血淀粉酶及白细胞恢复正常时间、住院时间和费用上均少于常规治疗组, 有显著性差异(均 $P < 0.05$)。

结论: 大柴胡汤加减治疗SAP疗效确切, 可明显减少并发症, 降低病死率, 缩短住院时间, 节省医疗费用。

背景资料

急性重症胰腺炎(SAP)是外科常见急腹症之一, 具有起病急、病因复杂, 可累及多脏器, 病情凶险, 并发症多, 病死率高等特点。中医中药辅助治疗SAP已逐渐成为治疗SAP的一个重要策略。

同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

■研发前沿

目前对中医中药治疗急性重症炎的具体作用机制、剂型及药物配伍等方面已成为研究的热点。

关键词: 急性重症胰腺; 中药; 疗效; 安全性

梅礼强, 周世骥, 唐先斌, 岳红. 大柴胡汤加减治疗急性重症胰腺炎25例. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 407-409
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/407.asp>

0 引言

急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是外科常见急腹症之一, 具有起病急、病因复杂, 可累及多脏器, 病情凶险, 并发症多, 病死率高等特点. 中医中药辅助治疗SAP已逐渐成为治疗SAP的一个重要的策略. 本文就大柴胡汤加减方治疗SAP在疗效及安全性方面进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 选自重庆市綦江县人民医院外科2007-01/2009-11收治并确诊的47例采取非手术治疗的SAP患者. 按随机数字表法将47例患者分成两组, 中药+常规治疗组25例, 其中男19例、女6例, 年龄34-61(平均 43.5 ± 11.1)岁; 常规治疗组22例, 其中男15例、女7例, 年龄29-63(平均 41.8 ± 12.2)岁. 所有病例均符合2001年中华医学会儿科学会“SAP临床诊断标准”腹部CT提示有胰腺坏死, APACHE II评分 ≥ 8 分^[1].

1.2 方法

1.2.1 中医中药治疗: 所有患者均进行持续胃肠减压, 按照中药配方: 柴胡15 g, 黄芩10 g, 木香10 g, 玄胡20 g, 白芍15 g, 生大黄(后下)15 g, 芒硝(冲服)9 g, 进行配伍, 水煎成500 mL, 从胃管中注入熬制好的中药4次/d, 80-100 mL/次, 然后夹闭胃管30 min后开放.

1.2.2 临床疗效评估: 采用APACHE II评分判断患者整体病情的变化. 治疗前、后每24 h动态进行APACHE II评分, 动态观察病情变化. 常规使用心电监护仪持续监测血压、心率、血氧饱和度. 准确记录每小时出入量, 定时监测电解质、血糖、血气分析、血常规、淀粉酶等临床指标的变化.

1.2.3 预后指标的观察: 观察给予中药治疗前后患者出现的并发症、白细胞、淀粉酶恢复正常的时间、平均住院时间及住院费用等.

统计学处理 各组数据使用SPSS13.0统计软件进行分析, 计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 t -test分析进行组间比较, 计数资料采用Chi-square test, 显著性水准为 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 临床疗效评估 中药+常规治疗组25例患者

中, 存活23例, 死亡2例; 常规治疗组22例患者中, 存活17例, 死亡5例. 中药+常规治疗组在行中医中药前APACHE II评分为 11.37 ± 4.57 . 中药开始治疗后24、48和72 h分别降至 10.3 ± 3.5 、 9.16 ± 3.16 和 8.0 ± 3.1 , 与治疗前比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 常规治疗组治疗前及治疗后24、48及72 h APACHE II评分分别为 12.7 ± 3.71 、 11.8 ± 3.23 、 11.1 ± 3.70 和 10.5 ± 4.05 , 变化无统计学意义(均 $P > 0.05$); 两组间在治疗后同一时间点APACHE II评分进行比较, 中药+常规治疗组较常规治疗组APACHE II评分明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表1).

2.2 中医中药治疗并发症 出现恶心者2例、腹泻者3例、腹痛者1例、无腹胀者, 未见药物过敏、肝损害等其他并发症.

2.3 其他指标检测 中药+常规治疗组在并发症、血淀粉酶及白细胞恢复正常时间、住院时间和费用上均少于常规治疗组(均 $P < 0.05$), 在统计学上有显著性差异; 在死亡率方面, 两组比较无统计学意义($P > 0.05$, 表2).

3 讨论

SAP为一全身性的炎症反应、胰腺弥漫性出血和组织坏死为特征的急性炎症. 本病起病急, 病情进展快, 发病机制复杂, 治疗方法上虽在不断改进, 但病死率仍高达40%左右^[2,3]. 近年来, “个体化治疗”已成共识. 大量的临床资料显示, 早期非手术治疗SAP, 并发症的发生率及死亡率均低于手术组^[4-6]. 在降低SAP并发症及死亡率方面, 大量的临床资料显示传统的中医中药治疗SAP能很好改善患者的预后^[7-9].

SAP病程早期往往具有中医阳明腑实证的特点, 属里实热证, 临床常采用通里攻下法治疗^[10]. 有效的通里攻下可促进肠蠕动, 减少腹胀, 改善心肺功能. 对肠源性内毒素有直接清除作用. 对肠机械屏障、免疫屏障和生物屏障有保护作用. 我们所采用的方剂出自《伤寒论》中大柴胡汤加减的处方, 大柴胡汤是一张治疗急腹症的有效经典方剂. 大柴胡汤配合西医治疗胰腺炎的临床报道较多, 且疗效满意. 杨丹等^[11]用大柴胡汤加减加以禁食等常规对症支持治疗急性胰腺炎64例, 其总有效率为90.6%, 与西药对照组比较, 虽无差异性, 但在改善症状、体征方面明显优于对照组. 林景松^[12]报道用大柴胡汤保留灌肠, 在不使用抗生素及抑制胃酸分泌和胰液分泌的药物的情况下, 酌情配合禁食, 胃肠减压及输液支持疗法治疗急性水肿型胰腺炎

■相关报道

杨丹等用大柴胡汤加减加以禁食等常规对症支持治疗急性胰腺炎64例, 其总有效率为90.6%, 与西药对照组比较, 虽无差异性, 但在改善症状、体征方面明显优于对照组.

表 1 两组患者APACHE II 评分比较 (分)

| 分组 | 治疗前 | 24 h | 48 h | 72 h |
|----------|--------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 常规治疗组 | 12.70 ± 3.71 | 11.8 ± 3.23 | 11.10 ± 3.70 | 10.5 ± 4.05 |
| 中药+常规治疗组 | 11.37 ± 4.57 | 10.3 ± 3.50 ^a | 9.16 ± 3.16 ^a | 8.0 ± 3.10 ^a |

^aP<0.05 vs 常规治疗组.

表 2 两组患者各项指标比较

| 分组 | 并发症 | 死亡 | 血淀粉酶恢复正常(d) | 白细胞恢复正常(d) | 平均住院费用(万元) | 平均住院时间(d) |
|----------|----------------|----|------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|
| 常规治疗组 | 11 | 5 | 7.1 ± 1.6 | 6.8 ± 1.8 | 3.65 ± 0.95 | 23 ± 6 |
| 中药+常规治疗组 | 5 ^a | 2 | 4.1 ± 1.1 ^a | 5.7 ± 0.9 ^a | 2.23 ± 0.77 ^a | 19 ± 8 ^a |

^aP<0.05 vs 常规治疗组.

23例, 其总有效率为95.6%, 优于单纯西医治疗. 张继良等^[13]用大柴胡汤随症状轻重加减药量, 再配合控制饮食、营养支持等疗法治疗急性胰腺炎52例, 其疗效与先前文献报道的相似.

本方剂以大黄作为主药, 药理研究证明, 大黄有增强肠蠕动、清除肠内毒物、改善微循环、解除奥迪氏括约肌痉挛降低胆胰管压力作用, 此外, 大黄对胰蛋白酶、胰淀粉及胰脂肪酶活性具有全面抑制作用^[14]. 辅以芒硝、黄芩, 加强清热通便之力, 再佐以白芍、玄胡, 行气消胀止痛. 不仅能较快地缓解临床症状, 而且能改善胰腺血液循环, 促进坏死组织及炎症吸收; 能促进肠蠕动, 减少肠道菌群移位, 防治肠源性感染, 减少内毒素吸收. 维持肠道内环境的稳定. 从而减少肠道功能衰竭及其继发的全身炎症反应和多脏器功能衰竭. 文中所报告的辅以中药治疗SAP在促进患者预后有明显的功效, 能缓解患者的腹痛、腹胀、降低死亡率, 缩短住院时间, 节省医疗费用等.

在给予中药治疗时机及安全性方面, 在发生SAP时, 胰腺对促胰液素和胆囊收缩素等促进胰腺外分泌酶的反应常明显下降. 因此, 胰腺分泌可能下降或受到抑制. 近年有人对2例曾行胰管外引流的志愿者进行观察, 口服清胰汤既不增加, 也不减少胰腺的分泌^[15]. 故认为不必担心中药口服或胃管注入会增加胰腺的外分泌, 临床采用中西医结合的方法应该是安全的. 我们所采用早期给予中药辅助治疗胰腺炎中可见, 早期给予中药治疗并未加重胰腺炎的症状, 相反在配伍的中药能明显抑制促胰液酶的释放, 对胰腺外分泌起着抑制作用.

中药在SAP治疗中的应用, 使SAP的并发症的发生率、死亡率等明显下降. 中药相对西药而言具有价格便宜、多靶点作用、不良反应少等诸多优势, 用于治疗AP有很好的前景, 值得进一步推广.

4 参考文献

- 张圣道. 重症急性胰腺炎诊治原则草案. 中华外科杂志 2001; 39: 963-964
- 张雷, 熊建琼, 李晓武, 尹昌林. 早期实施血液灌流治疗重症胰腺炎疗效观察. 实用临床医药杂志 2007; 11: 65-67
- Harper SJ, Cheslyn-Curtis S. Acute pancreatitis. *Ann Clin Biochem* 2010 [Epub ahead of print]
- 刘胜利, 陈峰, 杨德同, 王尔慧, 汤文浩, 李国强. 重症急性胰腺炎的非手术治疗. 中国普通外科杂志 1999; 8: 172-174
- 唐斌, 蒋传成, 黄汉民, 杨传宏, 舒远猛. 重症急性胰腺炎早期非手术治疗的再认识. 肝胆胰外科杂志 2002; 14: 209-210
- 李国津, 余加和, 沈德荣. 重症急性胰腺炎的非手术治疗. 韶关学院学报 2007; 28: 96-98
- 张敏, 朱德增. 中药治疗重症急性胰腺炎的规律. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2945-2948
- 张喜平, 王英. 中药治疗急性胰腺炎的主要机制与作用的实验研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 412-416
- 戴建忠, 范辉. 丹红对大鼠重症急性胰腺炎相关性心肌损害的防治作用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 969-975
- 汪浩, 郑海文, 赵之青, 陈佩. 中药治疗重症急性胰腺炎的临床疗效观察. 海南医学院学报 2009; 15: 440-442
- 杨丹, 杨莉云. 大柴胡汤治疗急性胰腺炎64例. 陕西中医 2003; 24: 781-782
- 林景松. 大柴胡汤保留灌肠治疗急性水肿型胰腺炎23例. 现代中西医结合杂志 2003; 12: 698-699
- 张继良, 王东君. 大柴胡汤治疗急性胰腺炎52例. 陕西中医 2006; 27: 31
- 关兴. 中药治疗急性胰腺炎机制的实验和临床研究进展. 贵阳中医学院学报 2009; 31: 80-83
- 田伏州, 黎冬暄. 急性胰腺炎重型化的预防. 中国实用外科杂志 1999; 19: 527

■应用要点

本文通过传统的中医中药联合西医非手术治疗SAP, 对探讨SAP的发病机制, 提高临床救治水平, 具有重要的理论指导和临床应用价值.

■同行评价

本文具有一定的临床参考价值, 但新颖性一般.

饮食因素与胰腺癌的相关性

孙丽红

■背景资料

胰腺癌是世界上第13位最常见的癌症,一般来说,在经济发达社会,胰腺癌的发病率和死亡率较高,胰腺癌的致死率极高.近年来随着我国人民生活水平的提高,饮食结构的变化,胰腺癌发病率也呈上升趋势.现在认为食物和营养因素与胰腺癌有一定相关性.

孙丽红, 上海中医药大学医学技术学院 上海市 201210
通讯作者: 孙丽红, 201210, 上海市浦东新区蔡伦路1200号, 上海中医药大学医学技术学院. slh_186@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-10-25 修回日期: 2010-12-21
接受日期: 2010-12-29 在线出版日期: 2011-02-08

Correlation between dietary factors and the risk of pancreatic cancer

Li-Hong Sun

Li-Hong Sun, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China
Correspondence to: Li-Hong Sun, School of Health Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cailun Avenue, Pudongxin District, Shanghai 201210, China. slh_186@yahoo.com.cn
Received: 2010-10-25 Revised: 2010-12-21
Accepted: 2010-12-29 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To explore the association between dietary factors and the risk of pancreatic cancer to provide a scientific basis for prevention of pancreatic cancer through diet and lifestyle changes.

METHODS: A case-control study involving 97 patients with pancreatic cancer and 194 controls was conducted. Controls were matched to cases for age and sex. All of them were interviewed with uniform questionnaires. Conditional logistic regression was used for univariate and multivariate analysis.

RESULTS: The development of pancreatic cancer was positively associated with intake of desserts ($OR = 4.706$), but negatively with intake of onion ($OR = 0.068$), yam ($OR = 0.301$), sweet potato ($OR = 0.178$), and fruit ($OR = 0.299$).

CONCLUSION: Dietary factors may play an important role in the development of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Dietary factors; Conditional logistic regression; Case-control study

Sun LH. Correlation between dietary factors and the risk

of pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 410-415

摘要

目的: 探讨多种饮食因素与胰腺癌危险性的关系,为该病防治提供科学依据.

方法: 2007-09/2009-10在上海部分门诊和医院确诊的97例胰腺癌病例纳入病例组,按年龄、性别配比选择未患肿瘤的人群194例纳入对照组,用统一的调查表以相同的询问方式和态度进行问卷调查.对获取的资料用条件logistic回归进行单因素和多因素分析.

结果: 经多因素分析结果显示:甜食($OR = 4.706$)与胰腺癌呈正相关.洋葱($OR = 0.068$)、山药($OR = 0.301$)、红薯($OR = 0.178$)和水果($OR = 0.299$)与胰腺癌呈负相关.

结论: 饮食因素在胰腺癌的发生过程中可能起着重要作用.

关键词: 胰腺癌; 饮食因素; 条件logistic回归; 病例-对照研究

孙丽红. 饮食因素与胰腺癌的相关性. *世界华人消化杂志* 2011; 19(4): 410-415

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/410.asp>

0 引言

胰腺癌由于部位特殊而难于早期发现,是目前世界上病死率较高的一种恶性肿瘤.目前已经明确吸烟可增加胰腺癌的危险性,蔬菜和水果可以减少胰腺癌的危险性,其他膳食因素与胰腺癌的关系尚不确定.为探讨饮食因素对胰腺癌的影响,我们开展了饮食营养因素与胰腺癌发病关系的病例对照研究.

1 材料和方法

1.1 材料 研究对象分为1个病例组和1个对照组.病例组均来自2007-09/2009-10在上海民生中医门诊部 and 上海曙光医院确诊的部分胰腺癌病例

■同行评议者

田文静, 副教授,
哈尔滨医科大学
公共卫生学院

97例,全部患者术前均经超声、CT和(或)MRI检查,诊断为胰腺癌,术后均经病理确诊.对照组按1:2配对选择与病例组相同地区、文化程度等与患者相当的,且按年龄、性别配比未患肿瘤的人群194例.病例组年龄为32-86(平均61±9.86157)岁;对照组年龄为33-84(平均61.9381±9.03226)岁.两组在年龄、性别方面均无显著性差异.

