世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 1979-1982
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

# 大肠癌和胃癌个体化疗的现状与未来

刘宝瑞, 钱晓萍

刘宝瑞, 钱晓萍, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心暨南京大学临床肿瘤学研究所 江苏省南京市 210008
刘宝瑞, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心主任, 南京大学临床肿瘤研究所所长, 教授, 博士生导师, 主要从事消化系肿瘤个体化疗的研究.
**通讯作者**: 刘宝瑞, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心暨南京大学临床肿瘤学研究所.
baoruiliu@nju.edu.cn
电话: 025-83304616-21002 传真: 025-83107081
收稿日期: 2007-04-11 接受日期: 2007-05-16

## State of tailored chemotherapy for colorectal and gastric cancers

Bao-Rui Liu, Xiao-Ping Qian

Bao-Rui Liu, Xiao-Ping Qian, Oncology Center, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School; Clinical Oncology Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Bao-Rui Liu, Oncology Center, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School; Clinical Oncology Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. baoruiliu@nju.edu.cn
Received: 2007-04-11 Accepted: 2007-05-16

## Abstract
Colorectal and gastric cancers are very common disease entities in China. Postoperative chemoradiotherapy has become the standard of care for treatment of colorectal and gastric cancers, mainly because most diagnoses are at late or advanced stages. Based on statistics from large sample studies and because of the heterogeneity among patients having the same site of cancer, there are variations in the effects and toxicity among those receiving standard chemotherapy. Tailored chemotherapy based on pharmacogenetics and pharmacogenomics has received much attention and has shown predictive potential. The present paper focuses on advances in tailored chemotherapy in colorectal and gastric cancers to determine the potential value of the drug-associated genes.

Key Words: Colorectal cancer; Gastric cancer; Individual chemotherapy

Liu BR, Qian XP. State of tailored chemotherapy for colorectal and gastric cancers. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):1979-1982

## 摘要
大肠癌和胃癌是我国常见的肿瘤, 由于我国大多数大肠癌和胃癌患者确诊时已属中晚期, 因此, 化疗作为全身性内科治疗手段成为患者的主要选择. 目前肿瘤的“标准化疗”仍然是以大样本统计学结果为基础选择化疗药物的治疗. 由于肿瘤本身以及个体之间异质性的存在, 同一部位的肿瘤对“标准化疗”的敏感性和毒副作用差异很大. 以药物基因组学及药物遗传学为基础的“个体化疗”受到广泛关注, 并显示出其潜在的应用前景. 本文着重论述大肠癌和胃癌领域“个体化疗”的研究进展, 初步探索各种有药物相关基因的应用价值.

**关键词: 大肠癌; 胃癌; 个体化疗**

刘宝瑞, 钱晓萍. 大肠癌和胃癌个体化疗的现状与未来. 世界华人消化杂志 2007;15(18):1979-1982
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1979.asp

■背景资料
近年来的研究表明, 以药物遗传学或药物基因组学为基础的“个体化疗”在提高化疗疗效方面起着重要作用. 通过检测患者自身的药物相关基因的表达或变异水平, 初步预测患者对化疗药物的敏感性, 从而指导临床化疗药物的选择, 具有潜在的应用前景.

## 0 引言
大肠癌和胃癌的化疗是临床最常采用的治疗方式. 大肠癌公认的化疗方案由5-氟尿嘧啶(5-FU)与草酸铂或开普拓组成, 有效率不超过50%. 胃癌的化疗自从1980年代获得应用以来, 化疗方案经历了诸多演变. 大样本随机对照研究表明, 迄今最常采用的药物主要有5-FU类、蒽环类、铂类和紫杉类, 但是任一组合的方案有效率也不超过50%[1-5]. 提高大肠癌和胃癌化疗疗效、减少无效化疗是临床迫切需要解决的难题. 最近3-5 a的研究证实, 药物基因组学(pharmacogenomics)/遗传学(pharmacogenetics)指导下“个体化疗”是提高化疗效果的必然选择.

## 1 个体化疗是提高疗效的必然选择
个体化疗是指通过对肿瘤自身药物敏感性的检查, 选择敏感的药物进行化疗的方法[6-7]. 在理

■研发前沿
目前的“个体化疗”领域, 仅非小细胞肺癌有前瞻性的临床研究报道, 其他领域主要为回顾性研究. 而这领域在非小细胞肺癌领域所取得的成绩令人瞩目.

