

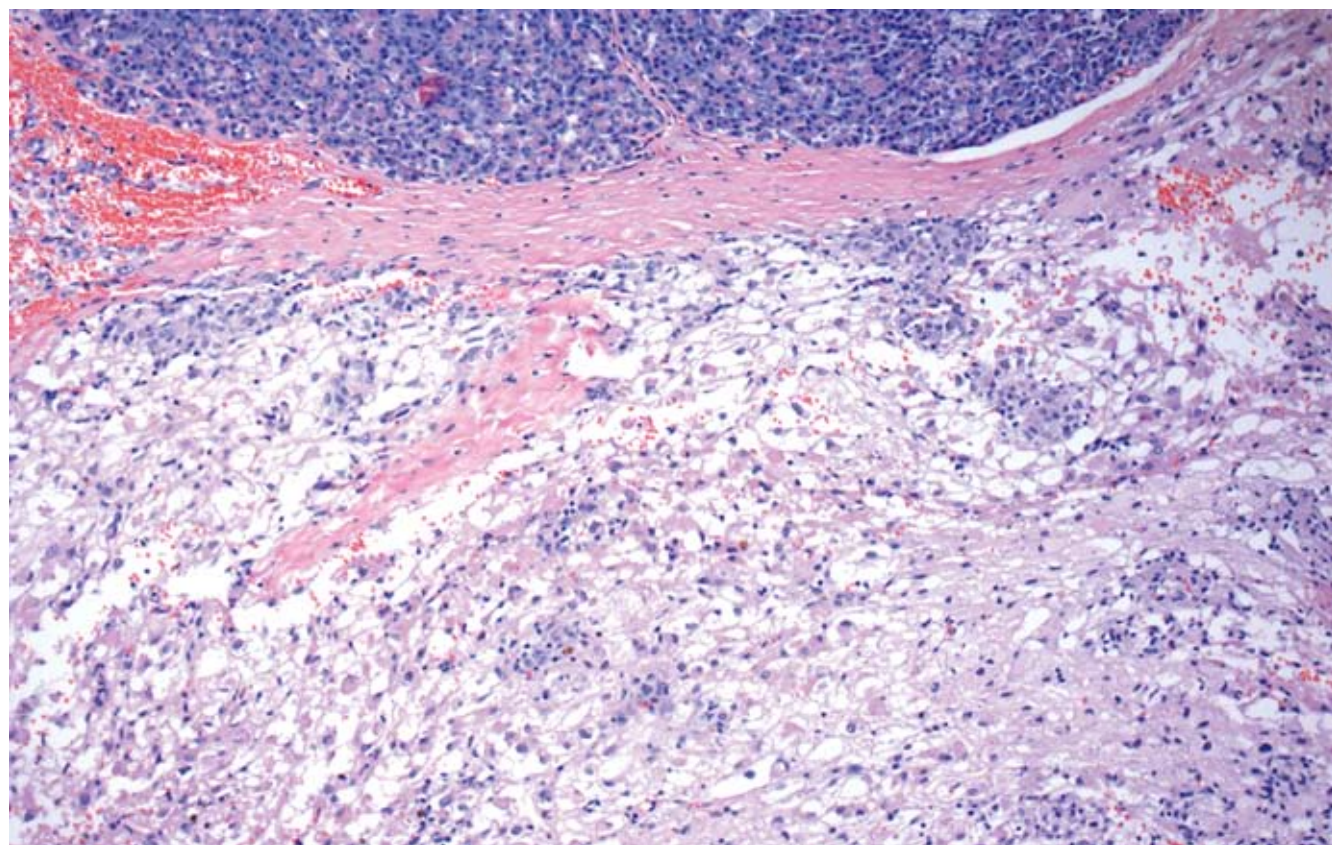
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

## WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2011年3月28日 第19卷 第9期 (Volume 19 Number 9)



# 9/2011

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

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

### 常务编委

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

### 编委

#### 消化内科学

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

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

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

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

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

林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘海林主任医师  
刘铁夫教授  
刘莹副主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
吕志武教授  
马红主任医师  
马欣主任医师

毛高平教授  
孟庆华教授  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵王玉教授

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

田宇彬教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授

许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
张晓岚教授  
张筱茵副教授

张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师  
周国雄主任医师  
周晓东副教授  
周宇教授  
朱春兰主任医师  
邹晓平主任医师  
诸琦教授

#### 消化外科学

白雪巍副主任医师  
蔡开琳副教授

蔡三军主任医师  
曹杰主任医师  
陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈力教授  
陈立波教授  
陈凜教授  
陈强谱教授  
陈汝福教授

陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
崔云甫教授

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

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

何晓顺教授  
何裕隆教授  
黄志勇教授  
季加孚教授  
姜卫东教授  
姜波健教授  
蒋龙元副教授  
金山副教授  
黎乐群教授  
李革副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师  
李杰教授

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

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

张宗明教授  
赵刚副教授  
智绪亭教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

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

庄林主任医师

### 消化中医学

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

### 消化肿瘤学

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

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授

韩新巍教授  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
倪才方教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐辉雄教授  
徐克教授  
严惟力副教授  
杨业发教授  
杨建勇教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

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

### 消化中西医结合学

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

### 消化基础研究

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

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

### 消化病理学

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

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011年3月28日 第19卷 第9期 (总第341期)

述 评	881 转运体在肝脏中的作用 孟强, 刘克辛
基础研究	887 $\beta$ 2糖蛋白I与乙型肝炎表面抗原的结合作用 何川, 高普均, 荆雪, 吴扬 892 JNK信号通路介导MDR1/P-gp调控人结肠癌多药耐药 隋华, 周利红, 殷佩浩, 王炎, 范忠泽, 周树峰, 李琦 899 眼针对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠水通道蛋白3表达的影响 王艳杰, 刘慧慧, 刘旭东, 柴纪严, 赵金茹, 王德山 905 联合转染Survivin shRNA和CD44v3 shRNA对结直肠癌SW480细胞增殖和侵袭能力的影响 郭勇杭, 刘中宏, 许军, 姚媛媛, 黄平
临床研究	912 DOG1、CD117和PDGFRA在胃肠道间质瘤中的表达及相关性 隋杏玲, 郝旺, 孙秀威
文献综述	919 晚期胃癌分子靶向治疗的现状及其发展趋势 曲晶磊, 刘云鹏 925 造血干细胞分化成肝细胞的可能性 盛瑜, 韩国庆 930 核苷类似物治疗乙型肝炎病毒感染相关肝衰竭患者的临床研究进展 刘江福, 张琳, 冯国和 936 槲皮素对结肠癌作用及其机制的研究进展 周阿成, 金黑鹰, 张春霞, 王水明
研究快报	940 TIM4对小鼠食物过敏模型中抗原特异性Th2细胞分化的影响 杨慧敏, 郑鹏远, 刘志强, 李付广, 王新亭
临床经验	946 环境及居民体内钼含量与胃癌的相关性 肖景榕, 周衍, 陈增春, 陈伯扬, 陈华英, 林才浩, 应敏刚 950 蛋白激酶C $\theta$ 对胃肠道间质瘤的诊断价值 杨颖, 刘潇, 叶余丰, 王孟春 956 急性缺血性脑血管病后胃肠道出血607例 张新宇, 王丽平, 沈扬, 李小刚 960 肝细胞癌冷冻消融术后早期复发的危险因素 杨茂, 郭志, 李保国 964 胰腺血管周上皮样细胞肿瘤的临床病理特点 谢飞来, 宋岫娜, 曲利娟, 余英豪, 郑智勇 969 代谢综合征与中老年人结直肠腺瘤型息肉的关系 郭美霞, 张晓华, 朱人敏, 杨妙芳, 吴晓尉 972 COX-2、15-PGDH在结直息肉组织中的表达及其作用 方兴国, 赵遼, 杨芳, 周元昆, 王红

	976 艾灸联合穴位注射对慢传输型便秘患者胃动素的影响 齐晶晶, 李志海, 潘国宏, 黄强, 魏蕴慧
病例报告	981 胃肠隐球菌病1例 雷静静, 薄莉, 周力
附录	984 《世界华人消化杂志》投稿须知 989 2011年国内国际会议预告
志 谢	990 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	886 《世界华人消化杂志》出版流程 891 《世界华人消化杂志》修回稿须知 918 《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》 924 《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》 935 <i>WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR</i> 6本期刊被PMC收录 939 《世界华人消化杂志》正文要求 945 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 949 汤姆森-路透公布2009年 <i>WJG</i> 影响因子2.092 955 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 959 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 980 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
封面故事	谢飞来, 宋屿娜, 曲利娟, 余英豪, 郑智勇. 胰腺血管周上皮样细胞肿瘤的临床病理特点. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 964-968 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/964.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/964.asp</a>
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

# 世界华人消化杂志

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创刊 1993-01-15

改刊 1998-01-25

出版 2011-03-28

原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣

总编辑 马连生

编辑部主任 李军亮

期刊名称 世界华人消化杂志

主管单位 山西省科学技术厅

主办单位 太原消化病研治中心

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

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

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

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

**印刷** 北京科信印刷厂

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

**订购** 全国各地邮电局

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

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

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

### 特别声明

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

2011年版版权归世界华人消化杂志所有

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

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

# World Chinese Journal of Digestology

## March 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 9

<b>EDITORIAL</b>	881 Role of transporters in the pathogenesis of liver disease <i>Meng Q, Liu KX</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	887 Factors affecting binding of beta 2-glycoprotein I to hepatitis B surface antigen in the serum of patients with chronic hepatitis B <i>He C, Gao PJ, Jing X, Wu Y</i> 892 JNK signal transduction pathway regulates MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in colon carcinoma cells <i>Sui H, Zhou LH, Yin PH, Wang Y, Fan ZZ, Zhou SF, Li Q</i> 899 Eye acupuncture therapy up-regulates aquaporin 3 expression in the colon of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome <i>Wang YJ, Liu HH, Liu XD, Chai JY, Zhao JR, Wang DS</i> 905 Combined transfection of shRNAs targeting survivin and CD44v3 inhibits proliferation and reduces invasion in human colorectal carcinoma cell line SW480 <i>Guo YH, Liu ZH, Xu J, Yao YY, Huang P</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	912 Expression of DOG1, CD117 and PDGFRA in gastrointestinal stromal tumors <i>Sui XL, Hao W, Sun XW</i>
<b>REVIEW</b>	919 Molecularly targeted therapy for gastric cancer: current status and future prospects <i>Qu JL, Liu YP</i> 925 Possibility of differentiation of hematopoietic stem cells into liver cells <i>Sheng Y, Han GQ</i> 930 Advances in treatment of HBV-related liver failure with nucleoside analogues <i>Liu JF, Zhang L, Feng GH</i> 936 Advances in understanding preventive and therapeutic effects of quercetin against colon cancer and mechanisms involved <i>Zhou AC, Jin HY, Zhang CX, Wang SM</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	940 TIM4 modulates antigen-specific Th2 cell differentiation in mice with food allergy <i>Yang HM, Zheng PY, Liu ZQ, Li FG, Wang XT</i>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	946 Association between environmental molybdenum levels and risk of gastric cancer <i>Xiao JR, Zhou Y, Chen ZC, Chen BY, Chen HY, Lin CH, Ying MG</i> 950 Diagnostic value of protein kinase C theta for gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis <i>Yang Y, Liu X, Ye YF, Wang MC</i> 956 Gastrointestinal hemorrhage after acute ischemic stroke: an analysis of 607 cases <i>Zhang XY, Wang LP, Shen Y, Li XG</i> 960 Risk factors for early recurrence after cryoablation for hepatocellular carcinoma <i>Yang M, Guo Z, Li BG</i> 964 Clinicopathologic features of perivascular epithelioid cell tumor of the pancreas <i>Xie FL, Song YN, Qu LJ, Yu YH, Zheng ZY</i> 969 Correlation between metabolic syndrome and colorectal adenomatous polyps in middle- and old-aged patients

	<p><i>Guo MX, Zhang XH, Zhu RM, Yang MF, Wu XW</i></p> <p>972 Role of COX-2 and 15-PGDH expression in colorectal tumorigenesis <i>Fang XG, Zhao K, Yang F, Zhou YK, Wang H</i></p> <p>976 Moxibustion in combination with point injection increases motilin levels in patients with slow transit constipation <i>Qi JJ, Li ZH, Pan GH, Huang Q, Wei YH</i></p>
<b>CASE REPORT</b>	<p>981 Gastrointestinal cryptococcosis: a report of one case <i>Lei JJ, Po L, Zhou L</i></p>
<b>APPENDIX</b>	<p>984 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>989 Meeting events calendar in 2011</p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>990 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Xie FL, Song YN, Qu LJ, Yu YH, Zheng ZY</i>. Clinicopathologic features of perivascular epithelioid cell tumor of the pancreas. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(9): 964-968 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/964.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/964.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Wei Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993  
Renamed on January 25, 1998  
Publication date March 28, 2011

### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

### RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology of Shanxi Province

### SPONSOR

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

### EDITING

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

### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

### PUBLISHING

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

### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

### SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

### SUBSCRIPTION

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

### CSSN

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

### COPYRIGHT

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

### SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

# 转运体在肝脏中的作用

孟强, 刘克辛

孟强, 刘克辛, 大连医科大学药学院临床药理教研室 辽宁省大连市 116044

刘克辛, 教授, 博士生导师, 主要从事肝脏转运体与肝病药物治疗方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81072694; No. 30873118; No. 30672498

国家高技术研究发展计划(863计划)基金资助项目, No. 2006AA020605

作者贡献分布: 本文综述由孟强完成; 刘克辛审校。

通讯作者: 刘克辛, 教授, 116044, 辽宁省大连市旅顺口区旅顺南路西段9号, 大连医科大学药学院临床药理教研室。

kexinliu@dlmedu.edu.cn

电话: 0411-86110407

收稿日期: 2011-01-21 修回日期: 2011-02-08

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-03-28

## Role of transporters in the pathogenesis of liver disease

Qiang Meng, Ke-Xin Liu

Qiang Meng, Ke-Xin Liu, Department of Clinical Pharmacology, College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81072694, 30873118, 30672498; and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA020605

Correspondence to: Professor Ke-Xin Liu, Department of Clinical Pharmacology, College of Pharmacy, Dalian Medical University, 9 West Section, South Lvshun Road, Lvshunkou District, Dalian 116044, Liaoning Province, China. kexinliu@dlmedu.edu.cn

Received: 2011-01-21 Revised: 2011-02-08

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-03-28

### Abstract

Hepatic transporters are a class of proteins located on the membrane of hepatocytes. They are responsible for uptake of endogenous substances, nutrients and exogenous substances into hepatocytes and excretion of their metabolic products into bile. Recent studies have provided clear evidence that decline or loss of function of transporters caused by gene mutations is related with development of a variety of liver diseases. In recent years, transporter functions and the relevance of transporters to liver diseases and liver-targeted therapy have become hot topics of research. In this paper, we summarize the classification of hepatic transporters and the relation of hepatic transporters to liver diseases and liver-targeted therapy.

**Key Words:** Hepatic transporters; Liver disease; Liver-targeted therapy

Meng Q, Liu KX. Role of transporters in the pathogenesis of liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 881-886

### 摘要

肝脏转运体是一类近20年发现的位于肝细胞膜上的蛋白质,其生理功能是将大多数内源性物质、营养物质和外源性物质等摄取进入肝脏,经过一定的代谢转化,最终将其从肝脏排入胆汁。最近已有明确的证据表明,转运体基因发生突变引起的功能下降或缺失与肝脏多种疾病的发生休戚相关,其表达水平受到多种因素的调节。近年来,转运体的功能及其与疾病、药物靶向治疗的相关性已成为研究热点。本文就肝脏转运体的分类、与肝脏疾病发生的关系及药物肝靶向治疗作一综述。

**关键词:** 肝脏转运体; 肝病; 肝靶向药物治疗

孟强, 刘克辛. 转运体在肝脏中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 881-886

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/881.asp>

### 0 引言

肝脏转运体是一类近20年发现的位于肝细胞膜上的蛋白质,通常由12个跨膜多肽链组成,膜外有糖基化区域。肝脏转运体可识别大多数内源性物质(胆汁酸、胆盐和胆红素等)、营养物质和外源性物质(药物等),将他们摄取进入肝脏,经过一定的代谢转化,最终将其从肝脏排入胆汁<sup>[1]</sup>。近年研究发现,转运体基因发生突变引起的功能下降或缺失与肝脏多种疾病的发生休戚相关。肝细胞窦状隙膜和胆管侧膜上的转运体功能下降是许多肝脏疾病包括原发性胆汁性肝硬化、进行性家族性肝内胆汁淤积、Dubin-Johnson综合征和肝囊性纤维化等发病的关键因素<sup>[2-4]</sup>。此外,转运体的表达水平还受多种因素调节,如机体的病理状态、激素、药物和环境等<sup>[5,6]</sup>,这些因素使得转运体介导的药物转运在不同状态下呈

### ■背景资料

随着膜分子生物学和遗传基因学突飞猛进的发展,研究者在机体的各组织器官中发现了许多与物质转运相关的转运体。肝脏是人体最重要的代谢和解毒器官,肝脏转运体的功能和表达与多种肝病的发生发展休戚相关,如部分肝脏转运体的基因缺陷是导致原发性胆汁性肝硬化、进行性家族性肝内胆汁淤积、Dubin-Johnson综合征和肝囊性纤维化等的关键因素。许多内外在因素可影响转运体的功能表达,致使转运体介导的药物转运在不同状态下呈现出较大的个体间差异。

### ■同行评议者

汪思应, 教授, 安徽医科大学实验动物中心



## ■ 研发前沿

目前,肝脏转运体的功能及表达与疾病、药物靶向性的相关性成为研究热点之一。

现出较大的个体间差异,同一转运体在不同个体的表达也表现很大差别,同一药物在不同个体的体内过程差异显著,因此,目前非常重视转运体的功能及与疾病、药物安全性的相关性研究。对肝脏转运体进行研究,必将加深对多种肝病发病机制的理解和认识,也有助于发现肝病治疗的新靶点,进而利用转运体的功能选择性提高药物靶向部位的分布,避免分布到不良反应发生的非靶部位,调控药物的体内过程,从而提高肝病药物治疗的安全性和有效性。本文就肝脏转运体的分类、与肝脏疾病发生的关系及药物肝靶向治疗作一综述。

### 1 肝脏转运体的种类及功能

人的肝脏约由25亿个肝细胞组成,肝细胞为多角形,肝细胞表面可分为窦状隙膜面、肝细胞面和胆管侧膜面3种。肝细胞的窦状隙膜面和胆管侧膜面上分别存在着许多与内源性物质和外源性物质转运相关的转运体。人类基因组术语委员会(the human genome term committee, HGNC)根据转运体的转运特点将转运体分为两类,分别是易化扩散型或继发性主动转运体(可溶性载体, solute carrier, SLC)和原发性主动转运体(ATP-结合盒),目前已经确认约300个SLC转运体基因和56个ATP-结合盒转运体基因<sup>[7]</sup>。肝脏转运体根据转运功能又可分为5类:葡萄糖转运体、氨基酸转运体、一元羧酸转运体、有机离子转运体和ATP-结合盒转运体,前4种属于SLC转运体。目前,肝脏转运体常根据转运方向的不同进行分类,分为摄取性和外排性转运体。位于肝细胞窦状隙膜面上的转运体负责将内、外源性物质从肝血流中摄取入肝细胞,进入肝细胞内的物质经过一定的代谢,然后经肝细胞胆管侧膜面的转运体排泄到胆汁中,最后经胆汁排入肠道。目前研究已揭示的人的肝脏丰富表达的转运体,包括位于肝细胞窦状隙膜上的摄取性转运体,分别为Na<sup>+</sup>-牛磺胆酸共转运多肽(Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)<sup>[8]</sup>,有机阳离子转运体(organic cation transporter, OCT),有机阴离子转运体(organic anion transporter, OAT),有机阴离子转运多肽(organic anion transporting polypeptide, OATP)<sup>[9]</sup>,有机可溶性转运体(organic solute transporter, OST)及外排性转运体多药耐药相关蛋白-3, 4(multidrug resistance-associated protein 3, 4, MRP3、MRP4);位于胆管侧膜上的外排性转运体为P-糖蛋白

(P-glycoprotein, P-gp),多药耐药相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)<sup>[10]</sup>,胆酸盐外排泵(bile salt export pump, BSEP)和乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)。

### 2 转运体与肝脏疾病发生的关系

2.1 肝脏转运体基因突变与肝内胆淤积 肝细胞窦状隙膜和胆管侧膜上的转运体是胆盐和胆红素的载体,在肝摄取和胆汁分泌过程中发挥着至关重要的作用<sup>[11]</sup>。人体内的内源性物质如结合型和未结合型胆酸、胆红素经由肝细胞窦状隙膜上NTCP, OATP-A(或称作OATP1、OATP1A2)、OATP-C(或称作OATP2、OATP1B1)和OATP8(或称作OATP1B3)摄取进入肝细胞,一价胆汁酸经由肝细胞胆管侧膜上的BSEP排入胆汁,二价胆汁酸及结合型胆红素等通过MRP2、BCRP或P-gp等转运进入胆汁中,因此,如果转运体表达减少或功能下降,便可引起胆汁淤积的发生。肝内胆淤积常见于原发性胆汁性肝硬化、病毒性肝炎、家族性胆汁淤积、妊娠、药物(如氯丙嗪、硫脲嘧啶、红霉素、口服避孕药、保泰松、异烟肼等)及全身感染等。最近研究表明,肝内胆淤积的发病原因主要是由于肝细胞窦状隙膜或胆管侧膜上的转运体表达减少,导致肝细胞对胆酸摄取障碍或从肝细胞排泄到胆汁过程障碍,致使胆汁成分如胆盐和胆红素等在血液中滞留,血清中胆盐和胆红素含量过高,患者表现出黄疸症状<sup>[12]</sup>。对肝细胞表面转运体的功能变化进行研究,可为更透彻地阐明胆汁淤积发生机制以及临床更有针对性地治疗胆汁淤积疾病提供新思路和新亮点。

2.1.1 BSEP基因缺陷与进行性家族性肝内胆淤积2: 研究发现, BSEP功能缺陷可导致进行性家族性肝内胆淤积2(progressive familial intrahepatic cholestasis 2, PFIC2)<sup>[13]</sup>。由于BSEP参与肝细胞胆管侧膜的胆酸盐的分泌,若编码BSEP转运体的ABCB11基因发生突变,便会引起常染色体隐性遗传胆汁淤积症,组织形态学上表现为肝门纤维化和胆管增生。BSEP失去转运结合胆盐(牛磺鹅去氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺熊去氧胆酸和甘氨酸胆酸)的能力,表现为胆汁分泌障碍,胆汁中胆酸含量降低。婴儿期持续胆汁淤积会引发肝硬化,最终导致肝功衰竭。

2.1.2 MDR3基因缺陷与进行性家族性肝内胆淤积3: MDR3表达于肝细胞的胆管侧膜上,是

磷脂酰胆碱的最重要转运体, 由基因ABCB4编码. MDR3基因缺陷, 可导致原始胆汁成分失衡, 胆汁中磷脂酰胆碱含量不足、胆酸盐相对过剩, 由此引起胆小管的损伤, 引发进行性家族性肝内胆汁淤积3(PFIC3), 肝组织表现出肝纤维化转向肝硬化. 常见于婴幼儿和妊娠妇女, 女性在妊娠期间出现MDR3基因突变, 表现出肝内胆汁淤积症状, 从而引起胎儿窘迫、自发性早产及原因不明的妊娠晚期胎死宫内或分娩出的婴儿先天MDR3缺陷<sup>[14]</sup>.

**2.2 MRP2基因缺陷与Dubin-Johnson综合征** Dubin-Johnson综合征, 又称为慢性特发性黄疸, 为遗传性结合胆红素增高I型, 1954年Dubin等首先报道. 其临床表现特点为长期性或间歇性的轻中度黄疸、尿色加深; 右上腹不适或隐痛、乏力、食欲不振、恶心、呕吐; 肝脾轻度肿大或轻微压痛. 常见于青年人, 世界各地均有病例报道. 研究发现, Dubin-Johnson综合征的发生原因是患者肝细胞胆管侧膜上MRP2转运体表达先天缺陷, 是常染色体隐性遗传病, 结合胆红素从肝细胞排泄入胆汁过程发生障碍, 致使结合胆红素反流入血, 表现为慢性或间歇性结合性血胆红素过多症, 诱发黄疸<sup>[15]</sup>. Dubin-Johnson综合征的发病机制有别于肝内胆汁淤积, 前者是结合型胆红素分泌障碍引起, 后者是由于胆汁分泌障碍导致. Wakusawa等<sup>[16]</sup>对Dubin-Johnson综合征患者的MRP2基因进行了突变分析, 发现外显子16中的2026G-->C发生突变, 致使位于MRP2蛋白的第一核苷酸结合区Walket A模体的676位的甘氨酸到精氨酸出现转录障碍, 引起MRP2应有的外排结合型胆红素等物质入胆汁的功能缺陷, 导致大量未结合和结合型胆红素反流入血, 血中胆红素含量急剧增多, 患者表现出黄疸症状. 后来, Machida等<sup>[17]</sup>又发现外显子17的2125T>C纯合子发生突变, 致使其编码的709色氨酸到精氨酸出现转录故障, 引发MRP2功能缺陷.

**2.3 转运体基因缺陷与肝癌** 胆汁分泌对于维持肝脏的正常生理代谢功能至关重要, 若胆汁形成或分泌出现问题, 将对肝脏造成炎症性的损伤. ATP-结合盒转运体如P-gp和MRP2等, 是人体内负责将胆酸盐和胆红素等成分排泄入胆汁的载体, 具有保护肝细胞及避免因胆汁累积引起的肝毒性的作用. BSEP是胆酸盐的主要转运体; MDR3编码的P-gp和BCRP蛋白分别负责转运磷脂酰胆碱和胆固醇. 这些转运体的功能

下降或缺失将导致炎症肝损伤甚至肝癌. Wang等<sup>[18]</sup>用基因敲除的小鼠来考察转运体与肝癌发生的关系, 将编码Bsep转运体的基因从小鼠体内敲除, 使小鼠体内缺乏Bsep蛋白的表达, 制成Bsep-/-小鼠, 发现这种小鼠肝癌的发病率极低, 推测原因可能与Mdr1、Mrp3和Mrp4代偿性增多有关. 此外, BSEP功能缺陷可显著提高肝脏恶性肿瘤的发病率, 有研究表明, 15%的BSEP功能缺陷患者可发展为肝癌或胆管上皮癌<sup>[19,20]</sup>.

**2.4 转运体表达变化与非酒精性脂肪性肝病** 非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), 又称为非酒精性脂肪性肝病, 是一种肝组织学改变与酒精性肝病相类似, 但无过量饮酒史的临床病理综合征. 其病理变化随病程的进展而表现有单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和肝硬化. 近年来NAFLD的发病率呈明显的上升趋势, 已成为发达国家第一大慢性肝病及肝功能异常的首要病因, 普通成年人NAFLD患病率为17%-33%. Fisher等<sup>[21]</sup>为观察NAFLD病理状态下, 肝细胞窦状隙上转运体的表达情况, 采取给予大鼠高脂饮食和低甲硫氨酸-胆碱饮食8 wk, 分别制成大鼠单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎模型, 然后考察肝细胞窦状隙上转运体的表达情况与对照组相比, 是否出现变化. 研究结果发现, 高脂饮食和低甲硫氨酸-胆碱饮食的大鼠与正常饮食组相比, 肝窦状隙膜上的Ntcp、Oatpl1a、Oatpl1a4、Oatpl1b2、Oatp2b、Oat2和Oat3的mRNA表达明显减少. 此外, 脂肪性肝炎患者肝细胞胆管侧膜上的BCRP的表达减少<sup>[22]</sup>. Lickterg等<sup>[23,24]</sup>发现低甲硫氨酸-胆碱饮食的大鼠体内, Mrp2、Mrp3、Mrp4和Bcrp表达都增加, 其中Mrp3和Mrp4将肝细胞内的某些内源性和外源性物质排回至肝血流中.

### 3 肝脏转运体在药物临床应用中的研究

**3.1 利用转运体提高药物肝靶向性** 肝脏多种疾病如原发性胆汁性肝硬化、病毒性肝炎、家族性胆汁淤积等的治疗, 主要采取药物疗法. 药物向肝脏的转运受药物的脂溶性、分子量以及其他理化因素的影响. 由于转运体的存在决定了某些药物向靶部位及非靶部位的分布程度, 因此, 可利用肝脏转运体的转运能力来增强药物向肝内的分布, 避免向非靶部位分布, 从而提高药物的药理活性, 降低药物的不良反应. 鉴于肝细胞窦状隙膜上丰富表达着OATP, 可有效利用其作为靶点来提高药物的肝内分布. 文献中报

#### ■相关报道

Wendy等提出ATP8B1, BSEP和MDR3的基因缺陷可分别引发进行性家族性肝内胆汁淤积(PFIC)1、2和3型, 并从弥补转运体基因缺陷角度, 阐述了如何更有针对性、更有效地进行PFIC治疗的观点.

### ■创新盘点

本文总结了近年来肝脏转运体与部分肝脏疾病发生的关系,并在此基础上进一步阐述了肝脏转运体在临床肝脏治疗中的应用,对发现肝病治疗的新靶点,进而利用转运体的功能选择性提高药物靶向部位的分布有重要的指导意义。

道最多的是普伐他汀,一种高效的降血脂药物,其靶器官为肝脏,在肝内可抑制HMG-CoA及胆固醇合成。普伐他汀脂溶性弱,不易透过生物膜进入到肝细胞内,但由于他是OATP1B1的底物,可被OATP1B1转运至细胞内,发挥其药理作用,再经胆管侧膜上的MRP2和BSEP排入胆汁,然后排至十二指肠,被重吸收形成肠肝循环,提高了其生物利用度和药理作用<sup>[25,26]</sup>。近来有明确的证据表明,肝脏转运体的表达受到肝细胞核受体的调控。肝细胞核受体包括视黄醇类X受体、孕烷X受体和构型雄甾烷受体等。疾病、激素和药物等在影响肝细胞核受体表达的同时,也调节了转运体的表达。肝脏常见疾病原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、妊娠性肝内胆汁淤积、进行性家族性肝内胆汁淤积、肝囊性纤维化和药物引起的胆汁淤积等常伴有胆汁淤积症状。肝细胞表面参与胆汁酸摄取和胆汁分泌的转运体的表达减少、转运功能下降是胆汁淤积产生的关键因素,因此,临床上可选用某些可以影响转运体表达水平的药物,增加摄取性和外排性转运体的表达,从而诱导胆汁分泌和抑制肝纤维化来缓解胆汁淤积症状<sup>[27]</sup>。

3.2 转运体在肝癌治疗中的应用 肝癌细胞产生耐药性的主要原因之一是癌细胞的细胞膜上大量表达着药物外排性转运体,其中最主要的是P-gp。P-gp是一种能量依赖性药物排出泵,通过ATP提供能量,将抗癌药物从肿瘤细胞内泵出到细胞外,使抗癌药物在细胞内浓度不断下降,并使其细胞毒作用减弱直至消失,致使肿瘤细胞得以存活并产生多药耐药性。近几年,研究者为解决肿瘤耐药性问题,提出了一系列方法,其中大多数方法集中在采用P-gp抑制剂。第一代P-gp抑制剂,如维拉帕米、环孢菌素A,这些药物在临床上常常与抗肿瘤药物联合应用,但是仍存在治疗特异性不强、效果不理想且常常产生较大细胞毒性作用的问题。第二、三代抑制剂如PSC833、VX-710、GF120918、LY335979,因化疗药物和P-gp抑制剂间的药物代谢相互作用而使临床应用受到限制,其失败的原因可能与药物未能抑制其他ATP-结合盒转运体有关。虽然目前为止还未发现确实可行的ATP-结合盒转运体的抑制剂进行抗肿瘤的辅助治疗,但这为更有针对性地治疗肿瘤提供了新的思路和出发点。

顺铂是一种广谱的抗肿瘤药物,临床上常用于治疗各种实体肿瘤,是癌症患者化学治疗的常用药物。日本学者Korita等<sup>[28]</sup>对临床49位肝

癌患者进行了研究,其中16位患者采取以顺铂为基础的新辅助化疗方法,然后行肝癌切除手术,其余33位患者未进行新辅助化疗方法,直接进行肝癌切除手术,通过免疫组织化学染色和Western blot技术检测了被切除组织中MRP2的表达。结果发现,52%肝癌患者被切除的癌组织中MRP2转运体表达增多,且MRP2丰富表达的肿瘤细胞的坏死程度要远低于MRP2正常表达者。进一步研究发现,给予顺铂为基础的新辅助化疗方法患者的肝癌组织,MRP2表达远多于未进行新辅助化疗方法的患者,切除部分的肿瘤坏死程度远低于未进行新辅助化疗方法的患者,可见,顺铂可增加肝癌组织的MRP2表达,降低肿瘤坏死程度。此外,NTCP也被广泛用于肝细胞癌化疗药物的靶向给药系统研究。抗肿瘤药物苯丁酸氮芥(瘤可宁)与牛磺胆酸共价结合后,易于被肝癌细胞表面的NTCP摄取进入肝癌细胞,使抗癌药物丰富集中于靶组织,从而达到提高抗癌药物的疗效,减少其不良反应的目的<sup>[29]</sup>。

## 4 结论

随着对肝脏转运体更进一步的认识,转运体与肝脏疾病的关系将进一步被阐明,如何更好地以转运体为靶点,有效地治疗肝脏疾病是一个亟待解决的问题。目前已经证实许多药物都是肝脏转运体的底物,通过摄取性转运体被摄入肝脏,然后经外排转运体排至胆汁中,最终进入肠道,这为药物的靶向设计开拓了新的研究领域。药学工作者可通过制药学等研究将药物设计成某转运体的底物,或在联合用药时,充分利用以转运体为基础的药物协同或拮抗,从而提高该药物的靶向分布,进而提高其生物利用度及临床疗效,降低不良反应。虽然离应用于临床治疗还有一定的距离,但这为肝病治疗以及肝癌的治疗带来了新的希望。肝脏转运体与肝病的关系以及药物治疗的靶向性的深入研究,将引领本世纪肝病治疗新趋势,必将具有药物应用的划时代意义。相信在不久的将来,随着肝脏转运体与肝病、肝癌发病关系的不断阐明,转运体与生理指标、病理状态数据库建设的进一步壮大充实,各器官转运体的研究必将掀起新一轮的研究热潮,进而发挥对临床疾病诊断、治疗的指导意义,造福于更多患者。

## 5 参考文献

- 1 Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribu-

- tion. *Eur J Pharm Sci* 2006; 27: 425-446
- 2 Zollner G, Fickert P, Silbert D, Fuchsbichler A, Marschall HU, Zatloukal K, Denk H, Trauner M. Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 38: 717-727
  - 3 Kanda D, Takagi H, Kawahara Y, Yata Y, Takakusagi T, Hatanaka T, Yoshinaga T, Iesaki K, Kashiwabara K, Higuchi T, Mori M, Hirota T, Higuchi S, Ieiri I. Novel large-scale deletion (whole exon 7) in the ABCB2 gene in a patient with the Dubin-Johnson syndrome. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009; 24: 464-468
  - 4 Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 682-699
  - 5 Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* 2007; 24: 1803-1823
  - 6 Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y, Fardel O. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 1756-1763
  - 7 Sai Y, Tsuji A. Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches. *Drug Discov Today* 2004; 9: 712-720
  - 8 Kouzuki H, Suzuki H, Stieger B, Meier PJ, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of organic anion transporting polypeptide 1 (oatp1) and Na(+)/taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp): comparative studies on the inhibitory effect of their possible substrates in hepatocytes and cDNA-transfected COS-7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 505-511
  - 9 Leonhardt M, Keiser M, Oswald S, Kühn J, Jia J, Grube M, Kroemer HK, Siegmund W, Weitschies W. Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA: role of human organic anion transporters. *Drug Metab Dispos* 2010; 38: 1024-1028
  - 10 Agarwal S, Pal D, Mitra AK. Both P-gp and MRP2 mediate transport of Lopinavir, a protease inhibitor. *Int J Pharm* 2007; 339: 139-147
  - 11 Zollner G, Trauner M. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 1-26, vii
  - 12 Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis* 2009; 4: 1
  - 13 Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, Baussan C, Gonzales E, Stieger B, Bernard O, Jacquemin E. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 2010; 51: 1645-1655
  - 14 Maisonnelle F, Abita T, Barriere E, Pichon N, Vincensini JF, Descottes B. [The MDR3 gene mutation: a rare cause of progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC)]. *Ann Chir* 2005; 130: 581-583
  - 15 Tsujii H, König J, Rost D, Stöckel B, Leuschner U, Keppler D. Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 1999; 117: 653-660
  - 16 Wakusawa S, Machida I, Suzuki S, Hayashi H, Yano M, Yoshioka K. Identification of a novel 2026G->C mutation of the MRP2 gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *J Hum Genet* 2003; 48: 425-429
  - 17 Machida I, Inagaki Y, Suzuki S, Hayashi H, Wakusawa S. Mutation analysis of the multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatol Res* 2004; 30: 86-90
  - 18 Wang R, Chen HL, Liu L, Sheps JA, Phillips MJ, Ling V. Compensatory role of P-glycoproteins in knockout mice lacking the bile salt export pump. *Hepatology* 2009; 50: 948-956
  - 19 Pawlikowska L, Strautnieks S, Jankowska I, Czubkowski P, Emerick K, Antoniou A, Wanty C, Fischler B, Jacquemin E, Wali S, Blanchard S, Nielsen IM, Bourke B, McQuaid S, Lacaile F, Byrne JA, van Eerde AM, Kolho KL, Klomp L, Houwen R, Bacchetti P, Lobritto S, Hupertz V, McClean P, Mieli-Vergani G, Shneider B, Nemeth A, Sokal E, Freimer NB, Knisely AS, Rosenthal P, Whittington PF, Pawlowska J, Thompson RJ, Bull LN. Differences in presentation and progression between severe FIC1 and BSEP deficiencies. *J Hepatol* 2010; 53: 170-178
  - 20 Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebacuerová D, Rayner A, Dutton L, Meier Y, Antoniou A, Stieger B, Arnell H, Ozçay F, Al-Hussaini HF, Bassas AF, Verkade HJ, Fischler B, Németh A, Kotalová R, Shneider BL, Cielecka-Kuszyk J, McClean P, Whittington PF, Sokal E, Jirsa M, Wali SH, Jankowska I, Pawlowska J, Mieli-Vergani G, Knisely AS, Bull LN, Thompson RJ. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 2008; 134: 1203-1214
  - 21 Fisher CD, Lickteig AJ, Augustine LM, Oude Elferink RP, Besselsen DG, Erickson RP, Cherrington NJ. Experimental non-alcoholic fatty liver disease results in decreased hepatic uptake transporter expression and function in rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 613: 119-127
  - 22 Vander Borgh S, Libbrecht L, Katoonizadeh A, van Pelt J, Cassiman D, Nevens F, Van Lommel A, Petersen BE, Fevery J, Jansen PL, Roskams TA. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is expressed by progenitor cells/reactive ductules and hepatocytes and its expression pattern is influenced by disease etiology and species type: possible functional consequences. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 1051-1059
  - 23 Lickteig AJ, Fisher CD, Augustine LM, Aleksunes LM, Besselsen DG, Slitt AL, Manautou JE, Cherrington NJ. Efflux transporter expression and acetaminophen metabolite excretion are altered in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1970-1978
  - 24 Lickteig AJ, Fisher CD, Augustine LM, Cherrington NJ. Genes of the antioxidant response undergo up-regulation in a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Biochem Mol Toxicol* 2007; 21: 216-220
  - 25 Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328: 652-662
  - 26 Hirano M, Maeda K, Hayashi H, Kusuhara H, Sugiyama Y. Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 876-882
  - 27 Paumgartner G, Pusch T. Medical treatment of cholestatic liver disease. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 53-80, viii

#### ■同行评价

本文选题较好, 内容全面, 有助于读者对肝脏中转运体作用的了解。

- 28 Korita PV, Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata J, Takamura M, Yano M, Sanpei A, Aoyagi Y, Hatakeyama K, Ajioka Y. Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2010; 23: 965-972
- 29 Kullak-Ublick GA, Glasa J, Böker C, Oswald M, Grützner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G. Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 1997; 113: 1295-1305

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》出版流程

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

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

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

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

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

**第五步 排版制作:** 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 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)

## β2糖蛋白I与乙型肝炎表面抗原的结合作用

何川, 高普均, 荆雪, 吴扬

何川, 吴扬, 吉林大学第一医院急诊内科 吉林省长春市 130000

高普均, 吉林大学第一医院肝胆胰内科 吉林省长春市 130000

荆雪, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266000

何川, 医师, 主要从事肝脏疾病方面的研究。

吉林省科技发展计划基金资助项目, No. 200705106

作者贡献分布: 何川与高普均对此文所作贡献均等; 此课题由高普均设计; 研究过程由何川操作完成; 研究样本收集由荆雪与吴扬完成; 本论文写作由何川与高普均完成。

通讯作者: 高普均, 教授, 博士生导师, 130000, 吉林省长春市新民大街71号, 吉林大学第一医院肝胆胰内科。pujun-gao@163.com  
电话: 0431-88781558

收稿日期: 2010-12-07 修回日期: 2011-03-05

接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-03-28

### Factors affecting binding of beta 2-glycoprotein I to hepatitis B surface antigen in the serum of patients with chronic hepatitis B

Chuan He, Pu-Jun Gao, Xue Jing, Yang Wu

Chuan He, Yang Wu, Department of Emergency Medicine, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130000, Jilin Province, China

Pu-Jun Gao, Department of Hepatology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130000, Jilin Province, China

Xue Jing, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Supported by: the Science Foundation of Jilin Province, No. 200705106

Correspondence to: Professor Pu-Jun Gao, Department of Hepatology, the First Hospital of Jilin University, 71 Xinmin Avenue, Changchun 130000, Jilin Province, China. pujun-gao@163.com

Received: 2010-12-07 Revised: 2011-03-05

Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-03-28

### Abstract

**AIM:** To investigate factors affecting binding of beta 2-glycoprotein I (β2-GPI) to hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the serum of patients with chronic hepatitis B (CHB).

**METHODS:** Recombinant HBsAg (rHBsAg) was radiolabeled with Na <sup>125</sup>I and used to measure the affinity constant (K<sub>a</sub>) of serum β2-GPI or recombinant β2-GPI with HBsAg. Serum

samples were collected from 9 HBeAg-positive, 9 HBeAg-negative CHB patients and 5 normal controls to measure the binding rate of <sup>125</sup>I-β2-GPI with serum HBsAg.

**RESULTS:** There was no statistically significant difference between the affinity constants of serum β2-GPI and recombinant β2-GPI with HBsAg [(2.795 ± 1.846) × 10<sup>8</sup> L/mol vs (3.001 ± 1.049) × 10<sup>8</sup> L/mol]. A significant difference was noted in the binding rate of I-β2-GPI with HBsAg between HBeAg-positive and -negative patients (33.200% ± 11.960% vs 54.540% ± 9.990%, *P* < 0.05) and between HBeAg-positive patients with different ALT levels (42.392% ± 6.860% vs 21.720% ± 1.442%, *P* < 0.05).

**CONCLUSION:** The binding affinity of β2-GPI to serum HBsAg is strong in CHB patients, which is not affected by the glycosylation of β2-GPI. HBeAg and ALT levels affect the binding of HBsAg to β2-GPI in the serum of CHB patients.

**Key Words:** Beta 2-glycoprotein I; Hepatitis B surface antigen; Protein binding

He C, Gao PJ, Jing X, Wu Y. Factors affecting binding of beta 2-glycoprotein I to hepatitis B surface antigen in the serum of patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 887-891

### 摘要

**目的:** 探讨慢性乙型肝炎(CHB)患者血清与β2糖蛋白I(β2-GPI)结合的影响因素。

**方法:** 利用<sup>125</sup>I标记rHBsAg和β2-GPI, 通过液相放射免疫法分别测定血浆中β2-GPI、大肠杆菌M15表达的rβ2-GPI与<sup>125</sup>I-HBsAg的结合常数(K<sub>a</sub>)。选取23例血清, 其中CHB HBeAg阳性组9例, CHB HBeAg阴性组9例, 正常对照组5例, 测定其与<sup>125</sup>I-β2-GPI的结合率。

**结果:** 血浆β2-GPI组和rβ2-GPI组的K<sub>a</sub>值分别为(2.795 ± 1.846) × 10<sup>8</sup> L/mol、(3.001 ± 1.049) × 10<sup>8</sup> L/mol。利用嵌套实验设计分析, 两组来源不同的β2-GPI的结合常数(K<sub>a1</sub>、K<sub>a2</sub>)无统

### ■背景资料

β2糖蛋白I(β2-GPI)是多种脂蛋白的组成成分, 是抗磷脂综合征(APS)的一种自身抗原, 近年研究表明其可能在HBV嗜肝过程中起到关键受体或中介分子的作用。

### ■同行评议者

范小玲, 主任医师, 北京地坛医院综合科

## ■ 研发前沿

近年来,  $\beta$ 2-GPI与乙型病毒性肝炎及肝癌的相关性研究成为新热点.

计学差异. HBeAg阳性组与阴性组的结合率具有统计学差异( $33.200\% \pm 11.960\%$  vs  $54.540\% \pm 9.990\%$ ,  $P < 0.05$ ). 并发现HBeAg阳性组内的不同水平ALT的结合率有差异( $42.392\% \pm 6.860\%$  vs  $21.720\% \pm 1.442\%$ ,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 血浆中HBsAg与 $\beta$ 2-GPI可能有较强的亲和力,  $\beta$ 2-GPI的糖基化结构对二者结合作用无影响. HBeAg、ALT影响HBsAg与 $\beta$ 2-GPI的结合.

**关键词:**  $\beta$ 2糖蛋白I; 乙型肝炎表面抗原; 蛋白结合

何川, 高普均, 荆雪, 吴扬.  $\beta$ 2糖蛋白I与乙型肝炎表面抗原的结合作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 887-891  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/887.asp>

## 0 引言

HBV感染具有多种临床转归, 包括最初隐匿感染到终末期肝病和肝细胞癌, 自然病程持续数十年. 在自限性感染中, 最关键的是早期HBsAg的清除和HBsAb的产生, 但若HBV持续存在, 将发展为慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)或CHB携带者. 虽然每年近0.5%-1.0%的乙型肝炎携带者能够实现HBsAg转阴, 并且大多数可以产生HBsAb<sup>[1]</sup>. 但HBsAg持续存在将增加患者发展为肝细胞癌的危险度. 研究已明确这种进行性疾病与一些危险因素有关, 包括年龄、男性、HBV基因C型、HBV DNA高复制水平以及长期饮酒史<sup>[2]</sup>. 针对HBV这种嗜肝性人们进行广泛的研究.  $\beta$ 2糖蛋白I(beta 2-glycoprotein I,  $\beta$ 2-GPI)是血浆中一种较丰富的蛋白, 是多种脂蛋白的组成成分. 研究表明,  $\beta$ 2-GPI可与重组乙型肝炎病毒表面抗原(recombinant hepatitis B surface antigen, rHBsAg)特异性结合<sup>[3]</sup>, 推断 $\beta$ 2-GPI可能参与HBV嗜肝过程. 本研究组已鉴定出 $\beta$ 2-GPI在肝细胞膜上的结合蛋白-膜联蛋白II(Annexin II), 并提出 $\beta$ 2-GPI可能作为HBsAg的中介分子参与HBV的感染<sup>[4]</sup>. 本研究利用放射性免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)进一步测定二者的结合常数(Ka), 并通过测定CHB患者血清与 $\beta$ 2-GPI的结合率, 初步探讨 $\beta$ 2-GPI与HBsAg结合的影响因素, 以期对HBV嗜肝机制研究提供实验基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 碘化钠-<sup>125</sup>I购自成都中核高通同位素股份有限公司; HBsAg阳性血清标准品, 购自中国药品生物制品检定所; 人血浆中提取的 $\beta$ 2-GPI,

由江苏大学基础医学院惠赠; 重组菌pQE30-h $\beta$ 2-GPI由吉林大学白求恩第一医院中心实验室提供; 人rHBsAg由吉林省长春生物制品研究所惠赠; 镍离子亲和层析柱(Ni<sup>2+</sup>-NTA)购自Qiagen公司; DNase I酶购自美国Pharmacia公司.

### 1.2 方法

1.2.1 <sup>125</sup>I标记rHBsAg和 $\beta$ 2-GPI: 采用氯胺-T法. 将218 mg/L的HBsAg用20 mmol/L pH7.5 PBS溶液稀释为10 mg/L, 共标记3组. 在反应试管内, 依次加入HBsAg 0.5 g/L, Na <sup>125</sup>I  $3.7 \times 10^{12}$  Bq/L, 氯胺-T 10 g/L, 混匀, 反应约2 min. 再加入10 g/L偏重亚硫酸钠, 混匀, 终止反应. 经SephadexG-25柱纯化, 每组15管. 通过上述同样方法标记 $\beta$ 2-GPI. 每管样品均经放射免疫 $\gamma$ -测量仪测量每分钟计数率(cpm). 计算标记<sup>125</sup>I-HBsAg、<sup>125</sup>I- $\beta$ 2-GPI的比活性.

1.2.2 重组 $\beta$ 2-GPI的表达: 对大肠杆菌M15(h $\beta$ 2-GPI cDNA/pQE30)进行筛选, 对最佳诱导时间和浓度进行优化. 包涵体选取Ni-NTA凝胶亲和层析, 稀释法和透析法对目的蛋白进行复性, BCA法测定r $\beta$ 2-GPI的含量.

1.2.3 测定 $\beta$ 2-GPI与rHBsAg结合的结合常数: 实验分为两组, 一组为人血浆中提取的 $\beta$ 2-GPI, 另一组为大肠杆菌M15表达的r $\beta$ 2-GPI. 采用竞争结合法, 取梯度反应浓度的 $\beta$ 2-GPI、r $\beta$ 2-GPI, 总反应体积100  $\mu$ L. 根据最佳结合温度37  $^{\circ}$ C, 最佳结合时间为4 h, 均采用双管重复反应. HBsAg阳性血清为标准品, 分离结合部分. 使用放射免疫 $\gamma$ -测量仪测量沉淀物的放射计数. 利用Logit-Log坐标轴上绘制RIA标准曲线, 求得Ka.

1.2.4 测定<sup>125</sup>I- $\beta$ 2-GPI与CHB患者血清的结合率: 共收集23份血清, 包括9份HBeAg阳性、9份HBeAg阴性的CHB患者血清和5份正常对照血清. CHB患者血清相关因素包括HBsAg定量、DNA定量、ALT水平(以于正常上限2倍为界), HBsAg标准品0.5 mL加入PBS 0.5 mL进行倍比稀释, 分别与23份血清结合, 37  $^{\circ}$ C水浴, 反应4 h. 取109.4 mg/L <sup>125</sup>I- $\beta$ 2-GPI加入上述样本中, 反应2 h, 加入分离剂, 离心, 弃上清, 使用放射免疫 $\gamma$ -测量仪测量沉淀物的放射计数.

**统计学处理** 实验数据以mean  $\pm$  SD表示, 两组 $\beta$ 2-GPI与rHBsAg的Ka用浓度( $10^8$  mol/L)表示, 采用嵌套实验设计.  $\beta$ 2-GPI与患者血清的结合率用百分率(%)表示, 组间采用秩和检验. 以上均以 $P < 0.05$ 具有统计学差异.

## 2 结果

2.1 <sup>125</sup>I标记rHBsAg、 $\beta$ 2-GPI 绘制经Sepha-

表 1 两组 $\beta 2$ -GPI与HBsAg结合的 $K_a$  (mean  $\pm$  SD)

蛋白浓度( $\mu\text{g/L}$ )	人血浆中 $\beta 2$ -GPI				<i>E. coli</i> 表达的r $\beta 2$ -GPI			
	1 240	300	75	18	1 300	325	80	20
$K_a(10^8 \text{ L/mol})$	2.075 $\pm$ 0.049	2.250 $\pm$ 0.099	5.500 $\pm$ 0.665	1.355 $\pm$ 0.064	2.055 $\pm$ 0.106	2.220 $\pm$ 0.028	3.485 $\pm$ 0.050	4.245 $\pm$ 0.134

$F = 0.04, P = 0.8522.$

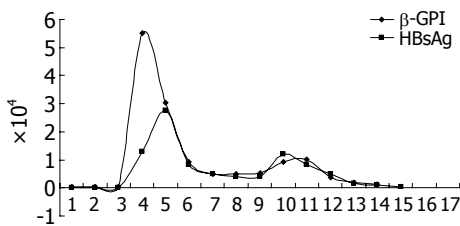


图 1 SephadexG-25分离标志物洗脱曲线. 第1峰: 标记蛋白峰约在4-6 mL处, 即分别为 $^{125}\text{I}$ 标记rHBsAg、 $\beta 2$ -GPI; 第2峰: 游离 $^{125}\text{I}$ 约在9-11 mL处.

dexG-25层析柱分离标记的rHBsAg、 $\beta 2$ -GPI和游离碘的洗脱曲线(图1). 计算 $^{125}\text{I}$ 标记rHBsAg、 $\beta 2$ -GPI的比活度:  $^{125}\text{I}$ -rHBsAg的比活度 =  $(2.6-2.8) \times 10^6 \text{ Bq}/\mu\text{g}$ ;  $^{125}\text{I}$ - $\beta 2$ -GPI的比活度 =  $(5.8-6.0) \times 10^6 \text{ Bq}/\mu\text{g}$ .

2.2 重组 $\beta 2$ -GPI的表达 以75  $\mu\text{g/L}$ 的 $\beta 2$ -GPI为代表, 筛选最佳反应温度和浓度(图2). 可知在37  $^\circ\text{C}$ 和4 h的条件下, 两者呈梯度线性且结合较稳定.

2.3 r $\beta 2$ -GPI的含量 BCA法测得r $\beta 2$ -GPI的含量约为260  $\mu\text{g/L}$ (图3).

2.4 两组来源不同的 $\beta 2$ -GPI与rHBsAg的 $K_a$ 值 人血浆 $\beta 2$ -GPI组:  $K_{a1} = (2.795 \pm 1.846) \times 10^8 \text{ L/mol}$ ; r $\beta 2$ -GPI组:  $K_{a2} = (3.001 \pm 1.049) \times 10^8 \text{ L/mol}$ (表1).

2.5 23份血清与 $\beta 2$ -GPI的结合率 经统计学分析, HBeAg阳性组与阴性组的结合率有显著统计学差异( $33.200\% \pm 11.960\%$  vs  $54.540\% \pm 9.990\%$ ,  $P < 0.05$ ), 且HBeAg阳性组内的结合率有统计学差异( $P < 0.05$ , 表2).

### 3 讨论

$\beta 2$ -GPI又称为载脂蛋白H(ApoH), 是一种相对分子质量约为46 000 Da的高度糖基化的血浆蛋白. 具有强亲脂特性, 血浆中约有30%左右的 $\beta 2$ -GPI与脂类化合物结合. 他是乳糜微粒(chylomicron, CM)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)及高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的组成成分. 多年来关于HBV

### ■ 相关报道

$\beta 2$ -GPI作为HBsAg的桥接分子可激活核因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )信号转导通路, 可能促进乙肝慢性化和肝细胞癌的发生发展.

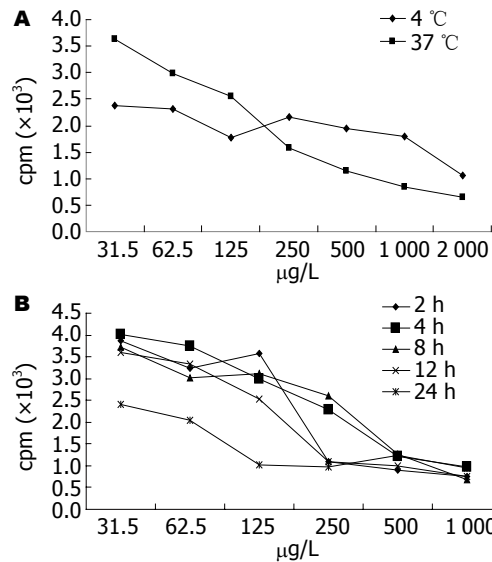


图 2  $\beta 2$ -GPI与rHBsAg结合的最佳反应温度与时间曲线. A: 温度; B: 时间. 梯度浓度的 $\beta 2$ -GPI与 $^{125}\text{I}$ -rHBsAg结合, 分别在4  $^\circ\text{C}$ 和37  $^\circ\text{C}$ 发生结合反应, 选择时间为2、4、8、12、24 h.

入肝的关键膜受体或中介分子尚未确定. Neurath等<sup>[5]</sup>鉴定了与HBV表面的脂质结合的多种受体, 后Mehdi等<sup>[3]</sup>证实了介导rHBsAg与肝细胞膜表面结合的蛋白是 $\beta 2$ -GPI, 故推断作为脂蛋白组分的 $\beta 2$ -GPI可能与HBV结合后发生变构, 随着CM和HDL入肝. 这种结合具有饱和性, 可被过量的rHBsAg、HBsAb、抗 $\beta 2$ -GPI抗体所阻断<sup>[6]</sup>. 在HCV感染相关研究中也发现有脂蛋白的参与<sup>[7]</sup>. 本课题组利用肝癌细胞株SMMC-7721鉴定出与人 $\beta 2$ -GPI特异结合的蛋白, 即Annexin II<sup>[4]</sup>, 推断 $\beta 2$ -GPI作为HBsAg的桥接分子与Annexin II组成复合物以某种方式入肝. 研究表明, 这种复合物可激活NF- $\kappa\text{B}$ 信号转导通路, 可能促进乙型肝炎慢性化和肝细胞癌的发生发展<sup>[8]</sup>. 同时, 也有研究提示 $\beta 2$ -GPI的基因多态性可能是HBV感染肝细胞的原因之一<sup>[9]</sup>. 本研究通过测定人 $\beta 2$ -GPI与rHBsAg的 $K_a$ , 说明二者结合力较强, 进而推断二者在血浆中较易形成复合物. 这种复合物很可能与肝细胞表面的Annexin II或其他膜蛋白结合, 参与CHB的发生与发展.

蛋白质糖基化是蛋白质翻译后的一种加工



### ■创新盘点

本研究利用放射免疫法检测测定 $\beta 2$ 糖蛋白I与HBsAg的结合常数,并探讨慢性乙型肝炎患者血清与 $\beta 2$ -GPI结合的影响因素,迄今尚无文献报道。

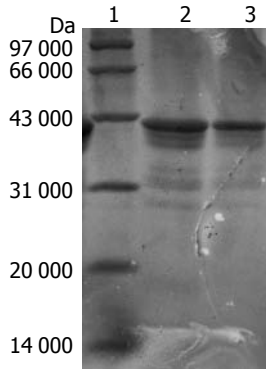


图3 重组 $\beta 2$ -GPI的表达。  
1: 标准蛋白Marker; 2, 3:  $\beta 2$ -GPI。

过程,在肽链合成的同时或合成后,在酶的催化下,糖链被接到肽链上的特定糖基化位点。有研究发现,部分蛋白质的糖基化对免疫功能的影响很大<sup>[10]</sup>,但此方面研究尚不深入。 $\beta 2$ -GPI是由326个氨基酸残基组成高度糖基化的单链亲水蛋白,根据 $\beta 2$ -GPI基因克隆和氨基酸序列分析结果,其结构中可能有4个N端-糖苷键<sup>[11]</sup>。学者常用Sf9细胞系统和杆状病毒表达人r $\beta 2$ -GPI<sup>[12]</sup>,也有人利用*E. coli*表达的重组蛋白进行研究<sup>[13]</sup>。有研究认为, $\beta 2$ -GPI的第V区和第I区能与带负电荷磷脂稳定结合,其糖基化与磷脂的结合能力无关<sup>[14]</sup>。在APS研究中发现, $\beta 2$ -GPI与aPL结合后表面结构发生变化,失去其原有的抗凝作用,使机体易形成血栓<sup>[15]</sup>,参与APS的疾病。另有研究表明,原核系统表达的r $\beta 2$ -GPI无糖基化并不影响其免疫活性,仍被APS自身抗体识别并攻击<sup>[13]</sup>,糖基化与否并不影响 $\beta 2$ -GPI的免疫活性,即其抗原性不变。本研究利用原核系统表达蛋白无糖基化的“缺点”,测定无糖基化的r $\beta 2$ -GPI与HBsAg的 $K_a$ ,并与人血浆中 $\beta 2$ -GPI的 $K_a$ 进行比较。发现两组来源不同的 $\beta 2$ -GPI的 $K_a$ 无差异,即 $\beta 2$ -GPI的糖基化结构并不影响其与HBsAg的结合。分析上述可能的原因是, $\beta 2$ -GPI是依赖于特定的一级结构上的氨基酸残基肽段与rHBsAg结合,而与糖基化结构关系不大。

HBeAg是HBV的一种保护性抗原,他在HBV感染和复制的过程中所起的作用尚不明确。本研究通过比较3组不同患者血清与 $\beta 2$ -GPI的结合率,得出HBeAg阳性组的 $\beta 2$ -GPI结合率与HBeAg阴性组、正常对照组均有差异,并且ALT的水平也影响结合率。我们初探到HBeAg、ALT在 $\beta 2$ -GPI与HBsAg结合中起到一定的作用,而具体作用仍需进一步研究。因此,将扩大样本量进一步观察HBeAg在HBV感染过程中所起的作用。

总之, $\beta 2$ -GPI作为HBV感染肝细胞的中介分子,在血浆中与HbsAg结合较强,且其糖基化

表2 HBeAg阳性组与 $\beta 2$ -GPI的结合率

分组	n	结合率(%)
ALT = N	5	42.392 ± 6.860 <sup>a</sup>
ALT ≥ 2N	4	21.720 ± 1.442

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs ALT ≥ 2N. N: ALT正常值。

结构对二者结合作用无影响。HBeAg、ALT在血清中的作用可能影响HBV的生命周期,此方面需进一步深入研究。

### 4 参考文献

- 1 Chu CM, Liaw YF. HBsAg seroclearance in asymptomatic carriers of high endemic areas: appreciably high rates during a long-term follow-up. *Hepatology* 2007; 45: 1187-1192
- 2 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539
- 3 Mehdi H, Kaplan MJ, Anlar FY, Yang X, Bayer R, Sutherland K, Peeples ME. Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol* 1994; 68: 2415-2424
- 4 时阳,刘雅文,高普均,高沿航,谭岩.肝细胞膜上 $\beta 2$ 糖蛋白I受体的鉴定.中华医学杂志 2007; 87: 2429-2431
- 5 Neurath AR, Strick N. The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. *Virology* 1994; 204: 475-477
- 6 Mehdi H, Yang X, Peeples ME. An altered form of apolipoprotein H binds hepatitis B virus surface antigen most efficiently. *Virology* 1996; 217: 58-66
- 7 Pumeeshockchai W, Bevvitt D, Agarwal K, Petropoulou T, Langer BC, Belohradsky B, Bassendine MF, Toms GL. Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody. *J Med Virol* 2002; 68: 335-342
- 8 Jing X, Piao YF, Liu Y, Gao PJ. Beta2-GPI: a novel factor in the development of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1671-1680
- 9 Toniutto P, Fattovich G, Fabris C, Minisini R, Burlone M, Pravadelli C, Peraro L, Falleti E, Caldera F, Bitetto D, Pirisi M. Genetic polymorphism at the apolipoprotein E locus affects the outcome of chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2010; 82: 224-331
- 10 Gabius HJ, André S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 165-177
- 11 Mehdi H, Nunn M, Steel DM, Whitehead AS, Perez M, Walker L, Peeples ME. Nucleotide sequence and expression of the human gene encoding apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *Gene* 1991; 108: 293-298
- 12 Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA, Koike T. Human beta2-glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using mutants expressed by a baculovirus system. *Blood* 1996; 87: 3262-3270
- 13 Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A. Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of hu-

- man beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 280-290
- 14 Alarcon-Segovia D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1992; 19: 1778-1781
- 15 Wang HH, Chiang AN. Cloning and characterization of the human beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) gene promoter: roles of the atypical TATA box and hepatic nuclear factor-1alpha in regulating beta2-GPI promoter activity. *Biochem J* 2004; 380: 455-463

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

■同行评价  
本文从病毒进入细胞途径方面进一步探讨了慢性乙型肝炎发病机制, 并与临床联系, 有较好的研究前景和实际意义。

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, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

#### 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, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。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。

# JNK信号通路介导MDR1/P-gp调控人结肠癌多药耐药

隋华, 周利红, 殷佩浩, 王炎, 范忠泽, 周树峰, 李琦

## ■背景资料

多药耐药是肿瘤化疗失败的主要原因, 国内外相继证实了MDR1基因编码的P-糖蛋白途径是肿瘤细胞耐药性发生发展的经典途径。同时MAPK信号转导途径中的JNK信号通路的激活参与了肿瘤细胞的MDR基因的表达, 但JNK通路参与MDR的机制尚不明确。

隋华, 周利红, 殷佩浩, 王炎, 范忠泽, 李琦, 上海中医药大学附属普陀医院 上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所 上海市 200062  
周树峰, 南佛罗里达大学药学院 美国佛罗里达州坦帕市 33612  
隋华, 住院医师, 主要从事消化系统肿瘤防治方面的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 308734  
上海市科委基金资助项目, No. 10ZR1427400; No. 10140902600  
上海市教委科研创新基金资助项目, No. 09YZ132  
上海市重点学科基金资助项目, No. S30302  
作者贡献分布: 此课题由隋华、范忠泽及李琦共同设计; 研究过程由周利红与殷佩浩操作完成; 数据分析和本论文写作由隋华与王炎完成; 周树峰与李琦审定。  
通讯作者: 李琦, 副教授, 硕士生导师, 200062, 上海市兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院, 上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所。lzwf@hotmail.com  
收稿日期: 2011-01-14 修回日期: 2011-01-30  
接受日期: 2011-02-15 在线出版日期: 2011-03-28

## JNK signal transduction pathway regulates MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in colon carcinoma cells

Hua Sui, Li-Hong Zhou, Pei-Hao Yin, Yan Wang, Zhong-Ze Fan, Shu-Feng Zhou, Qi Li

Hua Sui, Li-Hong Zhou, Pei-Hao Yin, Yan Wang, Zhong-Ze Fan, Qi Li, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Institute of Interventional Cancer, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Shu-Feng Zhou, Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of South Florida, Tampa 33612, Florida, USA

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No.308734; the Foundation of Shanghai Municipal Science and Technology Commission, Nos. 10ZR1427400, 10140902600; the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission, No. 09YZ132; and the Shanghai Leading Academic Discipline Project of Shanghai Municipal Education Commission, No. S30302

Correspondence to: Associate Professor Qi Li, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Institute of Interventional Cancer, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 164 Lanxi Road, Shanghai 200062, China. lzwf@hotmail.com

Received: 2011-01-14 Revised: 2011-01-30

Accepted: 2011-02-15 Published online: 2011-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) signal transduction pathway and multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein (P-gp)-mediated

multidrug resistance of human colon carcinoma HCT8/V cells.