1.2 方法 此次问卷在广泛地查阅有关文献,征求营养与卫生学专家意见的基础上编制而成,并由指导小组反复修改.调查问卷的内容包括患者基本信息和饮食史2个部分.基本信息有性别、出生年月、肿瘤确诊时间、治疗时间及联系方式等内容.饮食史部分的调查采用频数法,要求被调查者回忆发病前10年的饮食情况.对每一位调查对象均采用统一的方案和饮食频度问卷进行询问,调查人员由经过培训且已掌握询问技巧的营养专业人员组成.研究对象的确立、现场实施、资料录入和分析等都进行了严格的质量控制以减少随机误差和偏倚.

统计学处理 每份调查问卷均由调查人员核对后,对调查资料进行统一编号,双份录入Epidata3.0并建立数据库.先进行单因素Logistic回归分析,筛选有统计学意义的变量后,进一步应用多因素条件Logistic回归模型分析.估计各因素比值比(OR)及95%可信区间(CI),单因素分析采用SPSS15.0软件,多因素分析采用SAS8.2软件完成.

2 结果

44个变量进行单因素1:2配比条件Logistic回归分析,筛选出17个有统计意义的相关变量(表1).其中可能的危险性因素有2个,包括甜食,水产品中的甲鱼;可能的保护性因素有15个,包括菌菇藻类,豆浆,蔬菜中的花菜、卷心菜、大蒜、洋葱、山药、西红柿、红薯、胡萝卜和萝卜,肉类中的鸭肉,水产品中的海鱼、虾和黄鳝.将单因素分析有显著性统计学意义的变量引入多因素条件Logistic回归模型,进一步筛选出可能的危险性因素1个,是甜食;可能的保护性因素有4个,包括洋葱、山药、红薯和水果(表2).

3 讨论

本文通过单因素和多因素回归分析均研究发现,甜食摄入多可能增加胰腺癌的危险性.

精制的谷物制品可能含有相当多的盐,也

可能作为脂肪和糖涂抹料的载体.在对谷物进行精加工生产的大米、面粉、面包、糖的过程中会失去其中的膳食纤维和一些可能有防癌作用的微量成分,如各种维生素和矿物质等.精制糖本身只能提供能量,因此膳食中谷类的精制程度本身便可能是一种癌的重要危险因素.

相关研究报道胰腺癌危险性增加与高碳水化合物(如白面包和精制糖)摄入量相关. Baghurst等^[1]通过4项病例-对照研究中有2项研究表明胰腺癌与精制糖或单糖或蔗糖有关. Lyon等^[2]研究报道胰腺癌危险性增加与添加糖的摄入量相关,尤其是妇女. Armstrong等^[3]进行的一项国际生态学研究表明,糖的摄入量是与女性胰腺癌死亡率最高度相关的环境变量.

精制糖摄入量对胰腺癌危险性作用的特殊生物学机制尚未提出,有人认为由于发生胰腺癌引起的膳食改变可能导致膳食中碳水化合物比例增高,但这只是推测^[4].

在流行病学研究中,一般没有区分所研究的含淀粉的食物的精制程度,因此在淀粉的精制程度对肿瘤危险性影响方面迄今还没有可靠的流行病学数据.本文对甜食与胰腺癌发病的关系进行了问卷调查,研究得出了甜食是胰腺癌发病的可能危险性因素,有一定的参考价值.当然,精制糖对肿瘤的影响,还需要结合大量的流行病学调查和实验研究.

本人认为在进一步深入研究谷类摄入与肿瘤危险性关系时,除了从食物角度来研究含淀粉多的谷类、含简单糖较多的甜食类等与胰腺癌的关系以外,考虑到全谷类、粗加工谷类和精制谷物在营养素种类和含量上的差别,以及膳食纤维在预防某些疾病中的重要作用.建议将谷类中的淀粉、简单糖和膳食纤维等作为独立的营养成分和分析因素,从更深更广的角度分析其各自与肿瘤之间的关系.并设法建立更好的定量估算这些独立成分摄入量的方法,并进一步加强对其作用机制(无论是增加还是减少危险性)的研究.

虽然关于简单糖、淀粉与肿瘤发生关系的研究报道有限,证据不一.但应该看到,过量摄入高糖类食物对肿瘤的危险性.为了长期维持人体健康,中国营养学会根据中国人的膳食结构和体质状况,推荐来自碳水化合物的热量占总热量的55%-65%为宜,而其中精制糖所提供的能量占总能量10%以下较合适.

本研究单因素分析得出,鸭肉是胰腺癌的

■ 研究前沿

对于饮食、生活方式与胰腺癌的关系,目前已经明确吸烟可增加胰腺癌的危险性,蔬菜和水果可以减少胰腺癌的危险性,其他膳食因素与胰腺癌的关系尚不确定.目前饮食与胰腺癌关系的研究中,在食物的种类上,肉类、蔬菜、水果、碳水化合物等是研究的热点和重点,而对于水产品类、菌菇藻类等对胰腺癌的影响及作用制尚未明确.

■ 相关报道

Zheng等的膳食分析发现,随着食肉量增加,胰腺癌的死亡率也增加,但对水果、蔬菜和谷类没有一致性的结果。

表 1 胰腺癌发病前10年饮食情况的1:2配比单因素Logistic回归分析

| 分析因素 | 变量名称 | β | P值 | OR | 95%CI |
|------|------|---------|-------|-------|-------------|
| 菌菇藻类 | V6 | -1.348 | 0.000 | 0.260 | 0.142-0.475 |
| 甜食 | V8 | 0.968 | 0.000 | 2.632 | 1.804-3.841 |
| 花菜 | V11 | -0.644 | 0.000 | 0.525 | 0.365-0.755 |
| 卷心菜 | V12 | -0.602 | 0.002 | 0.548 | 0.375-0.799 |
| 大蒜 | V13 | -1.008 | 0.000 | 0.365 | 0.258-0.516 |
| 洋葱 | V14 | -2.120 | 0.000 | 0.120 | 0.071-0.203 |
| 山药 | V15 | -1.416 | 0.000 | 0.243 | 0.159-0.370 |
| 西红柿 | V16 | -0.633 | 0.000 | 0.531 | 0.378-0.746 |
| 红薯 | V17 | -1.405 | 0.000 | 0.245 | 0.163-0.369 |
| 胡萝卜 | V18 | -1.181 | 0.000 | 0.307 | 0.209-0.451 |
| 萝卜 | V19 | -0.432 | 0.016 | 0.649 | 0.457-0.921 |
| 鸭肉 | V27 | -0.428 | 0.012 | 0.652 | 0.467-0.910 |
| 海鱼 | V31 | -0.367 | 0.021 | 0.693 | 0.508-0.946 |
| 虾 | V34 | -0.865 | 0.000 | 0.421 | 0.303-0.585 |
| 黄鳝 | V36 | -1.051 | 0.000 | 0.350 | 0.209-0.585 |
| 甲鱼 | V37 | 0.385 | 0.036 | 1.470 | 1.026-2.106 |
| 豆浆 | V93 | -0.381 | 0.013 | 0.683 | 0.505-0.924 |

表 2 胰腺癌发病前10年饮食情况1:2配比的多因素条件Logistic回归分析

| 分析因素 | 变量 | β | P值 | OR | 95%CI |
|------|-----|----------|--------|-------|--------------|
| 水果 | V7 | -1.20619 | 0.0110 | 0.299 | 0.118-0.759 |
| 甜食 | V8 | 1.54874 | 0.0001 | 4.706 | 2.130-10.397 |
| 洋葱 | V14 | -2.69399 | 0.0001 | 0.068 | 0.020-0.230 |
| 山药 | V15 | -1.20032 | 0.0074 | 0.301 | 0.125-0.725 |
| 红薯 | V17 | -1.72725 | 0.0004 | 0.178 | 0.068-0.464 |

可能保护性因素。近年来一些国家的胰腺癌发病率呈上升的趋势,可能与饮食结构的西化有关。发展中国家由于生活水平不断提高,饮食结构向高蛋白、高脂肪、高胆固醇、低纤维素方向改变,胰腺癌的发病率也在不断增高。

动物脂肪和饱和脂肪完全与含肉类和膳食胆固醇的食物及膳食模式相关。许多流行病学研究已证实,胰腺癌危险性增加与肉的摄入量高有关系。Ghadirian等^[5]研究显示,总脂肪(特别是饱和脂肪酸)、胆固醇以及过多的从脂肪中获得能量与胰腺癌发生呈正相关。实验证实高脂肪饮食可以引起鼠胰腺的生理学和形态学变化^[6]。Zheng等^[7]作的膳食分析发现,随着食肉量增加,胰腺癌的死亡率也增加,但对水果、蔬菜和谷类没有一致性的结果。畜肉类脂肪以饱和脂肪酸为主,主要成分是三酰甘油,少量卵磷脂和胆固醇。相对于畜肉来看,禽肉类,如鸭肉的饱和脂肪酸含量较少,不饱和脂肪酸含量多于

畜肉类。波兰的一项研究发现胰腺癌危险性大大降低与单不饱和和脂肪摄入量高相关^[8]。

饮食脂肪调节致癌的确切机制尚未阐明,有人认为其可能的机制为饮食脂肪影响前列腺素及白三烯的合成^[9,10]。也有研究者报道认为胰腺癌的发生可能与经过烹饪后的肉、鱼中含有致癌及具有诱变作用的杂环芳香胺有关,他们是烹饪过程中氨基酸和蛋白质高温分解的产物^[11]。

关于肉类与肿瘤关系的报道比较多,大多数结论认为肉类摄入量增加与肿瘤的发生关系密切,但也有部分研究认为脂肪酸的饱和程度与肿瘤的发生不相关。本人认为某些研究力图评价膳食中总的脂肪含量,或者对脂肪酸的种类进行了分类研究,而另一些研究则在问卷中只调查少数有关的动物性食物,因此这些研究方法本身都存在着一些局限性。在调查不同类型的膳食脂肪时,不同研究使用的研究方法不同,也使得对比分析比较困难,可能结果也存在一

些差异. 因此, 有关高脂饮食和肿瘤的关系还有待进一步的研究. 今后对脂肪与肿瘤关系的研究应能区别不同脂肪酸组成的膳食与肿瘤的关系, 以及区分使用不同加工方法生产的脂肪与肿瘤的关系, 并能对从食物中摄入的饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸(如omega-3系列和omega-6系列)等进行定量分析.

尽管脂肪或者肉类与肿瘤关系的结果还不完全一致, 但根据大多数的研究认为, 在膳食中, 我们要减少动物脂肪在膳食总能量中的比例, 使得总脂肪摄入量降低到总能量的30%以下. 减少脂肪的摄入, 对于预防一些慢性非传染性疾病, 如肿瘤、肥胖、高血脂和糖尿病等都有一定的积极意义.

本研究单因素分析发现黄鳝、河鱼、虾是胰腺癌的可能保护性因素; 甲鱼是胰腺癌的可能危险性因素. 有人提出活性氧自由基是细胞癌变的原始引发机制. 近年来, 医学新成果发现黄鳝补身、活络、祛毒作用对人体癌细胞有较好的抑制功能. 肖湘等^[12]研究发现黄鳝的黏液、血液、粗多糖对氧自由基有清除作用, 提示了黄鳝可能在抗肿瘤、抗衰老、降血脂等方面发挥作用.

有关水产品与肿瘤关系的研究极少, 这可能与水产品人们在饮食当中所占的比例相对较少的缘故, 所以对此类食物的研究和关注不多. 我们在本研究中做了一个尝试, 可能涉及的水产品种类还不够丰富. 今后希望在水产品摄入的种类和定量的研究上再进一步深入下去, 再对水产品对肿瘤影响的机制有进一步的探讨.

本研究单因素分析发现, 花菜、包心菜、大蒜、洋葱、山药、西红柿、红薯、胡萝卜和萝卜都是胰腺癌的可能保护性因素; 多因素分析发现水果、洋葱、山药和红薯是胰腺癌的可能保护性因素, 本研究结果显示蔬菜对胰腺癌可能具有保护性, 与多数研究结果相一致.

近年来自由基及脂质过氧化作用与疾病的关系引起人们的重视. 自由基反应及其产物过氧化脂质对生物膜、DNA等有损伤作用, 故有致癌活性. 研究证明营养性抗氧化剂维生素E、维生素C、微量元素硒及天然抗氧化酶类(如超氧化物歧化酶)等参与捕获或消除自由基反应, 超氧化物歧化酶能有效地阻断过氧化脂质的形成, 在体内构成抗脂质过氧化的重要防线^[9,13]. 抗氧化剂之间还有协同作用, 共同保护机体正常功能(包括免疫功能)的完成. 蔬菜和水果含有丰

富的抗氧化剂维生素C及天然抗氧化酶类, 多数研究认为增加新鲜蔬菜和水果摄入, 摄取营养均衡的饮食, 保持正常体质量, 可降低胰腺癌危险性^[14].

世界癌症研究基金会和美国癌症研究所联合出版的《食物、营养与癌症预防》一书中详细总结了饮食与胰腺癌关系的研究结果. 认为富含蔬菜和水果的饮食很可能减少胰腺癌的危险性, 植物性食品中的膳食纤维和维生素C可能有保护作用. 维生素类(类胡萝卜素、视黄醇、维生素E、番茄红素等)和矿物质(硒、钙等)与胰腺癌的关系研究不多且结果不一致^[15,16], 但大多数结果显示上述营养素对肿瘤具有保护性.

一些酚类化合物也存在于新鲜蔬菜和水果中. 已经证明酚类化合物能增强II相结合酶的活性, 还可能通过捕捉亚硝酸盐而抑制亚硝化反应, 从而提供两种可能的抗癌机制. 类黄酮类物质存在于蔬菜、水果、咖啡、茶等食物中, 槲皮黄酮是广泛存在于多种蔬菜和水果中的黄酮醇类, 西红柿、薯类、蚕豆以及洋葱等是槲皮黄酮最丰富的来源. 其他一些类黄酮类物质, 如柑橘黄酮存在于柑橘类水果中. 不同的类黄酮类物质有不同的抗氧化特性, 抗氧化性可能是类黄酮类物质的一种抗癌机制. Phang等^[17]研究发现某些类黄酮类物质可增强细胞通过生物泵将某些致癌物质由细胞排出的作用.

柑桔类水果、苹果含丰富的胡萝卜素、类黄酮、维生素C等抗癌物质. 苹果中含有的类黄酮是一种高效抗氧化剂, 他不但是最好的血管清理剂, 而且有抗癌效果. 香豆素存在于蔬菜、柑桔类水果中. 用蔬菜及柑桔类水果进行的人体研究和用香豆素类物质进行的动物实验得到的结果都提示, 此类生物活性物质具有防癌作用.

本研究发现红薯和山药是胰腺癌的可能保护性因素. 红薯不仅是健康食品, 还是祛病的良药. 红薯中含有丰富的β-胡萝卜素、维生素C和叶酸, β-胡萝卜素和维生素C的抗氧化作用有助于抵抗氧化应激对遗传物质脱氧核糖核酸的损伤, 有助于清除体内的自由基, 起一定的抗癌作用. 常吃红薯有助于维持人体的正常叶酸水平, 而体内叶酸含量过低会增加得癌症的风险. 近年来的研究表明, 山药水浸液体外实验显示, 山药具有促进干扰素生成和增加T淋巴细胞数的作用, 抑制肿瘤细胞增殖, 有一定的抗癌功效. 并可抑制唾液酸酶, 对突变细胞有产生抑制的倾向. 洋葱除了具有降血压, 抗动脉硬化, 减

■创新盘点

目前对于饮食与胰腺癌关系的研究结论不多, 膳食因素与胰腺癌的关系尚不确定. 本文通过饮食与胰腺癌关系的流行病学研究, 对甜食类、肉类、水产品类、菌菇藻类、蔬菜和水果类、豆类和奶类及其制品等对胰腺癌的影响做了深入详尽的研究, 并对这些饮食因素对胰腺癌的影响机制做了分析和探讨.