念上, 个体化疗显然较当前的常规化疗(以大样本统计学资料为依据选药)有明显优势. 在实践中, 个体化疗经历了漫长的体外肿瘤细胞敏感实验、体内肿瘤组织药物敏感实验等过程, 终因检查技术复杂、耗时漫长、质控困难及肿瘤自身的复杂性等因素, 临床治疗效果评价不肯定. 最近3-5 a, 药物遗传学/药物基因组学在化疗药物作用机制等方面的研究获得了突破性进展, 发现化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效应与特定的一种(1组)基因的多态性和/或表达显著相关. 通过相关基因的检查, 预测该化疗药物的疗效, 选择合适的药物进行化疗, 已经成为提高疗效、减少无效治疗的合理选择. 事实上, 在2004年美国临床肿瘤大会(ASCO)上就有专家推测: 未来5-10 a的肿瘤化疗可能会由目前的常规标准化疗向个体化疗过渡; 2005年ASCO会议将个体化疗誉为化疗的革命性变化; 2006年ASCO会议鉴于个体化疗在肺癌治疗上获得肯定的最新资料, 指出肺癌已经迎来了个体化疗的时代(comes of age)[8]. 2006-09美国《新英格兰医学杂志》发表了肺癌个体化疗里程碑式的文章: 761例非小细胞肺癌中, 只有核苷酸切除修复酶(excision repair cross-complementing 1, ERCC1)表达阴性者标准化疗(含铂方案, 迄今国内外广泛采用)才能延长生存时间; 而表达阳性者标准化疗与不化疗相比对生存时间毫无贡献[9]. 该报道已引起广泛关注, 强烈提示个体化疗比目前广泛采用的标准化疗更合理、更科学, 个体化疗对于肺癌而言, 开始日趋成熟.

## 2 大肠癌的个体化疗

大肠癌也是美欧发达国家的常见肿瘤, 其个体化疗的相关研究近来逐渐增多, 但是主要集中于以下著名研究机构: 美国Massachusetts General Hospital/Dana-Farber/Harvard Cancer Center、美国Southern California University和德国Univ. of Hamburg. 综合欧美国家研究结果, 发现铂类相关基因研究较为深入, 其中肿瘤组织ERCC1 mRNA水平已经被证实与铂类药物的敏感性显著相关; 大肠癌外周血细胞的*XPD*, *XRCC1*, *ERCC1*, *GSTP1*等基因的SNPs也与铂类敏感性相关. 2004年Univ.of Hamburg和Univ.of Southern California在BJC杂志公布了他们的发现: 上述4种铂类相关基因SNPs的联合检查结果与铂类药物治疗后患者生存时间存在显著相关性: 大肠癌患者这4个基因变异与否, 铂类化疗后平均生存差异竟然为17.4 mo和5.4 mo之大[10]. 最近, 来自日本的报道对5-FU疗效与相关基因的关系进行了较为深入研究, 发现传统的5-FU体内代谢途径的几个酶基因的价值有限, 采用基因芯片筛出的多种基因组合较一种基因更具价值, 并提出了疗效指数(response index)的概念[11]. 虽然大肠癌5-FU相关基因筛选的研究刚刚开始, 涉及的临床病例数也很少难以获得肯定性结论, 这种多基因组合及疗效指数的模式预计更具有科学性与实用价值.

■创新盘点
本文总结了我国常见消化系肿瘤(大肠癌和胃癌)个体化疗方面的研究进展, 并结合我国的研究现状, 提出在我国开展“个体化疗”尚需完善的工作.

## 3 胃癌个体化疗

胃癌的个体化疗相关研究与肺癌和大肠癌相比显得明显滞后, 国外仅有一些零散的文献报道. 文献涉及到的基因有铂类相关的*XPD*, *ERCC1*, *GST*和*GADD45A*; 5-FU类相关的*TS*, *DPD*, *TP*和*OPRT*等已知基因. 胃癌例数超过50例的5-FU相关文献只有5篇, 其中基因表达者2篇, 基因多态性3篇[12-16]: 来自日本59例胃癌5-FU代谢途径4个基因(*TS*, *OPRT*, *TP*和*UP*)的表达结果显示OPRT mRNA高表达与TS mRNA低表达者5-FU化疗易获得疗效; 来自德国61例胃癌5-FU相关基因(*TS*, *DPD*和*TP*)mRNA表达结果却发现TS mRNA水平与疗效无明显相关性; TS的基因型却与胃癌5-FU疗效及预后有相关性. 胃癌例数超过50例的铂类相关文献仅有3篇[13,15-16]: 其中德国61例胃癌组织的GADD45A mRNA表达水平与疗效及生存时间有一定的相关性, 52例胃癌GST多态性与疗效及生存时间相关. 从以上文献中可以看出胃癌的个体化疗相关研究还处于起步阶段, 例数不多、深入不够, 主要是研究已知基因, 不同人种结果还不尽一致, 缺乏类似肺癌和大肠癌那样的大样本多基因研究.