**METHODS:** The sensitivity of multidrug-resistant HCT8/V cells and drug-sensitive HCT8 cells to a variety of antitumor drugs was evaluated by MTT assay. After inhibition of the activation of the JNK signaling pathway, MDR1 promoter transcriptional activity and expression of MDR1 mRNA and P-gp were evaluated by luciferase activity assay, real-time fluorescence quantitative PCR (RFQ-PCR) and Western blot, respectively.

**RESULTS:** HCT8/V cells exhibited 10.49-fold higher resistance to vincristine than their parental counterparts. The IC<sub>50</sub> value of SP600125 (20 μmol/L) decreased from 191.08 mg/L ± 18.18 mg/L to 50.34 mg/L ± 15.71 mg/L and resistance index (RI) reached 3.80 (*P* < 0.01). After inhibition of the activation of the JNK signaling pathway with a JNK specific inhibitor, MDR1 promoter transcriptional activity showed a 2.55-fold decrease (0.03647 ± 0.00191 *vs* 0.01362 ± 0.00196, *P* < 0.01) and the expression of MDR1/P-gp was significantly down-regulated (0.34275 ± 0.0339 *vs* 0.13625 ± 0.0196, 0.88132 ± 0.1026 *vs* 0.56174 ± 0.1014, both *P* < 0.01) in HCT8/V cells.

**CONCLUSION:** The JNK signal transduction pathway regulates MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of HCT8/V cells possibly by up-regulating MDR1/P-gp expression.

**Key Words:** Colon carcinoma; Multidrug resistance 1; P-glycoprotein; c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase; Signal transduction pathway

Sui H, Zhou LH, Yin PH, Wang Y, Fan ZZ, Zhou SF, Li Q. JNK signal transduction pathway regulates MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in colon carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 892-898

## 摘要

**目的:** 探讨在人结肠癌多药耐药细胞株HCT8/V中JNK信号传导通路与多药耐药1(MDR1)基因表达的关系。

## ■同行评议者

牛英才, 副研究员, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所

**方法:** MTT法检测人结肠癌多药耐药细胞株HCT8/V及其敏感株HCT8细胞对多种抗肿瘤药物的敏感性; 抑制JNK信号通路的激活后, 采用双荧光素酶活性报告基因检测MDR1启动子转录活性的表达; 实时荧光定量PCR检测MDR1 mRNA的表达; Western blot分析对P-糖蛋白(P-gp)表达的影响。

**结果:** HCT8/V细胞对长春新碱(VCR)的耐药倍数为10.49倍。加入JNK特异性抑制剂sp600125(20  $\mu\text{mol/L}$ )抑制后, HCT8/V细胞对VCR的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )由191.08 mg/L  $\pm$  18.18 mg/L降低到50.34 mg/L  $\pm$  15.71 mg/L, 逆转指数为3.80( $P < 0.01$ )。HCT8/V细胞加入JNK抑制剂后, MDR1启动子活性从0.03647  $\pm$  0.00191降低到0.01362  $\pm$  0.00196, 下降了2.52倍( $P < 0.01$ )。实时荧光定量PCR、Western blot检测结果提示, 抑制JNK通路的激活后, HCT8/V细胞的MDR1 mRNA从0.34275  $\pm$  0.0339下降到0.13625  $\pm$  0.0196( $P < 0.01$ ), P-gp表达从0.88132  $\pm$  0.1026下降到0.56174  $\pm$  0.1014( $P < 0.01$ )。

**结论:** JNK信号通路通过介导MDR1/P-gp调控人肠癌多药耐药, 抑制JNK信号通路可降低MDR1/P-gp的水平, 逆转人结肠癌HCT8/V细胞的多药耐药性。

**关键词:** 结肠癌; 多药耐药1; P-糖蛋白; c-Jun氨基末端激酶; 信号转导通路

隋华, 周利红, 殷佩浩, 王炎, 范忠泽, 周树峰, 李琦. JNK信号通路介导MDR1/P-gp调控人结肠癌多药耐药. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 892-898

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/892.asp>

## 0 引言

肿瘤细胞的多药耐药(multidrug resistance, MDR)的产生主要是由于MDR1基因编码的P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的表达增加<sup>[1-3]</sup>。促分裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的信号传导途径, 是细胞生长和分化的重要环节。以c-Jun为中心的c-Jun氨基末端激酶(c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase, JNK)信号转导途径, 是MAPK众多通路中的一个。目前越来越多的报道证实了JNK信号通路具有调控MDR基因表达的作用<sup>[4-6]</sup>。有研究表明化疗药物可增加c-Jun磷酸化水平, 使肿瘤细胞产生化疗耐受<sup>[7-9]</sup>, 但是目前对JNK信号通路与MDR产生和逆转关系的研究仍较少。本实验选用人结肠癌

MDR细胞株HCT8/V及其敏感株HCT8细胞, 给予JNK信号通路特异性抑制剂(sp600125)干预, 观察细胞的药物敏感性、MDR1 mRNA水平等方面的变化, 以探讨JNK信号通路与结肠癌MDR的可能关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人结肠癌细胞株HCT8及人结肠癌MDR细胞株HCT8/V购于上海博谷生物科技公司。MTT购自Sigma公司, 载体质粒pGL3-Basic、内参质粒pRL-SV40由华东理工大学药学院药理研究室馈赠。MDR1基因启动子重组质粒pGL3-Basic-MDR1-promoter为本实验室保存。转染脂质体Lipofectamine2000购自美国Invitrogen公司; 双荧光素酶检测试剂盒(dual luciferase assay system)与化学发光仪(GloMax 20/20 Luminometer)购自美国Promega公司。JNK特异性的抑制剂sp600125购于美国Serologilcais公司; 总RNA抽提试剂RNAiso Reagent、荧光定量PCR试剂购自日本TaKaRa公司; GAPDH和MDR1上下游引物和探针由上海闪晶生物公司设计并合成。Mastercycler EP银质梯度PCR仪、Biophotometer生物分光光度计、5804R高速冷冻离心机德国Eppendorf公司; ABI7300实时定量PCR仪美国ABI公司; CKX41/U-RFLT50荧光倒置显微镜购自日本Olympus; Chemidox化学发光成像仪购自Bio-Rad公司。蛋白质抽提试剂试剂盒(Sangon S-415)、BCA蛋白质定量试剂、兔抗人P-gp单克隆抗体是Merk公司产品; SDS-PAGE电泳试剂购自上海博彩生物技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** HCT8/V及其敏感细胞HCT8在37  $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下置于含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640完全培养液中, 常规培养。HCT8/V细胞培养体系中加入终浓度为2 mg/L的长春新碱(vincristine, VCR)以维持耐药性, HCT8/V细胞在无药培养液中培养2 wk后进行实验。

**1.2.2 MTT法检测HCT8/V细胞的药物敏感性:** 取对数生长期人结肠癌敏感细胞株HCT8和耐VCR细胞株HCT8/V, 分别调整细胞浓度至 $1 \times 10^8/\text{L}$ , 以每孔100  $\mu\text{L}$ 接种于96孔细胞培养板中, 在50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37  $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中常规培养, 待细胞贴壁后3-5 h后, 除对照组外各自加入含不同浓度化疗药物的培养基100  $\mu\text{L}$ , 每组设4个复孔。培养48 h后每孔加入MTT(5 g/L)20  $\mu\text{L}$ ,

## ■ 相关报道

Kawasaki等报道, 阻断JNK通路后, 明显降低MCF7/ADR细胞内P-gp的表达, 增加对阿霉素的敏感性, 并推测JNK通路可能是作用于耐药细胞的MDR1基因, 从而使MDR1的转录和翻译增加, 将化疗药物泵出细胞外从而逆转细胞的MDR。

### ■创新盘点

本研究首次在人肠癌多药耐药细胞中研究P-gp与JNK信号通路的相关性。

表 1 实时荧光定量PCR检测所需MDR1和GAPDH引物序列

基因	基因号	引物	探针
MDR1	NM000927	Forward: 5'CCACTCCTCCACCTTTGAC3'	5'TTGCCCTCAACGACCACCTTTGTC3'
		Reverse: 5'ACCCTGTTGCTGTAGCCA3'	
GAPDH	AF261085	Forward: 5'CCACTCCTCCACCTTTGAC3'	5'TTGCCCTCAACGACCACCTTTGTC3'
		Reverse: 5'ACCCTGTTGCTGTAGCCA3'	

37℃孵育4 h后弃上清,加入150 μL DMSO,震荡混匀使MTT还原产物充分溶解后,于酶标仪检测570 nm波长处吸光度(A值).计算细胞的生长抑制率和耐药指数(resistance factor, RF).计算公式:生长抑制率 = (1-实验组A平均值/对照组A平均值)×100%; RF = 某种药物针对抗药性细胞的IC<sub>50</sub>/某种药物针对敏感性细胞的IC<sub>50</sub>.以上实验重复3次.

1.2.3 JNK对HCT8/V耐药性的影响:所用方法同1.2.2,加VCR 2 h前,加入JNK抑制剂sp600125 (20 μmol/L).计算HCT8/V细胞对VCR耐药的降低程度.逆转指数(reversal index, RI)的计算公式如下: RI = 不加逆转剂时某种药物针对抗药性细胞的IC<sub>50</sub>/加入逆转剂后某种药物针对抗药性细胞的IC<sub>50</sub>.以上实验重复3次.

1.2.4 双荧光素酶活性报告基因检测MDR1启动子质粒转染的表达:质粒共转染人结肠癌细胞:按照1×10<sup>5</sup>个细胞/孔的量在96孔板中接种指数生长期的各组细胞中,在37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养,直到细胞到80%汇片.在EP管中配置重组质粒PGL3-Basic-MDR1-promoter、内参载体质粒pRL-SV40、转染脂质体Lipofectamine2000复合物.将重组质粒PGL3-Basic-MDR1-promoter、内参载体质粒pRL-SV40各5 μL/孔(96孔)稀释至25 μL/孔不含血清和抗生素的RPMI 1640中,用加样枪混合均匀.然后将脂质体悬液(0.5 μL/孔)加入25 μL/孔不含血清和抗生素的RPMI 1640中,在室温孵育5 min,最后将两者混合在一起,充分混匀静置20 min,使质粒与脂质体充分结合.分别吸取接种到96孔板中,用不含血清和抗生素的RPMI 1640洗1次,在每个孔中加入50 μL的质粒/脂质体混合物.在37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养3-5 h后,向各孔加入150 μL的RPMI 1640培养液培养48 h.收集样品,进行双荧光素酶活性检测.双荧光素酶报告基因活性测定:将转染有pGL3-Basic-mdr1-promoter和pRL-SV40的各组细胞经过一定时间的培养后收集,吸弃培养基,用PBS洗1次.加入

裂解液20 μL/孔,室温摇动15 min.按照双荧光素酶检测试剂盒(Dual Luciferase Assay System)的操作说明书,取100 μL Luciferase Assay Buffer II于1.5 mL的离心管中,设定化学发光仪延迟2 s,发光仪测读10 s,将全部细胞裂解液加入到离心管中,用加样枪轻轻抽吸2-3次混匀,将离心管放入GloMax20/20Luminometer化学发光仪中测萤火虫荧光素酶发光值;将离心管移出发光仪,加入100 μL Stop & Glo Reagent,快速旋涡混匀后,将离心管重放回发光仪中测海肾荧光素酶发光值.

1.2.5 实时荧光定量PCR检测JNK对人结肠癌细胞内MDR1 mRNA表达的影响:细胞总RNA的提取:将各组细胞分别加入RNAiso 1 mL,用移液器吹打混匀,分装入EP管中,每管再加入4℃预冷氯仿200 μL,颠倒混匀,室温静置5 min,4℃,12 000 r/min离心15 min.小心吸出水层,加入等体积的异丙醇(约500 μL),混匀,置于-20℃冰箱30 min后,4℃,12 000 r/min,离心15 min,弃上清.用1 mL 4℃预冷的750 mL/L乙醇(DEPC处理水配制)洗涤沉淀,4℃,8 000 r/min,离心5 min,吸弃上清.静置5 min,加入60 μL DEPC处理水,溶解RNA,生物分光光度计测定RNA浓度, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>为1.8-2.0, RNA产物置-80℃冰箱保存备用.实时荧光定量PCR反应:首先将mRNA逆转转为cDNA,按试剂盒说明,取1 000 ng的mRNA,加入5×Buffer 4 μL, Oligo dT primer 1 μL, Random 6 mers 1 μL, PrimeScript™ RT Enzyme Mix 1 μL,再加入RNase Free dH<sub>2</sub>O至20 μL,进行反转录反应,反应条件:37℃ 15 min, 85℃ 5 s,所得cDNA于-20℃保存. MDR1和GAPDH引物探针由上海闪晶生物公司设计并合成(表1). 荧光定量PCR反应体系均如下: Premix EX Taq™ 10 μL, Rox Reference Dye 0.4 μL, 上下游引物各0.4 μL, 荧光探针0.8 μL, dH<sub>2</sub>O 6 μL, cDNA 2 μL, 20 μL体系, 反应条件如下: (1)预变性: 95℃ 10 s; (2)变性: 95℃ 5 s; (3)退火、延伸: 60℃ 31 s, 40个循环, 数据采用ABI 7300 SDS Software分析.

表 2 4种化疗药物对HCT8和HCT8/V敏感性的影响

化疗药物	IC <sub>50</sub>		RF
	HCT8	HCT8/V	
VCR	18.22 ± 7.12	191.08 ± 18.18 <sup>b</sup>	10.49
DDP	10.25 ± 0.85	290.79 ± 28.38 <sup>b</sup>	28.37
5-Fu	7.48 ± 0.80	23.12 ± 1.99 <sup>b</sup>	3.09
THP	7.60 ± 0.88	26.40 ± 2.92 <sup>b</sup>	3.47

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs HCT8组.

实验重复3次. 相对mRNA表达水平的计算: 每个样本靶基因(检测基因)的相对mRNA表达水平, 能直接用样品各自的内源控制物GAPDH表达来标准化加入的初始RNA量. 即每个样品的靶基因的相对mRNA表达水平可以用以下公式计算: 相对mRNA表达 =  $2^{-\Delta Ct}$ ,  $\Delta Ct$ 值 = 靶基因Ct值 - GAPDH Ct值. 以GAPDH作为内参照, 每组均做3个样本, 取均数.

**1.2.6 Western blot法检测JNK对HCT8/V细胞中P-gp的影响:** 各组细胞用预冷PBS洗2次, 吸弃PBS, 加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂, 轻轻摇动5 min; 后用一预冷的橡胶和塑料细胞刮刮下培养瓶壁上细胞, 转移细胞悬液到离心管中, 冰浴15 min进行裂解. 裂解液于预冷的离心机中14 000 g离心15 min, 吸弃上清; BCA分析试剂测定蛋白质浓度. 50 μg总蛋白质在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转移至PVDF膜, 膜在5% BSA溶液中室温孵育1 h以封闭膜上的非特异结合. 封闭过的膜加入一级抗体4℃过夜, 抗原抗体结合. TBST洗膜3次, 每次5 min, 再加入HRP标记的二级抗体以结合一级抗体及HRP标记的抗生物素抗体以结合分子量标准, 室温孵育膜1 h, TBST洗膜3次, 每次5 min; 同样方法标记鼠单克隆抗GAPDH作对照. 洗完膜稍干后, 按1:1加入AB显影液(与二抗HRP结合), 在Bio-Rad的化学发光成像仪上显影. 然后分析灰度值, 再进行计算灰度系数比.

**统计学处理** 数据以 mean ± SD表示, 多个样本均数间的比较先进行方差齐性检验, 方差相等时采用*t*检验或者方差分析, 用Stata7.0统计软件处理数据, 以*P*<0.05表示差别有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 MTT检测人结肠癌细胞对多种化疗药物的敏感性** HCT8/V耐药细胞不仅对原诱导药物具有高度的耐药性, 耐药倍数达到10.49倍, 同时对

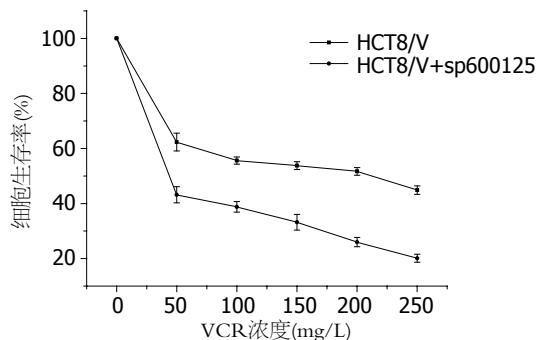


图 1 阻断JNK信号通路对HCT8/V细胞生存率的影响.

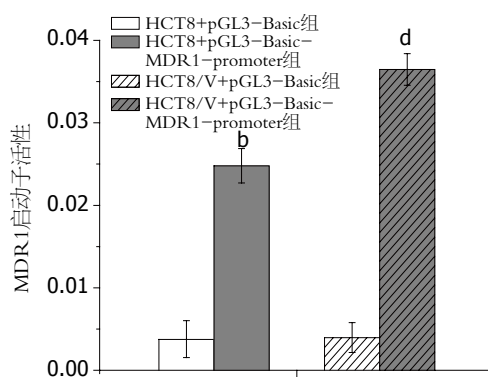


图 2 MDR1启动子转录活性在人结肠癌细胞中的表达.

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs HCT8+pGL3-Basic组; <sup>d</sup>*P*<0.01 vs HCT8/V+pGL3-Basic组.

结构和作用各异的其他化疗药物亦具有交叉耐药性. HCT8/V对4种化疗药物的IC<sub>50</sub>值及耐药指数见表2.

**2.2 JNK对HCT8/V细胞MDR的影响** 人肠癌MDR细胞被sp600125(20 μmol/L)干预后, 50、100、150、200、250 mg/L不同浓度的VCR对HCT8/V细胞生存率的影响均比对照组有所下降; IC<sub>50</sub>从191.08 mg/L ± 18.18 mg/L下降到50.34 mg/L ± 15.71 mg/L, 两者比较差异有统计学意义(*P*<0.01, 图1). 提示抑制JNK信号通路的激活可以影响耐药细胞HCT8/V对化疗药物VCR的敏感性(*P*<0.01).

**2.3 JNK对HCT8/V细胞MDR1启动子活性表达的影响**

**2.3.1 人结肠癌细胞对pGL3-Basic-MDR1启动子转录活性的表达:** pGL3-Basic-MDR1转染人结肠癌HCT8和HCT8/V细胞后, MDR1启动子的活性明显高于载体质粒转染对照组(*P*<0.01). HCT8+pGL3-Basic-MDR1组是HCT8+pGL3-Basic组的6.58倍, 而HCT8/V+pGL3-Basic-MDR1组高于HCT8/V+pGL3-Basic组9.19倍, 提示转染入MDR1基因的肠癌敏感和耐药细胞, 其

### ■应用要点

JNK通路的激活诱导P糖蛋白的高表达, 对肿瘤多药耐药的发生发展过程起着重要作用, 本研究有助于对人结直肠癌患者化疗失败, 临床症状改善不明显等发病机制的阐明, 并为肿瘤的诊治提供更充分的理论依据.

### 同行评价

本文科学性和创新性较强,能较好地反映我国胃肠病学基础研究的水平。

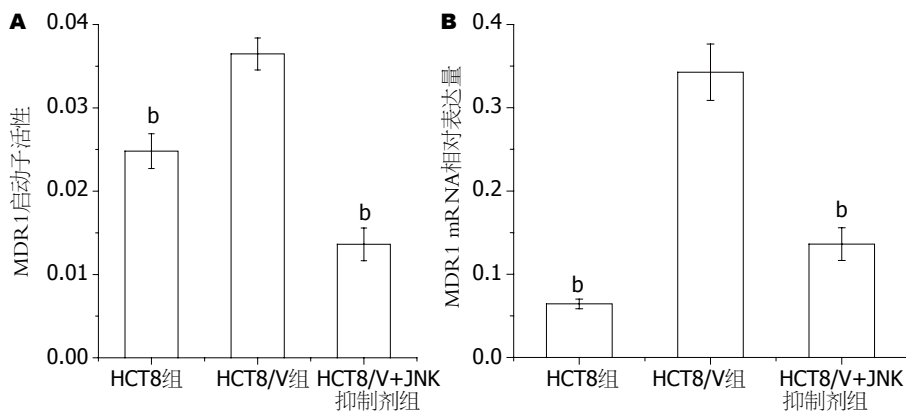


图3 JNK调控HCT8/V细胞对MDR1启动子活性、MDR1 mRNA的影响。A: MDR1启动子; B: MDR1 mRNA。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs HCT8/V组。

表3 MDR1启动子转录活性在人结肠癌细胞中的表达 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD)

分组	MDR1启动子活性
HCT8+pGL3-Basic组	0.003767 $\pm$ 0.002237
HCT8+pGL3-Basic-MDR1组	0.024800 $\pm$ 0.002081
HCT8/V+pGL3-Basic组	0.003967 $\pm$ 0.001801
HCT8/V+pGL3-Basic-MDR1组	0.036467 $\pm$ 0.001914

MDR1基因启动子的荧光素酶活性的表达均高于未转入该基因质粒的对照组(表3, 图2)。

2.3.2 JNK调控HCT8/V细胞MDR1启动子活性的表达: 耐药细胞HCT8/V的MDR1基因启动子的荧光素酶活性呈高表达, JNK抑制剂sp600125(20  $\mu$ mol/L)作用2 h后, HCT8/V细胞中MDR1基因启动子的荧光素酶活性表达明显降低, 下降了2.68倍, 两者比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 图3A)。

2.4 JNK对HCT8/V细胞MDR1 mRNA表达的影响 敏感细胞HCT8低表达MDR1, 耐药细胞HCT8/V的MDR1 mRNA表达明显高于敏感细胞。JNK抑制剂sp600125(20  $\mu$ mol/L)作用2 h后, HCT8/V细胞中MDR1表达明显降低, 下降了2.55倍, 两者比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 图3B)。

2.5 JNK对HCT8/V细胞P-gp表达的影响 耐药细胞HCT8/V的P-gp蛋白表达明显高于对照组( $P < 0.01$ )。并且JNK抑制剂sp600125(20  $\mu$ mol/L)作用HCT8/V细胞2 h后, P-gp蛋白表达下降了1.57倍, 差异呈显著性( $P < 0.01$ , 图4), 提示抑制JNK信号通路的激活后HCT8/V细胞的P-gp表达降低。

### 3 讨论

MDR是指肿瘤细胞长期接触某一化疗药物, 不仅对此种化疗药物产生耐药性, 而且对其他结构和功能不同的抗肿瘤药物也产生交叉耐药性

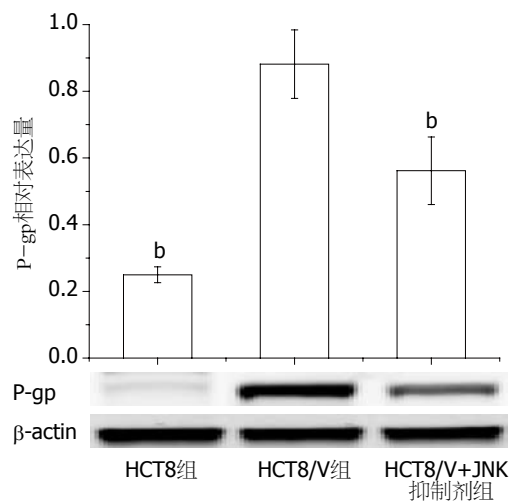


图4 JNK调控HCT8/V细胞P-gp的表达。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs HCT8/V组。

现象<sup>[10-14]</sup>, 这是造成化疗失败的主要原因。因此, 探索MDR机制是解决耐药问题、改善化疗效果的关键。近年来, 人们为逆转肿瘤细胞的MDR进行了大量尝试, 目前能在临床证实跟一些肿瘤耐药相关的基因只有MDR1/P-gp<sup>[15-17]</sup>。大量研究认为细胞信号转导通路逆转MDR1的表达有望成为逆转耐药的一个新靶点。

JNK又被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK), 他是哺乳类动物细胞中MAPK家族中的重要一员, 于1991年首次被发现。JNK信号通路可被细胞因子、生长因子、应激(如电离辐射、渗透压、热休克和氧化损伤)等多种因素激活<sup>[18-21]</sup>, 大量实验提示JNK信号通路在细胞分化、细胞凋亡、应激反应以及多种人类疾病的发生与发展中起着至关重要的作用。在JNK途径中, MAPKKK对MAPKK的丝氨酸、苏氨酸双位点磷酸化而将其活化, JNK接受上游信号被激活后, 可以进一步使核内的转录因子c-Jun氨基末端的第63、73位丝氨酸残基磷酸化, 进而激活c-Jun<sup>[22-24]</sup>。激活的JNK通路可

通过磷酸化转录因子、细胞骨架相关蛋白、酶类等多种底物来调节细胞的生理过程。

由于目前有关MAPK通路与MDR逆转治疗的研究尚处于起步阶段<sup>[25]</sup>, 两者之间的作用机制仍未清楚<sup>[26-28]</sup>. sp600125是一种广泛应用的JNK抑制剂, 可阻断JNK信号转导通路<sup>[29,30]</sup>. 有研究发现<sup>[31]</sup>, 未采用逆转剂抑制P-gp的外排功能, 仅通过抑制JNK/SAPK活性, 可以使耐药细胞株FM3A/M中的P-gp表达降低, 提示JNK的激活可能是介导MDR的原因之一. 进一步研究发现, 其发挥作用的可能是JNK通路中的上游激酶PEBG-SEK. 另有实验证实<sup>[32]</sup>, 在人胃癌耐药细胞EPG85-257/RDB和胰腺癌耐药细胞EPP85-181/RDB中, 阻断JNK信号转导通路, P-gp表达下调, 并发现细胞内抗癌药物浓度增加, 说明JNK信号转导通路与MDR有一定的相关性. Kawasaki等<sup>[33]</sup>报道, 阻断JNK通路后, 明显降低MCF7/ADR细胞内P-gp的表达, 增加对阿霉素的敏感性, 并推测JNK通路可能是作用于耐药细胞的MDR1基因, 从而使MDR1的转录和翻译增加, 将化疗药物泵出细胞外从而逆转MCF7/ADR细胞的MDR.

本实验证实, JNK特异性抑制剂sp600125能使人结肠癌MDR细胞对VCR更加敏感. JNK特异性抑制剂sp600125能降低细胞的耐药性而增加VCR的细胞杀伤作用, 使HCT8/V细胞凋亡增加, IC<sub>50</sub>由191.08 mg/L ± 18.18 mg/L降低到50.34 mg/L ± 15.71 mg/L. 说明sp600125可以部分逆转细胞的耐药性, 使其耐药性下降. 同时, 采用双荧光素酶活性报告基因检测MDR1启动子质粒转染表达的结果发现, pGL3-Basic-MDR1转染人结肠癌HCT8和HCT8/V细胞后, MDR1启动子的活性明显高于载体质粒转染对照组. 加入JNK抑制剂sp600125(20 μmol/L)2 h后, HCT8/V细胞中MDR1基因启动子的荧光素酶活性表达明显降低, 比耐药组下降了2.52倍. 结果提示阻断JNK通路抑制了信号传导, 使人结肠癌耐药细胞的MDR1的表达降低, 从而降低了细胞的耐药性. 为了更进一步证实这种想法, 我们采用RFQ-PCR检测耐药细胞MDR1 mRNA的表达, Western blot检测P-gp的表达, 结果发现, 抑制JNK通路的激活后, HCT8/V细胞的MDR1/P-gp表达明显降低. 提示肿瘤的耐药性有可能是通过JNK信号传导通路, 作用于细胞的MDR1基因, 从而使MDR1的转录和翻译增加, 调节细胞内的P-gp表达, 将化疗药物泵出细胞外, 产生耐药性<sup>[34,35]</sup>.

总之, 人结肠癌HCT8/V细胞较HCT8细胞具有MDR1基因的高表达, 阻断JNK通路后, 可降低MDR1的表达, 逆转MDR性. 但该信号通路的激活究竟在MDR1的表达过程中发挥怎样的作用, 有待于进一步研究.

#### 4 参考文献

- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 116-124
- Kuwazuru Y, Yoshimura A, Hanada S, Utsunomiya A, Makino T, Ishibashi K, Kodama M, Iwahashi M, Arima T, Akiyama S. Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in acute leukemia cells and correlation to clinical drug resistance. *Cancer* 1990; 66: 868-873
- Choi K, Frommel TO, Stern RK, Perez CF, Kriegl M, Tsuruo T, Roninson IB. Multidrug resistance after retroviral transfer of the human MDR1 gene correlates with P-glycoprotein density in the plasma membrane and is not affected by cytotoxic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7386-7390
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270: 1326-1331
- Yoshida K, Behrens A, Le-Niculescu H, Wagner EF, Harada T, Imaki J, Ohno S, Karin M. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates apoptosis in the retinal ganglion cells by optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 1631-1635
- Kinoshita M, Eguchi Y, Hynynen K. Activation of Bak in ultrasound-induced, JNK- and p38-independent apoptosis and its inhibition by Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353: 515-521
- 隋华, 李琦. JNK/SAPK信号转导通路与多药耐药机制的研究. *肿瘤防治研究* 2010; 37: 844-847
- Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-252
- Yan F, Wang XM, Liu ZC, Pan C, Yuan SB, Ma QM. JNK1, JNK2, and JNK3 are involved in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 287-295
- Shinoda C, Maruyama M, Fujishita T, Dohkan J, Oda H, Shinoda K, Yamada T, Miyabayashi K, Hayashi R, Kawagishi Y, Fujita T, Matsui S, Sugiyama E, Muraguchi A, Kobayashi M. Doxorubicin induces expression of multidrug resistance-associated protein 1 in human small cell lung cancer cell lines by the c-jun N-terminal kinase pathway. *Int J Cancer* 2005; 117: 21-31
- Ferguson LA, Rhoads J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: The new face of an old disease. *J Am Acad Nurse Pract* 2009; 21: 603-609
- Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol* 2010; 596: 47-76
- Lee CH. Reversing agents for ATP-binding cassette drug transporters. *Methods Mol Biol* 2010; 596: 325-340
- Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: clinical studies of p-glycoprotein inhibitors. *Methods Mol Biol* 2010; 596: 341-358



- 15 关云艳, 欧希龙, 郭庆明, 颜芳. P-gp, ToPo II 和 GST- $\pi$  在胃癌组织中的表达及与预后的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3371-3376
- 16 Kuo MT. Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol* 2007; 608: 23-30
- 17 Krupoves A, Seidman EG, Mack D, Israel D, Morgan K, Lambrette P, Costea I, Deslandres C, Grimard G, Law L, Levy E, Amre DK. Associations between ABCB1/MDR1 gene polymorphisms and Crohn's disease: a gene-wide study in a pediatric population. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 900-908
- 18 Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 470-473
- 19 Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 1996; 271: 31929-31936
- 20 Zanke BW, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles LA, Zon L, Kyriakis J, Liu FF, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol* 1996; 6: 606-613
- 21 Butterfield L, Storey B, Maas L, Heasley LE. c-Jun NH2-terminal kinase regulation of the apoptotic response of small cell lung cancer cells to ultraviolet radiation. *J Biol Chem* 1997; 272: 10110-10116
- 22 Herdegen T, Skene P, Bähr M. The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci* 1997; 20: 227-231
- 23 Guo YL, Baysal K, Kang B, Yang LJ, Williamson JR. Correlation between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 4027-4034
- 24 Bark H, Choi CH. PSC833, cyclosporine analogue, downregulates MDR1 expression by activating JNK/c-Jun/AP-1 and suppressing NF-kappaB. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65: 1131-1136
- 25 盛雅萍, 李建芳, 刘炳亚, 罗建明, 郑磊贞, 陈强, 郭伟剑. 结肠癌耐药细胞株LoVo/5-FU的建立及其差异表达基因的筛选. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1899-1904
- 26 Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W. Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 923-934
- 27 Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res* 2006; 26: 4457-4498
- 28 刘诗权, 于红刚, 唐国都, 黄杰安, 于皆平. 细胞外调节蛋白激酶通路对胃癌细胞化疗效果的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2211-2216
- 29 Bogoyevitch MA, Arthur PG. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JuNK no more? *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784: 76-93
- 30 Chen X, Wu J, Hua D, Shu K, Wang JZ, Li L, Lei T. The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 is neuroprotective in amygdala kindled rats. *Brain Res* 2010; 1357: 104-114
- 31 Kang CD, Ahn BK, Jeong CS, Kim KW, Lee HJ, Yoo SD, Chung BS, Kim SH. Downregulation of JNK/SAPK activity is associated with the cross-resistance to P-glycoprotein-unrelated drugs in multidrug-resistant FM3A/M cells overexpressing P-glycoprotein. *Exp Cell Res* 2000; 256: 300-307
- 32 Zhou J, Liu M, Aneja R, Chandra R, Lage H, Joshi HC. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res* 2006; 66: 445-452
- 33 Kawasaki K, Watanabe M, Sakaguchi M, Ogasawara Y, Ochiai K, Nasu Y, Doihara H, Kashiwakura Y, Huh NH, Kumon H, Date H. REIC/Dkk-3 overexpression downregulates P-glycoprotein in multidrug-resistant MCF7/ADR cells and induces apoptosis in breast cancer. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 65-72
- 34 van der Kolk DM, de Vries EG, Müller M, Vellenga E. The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 685-701
- 35 Ling X, Zhou Y, Li SW, Yan B, Wen L. Modulation of mitochondrial permeability transition pore affects multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Biol Sci* 2010; 6: 773-783

编辑 李薇 电编 何基才

# 眼针对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠水通道蛋白3表达的影响

王艳杰, 刘慧慧, 刘旭东, 柴纪严, 赵金茹, 王德山

王艳杰, 辽宁中医药大学基础医学院生物化学教研室 辽宁省沈阳市 110032  
刘慧慧, 刘旭东, 王德山, 辽宁中医药大学基础医学院生理教研室 辽宁省沈阳市 110032  
柴纪严, 赵金茹, 辽宁中医药大学基础医学院教学实验中心 辽宁省沈阳市 110032  
王艳杰, 博士, 副教授, 主要从事中医药对受体及受体后信号转导途径影响方面的研究。  
国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目, No. 2007CB512702  
作者贡献分布: 此课题由王德山设计; 研究过程由王艳杰、刘慧慧、刘旭东、柴纪严及赵金茹共同完成; 数据分析由王艳杰与刘慧慧完成; 本文论文写作由王艳杰与刘慧慧共同完成。  
通讯作者: 王德山, 教授, 博士生导师, 110032, 辽宁省沈阳市, 辽宁中医药大学基础医学院生理学教研室。  
wwdss5768@yahoo.com.cn  
电话: 024-31207091  
收稿日期: 2010-12-13 修回日期: 2011-02-23  
接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-03-28

## Eye acupuncture therapy up-regulates aquaporin 3 expression in the colon of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

Yan-Jie Wang, Hui-Hui Liu, Xu-Dong Liu, Ji-Yan Chai, Jin-Ru Zhao, De-Shan Wang

Yan-Jie Wang, Department of Biochemistry, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 11032, Liaoning Province, China  
Hui-Hui Liu, Xu-Dong Liu, De-Shan Wang, Department of Physiology, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 11032, Liaoning Province, China  
Ji-Yan Chai, Jin-Ru Zhao, Experimental Center, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 11032, Liaoning Province, China  
Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2007CB512702  
Correspondence to: Professor De-Shan Wang, Department of Physiology, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 11032, Liaoning Province, China. wwdss5768@yahoo.com.cn  
Received: 2010-12-13 Revised: 2011-02-23  
Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-03-28

## Abstract

**AIM:** To explore mechanisms underlying therapeutic effects of eye acupuncture against diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS) by investigating the expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) and aquaporin 3

(AQP3) in the colon of D-IBS rats.

**METHODS:** Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups: control group, D-IBS model group, and eye acupuncture group. D-IBS was induced in rats of the D-IBS model group and eye acupuncture group by chronic stress and constraint. The eye acupuncture group underwent eye acupuncture therapy for 7 d. VIP mRNA expression in the colon was detected by RT-PCR. The mRNA and protein expression of AQP3 in the colon was detected by immunohistochemistry and real-time PCR, respectively.

**RESULTS:** Compared to the control group, the mRNA expression level of VIP in the colon was increased significantly ( $0.94 \pm 0.07$  vs  $0.64 \pm 0.15$ ,  $P < 0.01$ ) and the mRNA and protein expression levels of AQP3 in the colon were remarkably decreased ( $1.09 \pm 0.09$  vs  $7.02 \pm 1.25$ ;  $0.284 \pm 0.020$  vs  $0.601 \pm 0.027$ , both  $P < 0.01$ ) in the D-IBS model group. Eye acupuncture therapy remarkably decreased the mRNA expression of VIP ( $0.78 \pm 0.15$  vs  $0.94 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ ) but significantly increased the mRNA and protein expression of AQP3 ( $2.33 \pm 0.66$  vs  $1.09 \pm 0.09$ ;  $0.374 \pm 0.03$  vs  $10.284 \pm 0.020$ , both  $P < 0.01$ ) in D-IBS rats.

**CONCLUSION:** Oversecretion of VIP and hyposcretion of AQP3 may be involved in the pathogenesis of D-IBS. Eye acupuncture therapy exerts therapeutic effects against D-IBS in rats possibly by down-regulating VIP expression and up-regulating AQP3 expression in the colon.

**Key Words:** Eye acupuncture; Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Vasoactive intestinal peptide; Aquaporin 3

Wang YJ, Liu HH, Liu XD, Chai JY, Zhao JR, Wang DS. Eye acupuncture therapy up-regulates aquaporin 3 expression in the colon of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 899-904

## 摘要

**目的:** 研究眼针对腹泻型肠易激综合征(D-

## ■背景资料

IBS临床根据罗马Ⅲ诊断标准分为便秘型、腹泻型、混合型及未定型4个分型, D-IBS最多见, 约占2/3, 所以粪便中含水量则是IBS分型的重要依据。近年来的研究发现, D-IBS患者及动物模型的结肠黏膜上皮细胞水通道蛋白(AQPs)表达发生明显改变。

## ■同行评议者

郑培永, 副研究员, 上海中医药大学脾胃病研究所

## ■ 研发前沿

结肠AQP3表达的变化和机制成为研究D-IBS发生的新热点。

IBS)模型大鼠结肠血管活性肠肽(VIP)和水通道蛋白3(AQP3)表达的影响,探讨眼针对D-IBS模型大鼠结肠水液代谢的调控作用和机制。

**方法:** SPF级Wistar大鼠30只,随机分为对照组、D-IBS模型组和眼针组,每组10只。采用慢性应激结合束缚方法建立D-IBS大鼠模型。采用RT-PCR检测结肠VIP的mRNA表达水平变化;采用Real time-PCR法检测AQP3的mRNA表达水平变化,采用SABC免疫组织化学法检测结肠AQP3的蛋白表达水平变化。

**结果:** 与对照组比较, D-IBS模型组结肠VIP的mRNA表达水平显著升高( $0.94 \pm 0.07$  vs  $0.64 \pm 0.15$ ,  $P < 0.01$ ), 而结肠AQP3的mRNA和蛋白表达水平显著降低( $1.09 \pm 0.09$  vs  $7.02 \pm 1.25$ ;  $0.284 \pm 0.020$  vs  $0.601 \pm 0.027$ , 均 $P < 0.01$ )。与D-IBS模型组比较, 眼针组结肠VIP的mRNA表达水平显著降低( $0.78 \pm 0.15$  vs  $0.94 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ ), 而结肠AQP3的mRNA和蛋白表达水平显著升高( $2.33 \pm 0.66$  vs  $1.09 \pm 0.09$ ;  $0.374 \pm 0.03$  vs  $10.284 \pm 0.020$ , 均 $P < 0.01$ )。

**结论:** 通过抑制结肠中VIP的表达和分泌及升高AQP3的表达, 调控结肠水液代谢可能是眼针治疗D-IBS的作用机制之一。

**关键词:** 眼针; 腹泻型肠易激综合征; 血管活性肠肽; 水通道蛋白3

王艳杰, 刘慧慧, 刘旭东, 柴纪严, 赵金茹, 王德山. 眼针对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠水通道蛋白3表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 899-904  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/899.asp>

## 0 引言

眼针是辽宁中医药大学著名中医彭静山教授在多年临床实践的基础上创立的根据眼球结膜上血管的形色变化, 判定疾病的性质与部位, 然后辩证针刺眼周特定穴区, 以治疗全身疾病的一种中医特色疗法。本课题组多年的临床实践表明眼针对胃肠功能具有较好的调整作用, 在治疗胃肠道功能性疾病和腹痛、腹泻方面具有显著疗效。因此本课题组建立了腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)大鼠模型, 通过观察眼针对该模型大鼠结肠中血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)和水通道蛋白3(aquaporin 3, AQP3)表达的影响, 探索眼针对D-IBS模型大鼠结肠水

液代谢的调控机制, 从而为眼针治疗D-IBS提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SPF级♂Wistar大鼠30只, 周龄6-7 wk, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证编号: SCXK(京)2007-0001, 体质量 $220 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ ; RNAiso™ Plus(TaKaRa Code. D9108); SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit(Perfect Real time)(TaKaRa Code. DRR063A), TaKaRa DNase I (RNase Free)(TaKaRa Code. D2215); Easy Dilution(for Real time PCR)(TaKaRa Code. D9160); PrimerScript™ RT-PCR Kit(TaKaRa Code. DRR014); *in vitro* Transcription T7 Kit(TaKaRa Code. D6140); AQP3抗体(美国ADL公司); WD-9413B凝胶成像分析仪; Mycycler Thermal Cycler梯度PCR; TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Real time System(TaKaRa Code. TP800); RM2235型手动石蜡切片机, EG1150C型包埋机, HI1220型烘片机(德国LEICA), BX51型Olympus反射荧光显微镜(日本Olympus)。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模:** SPF级♂Wistar大鼠30只, 按照随机数字法分为: 对照组、D-IBS模型组和眼针组, 每组10只, 分笼饲养, 适应饲养环境1 wk后, 开始建立D-IBS模型。以Katz等<sup>[1]</sup>的慢性应激法与Williams等<sup>[2]</sup>的束缚方法结合建立D-IBS模型。D-IBS的模型评价参考王艳杰等<sup>[3]</sup>的报道。

**1.2.2 眼针治疗方法:** 本实验采用慢性应激与束缚结合方法建立D-IBS模型, 中医辨证属于肝郁脾虚模型, 因此在D-IBS模型建立成功后, 根据辨证取穴, 针刺: 下焦区、大肠区、肝区、脾区, 针刺方法: 用31号13 mm毫针, 于大鼠眶缘处, 采用眶上横刺法, 按照穴区定位线1→8的顺序, 从该穴区定位线一端进针, 横刺进针3 mm, 到另一定位线, 留针20 min, 10 min时刮针1次, 刮针5下。

**1.2.3 RT-PCR测定结肠VIP mRNA的表达水平:** 取100 mg结肠组织, 加入1 mL的RNAiso™ Plus, 按说明书提取总RNA, 溶于DEPC处理的去离子水, 然后进行RNA的含量与纯度测定, 取 $A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$ 的总RNA进行逆转录合成cDNA, 取5 μL逆转录产物作为模板在25 μL体系中进行PCR扩增, 引物序列见表1。反应条件为94℃预变性2 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共30个循环; 72℃延伸5 min。将扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 采用溴化乙锭染色, 把凝

表 1 RT-PCR引物序列

	序列	大小(bp)
β-actin	5'-TGTATGCCTCTGGTCCGTACCAC-3'	592
	5'-ACAGAGTACTTGCCTCAGGAG-3'	
VIP	5'-GCTGCCGTGTACATAAAGCAA-3'	210
	5'-AAGCTCCAGGTTGGAAGTTGAG-3'	
Actb-F	5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3'	171
Actb-R	5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	
Aqp3-F	5'-GCCATTGTTGACCCTATAACAAC-3'	150
Aqp3-R	5'-AGTGAAAAGGCGAGGTCCAA-3'	

胶放入凝胶成像分析仪, 拍照后用Gelpro32软件测量目的基因和内参的平均 $A$ 值, 并计算两者的比值, 以该比值反应目的基因VIP mRNA的表达水平.

**1.2.4 RT-PCR测定结肠AQP3 mRNA的表达水平:** 采用Real-time PCR方法对AQP3基因的mRNA进行相对表达量分析. 利用RNAiso™ Plus进行总RNA的提取, 用DNase I处理、精制后, 利用SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit采用SYBR Green I 荧光染料嵌合法, 以Total RNA反转录获得的cDNA作为标准品, 分别对管家基因Actb和目的基因AQP3制作标准曲线. 采用双标准曲线法进行结果分析, 利用标准曲线分别对各样品管家基因和目的基因进行定量, 通过管家基因的校正, 对各样品目的基因相对表达量进行分析. 引物序列见表1.

**1.2.5 SABC免疫组织化学法测定结肠组织AQP3的蛋白表达水平:** 利用多聚赖氨酸进行防脱片处理, 切片常规脱蜡至水. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>灭活内源性酶, 蒸馏水洗3次. 热修复抗原, 冷却后PBS洗涤1-2次. 滴加5% BSA封闭液, 室温20 min. 滴加适当稀释的AQP3抗体(1:100), 4℃过夜. PBS洗2 min/3次. 滴加生物素化山羊抗小鼠IgG, 20℃-37℃孵育20 min. PBS清洗, 5 min×2次. 滴加试剂SABC, 在室温下孵育30 min. PBS清洗, 5 min×4次. DAB显色, 室温显色, 镜下控制反应时间. 蒸馏水洗涤. 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片. 显微镜观察, 拍照. 采用BI2000医学图像分析系统进行图像分析, 选取200倍图像, 观察结肠黏膜, 细胞质呈棕黄色为AQP3阳性表达细胞, 每张切片随机选取3-5个高倍视野测定平均 $A$ 值, 平均 $A$ 值代表阳性表达参数, 平均 $A$ 值越大, 阳性表达越强.

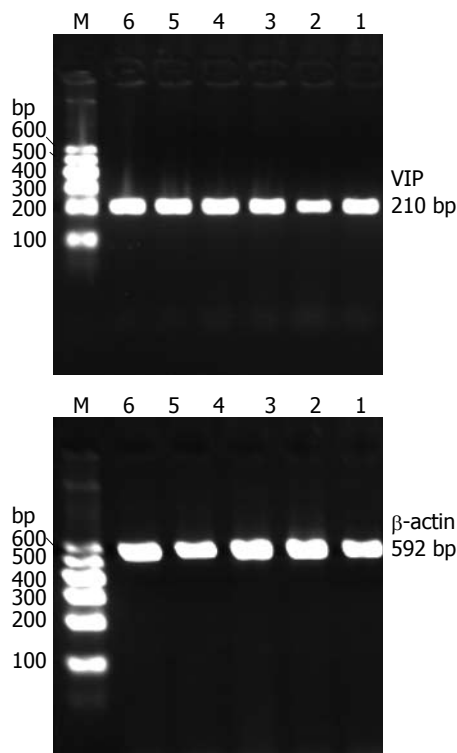


图 1 眼针对D-IBS模型大鼠结肠VIP mRNA表达水平的影响. 1, 2: 对照组; 3, 4: D-IBS模型组; 5, 6: 眼针组; M: 600 bp DNA Ladder Marker.

**■ 相关报道**  
杨会锋等研究发现结肠全段均有AQP3的表达, 提示结肠AQP3参与结肠重要生理功能之一.

**统计学处理** 实验数据运用SPSS13.0处理, 以mean±SD表示实验结果, 进行多组数据的方差分析, 组间比较采用LSD法.  $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 各组大鼠结肠VIP mRNA的表达水平** 对照组结肠VIP的相对表达量为 $0.64 \pm 0.15$ , D-IBS模型组结肠VIP的相对表达量为 $0.94 \pm 0.07$ , 与对照组比较, D-IBS模型组大鼠结肠VIP mRNA表达明显上调( $P < 0.01$ ). 经过眼针治疗后, 眼针组结肠VIP的相对表达量为 $0.78 \pm 0.15$ , 与D-IBS模型组比较, 眼针组结肠组织中VIP mRNA表达明显下调( $P < 0.01$ ), 与对照组比较无显著性差异( $P > 0.05$ , 图1).

**2.2 各组大鼠结肠组织AQP3 mRNA的表达** 对照组结肠AQP3的相对表达量为 $7.02 \pm 1.25$ , D-IBS模型组结肠AQP3的相对表达量为 $1.09 \pm 0.09$ ; 与对照组比较, D-IBS模型组结肠AQP3的mRNA表达水平显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 眼针治疗后, 眼针组结肠AQP3的相对表达量为 $2.33 \pm 0.66$ , 与D-IBS模型组相比, 眼针组结肠AQP3的mRNA表达水平显著升高( $P < 0.01$ , 图2).

### ■应用要点

通过抑制结肠中VIP的表达和分泌及升高AQP3的表达,调控结肠水液代谢可能是眼针治疗D-IBS的作用机制之一。

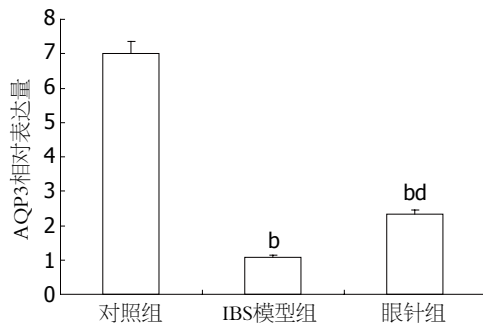


图2 各组大鼠结肠组织AQP3 mRNA表达水平的比较。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>bd</sup> $P < 0.01$  vs D-IBS模型组。

2.3 各组大鼠结肠AQP3的蛋白表达水平变化 光镜下观察, 对照组结肠AQP3的阳性细胞数目最多, 着色最深, 眼针组阳性细胞数目和着色居中, 而D-IBS模型组阳性细胞数目最少和着色最浅。免疫组织化学图像分析平均A值的结果表明: 对照组平均A值为 $0.601 \pm 0.027$ , D-IBS模型组平均A值为 $0.284 \pm 0.020$ , 与对照组比较, D-IBS模型组AQP3的蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ ); 眼针组平均A值为 $0.374 \pm 0.031$ , 且和D-IBS模型组比较, 眼针组AQP3的蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01$ , 图3)。

### 3 讨论

眼针是辽宁中医药大学基础医学院彭静山教授根据《内经》“观眼察病”和《证治准绳》对眼的脏腑划分理论, 于1974年开创的一种独特的针刺疗法<sup>[4,5]</sup>。《灵枢·邪气脏腑病形》云: “十二经脉, 三百六十五络, 其血气皆上于面而走窍, 其精阳气上走于目而为之精。”因此, 彭静山教授认为: 脏腑功能失调可通过经络反映于眼, 而眼针又通过对经络的调节, 起到调整脏腑经络气血, 平衡阴阳之目的。只需在眼眶边缘穴区施针, 就可以达到疏通经络、调节脏腑治疗全身疾病的目的。

IBS是指一种以腹痛或腹部不适伴有排便习惯改变和(或)大便性状异常的功能性肠病, 该病缺乏可解释症状的形态学改变和生化异常, 根据IBS的临床特点, 中医学将其归于“泄泻”、“腹痛”、“便秘”等疾病范畴<sup>[6]</sup>。现代医学目前尚无有效的治疗方法, 但是中医临床研究<sup>[7]</sup>和系统评价研究<sup>[8]</sup>表明中医药治疗IBS具有特色和优势。邱冰峰<sup>[9]</sup>明确指出抑郁恼怒或精神紧张等情志因素导致肝气郁滞, 气机不畅, 不通则痛而引起腹痛; 肝失疏泄, 横逆犯脾, 脾失运化而发为泄泻; 或肝气郁滞, 气机升降失

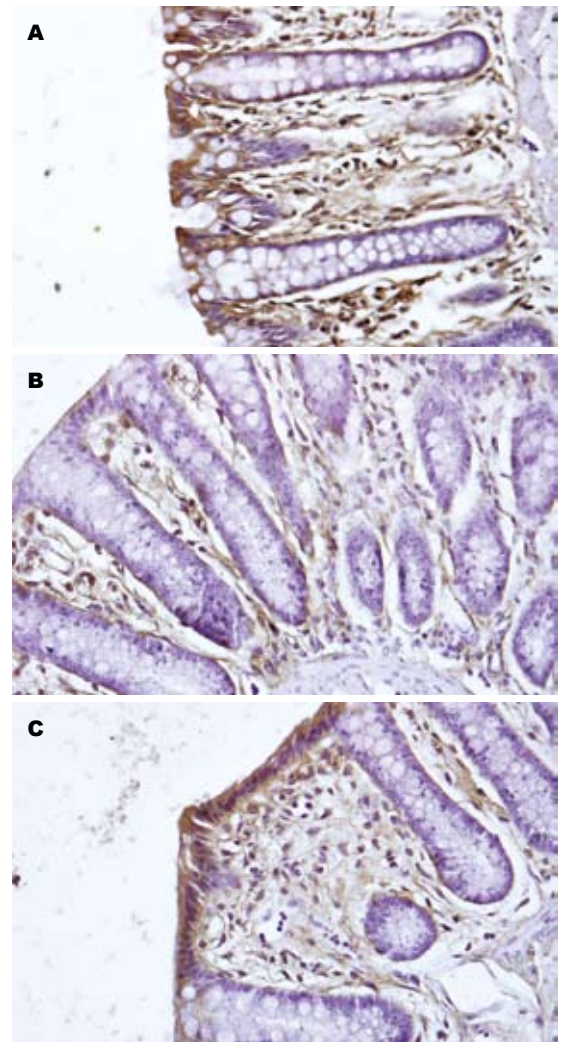


图3 各组大鼠结肠组织中AQP3阳性细胞的表达(DAB × 400)。A: 对照组; B: D-IBS模型组; C: 眼针组。

调, 大肠传导滞涩则发生便秘。而针刺或艾灸或针药结合等多种方法可以治宜疏肝理气, 健脾和胃, 通腑调肠, 而达到其治疗作用<sup>[10]</sup>。本课题组多年来的临床实践也表明, 针刺眼周能够调整多脏腑的功能, 尤其对胃肠功能具有较好的调整作用, 在治疗胃肠道功能性疾病和腹痛、腹泻方面疗效显著。为了进一步探索眼针是如何作用于内脏及其调整胃肠道功能的机制, 本课题组提出五脏六腑之精华皆注于目, 脏腑功能能气血盛衰均与眼穴相关联, 眼针刺刺激外周相关穴位, 能够启动靶器官神经递质、细胞因子等释放和分泌, 从而调控脏腑的各种代谢、改善其功能。为了证明这一假说, 本课题组建立了D-IBS大鼠模型, 并采用眼针治疗, 通过测定结肠VIP和AQP3的表达变化, 来探索眼针的作用机制, 从而为丰富眼针的中医理论基础内涵提供现代医学依据。

IBS临床根据罗马III诊断标准分为便秘型、腹泻型、混合型及未定型4个分型, 姚欣等<sup>[11]</sup>的研究结果显示照罗马III诊断标准, D-IBS最多见, 约占2/3, 所以粪便中含水量则是IBS分型的重要依据<sup>[12,13]</sup>. 近年来的研究发现, D-IBS患者及动物模型的结肠黏膜上皮细胞水通道蛋白(aquaporins, AQP)s表达发生明显改变<sup>[14-17]</sup>. 因此结肠AQP)s表达的变化和机制成为研究D-IBS发生的新热点. AQP)s在肠道上皮细胞大量表达, 肠道水代谢是其主要功能之一, 因此推测其表达的变化与肠道水代谢之间可能存在较为重要的关系<sup>[18]</sup>. 几种特异性AQP)s能够易化肠道内水的转运. 其中AQP3对人类肠表面细胞水的转运很重要. Ramírez-Lorca等<sup>[19]</sup>的研究结果显示AQP3 mRNA在结肠表达明显多于小肠和胃. Julian等<sup>[20]</sup>通过对小鼠腹泻模型研究发现, 在病情活动期时结肠AQP3表达降低, 病情好转后AQP3蛋白表达恢复到正常水平. Silberstein等<sup>[21]</sup>研究发现AQP3高表达可引起结肠黏膜对水的吸收增加而导致便秘, AQP3的低表达可引起结肠黏膜对水吸收减少而导致腹泻或便秘. 重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大鼠回肠黏膜AQP3蛋白及mRNA表达均较假手术组明显上调, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ ), 且以24 h时更为显著; AQP3参与了SAP大鼠的病理生理改变, 这可能是肠黏膜通透性增高的机制之一<sup>[22]</sup>. 杨会锋等<sup>[23]</sup>研究发现结肠全段均有AQP3的表达, 提示结肠AQP3参与结肠重要生理功能之一. 从以上研究结果分析, AQP3在结肠的水转运中具有重要作用, 其表达变化可以引起腹泻或便秘. 本实验结果表明D-IBS模型大鼠结肠组织AQP3的mRNA和蛋白表达与对照组相比均有下降. 由此推测D-IBS模型大鼠出现腹泻的症状可能与AQP3表达下调后影响了结肠内水转运有关.

以往的研究资料表明无论是结肠功能紊乱或是AQP)s表达发生变化都与体内, 特别是结肠组织中VIP含量变化有关, 表明VIP可能通过调控AQP)s的表达对D-IBS腹泻产生影响. 冯璟等<sup>[24]</sup>研究表明VIP作用下的HT-29细胞AQP8 mRNA和蛋白的表达均增加, 提示AQP)s可能是VIP作用的靶分子之一. 以VIP孵育人类结肠上皮细胞系HT-29, 可发现AQP)s mRNA表达上调, cAMP反应元件的DNA结合活性增强; 蛋白激酶A抑制剂H-89则可以阻断由VIP和cAMP对AQP)s mRNA表达的上调作用. Itoh等<sup>[25]</sup>研究显示, VIP通过cAMP依赖的途径上调AQP)s及其mRNA

表达研究显示VIP通过cAMP依赖的途径上调AQP3 mRNA和蛋白表达, 推测VIP参与便秘发生与上调AQP3表达, 从而促进水分的吸收有关. AQP)s是一类糖蛋白家族, 多种AQP)s都含有PKA和蛋白激酶C的同源序列, 所以能够直接接受磷酸化调节. 由于VIP属于含氮物质, 其VIP1-R属于G蛋白耦联型受体; 有报道<sup>[26]</sup>提出, VIP可以通过细胞蛋白激酶A系统来改变膜上AQP的含量, 以调节跨膜水流动, 从而调节膜对水的通透性. VIP是肠内分泌的一种脑肠肽类激素, 可以促进肠道水和电解质的分泌. 胃肠上皮细胞基底膜有VIP的受体, 当其与VIP结合时, 刺激细胞中的cAMP的蓄积, 促进肠上皮细胞分泌电解质和水分. 静脉注射VIP能够引起分泌性腹泻, 增加血浆中VIP浓度能够引起结肠炎腹泻, 这表明VIP在肠道水的转运过程中起重要作用. 近年在对IBS发生机制的研究中发现, IBS患者在腹痛、腹泻等症状出现的同时, 往往伴有血与结肠组织中VIP含量升高<sup>[27,28]</sup>, 但是学者认为, D-IBS患者结肠黏膜VIP表达升高可能是肠动力增强后的一种负反馈机制<sup>[29]</sup>. 姜道亮等<sup>[30]</sup>的实验发现, 外周血中以及大鼠回肠末端、远端结肠, VIP的表达均较对照组明显增加, 且差异有显著性( $P < 0.05$ ), 因此VIP的表达可以作为判断肠功能紊乱动物模型的一个有价值的指标. 本实验结果显示, IBS模型大鼠血清和结肠组织VIP含量改变与既往的研究结果一致, 提示VIP与IBS的腹痛、腹泻发生有着密切关系.

本实验结果显示, D-IBS模型大鼠结肠组织VIP mRNA表达水平升高, 同时AQP3的表达水平降低, 说明D-IBS模型大鼠结肠组织VIP mRNA水平的增高, 可能下调了结肠黏膜细胞AQP3的表达而影响了结肠内水的转运, 导致水吸收减少. 由于结肠腔内存水量的增加, 不但能够引起腹痛及腹泻发生, 同时由于结肠内水分增多则提高了结肠的敏感性, 通过“脑-肠轴”途径反射性地调控了肠道神经-体液-免疫网络系统活动, 进而加剧了结肠组织的运动和分泌功能的异常, 导致IBS状态下腹痛、腹泻等症状的发生.

本实验结果显示, 眼针还可能通过降低D-IBS模型大鼠的结肠组织的VIP mRNA的表达, 增加结肠黏膜细胞AQP3的表达, 由此不但促进了结肠内水的转运, 同时由于结肠残存的水液减少还可能降低了结肠组织的高敏感性, 从而达到减轻或缓解了D-IBS的腹痛、腹泻等症

■同行评价  
本文科学性较好, 具有较好的临床参考价值.

状. 至于眼针抑制VIP分泌与释放, 以及VIP调控AQP3表达的具体机制有待于进一步研究明确.

#### 4 参考文献

- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 1981; 5: 247-251
- Williams CL, Villar RG, Peterson JM, Burks TF. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1988; 94: 611-621
- 王艳杰, 王德山, 关洪全, 王健, 柴纪严, 赵金茹, 韩晓伟. 眼针对腹泻型肠易激综合征大鼠血清和结肠组织中P物质及血管活性肠肽含量的影响. *针刺研究* 2010; 35: 8-11
- 董文毅, 彭敏. 眼针疗法的研究进展. *针灸学报* 1991; 7: 48-51
- 彭静山. 眼针疗法. *中国针灸* 1988; 8: 21
- 张声生, 周滔, 汪红兵. 肠易激综合征中医药诊疗现状与挑战. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2216-2220
- 张声生, 汪红兵, 李振华, 唐旭东, 王新月, 刘建平, 张福文, 陈明, 陶琳, 唐博祥, 朱培一, 吴兵, 李保双, 宋秀江, 刘敏, 查波. 中医药辨证治疗腹泻型肠易激综合征多中心随机对照研究. *中国中西医结合杂志* 2010; 30: 9-12
- 苏冬梅, 张声生, 刘建平, 汪红兵. 中医药治疗腹泻型肠易激综合征的系统评价研究. *中华中医药杂志* 2009; 24: 532-535
- 邱冰峰. 肠易激综合征的几点中医学认识. *现代中西医结合杂志* 2007; 16: 2661-2733
- 黄宣, 吕宾. 肠易激综合征诊治进展和面临的挑战. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2234-2239
- 姚欣, 杨云生, 赵卡冰, 孙刚, 刘英圣, 王巍峰. 罗马Ⅲ标准研究肠易激综合征临床特点及亚型. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 563-566
- 胡品津, 潘国宗. 中华医学会第一届全国肠易激综合征学术会议纪要. *中华消化杂志* 2003; 23: 428
- Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 马瑞军, 王俊平, 陈星, 原丽莉. 腹泻型肠易激综合征患者结肠黏膜AQP4、AQP8相关性表达. *国际内科学杂志* 2008; 35: 129-131
- 王俊平, 侯晓华, 马瑞军. 腹泻型肠易激综合征患者临床特征与结肠黏膜水通道蛋白8的表达. *中华内科杂志* 2006; 45: 1000-1003
- 王德山, 张宇, 王哲, 单德红. 脾虚模型大鼠结肠上皮细胞水通道蛋白8表达变化. *中国中西医结合消化杂志* 2008; 16: 71-73
- 马瑞军, 陈星, 汪喙, 原丽莉. 水通道蛋白8与肠易激综合征相关性表达研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 354-355
- 王俊平, 侯晓华. 水通道蛋白与肠道水代谢的研究. *山西医科大学学报* 2007; 38: 281-284
- Ramírez-Lorca R, Vizuete ML, Venero JL, Revuelta M, Cano J, Ilundáin AA, Echevarría M. Localization of aquaporin-3 mRNA and protein along the gastrointestinal tract of Wistar rats. *Pflugers Arch* 1999; 438: 94-100
- Guttman JA, Samji FN, Li Y, Deng W, Lin A, Finlay BB. Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 2007; 9: 131-141
- Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, Zotta E, Bigi F, Berkowski D, Ibarra C. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 1303-1313
- 齐文杰, 张淑文, 王红, 张苗苗, 文艳, 王宝恩. 大黄素对重症急性胰腺炎大鼠小肠水通道蛋白3表达的调节作用. *中国中西医结合急救杂志* 2010; 17: 214-217
- 杨会锋, 袁维堂. 水通道蛋白3和水通道蛋白9在结肠黏膜的表达及意义. *医药论坛杂志* 2007; 28: 12-15
- 冯璟, 王俊平, 贾泽明. 血管活性肠肽VIP对人结肠上皮细胞系HT29细胞AQP8表达调节的研究. *中国现代医学杂志* 2007; 17: 2345-2348, 2353
- Itoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. Enhancement of aquaporin-3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell line. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 203-210
- Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Guggen M, Reubi JC. Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology* 2004; 145: 1203-1210
- Van Der Veek PP, Biemond I, Masclee AA. Proximal and distal gut hormone secretion in irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 170-177
- Morise K, Furusawa A, Yamamoto H, Saito H. [Role of gut hormones in irritable bowel syndrome]. *Nippon Rinsho* 1992; 50: 2697-2702
- 李兆申, 董文珠, 邹多武, 满晓华, 邹晓平, 尹宁. 肠易激综合征肠黏膜SP、VIP、CGRP变化的研究. *第二军医大学学报* 2003; 24: 147-151
- 姜道亮, 王巧民, 宋继中, 周政, 徐雪梅, 代子艳. 大鼠肠道DCs及相关细胞因子在冷-束缚应激诱导肠功能紊乱后的表达. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 89-93

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 联合转染Survivin shRNA和CD44v3 shRNA对结直肠癌SW480细胞增殖和侵袭能力的影响

郭勇杭, 刘中宏, 许军, 姚媛媛, 黄平

郭勇杭, 刘中宏, 许军, 黄平, 哈尔滨医科大学第二附属医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
姚媛媛, 黑龙江省医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
郭勇杭, 在读硕士, 主要从事结直肠癌基因治疗方面的研究。  
作者贡献分布: 此课题由刘中宏设计; 研究过程由郭勇杭、姚媛媛及黄平操作完成; 研究所用试剂及分析工具由刘中宏提供; 数据分析由许军与姚媛媛完成; 本论文写作由郭勇杭完成; 刘中宏与许军指导。  
通讯作者: 刘中宏, 副教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区, 哈尔滨医科大学第二附属医院消化内科。  
liuzhonghong@medmail.com.cn  
收稿日期: 2011-01-06 修回日期: 2011-03-03  
接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-03-28

## Combined transfection of shRNAs targeting survivin and CD44v3 inhibits proliferation and reduces invasion in human colorectal carcinoma cell line SW480

Yong-Hang Guo, Zhong-Hong Liu, Jun Xu, Yuan-Yuan Yao, Ping Huang

Yong-Hang Guo, Zhong-Hong Liu, Jun Xu, Ping Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Yuan-Yuan Yao, Department of Gastroenterology, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Correspondence to: Associate professor Zhong-Hong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. liuzhonghong@medmail.com.cn  
Received: 2011-01-06 Revised: 2011-03-03  
Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-03-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of combined transfection of short hairpin RNAs (shRNAs) targeting survivin and CD44v3 on cell proliferation and invasion in human colorectal carcinoma cell line SW480 and to provide experiment evidence for gene therapy of colorectal carcinoma.