■应用要点

饮食因素、营养成分与胰腺癌的关系十分密切。本研究通过饮食因素与胰腺癌发生关系的流行病学探讨,为研究食物的防癌、抗癌作用提供了方向性的引导,并对从饮食的角度对防治肿瘤做更好的干预。

少血栓,降低血脂等作用外,又是良好的天然抗癌食品。经化验证实,洋葱与大蒜相似,都含有“蒜素”及硫化硒,能够抑制致癌物质亚硝胺的合成,还有促进吞噬细胞破坏癌细胞的功能。洋葱中还含有槲皮黄酮、谷胱甘肽和微量元素硒,对防癌抗癌也起重要作用。

很多病例-对照调查显示肉类摄入量与蔬菜水果消费量成反比,而肿瘤患者蔬菜水果消费量偏低,这与大多数的研究结果相一致。本人认为对进一步研究蔬菜、水果与肿瘤关系时,应特别注意估计摄入量的问题,即估计总的和列出个别品种的摄入量。鉴于测定某种特定维生素和植物化学物的摄入量有困难,以及在植物性食物中有许多其他微量成分混杂,因而应优先考虑研究开发更完备的膳食成分数据库及更好的测定生物样品的方法。

菌菇藻类与肿瘤发生关系的报道很少,本课题研究分析发现菌菇藻类是胰腺癌的可能保护性因素。

菌菇类含有丰富的蛋白质、碳水化合物,食用菌的营养价值高还在于含有多种维生素,尤其是水溶性维生素的B族维生素和维生素C,脂溶性维生素的维生素D含量也较高。近年来的药理研究表明,香菇等各种食用菌菇有增强人体免疫功能、抗癌、降血脂等功效。蘑菇不仅能控制癌细胞的发展,并能使已形成的癌细胞萎缩。金针菇含有蛋白质、脂肪、多种维生素、胡萝卜素、粗纤维和多种氨基酸等有益成分,含锌量也较高,可抑制癌细胞的生长,可用于各种早、中期癌症的治疗。猴头菇含有17种氨基酸、丰富的多糖体和多肽类物质,对胃癌、食管癌等消化系统癌症有特殊疗效。

海带、海藻、紫菜统属海藻类食物。海带具有化痰软坚散结功用,作为传统的治肿瘤药,常与海藻同用,以发挥协同作用,用治甲状腺、食管、胃、淋巴系统等多种良性、恶性肿瘤。海带、紫菜等还含有一种褐藻胶和硒元素,可降低乳腺癌、冠心病、心脏病的发生率。

可能是由于菌菇藻类在人们膳食中的比例很小、对其定量研究有一定困难的原因,对菌菇藻类与肿瘤关系的报道非常少。本文只是一个初步尝试,希望借此抛砖引玉,引起更多的学者来关注此类食物对健康的影响,并对其影响成分做深入的研究。

本课题单因素研究分析发现豆浆是胰腺癌的可能保护性因素。大豆中含有丰富的硒元素,

有一定的防癌作用。根据流行病学对20多个国家和地区调查发现,癌症发病率、死亡率高的国家和地区与其地域和食品中含硒较低有关^[18,19]。

硒抗癌机制的研究有了很大的发展和深入,但抗癌机制还未彻底澄清,现在认为可能是多因素作用于肿瘤的结果。总的来说,其抑制肿瘤发生和发展的可能机制是:(1)选择性抑制癌细胞;(2)对机体遗传物质的保护作用;(3)对机体代谢酶的影响;(4)增强机体免疫功能等^[20]。

主要来自实验研究的其他证据显示,豆类的某些组分能够预防实验性诱导的动物肿瘤,以及这些组分可能具有预防癌症的生物学特性。例如豆类中含有多种蛋白酶抑制剂、不饱和脂肪酸、异黄酮、皂甙类和酚类化合物等,对致癌过程和亚硝胺形成有抑制作用^[16]。大豆异黄酮和以黄酮类为配基的糖甙(主要包括黄豆甙和染料木甙)和大豆皂甙的保健功能,是近年人们关注的热点。体外和动物实验发现异黄酮有多种抗癌作用,包括抑制肿瘤形成和肿瘤细胞增殖^[22]。皂甙类存在于各种植物性食物中,大豆中含量特别高,约占干质量的5%。一些动物实验和体外研究的结果显示,皂甙类物质可抑制多种癌细胞的生长并降低其DNA合成速度。植酸也主要存在于谷物和豆类中,虽然实验证实植酸有抗癌性,但其机制还不很清楚,有可能是控制癌细胞的生长^[21]。大豆膳食纤维是天然抗癌剂和抗诱变剂,可以通过诱导人体免疫系统的活力,从而杀灭致癌性病毒而达到抗癌的目的。

豆类的资料大部分来自对人的流行病学研究,这类研究多半在西方人群中进行,他们的豆类摄入量少而且比较均匀。如果在所研究的人群中只有一小部分人的摄入量较高时,在统计学上能检出相关性的力度是有限的。本研究显示豆浆对肿瘤可能具有保护性,鉴于豆制品与肿瘤关系研究的有限性,豆制品的抗癌作用还有待于进一步的研究证实^[22]。根据豆类的营养性内涵,以及其作为优质蛋白质和可能预防肿瘤的生物学活性微量组分的丰富来源,并且在我国这样的一个以植物性食物为主的、豆类资源丰富的国家中,建议优先对其进行流行病学和实验研究,以仔细确定豆类的品种(如豆腐、其他豆制品)、摄入量及其与疾病的关系。并特别注意对与现有研究人群不同的、豆类摄入量较高而花样较多的人群的研究。

根据医学实验证实,酸奶含有多量乳酸菌,乳酸菌在肠道内繁殖,其代谢产物能通过诱导

产生干扰素和促细胞分裂剂, 促使免疫球蛋白抗体的产生, 从而活化巨噬细胞, 提高了人体的免疫力, 增强对癌症的抵抗能力. 本文研究结果认为牛奶的摄入与肿瘤的关系不大. 可能是由于生活饮食习惯的差异, 发达国家, 包括美国因为牛奶摄入量较大, 而中国人牛奶摄入量较少的缘故, 所以国内外研究难以得到一致的结论. 有关奶类及奶制品与肿瘤相关性的研究, 还有待进一步深入探讨.

毋庸置疑, 饮食因素、营养成分与胰腺癌的关系十分密切. 本研究通过饮食因素与胰腺癌发生关系的流行病学探讨, 为研究食物的防癌、抗癌作用提供了方向性的引导. 由于本调查主要采用回忆法, 因此不能排除回忆偏倚而使调查结果的准确度受到影响. 我们期望今后能从更广更深的角度对饮食因素与胰腺癌的关系进行探讨, 从饮食的角度对防治肿瘤做更好的干预.

4 参考文献

- 1 Baghurst PA, McMichael AJ, Slavotinek AH, Baghurst KI, Boyle P, Walker AM. A case-control study of diet and cancer of the pancreas. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 167-179
- 2 Lyon JL, Slattery ML, Mahoney AW, Robison LM. Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2: 513-518
- 3 Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 1975; 15: 617-631
- 4 Howe GR, Burch JD. Nutrition and pancreatic cancer. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 69-82
- 5 Ghadirian P, Boyle P, Simard A, Baillargeon J, Maisonneuve P, Perret C. Reported family aggregation of pancreatic cancer within a population-based case-control study in the Francophone community in Montreal, Canada. *Int J Pancreatol* 1991; 10: 183-196
- 6 Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT. A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 297-306
- 7 Zheng W, McLaughlin JK, Gridley G, Bjelke E, Schuman LM, Silverman DT, Wacholder S, Co-Chien HT, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. A cohort study of smoking, alcohol consumption, and dietary factors for pancreatic cancer (United States). *Cancer Causes Control* 1993; 4: 477-482
- 8 Zatonski W, Przewozniak K, Howe GR, Maisonneuve P, Walker AM, Boyle P. Nutritional factors and pancreatic cancer: a case-control study from south-west Poland. *Int J Cancer* 1991; 48: 390-394
- 9 Woutersen RA, Appel MJ, van Garderen-Hoetmer A, Wijnands MV. Dietary fat and carcinogenesis. *Mutat Res* 1999; 443: 111-127
- 10 Levin B. An overview of preventive strategies for pancreatic cancer. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 4: 193-196
- 11 邵晓冬, 郭晓钟. 胰腺癌相关流行病学研究进展. *胰腺病学* 2002; 2: 54, 56
- 12 肖湘, 韩雅莉, 朱琦琪. 黄鳍清除氧自由基作用的研究. *天然产物研究与开发* 2005; 17: 726-729
- 13 Appel MJ, Woutersen RA. Dietary fish oil (MaxEPA) enhances pancreatic carcinogenesis in azaserine-treated rats. *Br J Cancer* 1996; 73: 36-43
- 14 高玉堂. 胰腺癌流行病学研究进展. *实用肿瘤杂志* 2003; 18: 347-349
- 15 Michaud DS. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* 2004; 59: 99-111
- 16 陈君石, 闻芝梅. 食物、营养与癌症预防. 第1版, 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 186-211, 479
- 17 Phang JM, Poore CM, Lopaczynska J, Yeh GC. Flavonol-stimulated efflux of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in multidrug-resistant breast cancer cells. *Cancer Res* 1993; 53: 5977-5981
- 18 徐辉碧. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用. 第1版, 武汉: 华中理工大学出版社, 1994: 18
- 19 Navarro-Alarcón M, de la Serrana HL, Pérez-Valero V, López-Martínez C. Serum selenium levels as indicators of body status in cancer patients and their relationship with other nutritional and biochemical markers. *Sci Total Environ* 1998; 212: 195-202
- 20 汪永录, 周汉高, 顾公望. 肝癌研究进展. 第1版, 上海: 上海科技文献出版社, 1999: 316-330
- 21 Latinkić BV, Zeremski M, Lau LF. Elk-1 can recruit SRF to form a ternary complex upon the serum response element. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1345-1351
- 22 周晓彬, 汪求真, 张超英, 鲁晓晴. 中国人群饮食因素与胃癌关系的Meta分析. *中国临床康复* 2006; 10: 1-4

■同行评价
本文设计合理, 为胰腺癌的防治提供了一个新的思路.

编辑 李薇 电编 李薇

5-氨基水杨酸维持治疗溃疡性结肠炎114例

沈 娟, 李俊霞, 王化虹, 李懿璇, 田 雨, 刘新光

■背景资料

溃疡性结肠炎近年来发病呈上升趋势, 目前我国在治疗中多重视诱导缓解, 但往往忽视了维持缓解治疗的重要意义, 对选择5-ASA维持缓解治疗的疗程及剂量尚无一致意见。

沈娟, 李俊霞, 王化虹, 李懿璇, 田雨, 刘新光, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034

作者贡献分布: 文献检索、数据收集、论文撰写由沈娟、李俊霞及王化虹完成; 此课题由李俊霞与王化虹设计; 部分数据分析和文献检索由沈娟、李懿璇及田雨完成; 刘新光参与论文修改。

通讯作者: 王化虹, 100034, 北京市, 北京大学第一医院消化内科. wanghuahong@medmail.com.cn

收稿日期: 2010-11-01 修回日期: 2010-12-18

接受日期: 2010-12-29 在线出版日期: 2011-02-08

5-aminosalicylic acid as a maintenance therapy for ulcerative colitis: an analysis of 114 cases

Ji Shen, Jun-Xia Li, Hua-Hong Wang, Yi-Xuan Li, Yu Tian, Xin-Guang Liu

Ji Shen, Jun-Xia Li, Hua-Hong Wang, Yi-Xuan Li, Yu Tian, Xin-Guang Liu, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

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

Received: 2010-11-01 Revised: 2010-12-18

Accepted: 2010-12-29 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To evaluate the clinical significance of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) as a maintenance therapy for patients with ulcerative colitis (UC).

METHODS: The clinical data for 114 UC patients (including 64 males and 50 females, aged from 16 to 76 years old) treated from January 2004 to August 2010 were analyzed retrospectively.

RESULTS: Seventy-five patients (65.8%) underwent 5-ASA therapy for induction of remission. There was no correlation between sex and the relapse rate of UC. The relapse rate in patients who had a history of more than 5 years was higher than those with a shorter history (62.1% vs 35.7%, $P > 0.05$). The relapse rate was significantly lower in mild patients undergoing maintenance treatment with 5-ASA more than 2 g daily than in those given 5-ASA less than 2 g daily (10% vs 33.3%, $P < 0.05$), in patients with mild disease than in those with moderate or severe disease (24.6% vs 83.3%, 80.6%, both P

< 0.05), in patients with proctitis than in those without proctitis ($P < 0.05$), and in patients who achieved mucosal healing than in those who did not (4.8% vs 89.6%, $P < 0.05$). The relapse rate of UC gradually increased from the second year after remission.

CONCLUSION: Mucosal healing and disease activity of UC are the most important factors associated with the recurrence of the disease. 5-ASA is the first choice for patients with mild and moderate disease. UC patients undergoing maintenance treatment with 5-ASA more than 2 g daily for 2 years can reduce the recurrence of the disease.

Key Words: Ulcerative colitis; 5-aminosalicylic acid; Maintenance remission

Shen J, Li JX, Wang HH, Li YX, Tian Y, Liu XG. 5-aminosalicylic acid as a maintenance therapy for ulcerative colitis: an analysis of 114 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 416-420

摘要

目的: 评估5-氨基水杨酸(5-ASA)对溃疡性结肠炎(UC)缓解期患者维持治疗及影响UC复发的相关因素。

方法: 回顾性分析2004-01/2010-08在北京大学第一医院消化内科就诊的114例缓解期UC患者的临床资料, 纳入分析病例114例。其中, 男64例, 女50例, 年龄16-76岁。

结果: 选择应用5-ASA诱导缓解治疗病例75例(65.8%)。结果显示: (1)UC复发与性别无关; (2)病程>5年的UC患者复发率显著高于病程≤5年的UC患者(62.1% vs 35.7%, $P > 0.05$); (3)轻度UC患者5-ASA维持治疗剂量>2 g/d者复发率显著低于≤2 g/d者(10% vs 33.3%, $P < 0.05$); (4)轻度UC患者复发率显著低于中度和重度患者(24.6% vs 83.3%, 80.6%, $P < 0.05$); (5)直肠型UC患者复发率(19.2%)较低; (6)诱导缓解治疗达到黏膜愈合患者的复发率显著低于未达到黏膜愈合的患者(4.8% vs 89.6%, $P < 0.05$); (7)UC患者诱导缓解后第2年始复发

■同行评议者

房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所

率随时间逐年上升.

结论: 黏膜愈合及疾病活动程度是影响UC复发率的重要因素, 5-ASA是轻-中度UC维持缓解治疗的首选药物, 5-ASA维持治疗剂量 >2 g/d、疗程至少2年以上, 可有效降低UC的复发率.