我们从2004年开始就在南京从事胃癌的药物遗传学/基因组学研究. 在建立了稳定的从石蜡组织扩增微量mRNA等技术的基础上, 先后开展了多项本项目相关研究, 发现: (1)胃癌组织ERCC1 mRNA水平的高低与铂类化疗生存时间存在显著相关性, TS mRNA水平与5-FU疗效关系不肯定; (2)胃癌*XRCC1*多态性与疗效相关, 而*XPD*和*GST*基因多态性未能够显示与铂类化疗疗效的相关性, 该结果与欧洲文献报道有所不同. 此外, 我们还紧密联系临床需求, 分别以恶性腹水上清和肿瘤细胞为研究对象, 探讨了胃癌实时个体化治疗的可能性, 发现: (1)腹水上清中可以检查出游离mRNA的存在, 且可以定量检

查; (2)腹水肿瘤细胞表达的某些药物疗效相关基因水平与实时药物敏感结果具有统计学的相关性. 以上结果为后续进一步深入研究奠定了基础. 相关内容将在国内外杂志陆续报道. 根据我们掌握的信息, 以腹水为对象开展个体化疗或实时个体化疗相关研究, 在国外国内均尚属首次.

## 4 个体化疗尚待完善之处

根据药物遗传学/药物基因组学知识开展的个体化疗研究是肿瘤化疗的最受瞩目的内容, 代表了肿瘤化疗的进一步精细化和发展方向, 且已在肿瘤界获得广泛肯定. 但是, 该领域毕竟是最近3-5 a才快速发展起来的年轻的学术分支, 除了对非小细胞肺癌铂类化疗(ERCC1 mRNA及蛋白水平)有临床大样本多中心研究结果以外, 尚有很多问题有待明确与回答.

4.1 *种族差异* 基因的多态性在不同种族人群常常表现出明显差异. 现有文献资料中铂类和紫杉类相关基因几乎均源于美欧人种, 5-FU类相关基因主要源于日本. 这些已发现的基因对中华民族的价值显然不会完全等同于国外的结果, 需要逐一验证. 我们的前期研究也证实了种族差异不可忽视.

4.2 *肿瘤类型* 肿瘤类型不同, 如肺癌、大肠癌和胃癌等, 肿瘤发生及生物学行为相关的基因谱不尽相同.

4.3 *药物基因谱* 迄今的发现均提示任一药物的疗效都有多种基因参与. 发现每一种化疗药物的疗效相关基因谱, 建立数学模型, 以疗效指数(response index)为参考点, 无疑更为合理. 目前这一思路见诸于文献仅有半年的时间(为5-FU相关、22例大肠癌), 有大量基础和临床性工作需要完善[12].

4.4 *实时个体化疗* 目前的个体化疗相关文献, 均集中于初次化疗前肿瘤组织某一基因的表达与疗效的关系. 事实上, 基因表达水平是随着漫长的药物的干预而不断发生变化的. 因此, 努力寻找具有临床可操作潜力的技术, 开展实时个体化疗的研究, 更符合临床需求, 潜力更大. 由于个体化疗本身就是近年来刚刚兴起的肿瘤化疗的新领域, 我们查阅国内外文献, 尚未发现涉及“实时个体化疗”的报道.

大肠癌和胃癌是我国人群高发的肿瘤. 在国内系统开展大肠癌和胃癌的个体化疗及实时个体化疗的研究, 既有鲜明的科学性, 又具有潜在的实用价值. 根据我们的前期工作基础, 相信经过深入研究, 会对提高大肠癌和胃癌治疗效果、减少无效化疗作出相应的贡献.

## 5 参考文献


1 Park DJ, Lenz HJ. Determinants of chemosensitivity in gastric cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 337-344
2 刘宝瑞, 刘文超. 现代肿瘤化疗手册. 第1版. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 82-93
3 Sadighi S, Mohagheghi MA, Montazeri A, Sadighi Z. Quality of life in patients with advanced gastric cancer: a randomized trial comparing docetaxel, cisplatin, 5-FU (TCF) with epirubicin, cisplatin, 5-FU (ECF). *BMC Cancer* 2006; 6: 274
4 Sumpter K, Harper-Wynne C, Cunningham D, Rao S, Tebbutt N, Norman AR, Ward C, Iveson T, Nicolson M, Hickish T, Hill M, Oates J. Report of two protocol planned interim analyses in a randomised multicentre phase III study comparing capecitabine with fluorouracil and oxaliplatin with cisplatin in patients with advanced oesophagogastric cancer receiving ECF. *Br J Cancer* 2005; 92: 1976-1983
5 Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Risse ML, Ajani JA. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4991-4997
6 魏嘉, 刘宝瑞, 王亚平, 钱晓萍. DNA修复基因单核苷酸多态性与铂类药物抵抗研究进展. 中华肿瘤杂志 2006; 28: 161-163
7 王立峰, 钱晓萍, 刘宝瑞. 药物遗传学和药物基因组学在肿瘤治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 318-323
8 Rosell R. Pharmacogenomics comes of age in selecting patients for lungcancer treatment. American Society of Clinical Oncology, 42nd Annual Meeting, Educational Book. 2006; 425-430
9 Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 983-991
10 Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S, Lenz HJ. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 344-354
11 Matsuyama R, Togo S, Shimizu D, Momiyama N, Ishikawa T, Ichikawa Y, Endo I, Kunisaki C, Suzuki H, Hayasizaki Y, Shimada H. Predicting 5-fluorouracil chemosensitivity of liver metastases from colorectal cancer using primary tumor specimens: three-gene expression model predicts clinical response. *Int J Cancer* 2006; 119: 406-413
12 Ichikawa W, Takahashi T, Suto K, Shirota Y, Nihei Z, Shimizu M, Sasaki Y, Hirayama R. Simple combinations of 5-FU pathway genes predict