**METHODS:** Plasmids carrying shRNAs targeting survivin and CD44v3 were designed, constructed and transfected into SW480 cells. SW480

cells were divided into negative control group, blank control group, survivin shRNA group, CD44v3 shRNA group and co-transfection group. Survivin and CD44v3 protein expression was analyzed by Western blot. Cell apoptosis, proliferation and invasion were measured by flow cytometry, MTT assay and Transwell chamber assay, respectively.

**RESULTS:** The expression of survivin and CD44v3 proteins in the co-transfection group was reduced by  $84.2\% \pm 0.3\%$  and  $77.3\% \pm 0.1\%$ , respectively. Co-transfection inhibited protein expression more efficiently than single-plasmid transfection ( $P < 0.05$ ). After transfection for 120 h, the reduced rate of cell growth was  $44.3\% \pm 0.1\%$  in the co-transfection group,  $21.5\% \pm 0.2\%$  in the survivin shRNA group, and  $26.4\% \pm 0.2\%$  in the CD44v3 shRNA group. Combined transfection inhibited cell proliferation more efficiently than single-plasmid transfection ( $P < 0.05$ ). The overall apoptosis rate was  $37.6\% \pm 2.3\%$  in the co-transfection group,  $20.0\% \pm 0.4\%$  in the survivin shRNA group, and  $21.6\% \pm 1.6\%$  in the CD44v3 shRNA group. Combined transfection induced cell apoptosis more efficiently than single-plasmid transfection ( $P < 0.05$ ). The number of cells passing the Transwell chamber was  $66.12 \pm 4.04$  in the co-transfection group,  $89.35 \pm 3.06$  in the survivin shRNA group, and  $93.53 \pm 5.13$  in the CD44v3 shRNA group. Combined transfection reduced cell invasion more significantly than single-plasmid transfection ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Transfection of either survivin shRNA or CD44v3 shRNA could significantly inhibit cell proliferation, reduce cell invasion and induce cell apoptosis in human colorectal carcinoma cell line SW480. Co-transfection of survivin and CD44v3 shRNAs has a synergistic effect in inhibiting proliferation and weakening invasion of SW480 cells.

**Key Words:** RNA interference; Survivin; CD44v3; Colorectal carcinoma

Guo YH, Liu ZH, Xu J, Yao YY, Huang P. Combined

### 背景资料

RNA干扰是双链RNA(dsRNA)介导的转录后基因沉默,能特异性地降解靶基因的mRNA,具有高度的特异性和有效性,目前正成为研究基因功能、肿瘤和病毒性疾病预防的有力工具。Survivin是凋亡抑制蛋白(IAPs)家族的成员,CD44v3是细胞黏附分子CD44变异型中的一个,两者均在肿瘤组织中表达,具有抑制细胞凋亡和调节细胞周期和细胞分裂的功能,且表达水平与恶性肿瘤的侵袭性以及预后有关。

### 同行评议者

黄培林, 教授, 东南大学



## ■ 研发前沿

小干扰RNA (si-RNA) 是一种短片断双链RNA分子, 能够以同源互补序列的mRNA为靶目标降解特定的mRNA, 导致其相应的基因沉默, 这种现象被称为RNA干扰 (RNAi), 是目前分子生物学的研究热点。

transfection of shRNAs targeting survivin and CD44v3 inhibits proliferation and reduces invasion in human colorectal carcinoma cell line SW480. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(9): 905-911

## 摘要

**目的:** 探讨联合转染Survivin短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA) 和CD44v3 shRNA对结直肠癌SW480细胞增殖和侵袭能力的影响, 为结直肠癌的基因治疗提供实验依据。

**方法:** 设计并构建能够稳定转录shRNA并干扰Survivin和CD44v3分子表达的质粒, 将其单独及联合转染结直肠癌SW480细胞后, 分阴性对照组、空白质粒对照组、Survivin组、CD44v3组和共转染组。Western blot检测转染后Survivin和CD44v3蛋白表达的变化, 流式细胞仪及MTT法检测细胞凋亡和细胞增殖的变化, Transwell小室检测细胞迁移能力的改变。

**结果:** 测序证明表达载体构建成功, 共转染组Survivin和CD44v3的蛋白表达抑制率分别为 $84.2\% \pm 0.3\%$ 和 $77.3\% \pm 0.1\%$ , 与单独转染组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。转染120 h后, 共转染组、Survivin组和CD44v3组细胞生长抑制率分别为 $44.3\% \pm 0.1\%$ 、 $21.5\% \pm 0.2\%$ 、 $26.4\% \pm 0.2\%$ , 共转染组抑制效果最明显 ( $P < 0.05$ ), 总凋亡率分别为 $37.6\% \pm 2.3\%$ 、 $20.0\% \pm 0.4\%$ 、 $21.6\% \pm 1.6\%$ , 共转染组凋亡率最高 ( $P < 0.05$ ), 小室穿膜细胞数分别为 $66.12 \pm 4.04$ 个,  $89.35 \pm 3.06$ 个、 $93.53 \pm 5.13$ 个, 共转染组与各组差异显著 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** Survivin shRNA和CD44v3 shRNA可分别下调Survivin和CD44v3蛋白的表达, 抑制结直肠癌细胞的增殖, 促进其凋亡, 减弱其迁移能力, 而两者的联合转染能进一步抑制细胞的生长增殖, 减弱细胞的侵袭能力。

**关键词:** RNA干扰; 生存素; CD44v3; 结直肠癌

郭勇杭, 刘中宏, 许军, 姚媛媛, 黄平. 联合转染Survivin shRNA和CD44v3 shRNA对结直肠癌SW480细胞增殖和侵袭能力的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 905-911

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/905.asp>

## 0 引言

小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 是一种短片断双链RNA分子, 能够以同源互补序列的mRNA为靶目标降解特定的mRNA, 导致其相应的基因沉默, 这种现象被称为RNA干扰 (RNA interference, RNAi)<sup>[1]</sup>, 是目前分子生物学

的研究热点。Survivin是凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) 家族的成员。黏附分子CD44v3是细胞黏附分子CD44变异型中的一个, 两者在人体正常组织中不表达或微量表达, 但在肿瘤组织中表达, 且表达水平与恶性肿瘤的侵袭性及预后有关, 并具有抑制细胞凋亡和调节细胞周期和细胞分裂的功能<sup>[2-9]</sup>。本研究用RNAi的方法单独及联合转染靶向这两个基因的短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA), 探讨这两种基因对结直肠癌细胞生物学行为的影响, 及两者作用机制的相关性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人结直肠癌细胞株SW480、KeyGen-Trans III聚阳离子转染试剂购自南京凯基生物公司, Survivin和CD44v3基因的siRNA表达载体pGCsi-H1/Neo/GFP/RNAi由上海吉凯生物公司构建, 上海英骏生物技术公司测序。Survivin和CD44v3多克隆抗体购自Santa Cruz公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA靶序列:** Survivin与CD44v3基因序列来自GenBank, 利用GeneChem™ siRNA的设计工具, 参照siRNA的设计原则, 分别设计选取19 nt的siRNA靶序列模板, GGCTGGCTTCATC-CACTGC(86-104) GGCTTTCAATAGCACCTTG(86-104), 经Blast分析证明与人类其他编码序列无同源性。序列的5'端对应于Bam H I酶切位点, 3'末端带有T6序列, 对应于Hind III的酶切位点, 正义链和反义链之间是9个碱基的环序列(TTCAAGAGA), 同时设计针对GFP的siRNA靶序列转录模板作为阳性对照, 以pGCsi-H1/Neo/GFP/NON RNAi载体作阴性对照, 不干扰待研究的内源性基因。Survivin shRNA序列: 5'-GATCCCGGCTG-GCTTCATCCACTGCTTCAAGAGAGCAGTG-GATGAAGCCAGCCTTTTTGGAT-3', CD44v3 shRNA序列: 5'-GATCCCGGCTTTCAATAG-CACCTTGTTCAAGAGACAAGGTGCTATT-GAAAGCCTTTTTGGAT-3'。

**1.2.2 细胞培养:** 水浴复苏人结肠癌细胞株SW480, 接种于30 mL培养瓶, 在37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中, 用含100 mL/L小牛血清, 100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养液中培养, 细胞贴壁生长, 2.5 g/L胰蛋白酶消化传代。

**1.2.3 细胞转染:** 转染前1 d, 胰酶消化并计数, 细胞铺板在0.5 mL含血清不含抗生素的培养基中,

调整细胞密度, 按每孔 $3 \times 10^5$ 个细胞等量加到6孔培养板中培养. 分组转染(转染试剂: DNA = 2:1), 实验设阴性对照组、空白质粒对照组, 单独转染Survivin shRNA实验组(简称Survivin组)、单独转染CD44v3 shRNA实验组(简称CD44v3组)、共转染组, 放置 $37^\circ\text{C}$ ,  $50\text{ mL/L CO}_2$  孵育箱孵育24-48 h, 转染过程按转染试剂盒说明书进行.

**1.2.4 Western blot检测各组Survivin蛋白和CD44v3蛋白表达水平的变化:** 转染后48 h, 收集各组细胞及培养液上清, 以SDS煮沸法裂解细胞提取总蛋白, 紫外分光光度计法进行蛋白定量,  $40\ \mu\text{g}$ 蛋白进行SDS-PAGE, 电泳后转至PVDF膜, 室温封闭2 h, 加入一抗(1:1000兔抗人Survivin抗体),  $4^\circ\text{C}$ 孵育过夜, PBS洗膜, 加入二抗(1:4000鼠抗兔IgG/HRP), 室温孵育2 h, 洗膜3次, 化学发光试剂反应5 min, ECL压片、曝光、显影, 实验重复3次, 检测CD44v3蛋白操作步骤同上. 目标蛋白的相对表达量 =  $A_{\text{目标蛋白}}/A_{\beta\text{-actin}}$ , 抑制率 =  $(1 - \text{转染组目标蛋白的相对表达量}/\text{阴性对照组的相对表达量}) \times 100\%$ .

**1.2.5 流式细胞仪检测各组细胞凋亡:** 转染后48 h, 将各组细胞用 $2.5\ \text{g/L}$ 胰酶(不含EDTA)消化收集, 用PBS洗涤细胞两次(离心 $2000\ \text{r/min}$ , 5 min)收集 $5 \times 10^5$ 个细胞, 加入 $500\ \mu\text{L}$  Binding Buffer悬浮细胞, 再加入 $5\ \mu\text{L}$  Annexin V-FITC混匀后, 加入 $5\ \mu\text{L}$  PI混匀, 室温避光反应5-15 min, 用流式细胞仪检测(Ex = 488 nm; Em = 530 nm)细胞凋亡的情况.

**1.2.6 MTT比色法检测细胞增殖活性:** 取对数生长期细胞, 胰酶消化并吹打成单个细胞悬液, 把细胞悬浮在含 $100\ \text{mL/L}$ 小牛血清的DMEM培养液中, 调整细胞浓度为 $8 \times 10^4/\text{mL}$ , 以每孔8000个细胞接种于96孔板中, 设空白质粒对照组、阴性对照组、只加转染试剂对照组(简称无质粒转染组)、Survivin shRNA组(简称Survivin组)、CD44v3 shRNA组(简称CD44v3组)、共转染组, 每组5个复孔, 在 $37^\circ\text{C}$ ,  $50\ \text{mL/L CO}_2$ 的培养箱中培养24 h后, 分别转染各组细胞. 分别于24、48、72、96、120 h取出一块培养板, 每孔加MTT染液( $5\ \text{g/L}$ ) $20\ \mu\text{L}$ , 在 $37^\circ\text{C}$ ,  $50\ \text{mL/L CO}_2$ 的培养箱中继续培养4-6 h, 小心弃去上清液, 每孔加入DMSO  $200\ \mu\text{L}$ , 振荡10 min, 使结晶物充分溶解. 选择492 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值, 以空白调零, 记录结果, 重复实验3次, 抑制率 =  $(1 - \text{转染组A值}/\text{阴性对照组$

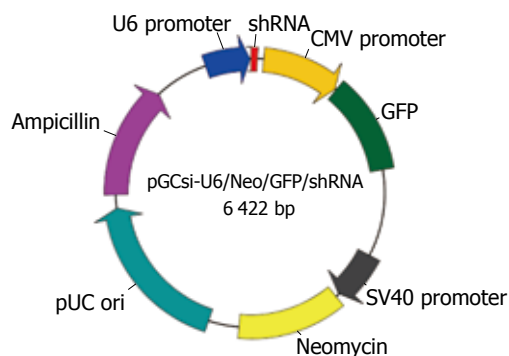


图1 pGC siRNA质粒. U6 Promoter: 6077-6422; shRNA: 9-55; CMV promoter: 105-704; GFP: 709-1428; SV40 Promoter: 2098-2475; Neomycin: 2503-3297; pUC ori: 3534-4702; Ampicillin: 4805-5659.

A值)  $\times 100\%$ .

**1.2.7 Transwell小室测细胞迁移能力:** 转染后48 h, 将各组细胞用胰酶消化后, 把细胞悬浮在无血清的DMEM培养液中, 调整浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ , 将小室放入24孔板中在 $8.0\ \mu\text{m}$ 孔径小室的上室加入 $100\ \mu\text{L}$ 细胞悬液, 下室加入 $500\ \mu\text{L}$ 含 $100\ \text{mL/L}$ 小牛血清的DMEM培养液, 培养12 h后, 取出小室用棉签擦去上室细胞并用Giemsa染色, 在倒置显微镜下按一定顺序选取9个视野观察并计数, 以穿出小室细胞数表示肿瘤细胞的迁移能力. 实验分阴性对照组、Survivin组、CD44v3组、共转染组, 每组重复3次.

**统计学处理** 实验数据处理应用SPSS软件, 进行统计分析. 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 进行方差分析, 各组均数间差异显著性比较采用 $t$ 检验进行,  $P < 0.05$ 为统计学差异显著.

## 2 结果

**2.1 pGC siRNA质粒 联合应用限制性内切酶BamHI、HindIII及DNA连接酶等将分别靶向Survivin和CD44v3的shRNA目的基因插入所构建质粒的基因组, U6 promoter、CMV promoter以及SV40 promoter均为启动子, Neomycin和Ampicillin是G418抗性基因, 有利于成功转染细胞的筛选, GFP能编码绿色荧光蛋白有利于观察转染效率及目的基因的沉默率(图1).**

**2.2 重组质粒测序** 重组质粒shRNA编码序列与我们设计的靶向Survivin和CD44v3的核苷酸序列完全一致, 表明成功构建了重组载体pGCsiRNA-Survivin和pGCsiRNA-CD44v3(图2).

**2.3 Western blot检测Survivin蛋白及CD44v3蛋白的表达** 实验转染组Survivin蛋白和CD44v3蛋白表达下调, 目标蛋白的相对表达量为: Sur-

### ■ 相关报道

周薇等研究表明, Survivin与胃癌的发生、发展和预后密切相关, Survivin蛋白表达与Bcl-2蛋白异常表达密切相关, 两基因在抗凋亡机制上既存在协同的一面, 又存在互补的一面.

■创新盘点

本文运用RNAi技术联合转染Survivin shRNA和CD44v3 shRNA,探讨结肠癌基因治疗的新方法,并与两基因单独转染方法的效果相比较,得出联合转染更具有有效性的结论,为结肠癌的基因治疗提供了一种新思路.

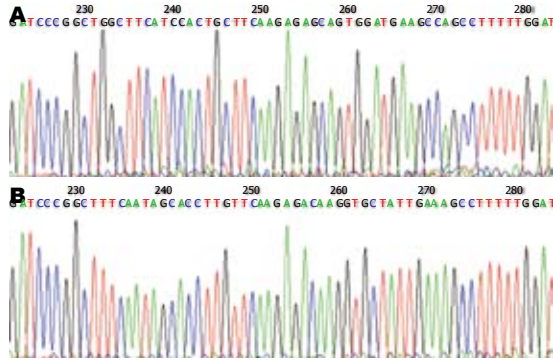


图2 Survivin和CD44v3 shRNA序列. A: Survivin; B: CD44v3.

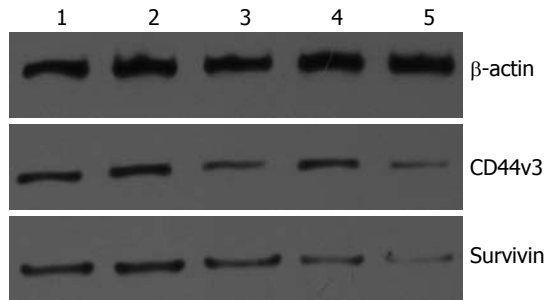


图3 各组CD44v3和Survivin的蛋白表达. 1: 空白对照组; 2: 空白质粒对照组; 3: CD44v3组; 4: Survivin组; 5: 共转染组.

vivin 0.697±0.021(阴性对照组)、0.663±0.025(空白质粒对照组)、0.297±0.025(Survivin组)、0.597±0.015(CD44v3组)、0.113±0.015(共转染组), CD44v3 0.727±0.025(阴性对照组)、0.69±0.01(空白质粒对照组)、0.407±0.015(Survivin组)、0.5916±0.021(CD44v3组)、0.173±0.015(共转染组), 转染组目标蛋白的相对表达量低于阴性对照和空白对照组, 其中共转染组最低, 统计学分析差异有显著(P<0.05), 而在空白对照组和阴性对照组内Survivin蛋白和CD44v3蛋白表达无明显差异. 其中共转染组的蛋白表达抑制率为84.2±0.3%(Survivin)和77.3±0.1%(CD44v3), 与单独转染组相比差异有统计学意义(P<0.05, 图3, 4).

2.4 转染后各组的凋亡情况 转染组不论在细胞的早期凋亡方面还是晚期凋亡方面其凋亡率均高于阴性对照组和空白质粒对照组(P<0.05), 阴性对照组和空白质粒对照组之间差异无统计学意义. 且早期凋亡率高于晚期凋亡率, 共转染组早期和晚期凋亡率分别为23.9%±2.3%、13.7±2.2%, 均高于单独转染组的早晚期凋亡率12.8±0.4%、7.2±0.5%(survivin组)和14.6%±1.6%、7.0%±2.1%(CD44v3组), 差异有统计学意义(P<0.05, 图5).

2.5 MTT检测细胞增殖活性 转染72 h后, 转染

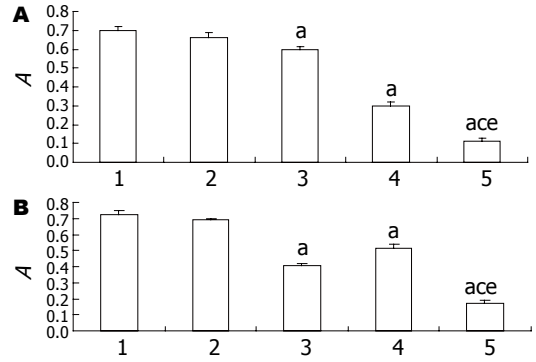


图4 各组CD44v3和Survivin A值. A: Survivin; B: CD44v3. 1: 空白对照组; 2: 空白质粒对照组; 3: CD44v3组; 4: Survivin组; 5: 共转染组. \*P<0.05 vs 阴性对照组; †P<0.05 vs CD44V3组; ‡P<0.05 vs Survivin组.

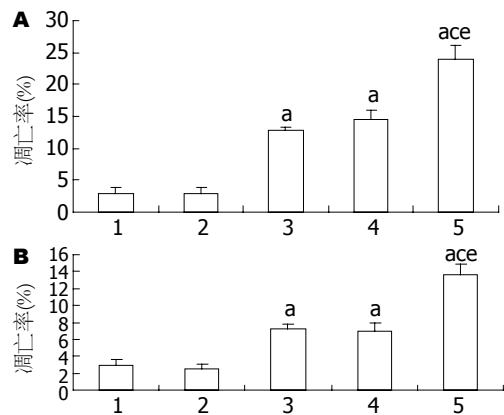


图5 各组细胞早晚期凋亡情况. A: 早期; B: 晚期. 1: 空白对照组; 2: 空白质粒对照组; 3: CD44v3组; 4: Survivin组; 5: 共转染组. \*P<0.05 vs 阴性对照组; †P<0.05 vs CD44V3组; ‡P<0.05 vs Survivin组.

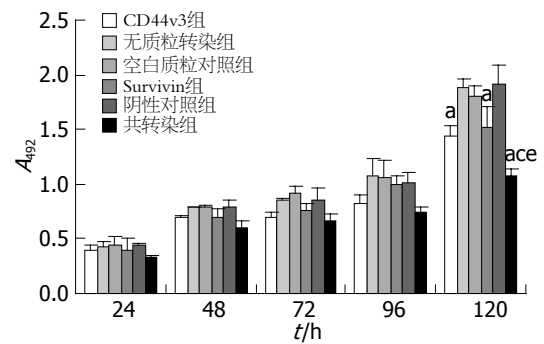


图6 MTT检测细胞增殖活性. \*P<0.05 vs 阴性对照组; †P<0.05 vs CD44V3组; ‡P<0.05 vs Survivin组.

组与空白质粒对照组、阴性对照组差别明显, 转染120 h后, 差别最明显, A值分别为1.07±0.14(共转染组)、1.52±0.39(Survivin组)、1.43±0.19(CD44v3组)、1.91±0.34(阴性对照组), 且共转染组与单独转染组相比差异有统计学意义(P<0.05), 细胞生长抑制率为44.3%±0.1%(共转染组)、21.5%±0.2%(Survivin组)、26.4%±0.2%(CD44v3组), 空白质粒对照组、无质粒转

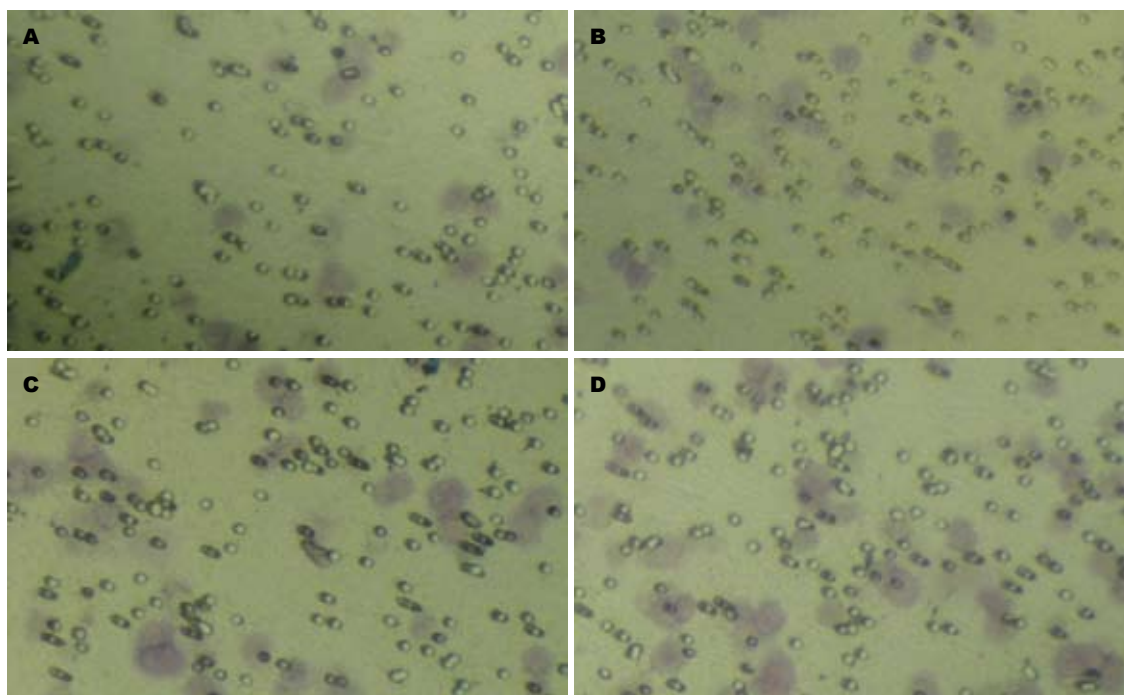


图7 转染后细胞迁移能力的变化( $\times 400$ ). A: 共转染组; B: CD44v3组; C: Survivin组; D: 阴性对照组.

染组、阴性对照组间差异无显著性(图6).

**2.6 转染后细胞迁移能力的变化** 共转染组穿过细胞数(个)为 $66.12 \pm 4.04$ , CD44v3组 $89.35 \pm 3.06$ , Survivin组 $93.53 \pm 5.13$ , 阴性对照组 $120.64 \pm 5.65$ , 结果显示针对目的基因CD44v3、Survivin的RNAi单独转染组与阴性对照组相比, 穿过细胞数少, 细胞的迁移能力减弱, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而且共转染组穿越细胞数最少, 与单独转染组比, 差异显著( $P < 0.05$ , 图7), 细胞的迁移能力明显减弱.

### 3 讨论

肿瘤的发生和发展是多基因、多因素共同作用的结果. 其之所以治疗困难一方面是因为肿瘤细胞的凋亡受阻; 另一方面是因为肿瘤细胞迁移力增强.

Survivin蛋白是凋亡IAPs家族成员之一, 基因定位于染色体17q25, 其表达发生在结直肠癌恶性转化的早期, 在癌变过程中起重要作用<sup>[10,11]</sup>, 是一种具有调控细胞凋亡和细胞增殖双重功能的调控子<sup>[12]</sup>, 其机制是Survivin通过抑制caspase3和caspase7的活性抑制细胞凋亡. caspase是控制细胞凋亡的核心环节, Survivin直接作用于caspase, 阻止由caspase激活剂或凋亡诱导剂诱导的细胞内相关自杀酶的积累, 从而起到抑制细胞凋亡的作用<sup>[13]</sup>. Survivin主要在G<sub>2</sub>/M期表达, G<sub>2</sub>/M期控制点负责保持遗传的准确性, 通过

Survivin对细胞周期的调节作用, 使肿瘤细胞逃避细胞周期G<sub>2</sub>/M期检测点的监测, 从而抵抗因DNA损伤或突变自身诱导的细胞凋亡, 导致肿瘤细胞异常分裂增殖<sup>[14]</sup>. 有研究表明, Survivin的表达上调与直肠癌凋亡指数下降、转移率增高、总体存活率缩短、预后不良和复发率增加有关<sup>[15]</sup>. 这些研究提示, 通过抑制Survivin的表达来诱导肿瘤细胞的凋亡、降低转移率是行之有效的, 在前期的研究中, 我们已经证实应用RNAi技术靶向Survivin的shRNA可以降低Survivin蛋白的表达, 抑制结肠癌细胞的增殖<sup>[16]</sup>. 熊英等<sup>[17]</sup>也得出相似的结论. 有关胃癌<sup>[18]</sup>、子宫内膜癌<sup>[19]</sup>、前列腺癌<sup>[20]</sup>、肺癌<sup>[21]</sup>等的研究也有相关的报道.

CD44是分布广泛的单链膜表面糖蛋白, 可赋予肿瘤细胞很强的侵袭及迁移能力, 其基因位于人类第11号染色体短臂上, 分为: (1)CD44标准体(CD44s); (2)CD44拼接变异体(CD44v). Tanabe等<sup>[22]</sup>认为: CD44变异型主要通过胞外多种基质成分结合(如透明质酸等), 一方面介导了肿瘤细胞与胞外基质的黏附, 有利于肿瘤细胞在原发病灶部位“定居”; 另一方面还可以激发活体细胞内某些信号的传导机制, 使肿瘤细胞分泌蛋白水解酶, 加速胞外基质的降解, 赋予他们很强的浸出行为及迁移能力, 从而构成肿瘤细胞的侵袭性和易转移性, 有利于肿瘤细胞的扩散. CD44v表达阳性的癌细胞与激活的淋巴细胞具有很多共性, 其模仿淋巴细胞执行了

### 应用要点

本实验方法若在今后的科研和临床工作中证实确实可行的话, 那么在肿瘤基因治疗的疗效方面将会取得更大突破, 各种化疗药物的应用将大大减少, 不仅医疗费用将会明显降低, 药物不良反应也会大幅降低.

### 同行评价

本文为结直肠癌的治疗奠定了实验基础,但可读性一般。

细胞-细胞和细胞-基质的相互作用,并最终进入循环系统渗入周围组织,这些为肿瘤扩散所必须<sup>[23]</sup>。同时卓文磊等<sup>[24]</sup>也推测转移机制与淋巴有关。CD44v3是细胞黏附分子CD44变异型中的一个,介导细胞和细胞外基质之间的相互作用,参与肿瘤细胞的增殖、分化、黏附、迁移及肿瘤血管形成等重要过程,在肿瘤的发展和转移中起重要作用。Mayer等<sup>[25]</sup>发现,CD44v3在胃癌中的表达与淋巴管浸润和淋巴转移密切相关。Wang等<sup>[26]</sup>研究表明CD44v3在头颈肿瘤患者转移性淋巴结中有过度表达。

在恶性肿瘤发生的癌基因研究中,不少学者提出了多基因协同作用的假设,认为在肿瘤发生发展的各阶段,至少有两个或两个以上功能不同的异常激活的癌基因各自发挥不同作用,并在时间和空间上相互配合,协同加强了细胞的癌变<sup>[27]</sup>。有实验研究表明,Survivin、Bcl-2在胃癌的发生中存在协同作用<sup>[28]</sup>,张东梅等<sup>[29]</sup>研究表明,FUS1和IL-12联合转染在诱导肺癌细胞凋亡方面具有良好的协同作用。本研究结果也显示,Survivin蛋白和CD44v3蛋白在SW480结直肠癌细胞中高表达,分别靶向两者基因的实验组在抑制细胞生长增殖、加速细胞凋亡、减弱细胞迁移力以及减少蛋白表达方面作用程度相当,而共转染组与单独转染组相比抑制作用更强,其中蛋白抑制率达到84.2%±0.3%(Survivin)和77.3%±0.1%(CD44v3),这提示两基因在大肠癌的发生和发展方面很可能存在协同或互补作用。

首先,Survivin和CD44v3可能在细胞周期调控点上存在协同作用。CD44分子是目前已知的透明质酸酶和透明质酸的主要受体,透明质酸主要是通过CD44受体途径对肿瘤细胞、内皮细胞产生一系列影响。Lisignoli等<sup>[30]</sup>的研究结果表明,透明质酸可以降低抗Fas抗体介导的凋亡,其机制之一就是与其配体CD44结合。细胞周期能否启动进行细胞增殖主要调控点在G<sub>1</sub>期,称为限制点,一旦通过该点,势必进入S期,完成整个细胞增殖周期。研究发现,透明质酸酶的cDNA上的一个蜕皮激素诱导的启动子结合在肿瘤细胞结构基因的上游,促进其通过限制点进入S期,从而使S期和G<sub>2</sub>-M期细胞比例增加G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期细胞比例减少<sup>[31]</sup>。而Survivin对细胞周期具有调节作用,使肿瘤细胞逃避细胞周期G<sub>2</sub>/M期检测点的监测,从而抵抗因DNA损伤或突变自身诱导的细胞凋亡,导致肿瘤细胞异常分裂增殖,由此可推测,Survivin和CD44v3在细胞周期调控点上存

在某些相似机制;其次,Survivin和CD44v3在增强肿瘤细胞迁移性或侵袭性方面可能存在协同作用。Coma等<sup>[32]</sup>研究发现,使用针对Survivin反义核酸和siRNA均可促进肿瘤组织血管内皮细胞凋亡,抑制血管内皮细胞迁移。透明质酸能上调肿瘤细胞、内皮细胞表面CD44分子的表达<sup>[33]</sup>,实验表明,透明质酸片段与内皮细胞表面的透明质酸受体(CD44等)结合后,可以通过激活局部的MAP酶的途径,促进内皮细胞的增殖和运动,这一作用在体内、体外实验中均得到了证实<sup>[34]</sup>,由此可推测Survivin和CD44v3在增强肿瘤细胞迁移性或侵袭性方面存在相似性。

两者在以上两方面的协同作用可能同时影响细胞生物学行为的其他方面,使共转染组在本实验中表现的抑制作用最强,从而证明shRNA的联合转染在基因治疗肿瘤方面更具有有效性,因而为肿瘤的基因治疗提供一种更有效的方法,但两基因协同作用的具体作用机制以及结合位点还需要进一步研究和探讨,而且此治疗方法对机体其他部位有无不良反应还需后续实验进一步验证。

### 4 参考文献

- 1 Kasschau KD, Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 1998; 95: 461-470
- 2 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 127-134
- 3 Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650
- 4 Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 4589-4592
- 5 Knudson W, Chow G, Knudson CB. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol* 2002; 21: 15-23
- 6 Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003; 88: 31-52
- 7 Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 2004; 23: 2825-2837
- 8 Wheatley SP, Henzing AJ, Dodson H, Khaled W, Earnshaw WC. Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279: 5655-5660
- 9 Kuniyasu H, Chihara Y, Kubozoe T, Takahashi T. Co-expression of CD44v3 and heparanase is correlated with metastasis of human colon cancer. *Int J Mol Med* 2002; 10: 333-337
- 10 郑长青, 林连捷, 马颖, 姜卫国, 马铁, 胡刚正. 大肠黏

- 膜癌变过程中Survivin蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1052-1053
- 11 Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 974-977
- 12 Watson AJ. An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57: 107-121
- 13 Huh JR, Foe I, Muro I, Chen CH, Seol JH, Yoo SJ, Guo M, Park JM, Hay BA. The Drosophila inhibitor of apoptosis (IAP) DIAP2 is dispensable for cell survival, required for the innate immune response to gram-negative bacterial infection, and can be negatively regulated by the reaper/hid/grim family of IAP-binding apoptosis inducers. *J Biol Chem* 2007; 282: 2056-2068
- 14 Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastry PR. Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia* 2004; 6: 29-40
- 15 Rödel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Weiss C, Günther K, Schick C, Sauer R, Rödel C. High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol* 2002; 178: 426-435
- 16 刘中宏, 郑长青, 喻卫红. Survivin短发夹RNA对结肠癌SW480细胞增殖和细胞周期的影响. *肿瘤学杂志* 2008; 14: 186-189
- 17 熊英, 王爱民, 郭文. 导入靶向survivin基因的shRNA质粒表达载体对大肠癌细胞生物学行为的影响. *中华实用诊断和治疗杂志* 2009; 23: 741-743
- 18 冷松, 刘颖, 赵辉, 孙广慧, 王若雨. 靶向survivin的siRNA对胃癌BGC-823细胞增殖和转移能力的影响. *中国微生态学杂志* 2010; 22: 805-807
- 19 艾志宏, 丰有吉. Survivin对子宫内膜癌细胞运动和侵袭能力影响的研究. *中华肿瘤防治杂志* 2010; 17: 261-265
- 20 刘艳波, 沈维高, 芦丽莉, 葛贺, 盖晓东, 赵雪俭. Survivin-siRNA对前列腺癌DU145细胞的促凋亡作用. *中国病理生理杂志* 2010; 26: 1474-1478
- 21 曾亮, 吴胜其, 王晖, 陈森林, 陈艳平. Survivin基因RNA干扰对肺癌细胞凋亡及增殖的影响. *现代生物医学进展* 2009; 9: 271-273
- 22 Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 1993; 341: 725-726
- 23 Birch M, Mitchell S, Hart IR. Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res* 1991; 51: 6660-6667
- 24 卓文磊, 王彦, 陈正堂. CD44v3短发夹RNA对透明质酸诱导人结肠癌SW480细胞体外粘附和侵袭的抑制作用. *中国癌症杂志* 2005; 15: 518-521
- 25 Mayer B, Jauch KW, Günthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993; 342: 1019-1022
- 26 Wang SJ, Wreesmann VB, Bourguignon LY. Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 2007; 29: 550-558
- 27 Gadd SL, Hobbs G, Miller MR. Acetaminophen-induced proliferation of estrogen-responsive breast cancer cells is associated with increases in c-myc RNA expression and NF-kappaB activity. *Toxicol Sci* 2002; 66: 233-243
- 28 周薇, 戴奇刚, 邓鑫, 张绍娟, 张锡流. Survivin、bcl-2在胃癌中的表达及其临床意义. *肿瘤学杂志* 2009; 15: 549-551
- 29 张冬梅, 杨寒朔, 朱文, 冯志华, 邓洪新, 魏于全. FUS1和IL-12双基因真核共表达质粒的构建及对A549细胞促凋亡作用研究. *四川大学学报(医学版)* 2009; 40: 569-574
- 30 Lisignoli G, Grassi F, Zini N, Toneguzzi S, Piacentini A, Guidolin D, Bevilacqua C, Facchini A. Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan: evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1800-1807
- 31 Lin G, Stern R. Plasma hyaluronidase (Hyal-1) promotes tumor cell cycling. *Cancer Lett* 2001; 163: 95-101
- 32 Coma S, Noe V, Lavarino C, Adán J, Rivas M, López-Matas M, Pagan R, Mitjans F, Vilaró S, Píulats J, Ciudad CJ. Use of siRNAs and antisense oligonucleotides against survivin RNA to inhibit steps leading to tumor angiogenesis. *Oligonucleotides* 2004; 14: 100-113
- 33 Stern R, Shuster S, Wiley TS, Formby B. Hyaluronidase can modulate expression of CD44. *Exp Cell Res* 2001; 266: 167-176
- 34 Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem* 2001; 276: 36770-36778

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# DOG1、CD117和PDGFRA在胃肠道间质瘤中的表达及相关性

隋杏玲, 郝旺, 孙秀威

## ■背景资料

胃肠道间质瘤(GISTs)是最常见的胃肠道间叶源性肿瘤, 遗传学上具有*c-kit*或PDGFRA基因激活突变, 通常CD117免疫表型阳性。近年来, 随着GISTs有效靶向治疗的新近发展, GISTs患者的预后已显著提高, 因此对于GISTs的准确诊断变得尤为重要, 但迄今为止, GISTs诊断除了结合肿瘤的解剖学位置、组织形态等特征外, 主要依赖于免疫组织化学CD117和CD34蛋白表达的证实, 但仍有5%的GISTs缺乏CD117表达。

隋杏玲, 郝旺, 孙秀威, 哈尔滨医科大学附属第三医院消化内科一病区 黑龙江省哈尔滨市 150040

隋杏玲, 硕士研究生, 主要从事消化系统肿瘤的基础及临床方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由孙秀威、隋杏玲及郝旺设计; 研究过程由隋杏玲、郝旺及孙秀威完成; 研究所用新试剂及分析工具由孙秀威提供; 数据分析由隋杏玲与郝旺完成; 本文写作由隋杏玲完成。

通讯作者: 孙秀威, 教授, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属第三医院消化内科一病区。

sun-xiuwei@163.com

电话: 0451-86298685

收稿日期: 2010-12-28 修回日期: 2011-02-09

接受日期: 2011-02-15 在线出版日期: 2011-03-28

## Expression of DOG1, CD117 and PDGFRA in gastrointestinal stromal tumors

Xing-Ling Sui, Wang Hao, Xiu-Wei Sun

Xing-Ling Sui, Wang Hao, Xiu-Wei Sun, Department of Gastroenterology (Division I), the Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Professor Xiu-Wei Sun, Department of Gastroenterology (Division I), the Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 150 Haping Road, Nangang District, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. sun-xiuwei@163.com

Received: 2010-12-28 Revised: 2011-02-09

Accepted: 2011-02-15 Published online: 2011-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the significance of expression of discovered on GIST-1 (DOG1), CD117 and platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) by analyzing their correlation with clinicopathologic features and risk degree of GISTs.

**METHODS:** The expression of DOG1, CD117 and PDGFRA was detected by immunohistochemistry in 63 cases of GISTs and 43 cases of non-GISTs. The correlation of expression of DOG1, CD117 and PDGFRA with clinicopathologic factors and risk degree of GISTs was then analyzed.

**RESULTS:** The positive expression rates of

DOG1, CD117 and PDGFRA in GISTs were 84.13% (53/63), 90.48% (57/63) and 3.17% (33/63), respectively. The positive expression rates of DOG1 and CD117 in GISTs were significantly higher than that of PDGFRA (both  $P < 0.01$ ). Of six CD117-negative cases, all were positive for DOG1 and five positive for PDGFRA. The positive expression rates of DOG1, CD117 and PDGFRA in patients with non-GISTs were 11.63%, 16.28% and 6.98%, respectively. The expression of DOG1 and PDGFRA had no significant association with gender, age, tumor location, tumor size, mitotic phase, histotype, or risk degree, while the expression of CD117 was related with tumor location and histotype ( $P = 0.008, 0.045$ ). Tumors derived from the mesentery, abdominal cavity and epiploon had higher positive rates of CD117 than those derived from the stomach, small intestine, colon and rectum (50.00% vs 94.74%,  $P = 0.008$ ). CD117 was highly expressed in spindle-cell and epithelial-cell types.

**CONCLUSION:** Both DOG1 and CD117 are highly expressed in GISTs and can serve as specific diagnostic markers for GISTs. DOG1 has a good sensitivity and specificity in the diagnosis of GISTs, especially KIT-negative GISTs. Detection of DOG1, CD117 and PDGFRA expression can not be used for assessing the risk degree of GISTs.

**Key Words:** Gastrointestinal stromal tumor; Discovered on GIST-1; Kit; Platelet-derived growth factor receptor alpha; Clinicopathologic features; Risk degree

Sui XL, Hao W, Sun XW. Expression of DOG1, CD117 and PDGFRA in gastrointestinal stromal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 912-918

## 摘要

**目的:** 探讨DOG1、CD117和血小板衍生生长因子受体 $\alpha$ (PDGFRA)在胃肠道间质瘤(GISTs)诊断中的意义, 并分析与其GISTs临床病理因素和危险度的关系。

## ■同行评议者

宋军, 副教授, 武汉协和医院消化科

**方法:**应用免疫组织化学Envision二步法检测63例GISTs及43例非GISTs间叶源性肿瘤患者中DOG1、CD117及PDGFRA的表达,并分析上述免疫组织化学指标与临床病理因素(性别、年龄、部位、肿瘤大小、核分裂象、组织学类型)和危险度的相关性。

**结果:**GISTs中DOG1、CD117和PDGFRA阳性表达率分别为84.13%(53/63)、90.48%(57/63)、52.38%(33/63),DOG1、CD117与PDGFRA相比,差异显著(均 $P < 0.01$ ),而其中CD117阴性的6例GISTs均表达DOG1阳性,5例表达PDGFRA阳性;非GISTs间叶源性肿瘤中DOG1、CD117及PDGFRA阳性表达率分别为11.63%、16.28%、6.98%。DOG1及PDGFRA的表达在不同性别、年龄、部位、肿瘤大小、核分裂象、组织学类型之间没有显著性差异,与危险度亦无相关性。但CD117的表达与部位及组织学类型有关( $P = 0.008, 0.045$ ),其他部位(肠系膜、腹腔、网膜)CD117表达率低于胃、小肠、结肠及直肠(50.00% vs 94.74%,  $P = 0.008$ )。且梭型及上皮型中CD117高表达。

**结论:**DOG1和CD117可以作为GISTs诊断的特异性标志物;对于KIT阴性的GISTs,DOG1检测的加入,将在病理学和临床上进一步完善诊断依据;DOG1、CD117和PDGFRA不能作为判断危险度的指标。

**关键词:**胃肠道间质瘤;DOG1;KIT蛋白;血小板衍生长因子受体 $\alpha$ ;临床病理因素;危险度

隋杏玲, 郝旺, 孙秀威. DOG1、CD117和PDGFRA在胃肠道间质瘤中的表达及相关性. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 912-918  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/912.asp>

## 0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)是一类特殊的起源于胃肠道间叶组织的肿瘤,占胃肠道间叶肿瘤的大部分,通常CD117免疫表型阳性,遗传学上频发*c-kit*或血小板衍生长因子受体 $\alpha$ (platelet-derived growth factor receptor alpha, PDGFRA)基因激活突变。近年来,随着GISTs有效的靶向治疗的新近发展,GISTs患者的预后已显著提高,因此对于GISTs的准确诊断变得尤为重要,尤其对于KIT表达缺失的GISTs。DOG1(discovered on GIST-1)是一种新近发现的GISTs的特异性标志物,与KIT的总体敏感性几乎相同<sup>[1]</sup>。本研究通过对63例GISTs及43

例非GISTs间叶源性肿瘤组织标本进行免疫组织化学检测,以进一步探讨GISTs免疫组织化学结果在诊断中的意义及其与临床病理相关因素和危险度分级的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集哈尔滨医科大学附属第三医院自2004-01/2008-12经手术切除的资料完整、诊断明确的GISTs患者组织标本63例,其均为原发性肿瘤。本组63例患者中,男31例,女32例,男女比例1:1;年龄24-83(中位年龄56)岁;肿瘤大小1.5-29(中位值9.0)cm;病灶位于胃34例(54%),小肠13例(21%),直肠7例(11%),结肠3例(5%),其他部位(肠系膜、腹腔、网膜)6例(10%);组织学类型中,梭型52例(83%),上皮型6例(10%),混合型5例(8%);根据美国国立卫生研究院(NIH)确定的GIST危险度分级(2008年)进行分级(表1)<sup>[2]</sup>,其中极低危险度4例(6%),低危险度13例(1%),中危险度19例(30%),高危险度27例(43%)。另收集非GISTs间叶源性肿瘤组织标本43例,均经复诊明确诊断,其中神经鞘瘤25例,平滑肌瘤12例,平滑肌肉瘤6例。DOG1、CD117、PDGFRA单克隆抗体及免疫组织化学试剂盒均购自北京中杉金桥有限公司,即用型。

**1.2 方法** 所有标本均经10%甲醛固定,常规石蜡包埋,3  $\mu\text{m}$ 切片,染色步骤和抗体稀释度均按产品说明书进行。PBS代替一抗做阴性对照,显微镜下观察结果。结果评定DOG1染色主要位于细胞质,少量位于细胞膜,CD117染色以细胞质为主,少量亦定位于细胞膜,PDGFRA主要为细胞质染色。根据显微镜下有无阳性细胞及其个数进行分类:阴性(-),阳性细胞数 $< 5\%$ ;弱阳性(+),棕色颗粒,阳性细胞数 $5\% - 25\%$ ;阳性(++),褐色颗粒,阳性细胞数 $25\% - 50\%$ ;强阳性(+++),深褐色颗粒,阳性细胞数 $> 50\%$ 。

**统计学处理** 采用SPSS13.0软件对数据进行统计学处理,计数资料组间比较采用 $\chi^2$ 检验,以 $P \leq 0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 GISTs患者中DOG1、CD117、PDGFRA的表达** DOG1染色主要位于细胞质,少量位于细胞膜,CD117染色以细胞质为主,少量亦定位于细胞膜,PDGFRA主要为细胞质染色,均呈弥漫性分布(图1)。DOG1阳性表达率为84.13%,其中弱阳性(+)18例(28.57%),阳性(++)12例(19.05%),强阳性(+++)23例(36.51%);CD117阳

■ **研发前沿**  
近年来,DOG1的研究已成为GISTs领域的一个热点。



### ■ 相关报道

Miettinen等的研究发现GISTs中DOG1和KIT的总体敏感性几乎相同: 94.4%和94.7%, 并且GISTs中的结果普遍一致; Kang等的研究显示DOG1、CD117的表达与组织类型有关, 梭型细胞中高表达, CD117高表达, 亦见于女性患者, 而PDGFRA表达与部位有关, 非小肠部位表达率明显增高; 张著学等发现PDGFRA及CD117的表达在组织学分型之间比较, 差异均有显著性。

表1 原发GISTs切除术后危险度分级

肿瘤原发部位	肿瘤大小 (cm)	核分裂数(每50个高倍视野)	危险度分级
任何部位	<2.0	≤5	极低度
任何部位	2.1-5.0	≤5	低度
胃	2.1-5.0	>5	中等度
任何部位	<5.0	6-10	中等度
胃	5.1-10.0	≤5	中等度
肿瘤破裂	任何大小	无论多少	高度
任何部位	>10	无论多少	高度
任何部位	任何大小	>10	高度
任何部位	>5.0	>5	高度
非胃来源	2.1-5.0	>5	高度
非胃来源	5.1-10.0	≤5	高度

表2 DOG1、CD117、PDGFRA在GISTs中的表达

类别	- (n)	+ (n)	阳性率 (%)	$\chi^2$ 值	P值
DOG1	10	53	84.13	1.145	0.285
CD117	6	57	90.48	22.400	0.000 <sup>b</sup>
PDGFRA	30	33	52.38	14.651	0.000 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs PDGFRA; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs DOG1.

性率为90.48%, 高于DOG1阳性表达; PDGFRA为52.38%。其中DOG1、CD117与PDGFRA相比, 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$ )。另外CD117阴性的6例病例中, 均表达DOG1阳性, 5例表达PDGFRA阳性(表2)。

2.2 非GISTs患者中DOG1、CD117、PDGFRA的表达 DOG1的表达率低于CD117, 分别为11.63%和16.28%, 其中神经鞘瘤3例, 平滑肌瘤1例, 平滑肌肉瘤1例表达DOG1阳性; PDGFRA为6.98%(表3)。

2.3 DOG1、CD117及PDGFRA与GISTs患者临床病理因素及危险度分级的相关性 DOG1、PDGFRA与患者性别、年龄、部位、肿瘤大小、核分裂象及组织学类型无统计学差异, 与危险度亦无相关性, 而CD117的表达却与部位及组织学类型有关, 其他部位(肠系膜、腹腔、网膜)CD117表达率低于胃、小肠及结直肠, 且CD117高表达于梭型及上皮型中, 具有统计学意义(表4)。

### 3 讨论

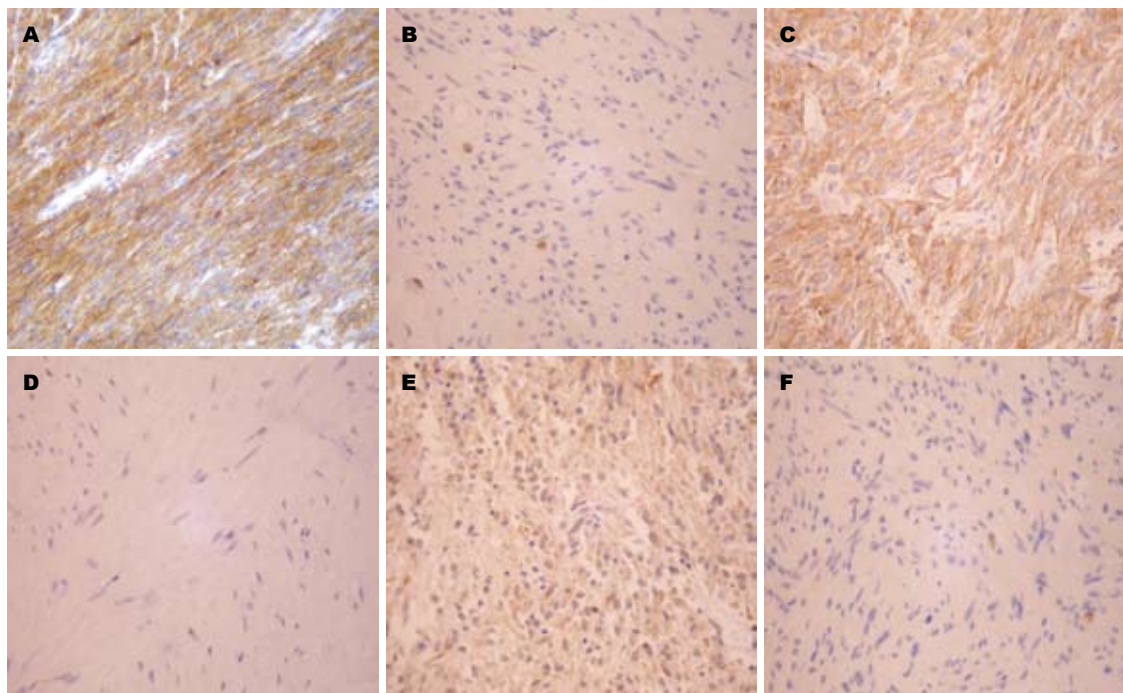
GISTs是一类特殊的起源于胃肠道间叶组织的肿瘤, 占胃肠道间叶肿瘤的大部分, 组织学上由梭形、上皮样、偶或多形性细胞排列成束状或

弥漫状图像, 免疫表型上表达*c-kit*基因蛋白产物KIT(CD117), 由突变的*c-kit*或PDGFRA基因驱动的特殊肿瘤<sup>[3]</sup>。国外研究报道, GISTs发病率约为1-2/10万<sup>[4]</sup>, 仅占全部胃肠道肿瘤的3%以下, 但却是最常见的胃肠道间叶源性肿瘤, 发生于消化系的任何部位, 最常发生于胃(60%-70%), 其次是小肠(20%-30%), 结肠、直肠(5%), 发生于食管<5%, 偶见在网膜和肠系膜<sup>[5-8]</sup>, 发病高峰位于55-65岁, 男稍多于女, 或男女相等, 无明显差异<sup>[9-12]</sup>。我们的资料显示, 病灶亦主要位于胃, 占54%(34例), 小肠21%(13例), 直肠11%(7例), 结肠5%(3例), 其他部位肠系膜、腹腔、网膜10%(6例); 男31例, 女32例, 男女比例1:1; 年龄24-83(中位年龄56)岁, 与文献报道相似。

CD117作为GISTs相对特异的标志物, 具有良好的敏感性, 在绝大多数GISTs中弥漫强表达, 阳性率85%-94%, 也就是说几乎所有的GISTs均有c-Kit表达, 因此CD117已成为GISTs特征性标志<sup>[13]</sup>。我们的研究中CD117阳性率为90.48%, 与文献报道相一致。CD117亦可作为治疗的靶点, 其通过TKIs抑制KIT和PDGFRA激酶已经使GISTs的治疗发生了革命性的变化, 因此特异性诊断对合适的患者提供了潜在拯救生命的治疗。但是CD117并不是GISTs绝对特异、敏感的指标, 仍有5%的GISTs缺少CD117的表达, 另外有文献报道, 精原细胞瘤、肥大细胞瘤、恶性黑色素瘤均表达CD117<sup>[14]</sup>, 这增加了GISTs诊断的难度。

2003年Heinrich等<sup>[15]</sup>报道了GISTs中存在PDGFRA基因激活突变, 并进一步通过Western blot证实了PDGFRA蛋白的表达, 使得PDGFRA成为一种诊断GISTs的新的标志物。我们的结果显示PDGFRA为52.38%, 敏感性较低, 且与CD117相比, 有统计学差异( $P < 0.01$ ), 但CD117阴性的6例病例中, 5例表达阳性, 显示PDGFRA在CD117阴性GISTs中高表达, 与文献<sup>[16,17]</sup>报道一致, 提示与CD117联合应用有诊断意义。但PDGFRA并不是GISTs的特异性标志物, 由于石蜡包埋的组织中PDGFRA缺乏可靠的抗体, 其免疫组织化学染色情况国内外文献报道仍较少, 且结果也不一致<sup>[16-21]</sup>, 加上许多易与GISTs混淆的肉瘤(如平滑肌肉瘤、滑膜肉瘤等)也可检测出PDGFRA抗体表达, 潜在否定了其应用及诊断价值, 临床上应用较少。

由于第一代和第二代酪氨酸激酶抑制剂药物的有效性, GISTs的精确诊断已变得极为重要, 但迄今为止, GISTs诊断除了结合肿瘤的解剖学



**■创新盘点**  
 本研究发现 DOG1及PDGFRA 的表达在不同性别、年龄、部位、肿瘤大小、核分裂象、组织学类型之间没有显著性差异,与危险度亦无相关性,但CD117的表达与部位及组织学类型有关,其他部位(肠系膜、腹腔、网膜)CD117表达率低于胃、小肠、结肠及直肠,且梭型及上皮型中CD117高表达。

图 1 GISTs DOG1、CD117和PDGFRA的表达(Envision二步法 × 400)。A: DOG1阳性; B: DOG1阴性; C:CD117阳性; D: CD117阴性; E: PDGFRA阳性; F: PDGFRA阴性。

表 3 DOG1、CD117、PDGFRA在非GISTs中的表达 n(%)

类别	n	DOG1		CD117		PDGFRA	
		-	+	-	+	-	+
神经鞘瘤	25	22(88.00)	3(12.00)	21(84.00)	4(16.00)	23(92.00)	2(8.00)
平滑肌瘤	12	11(91.67)	1(8.33)	10(83.33)	2(16.67)	11(91.67)	1(8.33)
平滑肌肉瘤	6	5(83.33)	1(16.67)	5(83.33)	1(16.67)	6(100.00)	0(0.00)
合计	43	8(88.37)	5(11.63)	36(83.71)	7(16.28)	40(93.02)	3(6.98)

位置、组织形态等特征外,主要依赖于免疫组织化学CD117和/或CD34蛋白表达的证实. 对于大约5%组织形态学可疑的GISTs,由于其免疫组织化学染色CD117呈阴性,使其精确性诊断变得复杂化,虽然KIT和PDGFRA突变筛选在这种情况下是有益的,但是其增加了诊断的时间和成本,况且目前国内大多数单位尚不具备检测c-Kit突变的条件,这就促使很多病理学者试图寻找其他对GISTs诊断和预后有用的新的标志物。

DOG1是新近发现的GISTs的一种特异性标志物,由West等<sup>[22]</sup>利用基因表达分析筛选出的选择性高表达于GISTs的基因,定位于人类染色体11q13,含有26个外显子,编码960个氨基酸组成的分子量为114 000 Da的蛋白<sup>[23,24]</sup>. 此蛋白有8个穿膜的功能区,被认为是一种钙调控的氯离子通道蛋白<sup>[25]</sup>. 目前对DOG1基因进行检测分析,发现并未存在突变型DOG1基因<sup>[26]</sup>. 但遗憾的是,

对其功能尚不明确。

近年来,DOG1的研究已成为GISTs领域的一个热点. 国外大多数研究报道<sup>[27,28]</sup>,GISTs中DOG1和KIT的总体敏感性几乎相同,均达95%以上,并且GISTs中的结果普遍一致,而与CD117联合用于GISTs的诊断具有较好的互补性. 目前国内亦有此方面研究<sup>[29-32]</sup>,DOG1阳性表达率96.1%以上,与国外文献报道一致,但也存在一定的分歧. 我们的研究发现,DOG1在GISTs的总阳性率为84%,这与Espinosa等<sup>[33]</sup>及尹慕军等<sup>[30]</sup>的结果一致,虽阳性表达率低于CD117(91%),但对于CD117阴性的6例标本,DOG1几乎均为阳性,这一点证实了DOG1至少可以作为GISTs明确诊断的必要补充,对于易漏诊的部分病例提供了潜在的诊断依据. DOG1染色强度中,强阳性敏感性较高,显著高于弱阳性和阳性(36.5% vs 28.6%, 19.0%). 在GISTs中,DOG1与PDG-

## ■应用要点

DOG1是一种新型的更加敏感而特异的标志物,选择性高表达于GISTs,且其表达并不依赖于*c-kit*或PDGFRA基因突变状态,而与CD117的总体敏感性几乎相同,其与CD117、PDGFRA的联合使用将在病理学和临床上进一步完善诊断依据,在GISTs的辅助诊断中意义重大。

表4 GISTs中DOG1、CD117及PDGFRA表达与临床病理因素及危险度的相关性

临床病理特征	n	DOG1			CD117			PDGFRA		
		n(%)	$\chi^2$ 值	P值	n(%)	$\chi^2$ 值	P值	n(%)	$\chi^2$ 值	P值
性别										
男	31	26(83.87)	0.003	0.956	28(90.32)	0.002	0.967	16(51.61)	0.104	0.904
女	32	27(84.38)			29(90.63)			17(53.13)		
年龄(岁)										
≤50	20	16(80.00)	0.374	0.541	19(95.00)	0.696	0.404	12(60.00)	0.682	0.409
>50	43	37(86.05)			38(88.37)			21(48.84)		
部位										
胃	34	27(79.41)	4.433	0.351	32(94.12)	13.800	0.008	19(55.88)	0.883	0.927
小肠	13	13(100)			13(100.00)			6(46.15)		
直肠	7	5(71.43)			6(85.71)			3(42.86)		
结肠	3	3(100.00)			3(100.00)			2(66.67)		
其他	6	5(83.33)			3(50.00)			3(50.00)		
肿瘤大小(cm)										
≤2	4	4(100.00)	6.182	0.103	3(75.00)	3.382	0.336	3(75.00)	1.837	0.607
2.1-5	18	12(66.67)			18(100.00)			10(55.56)		
5.1-10	26	23(88.46)			23(88.46)			14(53.85)		
>10	15	14(93.33)			13(86.67)			6(40.00)		
核分裂象(个/50HPF)										
≤5	43	35(81.40)	1.021	0.600	40(93.02)	2.397	0.302	24(55.81)	1.304	0.521
6-10	17	15(88.24)			15(88.24)			7(41.18)		
>10	3	3(100.00)			2(85.00)			2(45.00)		
组织学类型										
梭型	52	43(82.69)	1.026	0.599	48(92.31)	6.223	0.045	25(48.08)	2.406	0.300
上皮型	6	5(83.33)			6(100.00)			4(66.67)		
混合型	5	5(100.00)			3(60.00)			4(80.00)		
危险度										
极低度	4	4(100.00)	7.764	0.051	3(75.00)	3.758	0.289	3(75.00)	1.151	0.765
低度	13	10(76.92)			13(100.00)			7(53.85)		
中度	19	13(68.42)			18(94.74)			9(47.37)		
高度	27	26(96.30)			23(85.19)			13(48.15)		

FRA表达率相比,有统计学意义,其敏感性高于PDGFRA. DOG1在非GISTs中的阳性率普遍偏低(神经鞘瘤12%,平滑肌瘤8%,平滑肌肉瘤17%),对于GISTs的鉴别诊断提供了良好的特异性标志物。

对于DOG1、CD117及PDGFRA与临床病理因素及危险度的相关性,文献报道较少,且结果存在较大的差异. 张著学等<sup>[34]</sup>发现PDGFRA及CD117的表达在组织学分型之间比较差异均有显著性,PDGFRA在混合细胞型表达率高(81%),而CD117在梭形细胞型表达率高(98%); Kang等<sup>[35]</sup>的研究显示,DOG1、CD117的表达与组织类型有关,梭型细胞中高表达,CD117高表达亦见于女性患者,而PDGFRA表达与部位有关,非小肠部位表达率明显增高;甄丽影等<sup>[29]</sup>、Espinosa等<sup>[33]</sup>分析发现DOG1表达与基因突变类型、突变位

置、肿瘤大小、肿瘤级别和患者年龄均没有相关性;但尹慕军等<sup>[30]</sup>发现,DOG1蛋白表达情况与肿瘤发生部位、细胞丰富程度、细胞核异形性及Fletcher危险程度分级有关. 我们的研究发现,DOG1的表达与在不同性别、年龄、部位、肿瘤大小、核分裂象、组织学类型间无显著性差异,与甄丽影等<sup>[29]</sup>、Espinosa等<sup>[33]</sup>的结果一致,与危险度亦无相关性,但 $P = 0.051$ ,值得我们大样本试验进一步证实;CD117的表达在部位及组织学类型之间比较有显著性差异,其他部位(肠系膜、腹腔、网膜)CD117表达率低于胃、小肠及结直肠,且梭型及上皮型中CD117高表达,而PDGFRA的表达与临床病理因素及危险度分级无相关性,我们的结果与以上各研究小组间有一定的差异,这仍需要更进一步深入的研究。

目前GISTs的临床病理和治疗研究已取得

巨大进展, 但还有许多问题有待回答, 尤其在肿瘤发生机制、生物学行为预测和更有效治疗等方面. CD117及PDGFRA在GISTs中的研究已经相当成熟, 但与临床病理因素及危险度的关系仍不甚清楚, 矛盾较大, DOG1具体生物学功能及在GISTs中高表达的机制尚不清楚, 需要更进一步深入的研究. 但毋庸置疑是, DOG1可以作为GISTs患者明确诊断的一种特异性标志物, 尤其对于CD117阴性的患者, DOG1的检测具有诊断价值. 相信随着对GISTs研究的不断深入, DOG1、CD117及PDGFRA在GISTs的发生机制、诊断、治疗及预后中的作用将会逐渐表现出来. 对于明确诊断GISTs患者, 研究更好的靶向治疗药物, 延长患者生存期及改善患者预后意义重大.