关键词: 溃疡性结肠炎; 5-氨基水杨酸; 维持缓解

沈娟, 李俊霞, 王化虹, 李懿璇, 田雨, 刘新光. 5-氨基水杨酸维持治疗溃疡性结肠炎114例. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 416-420
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/416.asp

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性炎症性肠病, 我国UC的发病率明显低于西方国家, 近些年有逐渐上升的趋势. 氨基水杨酸制剂用于UC的治疗已有50余年的历史, 迄今已成为轻-中度UC诱导缓解与维持缓解治疗的一线药物^[1]. 临床上常用的氨基水杨酸制剂主要包括水杨酸偶氮磺胺吡啶(sulfasalazine, SASP)、5-氨基水杨酸(5-aminosalicylic acid, 5-ASA)及5-ASA前药奥柳氮与巴柳氮等. 然而, 目前对选择5-ASA维持缓解治疗的疗程及剂量尚无一致意见^[2], 国内有关文献报道也较少. 本研究通过对UC缓解期病例维持治疗的临床资料进行回顾性分析, 探讨UC维持缓解治疗的必要性及5-ASA在UC维持缓解治疗中的价值及影响UC复发的相关因素.

1 材料和方法

1.1 材料 以2004-01/2010-08在北京大学第一医院消化内科住院及门诊就诊的经诱导缓解治疗后获得病情缓解UC患者为研究对象.

1.2 方法

1.2.1 UC的诊断: 依据2007年我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见^[3], 根据结肠镜下病变分布表现分为直肠型、直乙结肠型、左半结肠型、区域性结肠型和全结肠型, 根据Mayo疾病活动指数^[3]将诱导缓解治疗前UC患者的基本严重程度分为轻度、中度和重度. 纳入分析患者标准: (1)在诱导缓解治疗前已行结肠镜检查, 具有UC诊断的病理学依据; (2)诱导缓解治疗后获得病情缓解, 应用5-ASA类药物维持治疗, 剔除自行改用中药或其他药物(包括氨基水杨酸前药)的患者; (3)定期随访(至少3-6 mo 1次), 随访

时间 ≥ 12 mo, 并有完整的临床资料和随访记录. 临床缓解的判定标准: 患者排便次数 <5 次/d, 无便血^[4]. UC复发标准: 诱导缓解后黏液血便重新出现. 临床症状缓解后复查内镜, 根据Mayo内镜下评分, 0-1分为黏膜愈合, 2-3分为未愈合^[5].

1.2.2 药物及给药途径: 患者应用5-ASA类药物包括口服制剂艾迪莎、颇得斯安、惠迪, 栓剂包括颇得斯安栓.

1.2.3 随访: 入选病例进行电话或门诊随访, 随访时间为1-7年. 随访内容包括服药情况、结肠镜检查、有无复发和并发症及其处理情况等.

统计学处理 采用SPSS14.0软件进行分析, 应用Kaplan-Meier法绘制生存曲线, 复发率比较采用Log rank检验, $P < 0.05$ 有统计学意义. 将对复发率有影响的因素进行COX回归分析.

2 结果

2.1 一般情况 纳入分析病例114例, 男64例, 女50例, 年龄16-76(平均 44.5 ± 14.8)岁. 其中轻度UC患者65例(57.0%)、中度18例(15.8%)、重度31例(27.2%). 病变分布直肠型26例(22.8%)、直乙结肠型26例(22.8%)、左半结肠型14例(12.3%)、区域性结肠型5例(4.4%)、全结肠型43例(37.7%). 病程6-444(平均 86.7 ± 81.6) mo.

2.2 诱导缓解治疗 经5-ASA诱导缓解75例(65.8%), 激素诱导缓解8例(7.0%), 激素联合5-ASA诱导缓解28例(24.6%), 环孢素A诱导缓解3例(2.6%). 2例5-ASA联合激素诱导缓解治疗的患者, 由于出现激素依赖, 经生物学制剂诱导缓解后口服5-ASA维持治疗.

2.3 维持缓解治疗 单独口服5-ASA制剂治疗76例(66.7%), 单独应用栓剂治疗10例(8.8%), 口服与直肠联合用药25例(21.9%). 3例环孢素A诱导缓解的患者, 口服5-ASA维持治疗.

2.4 影响UC复发的相关因素 分析性别、病程长短、病情分度、分型、既往是否服用过激素、是否达到内镜下黏膜愈合、5-ASA维持剂量对复发率的影响(表1).

2.4.1 性别: 复发与性别无关($P > 0.05$).

2.4.2 病程: 病程 >5 年的UC患者复发率(62.1%)明显高于病程 ≤ 5 年的UC患者(35.7%), 但无统计学意义($P > 0.05$).

2.4.3 疾病活动程度: 轻症患者复发率(24.6%)显著低于中等程度(83.3%)和重症患者(80.6%).

2.4.4 病变分布: 直肠型UC患者缓解期复发率(19.2%)低于直乙结肠型(50.0%)、左半结肠

■ 研究前沿
黏膜愈合对UC预后预测作用已成为目前国际上广泛关注的热点问题, 内镜下黏膜愈合作为UC的治疗目标得到越来越多的关注, 对临床治疗的指导作用是目前的研究热点.

■相关报道

Froslic等在一项超过5年的队列研究中发现,黏膜愈合对疾病的预后具有预测作用.

表 1 UC患者复发的可能影响因素

| 临床资料 | n | 复发n(%) | 维持缓解n(%) | P值 |
|-------------------|----|----------|----------|--------|
| 性别 | | | | |
| 男 | 64 | 32(50.0) | 32(50.0) | 0.7144 |
| 女 | 50 | 24(48.0) | 26(52.0) | |
| 病程(年) | | | | |
| >5 | 58 | 36(62.1) | 22(37.9) | 0.6211 |
| ≤5 | 56 | 20(35.7) | 36(64.3) | |
| 病情分度 | | | | |
| 重度 | 31 | 25(80.6) | 6(19.4) | |
| 中度 | 18 | 15(83.3) | 3(16.7) | |
| 轻度 | 65 | 16(24.6) | 49(75.4) | |
| 黏膜愈合 | | | | |
| 否 | 48 | 43(89.6) | 5(10.4) | 0.0000 |
| 是 | 21 | 1(4.8) | 20(95.2) | |
| 是否曾用激素 | | | | |
| 是 | 36 | 25(69.4) | 11(30.6) | 0.0083 |
| 否 | 78 | 31(39.7) | 47(60.3) | |
| 分型 | | | | |
| 直肠型 | 26 | 5(19.2) | 21(80.8) | |
| 直乙结肠型 | 26 | 13(50.0) | 13(50.0) | |
| 左半结肠型 | 14 | 6(42.9) | 8(57.1) | |
| 区域性结肠型 | 5 | 2(40.0) | 3(60.0) | |
| 全结肠型 | 43 | 30(69.8) | 13(30.2) | |
| 轻度患者口服药物剂量情况(g/d) | | | | |
| ≤2 | 36 | 12(33.3) | 24(66.7) | 0.038 |
| >2 | 20 | 2(10.0) | 18(90.0) | |

型(42.9%)、区域性结肠型(40.0%)和全结肠型(69.8%)。

2.4.5 黏膜愈合: 临床症状缓解后复查结肠镜的69例缓解期患者中, 21例达到内镜下黏膜愈合, 48例未达到黏膜愈合, 未达到黏膜愈合的患者随访期间仅5例始终维持缓解, 其余43例随访过程中出现复发. 经诱导缓解治疗达到黏膜愈合患者的复发率, 显著低于未达到黏膜愈合的患者(4.8% vs 89.6%, $P<0.05$).

2.4.6 应用激素诱导缓解: 在114例患者中, 诱导缓解期78例未曾应用激素, 其缓解期复发率显著低于应用激素的UC患者(39.7% vs 69.4%, $P<0.05$).

2.4.7 5-ASA维持治疗剂量: 病情分度为轻度的患者, 剔除单独应用栓剂的患者9例, 选择口服5-ASA维持治疗剂量 $\geq 2\text{g/d}$ 者复发率显著低于 $< 2\text{g/d}$ 者(10.0% vs 33.3%, $P<0.05$).

性别之间、病程 >5 年与 ≤ 5 年、中度UC患者与重度之间复发率的差别, 没有统计学意义(均 $P>0.05$). 病变分布、病情分度、疾病活动程

度、既往是否服用过激素、5-ASA维持治疗剂量、是否达到黏膜愈合等因素, 对UC复发率的影响有统计学意义(均 $P<0.05$). 经COX回归模型多因素分析, 采用向前逐步回归法, 筛查变量结果显示, 黏膜愈合及疾病活动程度与UC复发高度相关, 是影响复发率的重要因素(表2).

2.5 复发时间 随访114例获得诱导缓解的UC患者, 自第2年始复发率随时间逐年上升, 1-6年分别为13.2%、25.4%、34.2%、36.0%、37.7%和39.5%.

2.6 不良反应及其他 随访期间未见严重不良反应发生, 仅少数患者(2例)出现血白细胞降低, 1例患者尿常规检查出现尿晶体阳性, 查尿渗透压正常, 均未停药. 此外所有患者均无癌变.

3 讨论

目前, UC的病因和发病机制仍不十分明确, 尚缺乏特异性的治疗药物. UC的治疗药物主要包括氨基水杨酸制剂、肾上腺糖皮质激素、免疫抑制剂、生物学制剂及肠道微生态制剂等, 我国的治疗共识意见与国外治疗方案基本一致. UC是一种反复发作性的慢性疾病, 尽管经过诱导缓解治疗后临床症状与病理学可以获得最大程度的缓解, 但仍可出现反复. 近年来, 为了获得更为理想的治疗结果, 开始从分子水平探讨靶向治疗和黏膜结构的修复. 新的治疗目标更加关注UC的复发, 而降低复发率的关键是迅速诱导缓解, 长期维持缓解, 最终达到内镜下完全黏膜愈合.

目前, 在UC的治疗中多重视诱导缓解治疗, 往往忽视了维持缓解治疗的重要性. 由于UC为终生性疾病, 具有慢性反复发作的特点, 因此诱导缓解后的维持治疗十分重要. 美国、英国、亚太地区及我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见均推荐UC患者长期维持缓解治疗, 时间需3-5年, 甚至终生. UC的复发与是否进行维持治疗有关, 有研究表明缓解期UC患者, 服用安慰剂者6 mo的复发率为29%-43%, 12 mo的复发率为38%-76%^[6]. 然而, 由于医生和患者对维持治疗认识不足, 导致UC的复发率增加. 本研究资料显示, 在随访114例诱导缓解的UC患者中, 自第2年始复发率随时间逐年上升, 提示维持缓解治疗应持续至少2年以上, 甚至终生.

UC复发与性别无关, 复发率与疾病活动程度、病程、病变的分布等有关. 有文献报道表明, UC病程2-3年的患者复发率随病程的延长而

表 2 影响复发率的多因素COX回归分析

| 相关因素 | 偏回归系数(B) | B的标准误 | Wald | P值 | Exp(B) |
|------|----------|-------|-------|-------|--------|
| 黏膜愈合 | -2.720 | 1.036 | 6.890 | 0.009 | 0.066 |
| 分度 | -1.024 | 0.387 | 7.017 | 0.008 | 0.359 |

增加, 全结肠炎复发的时间最早、其次分别是左半结肠炎、远端结肠炎^[7]。本研究资料显示, 疾病活动度中-重度的UC患者复发率显著高于轻度UC患者, 直乙结肠型、左半结肠型、区域性结肠型和全结肠型UC患者缓解期复发率高于直肠型UC。在诱导缓解治疗中曾应用激素治疗的UC患者缓解期复发率, 显著高于未应用激素者, 提示疾病活动程度、病变分布、黏膜愈合、5-ASA剂量等是UC复发的影响因素, 其中黏膜愈合及疾病活动程度与UC复发高度相关, 是影响复发率的重要因素。

5-ASA是轻-中度UC治疗的首选药物, 也是维持缓解治疗的主要药物^[8]。5-ASA通过干扰花生四烯酸代谢、抑制白三烯与前列腺素的合成, 发挥其抗炎作用。多数UC诊治共识意见与指南推荐维持缓解治疗剂量为5-ASA: 2-4 g/d^[3,9]。有临床研究显示, 5-ASA栓剂每晚500 mg或1 000 mg, 对病变局限于直肠的患者维持缓解有效; 对于病变局限于直乙结肠或左半结肠、经5-ASA灌肠剂诱导缓解的患者, 继续灌肠剂治疗对维持缓解有效^[10]。5-ASA口服2.4 g-4.8 g联合局部治疗对于直乙型UC的维持缓解更为有效。高剂量美沙拉嗪可延长维持缓解的时间^[11]。由于大剂量的5-ASA并没有增加不良反应的发生率, 因此有学者建议应用高剂量的5-ASA进行维持缓解。5-ASA维持治疗的时间, 目前一般推荐终身维持治疗, 特别是左半结肠和全结肠病变的患者以及复发次数大于每年1次的患者。目前有证据表明, 长期维持治疗可减少结直肠癌的发生风险^[12]。

本研究资料中缓解期选择5-ASA维持治疗, UC的复发率较国外文献报道服用安慰剂的复发率低, 病程长、曾服用过激素的患者, 复发的风险更高, 轻度患者服用5-ASA剂量>2g/d的复发率低于剂量≤2 g/d的患者。

黏膜愈合是UC诱导缓解治疗的新目标。内镜下黏膜愈合作为UC的治疗目标得到越来越多的关注, 所谓黏膜愈合是指内镜下对黏膜病变愈合状况和疾病活动性的评估, 表现为黏膜无质脆、出血、糜烂及溃疡等^[13], 但目前对黏膜

愈合尚缺少公认的标准^[14]。Frøslie等对挪威一组UC患者长达5年的研究认为, 经过1年治疗达到黏膜愈合对于以后减少疾病活动有预测作用, 能减少以后需要积极治疗的可能性, 他们认为黏膜愈合可作为IBD的临床指标及治疗的目标^[15]。然而, Dahlia Awais等认为该研究并不能得出黏膜愈合能预测疾病病程的结论^[1]。尽管对黏膜愈合的重要性还存在争议, 其对UC预后的预测还缺乏有力的证据, 但目前仍普遍认为获得完全黏膜愈合, 将有助于提高UC的长期缓解率, 降低手术率和患者住院率, 使患者获得更好的生活质量。本研究资料显示, 经诱导缓解治疗获得黏膜愈合者较未获得黏膜愈合者复发率显著降低, 提示诱导缓解治疗未达到黏膜愈合可能是UC复发的高危因素。

目前, 我国医生对UC的长期性、顽固性、严重性认知尚有不足, 常对药物选择不当, 尤其对UC的维持治疗缺乏重视, 较少对患者进行宣传教育, 导致患者依从性差。因此, 我们有必要提高对UC维持缓解治疗必要性的认识。

4 参考文献

- 1 中国炎症性肠病协作组, 王玉芳, 欧阳钦. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. 中华消化杂志 2006; 26: 368-372
- 2 Ardizzone S, Pettilo M, Imbesi V, Cerutti R, Bollani S, Bianchi Porro G. Is maintenance therapy always necessary for patients with ulcerative colitis in remission? *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 373-379
- 3 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. 中华内科杂志 2008; 47: 73-79
- 4 Miner P, Hanauer S, Robinson M, Schwartz J, Arora S. Safety and efficacy of controlled-release mesalazine for maintenance of remission in ulcerative colitis. Pentasa UC Maintenance Study Group. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 296-304
- 5 Kane S, Lu F, Kornbluth A, Awais D, Higgins PD. Controversies in mucosal healing in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 796-800
- 6 Travis SPL, Stange EF, Lémann M, Øresland T, Bemelman WA, Chowers Y, Colombel JF, D'Haens G, Ghosh S, Marteau P, Kruis W, Mortensen NJMcC, Penninckx F, Gassull M, for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based consensus on the management of ulcerative colitis: current management. *Journal of Crohn's and Colitis* 2008; 2: 24-62