**■应用要点**
通过检测药物相关基因的水平, 有目的地选择化疗药物, 具有极大的临床应用价值.

**■名词解释**
1 药物遗传学: 研究与药物反应性或毒性相关的个体间DNA序列/基因多态性的差异.
2 药物基因组学: 将全基因组技术(即基因表达数据)用于预测1个患病个体对1个/1组药物的敏感性或抵抗性.

■同行评价
本文评论了肿瘤个体化化疗，尤其是胃肠癌的个体化化疗的现状与展望，行文流畅，有条理，很有见地，引用文献较新、较全面，有很好的借鉴价值.

the outcome of metastatic gastric cancer patients treated by S-1. *Int J Cancer* 2006; 119: 1927-1933
13 Napieralski R, Ott K, Kremer M, Specht K, Vogelsang H, Becker K, Muller M, Lordick F, Fink U, Rudiger Siewert J, Hofler H, Keller G. Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3025-3031
14 Ott K, Vogelsang H, Marton N, Becker K, Lordick F, Kobl M, Schuhmacher C, Novotny A, Mueller J, Fink U, Ulm K, Siewert JR, Hofler H, Keller G. The thymidylate synthase tandem repeat promoter polymorphism: A predictor for tumor-related survival in neoadjuvant treated locally advanced gastric cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 2885-2894
15 Goekkurt E, Hoehn S, Wolschke C, Wittmer C, Stueber C, Hossfeld DK, Stoehlmacher J. Polymorphisms of glutathione S-transferases (GST) and thymidylate synthase (TS)--novel predictors for response and survival in gastric cancer patients. *Br J Cancer* 2006; 94: 281-286
16 Ruzzo A, Graziano F, Kawakami K, Watanabe G, Santini D, Catalano V, Bisonni R, Canestrari E, Ficarelli R, Menichetti ET, Mari D, Testa E, Silva R, Vincenzi B, Giordani P, Cascinu S, Giustini L, Tonini G, Magnani M. Pharmacogenetic profiling and clinical outcome of patients with advanced gastric cancer treated with palliative chemotherapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1883-1891

电编 张敏 编辑 何燕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 功能性胃肠病诊治进展通知

**本刊讯** 经卫生部批准, 由甘肃省人民医院消化科主办的2007年国家级继续医学教育项目“功能性胃肠病诊治进展”(项目编号: 2007-0-0-02), 定于2007-09-01/05在甘肃兰州举行. 学习班期间将邀请国内及省内知名消化专家, 讲授功能性胃肠病诊治进展.

## 1 授课内容

功能性胃肠病罗马III分类及诊断标准的核心内容, 有消化道症状的抑郁及焦虑症状的判定评分标. 伴有抑郁及焦虑症状的功能性胃肠病患者的心理治疗, 便秘及腹泻型IBS、功能性腹胀、功能性便秘等, 功能性烧心、食管源性胸痛、功能性吞咽困难, 食管压力测定的临床意义; 糖尿病人食管压力测定结果与正常人群食管压力测定结果对比分析; 功能性消化不良、反刍综合征等; 胆囊及Oddi括约肌功能紊乱的诊断和治疗; 功能性大便失禁、功能性肛门直肠疼痛、功能性排便障碍; 功能性腹痛的诊断标准及治疗, 兰州地区50例健康成人食管PH测定结果分析; 食管PH监测的临床意义; 胃食管反流病人反流程度不同伴有不同的症状积分; 治疗功能性胃肠道疾病新方法疗效的临床试验设计; 学习班结业时授予国家级继续医学教育项目学分12学分. 学习班费用(含资料及证书费): 680元. 食宿统一安排. 费用自理. 有意参加者请于2007-07-25前将回执寄至甘肃省人民医院消化科, 以便预定房间并发第二轮通知.

## 2 联系方式

730000, 兰州市东岗西路160号, 甘肃省人民医院消化科. 联系人: 陈翔; 电话: 0931-8281140; 8281141

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 1983-1988
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

# 缺氧时三氧化二砷对人肝癌细胞株BEL-7402生长及凋亡的影响及机制

刘晓川, 刘铁夫

刘晓川, 刘铁夫, 哈尔滨医科大学附属第四临床医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150001
刘晓川, 哈尔滨医科大学消化内科博士, 主要从事消化系统肿瘤的研究.
黑龙江省卫生厅基金资助项目, No. 2006-236
**通讯作者:** 刘铁夫, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区颐园街37号, 哈尔滨医科大学附属第四临床医学院消化内科.
tfliu@mail.csoft.com.cn
电话: 0451-82576696
收稿日期: 2007-03-01 接受日期: 2007-03-31