#### 4 参考文献

- Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 1401-1408
- Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol* 2008; 39: 1411-1419
- 中国胃肠道间质瘤病理专家组. 中国胃肠道间质瘤病理共识意见. *中华病理学杂志* 2007; 36: 704-707
- Rossi CR, Mocellin S, Mencarelli R, Foletto M, Pilati P, Nitti D, Lise M. Gastrointestinal stromal tumors: from a surgical to a molecular approach. *Int J Cancer* 2003; 107: 171-176
- Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 52-68
- Dow N, Giblen G, Sobin LH, Miettinen M. Gastrointestinal stromal tumors: differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 111-119
- Stamatakis M, Douzinas E, Stefanaki C, Safioleas P, Polyzou E, Levidou G, Safioleas M. Gastrointestinal stromal tumor. *World J Surg Oncol* 2009; 7: 61
- 陈金培, 刘国荣, 杨耀湘. CD117、CD34、Ki-67在胃肠道间质瘤中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3043-3047
- Bórquez Ma P, Neveu C R. [Gastrointestinal stromal tumors. An update]. *Rev Med Chil* 2008; 136: 921-929
- 朱玉春, 王建良, 周伟, 吴志娟, 沈纪芳. 胃肠道间质瘤的螺旋CT征象与其良恶性的相关性分析. *实用临床医药杂志* 2010; 14: 127-129
- Corless CL, Heinrich MC. Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 557-586
- 吴志娟, 黄建康, 朱玉春, 龚惠明. 螺旋CT增强扫描对胃肠道间质瘤的诊断价值. *实用临床医药杂志* 2009; 13: 82-83
- 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
- Hornick JL, Fletcher CD. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 188-193
- Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710
- Peterson MR, Piao Z, Weidner N, Yi ES. Strong PDGFRA positivity is seen in GISTs but not in other intra-abdominal mesenchymal tumors: Immunohistochemical and mutational analyses. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14: 390-396
- 郑松, 陈丽荣, 王海军, 罗月球, 朱永良, 程水珍, 周燕. PDGFR- $\alpha$ 在胃肠道间质瘤中的表及其临床意义. *浙江大学学报(医学版)* 2007; 36: 280-284
- Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1466-1478
- Medeiros F, Corless CL, Duensing A, Hornick JL, Oliveira AM, Heinrich MC, Fletcher JA, Fletcher CD. KIT-negative gastrointestinal stromal tumors: proof of concept and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 889-894
- Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Thal D, Büttner R, Wardelmann E. PDGFR $\alpha$ - and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology* 2005; 46: 166-175
- Rossi G, Valli R, Bertolini F, Marchioni A, Cavazza A, Mucciarini C, Migaldi M, Federico M, Trentini GP, Sgambato A. PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue tumours of the gastrointestinal tract. *Histopathology* 2005; 46: 522-531
- West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, van de Rijn M. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* 2004; 165: 107-113
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeiffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008; 322: 590-594
- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 2008; 455: 1210-1215
- Carles A, Millon R, Cromer A, Ganguli G, Lemaire F, Young J, Wasylyk C, Muller D, Schultz I, Rabouel Y, Dembélé D, Zhao C, Marchal P, Ducray C, Bracco L, Abecassis J, Poch O, Wasylyk B. Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display. *Oncogene* 2006; 25: 1821-1831
- Miwa S, Nakajima T, Murai Y, Takano Y, Sugiyama T. Mutation assay of the novel gene DOG1 in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *J Gastroenterol* 2008; 43: 531-537
- Novelli M, Rossi S, Rodriguez-Justo M, Taniere P, Seddon B, Toffolatti L, Sartor C, Hogendoorn PC, Sciot R, Van Glabbeke M, Verweij J, Blay JY, Ho-

**同行评价**  
本文设计合理, 分析深入, 对胃肠道间质瘤的诊断意义的研究具有一定先进性和临床意义.

- henberger P, Flanagan A, Dei Tos AP. DOG1 and CD117 are the antibodies of choice in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2010; 57: 259-270
- 28 Lopes LF, West RB, Bacchi LM, van de Rijn M, Bacchi CE. DOG1 for the diagnosis of gastrointestinal stromal tumor (GIST): Comparison between 2 different antibodies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18: 333-337
- 29 甄丽影, 李岩, 徐灿. DOG1蛋白在胃肠道间质瘤中的表达及相关性分析. *中华消化杂志* 2010; 30: 585-587
- 30 尹慕军, 王杉, 李士杰, 姜可伟, 叶颖江. DOG1蛋白在胃肠道间质瘤中的表达及其意义. *中华普通外科杂志* 2010; 25: 44-47
- 31 赵晶洁, 张学东, 李建华, 武海生. 新型胃肠道间质瘤标志物DOG1的应用与探讨. *广东医学* 2010; 31: 896-898
- 32 方金满, 张海涛, 李德春. 胃肠道间质瘤新标志物DOG1应用的初步探讨(附37例报告). *中国血液流变学杂志* 2010; 20: 122-123
- 33 Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, Varma S, Corless CL, Heinrich MC, Smith KS, Wang Z, Rubin B, Nielsen TO, Seitz RS, Ross DT, West RB, Cleary ML, van de Rijn M. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 210-218
- 34 张著学, 成元华, 张微珊. PDGFRA在胃肠道间质瘤中的表达及意义. *贵州医药* 2007; 31: 963-966
- 35 Kang YN, Jung HR, Hwang I. Clinicopathological and immunohistochemical features of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res Treat* 2010; 42: 135-143

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

# 晚期胃癌分子靶向治疗的现状及其发展趋势

曲晶磊, 刘云鹏

曲晶磊, 刘云鹏, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科 辽宁省沈阳市 110001  
国家自然科学基金资助项目, No. 30770993  
作者贡献分布: 本文由曲晶磊综述; 刘云鹏审校。  
通讯作者: 刘云鹏, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科, cmuliuyunpeng@yahoo.cn  
电话: 024-83282312  
收稿日期: 2011-01-10 修回日期: 2011-03-07  
接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-03-28

## Molecularly targeted therapy for gastric cancer: current status and future prospects

Jing-Lei Qu, Yun-Peng Liu

Jing-Lei Qu, Yun-Peng Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770993  
Correspondence to: Professor Yun-Peng Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cmuliuyunpeng@yahoo.cn  
Received: 2011-01-10 Revised: 2011-03-07  
Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-03-28

### Abstract

Gastric cancer remains the second leading cause of cancer death worldwide. Currently, chemotherapy is the mainstay of treatment for patients with metastatic gastric cancer. Although new chemotherapeutic regimens improved the survival of patients with advanced gastric cancer, the median survival in all randomized trials remains unsatisfactory. Novel treatment options are urgently needed to improve the outcome of patients with advanced gastric cancer. Understanding the molecular pathways that characterize cell growth, apoptosis, angiogenesis and invasion has enabled us to use new approaches to treat this disease in clinical situations. The aim of this review is to summarize the most recent publications on targeted therapies for advanced gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Molecularly targeted therapy; Epidermal growth factor receptor; Vascular endothelial growth factor; Multityrosine kinase inhibitors

Qu JL, Liu YP. Molecularly targeted therapy for advanced gastric cancer: current status and future prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 919-924

### 摘要

胃癌死亡率占全球第2位。目前, 化疗仍是晚期胃癌的主要治疗手段。尽管新药联合化疗在一定水平改善了患者的生存, 但晚期胃癌中位生存仍不尽人意。迫切需要新的治疗手段改善患者的生存。随着胃癌分子生物学研究的不断深入, 针对肿瘤细胞生长、凋亡、侵袭浸润以及血管生成等分子靶点提出的分子靶向治疗成为胃癌综合治疗的热点。本文将对近几年报道的晚期胃癌的分子靶向治疗结果进行简要综述。

关键词: 胃癌; 分子靶向治疗; 表皮生长因子受体; 血管内皮生长因子; 多酪氨酸激酶抑制剂

曲晶磊, 刘云鹏. 晚期胃癌分子靶向治疗的现状及其发展趋势. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 919-924  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/919.asp>

### 0 引言

我国是世界上胃癌发病最高的国家之一, 每年新发病例近40万, 约占全世界的42%, 并且多数患者在诊断时已属晚期<sup>[1,2]</sup>。尽管近年来III期临床试验结果表明, 奥沙利铂、多西紫杉醇、卡培他滨和伊立替康治疗胃癌显示出较好的疗效, 但5年生存率仍<15%<sup>[3]</sup>。因此, 迫切需要新的治疗手段改善患者的生存。抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和抗血管生成等靶向治疗药物成为近年来胃癌研究的热点, 但目前有初步结果的研究多为I期和II期, 仅有两项III期临床试验-ToGA和AVAGAST研究得出了初步结论。本文将对近几年报道的晚期胃癌的分子靶向治疗结果进行简要介绍和讨论。

### 1 EGFR靶向治疗

EGFR家族成员包括EGFR1、HER-2、HER-3和HER-4。最近研究结果显示, 86%的胃癌和胃食

### ■背景资料

胃癌死亡率占全球第2位。目前, 尽管新药联合化疗在一定水平改善了患者的生存, 但晚期胃癌中位生存仍不尽人意。

### ■同行评议者

傅春彬, 主任医师, 吉化集团公司总医院一院消化内科

## ■ 研发前沿

表皮生长因子受体和抗血管生成等靶向治疗药物成为近年来胃癌研究的热点。

管结合部(gastro-esophageal junction, GEJ)肿瘤组织表达EGFR<sup>[4]</sup>, 22.1%表达HER-2<sup>[5]</sup>. EGFR与特异性配体结合后, 通过相应的酪氨酸激酶的自身磷酸化作用激活受体, 从而激发细胞内多条信号转导通路而促进肿瘤细胞分裂、迁移、血管生成以及抑制肿瘤细胞凋亡. 已有研究证实EGFR与肿瘤早期复发有关, 是预后不良因素之一. 目前针对EGFR1和HER-2靶点的药物正在进行胃癌方面的临床试验.

1.1 抗EGFR单抗 2007年Pinto等<sup>[6]</sup>报道了西妥昔单抗联合FOLFIRI方案治疗进展期胃癌或GEJ腺癌疗效和毒性的II期临床研究结果. 该研究是首次报道的西妥昔单抗联合化疗一线治疗进展期胃癌的临床试验. 该试验入组38例患者(中位年龄63.5岁; 胃癌占89.5%, GEJ腺癌占10.5%; 局部晚期占13.2%, 远处转移占86.8%), 总反应率(overall response rates, ORR)达44.1%, 中位疾病进展时间(time to progression, TTP)8 mo, 中位随访11 mo, 55.3%的患者仍然存活. 研究表明西妥昔单抗联合FOLFIRI方案一线治疗进展期胃癌有效, 且无严重不良反应.

继Pinto等报道之后, 近几年许多学者报道了西妥昔单抗联合不同化疗方案治疗胃癌的II期临床研究, 涉及新辅助治疗、一线治疗<sup>[7-9]</sup>和二线治疗<sup>[10]</sup>, 研究初步显示了良好的前景. 2010年ASCO年会上, Enzinger等<sup>[11]</sup>报道了以西妥昔单抗为基础, 尝试与ECF(表柔比星+顺铂+氟尿嘧啶)、IC(伊立替康+顺铂)、FOLFOX不同方案组合一线治疗转移性食管或GEJ腺癌的临床研究(CALGB 80403/ECOG 1206)结果, 以求探索最佳的化疗配伍方案. 从2006-09/2009-05共入组了245例患者, 3组中位无进展生存时间(progression-free survival, PFS)分别是5.6、5.0和5.7 mo; 中位总生存时间(overall survival, OS)分别是10、8.6和10 mo. 尽管ECF联合西妥昔单抗组有效率最高(58%), 但治疗相关的死亡率也最高, 较多患者需要调整剂量; IC联合西妥昔单抗有效率和生存期最差, 同时不良事件也多; 而FOLFOX联合西妥昔单抗组疗效(有效率为51%)和安全性都较为满意. 不足之处是研究并未设立单纯化疗的对照组, 无法科学地判断西妥昔单抗在胃癌中的疗效, 更直接的证据应该期待III期临床试验的结果. 另外值得注意的是, 该研究入组的患者为食管或GEJ腺癌, 而我国患者胃癌好发于胃窦部, 所以对于我国胃癌患者, 西妥昔单抗与化疗的最佳配伍方案仍有待进一步

研究.

目前正在进行的一项多中心III期临床试验, (EXPAND)比较西妥昔单抗联合卡培他滨+顺铂一线治疗进展期胃癌和GEJ腺癌的疗效. 该研究计划入组800例患者, 研究的首要终点是PFS. 该试验的结果将进一步阐明西妥昔单抗在胃癌靶向治疗中的意义.

1.2 抗HER-2单抗 曲妥珠单抗是以HER-2为靶点的人源化单克隆抗体. HER-2的过度表达常见于乳腺癌、卵巢癌及胃癌等, 与肿瘤的侵袭、转移、化疗耐药及预后不良有明显的相关性<sup>[12-14]</sup>. 研究显示<sup>[5]</sup>, 肠型胃癌HER-2的表达率高于弥漫型胃癌(34% vs 6%), GEJ腺癌HER-2的表达率高于胃癌(32% vs 18%).

2009年ASCO年会上Van Cutsem等报道了曲妥珠单抗联合5-FU/卡培他滨+顺铂(H+CT)对比单独化疗(CT)治疗HER-2阳性进展期胃癌的随机多中心III期临床研究结果(ToGA研究)<sup>[5]</sup>. 来自欧洲、拉丁美洲和亚洲的594例患者按1:1的比例随机分成H+CT组或单纯CT组, 化疗每3 wk为1个周期, 共6个周期, 曲妥珠单抗持续用药至疾病进展. H+CT组和单纯CT组中亚洲人群分别占53%和56%, 肠型胃癌分别占76.8%和74.2%, 中位OS分别是13.8、11.1 mo( $P = 0.0048$ ; HR = 0.74; 95%CI: 0.60-0.91). 亚组分析显示, HER-2表达IHC++/FISH+或IHC+++患者中位OS分别为16.0、11.8 mo(HR = 0.65); 肠型胃癌是预后良好因素, 而弥漫性胃癌是预后不良因素. H+CT组和单纯CT组的ORR分别是47.3%、34.5%( $P = 0.0017$ ). 两组不良事件无统计学差异, 尽管左心室射血分数下降H+CT组高于单纯CT组(5.9% vs 1.1%). 这一结果将为HER-2高表达的晚期胃癌患者提供了新的治疗选择, 也大大拓展了胃癌靶向治疗的前进道路.

尽管如此, ToGA研究亦引发诸多问题有待解决. 首先, 胃癌HER-2检测流程与诊断的标准化. 与乳腺癌不同, 胃癌异质性明显, HER-2分布不均匀; 胃癌可见腺上皮的极性分布, 形成U型(基底和侧面)不完整膜染色, 此型表达是否相当于乳腺癌的完整膜阳性? 另外, 免疫组织化学判断结果受人为因素影响较大. 其次, 耐药机制及疗效预测标志物. HER-2阳性患者中近半数对曲妥珠单抗治疗无效, 其耐药机制如何? 是否存在更为敏感的疗效预测指标? 再次, 如何选择最佳配伍化疗方案. 与欧洲常用的ECF不同, ToGA研究采用了氟尿嘧啶类药物联合顺铂的二联化疗

方案, 其中位OS达到了13.8 mo. 其中可能的原因: 一是HER-2阳性者多为肠型胃癌, 预后较好; 二是配伍的化疗方案强弱适当, 使得靶向治疗药物能最大限度地发挥作用. 上述问题的解决仍有待更多III期临床研究的深入开展.

## 2 血管生成抑制剂

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前所知作用最强的促血管内皮生成的细胞因子. 多项研究表明VEGF在进展期胃癌组织中的表达明显增高, 与肿瘤的浸润转移及预后密切相关<sup>[15,16]</sup>. 贝伐单抗是重组人源化抗VEGF单克隆抗体, 其与伊立替康、奥沙利铂、氟尿嘧啶组成的化疗方案已用于晚期大肠癌的治疗, 其在胃癌方面的研究目前尚处于临床试验阶段.

基于贝伐单抗联合化疗在II期临床试验中显示出良好的疗效和安全性<sup>[17,18]</sup>, AVAGAST随机双盲对照III期临床试验在全球开展, 并在2010年ASCO年会上公布了研究结果<sup>[19]</sup>. 该研究纳入初治的局部晚期或转移性胃癌或GEJ腺癌患者774例, 给予卡培他滨+顺铂(XP)联合贝伐单抗或安慰剂治疗, 研究主要终点是OS, 次要终点包括PFS和ORR. 结果显示化疗加安慰剂组的OS为10.1 mo, 而化疗加贝伐单抗组为12.1 mo(HR = 0.87;  $P = 0.1002$ ), 并未达到预期的研究终点. 但是PFS延长了1.4 mo(5.3 mo vs 6.7 mo,  $P = 0.0037$ ), ORR增加了9%(37% vs 46%,  $P = 0.0315$ ), 均达到了统计学差异. 从亚组分析上看, 美国入组患者从贝伐单抗获得的生存益处最大(6.8 mo vs 11.5 mo, HR = 0.63), 其次为欧洲入组患者(8.6 mo vs 11.1 mo, HR = 0.85), 在亚洲入组患者中几乎未观察到生存获益(12.1 mo vs 13.9 mo, HR = 0.97), 其可能的原因是试验中不同地区的患者在疾病进展后接受二线治疗的比例明显不同(亚洲、欧洲、美洲分别为61%、31%和21%), 可能影响了OS. 试验显示贝伐单抗安全性良好, 主要的不良反应为高血压和出血. 目前多数学者认为基于AVAGAST的研究结果, 并不能支持在晚期胃癌患者常规使用贝伐单抗, 鉴于试验显示出来的PFS优势, 主张进一步开展临床研究.

## 3 信号转导抑制剂

EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)代表药物有吉非替尼、埃罗替尼等. 吉非替尼是第一个被FDA批准的EGFR-TKI, 主要用于治疗化疗耐药的晚期非小细胞肺癌患者. Doi等<sup>[20]</sup>报道采

用吉非替尼每天250 mg或500 mg口服治疗75例化疗失败的进展期胃癌患者, 疾病控制率为18.3%、TTP为1.2 mo、中位OS为3.5 mo. Dragovich等<sup>[4]</sup>则采用埃罗替尼每天150 mg/d口服一线治疗局部晚期或转移性胃食管腺癌, 并根据肿瘤部位(GEJ/贲门和远端胃)进行分层. 在68例(GEJ组43例, 胃癌组25例)可评价的病例中, 1例患者达CR, 3例患者PR, 均为GEJ组患者. 中位OS在GEJ组为6.7 mo, 胃癌组为3.5 mo. 研究显示吉非替尼和埃罗替尼治疗胃癌疗效欠佳. 因此有学者认为, 多靶点药物可能是治疗进展期胃癌的新选择, 临床试验也相继开展.

拉帕替尼是一种作用于EGFR1和HER-2双靶点的酪氨酸激酶抑制剂. 比曲妥珠单抗更优越的是其分子量小, 能够透过血脑屏障<sup>[21]</sup>. 拉帕替尼已被美国FDA批准用于晚期乳腺癌的二线治疗. 基础研究显示拉帕替尼联合化疗或曲妥珠单抗能产生协同效应诱导胃癌细胞凋亡<sup>[22,23]</sup>. Iqbal等<sup>[24]</sup>报道了拉帕替尼一线治疗进展期或转移性胃癌的SWOG II期临床试验. 结果显示拉帕替尼耐受性良好, 单药对进展期/转移性胃癌具有一定的疗效, 值得进一步研究拉帕替尼与化疗的联合作用. 2010年ASCO年会上报道了拉帕替尼联合紫杉醇二线治疗亚洲HER-2+晚期胃癌患者的III期临床研究(TYTAN研究)的中期结果<sup>[25]</sup>. 截至数据关闭, 107例患者进行了安全性分析, 主要的不良反应为皮疹、中性粒细胞减少和腹泻. 目前试验正在顺利进行中. 另外, 拉帕替尼联合CapeOX方案(卡培他滨+奥沙利铂)一线治疗晚期胃癌的III期临床研究(LOGIC)也在进行之中.

索拉非尼是Raf酪氨酸激酶和多种受体酪氨酸激酶(VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- $\beta$ 、KIT)抑制剂, 具有双重抗肿瘤作用, 既可通过阻断由Raf/MEK/ERK介导的细胞信号传导通路而直接抑制肿瘤细胞的增殖, 还可以通过作用于VEGFR和PDCFR, 抑制新生血管的形成和切断肿瘤细胞的营养供应而达到间接抑制肿瘤生长转移的目的<sup>[26,27]</sup>. Sun等<sup>[28]</sup>的一项II期临床试验中, 采用索拉非尼联合多西他赛+顺铂治疗转移性(80%)或局部晚期无法手术切除(20%)的胃癌或GEJ腺癌. 试验共纳入44例患者, 接受索拉非尼400 mg/d 2次口服联合多西他赛75 mg/m<sup>2</sup> d1+顺铂75 mg/m<sup>2</sup> d1化疗, 21 d为1个周期. ORR为41%, 中位PFS为5.8 mo, 中位OS为13.6 mo. 研究者认为索拉非尼联合多西他赛+顺铂治疗晚期胃

## ■ 相关报道

Sun等的一项II期临床试验中, 采用索拉非尼联合多西他赛+顺铂治疗转移性(80%)或局部晚期无法手术切除(20%)的胃癌或GEJ腺癌.



### ■同行评价

本文内容详实,对晚期胃癌的靶向治疗和化疗具有临床指导意义。

癌或GEI腺癌安全有效,建议开展III期临床研究。

舒尼替尼是一种可以抑制多种参与肿瘤生长、血管增生以及肿瘤转移的受体酪氨酸激酶的小分子。舒尼替尼对血小板源性生长因子受体(PDGFR $\alpha$ 和PDGFR $\beta$ )、血管内皮细胞生长因子(VEGFR1, VEGFR2及VlGF)和干细胞因子受体(KIT)等活性均具有抑制作用<sup>[29]</sup>。目前舒尼替尼已被批准用于治疗肾细胞癌和胃肠道间质肿瘤<sup>[30,31]</sup>。Moehler等<sup>[32]</sup>报道了一项关于舒尼替尼单药治疗经多次化疗失败的无法手术切除的转移性胃癌的开放标签、多中心的II期临床研究。试验共纳入52例高加索患者,接受舒尼替尼50 mg/d一次口服,连服4 wk,停药2 wk,治疗直至疾病进展。初步分析结果显示舒尼替尼耐受性良好,38例可评价的患者中,2例部分缓解,10例疾病稳定;中位PFS为42 d,中位OS为177 d,预计1年生存率为23.7%。未来应开展舒尼替尼和其他药物的联合治疗。

#### 4 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂

依维莫司是口服的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂,是PI3K/Akt信号转导通路的下游分子,在蛋白合成、细胞生长代谢、增殖和血管生成等方面起着重要作用<sup>[33]</sup>。日本学者<sup>[34]</sup>对54例既往经过1-2个化疗方案治疗失败的转移性胃癌患者,给予每日10 mg的依维莫司单药治疗。在可分析的53例患者中,中位治疗持续时间57 d,疾病控制率达55%(29/53例),中位PFS达83 d,不良反应轻微。研究初步显示了依维莫司在胃癌治疗中的疗效和安全性,有待进一步的III期临床研究的评价。

目前正在进行的一项随机双盲多中心的III期临床研究(GRANITE-1)比较了依维莫司联合最佳支持治疗(BSC)对比安慰剂+BSC治疗一线或二线治疗失败的晚期胃癌患者。

#### 5 Catumaxomab

Catumaxomab是一种能与EpCAM分子、CD3抗原以及Fc $\gamma$ 受体特异性结合的三功能抗体<sup>[35]</sup>。Catumaxomab与这些特异性位点结合后,刺激多种免疫细胞通过穿孔素介导的细胞裂解、抗体介导的吞噬作用及抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用等多种机制引起肿瘤细胞死亡。EpCAM广泛表达于各种上皮性肿瘤,包括食管癌、胃癌、肺癌、卵巢癌等<sup>[36]</sup>。研究表明,Catumaxomab在上皮肿瘤引发的恶性腹水中安全、有效<sup>[37]</sup>。

2009年ESMO会议上报道了Catumaxomab治疗胃癌腹水患者的疗效和安全性<sup>[38]</sup>。试验共纳入66例胃癌伴有症状性腹水的患者,46例接受Catumaxomab+腹腔穿刺引流治疗,20例单纯接受腹腔穿刺引流治疗。结果显示Catumaxomab组无穿刺生存时间为44 d,对照组为15 d( $P<0.0001$ );中位OS Catumaxomab组为71 d,对照组为44 d( $P=0.0313$ )。研究表明腹腔注射Catumaxomab是控制胃癌腹水有效的治疗手段,且安全性良好。

#### 6 结论

胃癌的发生、发展与其他大多数实体肿瘤一样是一个多靶点多环节调控的结果,多靶点联合用药将是胃癌分子靶向治疗的一个发展趋势。另外,合理有效地与细胞毒药物联合应用将发挥更好的治疗效果。考虑到化疗药物的毒性和化疗疗效的“天花板效应”而影响靶向药物的疗效,目前倾向于推荐两药联合的化疗方案与靶向药物配伍应用。同时针对不同的靶向药物应该有不同的最佳化疗方案。虽然分子靶向治疗为提高胃癌的治疗效果带来了希望,但仍有待更多III期临床研究的循证医学支持。未来应进一步阐明分子靶向药物潜在的分子机制,以寻找新的治疗靶点和更为特异的疗效预测指标。

#### 7 参考文献

- 1 龚继芳,沈琳.老年胃癌药物治疗对策.世界华人消化杂志 2008; 16: 2443-2447
- 2 吴春晓,郑莹,鲍萍萍,顾凯,王春芳,向泳梅,彭鹏,邱永莉,龚杨明,卢伟.上海市胃癌发病流行现状与时间趋势分析.外科理论与实践 2008; 13: 24-29
- 3 Arkenau HT. Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 855-866
- 4 Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Benedetti JK, Baker AF, Hackett CB, Urba SG, Zaner KS, Blanke CD, Abbruzzese JL. Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4922-4927
- 5 Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 687-697
- 6 Pinto C, Di Fabio F, Siena S, Cascinu S, Rojas Llimpe FL, Ceccarelli C, Mutri V, Giannetta L, Giaquinta S, Funaioli C, Berardi R, Longobardi C, Piana E, Martoni AA. Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study). *Ann*

- Oncol* 2007; 18: 510-517
- 7 Lordick F, Luber B, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Wöll E, Decker T, Endlicher E, Röthling N, Schuster T, Keller G, Fend F, Peschel C. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Br J Cancer* 2010; 102: 500-505
  - 8 Han SW, Oh DY, Im SA, Park SR, Lee KW, Song HS, Lee NS, Lee KH, Choi IS, Lee MH, Kim MA, Kim WH, Bang YJ, Kim TY. Phase II study and biomarker analysis of cetuximab combined with modified FOLFOX6 in advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 298-304
  - 9 Pinto C, Di Fabio F, Barone C, Siena S, Falcone A, Cascinu S, Rojas Llimpe FL, Stella G, Schinzari G, Artale S, Mutri V, Giaquinta S, Giannetta L, Bardelli A, Martoni AA. Phase II study of cetuximab in combination with cisplatin and docetaxel in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (DOCETUX study). *Br J Cancer* 2009; 101: 1261-1268
  - 10 张小田, 沈琳, 张晓东, 李洁, 张忠涛. 西妥昔单抗联合化疗在消化系统肿瘤中的临床应用. *中华肿瘤杂志* 2008; 30: 385-388
  - 11 Enzinger PC, Burtness B, Hollis D, Niedzwiecki D, Ilson D, Benson AB, Mayer RJ, Goldberg RM. CALGB 80403/ECOG 1206: A randomized phase II study of three standard chemotherapy regimens (ECF, IC, FOLFOX) plus cetuximab in metastatic esophageal and GE junction cancer. *Proc ASCO, Annual Meeting* 2010: 4006
  - 12 Lialiaris TS, Georgiou G, Sivridis E, Kareli D, Tripsiannis G, Papageorgiou A, Chrisafi S, Kritsi Z, Giatromanolaki A. Prognostic and predictive factors of invasive ductal breast carcinomas. *J BUON* 2010; 15: 79-88
  - 13 Hwang MS, Yum YN, Joo JH, Kim S, Lee KK, Gee SW, Kang HI, Kim OH. Inhibition of c-erbB-2 expression an activity in human ovarian carcinoma cells by hypericin. *Anticancer Res* 2001; 21: 2649-2655
  - 14 Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1331-1339
  - 15 Lazăr D, Raica M, Sporea I, Tăban S, Goldiș A, Cornianu M. Tumor angiogenesis in gastric cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2006; 47: 5-13
  - 16 Whisenant J, Bergsland E. Anti-angiogenic strategies in gastrointestinal malignancies. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 411-421
  - 17 El-Rayes BF, Zalupski M, Bekai-Saab T, Heilbrun LK, Hammad N, Patel B, Urba S, Shields AF, Vaishampayan U, Dawson S, Almhanna K, Smith D, Philip PA. A phase II study of bevacizumab, oxaliplatin, and docetaxel in locally advanced and metastatic gastric and gastroesophageal junction cancers. *Ann Oncol* 2010; 21: 1999-2004
  - 18 Javle M, Hsueh CT. Recent advances in gastrointestinal oncology--updates and insights from the 2009 annual meeting of the American society of clinical oncology. *J Hematol Oncol* 2010; 3: 11
  - 19 Kang Y, Ohtsu A, Van Cutsem E, Rha SY, Sawaki A, Park S, Lim H, Wu J, Langer B, Shah MA. AVA-GAST: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of first-line capecitabine and cisplatin plus bevacizumab or placebo in patients with advanced gastric cancer (AGC). *Proc ASCO, Annual Meeting* 2010: LBA4007
  - 20 Doi T, Koizumi W, Siena S, Cascinu S, Ohtsu A, Michael M, Takiuchi H, Swaisland H, Gallagher N, VanCutsem E. Efficacy, tolerability and pharmacokinetics of gefitinib (ZD1839) in pretreated patients with metastatic gastric cancer. *Proc ASCO, Annual Meeting* 2003: 1036
  - 21 Abboud M, Saghir NS, Salame J, Geara FB. Complete response of brain metastases from breast cancer overexpressing Her-2/neu to radiation and concurrent Lapatinib and Capecitabine. *Breast J* 2010; 16: 644-646
  - 22 Kim JW, Kim HP, Im SA, Kang S, Hur HS, Yoon YK, Oh DY, Kim JH, Lee DS, Kim TY, Bang YJ. The growth inhibitory effect of lapatinib, a dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase, in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett* 2008; 272: 296-306
  - 23 Wainberg ZA, Anghel A, Desai AJ, Ayala R, Luo T, Safran B, Fejzo MS, Hecht JR, Slamon DJ, Finn RS. Lapatinib, a dual EGFR and HER2 kinase inhibitor, selectively inhibits HER2-amplified human gastric cancer cells and is synergistic with trastuzumab in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1509-1519
  - 24 Iqbal S, Goldman B, Lenz HJ, Fenoglio-Preiser CM, Blanke CD. S0413: A phase II SWOG study of GW572016 (lapatinib) as first line therapy in patients (pts) with advanced or metastatic gastric cancer. *Proc ASCO, Annual Meeting* 2007: 4621
  - 25 Roth A, Moehler MH, Mauer M, Schad A, Karrasch M, Praet M, Lim ML, Das-Gupta A, Lutz MP. Lapatinib in combination with ECF/x in EGFR1 or HER2-overexpressing first-line metastatic gastric cancer (GC): A phase II randomized placebo controlled trial (EORTC 40071). *Proc ASCO, Annual Meeting* 2010: TPS205
  - 26 Dal Lago L, D'Hondt V, Awada A. Selected combination therapy with sorafenib: a review of clinical data and perspectives in advanced solid tumors. *Oncologist* 2008; 13: 845-858
  - 27 Hasskarl J. Sorafenib. *Recent Results Cancer Res* 2010; 184: 61-70
  - 28 Sun W, Powell M, O'Dwyer PJ, Catalano P, Ansari RH, Benson AB 3rd. Phase II study of sorafenib in combination with docetaxel and cisplatin in the treatment of metastatic or advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: ECOG 5203. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2947-2951
  - 29 Sulkes A. Novel multitargeted anticancer oral therapies: sunitinib and sorafenib as a paradigm. *Isr Med Assoc J* 2010; 12: 628-632
  - 30 Escudier B. Sunitinib for the management of advanced renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10: 305-317
  - 31 Goodman VL, Rock EP, Dagher R, Ramchandani RP, Abraham S, Gobburu JV, Booth BP, Verbois SL, Morse DE, Liang CY, Chidambaram N, Jiang JX, Tang S, Mahjoob K, Justice R, Pazdur R. Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1367-1373
  - 32 Moehler MH, Hartmann JT, Lordick F, Al-Batran S, Reimer P, Trarbach T, Ebert MP, Daum S, Weihrach M, Galle PR. An open-label, multicenter phase II trial of sunitinib for patients with chemorefractory metastatic gastric cancer. *Proc ASCO, Annual Meeting* 2010: e14503

- 33 Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, Seidel U, Bataille F, Klein D, Ellis LM, Bolder U, Hofstaedter F, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *Int J Cancer* 2007; 120: 1803-1810
- 34 Yamada Y, Doi T, Muro K, Boku N, Nishina T, Takiuchi H, Komatsu Y, Hamamoto Y, Ohno N, Fujita Y, Ohtsu A. Multicenter phase II study of everolimus in patients with previously treated metastatic gastric cancer: Main results. *Proc ASCO, GI Cancers Symposium* 2009: 77
- 35 Sebastian M, Kuemmel A, Schmidt M, Schmittel A. Catumaxomab: a bispecific trifunctional antibody. *Drugs Today (Barc)* 2009; 45: 589-597
- 36 Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004; 35: 122-128
- 37 Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, Ivanchenko VV, Dudnichenko AS, Aleknaviciene B, Razbadauskas A, Gore M, Ganea-Motan E, Ciuleanu T, Wimberger P, Schmittel A, Schmalfeldt B, Burges A, Bokemeyer C, Lindhofer H, Lahr A, Parsons SL. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer* 2010; 127: 2209-2221
- 38 Heiss M, Linke R, Friccius-Quecke H, Klein A, Hennig M, Lindhofer H, Parsons S. Catumaxomab treatment in gastric-cancer patients with malignant ascites - subgroup-analysis of a pivotal trial. *Eur J Can Suppl* 2009; 7: 363

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32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

# 造血干细胞分化成肝细胞的可能性

盛瑜, 韩国庆

盛瑜, 韩国庆, 山东大学附属省立医院消化内科 山东省济南市 250021

作者贡献分布: 本文由盛瑜负责撰写; 韩国庆指导。

通讯作者: 韩国庆, 副教授, 副主任医师, 250021, 山东省济南市, 山东大学附属省立医院消化内科. [hanguotv@sohu.com](mailto:hanguotv@sohu.com)  
电话: 0531-86800326

收稿日期: 2010-12-01 修回日期: 2011-01-26

接受日期: 2011-02-15 在线出版日期: 2011-03-28

关键词: 造血干细胞; 移植; 诱导分化; 肝细胞

盛瑜, 韩国庆. 造血干细胞分化成肝细胞的可能性. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 925-929

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/925.asp>

## ■背景资料

实验研究大部分基于肝损伤的动物模型, 模拟临床中肝损害或是晚期肝病的模型, 其研究价值很大, 但是实验研究中也出现争议, 对分化的可能性提出质疑。

## Possibility of differentiation of hematopoietic stem cells into liver cells

Yu Sheng, Guo-Qing Han

Yu Sheng, Guo-Qing Han, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Correspondence to: Associate Professor, Guo-Qing Han, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China. [hanguotv@sohu.com](mailto:hanguotv@sohu.com)

Received: 2010-12-01 Revised: 2011-01-26

Accepted: 2011-02-15 Published online: 2011-03-28

## Abstract

Bone marrow-derived hematopoietic stem cells have the potential to undergo multilineage differentiation. Recent studies have shown that, in a given microenvironment, hematopoietic stem cells can differentiate into liver cells. However, some researchers hold a dissenting view. This review discusses the possibility of differentiation of hematopoietic stem cells into liver cells.

Key Words: Hematopoietic stem cells; Transplantation; Differentiation; Liver cells

Sheng Y, Han GQ. Possibility of differentiation of hematopoietic stem cells into liver cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 925-929

## 摘要

来自骨髓的造血干细胞具有干细胞的多向分化的潜能。近年来有研究表明, 在特定微环境下, 造血干细胞能诱导分化成肝细胞, 也有研究对此表示争议。本文对造血干细胞是否能有效诱导分化成肝细胞作简要综述。

## 0 引言

造血干细胞早在200多年前就已被提出, 来自骨髓的造血干细胞在整个生命过程中不断产生血细胞, 并且具有干细胞的自我更新和多向分化的潜能, 近年研究表明, 造血干细胞在特定环境下, 能向肝细胞分化, 形成造血干细胞源性肝细胞(hematopoietic stem cells-derived hepatocytes, HSCDH)。对于这一研究的可能性, 我们提出了几个质疑的问题: (1)造血干细胞能分化成肝细胞吗? (2)如果能, 那么在生理状态下或是肝细胞损伤的病理情况下HSCDH是否能替代受试者的肝细胞? (3)造血干细胞中哪类细胞能诱导分化成肝细胞? (4)产生的机制是什么? (5)造血干细胞在肝内除了直接分化成肝细胞, 对肝细胞的恢复还有其他作用机制吗?

## 1 造血干细胞能分化成肝细胞吗?

在哺乳动物早期的胚胎发育过程中肝组织和造血组织保持着密切的联系。造血干细胞先从卵黄囊或/和胚胎的主动脉-性腺-中肾区域迁移出后, 主要在胚胎肝中形成血细胞<sup>[1]</sup>。随后, 前肠内胚层出现内胚层前体细胞, 在胎肝中分化成肝细胞和胆管细胞<sup>[2]</sup>。在胎肝中, 胚胎肝上皮细胞和肝内造血干细胞通过特异的细胞因子和生长因子的作用, 相互促进彼此的细胞分化<sup>[3]</sup>。虽然胎肝上皮细胞和造血祖细胞共同表达一些相同的基因, 但是两者共同起源的干细胞在胎肝中并没有确定<sup>[4,5]</sup>。

目前对于造血干细胞能否分化成肝细胞, 研究最多的实验模型是用异体骨髓(含造血干细胞)植入受到致命性辐射的小鼠体内的实验, 检测在失去造血细胞系统的小鼠体内异体造血干细胞如何重建造血系统, 是否存在分化成肝细

## ■同行评议者

单云峰, 副主任医师, 温州医学院附属第一医院肝胆外科

### ■研发前沿

骨髓造血干细胞的多向分化的潜能, 对于其在特定条件下定向分化成肝细胞的研究已成为热点。

细胞的可能. 分析了Lagasse等用标准的实验模型所做的28个实验<sup>[6-32]</sup>, 有80%以上的实验检测到的HSCDH产量小于受试者肝细胞总量的0.05%, 而只有6%的实验产量超过1.5%. 当采用抑制受试者自身内源性肝细胞增殖的实验方法后, 50%的实验中HSCDH的产量多于受者肝细胞总量的1.5%, 而只有35%的产量>0.05%. 分析造成HSCDH产量高的实验结果的可能有: 移植后肝细胞扩增程度的差别, 在体外培养的造血干细胞基因重塑以及对HSCDH的测定不严密等原因. 总的实验结果分析表明, 移植的造血干细胞产生肝样细胞的可能性很低( $\leq 10^{-4}$ ).

**1.1 造血干细胞的移植与HSCDH的增殖** 很少有人研究造血干细胞的移植水平与移植后HSCDH的增殖水平对肝细胞产的影响. Wang等<sup>[25]</sup>和Camargo等<sup>[26]</sup>用小鼠建立骨髓移植后再生肝细胞力学模型, 将小鼠经过NTBC处理, 阻止有毒性的延胡索二酰乙酸的合成, 在延胡索二酰乙酸阴性的小鼠肝脏中, 检测到移植后产生的HSCDH的量只占宿主肝细胞的 $10^{-4}$ 到 $10^{-6}$ , 说明移植 $(1-2) \times 10^6$ 个骨髓细胞, 会产生50到500个HSCDH. 因此, 只有0.0025%-0.025%的移植细胞发生分化, 仅为受试者肝细胞总量的0.01%到0.0001%. 相似的移植水平在其他研究中也出现过<sup>[27-29]</sup>.

在上述实验中, 对Fah<sup>-/-</sup>小鼠去除保护肝细胞的NTBC因素的处理后, 内源性肝细胞被杀死, 而移植的造血干细胞增殖分化获得HSCDH, 并且HSCDH很少受到处理因素的影响, 50-500个HSCDH快速增殖, 产生一系列的HSCDH, 占整个肝脏细胞的30%. 在Jang等<sup>[30]</sup>和Yannaki等<sup>[31]</sup>的两个实验中, 用CCl<sub>4</sub>造成肝脏的损伤的模型, 发现移植骨髓造血干细胞后也出现增殖的情况. 但是, 在大多数的研究中骨髓移植的细胞增殖很少见. 在正常生理条件下的成体肝脏中, 移植骨髓出现肝细胞增殖的情况更是少见. 甚至在70%的肝损伤(等价于像CCl<sub>4</sub>引起的肝细胞损失), 只能诱导剩余的肝细胞不到2个分裂周期的循环. 这些研究说明移植造血干细胞的不同增殖水平, 是HSCDH产量的一个主要变化因素.

Jang等<sup>[30]</sup>、Terai等<sup>[32]</sup>、Yamamoto等<sup>[33]</sup>的3个实验中, 在未接受辐射的小鼠体内, 发现移植造血干细胞产生肝细胞的产量多于受者肝细胞总量的1.5%. 在移植异体的Fra25Lin<sup>-</sup> “home recovered” (将分离的骨髓造血干细胞通过表面抗原的表达、沉淀、标记在动物体内移植恢

复其功能)骨髓入未受辐射的小鼠体内, 2 d后HSCDH的产量为肝细胞总量的2%-7%, 但是独立使用这一方法并没有获得此种结果. 在另一些实验研究中, 将异体的骨髓或是Liv8的骨髓细胞直接输送到CCl<sub>4</sub>造成的肝损伤小鼠的静脉血管内, 检测到>12%的肝细胞来自于移植的造血干细胞, 但是Narindrasorasak等<sup>[34]</sup>使用同样的设计, 却没有得到此种结果. 所以这个问题需要进一步的研究.

**1.2 来自体外培养的造血干细胞能否有效分化成肝细胞** Gupta等<sup>[35]</sup>在胆汁淤积的小鼠模型中, 将来自骨髓的 $\beta 2 M$ -Thy1<sup>+</sup>造血干细胞与肝细胞共同培养(被一层半透膜隔开), 检测到骨髓造血干细胞能分化出几种细胞, 有多功能的成体祖细胞、巨噬细胞集落刺激因子的作用下产生的巨噬细胞, 来自胎儿骨髓的Flk<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>细胞<sup>[36]</sup>, 以及自由的体细胞等. 然而肝细胞未能检测到. 但是, 有实验表明, 如果延长骨髓造血干细胞在体外的培养时间会发生细胞核基因重塑, 从而导致产生的细胞系更具可塑性(可塑性指细胞从一种组织完全转变成另一种, 失去原来组织的特异性表面标记和功能, 获得新的组织的相关标记和功能), 也许能获得较多量的肝细胞, 这一问题有待进一步研究.

## 2 在生理和病理的情况下, HSCDH对肝脏能否起到修复作用?

最近研究结果表明, 在成年动物生理以及大部分病理的情况下, 造血干细胞对肝细胞的替换的作用是微不足道的<sup>[37,38]</sup>. 成年鼠肝细胞的生理更新周期大约是400 d<sup>[21]</sup>, 每天的更新的数量大约是肝细胞总量的0.25%. 然而众多研究表明HSCDH产量仅是肝细胞总量的 $10^{-4}$ - $10^{-5}$ , 产量太低而不能代替受试者肝细胞的损失量, 不能满足受试者肝脏的生理更新.

当受试者自身内源性肝细胞因创伤或疾病导致大量损失时, 如Fah<sup>-/-</sup>的小鼠接受Fah<sup>+/+</sup>骨髓移植细胞后, 发现HSCDH快速选择性扩增替代肝细胞. 有学者认为这种快速选择性的扩增是可能发生的, 但是这种选择优势是由致命的内源性肝细胞损伤才能实现的. 在大部分情况下, 移植细胞的后代相对于内源性肝细胞是没有选择优势的. 如在CCl<sub>4</sub>暴露的小鼠实验中<sup>[31]</sup>, 对内源性肝细胞与移植细胞增殖情况做了比较, 小部分的HSCDH增殖量增长6倍, 而内源性肝细胞增殖更多, 扩增了约10倍, 大部分新增的肝细胞

### ■相关报道

Snorri等认为造血干细胞并不是肝细胞的直接前体细胞, 造血干细胞分化成肝细胞的可能性很低, 分化产生的干细胞只占整个肝细胞的 $\leq 10^{-4}$ . 对于造血干细胞分化成肝细胞的可能性需进一步研究.

还是来源于剩余的受体源性肝细胞. 在肝细胞因创伤或疾病大量损失后, 剩余的内源性肝细胞快速从静止状态激活, 迅速增殖补充肝细胞的损失<sup>[21]</sup>. 而且, 即使当剩余细胞也受到损伤, 阻止其增殖, 来自卵原细胞池的内胚层肝脏上皮干细胞会代替他们分化出肝细胞, 来补充损失的肝细胞.

### 3 哪一种造血干细胞能产生肝细胞?

有研究显示淋巴细胞系能产生肝细胞. 但是这一结论被Willenbring等<sup>[39]</sup>和Camargo两个实验否定. 因为在Rag1和Rag2的转基因小鼠中, 其骨髓缺乏淋巴细胞系细胞, 但将其骨髓移植入另一组受辐射的小鼠体内, 仍能产生HSCDH. 也有学者认为单核巨噬细胞也能产生肝细胞, 在实验中将体外培育的由骨髓产生的巨噬细胞输入受试者体内发现可以产生肝细胞, 但是Simonsen等<sup>[40]</sup>为巨噬细胞在体外培育过程中可能已经出现细胞核重塑, 导致可塑性增加, 而产生肝细胞. 对于异体骨髓植入受辐射的小鼠体内哪种特定的造血干细胞系能产生肝细胞, 仍不能确定, 并且即使产生少量肝细胞是不是因为在移植过程中发生了细胞核重塑, 都需要进一步研究.

### 4 造血干细胞产生肝细胞的机制是什么?

目前认为造血干细胞分化成肝细胞的机制可能有两种: 一是骨髓造血干细胞的分化转移; 二是宿主肝细胞和造血干细胞的融合. 分化转移指在基因的转录过程中, 造血干细胞基因表型直接转换成肝细胞表型. 与此相反, 融合是指一个肝细胞和一个造血干细胞产生异核杂交细胞, 含有两种细胞的基因和细胞器. 这种杂交细胞要想表达肝细胞表型, 需要将造血干细胞核从异核细胞中挤出去, 或者造血干细胞特异基因重塑, 从而产生肝细胞特异蛋白(图1).

造血干细胞直接分化转移成肝细胞这一机制并没有被证实. 分化转移需要证明在同一时间多功能造血干细胞基因转变成肝脏特异基因, 并且在移植中会促使造血干细胞产生肝细胞. 在Fra25Lin<sup>-</sup>“homed-recovered”细胞中检测到造血干细胞的一小部分基因表达转换成肝细胞基因, 但是在这项实验中, 除了检测到这一小部分基因外, 并没有说明转换的基因改变后被克隆, 以及这些表达肝细胞性能的造血干细胞能否产生肝细胞. 目前仍缺乏造血干细胞的转换

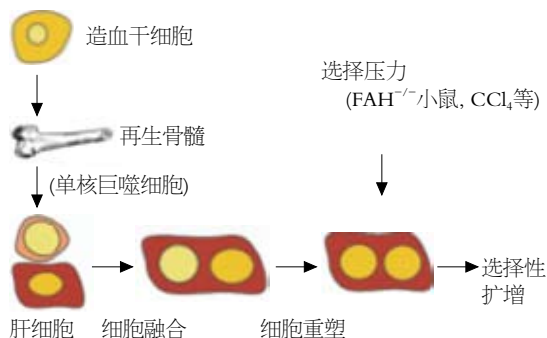


图1 移植造血干细胞产生肝细胞.

机制. 中胚层的造血干细胞分化转移成内胚层的肝细胞, 通常认为是在原肠胚形成时期, 是发育出现受阻的情况, 而在成年动物中不会发生. 在成年动物病理状态下, 类似的分化转移的过程如间充质细胞与上皮细胞的转化也是可能的. 但是造血干细胞能分化成肝细胞最可能的原因, 是造血干细胞的细胞核在延长的细胞培养中, 可能已经重塑, 因此增加了他们的可塑性而分化成肝细胞<sup>[40]</sup>. 这一问题还需进一步研究.

在一些实验中发现造血干细胞与宿主肝细胞融合能产生肝样细胞. 最近有研究认为正常及病态肝脏接受造血干细胞移植后, 可以产生肝样细胞, 产量为肝细胞总量的 $10^{-4}$ - $10^{-6}$ . 如Vasilopoulos等<sup>[41]</sup>、Kashofer等<sup>[42]</sup>和Fujino等<sup>[43]</sup>分别用3种不同的肝损伤模型, 使用不同的检测方法检测到杂交细胞, 说明存在细胞融合. 在这些杂交细胞中, 造血干细胞的基因发生重组, 抑制造血干细胞基因的表达, 上调肝细胞基因的表达. 然而造血干细胞和肝细胞的融合发生率是很低的, 如Zhou等<sup>[44]</sup>将ALDHhiLin<sup>+</sup>细胞植入肝损害模型中, 发现这些细胞与肝细胞融合的发生率很小. 在健康小鼠肝脏内用Cre-lox重组的方法<sup>[11]</sup>, 发现融合率很低. Harris等<sup>[45]</sup>用同样的方法却没有检测到骨髓细胞和肝细胞融合, 而在一只暴露在肝毒素化学制品的动物中, 检测到融合现象. 总之, 这些结果说明受损肝脏的肝细胞可能比正常的肝细胞更容易发生细胞融合.

### 5 移植的造血干细胞除了直接转化成肝细胞起作用, 是否还有其他间接的作用机制?

在胚胎形成时期造血干细胞迁移进肝内能分泌某些细胞因子和生长因子, 支持肝细胞的增殖分化. 在成年动物体内, 主要是来源于骨髓的肝脏非实质细胞分泌产生细胞因子和生长因子, 来调节肝细胞的增殖和修复等功能<sup>[46,47]</sup>. 目前有

**■创新盘点**  
目前大量文章综述了造血干细胞能分化出肝细胞, 而对于其分化可能性的多少, 移植细胞的分化情况, 增殖情况及移植分化后产生的肝细胞对受损肝脏的修复作用的大小, 以及可能的分化机制几个方面分别综述鲜有报道.

### ■应用要点

本文较全面地总结论述了造血干细胞向肝细胞分化的研究水平,从实验研究上对其分化的可能性及临床应用的价值作出评价,对以后实验研究具有一定的参考价值。

研究表明,输注的造血干细胞可以通过其分泌的细胞因子或生长因子对肝细胞的增殖、恢复起作用,例如Yannaki等<sup>[31]</sup>用小鼠CCl<sub>4</sub>肝损伤的模型,在输注造血干细胞前,只输注粒细胞集落刺激因子(造血干细胞分泌产生的)就能阻止小鼠死于CCl<sub>4</sub>的毒性.说明造血干细胞除了直接转化成肝细胞以外,还可以通过其他机制调节肝细胞的增殖生长.在Esch等<sup>[48]</sup>的实验中,研究右叶肝脏因肿瘤切除的患者,将CD133<sup>+</sup>的异体骨髓造血干细胞移植入左叶肝中,发现左叶肝中剩余的肝细胞有增殖现象.说明移植的造血干细胞有可能产生某些因子促进剩余的细胞增殖.但是对移植造血干细胞后,是主要通过分化成肝细胞起作用,还是由移植细胞或是非实质肝细胞分泌的细胞因子和生长因子调节肝脏功能的,或是同时起作用,其机制需要进一步研究。

### 6 结论

虽然目前研究说明中胚层造血干细胞能产生极少数的肝细胞,但是在大多数情况下,这不是一个有效的方法.造血干细胞虽然通过旁分泌提供细胞因子和生长因子促进肝细胞的作用,但是,无论在生理还是病理条件下,造血干细胞对肝细胞形成的作用都是微乎其微的.移植的造血干细胞的细胞核重塑能产生新的细胞系,说明造血干细胞不能直接有效的分化成肝细胞,这些问题都需要进一步研究.对于造血干细胞能否产生肝细胞,需要有足够的实验研究证明,不能轻易下结论。

### 7 参考文献

- Durand C, Dzierzak E. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica* 2005; 90: 100-108
- Lemaigre F, Zaret KS. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 582-590
- Kinoshita T, Miyajima A. Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592: 303-312
- Suskind DL, Muench MO. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34<sup>+</sup> cytokeratin 7/8<sup>+</sup> cells express markers for stellate cells. *J Hepatol* 2004; 40: 261-268
- Zheng YW, Taniguchi H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 337-348
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234

- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377
- Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002; 36: 653-659
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49
- Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1: 11850-11853
- Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003; 88: 368-378
- Abe S, Lauby G, Boyer C, Rennard SI, Sharp JG. Transplanted BM and BM side population cells contribute progeny to the lung and liver in irradiated mice. *Cytotherapy* 2003; 5: 523-533
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901
- Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, Nishimura D, Ichikawa T, Hamasaki K, Eguchi K. Bone marrow engraftment in a rodent model of chemical carcinogenesis but no role in the histogenesis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 884-889
- Abedi M, Greer DA, Colvin GA, Demers DA, Dooner MS, Harpel JA, Pimentel J, Menon MK, Quesenberry PJ. Tissue injury in marrow transdifferentiation. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32: 42-46
- Sharma AD, Cantz T, Richter R, Eckert K, Henschler R, Wilkens L, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Ott M. Human cord blood stem cells generate human cytokeratin 18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. *Am J Pathol* 2005; 167: 555-564
- Zhu W, Qiu DK, Lai ZS, Wang YD, Zhang YL. [A study of liver cell transformation from bone marrow hematopoietic stem cells]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 221-222
- Khurana S, Jaiswal AK, Mukhopadhyay A. Hepatocyte nuclear factor-4alpha induces transdifferentiation of hematopoietic cells into hepatocytes. *J Biol Chem* 2010; 285: 4725-4731
- Rideout WM 3rd, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; 293: 1093-1098
- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004; 32: 414-425
- Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* 1962; 22: 842-849
- Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31
- Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 836-847

- 24 Prindull G, Zipori D. Environmental guidance of normal and tumor cell plasticity: epithelial mesenchymal transitions as a paradigm. *Blood* 2004; 103: 2892-2899
- 25 Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161: 565-574
- 26 Camargo FD, Finegold M, Goodell MA. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest* 2004; 113: 1266-1270
- 27 Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, Kahn A, Gilgenkrantz H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002; 35: 799-804
- 28 Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259
- 29 Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425: 968-973
- 30 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539
- 31 Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassas A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33: 108-119
- 32 Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134: 551-558
- 33 Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 1110-1118
- 34 Narindrasorasak S, Yao P, Sarkar B. Protein disulfide isomerase, a multifunctional protein chaperone, shows copper-binding activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 405-414
- 35 Gupta RC, Shukla OP. Microbial metabolism of 2-hydroxypyridine. *Indian J Biochem Biophys* 1975; 12: 296-298
- 36 Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Multiorgan engraftment and multilineage differentiation by human fetal bone marrow Flk1+/CD31-/CD34- Progenitors. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12: 603-613
- 37 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487
- 38 Grompe M. Bone marrow-derived hepatocytes. *Novartis Found Symp* 2005; 265: 20-27; discussion 28-34, 92-97
- 39 Willenbring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Y, Dorrell C, Olson S, Finegold M, Fleming WH, Grompe M. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med* 2004; 10: 744-748
- 40 Simonsson S, Gurdon JB. Changing cell fate by nuclear reprogramming. *Cell Cycle* 2005; 4: 513-515
- 41 Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904
- 42 Kashofer K, Siapati EK, Bonnet D. In vivo formation of unstable heterokaryons after liver damage and hematopoietic stem cell/progenitor transplantation. *Stem Cells* 2006; 24: 1104-1112
- 43 Fujino H, Hiramatsu H, Tsuchiya A, Niwa A, Noma H, Shiota M, Umeda K, Yoshimoto M, Ito M, Heike T, Nakahata T. Human cord blood CD34+ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/gamma(c)null mice through cell fusion. *FASEB J* 2007; 21: 3499-3510
- 44 Zhou P, Hohm S, Olusanya Y, Hess DA, Nolte J. Human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity efficiently engraft into damaged liver in a novel model. *Hepatology* 2009; 49: 1992-2000
- 45 Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, Grove JE, Van Arnem JS, Krause DS. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 2004; 305: 90-93
- 46 Stadtfeld M, Graf T. Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing. *Development* 2005; 132: 203-213
- 47 Cantz T, Sharma AD, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Klein C, Manns MP, Ott M. Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant* 2004; 13: 659-666
- 48 am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, Piechaczek C, Burchardt ER, Feifel N, Stoldt V, Stockschröder M, Stoecklein N, Tustas RY, Eisenberger CF, Peiper M, Häussinger D, Hosch SB. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005; 23: 463-470

#### 同行评价

本文选题新颖, 论据充分, 结论科学, 具有较好的可读性。

编辑 李薇 电编 何基才



# 槲皮素对结肠癌作用及其机制的研究进展

周阿成, 金黑鹰, 张春霞, 王水明

## ■背景资料

槲皮素属于黄酮类化合物, 具有重要的抗肿瘤活性, 能够抑制多种肿瘤细胞, 尤其是结肠癌方面, 可能通过调节多个基因, 抑制细胞的增殖, 诱导细胞凋亡。

周阿成, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210046

金黑鹰, 全国肛肠医疗中心 南京中医药大学第三附属医院 江苏省南京市 210001

张春霞, 王水明, 南京中医药大学研究生部 江苏省南京市 210046

作者贡献分布: 本文由撰写过程由周阿成完成; 金黑鹰审校; 张春霞与王水明收集整理资料。

通讯作者: 金黑鹰, 210001, 江苏省南京市, 全国肛肠医疗中心, 南京中医药大学第三附属医院. jinheiying@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-01-16 修回日期: 2011-03-09

接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-03-28

## Advances in understanding preventive and therapeutic effects of quercetin against colon cancer and mechanisms involved

A-Cheng Zhou, Hei-Ying Jin, Chun-Xia Zhang, Shui-Ming Wang

A-Cheng Zhou, the First Clinical College of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Hei-Ying Jin, National Medical Center for Colorectal Care, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Chun-Xia Zhang, Shui-Ming Wang, Graduate School, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hei-Ying Jin, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. jinheiying@yahoo.com.cn

Received: 2011-01-16 Revised: 2011-03-09

Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-03-28

## Abstract

Quercetin can be extracted from many vegetables and fruits. Many studies have demonstrated that quercetin can suppress many kinds of cancer cells, such as breast, prostate, liver, esophageal and ovarian cancers. Quercetin not only inhibits proliferation and induces apoptosis of colon cancer cells but also reduces aberrant crypt foci in the colon. Currently, although the mechanisms underlying the inhibitory effect of quercetin against colon cancer cells are still unknown, it is believed that quercetin probably does have a broad modulatory effect on gene ex-

pression in colon cancer.

**Key Words:** Quercetin; Colon cancer; Inhibition; Apoptosis

Zhou AC, Jin HY, Zhang CX, Wang SM. Advances in understanding preventive and therapeutic effects of quercetin against colon cancer and mechanisms involved. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 936-939

## 摘要

槲皮素广泛存在于蔬菜和水果中, 属于黄酮类物质, 研究发现其对多种肿瘤细胞具有抑制作用, 包括乳腺癌、前列腺癌、肝癌、食管癌、卵巢癌等。目前在体内和体外研究均发现槲皮素对结肠癌具有抑制作用, 其不仅抑制结肠癌细胞的增殖、诱导癌细胞的凋亡, 同时可以减少结肠畸形腺隐窝的数目。槲皮素抑癌的具体作用机制目前还不明确, 可能是通过调节多个分子来实现。

**关键词:** 槲皮素; 结肠癌; 抑制; 凋亡

周阿成, 金黑鹰, 张春霞, 王水明. 槲皮素对结肠癌作用及其机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(9): 936-939

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/936.asp>

## 0 引言

槲皮素及其衍生物在自然界中的分布十分广泛, 是黄酮类化合物中的一种。它具有广泛的生物学活性, 包括抗氧化及清除氧自由基、抗纤维化、降低血压、降低血糖、保护心肌及抗肿瘤等<sup>[1]</sup>。近年来, 国内外许多研究发现槲皮素对多种癌细胞具有抑制作用, 尤其在结肠癌方面。槲皮素不仅可以抑制结肠癌细胞的增殖和诱导结肠癌细胞凋亡, 而且能够减少结肠中畸形腺隐窝的数目。

## 1 抑制炎症因子的表达

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)能够催化花生四烯酸生成前列腺素等致癌物质, 刺激细胞增殖而致癌<sup>[2]</sup>。槲皮素可有效地抑制COX-2促进子的转录活性, 抑制肿瘤的生长<sup>[3]</sup>。Warren等<sup>[4]</sup>

## ■同行评议者

李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

研究发现大鼠摄入槲皮素后, 结肠中的COX-1和COX-2的表达下降, iNOS在氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)注射组中显著高于槲皮素摄入组. Turner等<sup>[5]</sup>同样发现, 在未食用槲皮素的大鼠体内注射AOM时, iNOS表达增加5.29倍, 而食用槲皮素的大鼠iNOS表达仅增加1.68倍, 两者之间有显著的差异. COX-1在食用槲皮素后表达下降20.2%, 未食用槲皮素时COX-2表达增加24.3%. 该实验证实, 注射过AOM的大鼠通过食用槲皮素可以降低炎症因子COX-1和COX-2, 同时可以显著下调iNOS的表达. Murakami等<sup>[6]</sup>还发现槲皮素参与调节与炎症和肿瘤形成过程相关的信号转导途径, 如MEK/ERK、Nrf2/keap1.

## 2 抑制结肠癌的癌前病变

畸形隐窝灶(aberrant crypt foci, ACF)是结肠癌发生过程中最早期大肠黏膜病变, 被认为是结肠癌的癌前病变. 2002年, Gee等<sup>[7]</sup>对大鼠的在体研究发现, 喂食槲皮素可以通过抑制小肠和远端结肠隐窝细胞的分裂, 明显减少远端结肠中ACF的大小和数目. Warren等<sup>[4]</sup>将40只大鼠随机分成4组, 2组不食用槲皮素, 分别皮下注射生理盐水和AOM, 另2组食用槲皮素(4.5 g/kg)后分别注射生理盐水和AOM, 结果显示食用槲皮素组ACF明显减少( $P = 0.033$ ), 并且食用槲皮素的AOM注射组中的结肠细胞凋亡明显增加( $P = 0.014$ ), 同时发现炎症因子的表达下降. Miyamoto等<sup>[8]</sup>发现喂食黄酮类物质有降低小鼠结肠的ACF和抑制其增殖的作用, 其中槲皮素的抑制癌前病变和增殖的作用最显著. 对于槲皮素抑制结肠癌的癌前病变, 推测可能是通过抑制促炎症因子释放起作用.

## 3 调节癌基因及抑癌基因的表达

3.1 上调P53及其下游基因 *p53*是一种重要的抑癌基因, P53蛋白与调节细胞的成熟与分化有关, P53蛋白水平随细胞的增殖而进行性增加<sup>[2]</sup>. P53是重要的凋亡相关蛋白, 其具有促进凋亡的作用. 槲皮素作用于RKO结肠癌细胞后发现, P53蛋白表达明显增加, 呈浓度依赖性; 其下游的Gadd45a基因表达增加, 与对照组相比有统计学意义( $P < 0.05$ )<sup>[9]</sup>. 侯波等<sup>[10]</sup>同样发现, 槲皮素诱导Lovo结肠癌细胞凋亡可引起P53蛋白的表达上升. 槲皮素作用于HT-29结肠癌细胞也可以上调凋亡相关的P53蛋白<sup>[11]</sup>.

3.2 对抑制*ras*基因的影响 *ras*癌基因的编码产物是P21-ras蛋白, 其本质是膜相关的G蛋白, 具有

GTP酶活性, 参与信号的转导. *ras*癌基因家族主要包括*h-ras*、*n-ras*及*k-ras*基因. Ranelletti等<sup>[12]</sup>对结肠癌细胞研究发现, 10 mmol/L的槲皮素可以降低结肠癌细胞和原发性大肠癌中的P21-ras蛋白, 并呈时间和浓度依赖性, 槲皮素抑制*ras*癌基因的表达不依赖于结肠癌细胞的特定周期, 表现出独立的并且抑制蛋白的合成; 槲皮素对K-ras、H-ras、N-ras蛋白有类似的抑制作用, Northern blot分析显示, 槲皮素可引起结肠癌细胞中K-ras、H-ras和N-ras的mRNAs水平下降. Psahoulia等<sup>[13]</sup>也发现, 槲皮素治疗组通过下调结肠癌细胞中的*ras*癌基因减少, Ras蛋白的生成.