■应用要点

本文总结了114例UC患者维持缓解治疗期间的复发情况, 对指导UC的维持治疗、减少UC复发有一定的临床应用价值。

■同行评价

本文新颖性较好,对溃疡性结肠炎的治疗具有一定的临床意义。

- 7 Bresci G, Parisi G, Capria A. Duration of remission and long-term prognosis according to the extent of disease in patients with ulcerative colitis on continuous mesalazine treatment. *Colorectal Dis* 2008; 10: 814-817
- 8 Ng SC, Kamm MA. Therapeutic strategies for the management of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 935-950
- 9 Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, Geary R, Goh KL, Hamid S, Khan AG, LeMair AW, Malfertheiner, Ouyang Q, Rey JF, Sood A, Steinwurz F, Thomsen OO, Thomson A, Watermeyer G. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 112-124
- 10 Cohen RD. What is the optimal maintenance treatment for ulcerative colitis? *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14 Suppl 2: S236-S237
- 11 Paoluzi OA, Iacopini F, Pica R, Crispino P, Marceggiano A, Consolazio A, Rivera M, Paoluzi P. Comparison of two different daily dosages (2.4 vs. 1.2 g) of oral mesalazine in maintenance of remission in ulcerative colitis patients: 1-year follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1111-1119
- 12 Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53 Suppl 5: V1-V16
- 13 Allez M, Lémann M. Role of endoscopy in predicting the disease course in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2626-2632
- 14 Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lémann M, Colombel JF. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 15-29
- 15 Frøslie KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 2007; 133: 412-422

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 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) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

Mina53在结肠癌组织中的表达意义及与肿瘤增殖的关系

谭小平, 何长华, 朱燕妮, 张庆, 肖安华, 左绪艳, 周艳, 董卫国

谭小平, 何长华, 朱燕妮, 肖安华, 左绪艳, 周艳, 长江大学附属第一人民医院消化内科 湖北省荆州市 434000
张庆, 长江大学临床医学院 湖北省荆州市 434000
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: 董卫国与谭小平对此文所作贡献均等; 此课题由董卫国与谭小平设计; 研究过程由谭小平、何长华、朱燕妮、张庆、肖安华、左绪艳、周艳及董卫国操作完成; 数据分析由董卫国、张庆及谭小平完成; 本论文写作由董卫国与谭小平完成。
通讯作者: 董卫国, 教授, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. dongwg66@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-10-19 修回日期: 2010-12-04
接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-02-08

Significance of expression of Mina53 in colon cancer

Xiao-Ping Tan, Chang-Hua He, Yan-Ni Zhu, Qing Zhang, An-Hua Xiao, Xu-Yan Zuo, Yan Zhou, Wei-Guo Dong

Xiao-Ping Tan, Chang-Hua He, Yan-Ni Zhu, An-Hua Xiao, Xu-Yan Zuo, Yan Zhou, Department of Gastroenterology, Jingzhou First People's Hospital Affiliated to Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China
Qing Zhang, Clinical Medical College of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China
Wei-Guo Dong, Wuhan Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Professor Wei-Guo Dong, Wuhan Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. dongwg66@yahoo.com.cn
Received: 2010-10-19 Revised: 2010-12-04
Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To detect the expression of Mina53 (myc-induced nuclear antigen with a molecular mass of 53 000 Da) and to analyze its clinical significance in colon cancer.

METHODS: The expression of Mina53 and Ki67 mRNAs was detected by real-time PCR in 51 colon cancer samples, 19 colon adenoma samples, and 20 normal colon tissue samples.

RESULTS: The expression level of Mina53 in colon cancer was significantly higher than those in colon adenoma and normal colon tissue (1.369 ± 0.874 vs 0.453 ± 0.233 , 0.347 ± 0.128 , both $P < 0.05$). Mina53 expression was significantly associated with tumor differentiation, Dukes stage, distant metastasis, and lymph node metastasis

in colon cancer (all $P < 0.05$). Mina53 expression was positively associated with Ki67 expression in colon cancer ($r = 0.727$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Mina53 was overexpressed in colon cancer, which may be associated with tumor proliferation. Mina53 may play an important role in the carcinogenesis of colon carcinoma.

Key Words: Colon cancer; Mina53; Ki67; Real-time PCR

Tan XP, He CH, Zhu YN, Zhang Q, Xiao AH, Zuo XY, Zhou Y, Dong WG. Significance of expression of Mina53 in colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 421-424

摘要

目的: 研究Mina53在结肠癌中的表达及与各临床病理特征和肿瘤增殖活性的关系。

方法: 运用实时定量PCR分别检测51例结肠癌、19例结肠腺瘤和20例正常结肠组织Mina53 mRNA的表达, 及结肠癌组织中Ki67 mRNA的表达。

结果: 结肠癌、结肠腺瘤和正常结肠组织中Mina53 mRNA的表达水平分别为 1.369 ± 0.874 、 0.453 ± 0.233 、 0.347 ± 0.128 , 结肠癌组织Mina53 mRNA的表达明显高于结肠腺瘤及正常结肠组织; 而与肿瘤的组织分化程度、临床分期、远处转移和淋巴结转移均相关(均 $P < 0.05$); 结肠癌中Ki67 mRNA表达水平为 1.117 ± 0.805 , 通过相关分析Mina53 mRNA的表达与Ki67 mRNA呈正相关($r = 0.727$, $P < 0.01$)。

结论: Mina53在结肠癌中高表达, 其表达与肿瘤的增殖活性相关, 在结肠癌发生发展中Mina53可能起着重要作用。

关键词: 结肠癌; Mina53; Ki67; 实时定量PCR

谭小平, 何长华, 朱燕妮, 张庆, 肖安华, 左绪艳, 周艳, 董卫国. Mina53在结肠癌组织中的表达意义及与肿瘤增殖的关系. *世界华人消化杂志* 2011; 19(4): 421-424

背景资料

结肠癌的生长、分化及转移等生物学特性具有非常复杂的分子基础, 原癌基因的激活及抑癌基因失活, 细胞周期改变和细胞生长分化调控紊乱均与结肠癌发生有关. Myc是一种重要的原癌基因, 它具有促进细胞增殖和肿瘤血管生成的作用, 可降低基因组稳定性, 并且与细胞分化、凋亡及周期调控密切相关。

同行评议者

黄培林, 教授, 东南大学

■应用要点

Mina53在结肠癌中高表达,其表达与肿瘤的增殖活性相关,在结肠癌发生发展中Mina53可能起着重要作用。

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/421.asp>

0 引言

结肠癌的生长、分化及转移等生物学特性具有非常复杂的分子基础,原癌基因的激活及抑癌基因失活,细胞周期改变和细胞生长分化调控紊乱均与结肠癌发生有关。Myc是一种重要的原癌基因,它具有促进细胞增殖和肿瘤血管生成的作用,可降低基因组稳定性,并且与细胞分化、凋亡及周期调控密切相关^[1,2]。Mina53为Myc诱导核抗原,相对分子质量为53 000 Da,是Myc的靶基因,参与细胞增殖^[3]。本研究采用定量PCR的方法检测Mina53和Ki67在结肠中的表达,并分析Mina53与各临床病理特征和肿瘤增殖活性的相关性,探讨Mina53在人类结肠癌发生发展中的作用以及对临床的指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料 51例结肠癌组织均来自长江大学附属第一医院2009-06/2010-06手术切除标本,19例结肠腺瘤和20例正常结肠组织来自于结肠镜下活检,均经病理学检查证实,其中结肠癌中男28例,女23例;年龄34-67(52.9±10.6)岁;高分化12例,中分化16例,低分化23例;Dukes A 15例, Dukes B 12例, Dukes C 14例, Dukes D 10例。所有标本均先冻于液氮中1 h,快速取出后置于-80℃保存待测。实时定量PCR试剂盒(Toyobo),单链cDNA合成试剂盒(Invitrogen),RNA提取(TRIzol, Gibco BRL)DNA纯化试剂盒(北京博大),实时定量PCR仪(Rocher)。引物由上海申工生物有限公司合成, Mina53: 5'-TGACCATCAGCACCTACC-3', 3'-TCCTCCTCATTTCCCATC-5',产物长度为192 bp; Ki67: 5'-GCTGTTGATGATGGGTTA-3', 3'-AATGGGTGGGTATTTGTT-5',产物长度为165 bp; β -actin: 5'-GCTGTCACCTTACC-GTTCC-3', 3'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-5',产物长度为156 bp。

1.2 方法

1.2.1 总RNA抽提及cDNA合成: TRIzol提取组织总RNA。总RNA提取之后,测得各管内所提总RNA的浓度和纯度。各管均取2 μ g总RNA,逆转录总反应体系25 μ L,用M-MLV逆转录酶42℃逆转录1 h,合成cDNA。

1.2.2 检测Mina53、Ki67和 β -actin cDNA的扩增和纯化: 提取总RNA,扩增Mina53、Ki67和 β -actin的PCR产物,PCR反应体系和试剂除探针

表1 Mina53在结肠癌、结肠腺瘤和正常结肠组织中的mRNA表达水平

| 组织类型 | n | mRNA表达 | P值 |
|--------|----|-------------|-------|
| 正常结肠组织 | 20 | 0.347±0.128 | 0.009 |
| 结肠腺瘤 | 19 | 0.453±0.233 | 0.014 |
| 结肠癌 | 51 | 1.369±0.874 | |

外同定量实时PCR反应,在9600 PCR扩增仪上完成。反应条件:95℃变性后,进行40个循环。循环条件:95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min。1.5%的琼脂糖电泳,切胶,用DNA纯化试剂盒纯化DNA,紫外分光光度计定量,作为标准品。

1.2.3 实时定量PCR反应: 实时定量PCR反应体系20 μ L: SYRB Green I MIX(Toyobo公司)10 μ L,引物1 0.4 μ L,引物2 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, DEPC水 7.2 μ L。扩增过程:95℃ 5 s,58℃ 5 s,72℃ 20 s循环40次,使用Roche lightcycler PCR扩增仪扩增。每组样本重复测量3次。为了精确定量,我们将Mina53、Ki67和 β -actin纯化的PCR产物定量后进行系列稀释,再用实时PCR仪扩增,建立了各种基因mRNA表达实时PCR检测的标准曲线。根据标准曲线,实时PCR仪计算机程序直接计算出检测基因表达量,按检测基因表达量/ β -actin基因表达量计算,得出检测基因的相对表达量。

统计学处理 数据应用SPSS11.0软件进行统计学处理,所有数据采取mean±SD表示,根据实验资料要求,选用t检验及直线相关分析进行数据分析,以P<0.05为差异具有显著性。

2 结果

2.1 Mina53在结肠癌、结肠腺瘤和正常结肠组织中的表达 结肠癌、结肠腺瘤和正常结肠组织中Mina53 mRNA的表达水平分别为1.369±0.874、0.453±0.233、0.347±0.128,由此结肠癌组织Mina53 mRNA的表达高于结肠腺瘤($t = 2.968, P = 0.014$)及正常结肠组织($t = 3.062, P = 0.009$),具有统计学差异(表1)。

2.2 Mina53在结肠癌组织中的表达与各临床特征的关系 Mina53表达与胃癌的临床病理特征的关系(表2):Mina53在胃癌中的表达与性别、年龄无关(均P>0.05),而与肿瘤的组织分化程度、临床分期、远处转移和淋巴结转移均相关(均P<0.05)。

2.3 Mina53在结肠癌中的表达与核增殖的关系 结肠癌中Ki67 mRNA表达水平为1.117±0.805,

表 2 Mina53在结肠癌中的表达与各临床病理特征的关系

| 临床特征 | n | Mina53 mRNA表达水平 | P值 |
|---------|----|-----------------|-------|
| 所有病例 | 51 | | |
| 性别 | | | |
| 男 | 28 | 1.137 ± 0.935 | 0.211 |
| 女 | 23 | 1.206 ± 0.885 | |
| 年龄(岁) | | | |
| ≤60 | 32 | 1.210 ± 0.768 | 0.306 |
| >60 | 19 | 1.244 ± 0.903 | |
| 分化程度 | | | |
| 高、中分化 | 28 | 0.993 ± 0.735 | 0.043 |
| 低分化 | 23 | 1.331 ± 0.994 | |
| Dukes分期 | | | |
| A/B | 27 | 0.899 ± 0.637 | 0.037 |
| C/D | 24 | 1.356 ± 0.874 | |
| 淋巴结转移 | | | |
| 有 | 25 | 1.277 ± 0.909 | 0.015 |
| 无 | 26 | 0.944 ± 0.785 | |
| 远处转移 | | | |
| 有 | 15 | 1.305 ± 0.961 | 0.011 |
| 无 | 36 | 0.971 ± 0.847 | |

Mina53 mRNA的表达水平为 1.369 ± 0.874 , 通过相关分析Mina53 mRNA的表达与Ki67 mRNA呈正相关($r = 0.727, P < 0.01$).

3 讨论

细胞中由多种基因共同形成了一个增殖调控网络, 肿瘤的发生、发展与这个调控网络的失控密切相关, 因此研究肿瘤相关基因在肿瘤细胞中的作用以及相互关系, 对于揭示细胞癌变的机制, 寻找肿瘤治疗的有效途径, 成为广受关注的研究领域。

Mina53是由Tsuneoka等^[3]发现的新基因, 为Myc诱导核抗原, 位于核内, 部分蛋白聚集在核仁。c-myc则是一种重要的原癌基因, 它具有促进细胞增殖和肿瘤血管生成的作用, 可降低基因组稳定性, 并且与细胞分化、凋亡及周期调控密切相关^[1,2,4,5]。Mina53的表达直接由c-myc诱导, 在肿瘤组织和肿瘤细胞系中c-myc表达上调, 同时Mina53表达也上调, 通过RNA干扰技术特异性抑制Mina53从而抑制细胞增殖, 这些结论表明Mina53是myc一个直接靶基因, Mina53对细胞增殖有着重要作用。在人胃癌和食管鳞状细胞癌组织和许多肿瘤细胞系中Mina53均高表达^[3,6-16]。因此Mina53对细胞增殖有着重要作用, 在肿瘤的发生发展中起着重要作用。

我们从基因水平对Mina53在正常、结肠腺

瘤和结肠癌组织进行分析。在结肠癌中Mina53表达, 明显高于正常和结肠腺瘤组织; 并且Mina53的表达在各临床分期中有着显著性差异, 随临床分期的进展, 表达增高, 还与组织分化程度、淋巴结转移和远处转移相关, 而与性别和年龄无关。由此反映了Mina53在结肠癌中高表达, 说明Mina53在结肠癌发生发展上可能起着重要的作用, 在诊断上可作为一个新的肿瘤标志物。

在肿瘤诊断中, 肿瘤增殖活性是一个评价肿瘤进展的重要参数。Ki67是一种细胞增殖核抗原, 存在于G0期以外的所有细胞周期中, 在有丝分裂后迅速降解或失去抗原决定簇, 因此, 被认为是反映细胞增殖状态的理想标记物, 并且还和肿瘤预后密切相关^[17,18]。在我们的实验中, 结肠癌Mina53的表达与Ki67呈正相关($r = 0.727, P < 0.01$)。Mina53的表达通过c-myc诱导, 而c-myc表达于细胞分裂周期的各个期, 在肿瘤组织中Mina53要比Ki67更多的表达^[7,8,19,20], 故Mina53更能反映肿瘤增殖活性。临床分期和组织分级系统最重要的功能是评价预后和指导治疗, 而在我们的实验中Mina53的表达与结肠癌临床分期相关。此外有关食管鳞状细胞癌的表达与预后的研究发现^[7,8]: Mina53的表达与预后相关, Mina53高表达的生存率短。因此Mina53不仅可反映结肠癌的增殖活性, 而且可能对预后判定有着重要意义。

根据Mina53在许多肿瘤中高表达, 与肿瘤细胞增殖和致癌性转化密切相关, 目前已经建立了针对Mina53 mRNA的小干扰RNA, 他们能特异性抑制Mina53的表达, 能有效抑制肿瘤细胞的增殖^[3,6-8]。说明了Mina53可以作为肿瘤治疗的一个靶点, 在临床治疗中有着重要的指导作用。