## Effects and mechanism of arsenic trioxide on growth and apoptosis of the human liver cancer cell line BEL-7402 during hypoxia

Xiao-Chuan Liu, Tie-Fu Liu

Xiao-Chuan Liu, Tie-Fu Liu, Department of Gastroenterology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Supported by: Foundation from Sanitation Office, Heilongjiang Province, No. 2006-236
Correspondence to: Dr. Tie-Fu Liu, Department of Gastroenterology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, No. 37 Yiyuan Street, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. tfliu@mail.csoft.com.cn
Received: 2007-03-01 Accepted: 2007-03-31

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of arsenic trioxide ($As_2O_3$) on apoptosis and migration of the human liver cancer cell BEL-7402 under normal and hypoxic conditions.

**METHODS:** A hypoxic environment was induced by $CoCl_2$. The effect of $As_2O_3$ was determined by MTT assay. Electron microscopy, laser scanning confocal microscopy and flow cytometry (FCM) were used to study apoptosis of the human liver cancer cell BEL-7402. Expression of the multidrug resistance 1 (mdr1) and Hypoxia-inducible-factor-1α (HIF-1α) genes was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

**RESULTS:** Different concentrations of $As_2O_3$ can inhibit growth and induce apoptosis of the human liver cancer cell BEL-7402 during hypoxia. After being induced by 4.0 μmol/L $As_2O_3$ for 48 hours in hypoxia, the BEL-7402 cell had morphological features of apoptosis as observed by electron and laser scanning confocal microscopes. Concentrations of 0.5-4.0 μmol/L $As_2O_3$ down-regulated the mRNA expression of HIF-1α and mdr1 under hypoxic conditions, with the strongest effect being from 4.0 μmol/L. The mRNA contents of HIF-1α and mdr1 treated with 4.0 μmol/L $As_2O_3$ for 48 hours under hypoxic conditions were 0.60 ± 0.07 and 0.59 ± 0.09, respectively. This was significantly different compared with the hypoxia control group ($P < 0.01$).

**CONCLUSION:** $As_2O_3$ inhibited growth and induced apoptosis in the human liver cancer cell line BEL-7402 during hypoxia. The mechanism probably was related to the inhibition of the expressions of HIF-1α and mdr1.

Key Words: Arsenic Trioxide; Hypoxia; Apoptosis; Hypoxia-inducible-factor-1α; multidrug resistance 1

Liu XC, Liu TF. Effects and mechanism of arsenic trioxide on growth and apoptosis of the human liver cancer cell line BEL-7402 during hypoxia. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):1983-1988

## 摘要

**目的:** 探讨不同浓度三氧化二砷($As_2O_3$)对人肝癌细胞株BEL-7402生长及凋亡的影响及机制.

**方法:** 应用化学缺氧剂二氯化钴($CoCl_2$)诱导人肝癌细胞BEL-7402缺氧. 不同浓度$As_2O_3$对BEL-7402进行干预后, 应用MTT法测定缺氧条件下的生长抑制作用; 应用电镜, 激光共聚焦显微镜及流式细胞术观察其对细胞凋亡的影响; 应用逆转录聚合酶链式反应检测缺氧诱导因子HIF-1α, 耐药基因mdr1的表达水平.

**结果:** $As_2O_3$具有抑制人肝癌细胞株BEL-7402

**■背景资料**
我国是世界上原发性肝癌发病率最高的国家之一. 原发性肝癌的大多数病例在确诊时已失去手术根治机会, 诊断时不能切除的病例占80%以上. 缺氧作为恶性实体瘤的特征之一, 不仅改变了肿瘤细胞的生物学特性, 导致肿瘤细胞的遗传不稳定性及恶性选择, 而且也是肿瘤对放、化疗产生抗性的主要原因.

■研发前沿
实体肿瘤的缺氧, 已经成为影响肿瘤化疗敏感性的关键问题, HIF-1则是肿瘤缺氧过程中的关键影响因子, 并成为目前攻克肿瘤治疗的重要分子靶点. 国内外研究目前主要集中于研究HIF-1的调控、小分子siRNA的基因治疗和HIF-1抑制剂的研发. 但HIF-1的抑制剂多具有较大毒性作用, 使其临床应用受到限制.

缺氧条件下生长的作用, 并呈剂量-效应依赖性; 4.0 μmol/L $As_2O_3$干预48 h后, 缺氧条件下的细胞呈现典型的凋亡形态学特征; 缺氧时, 0.5-4.0 μmol/L $As_2O_3$下调HIF-1α, mdr1基因表达水平, 其中4.0 μmol/L $As_2O_3$组作用最强, 基因相对表达量分别为HIF-1α 0.60±0.07, mdr1 0.59±0.09, 各剂量组$As_2O_3$作用后与缺氧对照组比较差异有显著性($P$<0.01).