3.3 调节Bcl-2蛋白家族的表达 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. Bcl-2家族可以分为两类: 一类是抗细胞凋亡基因, 代表基因是*bcl-2*基因; 另一类是促细胞凋亡基因, 代表基因是*bax*基因, 他们主要通过激活一系列下游基因发挥调节凋亡的作用<sup>[14]</sup>. Kim等<sup>[15]</sup>发现槲皮素可以降低HT-29结肠癌细胞中Bcl-2蛋白的水平. 国内研究同样发现, 槲皮素可以抑制Lovo结肠癌细胞中Bcl-2蛋白的表达, 同时激活Bax和caspase-3蛋白来诱导细胞凋亡<sup>[10]</sup>.

## 4 激活磷酸腺苷活化蛋白激酶途径

磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是细胞生理上的能量传感器, 能够抑制正常和肿瘤细胞的增殖. 大鼠的在体研究发现, 100 mg/kg的槲皮素治疗组在治疗6 wk后, 大鼠的结肠癌瘤体体积明显减小, 凋亡相关蛋白AMPK上调<sup>[11]</sup>. Lee等<sup>[16]</sup>在发现槲皮素能激活HT-29结肠癌细胞中的AMPK, 活化的AMPK与降低COX-2表达有关, 当应用AMPK抑制剂时, 发现COX-2表达增加, 该实验不仅说明槲皮素可以通过激活AMPK抑制增殖、诱导凋亡, 还证实AMPK是COX-2的上游信号.

## 5 抑制 $\beta$ -catenin蛋白表达

正常情况下, 细胞质中 $\beta$ -catenin蛋白由泛素蛋白酶体介导, 呈降解状态而维持低水平表达. 当细胞质内的游离 $\beta$ -catenin不能及时被降解, 就会进入核内并与转录因子Tcf结合而启动与细胞增生有关的基因转录<sup>[17]</sup>. 在体实验发现, 槲皮素可以降低小鼠因注射AOM而引起的 $\beta$ -catenin蛋白聚集<sup>[8]</sup>. Park等<sup>[18]</sup>发现槲皮素能够通过减少细胞核中 $\beta$ -catenin和Tcf-4蛋白, 显著地抑制SW480结肠癌细胞中 $\beta$ -catenin/Tcf信号转录活性.

## ■ 相关报道

Kim等关于槲皮素的在体研究发现, 槲皮素可以抑制结肠癌的瘤体生长, 为在体研究提供依据.

## ■应用要点

对目前关于槲皮素对结肠癌细胞的体外研究进行总结,为在体研究提供依据。

## 6 调节其他肿瘤相关蛋白

目前发现在caspase家族中, caspase-3最重要,与凋亡的关系最为密切,参与多种因素诱导细胞凋亡。在正常情况下, caspase-3以无活性的酶原形式存在,只有当细胞凋亡时,才能被激活<sup>[19]</sup>。槲皮素能够增加caspase-3蛋白的表达活性诱导细胞凋亡<sup>[10]</sup>。Wenzel等<sup>[20]</sup>发现槲皮素能够抑制HT-29结肠癌细胞的增殖,可能与增加caspase-3活性调节细胞分化有关。严兴耘等<sup>[21]</sup>发现80 μmol/L和160 μmol/L的槲皮素能明显激活HT-29结肠癌细胞中的caspase-3 mRNA和蛋白的表达;而40 μmol/L时,虽然能增加caspase-3 mRNA的表达,但其蛋白的表达未见明显增加,最终导致HT-29结肠癌细胞的凋亡改变不明显。

此外,槲皮素能够通过下调细胞周期基因(CDC6、CDK4)和细胞周期蛋白D1的表达,抑制细胞增殖和诱导细胞周期停滞<sup>[22]</sup>。Mouat等<sup>[23]</sup>发现烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶硫铁蛋白-3和II型角蛋白细胞骨架8在槲皮素作用于SW480结肠癌细胞后,表达显著降低。槲皮素抑制RKO结肠癌细胞增殖中的研究发现,槲皮素能逆转p16INK4a基因的甲基化<sup>[24]</sup>。酪氨酸蛋白激酶受体ErbB2和ErbB3与结肠癌的发展有关,这两个受体在HT-29结肠癌细胞中表达增高,槲皮素作用后可使细胞中ErbB2和ErbB3水平下降<sup>[15]</sup>。魏金文等<sup>[25]</sup>发现,槲皮素不仅可以抑制结肠癌细胞的侵袭,而且能够下调TGF-1基因。然而,也有研究显示,槲皮素对结肠癌细胞有双向调节作用,低浓度的槲皮素可增加细胞的增殖<sup>[26]</sup>。

## 7 结论

槲皮素的抗肿瘤作用,已得到越来越多的实验证实,尤其是在抑制结肠癌细胞的增殖,诱导细胞凋亡方面,其具体的作用机制仍不十分明确,可能通过多种途径实现。目前国内外的研究主要集中在离体的细胞水平,关于槲皮素的在体实验研究较少。槲皮素作为天然的植物提取药,来源广泛,具有很重要的研究价值。因其水溶性差,所以基于槲皮素生物构象改造以增强其水溶性的研究也是必要的。

## 8 参考文献

- 1 刘彦芳,秦莉,张达,韩彩娟. 槲皮素的生物学活性研究进展. 国际眼科杂志 2009; 9: 941-943
- 2 瞿莺莺,周蕾,赖永洪. 槲皮素抗肿瘤作用的研究. 现代临床医学生物工程学杂志 2005; 11: 18-20
- 3 Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T, Wakabayashi K.

- Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis* 2000; 21: 959-963
- 4 Warren CA, Paulhill KJ, Davidson LA, Lupton JR, Taddeo SS, Hong MY, Carroll RJ, Chapkin RS, Turner ND. Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *J Nutr* 2009; 139: 101-105
- 5 Turner ND, Paulhill KJ, Warren CA, Davidson LA, Chapkin RS, Lupton JR, Carroll RJ, Wang N. Quercetin Suppresses Early Colon Carcinogenesis Partly through Inhibition of Inflammatory Mediators. *Acta Hort* 2009; 841: 237-242
- 6 Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 2008; 269: 315-325
- 7 Gee JM, Hara H, Johnson IT. Suppression of intestinal crypt cell proliferation and aberrant crypt foci by dietary quercetin in rats. *Nutr Cancer* 2002; 43: 193-201
- 8 Miyamoto S, Yasui Y, Ohigashi H, Tanaka T, Murakami A. Dietary flavonoids suppress azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. *Chem Biol Interact* 2010; 183: 276-283
- 9 王冲,谭赛男,陆彩玲,姚楠,马旭. 槲皮素对结肠癌的抑癌机制研究. 山西医科大学学报 2009; 40: 504-507
- 10 侯波,裴锐峰,韩雪梅. 槲皮素诱导人结肠癌LOVO细胞凋亡及其机制的研究. 中国老年学杂志 2009; 29: 2276-2278
- 11 Kim HJ, Kim SK, Kim BS, Lee SH, Park YS, Park BK, Kim SJ, Kim J, Choi C, Kim JS, Cho SD, Jung JW, Roh KH, Kang KS, Jung JY. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 8643-8650
- 12 Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, Ricci R, Larocca LM, Lanza P, Scambia G, Fattorossi A, Capelli A, Piantelli M. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 2000; 85: 438-445
- 13 Psahoulia FH, Moutzi S, Roberts ML, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A. Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS-transformed human colon cells. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1021-1031
- 14 王彤,刘存志,刘玉珍,于建春,韩景献. bcl-2/bax基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展. 中国老年学杂志 2008; 28: 1658-1660
- 15 Kim WK, Bang MH, Kim ES, Kang NE, Jung KC, Cho HJ, Park JH. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 155-162
- 16 Lee YK, Park SY, Kim YM, Lee WS, Park OJ. AMP kinase/cyclooxygenase-2 pathway regulates proliferation and apoptosis of cancer cells treated with quercetin. *Exp Mol Med* 2009; 41: 201-207
- 17 陈星明,官成浓. axin、β-catenin在Wnt信号转导途径中的调节机制. 医学研究杂志 2009; 38: 8-11
- 18 Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 227-234
- 19 邓文英,罗素霞,陈小兵,周梦强,李宁,韩黎丽,马杰,韩广森. Bcl-2、Caspase-3在大肠癌中的表达及意义.

- 现代肿瘤医学 2009; 17: 2263-2265
- 20 Wenzel U, Herzog A, Kuntz S, Daniel H. Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells. *Proteomics* 2004; 4: 2160-2174
- 21 严兴耘, 彭俊华, 张华欣, 张峰, 卞晓红, 王海忠, 赵涛. 槲皮素对结肠癌HT-29细胞增殖及周期的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1071-1076
- 22 van Erk MJ, Roepman P, van der Lende TR, Stierum RH, Aarts JM, van Bladeren PJ, van Ommen B. Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. *Eur J Nutr* 2005; 44: 143-156
- 23 Mouat MF, Kolli K, Orlando R, Hargrove JL, Grider A. The effects of quercetin on SW480 human colon carcinoma cells: a proteomic study. *Nutr J* 2005; 4: 11
- 24 Tan S, Wang C, Lu C, Zhao B, Cui Y, Shi X, Ma X. Quercetin is able to demethylate the p16INK4a gene promoter. *Chemotherapy* 2009; 55: 6-10
- 25 魏金文, 范钰, 张尤历, 钟锡明, 王崇强. 槲皮素对结肠癌细胞侵袭和畸胎瘤衍生长因子-1表达的影响. *中华消化杂志* 2008; 28: 573-574
- 26 Dihal AA, Woutersen RA, van Ommen B, Rietjens IM, Stierum RH. Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2. *Cancer Lett* 2006; 238: 248-259

■同行评价  
本文可读性较好, 对临床具有一定的参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》正文要求

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

# 核苷类似物治疗乙型肝炎病毒感染相关肝衰竭患者的临床研究进展

刘江福, 张琳, 冯国和

## ■背景资料

乙型肝炎病毒感染是引起肝功能衰竭的最常见原因, 在核苷类似物用于乙型肝炎抗病毒治疗以前, 没有安全有效的药物可以用于乙型肝炎病毒感染相关肝衰竭的抗病毒治疗。近年来, 随着核苷类药物的相继问世和临床广泛应用, 对乙型肝炎患者应用核苷类似物进行抗病毒治疗的研究报道越来越多, 但能否在短期内改善肝功能, 降低患者病死率尚有争议。

## ■同行评议者

谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

刘江福, 张琳, 冯国和, 中国医科大学附属盛京医院感染科  
辽宁省沈阳市 110004

辽宁省科技计划基金资助项目, No. 2006225001-1

作者贡献分布: 本综述写作由刘江福完成; 张琳与冯国和审核。  
通讯作者: 张琳, 副教授, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科. zhangl@sj-hospital.org  
电话: 024-96615-62115

收稿日期: 2010-12-28 修回日期: 2011-02-28

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-03-28

## Advances in treatment of HBV-related liver failure with nucleoside analogues

Jiang-Fu Liu, Lin Zhang, Guo-He Feng

Jiang-Fu Liu, Lin Zhang, Guo-He Feng, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Supported by: the Technology Program Fund of Liaoning Province, No. 2006225001-1

Correspondence to: Associate Professor Lin Zhang, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Avenue, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhangl@sj-hospital.org  
Received: 2010-12-28 Revised: 2011-02-28  
Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-03-28

## Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a common cause of liver failure in China. The mortality of fulminant hepatitis B is more than 70%. Adoption of antiviral therapy or not on the basis of comprehensive treatment has become a hot topic of recent research of treatment of fulminant hepatitis B, which causes liver failure in a way different from other reasons. HBV replication plays a critical role in initiating the development of fulminant hepatitis B. Reducing viral load to alleviate excessive immune response by antiviral therapy represents a new idea for the treatment of fulminant hepatitis B. The advent of nucleoside analogues makes it possible to conduct antiviral therapy against fulminant hepatitis B. This article summarizes recent advances in treatment of HBV-related liver failure with nucleoside analogues.

Key Words: Fulminant hepatitis B; Nucleoside ana-

logues; Antiviral therapy

Liu JF, Zhang L, Feng GH. Advances in treatment of HBV-related liver failure with nucleoside analogues. *Shi-jie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 930-935

## 摘要

乙型肝炎病毒感染是我国肝功能衰竭的常见原因, 乙型重型肝炎病死率高达70%以上。与其他原因所致肝功能衰竭不同, 在治疗上除综合治疗外, 是否进行抗病毒治疗是近年研究的热点。由于乙型肝炎病毒的复制在乙型重型肝炎的发生发展中起着始动或主导作用, 因此, 通过抗病毒治疗降低病毒载量, 缓解过强的免疫反应, 从而缓解病情, 是乙型重型肝炎治疗的新思路。核苷类抗病毒药物的问世, 使乙型重型肝炎抗病毒治疗成为可能。本文就该领域的研究现状作一综述。

关键词: 乙型重型肝炎; 核苷类似物; 抗病毒治疗

刘江福, 张琳, 冯国和. 核苷类似物治疗乙型肝炎病毒感染相关肝衰竭患者的临床研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(9): 930-935

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/930.asp>

## 0 引言

重型肝炎是由肝炎病毒感染引起肝细胞大量坏死或严重变性致肝功能衰竭的一类综合征。该病发展迅速、病情凶险、症状复杂, 常出现多器官功能衰竭, 病死率极高<sup>[1,2]</sup>。各型病毒性肝炎均可发展成重型肝炎。在我国, 由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染所致重型肝炎居各型肝炎病毒之首<sup>[3]</sup>。由于肝脏是人体最大的代谢器官, 参与糖、脂肪、蛋白质代谢和多种酶及生物活性物质的合成及分解, 因此肝功能衰竭患者常存在多种代谢紊乱, 导致机体内环境严重紊乱和各种严重并发症的发生<sup>[4,5]</sup>, 内科常规治疗效果差, 如何降低病死率迄今仍是医学领域中亟待解决的难题。

重型肝炎目前仍无特效治疗, 治疗原则包括以支持和对症治疗为基础的内科综合性治疗、人工肝支持系统治疗和肝脏移植. 病因治疗在内科综合治疗中占十分重要的地位. 在核苷类似物用于乙型肝炎抗病毒治疗前, 没有其他有效的抗病毒药物用于重型乙型肝炎的治疗. 因干扰素能增加肝细胞表面人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)表达, 加重细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)对肝细胞的损伤, 使用后的病情恶化者多见, 故不主张用于重型肝炎患者抗病毒治疗. 除干扰素外, 20世纪80年代末至90年代初的研究曾评估过几种核苷类似物, 包括阿糖腺苷、无环鸟苷、病毒唑等抗HBV的作用, 研究结果提示在安全剂量范围内这些药物并不能产生有效的抗HBV功效. 泛昔洛韦可以在体内代谢产生喷昔洛韦三磷酸盐发挥抑制病毒复制作用, 降低血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平, 改善肝组织炎症反应, 且药物不良反应少, 但抑制HBV DNA复制作用较弱, 而且停药后HBV DNA容易恢复到治疗前水平, 效果不甚理想. 近年来, 随着核苷类药物的相继问世和临床广泛应用, 有研究发现, 对乙型重型肝炎患者在传统综合治疗措施的基础之上, 选择合适的时机应用核苷类药物进行抗病毒治疗, 能提高患者生存率. 但是目前还有许多问题存在争议, 如药物种类和治疗时机的选择, 治疗的安全性等等. 本文将近年来核苷类似物抗病毒治疗在乙型重型肝炎中的应用进行综述.

## 1 乙型重型肝炎抗病毒治疗的理论依据

急性乙型重型肝炎的发病机制十分复杂, 至今尚未完全阐明. 目前认为肝组织在HBV相关性肝衰竭/重型肝炎发生过程中依次经受免疫损伤、缺血缺氧和内毒素血症等三重致死性打击<sup>[6]</sup>. 其中, HBV的复制在该病的发生中起着始动或主导作用<sup>[7-9]</sup>. HBV的高度复制及其蛋白抗原在肝细胞表面的表达, 诱发机体产生的抗乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)的抗体过早过多, 与HBsAg形成过多的免疫复合物, 导致局部过敏坏死反应, 肝细胞大块或亚大块坏死; 过多的抗原抗体复合物在肝血窦沉积, 造成微循环障碍, 可致肝细胞缺血坏死. 除强烈的体液免疫反应外, T淋巴细胞介导的细胞免疫反应也在急性肝细胞坏死中起十分重要的作用. 对于慢性乙型重型肝炎而言, HBV在机体

内持续复制而诱发亢进的免疫应答是主要致病因素, CTL介导的细胞免疫应答起主要作用. 赵振刚等<sup>[10]</sup>对289例慢加急性肝功能衰竭患者的诱因、转归等进行回顾性分析, 认为HBV活动复制和变异是乙型重型肝炎最主要诱因(占50.52%). 因此, 通过抗病毒药物降低机体病毒载量, 缓解过强的免疫反应, 从而缓解病情, 成为治疗乙型重型肝炎的一种可行性思路.

## 2 核苷类似物抗病毒治疗在乙型重型肝炎中的应用现状

2.1 拉米夫定 拉米夫定(lamivudine, LMV)是第一个用于乙型肝炎抗病毒治疗的核苷类药物, 为嘧啶核苷类似物, 能抑制DNA合成和HBV逆转录酶的活性, 使HBV复制迅速受到抑制, 减少肝脏和血液中病毒的载量, 同时使肝细胞膜上的靶抗原表达减少, 降低CTL对感染肝细胞的攻击.

对于急性乙型重型肝炎, 一般认为急性HBV感染绝大多数为自限性过程, 不必进行抗病毒治疗. Kumar等<sup>[11]</sup>应用LMV对急性乙型重型肝炎进行治疗, 结果显示: 在病程第4周时, 治疗组和对照组在病毒载量、乙型肝炎e抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)的消失或血清学转换、生化指标及临床症状的改善均无显著性差异. 治疗48及96 wk时, 两组在HBsAg消失或血清学转换方面亦无显著性差异. 然而, 与之截然不同的观点却认为, 尽早使用核苷类似物治疗有助于遏制病毒复制所致免疫应答, 阻断肝坏死的发生, 并且能减少或避免肝移植后HBV再感染. Miyake等<sup>[12]</sup>对37例基因型B型的HBV感染所致急性重型肝炎患者的回顾性队列研究表明, 10例应用LMV进行抗病毒治疗组患者的生存率显著高于对照组(70% vs 26%), 且治疗组的全身炎症反应综合征的发生率显著低于对照组. Schmilovitz-Weiss等<sup>[13]</sup>应用LMV治疗15例急性乙型重型肝炎患者, 有13例患者(86.6%)的临床症状和凝血指标均得到明显改善, HBV DNA载量明显下降. 11例HBeAg阳性患者治疗12 wk后均出现HBsAg消失, 其中9例出现表面抗体. Tillmann等<sup>[14]</sup>对17例急性乙型重型肝炎患者应用LMV进行抗病毒治疗进行观察, 结果显示, 12例患者的凝血酶原时间在1 wk内恢复正常, 14例患者完全恢复而避免了肝移植治疗. Delic等<sup>[15]</sup>对10例急性乙型重型肝炎患者应用LMV治疗后, 所有患者于4 mo时均出现HBsAg消失的现象, 继续治疗2 mo后停药, 随访6 mo, 所有患者均无复

■**研发前沿**  
HBV相关肝衰竭的治疗热点主要是治疗药物和时机的选择、药物的安全性, 能否降低患者近期病死率等. 目前尚缺乏严格的大样本随机对照研究.

### ■相关报道

Delic等对10例急性乙型重型肝炎患者应用LMV治疗后,所有患者于4 mo时均出现HBsAg消失的现象,继续治疗2 mo后停药,随访6 mo,所有患者均无复发。

发.上述3组研究结果提示,LMV治疗不但能提高急性乙型重型肝炎患者的生存率,同时还可能促进乙型肝炎病毒表面抗原的清除及血清学转换. Roznovsky等<sup>[16]</sup>还报道,单独应用LMV或联合糖皮质激素将有效降低急性重型肝炎病情进展的风险。

对于慢性乙型重型肝炎,有研究报道,在疾病病程的早期或者在胆红素上升至20 mg/dL前应用LMV,可以改善预后,降低患者的病死率,但在病程晚期或胆红素水平超过此数值时,则并不能明显改善患者的临床症状和病死率<sup>[17-22]</sup>,提示对慢性乙型重型肝炎早期抗病毒治疗是关键,可降低病死率.尤其对有明确的肝炎病毒复制是引起肝损伤的主要原因的患者,为保护未受感染的肝细胞免于病毒感染,控制病情发展,抗病毒治疗是必要的. Sun等<sup>[23]</sup>对130例应用LMV治疗的慢性乙型重型肝炎患者进行配对的回顾性队列研究,所有患者均随访观察3 mo,结果发现,治疗组的生存率高于对照组( $P = 0.0021$ ),治疗前高病毒载量的患者病死率高于低病毒载量患者( $P = 0.019$ ).对预后影响因素应用COX比例风险回归模型进行分析发现,终末期肝病评分模型(the model for End-Stage liver disease, MELD)分值20-30的患者,早期应用LMV抗病毒治疗可以显著降低患者的病死率,而对于对MELD分值>30的患者,并不能改善患者的预后. Yu等<sup>[24]</sup>也报道, MELD分值30-40的患者应用LAM治疗, HBV DNA水平的快速下降是预测预后较好的指标之一.且所有患者耐受性良好,提示LMV是慢性乙型重型肝炎抗病毒治疗的安全有效的药物。

然而也有不同报道认为,以LMV为主的抗病毒治疗对慢性乙型重型肝炎的疗效不理想. Yuen等<sup>[25]</sup>认为,即使早期应用LMV抗病毒治疗,也不能改善慢性乙型重型肝炎患者的预后. Tsubota等<sup>[26]</sup>对25例慢性乙型重型肝炎患者在常规治疗基础上加用LMV抗病毒治疗,并设立了25例对照病例,结果治疗组和对照组分别有6例(24%)和7例(28%)的患者很快发生肝衰竭,在这些患者中,治疗组有3例(50%)、对照组有2例(29%)存活下来,但差异无统计学意义( $P > 0.15$ ),认为LMV并不能阻止病情恶化. Cui等<sup>[27]</sup>将104例慢性乙型重型肝炎患者分为LMV治疗组、恩替卡韦(entecavir, ETV)治疗组及常规内科治疗组,随访观察3 mo时生存率分别为48.49%、50.00%、40.54%,无显著性差异( $P = 0.72$ ),且在

肝功能、肾功能、MELD分值的改变上均无显著性差异.但常规内科治疗组中,有5例患者再次进展为重型肝炎,因此认为应用LMV或ETV进行抗病毒治疗并不能改善患者的短期预后,但能显著降低慢性乙型重型肝炎患者的复发率,患者将因此而长期受益.还有学者认为随着LMV治疗时间的延长,病毒发生变异导致耐药的风险性增加,一旦发生酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(tyrosine-methionine-aspartate-aspartate, YMDD)变异,将使已获得的疗效趋于消失,甚至出现病情加重. Wong等<sup>[28]</sup>对45例应用LMV治疗的E抗原阳性的慢性乙型重型肝炎患者的观察结果显示, LMV治疗组e抗原血清转换率明显高于对照组(73% vs 52%),但有33%的患者在5年内出现了耐药和病毒学反弹,73%的患者出现病情恶化。

2.2 阿德福韦 阿德福韦(Adefovir, ADV)为腺嘌呤核苷类似物,是通过竞争脱氧腺苷三磷酸底物,终止病毒DNA链延长而抑制病毒复制.由于临床上该药起效相对缓慢而不作为慢性乙型重型肝炎抗病毒治疗的首选药物。

近年有学者认为,鉴于ADV能有效抑制HBV野生株及YMDD变异株,因此可以联合应用LAM和ADV对慢性乙型重型肝炎进行抗病毒治疗,不但能起到协同抗病毒作用,同时可以减少LAM的耐药率<sup>[29]</sup>. Lo等<sup>[30]</sup>和Hosaka等<sup>[31]</sup>观察发现, LAM治疗后出现YMDD变异的慢加急性肝衰竭患者,联合ADV治疗能减缓或终止病情进展,降低病死率,并能有效地防止肝脏移植后的病毒学反弹. Wiegand等<sup>[32]</sup>报道了1例失代偿期肝硬化患者在出现了LMV耐药后,病情迅速恶化出现肝衰竭,经加用ADV治疗后,病情得到缓解.然而也有ADV治疗LMV耐药所致肝衰竭失败的报道<sup>[33]</sup>.因此加用ADV的时机至关重要,应在患者出现病毒学反弹而未出现生化学异常时及时加用,可以防止病情进一步恶化<sup>[34]</sup>。

2.3 ETV ETV是一种环戊基鸟苷类似物,可抑制DNA多聚酶启动,从前基因组到HBV DNA负链的逆转录过程以及HBV DNA正链的合成过程.不但可以迅速降低肝脏及血液中病毒载量,还可以降低肝组织中共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)含量,对LMV耐药株仍有效.由于其强效且低耐药的特点,目前临床应用广泛。

Jochum等<sup>[35]</sup>对6例急性重型肝炎患者研究显示,应用ETV抗病毒治疗后患者HBV DNA明

显下降, 病理显示肝细胞变性坏死明显减轻, 其中有5例患者获得HBsAg的血清学转换, 且患者耐受性好, 无不良反应. 舒欣等<sup>[36]</sup>分析了132例HBeAg阴性和51例HBeAg阳性的慢性乙型重型肝炎患者应用ETV抗病毒治疗的短期疗效, 结果显示, 不论HBeAg阳性还是阴性患者, 抗病毒治疗组患者生存率明显高于未抗病毒治疗组; 未抗病毒组HBeAg阳性患者和HBeAg阴性患者生存率无显著性差异; 应用ETV组HBeAg阳性患者生存率高于HBeAg阴性患者. 提示ETV治疗能提高HBeAg阴性及阳性肝衰竭患者的生存率. Hu等<sup>[37]</sup>采用前瞻性、随机、平行对照临床试验, 观察HBV所致慢加急性肝衰竭早、中期患者接受核苷类似物治疗的疗效. 治疗4 wk时, LMV组好转率为58.9%, ETV组为59.2%, 均显著高于基础治疗组(34.8%), 两个抗病毒治疗组之间无显著性差异. 肖光明等<sup>[38]</sup>应用COX比例风险模型对219例应用核苷类似物抗病毒治疗的慢性乙型重型肝炎患者预后进行了分析, 结果显示, 在疾病早、中期开始抗病毒治疗可以改善患者预后, 而晚期抗病毒治疗并不能提高患者的生存率. LMV和ETV两种药物对患者预后的影响无显著性差异.

但Chen等<sup>[39]</sup>研究却得出不同的结论, 认为虽然ETV能强效快速抑制病毒复制, 但治疗组和对照组在短期内的生存率并没有差别, 患者的肝脏功能情况(转氨酶、白蛋白、胆红素、凝血酶原时间)和MELD分值与抗病毒治疗后病毒载量的下降无关, 提示慢性乙型重型肝炎患者抗病毒治疗虽能短期内抑制HBV DNA复制, 但并不能改善患者的预后.

2.4 替比夫定 替比夫定(telbivudine, LdT)是一种合成的胸腺嘧啶核苷类似物, 也是唯一的FDA批准的妊娠B级核苷类似物. LdT 5'-腺苷通过与HBV天然底物胸腺嘧啶的5'-腺苷竞争, 从而抑制HBV DNA多聚酶的活性; 通过整合到HBV DNA中造成HBV DNA链延长的终止, 从而抑制HBV的复制. 其抑制病毒迅速强劲, 能有效改善肝脏组织学, 使患者获得较高的HBeAg转阴率和HBeAg血清转换率. 同时, LdT在体外具有促进Th1细胞因子生成, 抑制Th2细胞因子产生的作用, 提示该药可能具有调节机体免疫功能的作用<sup>[40]</sup>, 但其与LMV存在交叉耐药位点, 且部分患者用药后会导致肌酸激酶(creatinase, CK)升高. 国内有报道, 慢性乙型重型肝炎患者应用LdT可使患者HBV DNA载量下降、MELD

评分下降、凝血酶原活动度好转, 但部分患者出现肝功能波动. 由于病例数较少, 缺少对照组, 尚无法说明病情好转与抗病毒治疗的相关性<sup>[41]</sup>. 目前, LdT用于乙型重型肝炎抗病毒治疗的临床研究较少, 其疗效及安全性有待于进一步评价.

2.5 替诺福韦 替诺福韦(tenofovir, TNV)是一种新型的无环核苷(酸)类似物, 其活性成分TNV双磷酸盐可直接竞争性的与天然脱氧核糖底物相结合而抑制病毒聚合酶, 通过插入DNA链中终止DNA合成. TNV最早被美国FDA批准用于HIV感染患者的治疗, 并在HIV和HBV重叠感染的患者中显示出对HBV野生株和LAM耐药株均有很强的抑制作用<sup>[42]</sup>. Van Bömmel等<sup>[43]</sup>报道1例慢性乙型肝炎患者因LAM耐药导致严重的肝功能损害, 使用TNV治疗获得成功. Taltavull等<sup>[44]</sup>报道1例患者在肝移植前因出现YMDD变异接受ADV联合LMV治疗8 mo, 仅部分应答, 加用TNV后第4周时, HBV DNA水平明显下降, 且无不良反应. 患者术后继续接受TNV治疗, 随访21 mo, HBV DNA一直处于检测线以下. 提示TNV是治疗LAM治疗失败HBV感染的很有希望的药物. 但以上仅仅是个案报道, 其结论尚需进一步大规模临床研究证实. 另外, TNV治疗肝衰竭患者的安全性也需进一步研究证实.

### 3 结论

目前大量研究表明, 乙型重型肝炎抗病毒治疗, 能迅速降低病毒载量, 改善肝脏功能, 降低病死率. 然而很多问题仍有待于深入研究, 如药物种类和用药时机的选择, 耐药的发生及处理、安全性等. 因目前有关乙型重型肝炎抗病毒治疗的研究多为临床回顾性分析, 没有严格的随机对照研究, 加上样本量小、随访时间短, 缺乏循证医学的证据, 因此很难准确评价某一药物的确切疗效. 进一步大样本前瞻性研究将对乙型重型肝炎抗病毒治疗具有重要指导意义.

### 4 参考文献

- 1 Mudawi HM, Yousif BA. Fulminant hepatic failure in an African setting: etiology, clinical course, and predictors of mortality. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3266-3269
- 2 Heo NY, Lim YS, Kang JM, Oh SI, Park CS, Jung SW, Lee YS, Kim KM, Lee HC, Chung YH, Lee YS, Suh DJ. [Clinical features of fulminant hepatic failure in a tertiary hospital with a liver transplant center in Korea]. *Korean J Hepatol* 2006; 12: 82-92
- 3 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组、中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 643-646

### ■ 创新盘点

本文系统地阐述了核苷类似物抗病毒治疗的理论依据及目前上市的5中核苷(酸)类似物抗病毒的作用机制、在乙型重型肝炎中的应用情况及对乙型重型肝炎预后的影响等热点问题.



## ■应用要点

在HBV相关肝衰竭的早期进行抗病毒治疗能迅速降低病毒载量,改善肝脏功能,降低病死率。

- 4 Wendon J, Lee W. Encephalopathy and cerebral edema in the setting of acute liver failure: pathogenesis and management. *Neurocrit Care* 2008; 9: 97-102
- 5 Munoz SJ. The hepatorenal syndrome. *Med Clin North Am* 2008; 92: 813-837, viii-ix
- 6 叶一农, 高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 638-640
- 7 Davis GL, Hoofnagle JH, Waggoner JG. Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1984; 86: 230-235
- 8 Gupta S, Govindarajan S, Fong TL, Redeker AG. Spontaneous reactivation in chronic hepatitis B: patterns and natural history. *J Clin Gastroenterol* 1990; 12: 562-568
- 9 Levy P, Marcellin P, Martinot-Peignoux M, Degott C, Nataf J, Benhamou JP. Clinical course of spontaneous reactivation of hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1990; 12: 570-574
- 10 赵振刚, 韩涛, 高英堂, 高艳颖, 张晔, 吴珍萍. 乙型肝炎患者并发慢加急性肝衰竭诱因及转归分析289例. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3269-3272
- 11 Kumar M, Satapathy S, Monga R, Das K, Hissar S, Pande C, Sharma BC, Sarin SK. A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 97-101
- 12 Miyake Y, Iwasaki Y, Takaki A, Fujioka S, Takaguchi K, Ikeda H, Kobashi H, Sakaguchi K, Shiratori Y. Lamivudine treatment improves the prognosis of fulminant hepatitis B. *Intern Med* 2008; 47: 1293-1299
- 13 Schmilovitz-Weiss H, Ben-Ari Z, Sikuler E, Zuckerman E, Sbeit W, Ackerman Z, Safadi R, Lurie Y, Rosner G, Tur-Kaspa R, Reshef R. Lamivudine treatment for acute severe hepatitis B: a pilot study. *Liver Int* 2004; 24: 547-551
- 14 Tillmann HL, Hadem J, Leifeld L, Zachou K, Canbay A, Eisenbach C, Graziadei I, Encke J, Schmidt H, Vogel W, Schneider A, Spengler U, Gerken G, Dalekos GN, Wedemeyer H, Manns MP. Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience. *J Viral Hepat* 2006; 13: 256-263
- 15 Delić D, Nesić Z, Prostran M, Borčić I, Svrtlih N. Treatment of subacute hepatitis B with lamivudine: a pilot study in Serbia. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66: 199-202
- 16 Roznovský L, Orságová I, Kloudová A, Mrázek J. [Lamivudine therapy in patients with severe acute hepatitis B]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2007; 13: 59-65
- 17 Tsang SW, Chan HL, Leung NW, Chau TN, Lai ST, Chan FK, Sung JJ. Lamivudine treatment for fulminant hepatic failure due to acute exacerbation of chronic hepatitis B infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1737-1744
- 18 Chien RN, Lin CH, Liaw YF. The effect of lamivudine therapy in hepatic decompensation during acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 38: 322-327
- 19 Wang YM, Tang YZ. Antiviral therapy for hepatitis B virus associated hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 17-24
- 20 张萍. 拉米夫定治疗慢性乙型重型肝炎的探讨. *临床肝胆杂志* 2008; 24: 291-292
- 21 张南, 夏杰, 邓国宏, 王宇明. 拉米夫定对慢性乙型肝炎患者生存率的提高. *第三军医大学学报* 2008; 30: 75-77
- 22 张耀, 郑莎, 周吉军, 王宇明. 拉米夫定治疗乙型肝炎病毒相关性肝衰竭疗效的Meta分析. *第三军医大学学报* 2008; 30: 848-850
- 23 Sun LJ, Yu JW, Zhao YH, Kang P, Li SC. Influential factors of prognosis in lamivudine treatment for patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 583-590
- 24 Yu JW, Sun LJ, Zhao YH, Li SC. Prediction value of model for end-stage liver disease scoring system on prognosis in patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure after plasma exchange and lamivudine treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1242-1249
- 25 Yuen MF, Sablon E, Hui CK, Li TM, Yuan HJ, Wong DK, Doutreloigne J, Bogaerts V, Wong BC, Fan ST, Lai CL. Prognostic factors in severe exacerbation of chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 979-984
- 26 Tsubota A, Arase Y, Suzuki Y, Suzuki F, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Lamivudine monotherapy for spontaneous severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 426-432
- 27 Cui YL, Yan F, Wang YB, Song XQ, Liu L, Lei XZ, Zheng MH, Tang H, Feng P. Nucleoside analogue can improve the long-term prognosis of patients with hepatitis B virus infection-associated acute on chronic liver failure. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2373-2380
- 28 Wong VW, Wong GL, Tsang SW, Hui AY, Chim AM, Yiu KK, Chan HY, Chan FK, Sung JJ, Chan HL. Long-term follow-up of lamivudine treatment in patients with severe acute exacerbation of hepatitis B e antigen (HBeAg)-positive chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2008; 13: 571-579
- 29 Liu KZ, Hou W, Zumbika E, Ni Q. Clinical features of chronic hepatitis B patients with YMDD mutation after lamivudine therapy. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6: 1182-1187
- 30 Lo CM, Liu CL, Lau GK, Chan SC, Ng IO, Fan ST. Liver transplantation for chronic hepatitis B with lamivudine-resistant YMDD mutant using add-on adefovir dipivoxil plus lamivudine. *Liver Transpl* 2005; 11: 807-813
- 31 Hosaka T, Suzuki F, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Someya T, Sezaki H, Akuta N, Tsubota A, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Adefovir dipivoxil for treatment of breakthrough hepatitis caused by lamivudine-resistant mutants of hepatitis B virus. *Intervirology* 2004; 47: 362-369
- 32 Wiegand J, Tischendorf JJ, Nashan B, Klempnauer J, Flemming P, Niemann P, Rohde P, Manns MP, Trautwein C, Tillmann HL. Severe exacerbation of chronic hepatitis B after emergence of lamivudine resistance in a cirrhotic patient: immediate switch to adefovir dipivoxil appears to be indicated. *Z Gastroenterol* 2004; 42: 15-18
- 33 Thabut D, Ratziu V, Bernard-Chabert B, Poynard T, Benhamou Y, Thibault V. Unsuccessful rescue therapy with adefovir dipivoxil for lamivudine resistant HBV in a patient with liver failure. *Gut* 2003; 52: 614
- 34 Kuwahara R, Kumashiro R, Ide T, Koga Y, Hino T, Hisamochi A, Tanaka K, Ogata K, Koga H, Takao Y, Sata M. Predictive factors associated with the progression to hepatic failure caused by lamivudine-resistant HBV. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2999-3006
- 35 Jochum C, Gieseler RK, Gawlista I, Fiedler A, Manca P, Saner FH, Roggendorf M, Gerken G, Canbay A. Hepatitis B-associated acute liver failure: im-

- diate treatment with entecavir inhibits hepatitis B virus replication and potentially its sequelae. *Digestion* 2009; 80: 235-240
- 36 舒欣, 徐启桓, 陈旒, 张卡, 李刚. HBeAg阴性乙型肝炎 ACLF患者的临床特征及抗病毒治疗短期疗效. 中华实验和临床病毒学杂志 2008; 22: 481-483
- 37 Hu JH, Wang HF, He WP, Liu XY, Du N, Huang K, Ding JB, Duan XZ, Chen J, Chen JM. [Lamivudine and entecavir significantly improved the prognosis of early-to-mid stage hepatitis B related acute on chronic liver failure]. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2010; 24: 205-208
- 38 肖光明, 贾卫东, 何凯茵, 谭行华, 雷春亮, 杨湛. 应用 COX比例风险模型分析抗病毒治疗对慢性乙型重型肝炎预后的影响. 实用肝脏病杂志 2009; 12: 190-192
- 39 Chen J, Han JH, Liu C, Yu RH, Li FZ, Li QF, Gong GZ. Short-term entecavir therapy of chronic severe hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 261-266
- 40 宁琴, 武泽光, 韩梅芳. 宿主免疫应答与乙型肝炎重症化. 中华肝脏病杂志 2010; 18: 246-251
- 41 刘国旺, 唐克诚, 李谦, 袁桂玉, 李海. 替比夫定治疗慢性乙型重型肝炎疗效观察. 胃肠病学和肝病学杂志 2008; 17: 662-664
- 42 Ying C, De Clercq E, Nicholson W, Furman P, Neyts J. Inhibition of the replication of the DNA polymerase M550V mutation variant of human hepatitis B virus by adefovir, tenofovir, L-FMAU, DAPD, penciclovir and lobucavir. *J Viral Hepat* 2000; 7: 161-165
- 43 Van Bömmel F, Schernick A, Hopf U, Berg T. Tenofovir disoproxil fumarate exhibits strong antiviral effect in a patient with lamivudine-resistant severe hepatitis B reactivation. *Gastroenterology* 2003; 124: 586-587
- 44 Taltavull TC, Chahri N, Verdura B, Gornals J, Lopez C, Casanova A, Cañas C, Figueras J, Casais LA. Successful treatment with tenofovir in a child C cirrhotic patient with lamivudine-resistant hepatitis B virus awaiting liver transplantation. Post-transplant results. *Transpl Int* 2005; 18: 879-883

#### ■同行评价

本文学术性较好, 比较全面地综述了核苷类抗乙型肝炎病毒药物在乙型重型肝炎中的治疗作用, 为读者提供理论依据.

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 •

### 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)

# TIM4对小鼠食物过敏模型中抗原特异性Th2细胞分化的影响

杨慧敏, 郑鹏远, 刘志强, 李付广, 王新亭

## ■背景资料

过敏性疾病尤其是食物过敏在世界上广泛存在, 最近几十年其发病率在全球范围内显著增高, 然而食物过敏的病因和发病机制尚不清楚。

杨慧敏, 郑鹏远, 刘志强, 王新亭, 郑州大学第二附属医院 消化内科 郑州大学医学微生物生态学研究所 河南省郑州市 450014

李付广, 郑州大学基础医学院微生物与免疫教研室 河南省郑州市 450052

国家自然科学基金资助项目, No. 30772028

作者贡献分布: 杨慧敏与郑鹏远对此文贡献均等; 此课题由杨慧敏与郑鹏远设计; 研究过程由杨慧敏、刘志强及王新亭完成; 研究所用新试剂和分析工具由郑鹏远与李付广提供; 数据分析由杨慧敏完成; 本论文写作由杨慧敏、郑鹏远及刘志强完成。

通讯作者: 郑鹏远, 教授, 主任医师, 博士生导师, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科, 郑州大学医学微生物生态学研究所. medp7123@126.com

电话: 0371-63921467 传真: 0371-63934118

收稿日期: 2010-12-28 修回日期: 2011-03-08

接受日期: 2011-03-16 在线出版日期: 2011-03-28

## TIM4 modulates antigen-specific Th2 cell differentiation in mice with food allergy

Hui-Min Yang, Peng-Yuan Zheng, Zhi-Qiang Liu, Fu-Guang Li, Xin-Ting Wang

Hui-Min Yang, Peng-Yuan Zheng, Zhi-Qiang Liu, Xin-Ting Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Institute of Medical Microecology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Fu-Guang Li, Department of Microbiology and Immunology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772028

Correspondence to: Professor Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Institute of Medical Microecology, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@126.com

Received: 2010-12-28 Revised: 2011-03-08

Accepted: 2011-03-16 Published online: 2011-03-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the modulatory effect of microbial products on the expression of T cell immunoglobulin and mucin domain 4 (TIM4) in dendritic cells (DCs) and to determine the role of TIM4 in modulating CD4<sup>+</sup> T cell activation in allergic response induced by exposure to microbial products.

**METHODS:** Bone marrow-derived DCs were

isolated from Balb/c mice and cultured *in vitro*. Cultured DCs were divided into control group and Staphylococcal enterotoxin B (SEB)-stimulated group. The expression of TIM4 mRNA in different groups of DCs was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of CD11c, MHC-II and CD86 on DCs were measured by flow cytometry. DCs co-cultured with CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro* were divided into five groups: control group, SEB group, OVA group, SEB plus ovalbumin (OVA) group, and anti-TIM4 antibody plus SEB and OVA group. Different sets of DCs were co-cultured for 48 h with CD4<sup>+</sup> T cells that were obtained from the spleen of allergic mice. Levels of interleukin-4 (IL-4) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in culture medium were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** Compared with the control group, the expression of TIM4 mRNA in DCs was increased significantly in the SEB-stimulated group ( $0.941 \pm 0.018$  vs  $0.422 \pm 0.083$ ,  $P < 0.05$ ), and SEB up-regulated the expression of TIM4 in a dose-dependent manner. SEB stimulation also significantly increased the expression of MHC-II and the costimulatory molecule CD86 on DCs compared with control cells (MHC-II:  $76.684\% \pm 3.1803\%$  vs  $52.984\% \pm 3.6026\%$ ,  $P = 0.000$ ; CD86:  $89.746\% \pm 2.113\%$  vs  $67.558\% \pm 0.4341\%$ ,  $P = 0.000$ ). Compared with control DCs co-cultured with CD4<sup>+</sup> T cells, the level of IL-4 in culture medium increased significantly ( $295.834 \pm 20.408$  vs  $78.335 \pm 13.109$ ,  $P < 0.05$ ) and that of IFN- $\gamma$  decreased significantly ( $362.109 \pm 92.271$  vs  $761.897 \pm 102.967$ ,  $P < 0.05$ ) in the SEB plus OVA group. The levels of IL-4 and IFN- $\gamma$  in the SEB group and OVA group showed no significant differences with those in the control group. In contrast, the expression level of IL-4 was significantly lower and that of IFN- $\gamma$  was significantly higher in the anti-TIM4 antibody group than in the SEB plus OVA group ( $P < 0.05$ ). The levels of IL-4 and IFN- $\gamma$  in the anti-TIM4 antibody group showed no significant differences with those in the control group, SEB group and OVA group

## ■同行评议者

刘占举, 教授, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科

(90.511 ± 15.500 vs 295.834 ± 20.408; 807.734 ± 95.436 vs 362.109 ± 92.271, both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** TIM4 is involved in the pathogenesis of food allergy induced by concurrent exposure to microbial products and food antigen. Inhibition of TIM4 expression can significantly inhibit Th2 cell polarization, effectively correct Th1/Th2 imbalance and thereby prevent the development of allergic reaction.

**Key Words:** TIM protein; Dendritic cell; Th2 cell; Food allergy; Staphylococcal enterotoxin B; Ovalbumin

Yang HM, Zheng PY, Liu ZQ, Li FG, Wang XT. TIM4 modulates antigen-specific Th2 cell differentiation in mice with food allergy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 940-945

## 摘要

**目的:** 研究微生物产物对树突状细胞(dendritic cell, DC)和TIM4的作用, 探讨在微生物产物参与的食物过敏(food allergy, FA)中TIM4对CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞分化的影响。

**方法:** 培养Balb/c小鼠骨髓来源的树突状细胞(bone marrow-derived DC, BMDC), 培养的DC分为两组: 金黄色葡萄球菌肠毒素B(SEB)刺激组和空白对照组, RT-PCR检测不同组DC的TIM4 mRNA表达; 流式细胞仪检测DC表面CD11c、MHC-II、CD86的表达。在DC和CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞共同培养中将培养的DC分为5组: 空白对照组、SEB+卵清蛋白(OVA)组、SEB组、OVA组及TIM4组, 同时取过敏模型小鼠脾脏CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞, 不同组的DC与CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞共同培养, ELISA法测定混合培养细胞上清液IL-4与IFN- $\gamma$ 的表达。

**结果:** 与空白对照组相比, SEB组DC TIM4 mRNA表达明显增高(0.941 ± 0.018 vs 0.422 ± 0.083,  $P < 0.05$ ), 并具有剂量依从性。SEB组DC表面分子MHC-II、CD86表达明显高于空白对照组(MHC-II: 76.684% ± 3.1803% vs 52.984% ± 3.6026%; CD86: 89.746% ± 2.113% vs 67.558% ± 0.4341%, 均 $P = 0.000$ )。DC和CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞共同培养中, 相比空白对照组, SEB+OVA组IL-4表达显著增高(295.834 ± 20.408 vs 78.335 ± 13.109,  $P < 0.05$ ), 而IFN- $\gamma$ 的表达明显减少(362.109 ± 92.271 vs 761.897 ± 102.967,  $P < 0.05$ ); 单独的SEB组或OVA组IL-4和IFN- $\gamma$ 与空白对照组无明显差异; TIM4组中IL-4的表达水平较SEB+OVA组明显降低,

而IFN- $\gamma$ 的表达明显增高(90.511 ± 15.500 vs 295.834 ± 20.408; 807.734 ± 95.436 vs 362.109 ± 92.271, 均 $P < 0.05$ )。

**结论:** 微生物产物和食物抗原共同作用导致FA, TIM4参与FA的发生。消除TIM4的表达可明显抑制Th2细胞分化, 有效纠正Th1/Th2细胞失衡, 可阻止过敏性免疫反应。

**关键词:** TIM蛋白; 树突状细胞; Th2细胞; 食物过敏; 金黄色葡萄球菌肠毒素B; 卵清蛋白

杨慧敏, 郑鹏远, 刘志强, 李付广, 王新亭. TIM4对小鼠食物过敏模型中抗原特异性Th2细胞分化的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(9): 940-945

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/940.asp>

## 0 引言

随着新型抗生素和疫苗的发展及其在临床上的应用, 治疗感染性疾病已取得巨大成功, 但在过去的几十年中, 过敏性疾病却呈现出明显上升趋势<sup>[1]</sup>, 大约15%-20%的人对外源抗原产生IgE介导的过敏反应<sup>[2]</sup>。近年虽然过敏性疾病成为研究热点且已有较多的研究<sup>[3]</sup>, 但是过敏性疾病的发病机制及病因学仍不清楚, 其治疗方法有限且效果不佳。一般认为树突状细胞(dendritic cell, DC)和Th2细胞是过敏免疫反应中的关键细胞。DC是机体内功能最强的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC), 也是唯一能激活初始T淋巴细胞的APC, DC捕获和加工外源性抗原, 并递呈抗原信息给T淋巴细胞<sup>[4]</sup>, 激活T淋巴细胞介导的免疫反应<sup>[5,6]</sup>。不成熟的DC刺激初始T淋巴细胞增殖、分化的能力弱, 成熟的DC高表达MHC-I/II类分子, 共刺激分子如CD80和CD86等协助抗原信息递呈过程, 有效活化T淋巴细胞<sup>[7]</sup>。初始CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞被激活后分化为Th1、Th2或Treg细胞, Th1细胞释放1型细胞因子如IFN- $\gamma$ 、Th2细胞主要释放IL-4、IL-5和IL-13。而IL-4和IL-13可诱导B淋巴细胞产生抗原特异性IgE, 产生一系列致敏反应<sup>[8,9]</sup>, 再暴露于特异性抗原后, IgE激活肥大细胞释放致敏物质促发超敏反应和产生过敏临床症状。最近发现的T淋巴细胞免疫球蛋白与黏蛋白域蛋白(T cell immunoglobulin and mucin domains, TIMs)基因家族是一组新的细胞表面蛋白家族。已发现TIMs基因家族在小鼠中包括8个成员(TIMs 1-8)和在人类中3个成员(TIM1、3、4)<sup>[10-12]</sup>。最近密切关注他们在过敏性疾病和自身免疫性疾病中重要的调节作用<sup>[13]</sup>。

## ■ 研发前沿

最近研究发现TIM4在Th2极化和过敏疾病中具有重要的作用, 成为研究热点。

## ■ 相关报道

Yang等研究表明在小鼠肠道TIM4与TIM1相互作用能促进Th2细胞分化,在食物过敏中发挥重要作用,应用相应抗体干预则能改善肠道症状。Rodriguez-Manzanet等体外研究显示,外周DC中TIM4蛋白的表达与自身免疫性疾病的严重程度相关,TIM4结合TIM1导致TIM1磷酸化,同时促进细胞分裂和诱导信号使细胞避免凋亡性死亡来导致T淋巴细胞的扩增,提示TIM4能调节T淋巴细胞免疫反应。

其中TIM4表达于APC,尤其是成熟的DC,TIM1表达于T淋巴细胞,特别是Th2细胞,近来发现他们是Th2细胞重要的调节因子<sup>[13,14]</sup>。体外研究<sup>[15]</sup>显示DC中TIM4蛋白的表达与自身免疫性疾病的严重程度正相关,TIM4结合TIM1共同促进T淋巴细胞的扩增,且提示TIM4可能作为一个新的分子机制来调节T淋巴细胞反应。我们前期研究<sup>[16]</sup>显示,在过敏小鼠中存在Treg细胞功能不全,TIM4与TIM1的相互作用可降低Treg细胞的功能及状态,破坏免疫耐受平衡。但是TIM4对食物抗原特异性Th2细胞分化的影响性研究甚少,体外实验证据不多,其机制仍需进一步研究。我们推测微生物产物和食物抗原共同作用导致食物过敏(food allergy, FA),其中TIM4与TIM1的相互作用可能导致Th1/Th2细胞失衡和免疫耐受的打破,是引起FA的关键。本研究是通过体外培养骨髓来源的DC(bone marrow-derived DC, BMDC),与CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞共同培养来研究微生物产物和食物抗原对CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞的影响,并应用TIM4抗体干预,探讨TIM4在FA中的作用,从而进一步了解食物过敏发生的分子机制,并为临床治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c小鼠购于河南省实验动物中心。卵清蛋白(ovalbumin, OVA, Sigma公司)。黄色葡萄球菌肠毒素B(staphylococcus aureus enterotoxin B, SEB)(郑州大学生物工程系)。RPMI 1640完全培养基由: RPMI 1640培养液(Gibco公司), HEPES  $2 \times 10^{-2}$  mol/L、L-谷氨酰胺  $2 \times 10^{-3}$  mol/L、青霉素100 kU/L、链霉素0.1 g/L和100 mL/L胎牛血清(Gibco公司)构成。重组小鼠GM-CSF(rmGM-CSF)、重组小鼠IL-4(rm IL-4)(Peprotech公司产品)。FITC-抗小鼠CD11c、PE-抗小鼠CD86、PE-抗小鼠MHC-II(均购自美国BioLegend公司)。CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit(Miltenyi Biotec)。TIM4抗体(美国RD公司)。小鼠IL-4、IFN- $\gamma$  ELISA定量试剂盒(武汉博士德生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠BMDC细胞的分离培养: 取Balb/c小鼠,颈椎脱臼法处死,浸入750 mL/L乙醇中3-5 min,无菌取出股骨和胫骨,用灭菌注射器抽取Hanks液,将针头从两端插入骨髓腔,反复冲洗出骨髓,收入离心管中,以1 800 r/min离心10 min,弃上清,加入37 °C预温的红细胞裂解液,室

温2-3 min,离心洗涤后,用RPMI 1640完全培养液调整细胞浓度为 $2 \times 10^8$ /L,接种于6孔培养板,每孔4 mL,加入细胞因子rmGM-CSF、rmIL-4各10  $\mu$ g/L,置于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养,48 h后全量换液,之后隔天半量换液。

1.2.2 小鼠过敏模型的制造: 按照文献[17]方法进行造模,第0天、第3天、第9天使用10  $\mu$ g SEB及20  $\mu$ g OVA无菌生理盐水溶液0.2 mL腹腔注射进行基础致敏,第7天、第14天使用10  $\mu$ g SEB及20  $\mu$ g OVA无菌生理盐水溶液0.2 mL对小鼠进行灌胃激发。

1.2.3 DC细胞和CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞的共培养: 培养第5天的DC分为5组: SEB组(加入SEB 200  $\mu$ g/L)、OVA组(加入OVA 20 mg/L)、SEB+OVA组(加入SEB 200  $\mu$ g/L和OVA 20 mg/L)、TIM4组(加入SEB+OVA+TIM4抗体 5 mg/L)、空白对照组(不加任何刺激物质),培养48 h后,收集悬浮及半贴壁细胞离心, RPMI 1640洗3次,调整细胞浓度为 $2 \times 10^8$ /L备用。致敏Balb/c小鼠无菌开腹取脾脏,清洗、剪碎、研磨,红细胞裂解液去红细胞,制成细胞悬液,用小鼠CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞磁珠纯化试剂盒收集CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞,调整细胞浓度至 $2 \times 10^9$ /L备用,取不同组DC和CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞各0.1 mL混合培养48 h,收集上清液冻存待测。

1.2.4 流式细胞仪测定DC表面分子: 培养的DC第5天加入SEB 200  $\mu$ g/L,收集第7天的DC,分为两组: 空白对照组和SEB刺激组,经PBS洗涤2次,调整细胞浓度至 $1 \times 10^9$ /L。将FITC-抗鼠CD11c 0.2  $\mu$ L、PE-抗鼠CD86 0.25  $\mu$ L、PE-抗鼠MHC-II 0.25  $\mu$ L,加入流式样管底部,加入500  $\mu$ L细胞悬液混匀,避光静置30 min后,1 mL PBS洗涤2次,500  $\mu$ L PBS重悬细胞上机检测。

1.2.5 RT-PCR检测TIM4 mRNA表达: 收集第7天的DC,分为3组: SEB刺激组(SEB 200  $\mu$ g/L培养48 h)、小剂量SEB刺激组(SEB 50  $\mu$ g/L培养48 h)及空白对照组。按TRIzol法提取总RNA,按试剂盒说明进行cDNA合成和PCR扩增,TIM4引物(上游: 5'-GGGAGGGATGATGAAGACG-3',下游: 5'-TAAGGCACGAGGCAGGGA-3', 63 °C,扩增产物217 bp)、 $\beta$ -actin(上游: 5'-CCGTA-AAGACCTCTATGCCAACA-3',下游: 5'-GTC-GCCTTACCGTTCCA-3', 58 °C,扩增产物475 bp),PCR产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳,以DNA Marker标记确定条带大小。凝胶扫描成像分析系统进行摄像后,并对凝胶条带灰度信号强度半定量分析。

表1 不同组DC和CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞混合培养上清液中IL-4和IFN- $\gamma$ 的浓度 ( $n = 5$ , mean  $\pm$  SD, ng/L)

分组	IL-4	IFN- $\gamma$
空白对照组	78.335 $\pm$ 13.109 <sup>a</sup>	761.897 $\pm$ 102.967 <sup>a</sup>
SEB+OVA组	295.834 $\pm$ 20.408	362.109 $\pm$ 92.271
SEB组	81.893 $\pm$ 8.978 <sup>a</sup>	835.366 $\pm$ 124.852 <sup>a</sup>
OVA组	89.000 $\pm$ 11.297 <sup>a</sup>	672.513 $\pm$ 69.938 <sup>a</sup>
TIM4组	90.511 $\pm$ 15.500 <sup>a</sup>	807.734 $\pm$ 95.436 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs SEB+OVA组.

1.2.6 CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞分泌Th细胞因子的检测: 使用ELISA试剂盒按操作说明检测各组DC和CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞混合培养上清液中的IL-4、IFN- $\gamma$ 表达水平.

**统计学处理** 结果以mean  $\pm$  SD表示, 实验结果采用SPSS13.0统计软件包分析, 组间均数比较选用单因素方差分析, 采用 $\alpha = 0.05$ 为假设检验标准.

## 2 结果

2.1 SEB刺激促进DC表达TIM4 BMDC未受刺激时仅能微量表达TIM4 mRNA, 与空白对照组相比, SEB刺激组TIM4 mRNA表达显著增加(0.941  $\pm$  0.018 vs 0.422  $\pm$  0.083,  $P < 0.05$ ), 为进一步研究SEB对TIM4的刺激作用, 我们另设一组小剂量SEB(50  $\mu$ g/L), 结果提示SEB刺激TIM4表达增加具有剂量依从性(图1).

2.2 DC表面分子的检测 培养的DC表面特异性分子CD11c在各检测组都达80%以上, SEB刺激组DC表面分子MHC-II、CD86表达明显高于空白对照组(MHC-II: 76.684%  $\pm$  3.1803% vs 52.984%  $\pm$  3.6026%,  $P = 0.000$ ; CD86: 89.746%  $\pm$  2.113% vs 67.558%  $\pm$  0.4341%,  $P = 0.000$ , 图2).

2.3 混合培养上清液细胞因子测定 SEB+OVA组的平均IL-4与空白对照组、SEB组和OVA组比较明显增加, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$ ), 而SEB+OVA组的平均IFN- $\gamma$ 水平较空白对照组、SEB组和OVA组明显减少, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$ ); SEB组或OVA组IL-4和IFN- $\gamma$ 与空白对照组均无明显差异; TIM4组中IL-4的表达水平较SEB+OVA组明显降低( $P < 0.05$ ), 而IFN- $\gamma$ 的表达明显增高( $P < 0.05$ ), 与空白对照组、SEB组和OVA组相比, IL-4和IFN- $\gamma$ 的表达无统计学差异(表1).

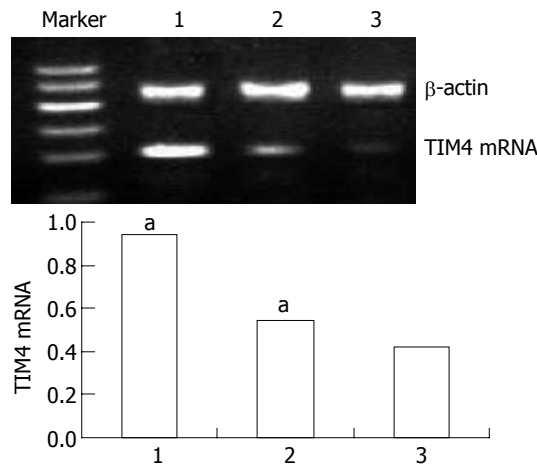


图1 SEB刺激DC 48 h后TIM4 mRNA表达. 1: SEB(200  $\mu$ g/L)刺激组; 2: 小剂量SEB(50  $\mu$ g/L)刺激组; 3: 空白对照组; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组.

## 3 讨论

FA和相关疾病在世界上广泛存在, 但其发病机制仍不清楚. 一般认为Th2细胞的极化、DC的激活、调节性T淋巴细胞、微生物产物及食物蛋白等参与FA的发生发展<sup>[17,18]</sup>. 表达于免疫细胞的TIMs基因家族在调节Th1和Th2细胞介导的免疫应答中展现了重要的作用, 为我们提供一个崭新的研究视角. 最近研究<sup>[19]</sup>证实在变应性鼻炎患者(allergic rhinitis, AR)外周血中存在Th2细胞的极化和TIM1的表达增加, 体外培养Th2细胞出现TIM1表达快速的衰变, 而加入TIM4能稳定TIM1的表达, 说明DC来源的TIM4能结合TIM1维持TIM1在一个稳定的状态, 然后共同作用促进Th2细胞的极化. 另外有研究显示表达于APC的TIM4特异性识别表达于凋亡细胞的磷脂酰丝氨酸, 在清除凋亡细胞过程中发挥作用<sup>[20,21]</sup>, 且发现肝脏中表达于巨噬细胞的TIM4过量表达, 抑制伴刀豆球蛋白A介导的肝炎<sup>[22]</sup>. 可见, TIM4的作用和产生机制比较复杂, 尚需大量的研究阐明.

越来越多的临床证据证实, 致病性微生物的感染及其毒素参与过敏性疾病的发生, 许多文献<sup>[23]</sup>提示, SEB与过敏性疾病的发病有关, 我们前期研究也发现, SEB在小鼠FA反应中发挥重要作用<sup>[24]</sup>, 因而SEB被用作有代表性的微生物产物, 作为佐剂应用于FA动物模型中, 但是其参与FA的分子机制知之甚少. DC作为最强的APC, 在固有免疫尤其是适应性免疫反应中发挥关键作用, 因此暴露于微生物产物, 如SEB的DC自身会产生什么反应是我们的研究内容之一. 一般认为启动CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞免疫反应, 需要DC上

### ■创新盘点

本文通过体外培养系统研究微生物产物对DC及其表面跨膜蛋白TIM4的作用, 明确TIM4对CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞分化的作用, 探讨食物过敏发生的病因学和分子机制.

### ■应用要点

本研究结果显示, 微生物产物和食物抗原共同导致食物过敏(FA)的产生, 其中TIM4能促进Th2细胞分化, TIM4的激活对FA的发生至关重要. 应用TIM4抗体, 可以维持Th1/Th2细胞平衡. 提示我们阻断TIM4的免疫学作用, 可预防和阻止FA的发生, 为临床治疗提供理论依据.

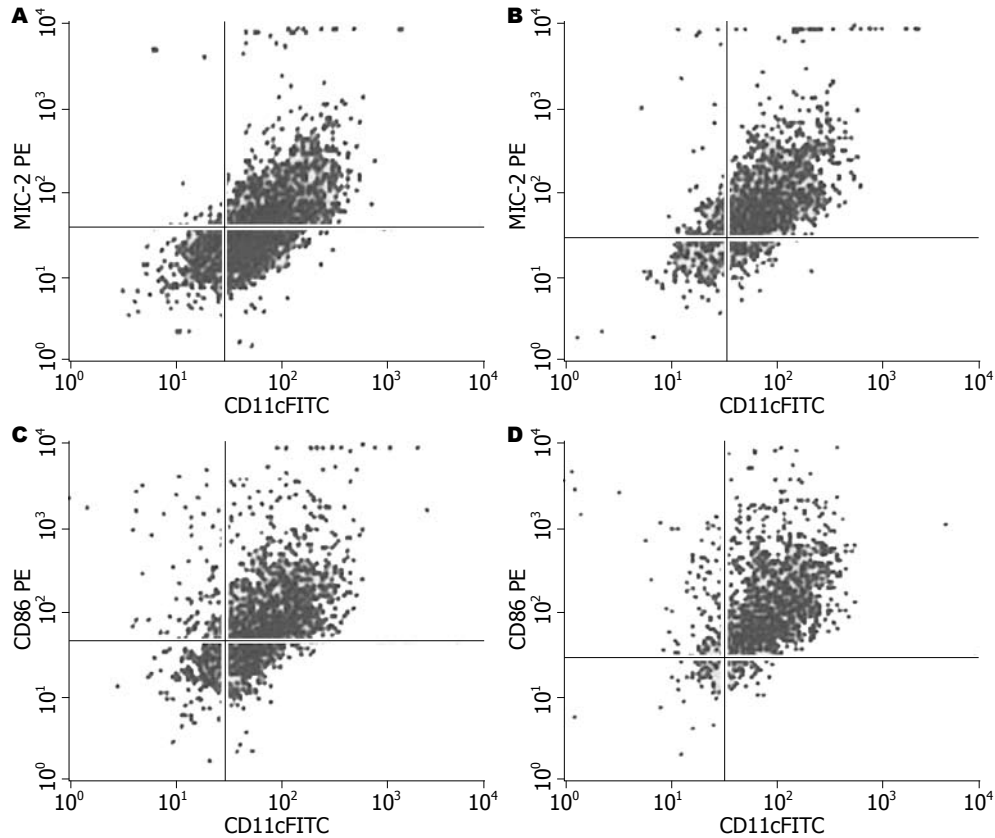


图2 SEB刺激组及空白对照组DC表面MHC-II和CD86的表达. A, C: 空白对照组DC; B, D: SEB刺激组DC. A, B: MHC-II; C, D: CD86.

MHC-II和共刺激分子如CD80、CD86等, 作为不同信号通路协同促进免疫应答<sup>[25]</sup>. 本研究显示SEB刺激DC导致其表面MHC-II和CD86表达增高, 促进DC的成熟.