总之, 我们的研究表明Mina53在结肠癌中表达明显高于正常和非典型增生组织, 其表达与临床分期、浸润深度、淋巴转移和肿瘤增殖活性密切相关, 在结肠癌的发生发展中可能起着重要作用, 在结肠癌诊断中可作为一种新的肿瘤标志物, 在临床治疗和预后判定中有一定的指导意义。

4 参考文献

- Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 1999; 18: 2967-2987
- Obaya AJ, Matyak MK, Sedivy JM. Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell

■同行评价

本文实用性较好, 为探讨Mina53在临床中的作用奠定了实验基础。

- cycle. *Oncogene* 1999; 18: 2934-2941
- 3 Tsuneoka M, Koda Y, Soejima M, Teye K, Kimura H. A novel myc target gene, mina53, that is involved in cell proliferation. *J Biol Chem* 2002; 277: 35450-35459
 - 4 Henriksson M, Lüscher B. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 1996; 68: 109-182
 - 5 Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001; 20: 5595-5610
 - 6 Teye K, Tsuneoka M, Arima N, Koda Y, Nakamura Y, Ueta Y, Shirouzu K, Kimura H. Increased expression of a Myc target gene Mina53 in human colon cancer. *Am J Pathol* 2004; 164: 205-216
 - 7 Tsuneoka M, Fujita H, Arima N, Teye K, Okamura T, Inutsuka H, Koda Y, Shirouzu K, Kimura H. Mina53 as a potential prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7347-7356
 - 8 Tsuneoka M, Nishimune Y, Ohta K, Teye K, Tanaka H, Soejima M, Iida H, Inokuchi T, Kimura H, Koda Y. Expression of Mina53, a product of a Myc target gene in mouse testis. *Int J Androl* 2006; 29: 323-330
 - 9 Zhang Q, Hu CM, Yuan YS, He CH, Zhao Q, Liu NZ. Expression of Mina53 and its significance in gastric carcinoma. *Int J Biol Markers* 2008; 23: 83-88
 - 10 Ogasawara S, Komuta M, Nakashima O, Akiba J, Tsuneoka M, Yano H. Accelerated expression of a Myc target gene Mina53 in aggressive hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2010; 40: 330-336
 - 11 Komiya K, Sueoka-Aragane N, Sato A, Hisatomi T, Sakuragi T, Mitsuoka M, Sato T, Hayashi S, Izumi H, Tsuneoka M, Sueoka E. Mina53, a novel c-Myc target gene, is frequently expressed in lung cancers and exerts oncogenic property in NIH/3T3 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 465-473
 - 12 Komiya K, Sueoka-Aragane N, Sato A, Hisatomi T, Sakuragi T, Mitsuoka M, Sato T, Hayashi S, Izumi H, Tsuneoka M, Sueoka E. Expression of Mina53, a novel c-Myc target gene, is a favorable prognostic marker in early stage lung cancer. *Lung Cancer* 2010; 69: 232-238
 - 13 Fukahori S, Yano H, Tsuneoka M, Tanaka Y, Yagi M, Kuwano M, Tajiri T, Taguchi T, Tsuneyoshi M, Kojiro M. Immunohistochemical expressions of Cap43 and Mina53 proteins in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 1831-1840
 - 14 Ishizaki H, Yano H, Tsuneoka M, Ogasawara S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Fukahori S, Moriya F, Matsuoka K, Kojiro M. Overexpression of the myc target gene Mina53 in advanced renal cell carcinoma. *Pathol Int* 2007; 57: 672-680
 - 15 Teye K, Arima N, Nakamura Y, Sakamoto K, Sueoka E, Kimura H, Tsuneoka M. Expression of Myc target gene mina53 in subtypes of human lymphoma. *Oncol Rep* 2007; 18: 841-848
 - 16 Kuratomi K, Yano H, Tsuneoka M, Sakamoto K, Kusukawa J, Kojiro M. Immunohistochemical expression of Mina53 and Ki67 proteins in human primary gingival squamous cell carcinoma. *Kurume Med J* 2006; 53: 71-78
 - 17 van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijkse G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in non-cycling cells. *Am J Clin Pathol* 1998; 110: 24-31
 - 18 Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40: 2-11
 - 19 Rabbitts PH, Watson JV, Lamond A, Forster A, Stinson MA, Evan G, Fischer W, Atherton E, Sheppard R, Rabbitts TH. Metabolism of c-myc gene products: c-myc mRNA and protein expression in the cell cycle. *EMBO J* 1985; 4: 2009-2015
 - 20 Waitz W, Loidl P. Cell cycle dependent association of c-myc protein with the nuclear matrix. *Oncogene* 1991; 6: 29-35

编辑 李军亮 电编 李薇

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,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.

以胃肠道出血首发的小肠间质瘤17例

唐彤丹, 朱磊

唐彤丹, 大连市中心医院急诊科 辽宁省大连市 116033
朱磊, 大连医科大学附属第一医院消化科 辽宁省大连市 116011
作者贡献分布: 唐彤丹与朱磊对此文所作贡献均等; 此研究由唐彤丹与朱磊共同设计; 病例收录、数据分析由朱磊完成; 论文写作由唐彤丹与朱磊完成。
通讯作者: 唐彤丹, 主治医师, 116033, 辽宁省大连市, 大连市中心医院急诊科, tangtongdan@sohu.com
收稿日期: 2010-11-05 修回日期: 2010-12-10
接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-02-08

Diagnosis and treatment of intestinal stromal tumors initially manifesting as gastrointestinal hemorrhage: an analysis of 17 cases

Tong-Dan Tang, Lei Zhu

Tong-Dan Tang, Department of Emergency Management, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China
Lei Zhu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Correspondence to: Tong-Dan Tang, Department of Emergency Management, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China. tangtongdan@sohu.com
Received: 2010-11-05 Revised: 2010-12-10
Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-02-08

Abstract

AIM: To improve the understanding, early diagnosis and treatment of intestinal stromal tumors initially manifesting as gastrointestinal bleeding.

METHODS: The clinical data for 17 patients with intestinal stromal tumors initially manifesting as gastrointestinal hemorrhage were analyzed retrospectively, including clinical manifestations, hemoglobin concentration, intestinal computed tomography (CT) imaging data, pathological data, immunohistochemistry data, and follow-up data.

RESULTS: Intestinal stromal tumors initially manifesting as gastrointestinal bleeding occurred more frequently in elderly patients whose average age was 58 years. Males were slightly more likely to suffer from the disease than fe-

males. Hematochezia and varying degrees of anemia were the major clinical manifestations. CT scan of the intestine was helpful for finding the tumors showing exophytic growth without lymphatic metastasis. Intestinal tumors, which presented as low-density, sharply marginated, lobulated or unlobulated soft masses, were found in 16 patients on CT scan. These tumors had an average computed tomographic value of 32 Hounsfield units. Enhanced CT scan showed that the majority of tumors exhibited inhomogeneous enhancement. All patients were positive for CD117. Histopathology and immunohistochemistry can help establish a confirmative diagnosis and conduct risk classification. Surgery was the first choice of treatment for the disease.

CONCLUSION: CT scan is helpful in finding intestinal stromal tumors initially manifesting as gastrointestinal bleeding. The prognosis of intestinal stromal tumors could be improved by surgery and biological targeted therapy.

Key Words: Gastrointestinal hemorrhage; Intestinal stromal tumors; Computed tomography

Tang TD, Zhu L. Diagnosis and treatment of intestinal stromal tumors initially manifesting as gastrointestinal hemorrhage: an analysis of 17 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 425-428

摘要

目的: 提高对以胃肠道出血首发的小肠间质瘤的了解和早期诊治。

方法: 回顾性分析17例以胃肠道出血首发的小肠间质瘤患者的临床表现、血红蛋白水平、小肠CT表现、手术病理、免疫组织化学以及随访结果等临床资料。

结果: 以胃肠道出血首发的小肠间质瘤多发于中老年人, 平均年龄58岁, 男性略多于女性, 临床表现为便血和不同程度的贫血。小肠CT检查有助于发现病灶, 16例患者小肠CT发现小肠占位病变, 表现为无分叶或有分叶的低密度、边界清晰软组织肿块, 平均CT值32 HU, 强化大多不均匀, 多数无淋巴结转移。肿

背景资料

小肠间质瘤是胃肠道间质瘤的一种, 是引起小肠出血的常见疾病。小肠间质瘤起病隐匿, 常表现为腹部包块、腹部不适以及胃肠道出血等, 早期诊治以胃肠道出血为首发的小肠间质瘤对于挽救生命、改善预后等方面有着很大的临床意义。

同行评议者

陈贻胜, 教授, 福建省立医院消化内科

■应用要点

对常规胃镜、肠镜检查未明确病因的胃肠道出血患者,应该重视小肠疾病尤其是小肠间质瘤所导致的出血,临床上可以通过小肠CT、血管造影,甚至小肠CT重建、小肠镜等技术及早发现病变,为进一步手术治疗、生物靶向治疗等创造时机并改善预后。

瘤多为外生性生长,17例患者CD117免疫组织化学检测均阳性。组织病理学以及CD117、CD34免疫组织化学有助于肿瘤的确诊和危险分类,治疗方法主要为手术切除。

结论: 重视急诊胃镜、肠镜检查阴性的以胃肠道出血的小肠间质瘤患者,小肠CT检查有助于发现病变,并经手术切除病灶、生物靶向治疗、加强随访以改善患者预后。

关键词: 胃肠道出血; 小肠间质瘤; 计算机断层扫描

唐彤丹, 朱磊. 以胃肠道出血首发的小肠间质瘤17例. 世界华人消化杂志 2011; 19(4): 425-428

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/425.asp>

0 引言

胃肠道出血是临床常见严重的症候,由于急诊胃镜、肠镜的开展使大部分胃肠道出血的患者得到及时的诊断和治疗,但是对于急诊内镜未发现出血病灶的患者亦应引起临床医生的注意,这种不明原因的胃肠道出血往往由于小肠疾病所致,而小肠肿瘤占据了很大的比例。小肠间质瘤是胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)的一种,其引起的胃肠道出血由于检查手段的限制往往造成漏诊、误诊。本文分析了一组以胃肠道出血首发的小肠间质瘤的临床资料,希望能为及早地诊断由小肠间质瘤导致的不明原因胃肠道出血提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-2010年大连市中心医院收治的以胃肠道出血首发的小肠间质瘤患者17例,所有患者均接受胃镜、肠镜检查(除外上消化道以及结肠病变导致的出血),所有病例均经病理及免疫组织化学检查证实。

1.2 方法 分析以胃肠道出血的小肠间质瘤患者的一般资料。血细胞计数仪测定就诊时患者血红蛋白水平。小肠CT检查病灶表现,包括病灶大小、形态、平扫CT值、增强后强化情况、有无淋巴结转移、生长方式等。观察手术切除标本的大体病理,并经HE染色。根据Fletcher分类法^[1]进行小肠间质瘤危险分组:手术时已有周围侵犯或肝脏、腹腔转移,直径>5 cm,核分裂相>5/50 HPF为高危组;肿瘤直径<5 cm,核分裂相6-10/50 HPF或肿瘤直径5-10 cm,核分裂相<5/50 HPF为中危险组;肿瘤直径2-5 cm,核分裂相<5/50 HPF为低危险组。SP法免疫组织化学观

察CD117、CD34、ACTIN、SMA、S-100等抗原的表达。

2 结果

17例患者中,男11例,女6例,男女比例1.8:1。年龄38-82(平均年龄58)岁。患者均为便血,其中黑便8例,柏油样便7例,暗红色血便2例。就诊时血红蛋白水平为36.2-118.0(平均81.4) g/L。从发病到确诊时间最短者于就诊后第3天即确诊,然而多数患者表现为间断、反复出血,最长的5年才得以确诊。1例患者小肠CT检查无阳性结果,余16例均观察到不同的占位病变,最大的占位15 cm×15 cm,最小的占位2.1 cm×3.0 cm。平扫占位病灶CT值23-39(平均32) HU。16例占位形态的表现:无分叶13例,有分叶3例;低密度软组织14例,低密度软组织内部钙化灶1例,低密度软组织内点状气体1例;无淋巴结转移15例,有淋巴结转移1例;强化不均匀15例,均匀1例;肿块边界清晰15例,不清晰1例。

以胃肠道出血首发的17例患者小肠间质瘤均为外生性生长,肿块最大15 cm×13 cm×15 cm,最小3 cm×3 cm×3 cm。10例位于空肠,7例位于回肠。免疫组织化学检测CD117、CD34、SMA、S-100抗原表达阳性分别为17、6、1、3例。病变危险高风险组6例,中风险组9例,低风险组2例。

17例均获得随访,无失访,随访时间3-72(平均42.6) mo。其中1例于空肠间质瘤手术后60 mo发现回肠间质瘤再次手术治疗,2例分别在手术后22 mo、48 mo因肿瘤广泛腹腔转移死亡。

3 讨论

小肠间质瘤是原发于小肠的GIST。GIST是起源于胃肠道原始间叶组织、非定向分化的肿瘤,部分可伴有平滑肌或神经鞘细胞的不完全分化^[2]。

小肠间质瘤占GIST的20%-30%^[3],好发于40-60岁人群,无明显性别差异。本组病例平均发病年龄为58岁,以中老年人为多,男性多于女性患者。小肠间质瘤起病隐匿,临床多表现为腹部隐痛、腹部包块、胃肠道出血、贫血、肠梗阻等。因间质瘤血供丰富,黏膜面易形成溃疡而并发出血^[4]。小肠间质瘤所致胃肠道出血可反复发作,出血量不等,临床表现为黑便、柏油样便、暗红色便,本组病例未见有呕血的表现,与病例都来自空回肠有关。贫血轻重不一,最低36.2 g/L,最高118 g/L,这与出血量的多少以及能否

早期诊断有关. 因为小肠间质瘤起病隐匿、临床认识较少、检查手段受限等原因, 导致很多病例反复发作胃肠道出血而不能早期诊断, 本组2个病例在长达5年后才得到诊断. 因此, 提高小肠间质瘤的早期诊断非常重要. 对于急性胃肠道出血患者, 如果急诊胃镜、肠镜未见出血病灶, 且无法行小肠镜、胶囊内镜检查时, 可以采用无创的小肠CT检查. 本组以胃肠道出血首发的小肠间质瘤患者行小肠CT检查, 仅1例没有发现病变, 而16例发现小肠占位, 结果显示与肠壁密切相关的软组织肿块, 平扫CT值32 HU左右, 多呈圆形、类圆形生长, 少见分叶状生长, 肿瘤内可见气体影, 瘤体可有钙化, 肿瘤边界大多清晰, 强化后密度大多不均匀, 极少有淋巴结转移. CT扫描可以了解肿瘤与周围血管关系有助于手术前评估和手术方式的选择^[5]. 另外可以借助多平面重建、三维重建、仿真内镜技术等提高小肠CT对于间质瘤的定位^[6], 但是本组病例为急诊检查并未行重建技术, 因此小肠CT的定位诊断与手术中观察病灶的位置有出入. 对于肿瘤小、CT没有发现病灶的可以采用DSA检查, 本组1例小肠CT未发现出血原因的病例经DSA检查发现空肠肿瘤染色、造影剂外溢而明确诊断及及时治疗. 但是临床上对于内科保守治疗差、急诊胃肠镜未发现病灶且有继续出血的患者, 不能因为检查而耽误剖腹探查外科手段解决的最佳时机.