**结论:** 不同浓度的$As_2O_3$在由$CoCl_2$诱导的化学缺氧条件下能够抑制人肝癌细胞BEL-7402的生长及诱导凋亡, 其机制可能与$As_2O_3$下调HIF-1α, mdr1的基因表达水平有关.

**关键词: 三氧化二砷; 缺氧; 凋亡; 缺氧诱导因子1α; 耐药基因1**

刘晓川, 刘铁夫. 缺氧时三氧化二砷对人肝癌细胞株BEL-7402生长及凋亡的影响及机制. 世界华人消化杂志 2007;15(18):1983-1988
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1983.asp

## 0 引言

三氧化二砷($As_2O_3$)近年来在抗肿瘤治疗方面取得了肯定的疗效, 其主要机制为诱导肿瘤细胞凋亡. 许多研究证实其对多种消化系肿瘤细胞的生长有抑制作用. 而实体肿瘤大多存在内部缺氧的报道也被很多研究所证实. 究竟$As_2O_3$在缺氧微环境下对实体肿瘤的生长有无抑制作用还鲜有报道. 本实验将就$As_2O_3$在缺氧时对人肝癌细胞的生长抑制、诱导凋亡及作用机制方面作进一步研究.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株BEL-7402由哈尔滨医科大学附属一院刘连新教授惠赠. RPMI1640培养基购自Gibco公司, $As_2O_3$, $CoCl_2$, MTT购自美国Sigma公司. Annexin V-FITC试剂盒购自深圳晶美生物. TRIzol及ThermoScript RT-PCR试剂盒购自美国Invitrogen公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肝癌细胞BEL-7402于含100 mL/L胎牛血清及100 kU/L双抗的RPMI1640培养液中培养. 化学缺氧剂$CoCl_2$加入培养液的终浓度为150 μmol/L[1], 用于模拟肿瘤内缺氧微环境.

1.2.2 MTT法测定常氧及缺氧条件下$As_2O_3$对细胞增殖活性的影响 实验分常氧组及缺氧组; 将处于对数生长期的细胞以5×$10^7$个/L浓度接种于96孔板中, 每孔200 μL, 在0.5-32 μmol/L的$As_2O_3$作用下培养48 h, 每个药物浓度设3个复孔, 培养终点前4 h每孔加入MTT(5 g/L) 20 μL, 继续培养4 h, 吸出培养液, 每孔加入150 μL二甲基亚枫, 震荡10 min酶标仪波长570 nm处测吸光值($A$值). 实验重复3次, 计算细胞增殖抑制率, 以$As_2O_3$浓度对数为横轴, 细胞存活率为纵轴做图, 并用作图法求出$As_2O_3$半数抑制浓度($IC_{50}$).

1.2.3 透射电镜观察细胞凋亡形态学变化 取对数生长期细胞接种于培养瓶中, 细胞贴壁后更换为缺氧培养基并加入4.0 μmol/L $As_2O_3$培养48 h后消化、离心, PBS洗涤, 2000 r/min离心10 min, 弃上清, 0.3 g/L戊二醛固定, 送电镜室.

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察细胞凋亡改变 取对数生长期细胞接种于6孔板行细胞爬片, 细胞贴壁后更换为缺氧培养基并加入4.0 μmol/L $As_2O_3$培养48 h. PBS洗涤, 按试剂盒说明, 行Annexin-V染色, 激光共聚焦显微镜下观察结果.

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 实验分为常氧对照组、常氧$As_2O_3$(4.0 μmol/L)组、缺氧对照组、缺氧$As_2O_3$作用组. 各组细胞分别处理48 h后, 2.5 g/L胰酶消化, 离心收集1×$10^6$个细胞, 4℃ PBS洗2次后重悬, 按试剂盒说明, 进行Annexin-V染色, 上流式细胞仪收集10 000个活细胞检测细胞凋亡率, 凋亡率(%) = (Annexin-$V^+$ $PI^+$细胞数+Annexin-$V^+$ $PI^-$细胞数)/10 000×100%. 其中Annexin-$V^+$ $PI^+$细胞为晚期凋亡细胞, Annexin-$V^+$ $PI^-$细胞数为早期凋亡细胞, 实验重复3次.

1.2.6 RT-PCR半定量法检测HIF-1α及mdr1 mRNA含量 实验分为常氧对照组、缺氧48 h对照组、不同浓度$As_2O_3$缺氧条件下处理组. (1)TRIzol法提取细胞内总RNA: 按试剂操作说明书进行, 电泳检测RNA质量, 测$A$值; (2)cDNA合成: 在0.2 mL的PCR反应管中加入10 pg-5 μg RNA, dNTPs并加入DEPC处理水和1.0 μL oligo (dT)引物, 总体积为12 μL, 65℃变性5 min; 置于冰上; 加入5×Reaction Buffer 4.0 μL, DTT (0.1 mol) 1.0 μL, RNaseOUT™ 1.0 μL, ThermoScript™ 1.0 μL, DEPC处理水1.0 μL, 50℃反应60 min; 85℃加热5 min, 停止cDNA合成反应; 加入1 μL RNase H, 37℃反应20 min, cDNA合成完成后, -20℃保存或立即用于PCR实验; (3)PCR法检测HIF-1α和mdr1的mRNA含量: 以逆转录所得cDNA为模板进行PCR扩增, 总体积为25 μL. 反应体系为: 10×PCR Buffer Minus