有研究<sup>[26]</sup>报道, 应用霍乱毒素(cholera toxin, CT)刺激DC能导致TIM4表达增加, CT和花生萃取物(peanut extract, PE)刺激培养的DC, 过继转移到正常小鼠体内, 口服PE抗原激发后能引起肠道Th2细胞的极化和过敏反应. 本研究显示体外培养的BMDC微量表达TIM4, SEB刺激后, TIM4的表达显著增加, 且具有剂量依从性. 另外研究显示仅在SEB或OVA单独条件下DC和CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞共同培养均不能导致Th2细胞的极化, 而只有同时存在SEB和OVA条件下, 才导致OVA特异性Th2细胞的极化, 表现为与空白对照组相比, IL-4分泌显著增高. 而IFN- $\gamma$ 分泌减少, 应用TIM4抗体共同培养能阻止Th2细胞的极化, 说明TIM4在Th2细胞极化反应中发挥重要作用. 当然微生物及微生物产物种类很多, 除了SEB的其他微生物产物是否也有这样的作用, 值得进一步探讨.

总之, 本实验中证实在SEB和OVA共存条件下, DC与CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞共同培养, 导致CD4<sup>+</sup> T向Th2方向分化增殖, 单独的SEB或OVA不能导

致Th2细胞分化, TIM4作为重要的分子参与这一过程, 应用相应抗体可抑制SEB和OVA对CD4<sup>+</sup> T向Th2分化的作用. 表明在FA中, TIM4对Th2细胞的分化起着重要作用, TIM4表达增加能促进Th2型细胞因子的分泌, 进而在体内产生一系列的过敏反应和临床症状. 阻断TIM4信号传导, 可以有效纠正Th1/Th2细胞失衡, 阻止过敏性免疫反应, 改善相应过敏症状.

### 4 参考文献

- 1 Herz U, Petschow B. Perinatal events affecting the onset of allergic diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 523-529
- 2 Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006; 355: 2226-2235
- 3 Tournoy KG, Provoost S, Van Hove C, Joos G. The role of immune tolerance in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006; 6: 437-443
- 4 Meraner P, Horejsi V, Wolpl A, Fischer GF, Stingl G, Maurer D. Dendritic cells sensitize TCRs through self-MHC-mediated Src family kinase activation. *J Immunol* 2007; 178: 2262-2271
- 5 Gatti E, Pierre P. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 468-473
- 6 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
- 7 Inaba K, Inaba M. Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *Int J Hematol* 2005; 81:

- 181-187
- 8 Webb RA, Hoque T, Dimas S. Expulsion of the gastrointestinal cestode, *Hymenolepis diminuta* by tolerant rats: evidence for mediation by a Th2 type immune enhanced goblet cell hyperplasia, increased mucin production and secretion. *Parasite Immunol* 2007; 29: 11-21
  - 9 Verdú EF, Bercík P, Bergonzelli GE, Huang XX, Blennerhasset P, Rochat F, Fiaux M, Mansourian R, Corthésy-Theulaz I, Collins SM. *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 2004; 127: 826-837
  - 10 Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 454-462
  - 11 McIntire JJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 25: 335-348
  - 12 Kuchroo VK, Meyers JH, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM family of genes in immunity and tolerance. *Adv Immunol* 2006; 91: 227-249
  - 13 Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, Kenny J, Zheng XX, Umetsu DT, DeKruyff RH, Strom TB, Kuchroo VK. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol* 2005; 6: 455-464
  - 14 Umetsu SE, Lee WL, McIntire JJ, Downey L, Sanjanwala B, Akbari O, Berry GJ, Nagumo H, Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2005; 6: 447-454
  - 15 Rodriguez-Manzanet R, Meyers JH, Balasubramanian S, Slavik J, Kassam N, Dardalhon V, Greenfield EA, Anderson AC, Sobel RA, Hafler DA, Strom TB, Kuchroo VK. TIM-4 expressed on APCs induces T cell expansion and survival. *J Immunol* 2008; 180: 4706-4713
  - 16 王新亭, 郑鹏远, 罗予, 刘志强, 张利利. TIM1与TIM4对小鼠食物过敏模型中CD4+CD25+调节性T淋巴细胞功能的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3507-3513
  - 17 Yang PC, Xing Z, Berin CM, Soderholm JD, Feng BS, Wu L, Yeh C. TIM-4 expressed by mucosal dendritic cells plays a critical role in food antigen-specific Th2 differentiation and intestinal allergy. *Gastroenterology* 2007; 133: 1522-1533
  - 18 Mandron M, Ariès MF, Brehm RD, Tranter HS, Acharya KR, Charveron M, Davrinche C. Human dendritic cells conditioned with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B promote TH2 cell polarization. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1141-1147
  - 19 Zhao CQ, Li TL, He SH, Chen X, An YF, Wu WK, Zhou XH, Li P, Yang PC. Specific immunotherapy suppresses Th2 responses via modulating TIM1/TIM4 interaction on dendritic cells. *Allergy* 2010; 65: 986-995
  - 20 Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 2007; 450: 435-439
  - 21 Kobayashi N, Karisola P, Peña-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, Butte MJ, Nagumo H, Chernova I, Zhu B, Sharpe AH, Ito S, Dranoff G, Kaplan GG, Casanovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 2007; 27: 927-940
  - 22 Xu L, Qi J, Zhao P, Liang X, Ju Y, Liu P, Liu B, Guo C, Zhang L, Ma C, Gao L. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-4 attenuates concanavalin A-induced hepatitis by regulating macrophage. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 329-336
  - 23 Kedzierska A, Kaszuba-Zwoińska J, Słodowska-Hajduk Z, Kapińska-Mrowiecka M, Czubak M, Thor P, Wójcik K, Pryjma J. SEB-induced T cell apoptosis in atopic patients--correlation to clinical status and skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53: 63-70
  - 24 Liu T, Wang BQ, Zheng PY, He SH, Yang PC. Rhinosinusitis derived *Staphylococcal enterotoxin B* plays a possible role in pathogenesis of food allergy. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 24
  - 25 Dai SY, Nakagawa R, Itoh A, Murakami H, Kashio Y, Abe H, Katoh S, Kontani K, Kihara M, Zhang SL, Hata T, Nakamura T, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2005; 175: 2974-2981
  - 26 Feng BS, Chen X, He SH, Zheng PY, Foster J, Xing Z, Bienenstock J, Yang PC. Disruption of T-cell immunoglobulin and mucin domain molecule (TIM)-1/TIM4 interaction as a therapeutic strategy in a dendritic cell-induced peanut allergy model. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 55-61, 61.e1-e7

#### ■同行评价

本文设计合理, 数据可靠, 具有较高的理论价值和潜在的临床意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》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)



## 环境及居民体内钼含量与胃癌的相关性

肖景榕, 周衍, 陈增春, 陈伯扬, 陈华英, 林才浩, 应敏刚

### ■背景资料

胃癌是我国一种常见的恶性肿瘤, 发病表现出明显的地区差异, 其发病过程较复杂, 是环境与遗传因素共同作用的结果。

肖景榕, 周衍, 陈增春, 应敏刚, 福建省肿瘤医院 福建省福州市 350014

陈伯扬, 陈华英, 林才浩, 福建省地质调查设计院 福建省福州市 350014

作者贡献分布: 应敏刚与肖景榕对此文所作贡献均等; 此课题由应敏刚、陈增春及肖景榕设计; 研究过程由应敏刚、肖景榕、陈增春、周衍、陈伯扬、陈华英及林才浩完成; 数据分析由肖景榕与周衍完成; 本论文写作由肖景榕、周衍及应敏刚完成。

通讯作者: 应敏刚, 教授, 350014, 福建省福州市, 福建省肿瘤医院. yingmg@163.com

收稿日期: 2010-12-29 修回日期: 2011-02-26

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-03-28

### Association between environmental molybdenum levels and risk of gastric cancer

Jing-Rong Xiao, Yan Zhou, Zeng-Chun Chen, Bo-Yang Chen, Hua-Ying Chen, Cai-Hao Lin, Min-Gang Ying

Jing-Rong Xiao, Yan Zhou, Zeng-Chun Chen, Min-Gang Ying, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian Province, China

Bo-Yang Chen, Hua-Ying Chen, Cai-Hao Lin, Fujian Institute of Geological Survey, Fuzhou 350011, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Min-Gang Ying, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian Province, China. yingmg@163.com

Received: 2010-12-29 Revised: 2011-02-26

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-03-28

### Abstract

**AIM:** To explore the association between molybdenum levels and risk of gastric cancer by comparing environmental molybdenum levels between a high and a low incidence area of gastric cancer.

**METHODS:** Samples of soil, earth, paddy, surface water, drinking water, and hair, serum and urine of residents were collected from a high and a low incidence area of gastric cancer. Atomic emission spectrometry and oscillopolarography were applied to detect the contents of molybdenum in the above samples. Nonparametric rank sum test was used for statistical analysis.

**RESULTS:** There is a significant difference in environmental molybdenum content between

the high and low incidence areas of gastric cancer ( $P < 0.01$ ). The median molybdenum contents in soil, bottom mud and rice were significantly higher in the low than in the high incidence area of gastric cancer (2.57 mg/kg vs 0.50 mg/kg, 3.53 mg/kg vs 0.71 mg/kg, 1.04 mg/kg vs 0.54 mg/kg, all  $P < 0.01$ ). The median molybdenum contents in soil and low mud in the low incidence area of gastric cancer were five times as high as those in the high incidence area. The molybdenum contents in the hair, serum and urine of residents in the low incidence area were significantly higher than those in the high incidence area (0.11 mg/kg vs 0.05 mg/kg, 8.42  $\mu\text{g/L}$  vs 3.17  $\mu\text{g/L}$ , 0.13 mg/L vs 0.04 mg/L, all  $P < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** High incidence of gastric cancer is probably related to insufficient intake of molybdenum.

**Key Words:** Gastric cancer; Molybdenum; Environment

Xiao JR, Zhou Y, Chen ZC, Chen BY, Chen HY, Lin CH, Ying MG. Association between environmental molybdenum levels and risk of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 946-949

### 摘要

**目的:** 研究微量元素钼与胃癌的关系。

**方法:** 采集胃癌高、低发区土壤、底泥、地表水、饮用水、水稻、健康人群的头发的血清和尿液样品, 采用等离子体原子发射光谱法(AES)和极普法(POL)等方法检测样品中钼含量, 采用非参数秩和检验对数据进行统计分析。

**结果:** 胃癌高、低发区环境及居民体内钼含量存在差异, 低发区土壤、底泥、水稻中的钼含量中位数分别为2.57 mg/kg、3.53 mg/kg和1.04 mg/kg, 均显著高于高发区的0.50 mg/kg、0.71 mg/kg和0.54 mg/kg(均 $P < 0.01$ ), 土壤和底泥样品检测值中位数是高发区的近5倍, 低发区常住居民的头发的血清和尿液中钼含量分别为0.11 mg/kg、8.42  $\mu\text{g/L}$ 和0.13 mg/L, 均显著高于高发区的0.05 mg/kg、3.17  $\mu\text{g/L}$ 和0.04 mg/L(均 $P < 0.001$ )。

### ■同行评议者

田文静, 副教授, 哈尔滨医科大学公共卫生学院

**结论:** 微量元素钼通过食物链进入人体, 胃癌高发可能与人体摄入钼不足有关。

**关键词:** 胃癌; 钼; 环境

肖景榕, 周衍, 陈增春, 陈伯扬, 陈华英, 林才浩, 应敏刚. 环境及居民体内钼含量与胃癌的相关性. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 946-949

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/946.asp>

## 0 引言

钼是人体必需微量元素之一, 在体内参与构成黄嘌呤氧化酶、醛氧化酶等几种重要酶的辅助因子, 在生理代谢中起重要作用. 胃癌是我国常见的一种恶性肿瘤, 其发病过程较为复杂, 与幽门螺杆菌、饮食习惯、营养和化学致癌物密切相关, 是环境与遗传因素共同作用的结果. 近年来微量元素与胃癌发生的相关性引起许多学者的重视, 钼是其中较为引人关注的一种微量元素. 福建省长乐市和福安市分别属胃癌的高、低发区, 死亡率相差近九倍(长乐市胃癌标化死亡率为58.3/10万, 福安市胃癌标化死亡率为6.46/10万), 我们通过检测两地土壤、底泥、地表水、饮用水、稻米、健康人群的头发、血清和尿液样品中钼含量, 研究微量元素钼与胃癌的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 长乐市的采样点设在文岭乡, 福安市采样点在下白石镇. 两采样点为地形、生活环境相似的沿海地区, 将当地50-65岁的常住健康居民作为研究对象. 长乐市103人, 其中男73人, 女30人, 平均年龄 $56.47 \pm 4.78$ 岁; 福安市102人, 其中男67人, 女35人, 平均年龄 $58.75 \pm 3.78$ 岁, 抽样人群具有可比性.

### 1.2 方法

**1.2.1 土壤、底泥样品采集及检测:** 土壤采样点布置在农田、菜地, 避开明显点状污染地段、垃圾堆及新近堆积土等, 在采样点周围多处(3-5处)采集合并为一个样品, 垂直采集地表至40 cm深的土壤, 土壤样品原始质量 $>1$  kg, 样品中弃去动、植物残留体、砾石、肥料团块等. 底泥采样点选择在非饮用水采集点附近, 样品采集时避开明显人为点状污染地段, 样品原始质量约1 kg. 样品经预处理后采用等离子体原子发射光谱法检测.

**1.2.2 地表水、饮用水样品采集及检测:** 地表水采样点布设在有代表性河沟及水塘中, 饮用水

表 1 分析方法准确度和精密度

	推荐值	平均值	RE(%)	RSD(%)
人发(GBW07601)	0.073	0.074	1.4	3.3
牛血清(GBW09131)	13	12.7	-2.3	4.7

采样布设在饮用人口多的水井及集中供水水源(水厂). 采集均采用瞬时采样法, 采样时尽量轻扰动水体, 取样前先用待取水洗涤装样瓶和塞子3-5次, 然后把取样瓶沉入水下30 cm深处取样. 水样经预处理后采用极普法检测.

**1.2.3 水稻样品采集及检测:** 在产量大的地方采集, 采用对角线方法选取4-5个样点, 四周样点要距地边1米以上, 个别样点如缺乏代表性应作适当调整, 每个样点取50 cm $\times$ (播幅+幅距)cm的样方一个. 样品经预处理后采用极普法检测.

**1.2.4 头发、血清和尿液的采集及检测:** 用不锈钢剪刀剪取受检者后枕部头发2 g, 去离子水清洗干净风干后封入塑料袋中待检. 用无污染的一次性塑料注射器抽取空腹静脉血5 mL, 注入干燥具塞的聚丙烯试管中, 在常温下垂直放置1 h使凝固, 以3 000 r/min离心10 min, 用移液器分离出血清, 转入另一聚丙烯血清管中加盖, 贮于-20 $^{\circ}$ C低温冰箱中待检. 用清洁的塑料容器取晨尿, 放置15 min澄清后, 倒入无污染的聚乙烯的尿样杯中加盖, 贮于-20 $^{\circ}$ C低温冰箱中待检. 采用原子荧光光谱法检测.

**1.2.5 分析技术质量控制:** 石检测按中国地质调查局的《生态地球化学评价样品分析指南》(简称指南)和《DD2005-01规范》样品技术及质量监控的要求执行. 样品检测准确度要求相对误差(relative error, RE) $\leq 30\%$ , 精密度要求相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) $\leq 30\%$ .

**统计学处理** 将所有资料输入计算机, 运用SPSS14.0统计软件进行分析. 由于数据分布呈偏态, 采用中位数(M)及四分位数( $P_{25}$ 、 $P_{75}$ )表示数据, 两地资料比较采用非参数秩和检验.

## 2 结果

**2.1 分析技术质量控制情况** 检测系统对人发(GBW07601)和牛血清(GBW09131)检测结果显示RE分别为1.4%和-2.3%, RSD分别为3.3%和4.7%, 方法的准确度和精密度均优于《指南》的要求. 除地表水和饮用水外, 其他样品报出率均为100%(表1).

**2.2 各种样品中钼含量** 长乐市和福安市地

### ■ 相关报道

吴磊等对江西省85个县、市的土壤有效态钼含量及胃癌患者的头发与血清中钼含量的测定及分析, 结果显示, 土壤有效钼与胃癌死亡率呈负相关( $r = -0.285, P < 0.01$ ), 胃癌患者发钼含量低于健康对照( $P < 0.01$ ), 血清钼亦低于对照( $P < 0.05$ ).

### ■ 创新盘点

本研究从环境(包括土壤、底泥、地表水)、食物(水稻)及人体(头发、血清、尿液)各方面对微量元素钼与胃癌的相关性进行研究, 探索环境中钼含量对人体的影响及其与胃癌发生的相关性.

### 应用要点

本研究表明,胃癌高、低发区环境及居民体内的钼含量存在明显差异,胃癌高发地区的环境及居民体内的钼含量均低于胃癌低发地区,为进一步深入研究提供了有价值的线索。

表 2 长乐、福安两地环境及人体中钼含量比较

样品	长乐市				福安市				P值
	n	P <sub>25</sub>	M	P <sub>75</sub>	n	P <sub>25</sub>	M	P <sub>75</sub>	
土壤(mg/kg)	45	0.47	0.50	0.62	30	1.56	2.57	4.18	<0.001
底泥(mg/kg)	15	0.49	0.71	1.36	10	2.51	3.53	6.40	0.003
地表水(μg/L)	15	1.00	1.00	2.00	10	-	-	-	
饮用水(μg/L)	45	0.50	1.00	1.50	30	-	-	-	
水稻(mg/kg)	12	0.38	0.54	0.78	11	0.45	1.04	1.43	0.031
头发(μg/g)	103	0.05	0.05	0.07	102	0.09	0.11	0.14	<0.001
血清(μg/L)	103	2.61	3.17	3.95	102	6.02	8.42	11.81	<0.001
尿液(mg/L)	103	0.02	0.04	0.05	102	0.07	0.13	0.19	<0.001

表水样品的报出率分别为86.7%(13/15)和40.0%(4/10),饮用水样品的报出率分别为77.8%(35/45)和13.3%(4/30),低于检出限的水样太多,不进行统计学检验.胃癌低发区(福安市)与高发区(长乐市)环境及健康居民体内钼含量存在差异.福安市土壤、底泥、水稻中的钼含量显著高于长乐市( $P<0.05$ ),尤其在土壤和底泥中,福安市样品检测值中位数是长乐市的近五倍.福安市常住健康居民的头发、血清和尿液中钼含量也显著高于长乐市( $P<0.001$ ).血清和尿液样品检测值与参考值(血清0.006 mg/L,尿液100 μg/L)做比较<sup>[1]</sup>,福安市检测值中位数均高于参考值,长乐市则明显低于参考值(表2).

### 3 讨论

钼是人体必需的微量元素之一,在植物性食品中含量较丰富,谷类和多叶蔬菜是其良好的食物来源,动物性食品和水果中含量较低.植物通过根茎从土壤中吸收钼,植物性食品中钼的含量取决于种植土壤中的钼的多少.研究表明,钼在人体中的吸收率很高,不同给予途径,其吸收率70%-90%<sup>[2]</sup>.吸收40-60 min后在血浆中达到峰值,然后快速清除,3 h后以钼酸盐的形式从尿液中排泄.吸收后储存在肝、肌肉和骨中的钼循环代谢较慢,半衰期为42-74 d,储存在肾上腺和胃肠道的循环代谢较快,半衰期为1.7-2.5 d<sup>[3,4]</sup>.血清和尿液中钼含量代表短期体内钼水平,受饮食影响较大,而头发中钼含量则可以代表体内中长期的水平.我们的分析结果显示,福安市土壤、底泥中钼含量高于长乐市,水稻钼含量也高于长乐市,福安市常住健康人群的头发、血清、尿液中钼含量均高于长乐市,表明钼主要通过土壤、底泥-植物-人体沿食物链从环境进入人体,与参考值比较,福安市居民血清和尿

液中钼含量高于参考值,长乐市明显低于参考值,福安市土壤钼含量高使得当地居民长期通过食物链摄入钼元素较充足,相反,高发区长乐市居民摄入钼明显不足.

吴磊等<sup>[5]</sup>对江西省85个县、市的土壤有效态钼含量及胃癌患者的头发与血清中钼含量的测定及分析,结果显示,土壤有效钼与胃癌死亡率呈负相关( $r = -0.285$ ,  $P<0.01$ ),胃癌患者发钼含量低于健康对照( $P<0.01$ ),血清钼亦低于对照( $P<0.05$ ).钼是亚硝酸盐还原酶的组成成分之一,土壤缺钼造成环境和农作物中亚硝酸盐含量增加,最终影响人摄入亚硝酸盐的量,亚硝酸盐致胃癌作用已经得到共识,因此,缺钼可能是胃癌发生的危险因素之一.河南林县由于土壤钼含量低,饮食摄入少,采用口服钼进行人群干预试验预防食管癌<sup>[6]</sup>.近年来,含钼化合物的抗肿瘤功效得到学者的认可, Mitsui等<sup>[7]</sup>对 $[\text{NH}_3\text{Pri}]_6[\text{MO}_7\text{O}_{24}]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (PM-8)作用于人类胃癌细胞模型的研究发现,PM-8抑制人胃癌细胞株MKN45生长,使癌细胞DNA断裂并形成凋亡小体. Ogata等<sup>[8]</sup>发现 $[\text{NH}_3\text{Pri}]_6[\text{MO}_7\text{O}_{24}(\text{OH})]$  (PM-17)在体外实验中能抑制胰腺癌细胞和胃癌细胞(MKN45)增殖,诱导癌细胞凋亡.铜在促进生理和恶性血管生长起重要作用,新血管的形成对肿瘤的生长、侵袭和转移至关重要,四硫钼酸盐(tetrathiomolybdate, TM)是铜整合剂能迅速有效地降低铜的储量,起到抗血管生成的功效, TM能通过抑制血管内皮生长因子,促使头颈部鳞状细胞癌发生坏死并且预防远处转移.第二代四硫钼酸盐(ATN-224)抑制肿瘤细胞和内皮细胞中超氧化物歧化酶1,导致体外内皮细胞增殖抑制和体内血管发生减弱<sup>[9-11]</sup>.

本次研究结果显示,在胃癌高发区从环境到居民体内钼元素含量均显著低于胃癌低发区,

钼主要通过食物链进入人体, 胃癌高发可能与环境缺钼、居民摄入钼不足有关, 钼可能是胃癌的保护因素. 虽然本次研究是生态学研究, 而且元素之间还存在着协同和拮抗作用, 还无法肯定两者之间的因果关系, 需要进一步研究来检验结果, 但为今后进一步研究提供了有价值的线索.

#### 4 参考文献

- 1 杨克敌. 微量元素与健康. 第1版. 北京: 科学出版社, 2003: 380-381
- 2 Turnlund JR, Keyes WR, Peiffer GL. Molybdenum absorption, excretion, and retention studied with stable isotopes in young men at five intakes of dietary molybdenum. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 790-796
- 3 Turnlund JR, Keyes WR, Peiffer GL, Chiang G. Molybdenum absorption, excretion, and retention studied with stable isotopes in young men during depletion and repletion. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 1102-1109
- 4 Thompson KH, Turnlund JR. Kinetic model of molybdenum metabolism developed from dual stable isotope excretion in men consuming a low molybdenum diet. *J Nutr* 1996; 126: 963-972
- 5 吴磊, 曹光辉, 颜世铭, 刘延芳. 微量元素钼与胃癌关系研究. *微量元素与健康研究* 1996; 3: 3-4
- 6 Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li GY. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1483-1492
- 7 Mitsui S, Ogata A, Yanagie H, Kasano H, Hisa T, Yamase T, Eriguchi M. Antitumor activity of polyoxomolybdate,  $[\text{NH}_3\text{Pri}]_6[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , against human gastric cancer model. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 353-358
- 8 Ogata A, Yanagie H, Ishikawa E, Morishita Y, Mitsui S, Yamashita A, Hasumi K, Takamoto S, Yamase T, Eriguchi M. Antitumor effect of polyoxomolybdates: induction of apoptotic cell death and autophagy in in vitro and in vivo models. *Br J Cancer* 2008; 98: 399-409
- 9 Hassouneh B, Islam M, Nagel T, Pan Q, Merajver SD, Teknos TN. Tetrathiomolybdate promotes tumor necrosis and prevents distant metastases by suppressing angiogenesis in head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1039-1045
- 10 Juarez JC, Betancourt O Jr, Pirie-Shepherd SR, Guan X, Price ML, Shaw DE, Mazar AP, Doñate F. Copper binding by tetrathiomolybdate attenuates angiogenesis and tumor cell proliferation through the inhibition of superoxide dismutase 1. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4974-4982
- 11 Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 255-263

■同行评价  
本文设计合理, 条理清晰, 为进一步的实验研究提供线索.

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 •

## 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)

## 蛋白激酶C $\theta$ 对胃肠道间质瘤的诊断价值

杨颖, 刘潇, 叶余丰, 王孟春

### ■背景资料

胃肠道间质瘤是消化系常见的间叶源性肿瘤, *c-kit* 原癌基因和血小板起源生长因子受体(PDGFR $\alpha$ )基因突变是其发生的关键因素。目前确诊主要依据病理表现和免疫组织化学检测, 其中免疫组织化学染色CD117多呈阳性, 但对于形态组织学可疑CD117表达阴性的病例诊断却较困难, 需要寻找一种新的诊断标志物。近几年研究发现蛋白激酶C $\theta$ 在胃肠道间质瘤中高水平表达, 可能作为一种新的标志物用于胃肠道间质瘤的诊断, 尤其适用于CD117表达为阴性的病例。

杨颖, 王孟春, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004

刘潇, 叶余丰, 中国医科大学 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 文章起草、数据分析由杨颖完成; 资料收集、提取与整理由刘潇与叶余丰完成; 文章设计、修改与审阅由王孟春完成。

通讯作者: 王孟春, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院消化内科。

wangmc@sj-hospital.org

电话: 024-96615-26111

收稿日期: 2010-12-26 修回日期: 2011-02-10

接受日期: 2011-02-15 在线出版日期: 2011-03-28

### Diagnostic value of protein kinase C theta for gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis

Ying Yang, Xiao Liu, Yu-Feng Ye, Meng-Chun Wang

Ying Yang, Meng-Chun Wang, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Xiao Liu, Yu-Feng Ye, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Meng-Chun Wang, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Avenue, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wangmc@sj-hospital.org

Received: 2010-12-26 Revised: 2011-02-10

Accepted: 2011-02-15 Published online: 2011-03-28

### Abstract

**AIM:** To perform a meta-analysis to assess the value of protein kinase C theta in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors.

**METHODS:** English or Chinese papers published from 1998 to 2010, which evaluated the diagnostic value of protein kinase C theta for gastrointestinal stromal tumors using pathologic diagnosis as the gold standard, were identified by searching Pubmed, Embase, Wanfang data, VIP, CBM and CNKI. The quality of included studies was assessed using the QUADAS tool. Meta-disc 1.4 software was used to extract data and to calculate the overall sensitivity, specificity, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio, and diagnostic odds ratio. The summary receiver operating characteristic (SROC) curve was plotted.

### ■同行评议者

崔莲花, 副教授, 青岛大学医学院公共卫生系

**RESULTS:** Nine studies involving 1 141 patients were included in the meta-analysis. The results for the nine studies were inconsistent ( $P = 0.0042$ ,  $I^2 = 64.3\%$ ). The overall sensitivity, specificity, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio, and diagnostic odds ratio were 93% (95%CI: 91%-95%), 93% (95%CI: 91%-95%), 12.47 (95%CI: 6.30-24.70), 0.10 (95%CI: 0.05-0.17) and 138.19 (95%CI: 52.75-362.04), respectively. The weighted area under the ROC curve (AUC) was 0.9713 (SE = 0.0116).

**CONCLUSION:** Protein kinase C theta has a high value in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors.

**Key Words:** Gastrointestinal stromal tumor; Protein kinase C theta; Diagnosis; Meta-analysis

Yang Y, Liu X, Ye YF, Wang MC. Diagnostic value of protein kinase C theta for gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 950-955

### 摘要

**目的:** 通过Meta分析方法评价蛋白激酶C $\theta$ 对胃肠道间质瘤的诊断价值。

**方法:** 检索Pubmed数据库、万方数据库、维普数据库、CBM以及CNKI数据库, 搜集1998-2010年国内外公开发表的以病理诊断结果为金标准的关于蛋白激酶C $\theta$ 诊断胃肠道间质瘤的英文、中文文献, 按照Meta分析的要求和诊断试验公认的质量标准对所有的纳入研究进行质量评估。采用Meta-disc1.4软件进行数据分析, 得到合并的诊断敏感度和特异度、合并的阳性和阴性似然比以及合并的比值比, 并绘制接受者工作特征(SROC)曲线。

**结果:** 共纳入9篇(2001-2008年)国内外有关蛋白激酶C $\theta$ 诊断胃肠道间质瘤的文献, 涉及研究对象1 141例。9篇文献研究结果存在异质性( $P = 0.0042$ ,  $I^2 = 64.3\%$ )。利用随机效应模型合并的诊断敏感度和特异度分别为93%(95%CI: 91%-95%)、93%(95%CI: 91%-95%), 合并阳性似然比为12.47(95%CI: 6.30-24.70), 合并阴

性似然比为0.10(95%CI: 0.05-0.17), 合并比数为138.19(95%CI: 52.75-362.04), 加权SROC面积为0.9713(SE = 0.0116).

**结论:** 蛋白激酶C $\theta$ 可作为敏感度以及特异度均高的标记物用于胃肠道间质瘤的诊断.

**关键词:** 胃肠道间质瘤; 蛋白激酶C $\theta$ ; 诊断; Meta分析

杨颖, 刘潇, 叶余丰, 王孟春. 蛋白激酶C $\theta$ 对胃肠道间质瘤的诊断价值. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 950-955  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/950.asp>

## 0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)是一组独立起源于胃肠道间质干细胞的肿瘤, 属于消化系间叶性肿瘤, 1983年由Mazur和Clark根据肿瘤的分化特征首次提出<sup>[1]</sup>. 目前GISTs的确诊主要依据病理表现和免疫组织化学检测, 其中免疫组织化学染色CD117多呈阳性, 对其诊断十分有意义, 但大约有5%组织形态学可疑的病例CD117呈阴性<sup>[2]</sup>. 蛋白激酶C $\theta$ 是一种新型的钙离子非依赖型丝氨酸/苏氨酸激酶, 近几年研究发现其在GISTs中存在表达, 但关于蛋白激酶C $\theta$ 对此病的诊断价值, 各文献报道不尽相同. 本研究采用Meta分析方法对有关蛋白激酶C $\theta$ 诊断GISTs的文献进行系统、客观的综合评价, 为其临床应用提供最佳的循证证据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 以美国生物学数据库(Medline)、万方科技期刊全文数据库作为已发表的国外文献的主要来源, 检索词为“gastrointestinal stromal tumor”、“Protein Kinase C theta/PKC-theta”、“diagnosis”; 以中国期刊全文数据库(CNKI)、重庆维普(VIP)中文科技期刊全文数据库、万方科技期刊全文数据库作为已发表的国内文献的主要来源, 检索词为“胃肠道间质瘤”、“蛋白激酶C $\theta$ /PKC-theta”、“诊断”, 发表年限为1998-01/2010-10. 对所有检索到的文章, 通过查阅其参考文献扩展检索的范围. 研究对象限定为人类, 并排除综述、信件、评论、病例报告等类型的文章.

### 1.2 方法

**1.2.1 资料提取:** 制定并严格按照纳入/排除标准筛选文献, 对检索搜集到的文献, 分别由两名评价者独立进行方法学质量评价和资料提取, 并

进行交叉核对, 若遇到分歧则通过讨论解决.

**1.2.2 文献纳入以及排除标准:** 纳入标准: (1)采用蛋白激酶C $\theta$ 诊断GISTs的文献; (2)病例数 $\geq 15$ ; (3)有病理诊断金标准结果的对比, 诊断明确; (4)文献的结果有四格表数据或经计算可获得四格表数据, 且均可获得全文, 发表文种仅限于英文以及中文. 排除标准: (1)完全不以病理组织学证据作为金标准; (2)文献类型属综述以及个案报道; (3)样本含量 $< 15$ 例; (4)各数据库中互相重复的文献; (5)无法提取四格表数据的文献.

**1.2.3 文献的质量评价:** 用诊断性试验准确性质量评价工具QUADAS(quality assessment of diagnostic accuracy studies)<sup>[3]</sup>评价文献质量以及发生偏倚的可能性, 每个项目按“是”、“否”、“不清楚”3个标准进行评价, 由两名评价员独立进行文献评价, 分歧通过讨论解决. 若14条质量评价标准均满足则研究存在偏倚的可能性极低(A级); 如果其中任何一条或多条质量评价标准仅部分满足即不清楚, 则该研究存在偏倚的可能性为中等(B级); 如果其中任何一条或多条质量评价标准完全不满足即未采用或不正确, 则该研究存在高度偏倚的可能性(C级).

**统计学处理** 采用STATA11.0软件用meta-funnel法绘制漏斗图评估发表偏倚. 将纳入研究的诊断四表格等数据录入到Meta-disc1.4软件中, 计算纳入文献合并的诊断敏感度和特异度、阳性和阴性似然比以及合并的比数比, 并进行综合受试者工作特征(summary receiver operating characteristic, SROC)曲线拟合分析, 获得SROC曲线下面积. 为避免原始数据为0时无法计算, 每项加0.5. Spearman相关分析检查有无阈值效应引起的异质性, 对其他异质性、敏感度和特异度采用卡方检验, 对阳性似然比和阴性似然比采用cochrane-Q检验. 用 $I^2$ 评估异质性大小,  $I^2 < 25\%$ 则异质性较小,  $25\% \leq I^2 \leq 50\%$ 则为中等度异质性,  $I^2 > 50\%$ 则研究结果间存在高度异质性. 若不存在异质性, 采用固定效应模型, 反之则采用随机效应模型对准确性指标进行汇总处理, 所有结果均用95%CI表示. 检验水准 $\alpha = 0.1$ . 同时Meta回归探讨异质性的来源, 按 $P$ 值由大到小逐步筛选出影响异质性的最重要因素, 通过RDOR评估影响因素对试验精确性的影响, 去除异质性大的研究再次分析.

## 2 结果

**2.1 文献筛选及纳入研究特点** 最初检索到相关

### ■ 相关报道

Blay等证实蛋白激酶C $\theta$ 在胃肠道间质瘤中高表达, 但在其他间叶组织肿瘤中则不表达, 包括KIT阳性的肿瘤.

### ■创新盘点

本文通过Meta分析,系统、客观、科学地评价了蛋白激酶C $\theta$ 对胃肠道间质瘤的诊断价值,为其临床应用提供最佳的循证证据。

表 1 纳入文献的作者、出版年份及设计特征

文献编号	作者	研究国家	年份	设计	患者数( <i>n</i> )	盲法	方法
1	Allander等 <sup>[4]</sup>	美国	2001	回顾性	19	NR	基因水平
2	Nielsen等 <sup>[5]</sup>	加拿大	2002	回顾性	46	NR	基因水平
3	Segal等 <sup>[6]</sup>	美国	2003	回顾性	81	NR	基因水平
4	Duensing等 <sup>[7]</sup>	美国	2004	回顾性	67	NR	免疫组织化学
5	Blay等 <sup>[8]</sup>	西班牙	2004	回顾性	73	NR	免疫组织化学
6	Motegi等 <sup>[9]</sup>	日本	2005	回顾性	112	NR	免疫组织化学
7	Kim等 <sup>[10]</sup>	韩国	2006	回顾性	318	NR	免疫组织化学
8	梁建芳等 <sup>[11]</sup>	中国	2007	回顾性	115	是	免疫组织化学
9	Lee等 <sup>[12]</sup>	韩国	2008	回顾性	310	NR	免疫组织化学

NR: 文章未说明。

文献325篇,通过筛选,排除综述、个案报道、重复、不相关以及研究目的与本系统评价不符的文献,最终有9篇文献<sup>[4-12]</sup>符合纳入标准。其中英文文献8篇,中文文献1篇,共涉及病例1 141例,包含胃、肠、胃食管连接处、食管、肠系膜、后腹膜、阔韧带等来源的间质瘤682例及作为对照的消化系来源的平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神经鞘瘤、恶性神经鞘瘤等和其他部位来源的胸腺瘤、精原细胞瘤、肾透明细胞癌、恶性黑色素瘤等459例。发表时间为2001-2008年,3项研究在美国完成,2项研究在韩国完成,中国、日本、西班牙、加拿大各有1项研究(表1)。

2.2 方法学质量评价 9篇纳入研究文献均为回顾性研究,按文献质量评价标准进行评价,评分为A级5篇<sup>[7,9-12]</sup>,B级3篇<sup>[5,6,8]</sup>,C级1篇<sup>[4]</sup>。9项研究中8项<sup>[5-12]</sup>对各种易混淆疾病进行了对比分析,1项研究<sup>[4]</sup>对照疾病覆盖范围不全;所有研究均设立金标准(临床表现及病理学证据),金标准均能够准确区分恶性以及良性;所有研究采用的病理切片与金标准检查所用的病理切片不存在病情进展;所有研究对象接受了金标准检查;1项研究<sup>[11]</sup>采用了盲法,其余均未报道。所有研究均详细描述了蛋白激酶C $\theta$ 的检测方法,但各研究间采用试剂和仪器均不相同(表2)。

### 2.3 统计学分析结果

2.3.1 发表偏倚分析:采用metafunnel法绘制漏斗图(图1)以估计发表偏倚,可见图像对称性,文献发表偏倚较小。

2.3.2 异质性分析:首先检验是否存在阈值效应,当存在阈值效应时,敏感度与特异度呈阴性关联(与1-特异度呈阳性关联),从而ROC平面散点分布呈典型的“肩臂形”样式,Spearman相关分析提示强阳性关联。本研究中,Meta-disc1.4软件

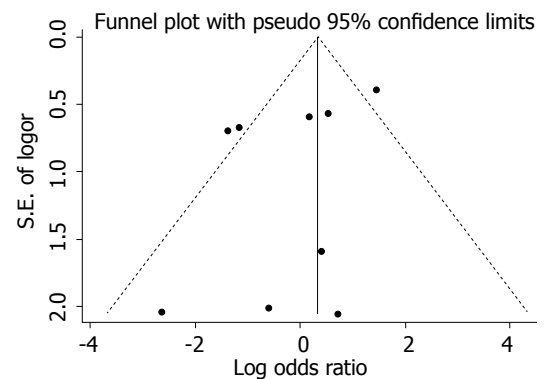


图 1 metafunnel法绘制的漏斗图。

输出的ROC平面散点图并非典型的“肩臂形”外观(图2),同时Spearman相关系数为-0.333( $P = 0.381$ ),提示敏感度与1-特异度呈阴性关联,不存在阈值效应。对其他来源的异质性进行检验,结果提示,个研究之间敏感度( $P = 0.0006$ ,  $I^2 = 71.0\%$ )、特异度( $P = 0.0000$ ,  $I^2 = 79.5\%$ )、阳性似然比(cochrane-Q = 25.34,  $P = 0.0014$ ,  $I^2 = 68.4\%$ )、阴性似然比(cochrane-Q = 24.93,  $P = 0.0016$ ,  $I^2 = 67.9\%$ )、诊断比数比(diagnostic odds ratio, DOR)(cochrane-Q = 22.42,  $P = 0.0042$ ,  $I^2 = 64.3\%$ )均存在高度异质性(图3)。Meta回归分析发现异质性的来源与文献质量及入选文献的检测方法有关,以文献质量分类的RDOR = 4.34(95%CI: 0.43-43.79,  $P = 0.1708$ )。按入选文献的检测方法不同分类的RDOR = 4.26(95%CI: 0.13-135.88,  $P = 0.3451$ )。

2.3.3 Meta分析:以Moses模型建立SROC直线回归模型:  $D = a + b \times S$ , SROC曲线在(S, D)平面变成了一条直线,以加权最小二乘法求得回归模型中的参数a、b。b与0差异无统计学意义( $P = 0.5497$ ),提示SROC曲线是对称的,拟

■同行评价  
本文内容丰富, 为  
胃肠道间质瘤的  
诊断提供依据.

表 2 QUADAS工具质量评价

研究设计特征	文献编号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
研究对象是否代表实际操作中接受该检查的所有患者	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
研究对象的选择标准是否明确	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
诊断金标准能否帮助疾病分级	NR	NR	NR	Y	NR	Y	Y	Y	Y
诊断试验和诊断金标准检查之间是否间隔足够短的时间	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
所有被纳入研究的样本是否均被诊断金标准证实	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
不管诊断试验结果如何, 患者是否都是运用同样的诊断金标准	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
诊断金标准试验、诊断试验是否为独立的试验	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
诊断试验的操作是否有细节描述并可以重复	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
诊断金标准的操作是否有完整的细节描述并可以重复	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
诊断试验结果解释是否独立于诊断金标准	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
诊断金标准结果解释是否独立于诊断试验	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
得到诊断试验的结果时, 与之相对应的临床资料不可得	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
无法解释或介于中间的试验结果是否报道	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
中途退出研究是否有明确解释	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
文献质量	C	B	B	A	B	A	A	A	A

NR: 文章未说明; Y: 是; N: 否; A: A级; B: B级; C: C级.

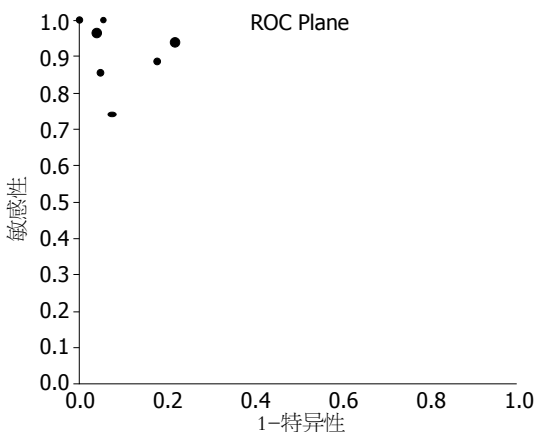


图 2 纳入9篇研究的ROC平面散点图.

合SROC曲线, 9项研究的加权SROC曲线下面积为0.9713, SE = 0.0116(图4). 由于异质性检验提示各研究之间存在高度异质性, 故Meta分析合并效应量时采用随机效应模型, 9个研究的合并敏感度为93%(CI: 91%-95%)、合并特异度为93%(CI: 91%-95%)、合并阳性似然比为12.47(CI: 6.30-24.70)、合并阴性似然比为0.10(CI: 0.05-0.17)、合并DOR为138.19(CI: 52.75-362.04).

2.3.4 敏感性分析: Meta回归分析发现异质性的来源与文献质量有关, 剔除4篇精确性差的文献<sup>[6,8,10,12]</sup>后, 再次进行异质性检验, 剩余5项研究之间敏感度( $P = 0.0418$ ,  $I^2 = 59.7%$ )存在较

高异质性, 特异度( $P = 0.2677$ ,  $I^2 = 23%$ )、阳性似然比( $P = 0.3612$ ,  $I^2 = 8.0%$ )、阴性似然比( $P = 0.2902$ ,  $I^2 = 19.6%$ )存在低度异质性, DOR无异质性( $P = 0.4149$ ,  $I^2 = 0.00%$ ). 5项研究的加权SROC曲线下面积为0.9476, SE = 0.0180(图5). 固定效应模型的合并敏感度为87%(CI: 0.81-0.92)、合并特异度为93%(CI: 0.88-0.96)、合并阳性似然比为9.37(CI: 5.52-15.89)、合并阴性似然比为0.17(CI: 0.11-0.26)、合并DOR为59.36(CI: 28.58-123.43).

### 3 讨论

单纯以文献质量为筛选标准的亚组分析并不能把异质性控制在理想水平, 说明异质性的来源有多种原因. 首先9项研究中3项研究对蛋白激酶C $\theta$ 进行了基因水平的检测, 其他研究则进行了免疫组织化学染色检测, 即存在检测方法不统一的情况; 其次, GISTs的诊断存在金标准判读的偏倚, 由此可能夸大诊断实验的特异度; 第三, 部分研究纳入的病例数较大, 所占权重也较大, 因此对异质性分析结果影响较大. 最后, 所有的研究都是回顾性的, 存在收集GISTs病例后再设置对照的情况, 可能未实现同步盲法而存在判读偏移. 本文纳入的9项研究中均有明确的诊断金标准, 研究对象包含了所有因胃肠道肿块而进行免疫组织化学或基因水平检测的病例,



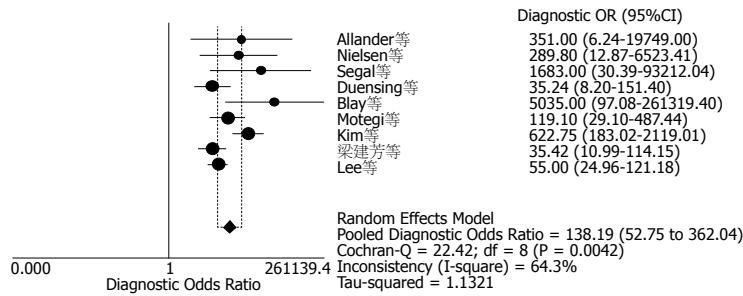


图 3 纳入9篇研究的DOR.

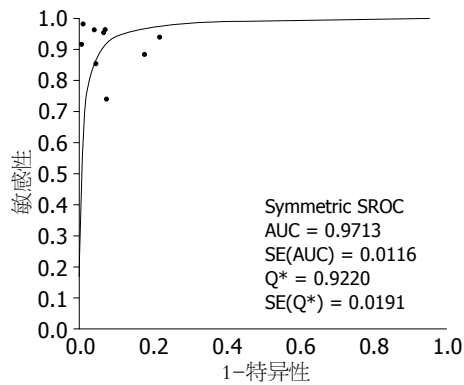


图 4 纳入9篇研究的SROC.

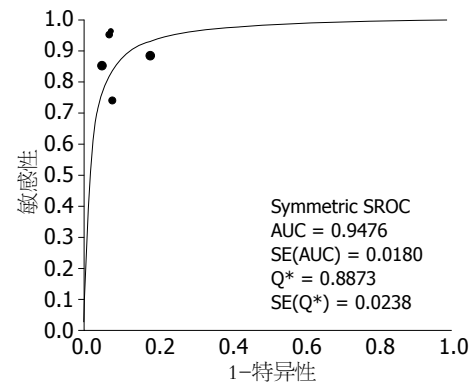


图 5 剩余5篇研究的SROC.

仅1项研究<sup>[4]</sup>未包含各类易混淆的疾病. 8项研究<sup>[4-10,12]</sup>未明确报道是否采用了盲法, 可能同样存在诊断实验的判读偏倚.

目前多数学者认为GISTs起源于胃肠道间质干细胞-Cajal细胞(interstitial cells of Cajal, ICC), 大部分存在*c-kit*基因的突变, *c-kit*基因突变导致KIT酪氨酸激酶持续活化, KIT(CD117)过度表达<sup>[13]</sup>, 是目前诊断GISTs的主要依据. 然而少数*c-kit*基因突变的病例KIT表达很弱甚至不表达, 还有一部分KIT阴性的GISTs因血小板起源生长因子受体基因突变所致<sup>[14,15]</sup>. 因此, 对于形态组织学可疑但KIT表达阴性的病例诊断较困难, 十分有必要寻找一种新的诊断标志物. 蛋白激酶C $\theta$ 是蛋白激酶C家族成员之一, 其活性受甘油二酯和磷脂调控, 是一个细胞周期蛋白, 最初仅发现在T淋巴细胞、骨骼肌细胞及血小板中表达. 近年, DNA微阵列技术证实蛋白激酶C $\theta$ 与KIT同时表达于豚鼠消化系的ICC<sup>[16]</sup>, 并且在GISTs中高水平表达. Western blot也清晰地显示了在GISTs中存在与KIT表达无关的单个条带, 该条带位于蛋白激酶C $\theta$ 分子量所在位置<sup>[14,17]</sup>. 因此, 蛋白激酶C $\theta$ 可能作为一种新的标志物用于GISTs的诊断, 尤其适用于KIT表达为阴性的病例. 本研究共搜索到9篇符合纳入标准的相关文献, 质量水平中等, 采用诊断实验专用软件Meta-disc1.4软件计算合并的敏感度和特异度等, 并绘

制蛋白激酶C $\theta$ 诊断GISTs的SROC曲线, 对蛋白激酶C $\theta$ 诊断GISTs有一个较客观而准确的评价. 结果显示蛋白激酶C $\theta$ 在诊断GISTs方面具有较好的敏感度93%(95%CI: 91%-95%)及特异度93%(95%CI: 91%-95%), SROC曲线下面积为0.9713. Meta回归分析发现异质性的来源与文献质量有关, 在去除精确性差的4项研究后, 得到的合并敏感度及特异度分别为87%(95%CI: 81%-92%)、93%(95%CI: 88%-96%), 与9项研究的合并效应无统计学差异. 因此, 蛋白激酶C $\theta$ 可作为敏感度以及特异度均高的标志物用于GISTs的诊断.

#### 4 参考文献

- Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 507-519
- 中国胃肠道间质瘤专家组. 中国胃肠道间质瘤诊断治疗共识(2008年版). *临床肿瘤学杂志* 2009; 14: 746-754
- Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, Bossuyt PM, Kleijnen J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Med Res Methodol* 2003; 3: 25
- Allander SV, Nupponen NN, Ringnér M, Hostetter G, Maher GW, Goldberger N, Chen Y, Carpten J, Elkahloun AG, Meltzer PS. Gastrointestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile. *Cancer Res* 2001; 61: 8624-8628
- Nielsen TO, West RB, Linn SC, Alter O, Knowling MA, O'Connell JX, Zhu S, Fero M, Sherlock G, Pollack JR, Brown PO, Botstein D, van de Rijn M.

- Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet* 2002; 359: 1301-1307
- 6 Segal NH, Pavlidis P, Noble WS, Antonescu CR, Viale A, Wesley UV, Busam K, Gallardo H, DeSantis D, Brennan MF, Cordon-Cardo C, Wolchok JD, Houghton AN. Classification of clear-cell sarcoma as a subtype of melanoma by genomic profiling. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1775-1781
  - 7 Duensing A, Joseph NE, Medeiros F, Smith F, Hornick JL, Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. Protein Kinase C theta (PKCtheta) expression and constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Cancer Res* 2004; 64: 5127-5131
  - 8 Blay P, Astudillo A, Buesa JM, Campo E, Abad M, García-García J, Miquel R, Marco V, Sierra M, Losa R, Lacave A, Braña A, Balbín M, Freije JM. Protein kinase C theta is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4089-4095
  - 9 Motegi A, Sakurai S, Nakayama H, Sano T, Oyama T, Nakajima T. PKC theta, a novel immunohistochemical marker for gastrointestinal stromal tumors (GIST), especially useful for identifying KIT-negative tumors. *Pathol Int* 2005; 55: 106-112
  - 10 Kim KM, Kang DW, Moon WS, Park JB, Park CK, Sohn JH, Jeong JS, Cho MY, Jin SY, Choi JS, Kang DY. PKCtheta expression in gastrointestinal stromal tumor. *Mod Pathol* 2006; 19: 1480-1486
  - 11 梁建芳, 郑绘霞. PKC- $\theta$ 在胃肠间质瘤中的表达及意义. *诊断病理学杂志* 2007; 14: 56-59
  - 12 Lee HE, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Characteristics of KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and diagnostic utility of protein kinase C theta immunostaining. *J Clin Pathol* 2008; 61: 722-729
  - 13 Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 8118-8121
  - 14 Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710
  - 15 Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003; 125: 660-667
  - 16 Poole DP, Van Nguyen T, Kawai M, Furness JB. Protein kinases expressed by interstitial cells of Cajal. *Histochem Cell Biol* 2004; 121: 21-30
  - 17 Debiec-Rychter M, Wasag B, Stul M, De Wever I, Van Oosterom A, Hagemeyer A, Sciot R. Gastrointestinal stromal tumours (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity. *J Pathol* 2004; 202: 430-438

编辑 李薇 电编 何基才

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

## • 消息 •

### WJG 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)

# 急性缺血性脑血管病后胃肠道出血607例

张新宇, 王丽平, 沈扬, 李小刚

## ■背景资料

急性脑血管病由于发病率高、致死致残性强, 在2008年后已经成为我国疾病患者死亡的第一顺位原因。急性脑血管病中70%以上为缺血性脑血管病。除了针对脑血管病本身的治疗, 对于其并发症的治疗也很重要。作为急性脑血管病常见并发症的胃肠道出血, 近年来在治疗中逐渐得到重视。

张新宇, 王丽平, 沈扬, 李小刚, 北京大学第三医院神经内科北京市 100191

作者贡献分布: 张新宇与王丽平对此文做出主要贡献; 此课题由张新宇与李小刚设计; 研究过程由张新宇、王丽平及沈扬完成; 数据汇总和分析由张新宇与王丽平完成; 写作由张新宇与王丽平完成。

通讯作者: 李小刚, 主任医师, 100191, 北京市, 北京大学第三医院神经内科. zhangxy3216@126.com

收稿日期: 2010-12-21 修回日期: 2011-02-08

接受日期: 2011-02-28 在线出版日期: 2011-03-28

## Gastrointestinal hemorrhage after acute ischemic stroke: an analysis of 607 cases

Xin-Yu Zhang, Li-Ping Wang, Yang Shen, Xiao-Gang Li

Xin-Yu Zhang, Li-Ping Wang, Yang Shen, Xiao-Gang Li, Department of Neurology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Correspondence to: Xiao-Gang Li, Department of Neurology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China. zhangxy3216@126.com

Received: 2010-12-21 Revised: 2011-02-08

Accepted: 2011-02-28 Published online: 2011-03-28

## Abstract

**AIM:** To analyze the incidence, diagnosis and treatment of gastrointestinal hemorrhage after acute ischemic stroke.

**METHODS:** A total of 607 patients with acute ischemic stroke were involved in the study. The relationship of Glasgow coma score, age, sex, diabetes, hypertension, smoking, and the type of cerebral infarction with the risk of gastrointestinal hemorrhage after acute ischemic stroke was analyzed.

**RESULTS:** Gastrointestinal bleeding was observed in 18 (2.9%) patients. The development of gastrointestinal hemorrhage after acute ischemic stroke was correlated with age ( $OR = 3.60$ ) and middle cerebral artery infarction (MCA,  $OR = 9.47$ ), but not with lacunar infarction, diabetes, hypertension, sex or smoking.

**CONCLUSION:** Elder age and larger MCA infarcts predict the development of gastrointestinal bleeding after acute ischemic stroke. Stroke

mortality can be independently predicted by gastrointestinal bleeding.

**Key Words:** Gastrointestinal hemorrhage; Acute ischemic stroke; Arterial obstruction

Zhang XY, Wang LP, Shen Y, Li XG. Gastrointestinal hemorrhage after acute ischemic stroke: an analysis of 607 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 956-959

## 摘要

**目的:** 回顾性分析急性缺血性脑血管病患者并发胃肠道出血和应激性溃疡的发病率、诊治情况, 为该病的治疗提供新的参考。

**方法:** 2005-2010年来北京大学第三医院治疗的急性缺血性脑血管病患者607例, 分析格拉斯哥昏迷评分、年龄、性别、是否患有糖尿病、高血压、吸烟及脑梗死的类型等指标与急性脑血管病合并胃肠道出血的关系。

**结果:** 607例急性缺血性脑血管病患者中, 有18例胃肠道出血患者, 其患病率为2.9%, 年龄(优势比为3.60)和大脑中动脉梗死(优势比为9.47)与胃肠道出血相关; 腔隙性梗死、糖尿病、高血压、性别和吸烟与急性脑血管病伴胃肠道出血等指标不相关。

**结论:** 高龄和大脑中动脉梗死的脑血管病患者要严密观察, 预防性使用胃黏膜保护剂和质子泵抑制剂, 防止大出血导致的失血性休克。

**关键词:** 胃肠道出血; 急性缺血性脑血管病; 动脉梗死

张新宇, 王丽平, 沈扬, 李小刚. 急性缺血性脑血管病后胃肠道出血607例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(9): 956-959  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/956.asp>

## 0 引言

随着我国经济和生活水平的迅速提高, 急性脑血管病患者特别是缺血性脑血管病患者逐渐增多。由于急性缺血性脑血管病患者具有起病

## ■同行评议者

阴赅宏, 研究员, 首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科; 朱亮, 副教授, 大连医科大学生理教研室

急、进展快、死亡率高和易出现并发症等特点, 临床治疗较为复杂. 许多临床资料提示<sup>[1-3]</sup>, 严重的急性脑血管病患者发生应激性溃疡和胃肠道出血的可能性较高, 而在治疗急性缺血性脑血管病患者时, 常使用的溶栓及抗血小板等药物<sup>[4]</sup>又可能会加重胃肠道出血和溃疡的程度, 所以成为临床治疗的难点. 国内有关急性脑血管病患者后胃肠道出血临床诊治及预后的相关报道较少. 因此, 本文回顾性分析北京大学第三医院急性缺血性脑血管病患者并发胃肠道出血和应激性溃疡的发病率、诊治情况, 以期为临床急性脑血管病患者并发胃肠道出血和应激性溃疡的治疗提供新的参考.

## 1 材料和方法

1.1 材料 回顾性分析2005-2010年北京第三医院神经内科、ICU病房及高干病房治疗的急性缺血性脑血管病患者607例, 患者均为首次发作或症状初发后1 wk, 其中包括使用阿司匹林、氯吡格雷、华法令等药物的患者. 所有患者均符合1995年第四届全国脑血管会议修订的《各类脑血管病诊断要点》标准<sup>[5]</sup>, 并经头颅CT或MRI检查除外脑实质出血及蛛网膜下腔出血. 急性缺血性脑血管病患者伴有胃肠道出血均详细记录出血可能的原因、处理及预后.

1.2 方法 胃肠道出血的诊断标准为: 急性缺血性脑血管病后发现有呕血、黑便或病理分析发现胃腔内有血块. 按照单因素方差分析相关指标, 即格拉斯哥昏迷评分、年龄、性别、是否患有糖尿病、吸烟及脑梗死的类型等, 分析与急性缺血性脑血管病胃肠道出血的相关性.

**统计学处理** 以上指标与急性缺血性脑血管病的关系采用Logistic回归分析. 各项指标间采用95%CI优势比分析其相关性.

## 2 结果

607例急性缺血性脑血管病患者, 平均年龄为78.79 (35-88)岁, 男281例(46.3%), 急性大脑中动脉供血区梗死占20%, 腔隙性梗死占60.9%, 其他占19.1%. 急性缺血性脑血管病患者中有18例患者伴有胃肠道出血, 占2.9%, 所有患者均为上消化道出血, 其中胃溃疡12例, 十二指肠溃疡3例, 黏膜糜烂3例. 18例出血患者病因检查中只有4例通过胃镜, 即病理分析发现胃腔内有血块, 其余14例均有较明显的临床表现, 如呕血、黑便或同时出现两种情况. 所有胃肠道出血患者均经

过严格的诊断和治疗. 18例伴胃肠道出血患者有6例死亡. 单因素方差分析显示, 伴胃肠道出血患者平均年龄与不伴胃肠道出血患者平均年龄有显著性差异(78.0岁±8.9岁 vs 71.0岁±12.3岁,  $P<0.05$ ), 大脑中动脉区梗死与胃肠道出血相关. 腔隙性梗死、糖尿病、高血压、性别和吸烟等指标与急性缺血性脑血管病伴胃肠道出血没有相关性. 胃肠道出血为急性脑血管病死亡率增加的独立指标( $OR = 24.97$ , 95%CI: 1.97-316.9, 表1).

## 3 讨论

国外对急性脑血管病伴胃肠道出血研究较多, 但是针对国内人群的研究较少. Jura等<sup>[6]</sup>对于498例白种人急性缺血性脑血管病患者进行尸检发现胃肠道出血的比例高达15.1%, 多出现在较为严重的脑梗死, 尚未发现胃肠道溃疡类型与脑梗死的类型相关. Davenport等<sup>[7]</sup>研究613例急性缺血性脑血管病患者, 有18例有胃肠道出血并发现与年龄呈一定相关性. Kitamura等<sup>[8]</sup>发现, 急性脑血管病患者的胃肠道出血患病率高达52%.

本文研究急性脑血管病伴胃肠道出血发病率为2.9%, 其结果明显低于Kitamura等<sup>[8]</sup>报道的52%和Dobkin等报道的16%-25%, 主要原因是Kitamura和Dobkin等研究将缺血性脑血管病和出血性脑血管病均纳入到研究中, 出血性脑血管病的并发症较多, 高达30%以上<sup>[9-11]</sup>. Phan等<sup>[12]</sup>的研究中发现6例急性脑血管病伴胃肠道出血患者, 并合并有低血压和血红蛋白降低, 其中有3例死亡, 所以胃肠道出血是导致急性脑血管病死亡的重要原因之一. 我们认为, 老年患者, 特别是伴有其他疾病患者, 大量的胃肠道出血可以导致患者死亡. 尽管在本研究中尚未发现在急性脑血管病时胃肠道出血对患者预后的影响, 但我们认为高血压和贫血可能是脑血管病急性期的死亡原因之一.

本次研究中我们分析了影响胃肠道出血的因素, 包括年龄、糖尿病、吸烟、血糖、格拉斯哥评分及梗死类型等指标. 在所有的因素中, 大脑中动脉梗死与年龄是急性脑血管病伴胃肠道出血的独立致病因素, 大脑中动脉梗死是急性脑血管病中常见而又严重的一种, 通常可以使中枢神经产生应急性激素升高, 胃肠道蠕动增加, 黏膜充血及炎症介质的作用, 可使Cushing氏溃疡的发生率增加, 这将直接导致胃肠道出血的增加<sup>[13]</sup>. 高龄段缺血性脑血管病患者胃

### ■研究前沿

严重的急性脑血管病患者发生应激性溃疡和胃肠道出血的可能性较高, 而在治疗急性缺血性脑血管病患者时, 常使用的溶栓及抗血小板等药物又可能会加重胃肠道出血和溃疡的程度, 所以成为临床治疗的难点.

### ■相关报道

Jura等对于498例白种人急性缺血性脑血管病患者进行尸检发现胃肠道出血的比例高达15.1%, 多出现在较为严重的脑梗死, 尚未发现胃肠道溃疡类型与脑梗死的类型相关.

### ■创新盘点

本文提出的缺血性脑血管病合并胃肠道出血的重要因素包括高龄和大脑中动脉梗死,而不同于传统观点中认为的抗凝或抗血小板制剂的使用.使用的病例在国内单中心属于较大规模,但对于证实脑血管病伴发胃肠道出血与吸烟饮酒等一般因素的关系仍显不够.

表 1 急性脑血管病伴胃肠道出血原因分析

指标	胃肠道出血(n = 18)	非胃肠道出血(n = 589)	OR值	95%CI	P值
年龄>73岁	14	288	3.60	1.1-15.4	0.020
男性	8	273	0.90	0.3-2.6	0.060
吸烟	3	193	0.40	0.1-1.5	0.120
嗜酒	1	75	0.40	0.1-2.7	0.510
房颤	2	74	0.90	0.1-3.8	0.620
尿失禁	14	250	4.80	1.5-20	0.330
大脑中动脉梗死	12	320	9.47	1.62-55.5	0.010
格拉斯哥评分<4	4	89	1.45	0.73-27.2	0.100
肝素治疗	4	109	1.30	0.3-4.1	0.070
抗凝治疗	2	66	1.00	0.1-4.4	0.525
抗血小板治疗	7	341	0.50	0.2-1.3	0.540
吸烟	3	193	0.48	0.05-4.28	0.510
糖尿病	6	187	0.73	0.14-3.78	0.710

肠道出血的发病率和死亡率较高,这可能与高年龄段多器官功能退化、胃肠道黏膜屏障功能降低有关.本研究提示在急性缺血性脑血管病中常使用药物的如肝素、抗血小板制剂并不是导致胃肠道出血的直接原因,所以急性脑血管病常规使用抗凝或抗栓药物不会显著增加胃肠道出血的发生.有研究表明<sup>[14,15]</sup>吸烟是胃溃疡形成的条件,吸烟能兴奋迷走神经,使胃酸分泌增多;乙醇对胃黏膜有刺激损伤作用,但在本研究中,吸烟、饮酒史与急性脑血管病胃肠道出血并无直接的联系,我们认为可能与本次研究病例数过少有关.

当急性脑血管病患者出现柏油样便,可能提示胃肠道出现广泛出血,如果没有给予有效治疗,通常会出现失血性休克,导致患者多器官衰竭和预后不良.所以临床要严密观察急性脑血管病患者,尤其是老年及大脑动脉梗死患者,在常规脑血管病药物的基础上给予质子泵抑制剂<sup>[16]</sup>(如奥美拉唑)或胃黏膜保护剂,适量的调整抗凝抗栓剂的使用剂量,积极防治胃肠道出血,避免严重的并发症发生.常规剂量的抗血小板或抗凝制剂对于一般的脑血管病患者增加胃肠道出血的比例较小,本文的样本量中未能体现统计学差异,但国外报道的上万例患者抗血小板研究中显示了较安慰剂组的消化道出血的增加.一旦出现出血迹象,不论是否与用药相关,除了给予胃黏膜保护剂,必须要调整或停止影响血小板聚集或凝血的药物.

本文虽对来北京大学第三医院治疗的607例急性脑血管病患者进行回顾性研究,但由于分

析的指标和样本量有限,所以未来尚需大样本长期的跟踪调研,以期能为临床提供更详实和价值更高的资料,从而降低急性脑血管病后胃肠道出血的发生.