小肠间质瘤的好发部位分别为空肠、回肠、十二指肠. 因为小肠间质瘤起源于小肠壁层组织, 所以大多向腔外生长或以向腔外生长为主^[7]. 本组病例10例位于空肠、7例位于回肠, 未见十二指肠间质瘤病例, 且17例小肠间质瘤均呈外生性生长, 最大者直径约15 cm. 小肠间质瘤的确诊依赖于病理学检查, 显微镜下可见梭形细胞或上皮样细胞肿瘤, 免疫组织化学表型CD117是决定性特征. CD117是癌基因 $c-kit$ 的蛋白产物, 在GIST中呈特异的高表达^[8]. CD34是一种骨髓造血前体细胞标记物, 在GIST中表达率在60%左右^[9]. 检测SMA、S-100可以了解间质瘤是否伴有平滑肌、神经细胞分化的倾向^[10]. 本组17例均表达CD117, CD34的阳性表达率为54.5%, 提示联合检测CD117、CD34, 尤其是CD117阳性对于确诊小肠间质瘤十分重要.

小肠间质瘤的放化疗效果均不显著, 手术切除是最有效、彻底的治疗手段. 对于术中难以判断肿瘤性质的, 应实施根治性小肠肿瘤切

除术, 即切除的肠管两端应距离肿瘤边缘10 cm以上, 若术中发现局部淋巴结肿大, 应进一步清扫区域淋巴结和血管根部淋巴结. 对难以根治性切除的小肠间质瘤采取减瘤荷术^[11]. 对术后有复发和转移倾向、放化疗等辅助治疗不敏感、不能手术切除或切除不全的小肠间质瘤患者可以采用分子靶向治疗, 酪氨酸激酶受体抑制剂伊马替尼能选择性作用于GIST细胞 $c-kit$ 酪氨酸激酶受体, 从而阻止肿瘤的发生发展^[12]. 小肠间质瘤的生物学行为难以预测, 低风险组的间质瘤也常发生转移, 应该加强小肠间质瘤患者的随访, 本组病例可见空肠间质瘤术后于回肠再发, 并且2例患者分别在术后不到2年、5年死亡, 提示我们术后随访时应该考虑加用伊马替尼等治疗以提高生存率.

小肠间质瘤因为发病率较低、临床认识不够、检查确诊手段难度大等原因常常导致延误诊断和误诊. 临床医生对胃镜、肠镜检查阴性又未行小肠镜、胶囊内镜等检查的胃肠道出血患者, 不要轻易考虑急性胃黏膜病变、血管畸形等原因, 应该重视小肠疾病尤其是小肠间质瘤所导致的出血, 可以结合小肠CT检查及早发现病变, 必要时行小肠CT重建技术或结合DSA甚至小肠镜、胶囊内镜等明确诊断, 尽早手术治疗, 加强随访, 联合生物靶向治疗, 从而提高小肠间质瘤的早期诊断率, 改善患者的预后.

4 参考文献

- 1 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
- 2 Dow N, Giblen G, Sobin LH, Miettinen M. Gastrointestinal stromal tumors: differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 111-119
- 3 Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, Burke A, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1121-1133
- 4 牛应林, 吴咏冬, 冀明, 张澍田. 小肠间质瘤并发消化道出血15例临床分析. *临床内科杂志* 2007; 24: 744-745
- 5 夏泽锋, 陈少飞, 陶凯雄, 蔡开琳, 帅晓明, 韩高雄, 王继亮, 杜寒松, 郑威强, 王国斌. 胃肠道间质瘤67例. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2266-2270
- 6 黄清玲, 卢光明, 张龙江, 王中秋, 袁彩云. 小肠间质瘤的CT表现及其与病理的对照研究. *中国医学影像技术* 2008; 24: 104-106
- 7 Scarpa M, Bertin M, Ruffolo C, Polese L, D'Amico DF, Angriman I. A systematic review on the clinical diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *J Surg Oncol* 2008; 98: 384-392

■同行评价
本文内容详实, 具有一定的临床诊断价值.

- 8 Demetri GD, Benjamin RS, Blanke CD, Blay JY, Casali P, Choi H, Corless CL, Debiec-Rychter M, DeMatteo RP, Ettinger DS, Fisher GA, Fletcher CD, Gronchi A, Hohenberger P, Hughes M, Joensuu H, Judson I, Le Cesne A, Maki RG, Morse M, Pappo AS, Pisters PW, Raut CP, Reichardt P, Tyler DS, Van den Abbeele AD, von Mehren M, Wayne JD, Zalberg J. NCCN Task Force report: management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)--update of the NCCN clinical practice guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2007; 5 Suppl 2: S1-S29; quiz S30
- 9 袁琼英, 刘菲, 赵中辛, 王军臣. 胃肠道间质瘤25例临床病例及免疫组化分析. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 255-256
- 10 梁建芳, 郑绘霞, 肖虹, 武丽娜, 王宏坤. 胃肠道间质瘤病理诊断新进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 58-64
- 11 沈志勇, 刘骅, 倪醒之, 陈治平. 35例小肠间质瘤诊治分析. *胃肠病学* 2005; 10: 165-167
- 12 Davila RE, Faigel DO. GI stromal tumors. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 80-88

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

胃肠道息肉-皮肤色素沉着-指(趾)甲萎缩综合征1例

张萍, 张东, 李贻奎

张萍, 北京中医药大学 北京市 100029
张东, 中国中医科学院西苑医院心内科 北京市 100091
李贻奎, 中国中医科学院西苑医院实验研究中心 北京市 100091
作者贡献分布: 张萍、张东对此文贡献均等; 此课题由张萍设计; 病例收集由张萍完成; 本论文写作由张萍、张东和李贻奎共同完成, 其中张东主要负责文章的结构、病理部分; 李贻奎主要负责诊断部分。
通讯作者: 张萍, 100029, 北京市, 北京中医药大学.
pingping09291103@126.com
收稿日期: 2010-09-25 修回日期: 2010-12-08
接受日期: 2010-12-25 在线出版日期: 2011-02-08

Cronkhite-Canada syndrome: a report of one case

Ping Zhang, Dong Zhang, Yi-Kui Li

Ping Zhang, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Dong Zhang, Department of Cardiology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China
Yi-Kui Li, Research Center, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China
Correspondence to: Ping Zhang, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China. pingping09291103@126.com
Received: 2010-09-25 Revised: 2010-12-08
Accepted: 2010-12-25 Published online: 2011-02-08

Abstract

Cronkhite-Canada syndrome (CCS) is a rare clinical entity of unknown etiology and has poor prognosis, characterized by gastrointestinal polyposis with ectodermal changes. Main clinical manifestations include chronic diarrhea, abdominal pain, alopecia, skin pigmentation, and nail changes. Here, we report a case of CCS in a 50-year-old male and review the relevant literature.

Key Words: Cronkhite-Canada syndrome; Gastrointestinal polyposis; Ectodermal changes; Skin pigmentation

Zhang P, Zhang D, Li YK. Cronkhite-Canada syndrome: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(4): 429-433

摘要

Cronkhite-Canada综合征(Cronkhite-Canada

syndrome, CCS)是以胃肠道多发息肉和外胚层三联征两大症候群为主, 临床表现为慢性腹泻、腹痛、脱发、皮肤色素沉着、指(趾)甲萎缩脱落等. 发病罕见, 病因不明, 预后较差. 本文报道CCS 1例, 通过病史及内镜检查并结合文献进行分析讨论, 提高对CCS的认识.

关键词: 胃肠道息肉-皮肤色素沉着-指(趾)甲萎缩综合征; 胃肠道息肉; 外胚层改变; 色素沉着

张萍, 张东, 李贻奎. 胃肠道息肉-皮肤色素沉着-指(趾)甲萎缩综合征1例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(4): 429-433
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/429.asp>

0 引言

Cronkhite-Canada综合征(Cronkhite-Canada syndrome, CCS)又称为胃肠道息肉-皮肤色素沉着-指(趾)甲萎缩综合征, 该病的病因和发病机制尚不清楚, 发病罕见. 2008年于北京中医药大学国医堂门诊部接诊1例.

1 病例报告

男, 50岁, 主因食欲不振、面部及手掌皮肤色素沉着8 mo于2008-03就诊于北医三院. 患者从2007-07开始出现面部及手掌发黑, 食欲不振, 食之无味, 间断出现腹泻, 稀便, 无黏液及脓血, 脱发. 于2007-09-18就诊于黑龙江中医药大学附属医院查: 血常规、尿常规、肾功能、血脂、血糖、白蛋白、超敏C反应蛋白、感染病筛查均正常, 肝功能ALT: 41 U/L, AST: 48 U/L稍增高, 腹部B超: 肝胆胰脾肾未见异常. 给予中药治疗. 患者于2007-09-24至哈尔滨医科大学附属医院行肠镜检查示: 结肠多发息肉. 病理: 升结肠: 黏膜慢性炎, 息肉样增生. 因息肉多、小, 未予特殊处理, 继续观察. 间断服用中药治疗, 具体不详. 2008年初患者发现眉毛、腋毛及全身汗毛开始脱落, 指甲、趾甲变粗糙, 凹凸不平, 全身皮肤发黑色素沉着, 胸腹部及四肢严重, 背部较轻, 食欲差, 且舌头发麻, 味觉稍减退, 时有腹泻, 体质量无明显减轻. 于2008-02-16就诊于郑

■背景资料

胃肠道息肉-皮肤色素沉着-指(趾)甲萎缩综合征(CCS)是一种以胃肠道息肉、色素沉着与外胚层病变为主要特征, 发病率极低, 是非家族性的综合征.

■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科; 万军, 主任医师, 中国人民解放军总医院南楼老年消化科

■相关报道

曹晓沧等分析了35例中国人CCS临床特点,发现患者以胃肠道多发息肉伴外胚层三联征为主要表现,慢性腹泻、腹痛、体质量下降、贫血、水肿等症状最为常见,2例患者合并癌变。

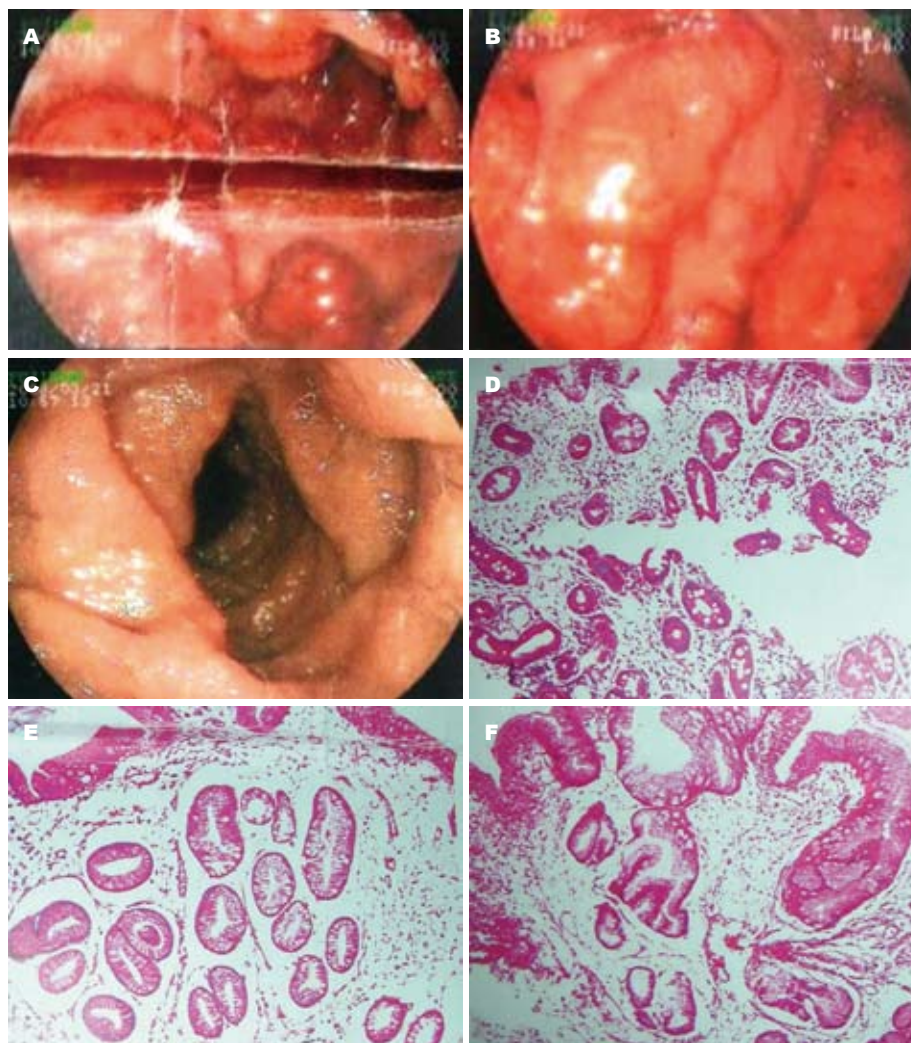


图1 2008-03-21胃镜及病理检查结果。A:胃体部:多发息肉样改变,呈圆形、条状,呈山田II-III型息肉充血;B:胃窦部;C:十二指肠降部:黏膜变薄,呈结节不平,部分充血,绒毛扁平;D:十二指肠球降交界病理:浅层黏膜水肿,局部有淋巴细胞浸润;E:窦大弯息肉病理;F:窦小弯息肉病理。

州大学第一附属医院,查24 h尿游离皮质醇、促肾上腺皮质激素、去氢皮质酮、微量元素、肝肾功、血脂、血糖等均正常。未予治疗。患者2008-03-10至哈尔滨医科大学附属第一医院做胃镜示:胃内多发息肉。未予治疗。患者于2008-03-18就诊于北京大学第三附属医院消化科,患者食欲不振,纳差,食后腹胀,无明显腹痛,大便稀,每日3-4次,偶有黏液,无便血,乏力,舌麻,味觉稍减退,口干渴,睡眠稍差。既往体健。家族中无类似疾病史。

查体:全身皮肤发黑,面部及手掌色素沉着明显,趾甲、指甲变厚粗糙,部分脱落,头发稀疏,眉毛、腋毛及全身汗毛细软、稀疏,浅表淋巴结不大,心肺正常,腹软,无压痛,肝脾未触及,双下肢不肿,神经系统未见异常。

结合症状及体征,怀疑CCS。为明确诊断,于2008-03-21行胃镜检查示:食管S-CJ 40 cm,黏膜光滑,血管网清晰,齿状线不规整,贲门口松弛。胃底正常,黏液池清,胃体花斑,角切迹花斑稍不平,胃窦花斑并多发息肉样病变,呈圆形,条

状,大小不一,0.6-3.0 cm,呈山田II-III型息肉充血,表面小区扩大,活检软。幽门正常。十二指肠球黏膜变薄,降部黏膜结节不平,部分充血,绒毛变平。结合患者指甲改变以及脱发考虑CCS。诊断:CCS。病理结果:(1)十二指肠降部及球降交界:中度慢性炎症。WS-;(2)“窦大弯息肉”浅层黏膜轻度慢性炎伴小凹略弯曲变长;WS-;(3)“窦小弯息肉”轻度慢性炎伴轻度充血、水肿,小凹上皮增生,小凹弯曲变长;WS-;(4)角切迹:浅层黏膜未见明显异常。WS-;(5)“窦大弯”体黏膜轻度慢性炎伴灶性淋巴细胞浸润。WS-。具体见图1所示。结合临床,病变符合CCS的息肉改变。

最终确诊为CCS。患者拒绝激素等西医疗,后至北京中医药大学孔光一教授处进行中医治疗。中医辨证为脾胃不足、瘀血阻络,治法:活血化瘀、和络调中。方用丹参30 g、赤芍15 g、当归6 g、郁金10 g、半夏10 g、黄芩10 g、麦冬20 g、桂枝6 g、甘草5 g、砂仁^{后下}6 g、白术10 g、炒山栀10 g、槐米10 g、螻虫^打10 g、

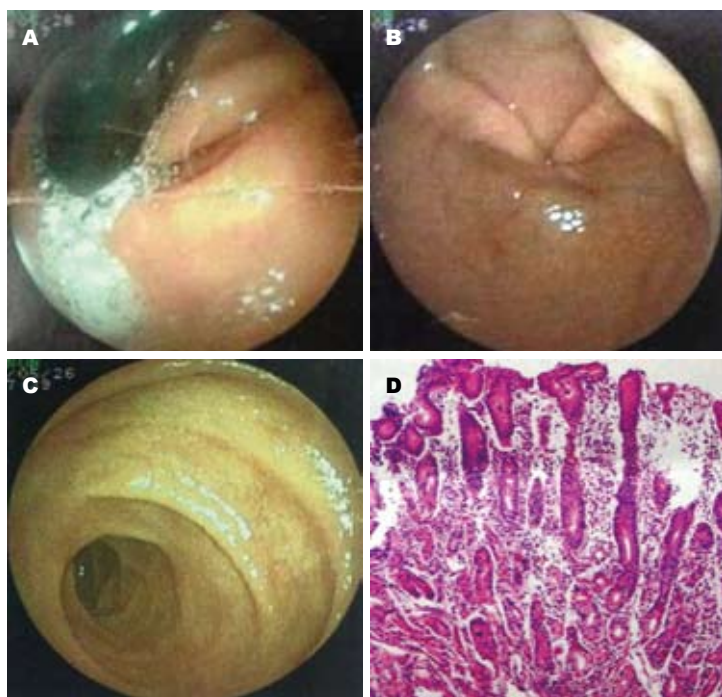


图 2 2010-05-26胃镜及病理结果. A: 贲门部: 黏膜光滑, 血管透见; B: 胃窦部: 黏膜花瓣, 血管透见; C: 十二指肠降部: 未见异常; D: 体小弯病理: 黏膜水肿, 淋巴细胞浸润.