表 1 HIF-1α, mdr1, β-actin引物

| 扩增基因 | 预期产物 | 引物 | | T |
|---|---|---|---|---|
| HIF-1α | 459 | 上游引物 | 5'-TCAAAGTCGGACAGCCTC-3' | 58℃ |
| | | 下游引物 | 5'-CCCTGCAGTAGGGTTTCTGCT-3' | |
| mdr1 | 501 | 上游引物 | 5'-AGAGGCTCTATGACCCCACA-3' | 55℃ |
| | | 下游引物 | 5'-CCACAATGACTCCATCATCG-3' | |
| β-actin | 500 | 上游引物 | 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' | 58℃ |
| | | 下游引物 | 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' | |

**■创新盘点**

为了进一步探讨$As_2O_3$抗实体瘤的作用机制, 本实验设计应用化学诱导缺氧的条件下应用$As_2O_3$对肝癌细胞株进行干预, 观察其对肝癌细胞生长及凋亡的影响, 检测与缺氧及肿瘤化疗敏感性相关的分子指标, 发掘其于传统抗肿瘤药物相比的优势, 完善$As_2O_3$抗肝癌治疗的作用机制, 为临床联合应用药物提供科学的理论基础. 此方面问题国内外尚未见报道.

Mg 2.5 μL, 50 mmol/L $MgCl_2$ 1.0 μL, 10 μmol/L dNTP Mixture 0.5 μL, 10 μmol/L sense primer 1.0 μL, 10 μmol/L antisense primer 1.0 μL, Taq DNA polymerase 0.2 μL, RT Products 2.0 μL, DEPC处理水16.8 μL; 目的基因HIF-1α的扩增: 95℃ 2 min, 94℃ 1 min, 58℃ 45 s, 72℃ 45 s, 25个循环后74℃延伸10 min; 目的基因mdr1的扩增: 95℃ 2 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 45 s, 25个循环后72℃延伸10 min; 内参β-actin的扩增: 95℃ 2 min, 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 74℃ 1 min, 25个循环后74℃延伸10 min; 15 g/L琼脂糖电泳鉴定扩增产物, 凝胶图像扫描分析系统观察条带位置, 灰度, 扫描凝胶得到内参对照β-actin与目的基因的电泳条带光密度, 通过目的基因/β-actin的光密度比值做相对定量分析. 引物序列见表1.

**统计学处理** 数据均用统计软件包SAS11.5分析, 配对组间比较采用*t*检验, 多组间比较采用方差分析.

## 2 结果

2.1 常氧和缺氧组$As_2O_3$对人肝癌细胞株BEL-7402增殖活性的影响 不同浓度的$As_2O_3$在常氧及缺氧条件下对BEL-7402的生长均有抑制作用, 并呈剂量-效应关系, 常氧组和缺氧组不同浓度$As_2O_3$对BEL-7402的生长抑制作用相似(表2), 无统计学差异($P$>0.05). 常氧和缺氧组48 h $As_2O_3$ $IC_{50}$值分别为17.56 μmol/L和17.24 μmol/L, 差异无显著性($P$>0.05).

2.2 缺氧时$As_2O_3$对人肝癌细胞株BEL-7402凋亡的影响 (1)透射电镜观察细胞凋亡形态学改变, 未加药组细胞48 h电镜像显示胞膜完整, 表面微绒毛丰富, 细胞器结构正常, 核仁较大, 染色质均匀, 常染色质丰富. 经$As_2O_3$作用48 h后呈现典型凋亡改变, 可见染色质边聚于核膜下, 细胞表面伸出空泡样的质膜突起, 游离核糖体解聚, 凋亡小体形成; 细胞核固缩, 细胞表面微绒毛减少, 甚至消失(图1); (2)激光共聚焦显微镜Annexin-V染色结果: 凋亡早期细胞仅细胞膜被染成绿色, 中期以后胞膜胞质均为绿色, 凋亡小体形成, 绿红双染为凋亡晚期细胞, 红色单染为死亡细胞(图2); (3)流式细胞术AnnexinV标记染色结果: 150 μmol/L $CoCl_2$诱导的缺氧48 h细胞与正常细胞对照相比, 无明显凋亡出现, 差异无显著性. 常氧和缺氧条件下相同浓度$As_2O_3$ (4.0 μmol/L)作用48 h后, 常氧组早期凋亡率为18.46%±4.69%, 晚期凋亡率为4.86%±2.24%, 总凋亡率为23.33%±3.10%; 缺氧组早期凋亡率为14.56%±2.82%, 晚期凋亡率为8.52%±4.29%, 总凋亡率为22.74%±3.01%, 两组间总凋亡率比较, $P$>0.05, 差异无统计学意义.