### 4 参考文献

- Lin S, Wu B, Hao ZL, Kong FY, Tao WD, Wang DR, He S, Liu M. Characteristics, Treatment and Outcome of Ischemic Stroke with Atrial Fibrillation in a Chinese Hospital-Based Stroke Study. *Cerebrovasc Dis* 2011; 31: 419-426
- Ray WA, Murray KT, Griffin MR, Chung CP, Smalley WE, Hall K, Daugherty JR, Kaltenbach LA, Stein CM. Outcomes with concurrent use of clopidogrel and proton-pump inhibitors: a cohort study. *Ann Intern Med* 2010; 152: 337-345
- van Hattum ES, Algra A, Lawson JA, Eikelboom BC, Moll FL, Tangelder MJ. Bleeding increases the risk of ischemic events in patients with peripheral arterial disease. *Circulation* 2009; 120: 1569-1576
- Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 2002; 33: 2123-2136
- 中华医学会, 中华神经外科学会. 脑血管病分类及诊断标准(1995). *中华神经科杂志* 1996; 29: 376-377
- Jura E. Gastrointestinal disturbances in stroke. *Acta Neurol Scand* 1987; 76: 168-171
- Davenport RJ, Dennis MS, Warlow CP. Gastrointestinal hemorrhage after acute stroke. *Stroke* 1996; 27: 421-424
- Kitamura T, Ito K. Acute gastric changes in patients with acute stroke. Part 1: with reference to gastroendoscopic findings. *Stroke* 1976; 7: 460-463
- Dobkin BH. Focused stroke rehabilitation programs do not improve outcome. *Arch Neurol* 1989; 46: 701-703
- Xian Y, Holloway RG, Chan PS, Noyes K, Shah MN, Ting HH, Chappel AR, Peterson ED, Friedman B. Association between stroke center hospitalization for acute ischemic stroke and mortality. *JAMA* 2011; 305: 373-380
- Garnock-Jones KP. Dabigatran etexilate: a review

- of its use in the prevention of stroke and systemic embolism in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011; 11: 57-72
- 12 Phan TG, Huston J 3rd, Campeau NG, Brown RD Jr, Fulgham JR, Wijedicks EF. Early evolution of deficits in acute ischemic stroke: mean transit time, relative blood volume, and relative blood flow. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2002; 11: 66-71
- 13 Rhoney DH, Parker D Jr, Formea CM, Yap C, Coplin WM. Tolerability of bolus versus continuous gastric feeding in brain-injured patients. *Neurol Res* 2002; 24: 613-620
- 14 Hammadi M, Adi M, John R, Khoder GA, Karam SM. Dysregulation of gastric H,K-ATPase by cigarette smoke extract. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4016-4022
- 15 Qui BS, Mei QB, Liu L, Tchou-Wong KM. Effects of nitric oxide on gastric ulceration induced by nicotine and cold-restraint stress. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 594-597
- 16 Simon T, Steg PG, Gilard M, Blanchard D, Bonello L, Hanssen M, Lardoux H, Coste P, Lefèvre T, Drouet E, Mulak G, Bataille V, Ferrières J, Verstuyft C, Danchin N. Clinical events as a function of proton pump inhibitor use, clopidogrel use, and cytochrome P450 2C19 genotype in a large nationwide cohort of acute myocardial infarction: results from the French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) registry. *Circulation* 2011; 123: 474-482

#### ■同行评价

本文选题尚可, 对本地区急性缺血性脑血管病患者的治疗有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

### • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》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、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。

## 肝细胞癌冷冻消融术后早期复发的危险因素

杨茂, 郭志, 李保国

### ■背景资料

冷冻消融是一种有效的肿瘤靶区微创治疗方法。几十年来, 冷冻治疗由于缺乏满意的治疗设备, 发展缓慢。随着科技进步, 美国率先研制出具有冷热双重功能的氩氦刀, 广泛应用于临床。近年来氩氦冷冻治疗肝癌迅速发展, 其基本原理是利用氩气快速制冷产生的超低温作用于肿瘤组织, 引起细胞内外冰晶形成、细胞脱水, 氩气迅速复温, 导致肿瘤坏死。

杨茂, 郭志, 李保国, 天津医科大学附属肿瘤医院介入治疗科 天津市肿瘤防治重点实验室 天津市 300060

国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2007BAI05B06

作者贡献分布: 杨茂、郭志及李保国对此文所作贡献均等; 此课题由郭志、李保国及杨茂设计; 研究过程由郭志、李保国及杨茂共同操作完成; 数据分析由杨茂完成; 本论文写作由杨茂、郭志及李保国完成。

通讯作者: 郭志, 教授, 300060, 天津市河西区环湖西路体院北, 天津医科大学附属肿瘤医院介入治疗科。guozh@vip.163.com  
电话: 022-23340123

收稿日期: 2010-12-06 修回日期: 2011-01-26

接受日期: 2011-02-15 在线出版日期: 2011-03-28

### Risk factors for early recurrence after cryoablation for hepatocellular carcinoma

Mao Yang, Zhi Guo, Bao-Guo Li

Mao Yang, Zhi Guo, Bao-Guo Li, Department of Interventional Therapy, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital & Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin City, Tianjin 300060, China

Supported by: the National Key Technology R&D Program of China, No. 2007BAI05B06

Correspondence to: Professor Zhi Guo, Department of Interventional Therapy, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, North Tiyuan, West Huanhu Road, Hexi District, Tianjin 300060, China. guozh@vip.163.com  
Received: 2010-12-06 Revised: 2011-01-26

Accepted: 2011-02-15 Published online: 2011-03-28

### Abstract

**AIM:** To investigate risk factors for early recurrence after cryoablation for hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** The clinical data for 90 HCC patients with recurrence after cryoablation were analyzed retrospectively. Risk factors associated with tumor early recurrence were assessed.

**RESULTS:** During a median follow-up of 21.9 mo  $\pm$  10.1 mo (range, 8 to 47 mo), early recurrences were observed in 57 out of 90 patients (63.4%) and late recurrences in 29 patients (32.2%). The median survival time was significant lower in the early recurrence group than in the late recurrence group (21 mo vs 36 mo,  $P < 0.05$ ). Univariate analysis demonstrated that risk factors associated with early recurrence after cryoablation for HCC were preoperative serum

$\alpha$ -fetoprotein (AFP) level  $>200 \mu\text{g/L}$ , hepatitis B virus (HBV) DNA level  $>5 \log_{10}$  copies/mL, maximum tumor diameter  $>3 \text{ cm}$ , and adjacency of the tumor to large blood vessels (diameter  $\geq 6 \text{ mm}$ ). Multivariate analysis showed that preoperative HBV DNA level  $>5 \log_{10}$  copies/mL, maximum tumor diameter  $>3 \text{ cm}$ , and adjacency of the tumor to large blood vessels were independent risk factors for early recurrence after cryoablation for HCC (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Preoperative HBV DNA level  $>5 \log_{10}$  copies/mL, maximum tumor diameter  $>3 \text{ cm}$  and adjacency of the tumor to large blood vessels are independent risk factors for early recurrence after cryoablation for HCC.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Cryosurgery; Early recurrence; Risk factors

Yang M, Guo Z, Li BG. Risk factors for early recurrence after cryoablation for hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 960-963

### 摘要

**目的:** 探讨肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者冷冻消融术后影响早期复发的相关危险因素。

**方法:** 回顾分析90例直径 $\leq 5.0 \text{ cm}$ 的HCC行冷冻消融治疗后复发的患者的临床资料, 分析影响冷冻消融术后早期复发的危险因素。

**结果:** 本组患者随访8-47(平均随访时间21.9 $\pm$ 10.1) mo, 共有57例(63.3%)早期复发( $\leq 2$ 年), 33例(36.7%)晚期复发( $>2$ 年)。早期复发组与晚期复发组复发后的中位生存时间分别为21 mo和36 mo, 二者具有显著差异( $P < 0.05$ )。单因素分析结果显示, 术前血清甲胎蛋白(AFP) $>200 \mu\text{g/L}$ 、乙型肝炎病毒(HBV) DNA $>5 \log_{10}$  copies/mL、肿瘤最大直径 $>3 \text{ cm}$ 、肿瘤邻近大血管(直径 $\geq 6 \text{ mm}$ )是HCC冷冻消融术后早期复发的危险因素( $P < 0.05$ ); 多因素分析显示术前HBV-DNA $>5 \log_{10}$  copies/mL、肿瘤最大直径 $>3 \text{ cm}$ 、肿瘤邻近大血管是HCC冷冻消融术后早期复发的独立影响因素( $P < 0.05$ )。

### ■同行评议者

杜顺达, 副主任医师, 北京协和医院肝外科

**结论:** 冷冻消融术后早期复发影响术后远期生存. 术前HBV DNA $>5 \log_{10}$  copies/mL、肿瘤最大直径 $>3$  cm、肿瘤邻近大血管的HCC患者在冷冻消融术后应警惕早期复发, 可根据患者的不同特点采用个体化辅助治疗方案.

**关键词:** 肝细胞癌; 冷冻外科; 早期复发; 危险因素

杨茂, 郭志, 李保国. 肝细胞癌冷冻消融术后早期复发的危险因素. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 960-963  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/960.asp

## 0 引言

冷冻消融等局部微创疗法在直径较小( $\leq 5$  cm)的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者治疗上得到认可, 并初步取得了较好的疗效<sup>[1-4]</sup>. 与传统的外科手术比较, 冷冻消融具有微创、对肝功能影响小、重复性强多种优点. 但无论根治性切除术还是冷冻消融术, 治疗后的高复发率仍是制约肝癌疗效的主要原因. 本组主要研究HCC冷冻消融术后早期复发对生存时间的影响以及早期复发的相关危险因素.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2004-01/2007-01行冷冻消融术后复发的小HCC( $\leq 5$  cm)90例, 全部符合HCC诊断标准<sup>[5]</sup>, 其中穿刺活检病理诊断62例, 临床诊断28例. 男56例, 女34例, 年龄34-78岁(中位年龄61)岁. 行冷冻治疗前, 19例AFP阴性( $\leq 20 \mu\text{g/L}$ ); 71例AFP阳性( $>20 \mu\text{g/L}$ ). 治疗前, 肝功能Child-Pugh A、B级者分别为58、32例; 按BCLC分期, A期26例, B期64例. 单发肿瘤63例, 多发肿瘤17例. 纳入标准: 单发结节肿瘤直径 $\leq 5$  cm, 多发结节肿瘤数 $\leq 3$ 个且最大直径 $\leq 3$  cm; 肝功能Child-Pugh分级A级或B级; 无门脉癌栓或其他部位转移; 有合适的经皮穿刺进针路径; 均为HBV感染. 剔除标准: 术前有远处转移; 合并心、肾、脑等严重器质性疾病者, 不能耐受手术. 所有治疗均经患者和家属同意, 并签订知情同意书. 按复发时间分为早期复发组( $\leq 2$ 年)和晚期复发组( $>2$ 年).

### 1.2 方法

**1.2.1 冷冻消融治疗:** 选择10 mm层厚肝脏平扫, 计算肿瘤区域, 预计靶冷冻体积. CT定位线做体表标志, 选择、确定不同进针角度、深度, 靶向穿刺点. 操作步骤: 取仰卧位, 常规消毒、铺巾. 局麻后, 按预定穿刺途径将冷冻器穿入冷冻靶区. 氩气工作压力17 225 kPa(2500 PSI), 100%输出功率条件下, 冷冻至 $-140^\circ\text{C} \sim -160^\circ\text{C}$ , 持续

15-20 min, 氦气复温至 $10^\circ\text{C}$ , 为第1冷冻循环. 第2循环, 方法同前. 再次行CT平扫, 见冰球范围超出肿瘤范围5 mm定义为手术成功. 术毕, 撤出冷冻器. 全部技术操作均在心电、呼吸、脉搏、血氧饱和度监护监测下进行. 术后常规预防感染治疗.

**1.2.2 随访:** 患者定期住院复查、门诊或电话随访, 建立病历档案. 随访期内每1-2 mo复查腹部CT、MRI、血清AFP水平及肝功能情况以了解复发情况. 复发判定主要根据增强CT或MRI检查, 了解消融局部或肝内远处有无复发. 若随访期间影像学检查显示原肿瘤区内部或周边有强化, 考虑肿瘤局部复发; 原消融区以外的肝内强化灶定为另位复发灶. 生存时间以月为单位, 以肿瘤导致的死亡为事件终点, 以生存、失访或死于其他疾病为终检值.

**统计学处理** 使用SPSS16.0统计软件包分析处理数据. 采用Kaplan-Meier法计算复发后生存时间, 做Log-rank检验; 单因素分析采用 $\chi^2$ 检验, 把具有统计学意义的因素纳入Logistic回归模型进行多因素分析. 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 随访结果及并发症** 随访至2007-12-01, 平均随访 $21.9 \text{ mo} \pm 10.1 \text{ mo}$ . 全组57(63.3%)例出现早期复发, 其中原位复发35例, 另位复发22例; 33例(36.7%)晚期复发, 其中原位复发8例, 另位复发25例. 早期复发组和晚期复发组复发后的中位生存时间差异明显( $21 \text{ mo}$  vs  $36 \text{ mo}$ ,  $\chi^2 = 9.720$ ,  $P = 0.002$ , 图1). 治疗过程中或治疗后无冷冻消融相关的死亡. 大多数患者术后出现低热、伤口疼痛等症状, 通常在2-3 d后症状缓解或消失, 未出现出血、胆管瘘、肌红蛋白尿、凝血功能障碍等并发症.

**2.2 影响HCC冷冻消融后复发的单因素分析** HCC冷冻消融后复发与AFP $>200 \mu\text{g/L}$ 、HBV DNA $>5 \log_{10}$  copies/mL、肿瘤最大直径 $>3$  cm、邻近大血管有关( $P < 0.05$ , 表1).

**2.3 影响HCC冷冻消融后复发的多因素分析** 将单因素分析有统计学意义的4个变量进行多因素Logistic回归分析, 结果显示, 术前HBV DNA $>5 \log_{10}$  copies/mL、肿瘤最大直径 $>3$  cm、邻近大血管是HCC冷冻消融术后早期复发的独立危险因素( $P < 0.05$ , 表2).

## 3 讨论

近年来, 随着多元化介入治疗创新, HCC疗效

**■ 相关报道**  
Zytoon等报道称, 肿瘤直径 $>3$  cm、肿瘤邻近大血管等是射频消融治疗肝癌术后早期复发的影响因素.

**■ 创新盘点**  
目前冷冻消融技术广泛应用于肝癌治疗, 对 $<5$  cm肿瘤可彻底毁损, 甚至达到根治目的, 但术后早期复发限制其疗效的进一步提高. 因此, 探讨早期局部复发的影响因素, 对其临床应用具有重要意义.



### 应用要点

对于肿块较大或者位置特殊的肝癌病例,单纯依靠冷冻消融取得的治疗效果有限,应联合其治疗方式控制早期复发。同时应注意患者基础病变,必要时给予抗病毒治疗。

表 1 影响HCC冷冻消融术后早期复发的单因素分析

临床因素	早期复发组(n)	晚期复发组(n)	$\chi^2$ 值	P值
性别				
男	39	23	0.016	0.900
女	18	10		
年龄(岁)				
≥60	33	19	0.001	0.976
<60	24	14		
ECOG评分				
0分	32	16	0.492	0.483
1分	25	17		
AFP>200 μg/L				
是	30	10	4.220	0.040
否	27	23		
HBV DNA>5 log <sub>10</sub> copies/mL				
是	33	12	3.876	0.049
否	24	21		
ALT≥2N				
是	30	13	1.468	0.226
否	27	20		
AST≥2N				
是	13	9	0.226	0.635
否	44	24		
PLT<100 × 10 <sup>9</sup>				
是	22	14	1.073	0.300
否	35	19		
Child-Pugh分级				
A	39	19	0.128	0.721
B	18	14		
合并肝硬化				
是	36	22	0.112	0.738
否	21	11		
肿瘤个数				
1	39	24	0.185	0.667
2-3	18	9		
肿瘤最大直径(cm)				
>3	35	9	9.743	0.002
≤3	22	24		
临近大血管				
是	36	11	7.451	0.006
否	21	22		
肿瘤包膜				
有	33	17	0.344	0.557
无	24	16		

稳步提高,预后已经取得较大程度提高。但由于HCC具有高复发率的特性,所以其远期疗效仍不理想,且复发时间主要集中在治疗后2年左右<sup>[6]</sup>,2年内复发称早期复发<sup>[7]</sup>。研究发现<sup>[8,9]</sup>,早期复发是影响肝癌预后的最重要的因子。本组中,63.3%患者在治疗后2年内复发,2年内复发患者复发

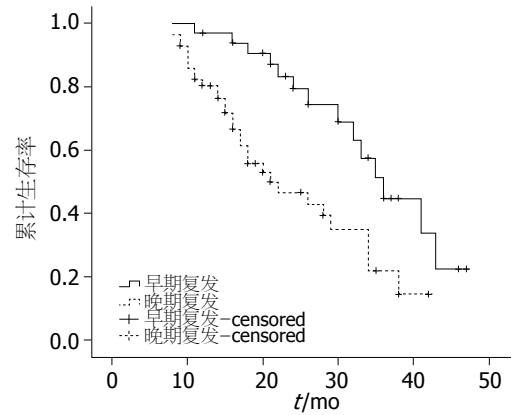


图 1 早期和晚期复发组生存时间比较。

后的中位生存时间明显较超过2年复发患者短( $P<0.05$ )。说明早期复发对HCC患者的预后影响更为明显。

在我国, HCC与HBV密切相关。HBV持续高复制状态导致相应肝脏微观及宏观改变。研究显示<sup>[10-12]</sup>,行根治性肝切除术、肝移植术或者经肝动脉化疗栓塞术后HCC复发与术前HBV病毒复制水平密切相关。本组结果显示: HBV DNA>5 log<sub>10</sub> copies/mL是冷冻消融术后肝癌早期复发的独立影响因素( $P<0.05$ )。说明HBV水平对肝癌复发早期具有明显影响,抗病毒治疗可能成为预防病毒感染相关的肝癌复发的治疗手段。

肝癌早期复发的主要原因是单中心生长的微小癌灶或微转移灶的残留<sup>[13]</sup>。肿瘤大小影响冷冻消融的治疗效果<sup>[14]</sup>,对于>3 cm的肿瘤容易因治疗范围不足导致复发。本研究中,肿瘤最大直径>3 cm是早期复发的独立危险因素( $P<0.05$ )。因此,冷冻消融应用于较大肿瘤时,可考虑行多点穿刺融合治疗以扩大有效治疗范围。肿瘤所处位置也影响冷冻消融的治疗效果。当肿瘤邻近大血管时,由于存在“热池效应”(heat sink effect),冷冻产生的能量会被血液带走,冷冻边缘功率下降,致使冷冻边缘细胞没有完全坏死,进而导致复发<sup>[15,16]</sup>。本组研究亦证实邻近大血管是冷冻消融术后复发的影响因素( $P<0.05$ )。

Peng等<sup>[17]</sup>认为AFP与肝癌切除术后复发有关,当术前AFP>200 μg/L时,肝癌术后容易早期复发,患者的预后较差。本组单因素分析显示,AFP是肝癌冷冻消融术后早期复发的影响因素,但在多因素分析中无统计学意义。原因可能是部分HCC患者血清AFP水平可能处于正常水平,其作为预测肝癌早期复发指标的尚待进一步研究。血管侵犯是目前公认肝癌复发的危险因素<sup>[18]</sup>,为更好说明小肝癌冷冻消融术后早期复发的影响

表 2 影响HCC冷冻消融术后早期复发多因素Logistic回归分析

影响因素	标准误	$\chi^2$ 值	P值	危险比	95%CI
HBV DNA>5 log10 copies/mL	0.624	8.033	0.005	5.865	1.726-19.930
肿瘤最大直径>3 cm	0.600	7.782	0.005	5.337	1.646-17.309
临近大血管	0.597	8.394	0.004	5.643	1.750-18.191

■同行评价  
 本文设计合理, 结论明确, 对临床医生有一定的参考意义。

因素, 本组中经CT及MRI证实有血管侵犯的未纳入研究。

总之, 冷冻消融术后早期复发对HCC患者的预后具有重要影响作用。甄别冷冻消融术后存在的复发危险因素, 不仅有助于治疗前的病例选择, 而且有助于个体化辅助治疗方案的制定。

#### 4 参考文献

- NCCN. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology. 2010-02; cited 2011-03. Available from: www.nccn.org
- Orlacchio A, Bazzocchi G, Pastorelli D, Bolacchi F, Angelico M, Almerighi C, Masala S, Simonetti G. Percutaneous cryoablation of small hepatocellular carcinoma with US guidance and CT monitoring: initial experience. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2008; 31: 587-594
- Weber SM, Lee FT Jr. Expanded treatment of hepatic tumors with radiofrequency ablation and cryoablation. *Oncology (Williston Park)* 2005; 19: 27-32
- Mala T. Cryoablation of liver tumours -- a review of mechanisms, techniques and clinical outcome. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2006; 15: 9-17
- Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001; 35: 421-430
- 程红岩, 徐雯, 徐爱民, 陈栋, 杨业发, 贾雨辰. 肝动脉插管化疗栓塞在预防肝癌术后复发中的应用价值. *中华肿瘤杂志* 2005; 27: 626-628
- Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, Gupta S, Moore J, Wrobel MJ, Lerner J, Reich M, Chan JA, Glickman JN, Ikeda K, Hashimoto M, Watanabe G, Daidone MG, Roayaie S, Schwartz M, Thung S, Salvesen HB, Gabriel S, Mazzaferro V, Bruix J, Friedman SL, Kumada H, Llovet JM, Golub TR. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 1995-2004
- Regimbeau JM, Abdalla EK, Vauthey JN, Lauwers GY, Durand F, Nagorney DM, Ikai I, Yamaoka Y, Belghiti J. Risk factors for early death due to recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: results of a multicenter study. *J Surg Oncol* 2004; 85: 36-41
- Shah SA, Greig PD, Gallinger S, Cattral MS, Dixon E, Kim RD, Taylor BR, Grant DR, Vollmer CM. Factors associated with early recurrence after resection for hepatocellular carcinoma and outcomes. *J Am Coll Surg* 2006; 202: 275-283
- Hung IF, Poon RT, Lai CL, Fung J, Fan ST, Yuen MF. Recurrence of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma is associated with high viral load at the time of resection. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1663-1673
- 李敏如, 易述红, 蔡常洁, 汪国营, 易慧敏, 陈规划. 肝癌患者术前HBV DNA定量水平与肝移植术后肝癌复发关系的探讨. *中华普通外科杂志* 2010; 25: 717-719
- Jang JW, Choi JY, Bae SH, Yoon SK, Woo HY, Chang UI, Kim CW, Nam SW, Cho SH, Yang JM, Lee CD. The impact of hepatitis B viral load on recurrence after complete necrosis in patients with hepatocellular carcinoma who receive transarterial chemolipiodolization: implications for viral suppression to reduce the risk of cancer recurrence. *Cancer* 2007; 110: 1760-1767
- Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, Sugawara Y, Minagawa M, Takayama T, Kawasaki S, Makuuchi M. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 2003; 38: 200-207
- Chen MS, Li JQ, Zheng Y, Guo RP, Liang HH, Zhang YQ, Lin XJ, Lau WY. A prospective randomized trial comparing percutaneous local ablative therapy and partial hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2006; 243: 321-328
- Jones JS. Effect of aberrant vasculature during cryosurgery for prostate cancer. *Urology* 2009; 73: 754-755
- Wong WS, Patel SC, Cruz FS, Gala KV, Turner AF. Cryosurgery as a treatment for advanced stage hepatocellular carcinoma: results, complications, and alcohol ablation. *Cancer* 1998; 82: 1268-1278
- Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, p53 and beta-catenin mutations. *Int J Cancer* 2004; 112: 44-50
- Shah SA, Cleary SP, Wei AC, Yang I, Taylor BR, Hemming AW, Langer B, Grant DR, Greig PD, Gallinger S. Recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: risk factors, treatment, and outcomes. *Surgery* 2007; 141: 330-339

编辑 李军亮 电编 何基才

## 胰腺血管周上皮样细胞肿瘤的临床病理特点

谢飞来, 宋屿娜, 曲利娟, 余英豪, 郑智勇

### ■背景资料

PEComas主要发生于肾脏和肝脏, 发生于胰腺的极为罕见, 目前国外仅报道6例, 国内尚未见报道。临床医生和病理医生对胰腺PEComas的临床病理特征认识不足, 容易误诊。

谢飞来, 宋屿娜, 曲利娟, 余英豪, 郑智勇, 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

作者贡献分布: 此课题由谢飞来设计; 研究过程由宋屿娜、曲利娟、余英豪及郑智勇操作完成; 本论文写作由谢飞来与曲利娟完成。

通讯作者: 曲利娟, 副主任医师, 350025, 福建省福州市西二环路北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科。  
qljuan6516@sina.com.cn

电话: 0591-24937095 传真: 0591-83717703

收稿日期: 2010-12-11 修回日期: 2011-02-28

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-03-28

### Clinicopathologic features of perivascular epithelioid cell tumor of the pancreas

Fei-Lai Xie, Yu-Na Song, Li-Juan Qu, Ying-Hao Yu, Zhi-Yong Zheng

Fei-Lai Xie, Yu-Na Song, Li-Juan Qu, Ying-Hao Yu, Zhi-Yong Zheng, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Li-Juan Qu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 North Xi'erhuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. qljuan6516@sina.com.cn

Received: 2010-12-11 Revised: 2011-02-28

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-03-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the clinicopathologic features, diagnosis, treatment and prognosis of perivascular epithelioid cell tumor (PEComa) of the pancreas.

**METHODS:** One case of PEComa of the pancreas was investigated by light microscopy and immunohistochemistry. A literature review was performed to summarize the characteristics of the disease.

**RESULTS:** The tumor was located in the head of the pancreas. Microscopically, the lesion was composed of thick or thin blood vessels and nest- or slice-shaped cells around the blood vessels. The tumor cells were huge, showed different polygons and had abundant clear to eosinophilic, granular cytoplasm. The nuclei were polymorphic and no mitoses were observed. Immunohistochemically, the tumor cells

were strongly positive for HMB45, Melan-A, SMA, HHF35 and vimentin, weakly positive for D2-40 and S-100, and negative for Syn, CK (Pan), CD117, CD34, insulin, somatostatin, gastrin, calcitonin,  $\alpha$ -hCG, ACTH, serotonin, PP, VIP and glucagon.

**CONCLUSION:** Pancreatic PEComa is a mesenchymal tumor with undetermined biological behavior and has unique histological, immunohistochemical and ultrastructural features. There are no definitely diagnostic criteria currently available to differentiate malignant and benign pancreatic PEComa. Current management has relied on surgery, and postoperative long-term close follow-up is needed.

**Key Words:** Pancreatic neoplasms; Perivascular epithelioid cell tumor; Clinicopathology; Diagnosis; Differential diagnosis

Xie FL, Song YN, Qu LJ, Yu YH, Zheng ZY. Clinicopathologic features of perivascular epithelioid cell tumor of the pancreas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 964-968

### 摘要

**目的:** 探讨胰腺血管周上皮样细胞肿瘤(perivascular epithelioid cell tumors, PEComas)的临床病理学特征、诊断、鉴别诊断、治疗方法和预后。

**方法:** 对1例罕见的胰腺PEComas进行光镜观察、免疫组织化学染色,并结合文献探讨该病的临床病理学特点。

**结果:** 肿瘤位于胰头部,光镜下可见肿瘤内含有丰富的厚壁和薄壁血管,血管周围及血管间为成巢、成片或器官样排列的上皮样细胞。肿瘤细胞体积较大,呈多边形,胞质丰富,透亮或颗粒状、淡嗜酸性。细胞核小,圆形、卵圆形或不规则形,核分裂象罕见。免疫组织化学显示肿瘤细胞HMB45、Melan-A、SMA、HHF35、Vimentin弥漫强阳性,D2-40和S-100呈弱阳性表达,Syn、CK(Pan)、CD117、CD34、Insulin、Somatostatin、Gastrin、Calcitonin、 $\alpha$ -hCG、ACTH、Serotonin、PP、

### ■同行评议者

于颖彦,教授,上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

VIP、Glucagon均阴性。

**结论:** 胰腺PEComas是一种生物学行为未定的间叶源性肿瘤, 有其独特的组织形态及免疫组织化学表型。目前尚无明确的良、恶性诊断标准。以手术完整切除为主要治疗方法, 术后密切随访。

**关键词:** 胰腺肿瘤; 血管周上皮样细胞肿瘤; 临床病理特征; 诊断; 鉴别诊断

谢飞来, 宋屿娜, 曲利娟, 余英豪, 郑智勇. 胰腺血管周上皮样细胞肿瘤的临床病理特点. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 964-968

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/964.asp>

## 0 引言

血管周上皮样细胞肿瘤(perivascular epithelioid cell tumors, PEComas)是2002年WHO软组织新分类的间叶性肿瘤, 又称具有血管周上皮样细胞分化的肿瘤, 因上皮样细胞围绕血管呈器官样、放射状排列并特异性表达黑色素细胞和肌细胞标志物而得名。目前PEComas家族成员包括: 血管平滑肌脂肪(angiomylipoma, AML)[上皮样血管平滑肌脂肪瘤(epithelioid angiomylipoma, EAML)]、肺及肺外透明细胞‘糖’瘤(clear cell ‘sugar’ tumor, CCST)、淋巴管平滑肌瘤病(lymphangiomyomatosis, LAM)、肝镰状韧带/圆韧带透明细胞肌黑色素细胞性肿瘤(clear cell myomelanocytic tumor of the falciform ligament/ligamentum teres, CCMMT)<sup>[1]</sup>。发生在胰腺的PEComas很少见, 国内未见相关文献报道。现报道中国人民解放军南京军区福州总医院病理科近期诊断的1例胰腺PEComas, 并复习文献探讨该病的临床病理学特征、诊断、鉴别诊断、治疗方法和预后, 旨在提高对该病的认识。

## 1 材料和方法

1.1 材料 患者, 女, 58岁, 因反复上腹部疼痛6 mo余, 于2010-05-27入院。腹痛为持续性胀痛, 无他处放射痛, 平卧时疼痛减轻, 伴食欲减退、乏力等症状。曾就诊当地医院, 考虑胃炎, 予胃药口服及补液(具体不详)等治疗, 上诉症状无明显缓解, 并出现全身皮肤黄染、大便陶土色, 无进行性加重, 无腹泻、腹胀、便秘、里急后重感、黑便。腹部B超示: 胰头区低回声团块, 考虑肿瘤。查血生化氯化物升高110 mmol/L, 余均在正常范围。血清肿瘤标志物: AFP 5.8 μg/L、CEA 1.99

μg/L、CA-125 9.1 kU/L、CA19-9 13.69 kU/L, 均在正常范围。腹部MRI示: 胰头部见一类圆形结节, T2WI、脂肪抑制及DWI呈稍高信号, T1WI呈低信号, 大小约2.2 cm×2.1 cm, 边界尚清, 增强扫描病灶动脉期呈明显强化, 延迟后强化有所退出, 胰管无明显扩张。诊断: 胰腺恶性肿瘤, 行胰头肿物切除术+胰肠R-Y吻合术, 术后切除标本送病理检查。

1.2 方法 手术标本经40 g/L甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 4 μm厚切片, HE染色; 采用EliVision法分别进行HMB45、Melan-A、SMA、HHF35、D2-40、S-100、Syn、CK(Pan)、CD117、CD34、Ki-67、Vimentin、Insulin、Somatostatin、Gastrin、Calcitonin、α-hCG、ACTH、Serotonin、PP、VIP、Glucagon等免疫组织化学染色。光镜观察。所用一抗和EliVision试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

## 2 结果

2.1 巨检 部分胰腺切除标本, 大小3.0 cm×2.5 cm×2.0 cm, 切面见一类圆形肿物, 大小2.2 cm×2.1 cm×1.5 cm, 边界尚清, 无明显包膜, 切面灰红灰白色, 质地较软。

2.2 镜检 肿瘤细胞呈巢状和片状排列, 与周围胰腺组织界限清楚(图1A)。肿瘤内含丰富的厚壁和薄壁血管, 上皮样细胞围绕血管或血管间呈成巢、成片或器官样排列。肿瘤细胞体积大, 呈圆形或多边形, 胞质丰富, 透亮或颗粒状、淡嗜酸性(图1B)。肿瘤细胞核小, 轻度异型, 居中或偏位, 呈圆形、卵圆形或不规则形, 染色质细腻, 核仁不明显, 无核分裂象(图1C)。

2.3 免疫组织化学染色 肿瘤细胞HMB45(图2A)、Melan-A(图2B)、SMA(图2C)、HHF35(图2D)、Vimentin弥漫强阳性, D2-40和S-100呈弱阳性表达, Syn、CK(Pan)、CD117、CD34、Insulin、Somatostatin、Gastrin、Calcitonin、α-hCG、ACTH、Serotonin、PP、VIP、Glucagon均阴性。

2.4 病理诊断 胰腺PEComas, 单向型上皮样血管平滑肌脂肪瘤。术后随访5 mo无瘤生存。

## 3 讨论

根据Martignoni等<sup>[2]</sup>2008年的报道, 血管周上皮样细胞(perivascular epithelioid cell, PEC)作为组成肾脏AML的异常肌母细胞, 是1943年由Apitz最先提出的, 直到1992年, Bonetti等<sup>[3]</sup>才赋予了

### ■ 相关报道

PEComas是1996年Zamboni等在报道1例发生在胰腺的透明细胞糖瘤时提出的, 用以描述一类具有相似形态学和免疫表型特征的肿瘤, 包括: AML、CCST、LAM、CCMT。

### ■ 创新盘点

本文主要对1例胰腺PEComas的临床诊疗经过、病理形态学特征及免疫表型进行总结,并复习相关文献,探讨胰腺PEComas的临床及病理形态学特征。

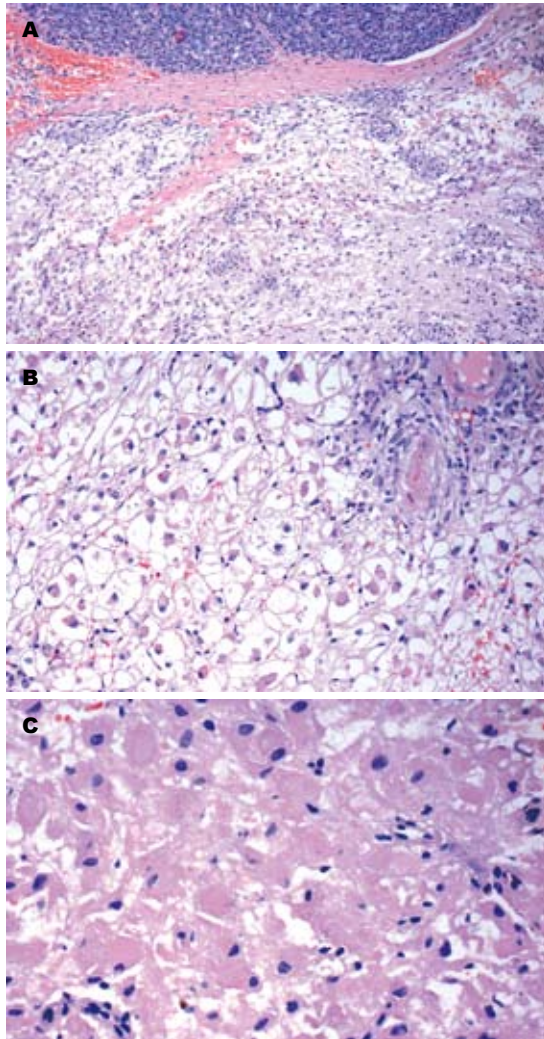


图1 胰腺PEComas的形态学表现。A: 肿瘤细胞呈巢状和片状排列,与周围胰腺组织界限清楚(HE × 100); B: 肿瘤内含丰富的厚壁和薄壁血管,上皮样细胞围绕血管或血管间呈成巢、成片或器官样排列。肿瘤细胞体积大,呈圆形或多边形,胞质丰富,透亮或颗粒状、淡嗜酸性(HE × 200); C: 肿瘤细胞核小,轻度异型,居中或偏位,呈圆形、卵圆形或不规则形,染色质细腻,核仁不明显,无核分裂象(HE × 400)。

PEC新的含义。他们将PEC定义为分布于血管周围,常围绕血管呈放射状排列,免疫组织化学特异性表达黑色素细胞及肌细胞标志物的PEC。随后,陆续发现多种发生在不同部位、貌似互不相关的肿瘤如AML、CCST、LAM、CCMMT等均由PEC组成,相互之间存在密切关系,属同一家族。因此,1996年Zamboni等<sup>[4]</sup>根据其基本的结构及其特殊的免疫表型特点将上述肿瘤定义为PEComas,并很快获得病理工作者的认可。

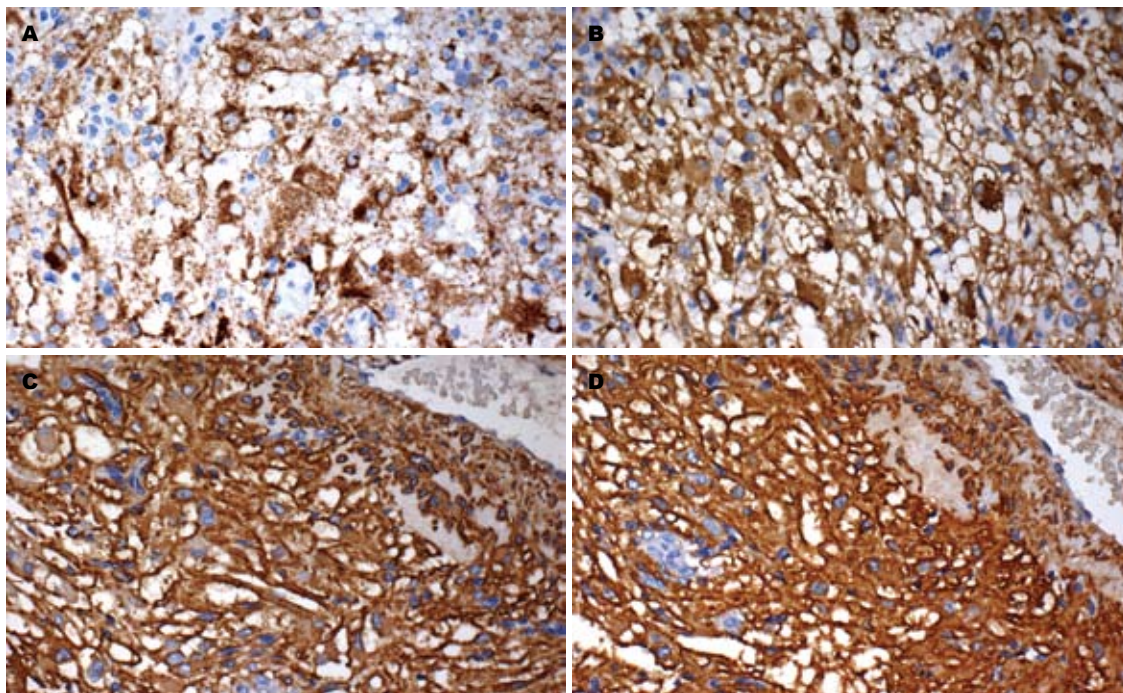
PEComas好发于实质脏器和腹腔,包括肝脏、肾脏、肺脏、子宫、胃肠道、阔韧带、乳腺、大网膜、前列腺、膀胱、胰腺、胆总管、软组织等。多见于女性,各年龄段均可发病,中位年龄46岁。临床症状取决于肿瘤发生部位,多

数表现为无痛性肿块。影像学检查:除了AML富含脂肪外,家族其他成员常因肿瘤无脂肪成分而难以与癌或肉瘤鉴别<sup>[2]</sup>。发生在胰腺的PEComas很罕见,自1996年Zamboni等<sup>[4]</sup>报道首例以来,迄今仅国外报道6例<sup>[4,6-9]</sup>,均为女性,中位年龄54岁,临床常表现为腹痛、腹胀、食欲减退和体质量下降,实验室检查常无特殊。本文报道的胰腺PEComas,系女性患者,临床表现反复上腹痛6 mo余,对症治疗无明显缓解,并出现全身皮肤黄染、大便陶土色,体质量下降7 kg,腹部MRI示胰头占位,拟胰腺恶性肿瘤而收治入院。

关于PEComas的组织起源及发病机制迄今尚不十分清楚。有研究发现,1/3-1/2的AML和LAM患者临床伴有结节性硬化综合征(the tuberous sclerosis complex, TSC),准确地讲与TSC1和TSC2基因突变有关<sup>[10]</sup>。TSC为常染色体显性遗传性疾病,系由TSC1(9q34)和TSC2(16p13.3)基因突变、缺失等引起的一系列临床症状。TSC基因通过调节Rheb/mTOR/p70S6K途径上发挥重要作用。Kenerson等<sup>[11]</sup>证实在AML中磷酸化的p70S6K(mTOR活性的标志物)高表达,磷酸化的蛋白激酶B的低表达与TSC1或TSC2功能破坏是一致的。

尽管PEComas家族成员的肿瘤细胞均为PEC,但不同成员的组织形态学表现不尽相同。AML主要由比例不等的脂肪组织、梭形或上皮样的平滑肌细胞和异常的厚壁血管3种成分混合组成。CCST由纤细的血管网和围绕血管周围成片、成巢或器官样排列的上皮样或梭形透明细胞组成,一般无厚壁血管。CCMMT与CCST相似,由大量纤细的血管网将梭形或上皮样细胞分隔成巢状、片状和腺泡状。LAM由淋巴管及其周围增生的淋巴管肌细胞所组成。有学者提出AML、CCST、CCMMT和LAM可能是PEComas的不同阶段,建议诊断时除了用PEComas外,还需注明具体名称,以便临床医生更好的理解<sup>[2]</sup>。

PEComas免疫表型具有特征性,所有家族成员均特异性表达黑色素细胞和平滑肌细胞标志物,而上皮细胞标记(CK、EMA)阴性。黑色素细胞标志物中HMB45表达最敏感,其次是Melan-A和MitF;平滑肌标记主要表达SMA和Actin。此外,肿瘤细胞还可以表达desmin、Vimentin、S-100等。超微结构特征:肿瘤细胞外可见间断的基膜样物质,胞质内细胞器较丰富,可见成束的微丝、糖原颗粒、发育好的粗面内质网、大量线粒体和类似黑色素小体的结构及致密颗粒。



**■应用要点**  
 胰腺PEComas的组织形态学表现多样化, 容易误诊. 在胰腺肿瘤的鉴别诊断中应想到此肿瘤的可能, 免疫组织化学同时表达黑色素细胞和平滑肌细胞标志物有助鉴别.

图 2 胰腺PEComas的免疫表型(EliVision × 400). A: 肿瘤细胞HMB45阳性; B: 肿瘤细胞Melan-A阳性; C: 肿瘤细胞SMA阳性; D: 肿瘤细胞HHF35阳性.

PEComas生物学行为未定, 原因在于该病是WHO新近分类的肿瘤, 迄今无大宗病例报道, 人们对其预后认识不足. 已有报道显示PEComas有良性、交界性和恶性<sup>[12,13]</sup>. Folpe等<sup>[14]</sup>总结了26例软组织和女性生殖系统PEComas并提出以下诊断暂行标准. (1)良性: 肿瘤直径≤5 cm、非浸润性生长、无高的核分级和细胞高密度、核分裂象≤1个/50个HPF、无坏死、无血管侵犯; (2)恶性潜能未定: 仅有核的多形性/多核巨细胞、或肿瘤直径仅>5 cm; (3)恶性: 具有两个或更多下列相关指标: 肿瘤直径>5 cm、浸润性生长、高的核分级和细胞高密度、核分裂象>1个/50 HPF、坏死、血管侵犯.

本例形态学特征表现如下: (1)形态多样的上皮样细胞呈弥漫、不规则片状、结节状, 或围绕扩张的厚壁/薄壁血管呈放射状排列; (2)肿瘤细胞呈圆形、多边形或短梭形, 胞质丰富、透明至淡嗜伊红色; 细胞核圆形或不规则形、居中或偏位, 染色质细腻, 核仁不明显, 核分裂象罕见; (3)免疫表型: HMB45、Melan-A、SMA、HHF35、Vimentin弥漫强阳性, D2-40和S-100弱阳性, Syn、CK(Pan)、CD117、CD34、Insulin、Somatostatin、Gastrin、Calcitonin、α-hCG、ACTH、Serotonin、PP、VIP、Glucagon均阴性. 本例肿瘤中虽无脂肪成分, 但富含厚壁、扭曲的血管, 最后诊断: 胰腺PEComas, 单

向型EAML.

胰腺PEComas需要与以下原发性及继发性胰腺肿瘤进行鉴别诊断: (1)恶性黑色素瘤<sup>[15]</sup>: 二者肿瘤细胞均表达HMB-45、Melan-A, 但后者还表达S-100, 而不表达肌源性标志物; (2)原发性或继发性透明细胞癌<sup>[16]</sup>: 透明细胞癌亦富于糖原及纤细的血管网, 细胞异型性也不明显, 很难与CCST鉴别, 但后者表达上皮性, 而不表达HMB-45和肌源性标志物, 易与CCST鉴别; (3)神经内分泌肿瘤<sup>[17]</sup>: 好发于胰腺, 肿瘤也富于血管, 但后者表达神经内分泌的标记, 而不表达HMB-45和肌源性标志物, 很容易鉴别; (4)恶性纤维组织细胞瘤<sup>[18]</sup>: 肿瘤由纤维组织细胞组成, 常呈梭形、车辐状排列, 另见大量瘤巨细胞、病理核分裂象及间质炎症细胞浸润. 仅从形态学特点很容易与前者鉴别; (5)实性-假乳头状瘤<sup>[19]</sup>: 组织学可见瘤细胞围绕血管排列成片块状、巢状的实性区及有纤维血管轴心的分支状假乳头两种排列方式, 肿瘤细胞不表达HMB-45、Melan-A, 但表达CD10、CD56、NSE等; (6)嗜酸细胞瘤<sup>[20]</sup>: 由成片或成巢富含颗粒状、嗜酸性胞质的瘤细胞构成, 不易与前者区别, 但后者细胞核大, 核仁明显, 且表达上皮性标志物, 而不表达HMB-45和肌源性标志物, 可以鉴别.

PEComas以手术完整切除为主要治疗方

### 同行评价

本文选题新颖, 对从事肿瘤病理诊断工作者有较好的借鉴作用。

法, 针对该病的特效性药物治疗目前无相关文献报道。Kenerson等<sup>[11]</sup>通过免疫组织化学和免疫印记证实, 临床不伴有TSC的肾及肾外AML中有1/2病例TSC失活及mTOR高表达。Rapamycin是特效的mTOR抑制剂<sup>[21]</sup>, 目前动物TSC模型及临床肾AML的治疗研究已取得满意效果, 但是否适用于其他部位的PEComas, 有待进一步研究。PEComas的预后与肿瘤大小、浸润性生长模式、高级别核、肿瘤坏死、核分裂象、是否转移等生物学行为密切相关。多数恶性PEComas与高度恶性肉瘤一样, 具有高度侵袭性, 容易发生早期转移而死亡。少数恶性PEComas可在若干年(7-9年)后发生转移<sup>[2]</sup>。

总之, 胰腺PEComas是一种生物学行为未定的间叶源性肿瘤, 有其独特的组织学形态、免疫组织化学表型以及超微结构特征。目前尚无明确的良、恶性诊断标准, 治疗主要以手术为主, 并在术后长期密切随访。

### 4 参考文献

- Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. Pathology and Genetics of Tumors of Soft Tissue and Bone. World Health Organization Classification of Tumors, Lyon, France: IARC Press, 2002: 221-222
- Martignoni G, Pea M, Reghellin D, Zamboni G, Bonetti F. PEComas: the past, the present and the future. *Virchows Arch* 2008; 452: 119-132
- Bonetti F, Pea M, Martignoni G, Zamboni G. PEC and sugar. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 307-308
- Zamboni G, Pea M, Martignoni G, Zancanaro C, Faccioli G, Gilioli E, Pederzoli P, Bonetti F. Clear cell "sugar" tumor of the pancreas. A novel member of the family of lesions characterized by the presence of perivascular epithelioid cells. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 722-730
- Heywood G, Smyrk TC, Donohue JH. Primary angiomyolipoma of the pancreas. *Pancreas* 2004; 28: 443-445
- Ramuz O, Lelong B, Giovannini M, Delperio JR, Rochaix P, Xerri L, Hassoun J, Flejou JF, Monges G. "Sugar" tumor of the pancreas: a rare entity that is diagnosable on preoperative fine-needle biopsies. *Virchows Arch* 2005; 446: 555-559
- Périgny M, Laroche O, Hammel P, Sauvanet A, Dokmak S, Belghiti J, Ruszniewski P, Vilgrain V, Bedossa P, Couvelard A. [Pancreatic perivascular epithelioid cell tumor (PEComa)]. *Ann Pathol* 2008; 28: 138-142
- Hirabayashi K, Nakamura N, Kajiwara H, Hori S, Kawaguchi Y, Yamashita T, Dowaki S, Imaizumi T, Osamura RY. Perivascular epithelioid cell tumor (PEComa) of the pancreas: immunoelectron microscopy and review of the literature. *Pathol Int* 2009; 59: 650-655
- Baez JC, Landry JM, Saltzman JR, Qian X, Zinner MJ, Mortelé KJ. Pancreatic PEComa (sugar tumor): MDCT and EUS features. *JOP* 2009; 10: 679-682
- van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nelling M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D, Sampson JR, Reeve MP, Richardson P, Wilmer F, Munro C, Hawkins TL, Sepp T, Ali JB, Ward S, Green AJ, Yates JR, Kwiatkowska J, Henske EP, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 1997; 277: 805-808
- Kenerson H, Folpe AL, Takayama TK, Yeung RS. Activation of the mTOR pathway in sporadic angiomyolipomas and other perivascular epithelioid cell neoplasms. *Hum Pathol* 2007; 38: 1361-1371
- Yamamoto H, Oda Y, Yao T, Oiwa T, Kobayashi C, Tamiya S, Kawaguchi K, Hino O, Tsuneyoshi M. Malignant perivascular epithelioid cell tumor of the colon: report of a case with molecular analysis. *Pathol Int* 2006; 56: 46-50
- Gleeson FC, de la Mora Levy JG, Zhang L, Levy MJ. The differential broadens. EUS FNA appearance and cytological findings of pancreatic angiomyolipoma. *JOP* 2008; 9: 67-70
- Folpe AL, Mentzel T, Lehr HA, Fisher C, Balzer BL, Weiss SW. Perivascular epithelioid cell neoplasms of soft tissue and gynecologic origin: a clinicopathologic study of 26 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1558-1575
- He MX, Song B, Jiang H, Hu XG, Zhang YJ, Zheng JM. Complete resection of isolated pancreatic metastatic melanoma: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4621-4624
- Lee HY, Lee DG, Chun K, Lee S, Song SY. Clear cell carcinoma of the pancreas - a case report and review of the literature-. *Cancer Res Treat* 2009; 41: 175-181
- 盖保东, 肖钟迪. 胃肠胰腺神经内分泌肿瘤诊治进展. *中华内分泌外科杂志* 2009; 3: 76-79
- Yu RS, Wang JW, Chen Y, Ding WH, Xu XF, Chen LR. A case of primary malignant fibrous histiocytoma of the pancreas: CT and MRI findings. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2942-2945
- Liu X, Rauch TM, Siegal GP, Jhala N. Solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas: Three cases with a literature review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14: 445-453
- Zerbi A, De Nardi P, Braga M, Radice F, Sironi M, Di Carlo V. An oncocytic carcinoma of the pancreas with pulmonary and subcutaneous metastases. *Pancreas* 1993; 8: 116-119
- Cohen E. mTOR inhibitors. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006; 4: 38-39

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

## 代谢综合征与中老年人结直肠腺瘤型息肉的关系

郭美霞, 张晓华, 朱人敏, 杨妙芳, 吴晓尉

郭美霞, 张晓华, 朱人敏, 杨妙方, 吴晓尉, 中国人民解放军南京军区南京总医院干部消化内科 江苏省南京市 210002  
作者贡献分布: 郭美霞与朱人敏对此文所作贡献均等; 此课题由郭美霞、张晓华及朱人敏设计; 研究过程由郭美霞、杨妙芳及吴晓尉操作完成; 数据分析及论文写作由郭美霞与张晓华完成。  
通讯作者: 张晓华, 博士, 210001, 江苏省南京市, 中国人民解放军南京军区南京总医院干部消化内科. jszhxh@sina.com  
收稿日期: 2011-01-13 修回日期: 2011-02-21  
接受日期: 2011-03-02 在线出版日期: 2011-03-28

### Correlation between metabolic syndrome and colorectal adenomatous polyps in middle- and old-aged patients

Mei-Xia Guo, Xiao-Hua Zhang, Ren-Min Zhu, Miao-Fang Yang, Xiao-Wei Wu

Mei-Xia Guo, Xiao-Hua Zhang, Ren-Min Zhu, Miao-Fang Yang, Xiao-Wei Wu, Cadres Ward, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Hua Zhang, Cadres Ward, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. jszhxh@sina.com  
Received: 2011-01-13 Revised: 2011-02-21  
Accepted: 2011-03-02 Published online: 2011-03-28

### Abstract

**AIM:** To explore the correlation between metabolic syndrome (MS) and colorectal adenomatous polyps (CAP) in middle- and old-aged patients.

**METHODS:** The clinical data for 114 middle- and old-aged patients who were hospitalized at our hospital from January 2007 to October 2010 were retrospectively analyzed. They were divided into two groups: patients with CAP (CAP group,  $n = 64$ ) and those without CAP (control group,  $n = 50$ ). Blood glucose, blood lipids, blood pressure, body mass, height, and blood uric acid were compared between the two groups. MS was diagnosed according to the criteria proposed by the Chinese Diabetes Society. Univariate and multivariate analyses were performed.

**RESULTS:** Patients with CAP had significantly

higher rates of MS, high blood pressure, abnormal blood glucose and abnormal blood lipids than controls (35.9% vs 8.0%, 67.2% vs 44%, 28.1% vs 6.0%, 48.4% vs 30.0%, all  $P < 0.05$ ). Although there was no significant difference in body mass index (BMI) between the two groups, the prevalence of high BMI had a tendency to rise in the CAP group (39% vs 24%,  $P < 0.1$ ). No significant difference was noted in the prevalence of hyperuricemia between the two groups. CAP was significantly correlated with MS and abnormal blood glucose ( $OR = 4.878, 4.094$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Patients with MS or diabetes are associated with a higher risk of CAP. MS and abnormal blood glucose may be independent risk factors for CAP in middle- and old-aged patients.

**Key Words:** Metabolic syndrome; Colorectal adenoma; Polyps; Risk factor

Guo MX, Zhang XH, Zhu RM, Yang MF, Wu XW. Correlation between metabolic syndrome and colorectal adenomatous polyps in middle- and old-aged patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 969-971

### 摘要

**目的:** 研究代谢综合征(metabolic syndrome, MS)与中老年人结直肠腺瘤型息肉(colorectal adenoma polyps, CAP)的关系。

**方法:** 回顾性分析2007-1/2010-10在中国人民解放军南京军区南京总医院干部消化内科住院期间做电子结肠镜检查的45岁以上患者114例的病例资料, 根据是否患有CAP分为CAP组( $n = 64$ )和对照组( $n = 50$ ), 调查各组患者血糖、血脂、血压、体质量、身高和尿酸情况。根据中华医学会糖尿病分会MS的诊断标准诊断MS, 应用单变量和多变量进行统计分析。

**结果:** (1)单因素分析中老年人CAP组MS、高血压、血糖异常和血脂异常患病率明显高于对照组(35.9% vs 8.0%; 67.2% vs 44%; 28.1% vs 6.0%; 48.4% vs 30.0%, 均 $P < 0.05$ )。虽

### 背景资料

结直肠息肉是指突出肠道黏膜的赘生物, 包括增生性息肉、炎性息肉、腺瘤及其他肿瘤等, 其中以腺瘤发病率为最高, 是公认的癌前病变, 因此对腺瘤型息肉的早期诊断及治疗对预防结肠直肠癌尤为重要。

### 同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科



### ■相关报道

Garow等收集近58 000例受试对象临床资料,发现1 200例患有MS,其中有350例患有结直肠癌,提示MS患者结直肠癌的风险明显增加。MS是肿瘤的独立危险因素,这与炎症、脂质氧化及胰岛素抵抗有关

然两组体质量指数(BMI)患病率无统计学差异,但CAP组BMI患病率有上升的趋势(39% vs 24%),两组高尿酸血症患病率无统计学差异;(2)应用多因素逐步Logistic回归分析,MS及血糖异常仍与中老年CAP相关( $OR = 4.878, 4.094$ ; 均 $P < 0.05$ )。

**结论:** MS和糖尿病患者是中老年CAP发病高危人群,糖尿病是中老年CAP的独立危险因素。

**关键词:** 代谢综合征; 结直肠腺瘤; 息肉; 危险因素

郭美霞, 张晓华, 朱人敏, 杨妙芳, 吴晓尉. 代谢综合征与中老年人结直肠腺瘤型息肉的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 969-971

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/969.asp>

## 0 引言

结直肠息肉是指突出肠道黏膜的赘生物,包括增生性息肉、炎性息肉、腺瘤及其他肿瘤等,其中以腺瘤发病率为最高,是公认的癌前病变,因此对腺瘤型息肉的早期诊断及治疗对预防结直肠癌尤为重要。大量研究证实代谢综合征(metabolic syndrome, MS)是结直肠癌的危险因素<sup>[1]</sup>,但MS与结直肠腺瘤的相关性国内报道较少,本研究通过调查患者血糖、血脂、体质量指数(body mass index, BMI)、高血压病及尿酸情况,探讨MS与中老年结直肠腺瘤型息肉(colorectal adenoma polyps, CAP)的相关性,旨在提高对高危人群CAP的检出率,早期发现和治疗CAP,预防结直肠癌的发生。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择2007-01/2010-10入住中国人民解放军南京军区南京总医院干部消化内科行电子结肠镜检查的45岁以上住院患者114例,其中男97例,女17例。根据中华医学会糖尿病分会MS的诊断标准<sup>[2]</sup>,符合以下4项中的3项以上者诊断MS患者:(1)FPG $\geq 6.1$  mmol/L,餐后2 h血糖 $\geq 7.8$  mmol/L,和(或)已确诊糖尿病并治疗者;(2)BMI $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>;(3)TG $\geq 1.7$  mmol/L,和(或)HDL-C男 $< 0.9$  mmol/L,女 $< 1.0$  mmol/L;(4)收缩压/舒张压 $\geq 140/90$  mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)或已经治疗者。尿酸 $\geq 430$   $\mu$ mol/L诊断为高尿酸血症。

**1.2 方法** 采用自制的病例调查表对2007-01/2010-10上述调查对象进行回顾性调查。所有电子结肠镜下发现结直肠息肉单发的患者均送病理学检查,多发息肉的患者选取有代表性的息

肉标本送病理学检查。剔除了病理确诊结肠癌4例,炎症性肠病患者3例,资料不完整的3例后,根据是否发现CAP,将114例患者分为CAP组和对照组,CAP64例,年龄45-87岁,对照组50例,年龄47-91岁,包括电子结肠镜正常者35例和增生性息肉患者15例,因炎症型息肉癌变率极低,因此将炎症型息肉纳入对照组。调查同期患者高血压病、糖尿病病史,体质量和身高,清晨7:00空腹静脉抽血送检的葡萄糖、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇及尿酸。行有关统计学分析血糖、血脂、BMI、高血压病及尿酸与中老年患者CAP相关性。

**统计学处理** 应用SPSS13.0软件进行统计学分析。先做单因素分析,计数资料采用4个表 $\chi^2$ 检验,分析2组病例所患MS及其各组分、高尿酸血症的差异,在选择单因素中分析中差异有统计学意义的指标作自变量,以CAP为因变量,采用非条件多因素逐步Logistic回归分析,分析MS及其各组分、高尿酸血症对中老年CAP的影响,以 $P < 0.05$ 有统计学意义, $P < 0.01$ 有显著性统计学意义。

## 2 结果

**2.1 2组MS及各组分、高尿酸血症单因素比较** CAP组MS、高血压、血糖异常和血脂异常患病率明显高于对照组( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义,2组BMI患病率虽然无统计学差异,但CAP组患病率较对照组有上升趋势( $P < 0.1$ ),可增加病例数,进行统计学分析,2组高尿酸血症患病率无统计学差异(表1)。

**2.2 2组MS及各组分发病率的多因素比较** 选取表1中单因素分析 $P < 0.1$ 的变量MS、血脂异常、高血压、BMI $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>、血糖异常作自变量,CAP为因变量作多因素非条件逐步Logistic回归分析,2组MS有显著统计学差异( $OR = 4.878, 95\%CI: 1.492-15.946, P < 0.01$ ),2组血糖异常有统计学差异( $OR = 4.094, 95\%CI: 1.061-15.798, P < 0.05$ )。MS和糖尿病患者是CAP发病高危人群,糖尿病是中老年CAP的独立危险因素。

## 3 讨论

不同学术机构对MS的定义有所不同,但其主要组分类似,包括中心型肥胖、高血压、血糖和血脂代谢异常,因此常合并存在,所以采用MS来描述。北京老年人群的患病率22.2%,本研究中老年MS患病率约为25%,与我国其他地区老年人患病率相似<sup>[3]</sup>。大量研究表明MS发病率与

表 1 CAP组与对照组MS及其各组分单因素分析  $n(\%)$ 

分组	$n$	MS	血脂异常	高血压	BMI	血糖异常	尿酸异常
对照组	50	4(8.0)	15(30.0)	22(44.0)	12(24.0)	3(6.0)	2(4.0)
CAP组	64	23(35.9)	31(48.4)	43(67.2)	25(39.0)	18(28.1)	6(9.4)
$P$ 值		0.000	0.031	0.008	0.088	0.000	0.265

## ■同行评价

本文设计新颖, 结论可靠, 对指导临床筛查中老年人结直肠腺瘤型息肉有指导意义。

年龄呈正相关<sup>[4]</sup>, 这可能与长期高脂饮食及缺乏运动有关。CAP为癌前病变, 50%-70%的结直肠癌来源于腺瘤, 从腺瘤到癌变是一逐渐演变的过程, 一般需10年左右, 腺瘤绒毛成分越多, 癌变率越高<sup>[5]</sup>。早期发现和治疗结直肠腺瘤, 能有效减少结肠癌患病率<sup>[6]</sup>。结直肠息肉近年发病率有上升趋势, 主要以老年人发病为主, 50岁以上的老年人其发病率达20%-25%, 与中老年MS患病率相似。本文主要探讨中老年APC与MS相关性, 旨在提高中老年高危人群CAP检出率, 减少结直肠癌的发生。

Garow等<sup>[7]</sup>收集近58 000例受试对象临床资料, 发现1 200例患有MS, 其中有350例患有结直肠癌, 提示MS患者结直肠癌的风险明显增加。MS是肿瘤的独立危险因素, 这与炎症、脂质氧化及胰岛素抵抗有关<sup>[8,9]</sup>。在本研究中CAP组MS患病率较对照组明显升高, 与文献报道一致<sup>[10]</sup>。其可能机制: 胰岛素、胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)分别作用于胰岛素受体及IGF-1受体, 促进结肠上皮细胞的增殖, 分化及凋亡<sup>[11]</sup>, 在MS患者中, 多有胰岛素抵抗, 超高胰岛素血症, 此时胰岛素、IGF-1主要促进细胞增殖、分化, 加快细胞更新, 抑制细胞凋亡, 使得肠黏膜上皮细胞过度分化、增殖, 同时凋亡减少, IGF-1还可促进血管内皮生长因子合成, 综合促进肿瘤生长<sup>[12]</sup>。另外糖尿病继发的周围神经病变及周围血管病变, 可导致患者肠道蠕动减弱, 长期便秘, 肠黏膜屏障功能减弱, 毒素吸收增加, 加重对肠黏膜的毒性作用。

本研究显示MS和血糖异常是中老年人CAP的危险因素, 积极防治MS和糖尿病患者便秘等并发症, 并提高对MS患者腺瘤型息肉的检出率,

有助于早期预防结直肠癌的发生。

## 4 参考文献

- Ahmed RL, Schmitz KH, Anderson KE, Rosamond WD, Folsom AR. The metabolic syndrome and risk of incident colorectal cancer. *Cancer* 2006; 107: 28-36
- 中华医学会糖尿病学分会代谢综合征研究协作组. 中华医学会糖尿病学分会关于代谢综合征的建议. *中华糖尿病杂志* 2004; 12: 156-161
- 田慧. 评估代谢综合征的临床意义. *解放军医学杂志* 2008; 33: 8-11
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-1428
- 欧希龙, 孙为豪, 曹大中, 俞谦, 俞婷, 张有珍, 吴志英. 27例大肠息肉癌变内镜特点及诊治. *中国内镜杂志* 2005; 11: 804-809
- Citarda F, Tomaselli G, Capocaccia R, Barcherini S, Crespi M. Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut* 2001; 48: 812-815
- Garow D. Metabolic syndrome is a risk factor for colorectal cancer in the United States. American College of Gastroenterology 2008 Annual Scientific Meeting, October 6, 2008
- Jee SH, Kim HJ, Lee J. Obesity, insulin resistance and cancer risk. *Yonsei Med J* 2005; 46: 449-455
- Kang HW, Kim D, Kim HJ, Kim CH, Kim YS, Park MJ, Kim JS, Cho SH, Sung MW, Jung HC, Lee HS, Song IS. Visceral obesity and insulin resistance as risk factors for colorectal adenoma: a cross-sectional, case-control study. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 178-187
- Kim JH, Lim YJ, Kim YH, Sung IK, Shim SG, Oh SO, Park SS, Yang S, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Rhee JC, Choi YH. Is metabolic syndrome a risk factor for colorectal adenoma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1543-1546
- Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut* 2006; 55: 285-291
- Kaaks R, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Lukanova A, Biessy C, Dechaud H, Rinaldi S, Zeleniuch-Jacquotte A, Shore RE, Riboli E. Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1592-1600

编辑 李薇 电编 何基才

# COX-2、15-PGDH在结直息肉组织中的表达及其作用

方兴国, 赵逵, 杨芳, 周元昆, 王红

## ■背景资料

结直肠癌是影响人类健康的最常见恶性肿瘤之一, 近年来随着人们生活方式和生活习惯的改变, 其发病率在不断上升。研究已证实超过80%以上的结直肠癌是由息肉恶变而来, 使得结肠息肉(尤其是腺瘤性息肉)被公认是结肠癌的癌前病变。

方兴国, 赵逵, 杨芳, 周元昆, 王红, 遵义医学院附属医院消化内科 贵州省遵义市 563003

贵州省科技计划基金资助项目, No. 20071031

作者贡献分布: 方兴国与赵逵对此文所作的贡献均等; 本研究由赵逵设计; 实验标本由王红提供; 研究过程由方兴国、杨芳及周元昆共同完成; 研究所用试剂及分析工具由赵逵提供; 数据分析及写作由方兴国完成。

通讯作者: 赵逵, 教授, 硕士生导师, 563003, 贵州省遵义市大连路149, 遵义医学院附属医院消化内科。

kuizhao95868@msn.com

电话: 0852-8608155

收稿日期: 2010-12-27 修回日期: 2011-03-02

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-03-28

## Role of COX-2 and 15-PGDH expression in colorectal tumorigenesis

Xing-Guo Fang, Kui Zhao, Fang Yang, Yuan-Kun Zhou, Hong Wang

Xing-Guo Fang, Kui Zhao, Fang Yang, Yuan-Kun Zhou, Hong Wang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Guizhou Province, No. 20071031

Correspondence to: Professor Kui Zhao, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 149 Dalian Road, Zunyi 563003, Guizhou Province China. kuizhao95868@msn.com

Received: 2010-12-27 Revised: 2011-03-02

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of cyclooxygenase (COX)-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) expression in colorectal tumorigenesis.