■创新盘点
激素治疗本病的有效性虽未被大规模循证医学证实, 但已成为首选的经验用药. 而该例患者未曾用过激素等西医方法治疗, 完全经中医治疗, 随访2年半, 患者目前患者症状和胃镜检查均明显好转, 该病例仍在随访中.

红花6 g、太子参10 g、生苡仁20 g、柴胡10 g、青陈皮各6 g. 应用此法加减变化调整半年余. 以后根据病情变化以补气养血, 养阴清热, 平调阴阳为法, 方用生黄芪15 g、当归10 g、赤白芍^各10 g、怀牛膝10 g、蛇舌草15 g、杜仲10 g、麦冬30 g、石斛10 g、黄芩10 g、柴胡10 g、半夏10 g、枸杞10 g、丹参40 g、砂仁^{后下}8 g、甘草5 g、白术15 g、青陈皮^各6 g、太子参15 g、枳壳10 g、生苡仁30 g、桂枝8 g、制首乌15 g、干姜3 g、菊花10 g. 此后以此方为主, 并根据病情调整方药.

患者坚持中医治疗2年, 患者于2010-05-26在北医三院复查胃镜: 食管S-CJ 40 cm, 黏膜光滑, 血管网清晰, 齿状线不规整, 贲门口不松弛. 胃底花斑, 黏液池清, 胃体花斑, 血管透见, 角切迹光整、花斑, 胃窦花斑, 血管透见, 可见陈旧出血点. 幽门正常. 十二指肠球及降部未见异常. 诊断: 慢性萎缩性胃炎. 病理结果: (1) 窦小弯: 浅层黏膜轻度慢性炎(轻度活动). WS-; (2) 体小弯: (挤压)轻度慢浅炎(活动性). WS-(图2).

目前患者无明显不适症状, 四肢躯干部色素沉着消失, 仅面部及手掌部少许色素沉着, 指(趾)甲已经脱落长出完整正常新甲, 毛发亦重新长出. 目前该病例仍在随访中.

2 讨论

CCS由美国两位医师Leonard Wolsey Cronkhite Jr和Wilma Jeanne Canada于1955年首先报告^[1]. 1966

年Jarnum和Jensen将本征命名为Cronkhite-Canada综合征. 本病罕见, 目前国外文献报道超过400多例, 胃肠道息肉恶变发生率在10%左右^[2]. 小儿很少报道, 有75%为日裔人种^[3]. 国内至2010-03共报道44例. 病因迄今未明. 多数研究认为是一种获得性、非遗传性疾病, 可能与感染、缺乏生长因子、砷中毒、免疫紊乱有关^[4,5]. 大部分患者发病有诱因, 如精神刺激、过度劳累、长期服药或手术等. Senesse报道砷中毒可致外胚层与黏膜损害, 并从血、指甲中测得砷的存在. 提示砷中毒可能是其诱因. 亦有研究表明CCS患者存在高滴度抗核抗体和IgG4水平升高, 并同甲状腺机能减退和自身免疫性疾病相关^[6,7], 因此CCS病因可能与自身免疫异常有关. 本病例患者无砷中毒病史, 既往体健, 无长期服药病史及手术史, 辅助检查排除感染因素, 患者自诉长期在外奔波劳累, 精神压力较大, 情绪不稳定, 精神紧张, 故考虑患者的病因可能跟劳累和情绪精神等有关.

CCS以胃肠道多发息肉伴外胚层变化如脱发、指(趾)甲萎缩脱落、皮肤色素沉着等为特征. 偶有伴发味觉减退、周围神经病变、白内障、舌乳头萎缩、脑萎缩、多发性骨髓瘤等疾病^[8,9], 但Goto^[10]发现在日本大约41%的患者以味觉减退, 为首表现, CCS胃肠道息肉分布可遍及整个消化道, 以胃、结肠最常见, 其次是直肠、小肠, 尚无发生于食管的报道. 息肉呈弥漫分布, 大小不等, 多为无蒂或广基息肉, 常数十

同行评价

本文科学性和新颖性较好, 有较好的临床意义。

或为数以百计, 呈结节状或不规则状, 息肉黏膜充血水肿明显, 黏膜皱襞增厚, 巨大的黏膜皱襞在胃大弯最显著. 组织病理学上多表现为胃、肠慢性炎性改变, 腺体减少, 腺腔囊状扩张, 囊内大量黏液, 间质明显水肿, 伴炎性细胞浸润; 也可为炎性增生性、腺瘤性或幼年性息肉(错构瘤).

临床上消化道症状表现为慢性腹泻、腹痛、便血等. 其中腹泻是最突出的临床表现, 多为水样便、糊状便, 极少出现便血或脓血便. 曹晓沧等^[12]分析了35例中国人CCS临床特点, 发现患者以胃肠道多发息肉伴外胚层三联征为主要表现, 慢性腹泻、腹痛、体质量下降、贫血、水肿等症状最为常见, 2例患者合并癌变. 慢性腹泻多数学者认为腹泻可能与胃肠道息肉过度分泌、脂肪和碳水化合物吸收不良、肠道中获得性双糖酶缺乏、免疫力低下及肠道菌群失调有关.

CCS皮肤表现为弥漫性色素沉着, 好发于面部和手掌、足跖、手背、足背等处; 也可表现为斑点状, 多见于口唇及其周围、口腔黏膜、会阴等处. 90%患者有毛发脱落, 常为泛发性, 如头发、眉毛、胡须、腋毛、阴毛、四肢毛发等皆可脱落. 常并发明显的甲改变, 表现为甲营养不良、甲分离、甲脱落等. 以前认为CCS外胚层的变化是继发于胃肠道吸收不良, 但后来发现很多患者外胚层改变要早于胃肠道症状数周甚至数月, 二者的关系目前尚不清楚.

消化内镜是诊断本病最为直观的检查方法, 其中胃镜和结肠镜是确诊CCS的主要手段, 胶囊内镜和双气囊电子小肠镜正逐步开展.

CCS诊断主要依据如下: (1)成年发病, 男性多见; (2)无家族史; (3)全胃肠道多发息肉, 表现为腹泻、腹痛伴食欲不振、纳差、体质量下降等症状; (4)有外胚层病变如皮肤色素沉着、脱发、指(趾)甲萎缩等; (5)病理活检示息肉有上皮细胞覆盖, 腺体增生呈囊性扩张, 细胞间质水肿并可见炎性细胞浸润^[13,14].

本例患者发病及临床表现较为典型, 男性, 成年发病, 无家族病史, 症状先出现手掌部、面部色素沉着, 后出现食欲不振, 腹泻, 稀便, 脱发, 再后来出现眉毛、腋毛及全身汗毛开始脱落, 指甲、趾甲变粗糙, 凹凸不平, 部分脱落, 同时出现味觉减退. 行胃肠镜见多发息肉, 结节状或不规则状, 呈山田II-III型息肉充血表现. 病理见: 胃肠道慢性炎症改变, 间质水肿, 伴有淋巴细胞浸润. 符合CCS诊断的5条, 故可以明确诊断.

CCS的治疗方法包括内科保守治疗和外科手术. 内科保守治疗包括营养支持治疗、糖皮质激素、抗生素、抗凝剂、组胺受体拮抗剂等药物治疗及内镜下息肉摘除. 少数患者仅接受营养支持治疗可获部分缓解^[15]. 内镜下息肉摘除适用于局限、单发息肉, 可改善症状, 但术后有复发报道. 目前激素治疗本病的有效性虽未被大规模循证医学证实, 但已成为首选的经验用药, 小剂量激素治疗患者可长期缓解, 同时胃肠切除术后及内镜下息肉摘除复发者应用激素治疗仍可获得满意疗效^[16,17], 激素治疗的机制可能与减轻胃肠道炎症及抑制自身免疫反应等有关.

外科手术治疗适用于息肉癌变、消化道梗阻及蛋白丢失性肠病者, 且激素治疗效果不理想或禁忌时也可手术治疗^[18-21].

CCS病情常进行性发展, 预后较差. 若有足够的支持治疗可有效改善患者的生活质量, 降低病死率, 40%-50%的患者长期存活, 而50%-60%的患者无论采取何种治疗方法在确诊后2年内死亡, 女性的预后似乎更差^[12]. 患者常死于CCS的并发症, 如胃肠道出血、继发感染、全身衰竭、恶病质、充血性心力衰竭等.

本病例未采用激素、手术等内外科治疗, 应用中医中药治疗, 目前患者无明显不适症状, 四肢躯干部色素沉着消失, 仅面部及手掌部少许色素沉着, 指(趾)甲已经脱落长出完整正常新甲, 毛发亦重新长出. 2010-05胃镜检查与2008-03比较: 息肉基本消失, 呈现慢性胃炎表现. 至今随访3年, 患者目前生活、精神状态良好. 该病例仍在随访中.

3 参考文献

- 1 Cronkhite LW Jr, Canada WJ. Generalized gastrointestinal polyposis; an unusual syndrome of polyposis, pigmentation, alopecia and onychotrophy. *N Engl J Med* 1955; 252: 1011-1015
- 2 Yashiro M, Kobayashi H, Kubo N, Nishiguchi Y, Wakasa K, Hirakawa K. Cronkhite-Canada syndrome containing colon cancer and serrated adenoma lesions. *Digestion* 2004; 69: 57-62
- 3 Riegert-Johnson DL, Osborn N, Smyrk T, Boardman LA. Cronkhite-Canada syndrome hamartomatous polyps are infiltrated with IgG4 plasma cells. *Digestion* 2007; 75: 96-97
- 4 Takeuchi Y, Yoshikawa M, Tsukamoto N, Shiroy A, Hoshida Y, Enomoto Y, Kimura T, Yamamoto K, Shiiki H, Kikuchi E, Fukui H. Cronkhite-Canada syndrome with colon cancer, portal thrombosis, high titer of antinuclear antibodies, and membranous glomerulonephritis. *J Gastroenterol* 2003; 38: 791-795

- 5 钱可大. Cronkhite-Canada综合征. 中国实用内科杂志 2000; 20: 80-81
- 6 Qiao M, Lei Z, Nai-Zhong H, Jian-Ming X. Cronkhite-Canada syndrome with hypothyroidism. *South Med J* 2005; 98: 575-576
- 7 Daniel ES, Ludwig SL, Lewin KJ, Ruprecht RM, Rajacich GM, Schwabe AD. The Cronkhite-Canada Syndrome. An analysis of clinical and pathologic features and therapy in 55 patients. *Medicine (Baltimore)* 1982; 61: 293-309
- 8 Naoshima-Ishibashi Y, Murofushi T. A case of Cronkhite-Canada syndrome with vestibular disturbances. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004; 261: 558-559
- 9 Blonski WC, Furth EE, Kinosian BP, Compber C, Metz DC. A case of Cronkhite-Canada syndrome with taste disturbance as a leading complaint. *Digestion* 2005; 71: 201-205
- 10 Goto A. Cronkhite-Canada syndrome: epidemiological study of 110 cases reported in Japan. *Nippon Geka Hokan* 1995; 64: 3-14
- 11 Gomes da Cruz GM. Generalized gastrointestinal polyposis. An unusual syndrome of adenomatous polyposis, alopecia, onychorotrophia. *Am J Gastroenterol* 1967; 47: 504-510
- 12 曹晓沧, 周斌, 丁娟娟, 连佳, 陆宁, 王邦茂. 35例中国人Cronkhite-Canada综合征临床分析. 中华医学杂志 2007; 87: 3130-3132
- 13 武希润, 王玲, 王琦. Cronkhite-Canada综合征-附1例报告并国内文献复习. 罕见疾病杂志 2005; 12: 35-37
- 14 田字彬, 孔心涓, 薛会光, 厉海妮, 魏良洲, 张鹏, 赵清喜. 食欲不振、脱发、指趾甲萎缩、皮肤色素沉着、腹泻. 中国实用内科杂志 2009; 29: 1069-1071
- 15 Nakayama M, Muta H, Somada S, Maeda T, Mutoh T, Shimizu K, Suehiro Y, Hisano T, Kurita R, Shirai-shi T, Mori M, Yoshikawa Y, Tsunetomi N, Uchida A, Tani K. Cronkhite-Canada syndrome associated with schizophrenia. *Intern Med* 2007; 46: 175-180
- 16 Murata I, Yoshikawa I, Endo M, Tai M, Toyoda C, Abe S, Hirano Y, Otsuki M. Cronkhite-Canada syndrome: report of two cases. *J Gastroenterol* 2000; 35: 706-711
- 17 方卫纲, 杨爱明, 方秀才. Cronkhite-Canada综合征的诊治探讨. 中华消化内镜杂志 1999; 16: 181-182
- 18 Yamaguchi K, Ogata Y, Akagi Y, Sasatomi T, Ozaki K, Ohkita A, Ikeda H, Shirouzu K. Cronkhite-Canada syndrome associated with advanced rectal cancer treated by a subtotal colectomy: report of a case. *Surg Today* 2001; 31: 521-526
- 19 Hanzawa M, Yoshikawa N, Tezuka T, Konishi K, Kaneko K, Akita Y, Mitamura K, Tsunoda A, Takeda M, Kusano M. Surgical treatment of Cronkhite-Canada syndrome associated with protein-losing enteropathy: report of a case. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 932-934
- 20 Tseng KC, Sheu BS, Lee JC, Tsai HM, Chiu NT, Dai YC. Application of technetium-99m-labeled human serum albumin scan to assist surgical treatment of protein-losing enteropathy in Cronkhite-Canada syndrome: report of a case. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 870-873
- 21 Egawa T, Kubota T, Otani Y, Kurihara N, Abe S, Kimata M, Tokuyama J, Wada N, Suganuma K, Kuwano Y, Kumai K, Sugino Y, Mukai M, Kitajima M. Surgically treated Cronkhite-Canada syndrome associated with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2000; 3: 156-160

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 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

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

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