**METHODS:** Dissected samples of colorectal polyps from 48 consecutive patients with adenomatous polyps and 25 patients with hyperplastic polyps, who underwent colonoscopy at our hospital from February 2009 to October 2009, were used in this study. Carcinomatous tissue samples surgically dissected from 15 patients with colorectal adenocarcinoma and 15 endoscopically taken normal colorectal mucosal samples were used as controls. The protein and mRNA expression of COX-2 and 15-PGDH was analyzed by RT-PCR and Western blot, respec-

tively.

**RESULTS:** Colorectal adenocarcinoma showed the highest expression level of COX-2 mRNA and protein, followed by adenomatous polyps, hyperplastic polyps, and normal mucosa ( $429.184 \pm 45.721$  vs  $9.859 \pm 1.151$ ,  $83.387 \pm 15.957$ ,  $155.732 \pm 28.395$ ;  $0.772 \pm 1.054$  vs  $0.138 \pm 0.025$ ,  $0.557 \pm 0.131$ ,  $0.509 \pm 0.087$ , all  $P < 0.05$ ). There was no significant difference in COX-2 protein expression level between adenomatous polyps and hyperplastic polyps though significant differences were noted among normal mucosa, polyps, and carcinoma. Normal colorectal mucosa showed the highest expression level of 15-PGDH mRNA and protein, followed by hyperplastic polyps, adenomatous polyps and adenocarcinoma ( $5.234 \pm 0.358$  vs  $918.260 \pm 82.116$ ,  $125.380 \pm 28.713$ ,  $12.036 \pm 3.509$ ;  $0.186 \pm 0.058$  vs  $0.762 \pm 0.165$ ,  $0.443 \pm 0.085$ ,  $0.202 \pm 0.042$ , all  $P < 0.05$ ). The absence of 15-PGDH protein expression was found in both adenocarcinoma and adenomatous polyps. There was no significant difference in 15-PGDH protein expression level between adenomatous polyps and adenocarcinoma though significant differences were noted in 15-PGDH protein expression levels among normal mucosa, hyperplastic polyps, and carcinoma.

**CONCLUSION:** Increased COX-2 expression and decreased 15-PGDH expression may be involved in colorectal carcinogenesis.

**Key Words:** Cyclooxygenase-2; 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase; Intestinal polyps; Colorectal cancer

Fang XG, Zhao K, Yang F, Zhou YK, Wang H. Role of COX-2 and 15-PGDH expression in colorectal tumorigenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 972-975

## 摘要

**目的:** 探讨环氧合酶-2(COX-2)和15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)在结直肠息肉组织中的表达及在息肉恶变中的作用。

**方法:** 选取2009-02/2009-10肠镜下摘除的结直

## ■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科

腺瘤性息肉48例及增生性息肉25例, 活检或外科手术的结肠腺癌15例及正常结肠黏膜15例作为对照. 采用RT-PCR和Western blot分别检测各组织中COX-2、15-PGDH mRNA和蛋白的表达.

**结果:** COX-2 mRNA和蛋白的相对表达量在正常黏膜、增生性息肉、腺瘤性息肉和腺癌组中逐渐增加, 在腺癌组中表达量最多( $429.184 \pm 45.721$  vs  $9.859 \pm 1.151$ ,  $83.387 \pm 15.957$ ,  $155.732 \pm 28.395$ ;  $0.772 \pm 1.054$  vs  $0.138 \pm 0.025$ ,  $0.557 \pm 0.131$ ,  $0.509 \pm 0.087$ , 均  $P < 0.05$ ), COX-2蛋白在腺瘤组与增生性息肉组之间比较无差异, 余各组之间差异比较均有统计学意义. 15-PGDH mRNA和蛋白相对表达量在正常黏膜、增生性息肉、腺瘤性息肉及腺癌组中表达逐渐降低( $5.234 \pm 0.358$  vs  $918.260 \pm 82.116$ ,  $125.380 \pm 28.713$ ,  $12.036 \pm 3.509$ ;  $0.186 \pm 0.058$  vs  $0.762 \pm 0.165$ ,  $0.443 \pm 0.085$ ,  $0.202 \pm 0.042$ , 均  $P < 0.05$ ), 在腺瘤组和腺癌组中均可见到表达缺失, 腺瘤组与腺癌组之间比较无差异, 余各组之间比较差异均有统计学意义.

**结论:** COX-2表达的升高和15-PGDH表达的降低或缺失可共同作用于结肠癌发生和发展中, 二者可能具有协同致癌的作用.

**关键词:** 环氧合酶-2; 15-羟基前列腺素脱氢酶; 肠息肉; 结肠癌

方兴国, 赵逢, 杨芳, 周元昆, 王红. COX-2、15-PGDH在结直肠组织中的表达及其作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 972-975  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/972.asp

## 0 引言

结肠癌是影响人类健康的最常见恶性肿瘤之一, 近年来随着人们生活方式和生活习惯的改变, 其发病率在不断上升. 研究已证实超过80%以上的结肠癌是由息肉恶变而来, 使得结肠息肉(尤其是腺瘤性息肉)被公认是结肠癌的癌前病变. 研究发现, 环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达的升高及15-羟基前列腺素脱氢酶(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, 15-PGDH)表达的降低或缺失与多种癌症的发生、发展密切相关<sup>[1-6]</sup>. 但他们在结直肠息肉中的表达如何以及对息肉恶变的影响目前研究较少. 本实验采用RT-PCR和Western blot法分别对结直肠腺瘤性息肉、增生性息肉、结直肠腺

癌及正常结肠黏膜组织中COX-2、15-PGDH mRNA和蛋白质的表达进行检测, 以探讨二者在结直肠息肉组织中的作用关系及对息肉恶变的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取2009-02/2009-10在遵义医学院肠镜检查或外科手术并经病理确诊的结直肠腺瘤性息肉48例, 男25例, 女23例, 平均为46岁±2岁; 结直肠增生性息肉25例, 男13例, 女12例, 平均为42岁±3岁; 结直肠腺癌15例, 男7例, 女8例, 平均为50岁±5岁; 正常肠黏膜组织15例, 男9例, 女6例, 平均为40岁±2岁. 所选的所有病例近半年来无长期服用非甾体抗炎药, 无严重的炎症性疾病及其他肿瘤病史. 将留取部分各组织标本放入福尔马林中送病理以确定组织学类型, 余下组织剪成大小约0.2 cm×0.2 cm×0.5 cm组织块, 用生理盐水反复冲洗数次去除粪质和血液残留物, 装入EP管标记后转入液氮罐中保存备用.

### 1.2 方法

**1.2.1 COX-2、15-PGDH mRNA表达的检测:** 用TRIzol(Invitrogen公司)提取各组织中的总RNA, 紫外分光光度法定量RNA. 按逆转录试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)说明合成cDNA, 逆转录反应: 37 °C反应15 min, 逆转录酶的失活反应: 85 °C反应5 s. 根据基因设计要求从GenBank查出相关引物碱基序列(由大连宝生物工程公司合成): COX-2(81 bp): 上游引物5'CTGGAA-CATGGAATTACCCAGTTTG3', 下游引物5'TG-GAACATTCCTACCACCAGCA3'; 15-PGDH(91 bp): 上游引物5'AAGCATGGC ATAGTTG-GATTCACA3', 下游引物5'AGCCTGGACAAAT-GGCATTCA3'; β-actin(132 bp): 上游引物5'TG-GCACCCAGCACAATGAA3', 下游引物5'CTA-AGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA3'. PCR反应条件: 95 °C预变性10 s, 1个循环, PCR反应95 °C 5 s, 58.5 °C 20 s, 40个循环, 融解曲线55 °C, 80个循环. PCR产物的定性: 取PCR产物2 μL置2.5%琼脂糖凝胶电泳, 用全自动凝胶成像分析系统(美国SYGENE公司)进行拍照, 以15-PGDH/β-actin比值×100分别表示COX-2、15-PGDH mRNA相对表达量.

**1.2.2 COX-2、15-PGDH蛋白的表达检测:** 从液氮罐中取出各组织剪碎后, 加入细胞裂解液裂解匀浆使其充分裂解(操作在冰上进行); 4 °C 12 000 r/min离心15 min, 将上清液转移至新管;

## ■ 相关报道

Myung等研究认为15-PGDH的作用可作结肠肿瘤生成的有效抑制剂, 他的灭活可促使结肠肿瘤的形成和发展.

### ■应用要点

COX-2和15-PGDH在人体正常结肠黏膜、结肠息肉和结肠癌中具有相互调节的作用;在结肠癌前病变结肠息肉(特别是腺瘤性息肉)中也同时存在COX-2表达的明显增加和15-PGDH表达的降低或缺失,由此推断二者在结肠息肉恶变过程中可能起到协同作用,可能为结肠肿瘤的防治找到新的切入点。

表1 各结肠组织COX-2、15-PGDH mRNA和蛋白的相对表达量 (mean ± SD)

分组	n	COX-2		15-PGDH	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
正常结肠黏膜	15	9.859 ± 1.151	0.138 ± 0.025	918.260 ± 82.116	0.762 ± 0.165
结肠增生性息肉	25	83.387 ± 15.957 <sup>ac</sup>	0.557 ± 0.131 <sup>ac</sup>	125.380 ± 28.713 <sup>ac</sup>	0.443 ± 0.085 <sup>ac</sup>
结肠腺瘤性息肉	48	155.732 ± 28.395 <sup>ac</sup>	0.509 ± 0.087 <sup>ac</sup>	12.036 ± 3.509 <sup>a</sup>	0.202 ± 0.042
结肠腺癌	15	429.184 ± 45.721 <sup>a</sup>	0.772 ± 1.054 <sup>a</sup>	5.234 ± 0.358 <sup>a</sup>	0.186 ± 0.058 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 正常结肠黏膜; <sup>c</sup>P<0.05 vs 结肠腺癌。

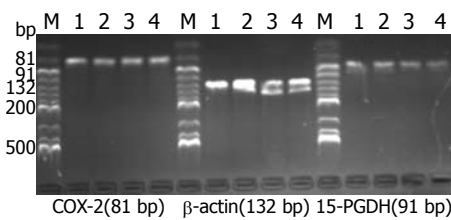


图1 RT-PCR检测COX-2和15-PGDH的mRNA表达。M: Marker; 1: 正常组; 2: 增生组; 3: 腺瘤组; 4: 腺癌组。

BCA(上海捷瑞生物工程有限公司)法测定蛋白含量。以40 μg蛋白质上样,常规进行SDS-PAGE电泳后转印至PVDF膜,用5%的脱脂奶粉(用PBS-T配置)封闭;山羊抗人COX-2多克隆抗体(按1:200稀释)(Santa Cruz公司),兔抗人15-PGDH多克隆抗体(1:500)(Cayman公司),小鼠抗人β-actin抗体(1:1000)(Santa Cruz公司)作为一抗;兔抗山羊、山羊抗兔IgG(H+L)(均为1:500)和山羊抗小鼠(1:2000)(均为中杉金桥公司)作为二抗。ECL发光,X线胶片感光,自动洗片机洗片;用全自动凝胶成像分析系统扫描Western blot胶片并测定各组蛋白电泳带积分吸光度值,以COX-2/β-actin、15-PGDH/β-actin比值分别表示COX-2、15-PGDH蛋白相对表达量。

**统计学处理** 实验完全按照随机原则设计,各数据以mean ± SD表示,采用单因素方差进行分析,P<0.05为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 COX-2、15-PGDH mRNA表达** COX-2 mRNA在正常结肠黏膜、增生性息肉、腺瘤性息肉及结肠腺癌中从低表达逐渐增加,在腺癌组织中表达最高。统计显示,各组之间比较均有统计学意义(P<0.05,表1)。而15-PGDH mRNA在正常结肠黏膜、增生性息肉、腺瘤性息肉及结肠腺癌中从高表达逐渐降低,在腺癌组织中呈低表达。结肠腺瘤组与结肠腺癌

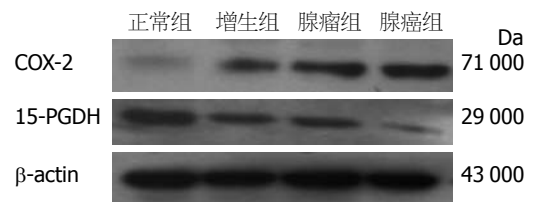


图2 COX-2、15-PGDH与β-actin蛋白在不同组中的表达。

组之间比较,无统计学意义(P=0.151),余各组之间比较均有统计学意义(P<0.05,表1)。在实验中见各组标本的荧光定量扩增曲线呈典型的S型,溶解曲线为单峰,产物凝胶电泳图在对应位置处见特异性产物条带(图1)。

**2.2 COX-2、15-PGDH蛋白表达** COX-2蛋白在正常结肠黏膜、增生性息肉、腺瘤性息肉及结肠腺癌中从弱表达或不表达也逐渐增加。结肠腺瘤组与增生性息肉组之间比较,无统计学意义(P=0.058),余各组之间比较均有统计学意义(P<0.05,表1,图2)。而15-PGDH蛋白在正常结肠黏膜、增生性息肉、腺瘤性息肉及结肠腺癌中从高表达逐渐降低,在腺瘤组织和腺癌组织中都可见到表达缺失。结肠腺瘤组与结肠腺癌组之间比较,无统计学意义(P=0.255),余两组之间比较均有统计学意义(P<0.05,表1,图2)。

## 3 讨论

环氧合酶是催化花生四烯酸转变为前列腺素的限速酶,可分为COX-1和COX-2两个亚型。COX-1在机体内以固有形式表达,对维持组织恒定中起重要的作用,然而COX-2作为一种诱导酶,在正常组织中仅微量表达或不表达,但在炎症、肿瘤等因子刺激下可使其表达上调。我们以前通过免疫组织化学染色研究显示,COX-2在腺瘤性息肉及结肠癌中均呈高表达,在腺瘤中的表达还跟组织分化程度相关<sup>[5,6]</sup>。Wasilewicz

等<sup>[7]</sup>通过对结肠息肉研究中又发现, 腺瘤性息肉中COX-2表达明显高于其他息肉, 除与腺瘤的分化程度有关外, 还跟腺瘤生长的部位及大小同样相关. 本组研究数据表明, COX-2在基因和蛋白两个层面上均可看到在正常结肠黏膜、增生性息肉、腺瘤性息肉和结直肠癌中从弱表达或不表达逐渐增加为强表达, 以腺瘤中最明显. 这一结果进一步说明了, COX-2从正常结肠黏膜到腺瘤的序列转变中担当着重要的角色. 其致癌作用可能是通过抑制免疫反应及抑制细胞凋亡, 增加上皮细胞的转移能力以及促进血管生成有关<sup>[8]</sup>.

15-PGDH广泛分布于人和哺乳动物的胃肠道、肺、肾等正常组织中. 研究发现, 15-PGDH在胃癌、结直肠癌、肺癌等多种肿瘤中存在表达的降低或缺失<sup>[9-11]</sup>. 本研究结果显示, 15-PGDH mRNA和蛋白在正常结肠黏膜中呈高表达, 在增生性息肉、腺瘤息肉及腺癌中从表达均逐渐降低, 在腺瘤组织和腺癌组织中都可看到表达缺失. 由此表明, 15-PGDH表达的降低或缺失在息肉恶变前已存在, 15-PGDH表达的下调或缺失可能是结直肠癌发生的早期事件之一. Myung等<sup>[12]</sup>研究认为15-PGDH的作用可作结肠肿瘤生成的有效抑制剂, 他的灭活可促使结肠肿瘤的形成和发展.

近年来, COX-2和15-PGDH在癌细胞中的相互表达关系受到了一些研究者们的关注. Tong等<sup>[13]</sup>对能表达COX-2和15-PGDH两种基因的肺腺癌细胞A549研究显示, 静息状态下的A549细胞仅微量表达COX-2, 但高表达15-PGDH, 当在肿瘤诱导剂(如LI-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )作用下COX-2表达显著增加, 而15-PGDH表达反而下降; Liu等<sup>[14]</sup>对分别被转染COX-2 siRNA质粒和COX-2 cDNA的胃癌细胞SGC7901研究中发现, 15-PGDH下调也可通过COX-2表达来实现. Chi等<sup>[15]</sup>发现非甾体抗炎药在抑制结直肠癌HT-29细胞中的COX-2的同时上调了15-PGDH表达和减少15-PGDH的降解. 从我们上面研究结果中同样看出, COX-2和15-PGDH在人体正常结肠黏膜、结直肠息肉和结直肠癌中具有相互调节的作用; 在结直肠癌前病变结直肠息肉(特别是腺瘤性息肉)中也同时存在COX-2表达的明显增加和15-PGDH表达的降低或缺失, 由此推断二者在结肠息肉恶变过程中可能起到协同作用,

可能为结肠肿瘤的防治找到新的切入点.

#### 4 参考文献

- Zhao JH, Jiang YG, Wu CT, Luo Y, Hou Z, He DL. [Expression of COX-2 in different human prostate cancer cell lines and its significance]. *Zhonghua Nan-kexue* 2010; 16: 689-692
- 孔令建, 赵晶, 曲波. Survivin、COX-2及VEGF在大肠癌中的表达及与肿瘤微血管密度的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2048-2053
- 楼丽泓, 靖大道, 李继坤. 胃癌组织中15-羟基前列腺素脱氢酶的表达研究. *中华医学杂志* 2006; 86: 709-711
- Tseng-Rogenski S, Gee J, Ignatoski KW, Kunju LP, Bucheit A, Kintner HJ, Morris D, Tallman C, Evron J, Wood CG, Grossman HB, Lee CT, Liebert M. Loss of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression contributes to bladder cancer progression. *Am J Pathol* 2010; 176: 1462-1468
- 刘模荣, 赵逵, 王红. GAS、COX-2在结直肠腺瘤及恶变中表达及意义. *中国消化内科杂志* 2009; 3: 50-54
- 王红, 赵逵, 王建立. COX-2、EGFR和Ki67在大肠癌组织中的表达及意义. *山东医药* 2008; 48: 1-3
- Wasilewicz MP, Kołodziej B, Bojulko T, Kaczmarczyk M, Sulzyc-Bielicka V, Bielicki D. Expression of cyclooxygenase-2 in colonic polyps. *Pol Arch Med Wewn* 2010; 120: 313-320
- Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut* 2006; 55: 115-122
- Thiel A, Ganesan A, Mrena J, Junnila S, Nykänen A, Hemmes A, Tai HH, Monni O, Kokkola A, Haglund C, Petrova TV, Ristimäki A. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4572-4580
- Backlund MG, Mann JR, Holla VR, Buchanan FG, Tai HH, Musiek ES, Milne GL, Katkuri S, DuBois RN. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem* 2005; 280: 3217-3223
- Tai HH, Tong M, Ding Y. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) and lung cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007; 83: 203-208
- Myung SJ, Rerko RM, Yan M, Platzer P, Guda K, Dotson A, Lawrence E, Dannenberg AJ, Lovgren AK, Luo G, Pretlow TP, Newman RA, Willis J, Dawson D, Markowitz SD. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12098-12102
- Tong M, Ding Y, Tai HH. Reciprocal regulation of cyclooxygenase-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2006; 27: 2170-2179
- Liu Z, Wang X, Lu Y, Han S, Zhang F, Zhai H, Lei T, Liang J, Wang J, Wu K, Fan D. Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1219-1227
- Chi X, Freeman BM, Tong M, Zhao Y, Tai HH. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) is up-regulated by flurbiprofen and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in human colon cancer HT29 cells. *Arch Biochem Biophys* 2009; 487: 139-145

#### ■同行评价

本文设计合理, 结论可靠, 具有较好的科学价值和临床借鉴意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

# 艾灸联合穴位注射对慢传输型便秘患者胃动素的影响

齐晶晶, 李志海, 潘国宏, 黄强, 魏蕴慧

## ■背景资料

慢传输型便秘是一种胃肠动力紊乱性疾病,以结肠传输功能障碍为主要特点,症状顽固,治疗困难。目前一系列研究表明,肠神经系统、肠神经递质、胃肠激素、Cajal细胞以及精神、心理因素等均可能与STC的发病有关。

齐晶晶, 李志海, 潘国宏, 黄强, 魏蕴慧, 襄州区人民医院 湖北省襄阳市 441000

作者贡献分布: 齐晶晶与李志海对此文所作贡献均等; 此课题由齐晶晶与李志海设计; 研究过程由齐晶晶、李志海、潘国宏及黄强操作完成; 研究用新试剂及分析工具由李志海与魏蕴慧提供; 数据分析由齐晶晶完成; 本论文写作由齐晶晶完成。

通讯作者: 齐晶晶, 441000, 湖北省襄阳市, 襄阳市襄州区人民医院消化内科。jingjing82361@sina.com

收稿日期: 2010-12-12 修回日期: 2011-02-26

接受日期: 2011-03-08 在线出版日期: 2011-03-28

## Moxibustion in combination with point injection increases motilin levels in patients with slow transit constipation

Jing-Jing Qi, Zhi-Hai Li, Guo-Hong Pan, Qiang Huang, Yun-Hui Wei

Jing-Jing Qi, Zhi-Hai Li, Guo-Hong Pan, Qiang Huang, Yun-Hui Wei, Xiangzhou District People's Hospital, Xiangyang 441000, Hubei Province, China

Correspondence to: Jing-Jing Qi, Department of Gastroenterology, Xiangzhou District People's Hospital, Xiangyang 441000, Hubei Province, China. jingjing82361@sina.com

Received: 2010-12-12 Revised: 2011-02-26

Accepted: 2011-03-08 Published online: 2011-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the therapeutic effect of moxibustion in combination with point injection against slow transit constipation and to explore possible mechanisms involved.

**METHODS:** Fifty-six patients with slow transit constipation were randomly and equally divided into test group and Western medicine group. Twenty-eight normal volunteers were included in a normal control group. The Western medicine group was given mosapride 10 mg tid for 20 d, while the test group underwent bilateral injection of 2 mL Astragalus Injection into Zusanli point, once a week for three weeks, and moxibustion for 20 min at Tianshu point, once daily for 20 d. Fasted and postprandial motilin (MLT) levels were measured at baseline and after treatment. The positive rate of colonic transit test and treatment response were compared among the three groups.

## ■同行评议者

魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院中西医结合科

**RESULTS:** After treatment, fasted and postprandial MLT levels increased in the test group and Western medicine group. Mean MLT level in the test group differed significantly between before and after treatment ( $346.59 \pm 9.90$  vs  $248.11 \pm 12.16$ ,  $P < 0.05$ ). After treatment, the positive rate of the colonic transit test decreased significantly ( $30.36\%$  vs  $100\%$ ;  $52.34\%$  vs  $100\%$ , both  $P < 0.05$ ) and efficacy score increased significantly ( $19.63$  vs  $8.42$ ;  $17.75$  vs  $8.83$ , both  $P < 0.05$ ) in the test group and Western medicine group. Efficacy score was significant in the Western medicine group between before treatment and the follow-up period ( $17.72$  vs  $8.42$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Moxibustion in combination with point injection exerts a significant therapeutic effect against slow transit constipation possibly by accelerating MLT secretion.

**Key Words:** Moxibustion; Point injection; Slow transit constipation; Motilin

Qi JJ, Li ZH, Pan GH, Huang Q, Wei YH. Moxibustion in combination with point injection increases motilin levels in patients with slow transit constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9): 976-980

## 摘要

**目的:** 研究艾灸联合穴位注射治疗慢传输型便秘的临床疗效及其对慢传输型便秘患者胃动素(MLT)的影响, 探讨其治疗慢传输型便秘的可能机制。

**方法:** 将符合纳入标准的56例慢传输型便秘患者随机分为观察组和西药组。同时选取正常体检志愿者28人作为正常对照组。西药组患者给予莫沙比利10 mg口服, 3次/d, 共20 d。观察组患者给予双侧足三里穴注射黄芪注射液, 每侧均2 mL, 1次/wk, 共3次, 联合双侧天枢穴艾灸20 min, 1次/d, 共20 d。3组患者均于基线期测量空腹及餐后血MLT值, 观察组与西药组于治疗后及随访期测量空腹及餐后血MLT值, 比较MLT的变化。比较3组患者三期结肠运输实验阳性率及观察组与西药组的疗效积分的变化。

**结果:** 观察组及西药组空腹及餐后胃动素水平治疗后及随访期较治疗前均有提高, 与西药组相比, 治疗后观察组患者餐后MLT水平升高较为显著( $346.59 \pm 9.90$  vs  $248.11 \pm 12.16$ ,  $P < 0.05$ ). 与西药组相比, 随访期观察组患者餐后MLT水平较治疗后差异无统计学意义. 治疗后观察组及西药组结肠运输实验阳性率较治疗前显著减低( $30.36\%$  vs  $100\%$ ;  $52.34\%$  vs  $100\%$ , 均 $P < 0.05$ ), 治疗后观察组及西药组总体疗效积分较治疗前均明显提高( $19.63$  vs  $8.42$ ;  $17.75$  vs  $8.83$ , 均 $P < 0.05$ ), 观察组随访期积分与治疗前比较有明显差异( $17.72$  vs  $8.42$ ,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 艾灸加穴位注射治疗慢传输型便秘的临床疗效显著, 其治疗机制可能与其提高患者空腹及餐后MLT水平有关.

**关键词:** 艾灸; 穴位注射; 慢传输型便秘; 胃动素

齐晶晶, 李志海, 潘国宏, 黄强, 魏蕴慧. 艾灸联合穴位注射对慢传输型便秘患者胃动素的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 976-980  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/976.asp>

## 0 引言

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是一类以结肠传输减慢为特点的顽固性便秘, 由结肠传输功能减弱致使肠内容物滞留于结肠而引起, 约占功能性便秘的45.5%. 至今尚未明确其确切病因, 但许多研究表明, 肠神经系统、肠神经递质、胃肠激素以及精神、心理因素等均可能与STC的发病有关, 其中胃肠激素与STC密切相关<sup>[1,2]</sup>. 目前, 临床上对该类患者一般以缓泻剂、中成药以及肠道水疗等手段处理. 但效果均不甚理想, 部分STC患者甚至需接受手术治疗. 长期使用缓泻剂不仅易产生耐药性, 而且某些化学性泻剂中的蒽醌类物质可导致结肠黑变病, 而后者可能与结肠癌变有关. 因此, 寻找一种新的治疗该病的方法成为近年研究的热点. 本研究旨在探讨艾灸联合穴位注射对STC患者胃动素(motilin, MLT)的影响及其与STC之间的关系, 为STC的治疗提供新思路.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择2008-06/2009-04曾于襄州区人民医院普内科住院的STC患者56例患者作为观察对象, 所有患者均签署该项研究知情同意书. 患者均符合功能性便秘罗马III标准以及罗金燕制

定的《慢性便秘的规范化诊断》STC诊断标准<sup>[3]</sup>, 并经全身体检理化检查及特殊检查排除器质性便秘. 入组标准: (1)结肠运输实验结果异常, 72 h结肠排空率 $< 80\%$ , 标志物散在分布于各段结肠内; (2)粪便干结, 排便费力; (3)排便间隔时间延长, 超过原有习惯1 d以上, 或两次排便间隔时间 $> 3$  d; (4)经全身体检理化检查及特殊检查排除器质性便秘; (5)病程在6 mo以上. 其中男27例, 女29例, 年龄21-72(平均47.8)岁. 同时于同期健康体检者中选取28例每天排便1次、无排便困难、硬便或排便不尽感者作为正常对照组. 其中男16例, 女12例, 年龄42-67(平均51.0)岁.

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 将56例STC患者随机分成西药组和观察组(艾灸联合穴位注射组), 与正常对照组共同组成3组. 3组患者性别、年龄均无统计学差异( $P > 0.05$ ).

**1.2.2 治疗:** 该研究分3期: 基线期10 d, 治疗期20 d, 随访期30 d. 西药组和观察组患者检查前2 wk内禁用各类影响胃肠动力的药物, 2 wk前停用泻药和刺激性食物. 治疗期间生活习惯不变. 研究期间均给予标准餐饮食. 治疗期处理: 西药组患者分别给予莫沙比利10 mg, 口服3次/天, 共20 d. 观察组患者给予双侧足三里穴注射黄芪注射液, 每侧均2 mL, 1次/周, 共3次; 联合双侧天枢穴艾条灸20 min, 1次/天, 共20 d. 穴位注射方法: 患者仰卧位, 在双侧髂韧带外侧向下3寸, 胫骨向外1横指处, 用5 mL注射器抽取2 mL黄芪注射液, 以持笔式刺入皮肤约1.5寸, 使患者有强烈的酸、胀、麻、沉等局部感觉, 并回抽无回血时注入药液. 艾灸方法: 在肚脐水平距肚脐左右各2寸处, 同时用艾条距离该穴2 cm处, 点燃施灸20 min. (以上单位“寸”均按照中医同身寸度量).

**1.2.3 总体治疗效果积分:** 主要指标: (1)排便频率: 1、2 d 1次为4分, 3、4 d 1次为3分, 5、6 d 1次为2分, 6 d以上1次为1分, 不借助药物、手法或灌肠无法自行排便为0分; (2)排便费力程度: 自然排便, 无排便费力为4分, 用力方能排便为3分, 努挣方能排便为2分, 排便费力需借其他方法辅助为1分; (3)每次排便时间: 1-10 min为4分, 11-20 min为3分, 20 min以上为2分; (4)排便不尽感: 无为4分, 轻微为3分, 明显为2分, 难忍为1分; (5)便质性状: 成条光软为3分, 呈条有裂纹或软胶状便为2分, 硬块成条或糊状便为1分, 硬块散在或稀水样便为0分; (6)便意感: 有为1分, 无为0分. 次要指标: 生活质量评估. 精神明显改善

### ■ 研发前沿

早期的研究认为慢传输型便秘(STC)结肠无器质性改变, 长期滥用刺激性泻剂是STC发展过程中的一个重要因素, 容易导致结肠黑变, 寻找一种新的治疗该病的方法成为近年研究的热点.

### ■ 相关报道

李冬冰等曾研究穴位埋线治疗STC的临床效用, 他的实验研究发现大肠俞、天枢、中极、足三里埋线可以改善STC患者的临床症状, 但该研究仅从穴位埋线经络刺激单方面进行研究, 仅进行了一个疗程的实验, 并且未对穴位埋线治疗STC的作用机制进行探讨.



### ■创新盘点

本文采用药物联合经络穴位刺激,辅助艾灸的温热加药穴效应,治疗手法将中医学与现代医学治疗模式有机结合,研究内容将中医学与现代医学微观病理生理机制有机结合,研究时程适中,研究方法客观,对研究中医药治疗慢传输型便秘起到了一定的指导作用。

者1.5分,轻度改善者1分,精神没有变化者0分. 饮食明显改善者1.5分,轻度改善者1分,饮食没有变化者0分. 睡眠明显改善者1.5分,轻度改善者1分,睡眠没有变化者0分. 工作生活自我满意度,满意2分,基本满意1.5,不满意0.5分. 计算基线期、治疗后及随访期上述各方面的分数总和,比较两组间治疗前后及随访时的差值.

1.2.4 测量MLT值: 3组患者均于基线期、治疗期及随访期末抽取空腹及标准餐后30 min静脉血4 mL,离心取上清液, -20 °C冻存待测. 测量时送十堰市太和医院用放免法测量MLT值.

1.2.5 肠动力学疗效: 结肠运输试验,于治疗前后及随访后早晨随餐顿服含20粒不透光标志物的胶囊1枚,每隔24 h摄取腹部平片1张. 按充气肠管轮廓判断腹部平片上标志物的位置. 缺乏清晰轮廓的按Arhan方法将大肠分为右侧结肠区、左侧结肠区、直肠乙状结肠区. 结果以72 h标志物排出80%以下者为异常. 观察两组患者三期结肠运输实验阳性率.

**统计学处理** 所有数据输入计算机,用SPSS12.0软件包进行统计分析. 计量资料以mean±SD表示,比较采用t检验. 对两组间人口统计学及疾病特征的比较分别采用 $\chi^2$ 检验及F检验,对数据资料和计量资料进行分析.  $P<0.05$ 认为差异有显著性意义.

## 2 结果

2.1 总体治疗效果积分比较 观察组与对照西药组患者排便及生活质量情况治疗前平均积分分别为8.42分和8.83分,观察组与西药组患者排便及生活质量情况治疗后平均积分分别为19.63分和17.75分. 两组患者排便及生活质量情况治疗后平均积分明显高于治疗前( $P<0.05$ ),但两组间积分比较无显著性差异. 随访期观察组与西药组患者排便及生活质量情况平均积分分别为17.72分和12.46分,患者排便及生活质量情况平均积分明显高于治疗前( $P<0.05$ ),但观察组与治疗前相比无明显差异,西药组较治疗后有显著差异( $P<0.05$ ,图1).

2.2 基线期、治疗后及随访期西药组、观察组与正常对照组空腹及标准餐后静脉血MLT水平比较

2.2.1 基线期观察组与正常对照组空腹及标准餐后静脉血MLT水平比较: 基线期西药组及观察组患者空腹静脉血MLT水平均明显低于正常对照组空腹静脉血MLT水平,差别具有显著性

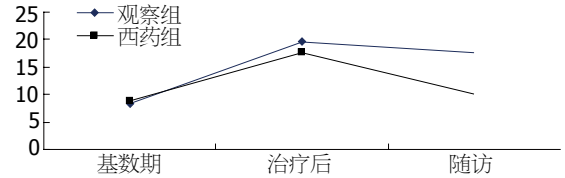


图1 总体疗效积分比较.

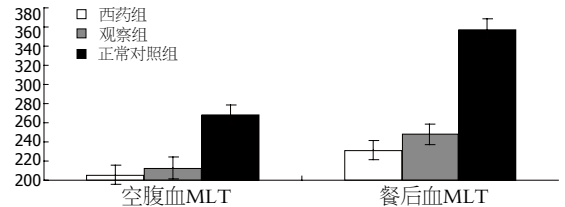


图2 基线期空腹血MLT的比较.

意义( $206.15 \pm 11.34$  vs  $268.56 \pm 10.33$ ,  $P<0.05$ ;  $212.76 \pm 9.68$  vs  $268.56 \pm 10.33$ ,  $P<0.05$ ,图2).

2.2.2 治疗后及随访期西药组、观察组与正常对照组空腹及标准餐后静脉血MLT水平比较: 治疗后观察组与西药组患者空腹及餐后静脉血MLT水平均较基线期高(空腹:  $256.15 \pm 7.96$  vs  $206.15 \pm 11.34$ ,  $272.76 \pm 10.34$  vs  $212.76 \pm 9.68$ ; 餐后:  $297.33 \pm 11.25$  vs  $231.00 \pm 14.01$ ,  $346.59 \pm 9.90$  vs  $248.11 \pm 12.16$ ),与西药组相比,观察组患者餐后MLT水平升高较为显著( $346.59 \pm 9.90$  vs  $248.11 \pm 12.16$ ,  $P<0.05$ ,图3). 随访期观察组与西药组患者空腹及餐后静脉血MLT水平较治疗后略有降低,但仍均较基线期高(空腹:  $219.81 \pm 9.67$  vs  $206.15 \pm 11.34$ ,  $263.62 \pm 7.10$  vs  $212.76 \pm 9.68$ ; 餐后:  $259.77 \pm 10.35$  vs  $231.00 \pm 14.01$ ,  $329.08 \pm 16.33$  vs  $248.11 \pm 12.16$ ,图3),与西药组相比,观察组患者餐后MLT水平较治疗后差异无统计学意义.

2.3 肠动力学疗效比较 基线期观察组与西药组患者结肠运输实验阳性率均为100%,治疗后观察组与西药组患者结肠运输实验阳性率分别为30.36%、52.34%. 随访期观察组与西药组患者结肠运输实验阳性率分别为35.93%、61.10%. 两组患者治疗后及随访期末的结肠运输实验的阳性率较治疗前明显降低,观察组结肠运输实验阳性率治疗后及随访期与治疗前相比均有显著性差异( $P<0.05$ ,图4).

## 3 讨论

STC是功能性便秘中常见的一种类型,目前一系列研究表明,肠神经系统、肠神经递质、胃肠激素、Cajal细胞以及精神、心理因素与STC的

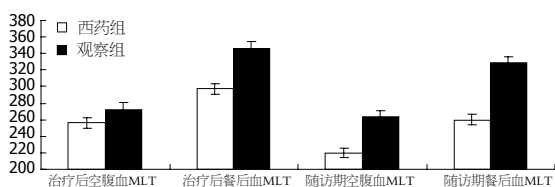


图3 治疗后及随访期空腹及餐后血MLT的比较。

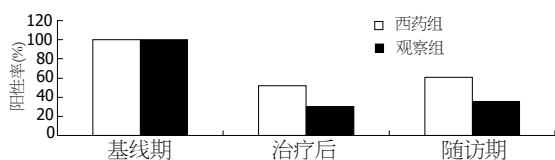


图4 肠动力学比较。

发病有一定关系。胃肠激素中MLT是由22个氨基酸组成的单链多肽,他是胃肠兴奋性运动神经元的重要递质,MTL能促进胃肠运动,提高胃肠道、胆道、Oddis括约肌的收缩力和张力。在消化期,MLT能引起胃和上部小肠产生消化期MMCIII相并诱发胃强烈收缩和小肠明显的分节运动<sup>[4]</sup>。他能直接作用于胃肠道平滑肌上的受体引起平滑肌内环-磷酸鸟苷浓度增加,使细胞内Ca<sup>2+</sup>从微粒体释放出来,细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度增加后可引起平滑肌收缩<sup>[5]</sup>。因此,MLT是影响胃肠动力的重要因素。许多研究表明,MLT与胃肠动力障碍密切相关,其MLT含量改变必然引起胃肠动力障碍患者的胃肠动力改变<sup>[6-8]</sup>。本实验中STC患者餐前MLT水平较正常对照组低,餐后MLT水平虽有升高,但升高幅度并不明显,且较正常组比较,维持在较低水平。与喻玉等<sup>[9]</sup>研究有类似结果,提示MLT水平与STC相关。本研究中治疗后观察组和西药组患者空腹尤其是餐后MLT水平较治疗前升高,且MLT水平与结肠运输实验负相关,与疗效积分正相关,提示干预治疗STC的机制可能是通过引起患者MLT水平的变化,从而提高胃肠道动力,改善便秘症状。这一作用在观察组更为明显。

肠神经系统<sup>[10]</sup>是由大量神经元所构成的巨大神经网络,可独立对胃肠功能进行局部调节。中医认为饮食失节、劳倦过度、情志失调等各种因素均可导致大肠传导功能失常引起便秘。经络系统作为中医学的重要分支,中医认为人体的五脏六腑、四肢百骸、五官九窍、皮肉筋骨等组织器官,之所以能保持相对的协调与统一,完成正常的生理活动,是依靠经络系统的联络沟通而实现的。便秘与许多经络尤其是大肠经、小肠经、胃经、脾经、肾经等经络功能密

切相关,天枢穴是大肠经募穴,《素问·阴阳应象大论》说:“阳病治阴”,六腑病证多取募穴治疗,大肠病多取天枢,便秘也是天枢穴主治证之一。灸法借助灸火的温和热力作用及腧穴的功能,能够疏通经络,调和气血。艾灸天枢即是一方面借助天枢穴的特定作用,一方面借助艾条点燃火灸的药热二力共同调节经络功能,来达到调整胃肠运动动能的作用的。足三里穴功可补益气血,健脾和胃。现代实验研究证明,针刺天枢、足三里、上巨虚等穴位,对结肠的运动有明显的双向调节作用,对高张力、运动亢进的肠管具有抑制效应,可使肠管病理性痉挛获得解除;而对低张力肠管,则有兴奋效应,可促进肠管的运动<sup>[11-15]</sup>。黄芪能补脾益气,在足三里穴位注射黄芪注射液共同达到健脾益气,通便导滞的作用<sup>[16,17]</sup>。本研究中艾灸加穴位注射与西药对于胃动素的影响已如前述,对于结肠运输实验及疗效积分的影响也证实艾灸加穴位注射治疗STC疗效较好,作用较持久,我们认为这可能与艾灸加穴位注射从总体调节胃肠道功能有关,其机制可能与提高空腹及餐后MLT水平有关。但STC机制是个复杂的网络结构,每个点的变化都可能牵动整体效果的变化,因此干预治疗STC的研究有待更系统更深层次的进一步探讨。

#### 4 参考文献

- 徐国萍, 范一宏, 吕宾. 慢传输型便秘发病机制的研究进展. 国际消化病杂志 2010; 30: 231-234
- 衣运玲, 王玲玲. 慢传输型便秘发病机制研究趋势探讨. 医学综述 2009; 15: 2441-2443
- 罗金燕. 慢性便秘的规范化诊断. 临床消化病杂志 2007; 19: 132
- 陈兰, 刘诗. 肠神经系统与慢传输型便秘. 国际消化病杂志 2007; 27: 178
- Konturek JW, Thor P, Maczka M, Stoll R, Domschke W, Konturek SJ. Role of cholecystokinin in the control of gastric emptying and secretory response to a fatty meal in normal subjects and duodenal ulcer patients. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 583-590
- Galligan JJ, Vanner S. Basic and clinical pharmacology of new motility promoting agents. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 643-653
- Kamerling IM, Van Haarst AD, Burggraaf J, Schoemaker RC, Biemond I, Heinzerling H, Jones R, Cohen AF, Masclee AA. Motilin effects on the proximal stomach in patients with functional dyspepsia and healthy volunteers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G776-G781
- Xing J, Felsher J, Brody F, Soffer E. Gastric electrical stimulation significantly increases canine lower esophageal sphincter pressure. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1481-1487
- 喻玉, 康晓征, 单铁莲, 廖琴, 陈辉, 肖国辉. 通便胶囊对慢传输型便秘模型大鼠胃肠激素影响的研究. 中国中西医结合消化杂志 2010; 18: 244-246

#### ■应用要点

本文对艾灸联合穴位注射治疗慢传输型便秘地临床效用及其机制进行了初步探讨,研究发现艾灸联合穴位注射可以较持久的提高STC患者胃动素水平,从而能持续改善STC患者的便秘症状。这为临床治疗慢传输型便秘提供了一种有效的新方法。

### ■同行评价

本文方法可靠, 结论可信, 为治疗慢性传输型便秘患者奠定实验基础.

- 10 Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Ikeda T, Fukuzawa M. Regulation of the enteric nervous system in the colon of patients with slow transit constipation. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1540-1544
- 11 王军, 齐清会, 罗茂红, 董作亮, 胡应超. 2.63针刺治疗慢传输型功能性便秘的临床研究. *基础医学与临床* 2003; 23: 77
- 12 何国栋, 牛伟新, 刘寒, 秦新裕. 针刺足三里调控胃肠动力机制的实验研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 748-751
- 13 段锦绣, 彭唯娜, 刘志顺, 杨德莉, 郭郡, 蔡姮婧. 深刺天枢穴改善结肠慢传输型便秘临床观察. *上海针灸杂志* 2010; 29: 631-633
- 14 杨德莉, 刘志顺. 深刺天枢治疗功能性便秘疗效观察. *北京中医药* 2010; 29: 366-369
- 15 孙建华, 郭慧, 裴丽霞, 彭拥军, 陆斌, 吴晓亮, 李浩. 电针天枢穴对慢传输型便秘大鼠结肠c-kit、SCF基因表达的调节. *南京中医药大学学报* 2010; 27: 33-35
- 16 孙士然, 陈雪清, 于桂云. 益气润肠汤配合功能锻炼治疗结肠慢传输型便秘100例临床观察. *河北中医* 2010; 32: 835-837
- 17 肖天宝, 苗大兴. 补中益气汤加五磨饮子治疗慢传输型便秘36例临床疗效观察. *世界中西医结合杂志* 2010; 5: 177

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 •

## 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)

# 胃肠隐球菌病1例

雷静静, 薄莉, 周力

雷静静, 周力, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550004

薄莉, 贵阳医学院附属医院病理科 贵州省贵阳市 550004  
作者贡献分布: 课题设计由雷静静完成; 研究过程由雷静静、周力及薄莉操作完成; 病理图片及说明由薄莉提供; 论文写作由雷静静完成; 周力负责审核。

通讯作者: 周力, 教授, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院消化内科, 13908501208@163.com

电话: 0851-6774245

收稿日期: 2011-01-05 修回日期: 2011-02-11

接受日期: 2011-02-22 在线出版日期: 2011-03-28

## Gastrointestinal cryptococcosis: a report of one case

Jing-Jing Lei, Li Po, Li Zhou

Jing-Jing Lei, Li Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical Collage, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Li Po, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical Collage, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Professor Li Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical Collage, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. 13908501208@163.com

Received: 2011-01-05 Revised: 2011-02-11

Accepted: 2011-02-22 Published online: 2011-03-28

## Abstract

Cryptococcosis is a fungal infection caused by *Cryptococcus neoformans*, which commonly occurs in immunocompromised patients and is often disseminated. Disseminated cryptococcosis generally manifests as pulmonary lesions or meningitis. Sometimes it might affect the gastrointestinal tract, and rare cases have been reported involving the intestine without systemic infection. Here we report a case of cryptococcosis involving the jejunum and mesenteric lymph nodes which contributed to incomplete intestinal obstruction. This case was finally diagnosed by histology and cured by antifungal medication.

**Key Words:** Cryptococcal infection; Jejunum; Mesenteric lymph nodes; Incomplete intestinal obstruction

Lei JJ, Po L, Zhou L. Gastrointestinal cryptococcosis: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(9):

981-983

## 摘要

隐球菌病主要侵犯中枢神经系统和肺,在中枢神经系统引起隐球菌性脑膜炎,在肺部可致肺炎和肺部肉肿样病变,而胃肠隐球菌病,无论原发还是继发,临床都相当罕见,我们报道1例以不全性肠梗阻为主要表现,经手术后病理切片证实的空肠及肠系膜淋巴结隐球菌病,结合相关文献进行分析。

**关键词:** 隐球菌感染; 空肠; 肠系膜淋巴结; 不全性肠梗阻

雷静静, 薄莉, 周力. 胃肠隐球菌病1例. 世界华人消化杂志 2011; 19(9): 981-983

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/981.asp>

## 0 引言

隐球菌病主要侵犯中枢神经系统和肺,在中枢神经系统引起隐球菌性脑膜炎,在肺部可致肺炎和肺部肉肿样病变,而胃肠隐球菌病,无论原发还是继发,临床都相当罕见,我们报道1例经手术后病理切片证实的患者,并对相关文献作一综述。

## 1 病例报告

女, 58岁, 因“反复腹胀、呕吐45 d, 再发并加重8 d”收入院。患者45 d来无明显诱因反复出现腹胀并呕吐, 呕吐呈非喷射性, 为胃内容物, 上午进食后常于晚间呕吐明显, 伴暖气、上腹部烧心感、纳差, 无反酸、厌油、恶心、呕血、腹痛、腹泻、黑便, 无发热、咳嗽、咳痰、咯血, 无尿频、尿急、尿痛、血尿、少尿, 无胸闷、心悸、头痛、头晕等不适。经私人诊所不规则治疗后症状有所缓解。8 d前患者再次出现腹胀、呕吐, 且呕吐咖啡渣样物质, 量约100 mL, 解黑便1次, 量约200 g, 仍无发热、腹痛、黄染, 无头晕、心悸、胸闷等症状, 就诊于当地医院, 予输液治疗(具体不详), 上述症状无缓解, 今为进一步诊治收入贵阳医学院附属医院消化内科。

## ■背景资料

隐球菌病是条件致病性深部真菌病, 其病原体主要是新型隐球菌及其变种, 多发生在免疫系统受损伤的患者, 主要侵犯中枢神经系统和肺, 也可原发或继发于皮肤、肝脏、胆道和骨骼等, 胃肠道也可能是弥漫性的隐球菌感染的一部分, 但原发于胃肠道的隐球菌感染相当少见。

## ■同行评议者

唐世刚, 教授, 大连大学附属中山医院内科

### ■ 研发前沿

关于胃肠道隐球菌感染的诊断,目前除病理活检外,临床上尚无好的方法,有待进一步的研究。而且对于原发性胃肠道隐球菌感染,由于临床病例较少,治疗方案及疗程并未统一,均是亟待研究的问题。

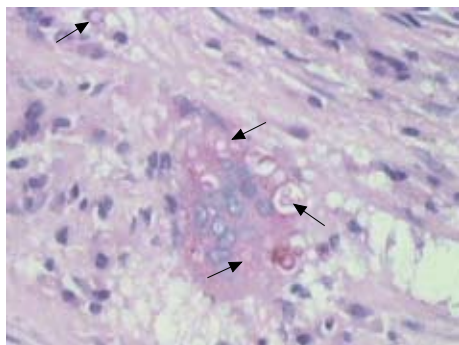


图1 小肠壁(PAS染色×400). 肠黏膜下见多核巨细胞及肉芽肿形成,其中可见淡红、淡紫色的隐球菌孢子(箭头所指).

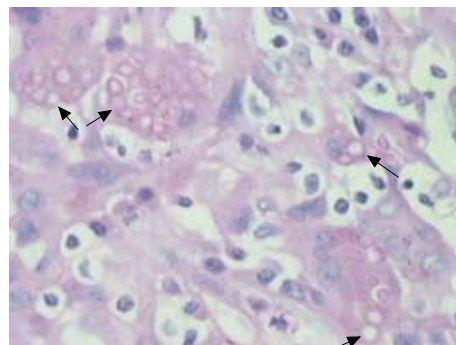


图2 淋巴结PAS染色×400. 肠系膜淋巴结可见多核巨细胞及肉芽肿形成,其中可见淡红、淡紫色的隐球菌孢子(箭头所指).

病来患者精神、睡眠欠佳,饮食差,大便1次/3-4 d,小便正常,体质量下降约5 kg.

既往史: B超发现“胆囊炎、胆结石”病史5年,但具体诊治描述不清. 否认“高血压、糖尿病、慢性肾病”病史,否认“肝炎、伤寒、结核”等传染病史. 否认手术外伤史. 否认输血史及使用其他血制品史,血型不详.

入院体查: T: 37.4 °C, P: 80 次/min, R: 19次/min, BP: 120/78 mmHg, 发育正常,体型消瘦,营养差,慢性病容,神清. 全身皮肤黏膜无黄染、出血,无蜘蛛痣、肝掌,全身浅表淋巴结未扪及肿大,睑结膜无苍白,巩膜无黄染,双肺呼吸音清,未闻及干湿性啰音,心律齐,未闻及杂音,腹凹、软,未见明确胃肠型、蠕动波,未见腹壁静脉曲张,上腹部剑突下轻压痛,无反跳痛、肌紧张,肝、脾肋下未扪及,墨菲氏征(+),移动性浊音阴性.

辅查: 血常规结果示: WBC:  $6.35 \times 10^9/L$ , N: 82.20%, HGB: 126 g/L. 血生化: 淀粉酶: 56.00 U/L, 尿淀粉酶结果回示: 130.00 U/L. 肾功、电解质未见明显异常. 肝功能示: ALT: 31 U/L, AST: 44.50 U/L, 前白蛋白: 163.00 mg/L, 血糖: 3.16 mmol/L. 胸片: (1)肺内未见明显异常; (2)主动脉硬化; (3)胸椎侧弯畸形,左侧第7、8肋骨陈旧性骨折可疑. 心电图: 未见异常. 上腹B超: 胆囊内强光团考虑: (1)胆泥淤积; (2)结石不排除. 腹平片: 肠梗阻可疑. 上腹CT结果回示: (1)考虑高位小肠梗阻; (2)胆囊结石? 入院诊断: (1)不全性肠梗阻? 原因待查; (2)结石性胆囊炎. 经过暂禁食、胃肠减压、抗炎、抑酸、补液、促进胃肠蠕动等对症支持治疗,症状未缓解,作全消化道碘水造影结果显示: (1)胃潴留,胃下垂、十二指肠、空肠上段扩张; (2)空肠上段狭窄考虑: 占位,空肠扭转; (3)十二指肠上段小憩室形成. 为

进一步明确诊治转入胃肠外科手术. 术中见距屈氏韧带50 cm处空肠肠壁明显增厚,长约4 cm,管腔狭窄. 小肠系膜上有各处淋巴结肿大,可见散在灰白色粟粒样结节,根据术中探查情况,高度怀疑小肠癌,决定行肠管切除,在距离病变肠管两端各约10 cm分别定出切除线,逐段钳夹切除,切除小肠段及小肠系膜上肿大淋巴结3枚送术后病理检查. 活检结果示: 小肠壁及淋巴结病变为新型隐球菌感染(图1, 2),故给予氟康唑静滴抗真菌感染,患者食欲好转,进食可,一般情况好转后出院,院外继续口服氟康唑治疗,总疗程6 wk,随访6 mo,无不适,体质量增加2 kg.

## 2 讨论

隐球菌菌属于条件致病性深部真菌病,包括17个种和7个变种,其中只有新型隐球菌及其变种有致病性,其广泛存在于土壤和鸽粪中,偶可在水果、蔬菜、牛乳以及健康人的口腔、鼻腔、咽部、胃肠、皮肤等处分离到,故鸽粪被认为是人类最主要的传染来源<sup>[1]</sup>,本例患者后经追问病史,证实其邻居有饲养鸽子. HIV感染是弥漫性的隐球菌感染的危险因素,其他原因导致免疫力的减低也可成为易感原因: 如使用免疫抑制剂、器官移植、慢性脏器功能的衰竭、血液学的紊乱、肝硬化等<sup>[2]</sup>.

目前认为隐球菌主要通过呼吸道进入肺内,另有原发性胃肠道感染报道,支持隐球菌可经消化系吞入而引发感染<sup>[3]</sup>,皮肤直接感染也是一种感染方式,进入体内的隐球菌可经血液、淋巴播散到全身或者直接蔓延到周围组织.

临床表现多无特异性,这可能是其发病率在临床报道上偏少的原因. 胃肠道隐球菌感染常常是无症状或症状轻微的, Washington等<sup>[4]</sup>报道24例播散性隐球菌或肺部隐球菌感染患者的

尸检结果,发现其中8例累及胃肠道,但这8例患者中只有1例患者在生前确认,该患者因胃食管反流和吞咽痛行胃镜加病理活检,确诊为胃的隐球菌病.该患者在抗真菌治疗3 wk后死亡,尸检表明,胃的病变好转却有回盲部感染和全身播散性感染,说明胃的病变可能是全身感染的首发表现.胃肠隐球菌感染还可以急性水样腹泻为主要症状<sup>[2]</sup>,要注意与难辨梭状芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌感染所引起的肠炎鉴别,因两者都可以发生在免疫力低下和长期使用抗菌素的患者.另外,也有以空肠穿孔<sup>[5]</sup>为首先表现的胃肠隐球菌病,还有以肛门溃疡为表现的隐球菌感染<sup>[6]</sup>,这些患者都常常并有免疫损伤的疾病,如HIV或肝硬化,故预后极差,如其中两例患者分别在腹泻出现后16 d和抗真菌治疗后3 wk死亡<sup>[2,4]</sup>.若患者免疫功能尚可,则可表现为增生为主的病变,如不全性肠梗阻,梗阻部位可以在升结肠或回盲部<sup>[7]</sup>,也可以在回肠末端<sup>[8]</sup>,还有因腹膜隐球菌性肉芽肿压迫肠壁致空肠梗阻的报道<sup>[9]</sup>.我们报道的患者梗阻部位在空肠,以增生为主要表现的患者如诊断治疗及时,大多预后较好.

真菌培养是确诊的金标准,但大便培养阳性率不高.临床确诊主要依靠组织病理检查和病灶内脓液穿刺标本的病原学涂片和墨汁染色.血清学隐球菌荚膜多糖抗原检测有助于临床诊断.DNA探针法和PCR探针等方法,具有高度的特异性,但两者目前主要用于肺和播散性隐球菌感染的诊断,还无用于原发性胃肠道感染诊断的报道.

关于胃肠道隐球菌感染的治疗方案,如果是继发于全身播散性隐球菌感染,可参照2010年美国感染病学会更新的隐球菌处理临床实践指南<sup>[10]</sup>.如果是原发性胃肠道隐球菌感染,由于临床病例较少,治疗方案及疗程并未统一,可选用多种抗真菌药物,如两性霉素B、两性霉素B脂质体、氟康唑、伊曲康唑等.其疗效与病灶

性质相关,早期感染灶的形成隐球菌繁殖产生的凝胶物质,其周围组织炎症反应轻,此种病变常在应用一般剂量的抗真菌药物即可吸收.但病程长的较晚期感染灶则形成慢性炎症、肉芽肿、结缔组织增生,故主张手术切除后再加抗真菌治疗以求得根治.本例患者因肠道慢性炎症,肉芽肿形成致肠管狭窄,出现不全性肠梗阻的临床表现,术中考虑小肠肿瘤,故行了病变肠管的切除术,术后在病理诊断明确后静滴了氟康唑2 wk出院,出院后改为口服氟康唑4 wk,随访6 mo,情况良好.

### 3 参考文献

- 1 张园,王静梅,剡根强.新生隐球菌病研究进展.动物医学进展 2007, 28: 63-67
- 2 Hokari S, Tsukada H, Ito K, Shibuya H. An autopsy case of disseminated cryptococcosis manifesting as acute diarrhea in a patient with primary biliary cirrhosis. *Intern Med* 2010; 49: 1793-1796
- 3 Melato M, Gorji N. Primary intestinal cryptococcosis mimicking adenomatous polyp in an HIV-negative patient. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1592-1593
- 4 Washington K, Gottfried MR, Wilson ML. Gastrointestinal cryptococcosis. *Mod Pathol* 1991; 4: 707-711
- 5 Saha S, Agarwal N, Srivastava A, Kumar A. Perforation peritonitis due to gastrointestinal cryptococcosis as an initial presentation in an AIDS patient. *Singapore Med J* 2008; 49: e305-e307
- 6 Van Calck M, Motte S, Rickaert F, Serruys E, Adler M, Wybran J. Cryptococcal anal ulceration in a patient with AIDS. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 1306-1308
- 7 黄修海,夏洪志,曹振凯,张一帆,刘祥,毕超.回盲部升结肠隐球菌病并肠梗阻.中华消化内科杂志 2005; 25: 194
- 8 Nawabi DH, Ffolkes L, O'Bichere A. Cryptococcal small-bowel obstruction in an HIV-positive patient. *J R Soc Med* 2005; 98: 513-514
- 9 Gordon SM, Gal AA, Amerson JR. Granulomatous peritoneal cryptococcomas. An unusual sequela of disseminated cryptococcosis. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118: 194-195
- 10 周颖杰,李光辉,Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F. 隐球菌病处理临床实践指南: 2010年美国感染病学会更新.中国感染与化疗杂志 2010; 10: 161-166

### 同行评价

本文病理报道详细,内容详实,有利于胃肠隐球菌在临床中的发现和治理.

编辑 李薇 电编 何基才

# 《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册,免费获取PDF等格式的全文,切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具,编委、作者和读者利益的最大化的目标,努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元,全年2016.00元,邮发代号82-262,由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章,具体内容涉及:食管疾病,如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等;胃部疾病,胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等;肠道疾病,如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等;肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等;胰腺疾病,如胰腺炎和胰腺癌等;全身性疾病涉及消化系统,如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等;以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等);除以上外,本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和

中国知识资源总库收录。2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次,影响因子0.625,综合评价总分49.4分,分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位,分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位;其他指标:即年指标0.112,他引率0.79,引用刊数473种,扩散因子15.72,权威因子1 170.03,被引半衰期4.0,来源文献量752,文献选出率0.93,地区分布数30,机构分布数30,基金论文比0.39,海外论文比0.01。

1.2 栏目 述评,基础研究,临床研究,焦点论坛,文献综述,研究快报,临床经验,病例报告,会议纪要。文稿应具有科学性、先进性、可读性及实用性,重点突出,文字简练,数据可靠,写作规范,表达准确。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式,GB6447文摘编写规则,GB7714文后参考文献著录规则,GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求;同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中fengstroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$ , WBC数用 $1 \times 10^9/L$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量 $\gamma$ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.



《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wcyj@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) $t$ 检验用小写 $t$ ; (2) $F$ 检验用英文大写 $F$ ; (3)卡方检验用希腊文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希腊文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写 $n$ ; (7)概率用英文斜体大写 $P$ . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 统计学显著性用 $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.01$ ; 第三套为 $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg  $\pm$  0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm  $\pm$  0.27 cm, 其 $\text{SD}/3 = 0.09$  cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq$  分母  $\leq 1000$ , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

### 3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcyj@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

## 6 修回稿须知

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

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

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2011年国内国际会议预告

2011-04-01/30

第九届全国儿童感染性疾病暨第十届全国儿童肝脏疾病学术会议

会议地点: 扬州市

联系方式: fuxiaoxia@cma.org.cn

2011-04-08

2011第五届中华消化病学年度讲坛

会议地点: 北京市

联系方式: cma\_spd@yahoo.com

2011-04-09/10

第四届NCCN亚洲学术会议暨2011NCCN指南中国版修订会

会议地点: 上海市

联系方式: nccn-asia@emdchina.com

2011-04-14/17

第四届全国消化内科危重疑难少见病学术大会

会议地点: 桂林市

联系方式: xiaohuayinan2011@yahoo.com.cn

2011-04-15/17

第二届中国肿瘤介入与微创治疗大会

会议地点: 上海市

联系方式: 010-84288944

2011-04-22/24

第九届全国内镜外科学术研讨会

会议地点: 济南市

联系方式: gandanneijing@163.com

2011-05-01/31

2011年安徽省消化、消化内镜学术年会暨肝脏疾病诊治难点与对策学习班

会议地点: 合肥市

联系方式: meiqiaomq@yahoo.com.cn

2011-05-20/22

第二届广州国际肿瘤学术会议

会议地点: 广州市

联系方式: gzco2011@163.com

2011-05-27/29

第十四届中西医结合学会大肠肛门病专业委员会学术研讨会

会议地点: 沈阳市

联系方式: gcyy88@163.com

2011-06-11/12

2011国际消化疾病论坛

会议地点: 香港

联系方式: www.iddforum.com

2011-06-16/20

第二十三次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 太原市

联系方式: 0351-4174328

2011-06-23/26

第十五次全国病毒性肝炎及肝病学术会议

会议地点: 沈阳市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2011-06-24/26

2011南方消化论坛暨第七届全国肠道疾病学术大会

会议地点: 广州市

联系方式: gwei203@yahoo.com.cn

2011-07-07

第八届全国大肠癌学术会议暨2011哈尔滨国际结直肠癌外科周

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: rainy\_gg@yeah.net

2011-07-14/17

第五届地坛国际感染病会议

会议地点: 北京市

联系方式: info@bjditan.org

2011-07-22/24

第四届全国脂肪肝病专题研讨会

会议地点: 重庆市

联系方式: 010-85867619

2011-08-04/07

第五届中国肿瘤内科大会

会议地点: 北京市

联系方式: 010-87788701

2011-09-14/17

第六届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 兰州市

联系方式: office@cnsld.org

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会

会议地点: 福州市

联系方式: 010-67726451

2011-09-16/18

第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会

会议地点: 济南市

联系方式: xiaohuahuiyi@126.com

## 志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈红松 研究员

北京大学人民医院肝病研究所

陈其奎 教授

中山大学附属第二医院消化内科

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

陈钟 主任医师

南通大学附属医院普外科

崔莲花 副教授

青岛大学医学院公共卫生系

崔云甫 教授

哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

戈之铮 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

谷俊朝 主任医师

首都医科大学附属北京友谊医院普外科

关晓辉 主任医师

吉林北华大学附属医院

黄恒青 主任医师

福建省第二人民医院消化内科

黄昆 教授

华中科技大学同济药学院

黄晓东 主任医师

武汉市中心医院消化内科

黄志勇 教授

华中科技大学同济医院普外科

江米足 教授

浙江大学医学院附属儿童医院儿科

李晟磊 副主任医师

郑州大学第一附属医院病理科 河南省肿瘤病理重点实验室

刘莹 副主任医师

首都医科大学附属北京友谊医院消化科

孙诚谊 教授

贵阳医学院附属医院院长办

唐文富 副教授

四川大学华西医院中西医结合科

王学美 研究员

北京大学第一医院中西医结合研究室

王振宁 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

王正康 教授

北京中日友好医院普外科

魏睦新 教授

南京医科大学第一附属医院中西医结合科

杨柏霖 副主任医师

南京中医药大学附属医院结直肠外科

杨江华 副教授

安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院感染科

张明辉 副主任医师

河北医科大学第一医院肝病中心

张筱茵 副教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

张宗明 教授

清华大学第一附属医院消化医学中心

周伟平 教授

上海东方肝胆外科医院肝外三科

周晓武 副主任医师

中国人民解放军空军总医院普通外科