2.3 半定量RT-PCR检测常氧、缺氧及不同浓度$As_2O_3$作用后HIF-1α, mdr1 mRNA基因表达水平的变化 常氧组HIF-1α, mdr1 mRNA基因表达均为较低水平, 缺氧诱导48 h后, 两种基因表达水平与常氧组比较都有显著升高, 两组之间比较有统计学意义(HIF-1α: $t$ = 17.457, $P$<0.01) (mdr1: $t$ = 12.742, $P$<0.01); 缺氧条件下应用不同浓度$As_2O_3$作用48 h后HIF-1α及mdr1基因表达水平与缺氧48 h对照组相比有明显下降, 有统计学意义($P$<0.01, 图3, 表3).

## 3 讨论

近年的研究表明, 实质性肿瘤发生过程中, 血管生长的相对滞后和肿瘤细胞的快速增殖导致肿瘤细胞缺氧[2]. 缺氧介导肿瘤细胞的恶性筛选, 导致缺氧肿瘤细胞对放、化疗耐受性的增加[3]. 缺氧还可以使肿瘤细胞内参与解毒和药物代谢的酶类表达增加, 从而使进入细胞内的化疗药物迅速被代谢而丧失效应[4-5]. Tan *et al*[6]研究发现, $CoCl_2$诱导的体外缺氧可以减缓SW480细胞的生长速度, 并降低SW480细胞对氟尿嘧啶的敏感性, 其机制可能与HIF-1α及HO-1的表达上调有

**■应用要点**
本实验结果中，$As_2O_3$对由缺氧诱导的HIF-1α和mdr1基因表达水平的下调，提示我们小剂量$As_2O_3$具有不易产生肿瘤治疗中常出现的多药耐药性的优点. 因此在临床治疗过程中，可考虑将小剂量$As_2O_3$与常规化疗药物联合应用，提高实质肿瘤细胞在缺氧微环境下对化疗药物的敏感性，发挥化疗药物的最佳作用.

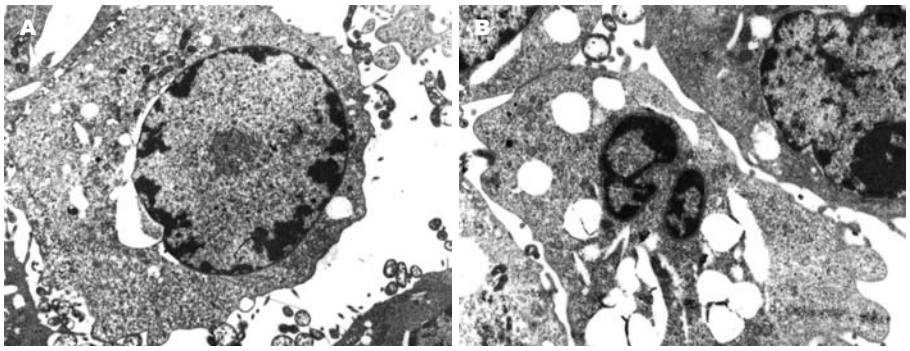



**图 1 缺氧条件下$As_2O_3$作用48 h电镜下观察**. A: 早期凋亡细胞，核染色质边聚(×5000); B: 细胞凋亡小体形成(×8000).

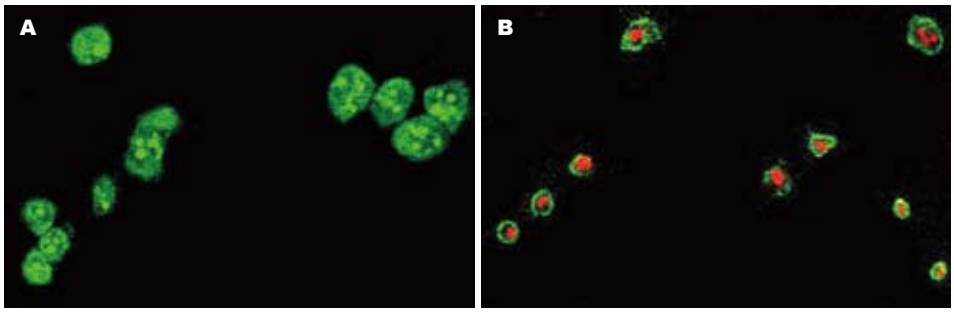



**图 2 缺氧条件下$As_2O_3$作用48 h激光共聚焦显微镜Annexin-V染色**. A: 绿色单染早、中期凋亡细胞(×40); B: 红、绿色双染凋亡晚期细胞(×25).

表 2 不同氧条件下$As_2O_3$对人肝癌细胞株BEL-7402细胞的抑制率

| 浓度 | 常氧组 | | 缺氧组 | |
|---|---|---|---|---|
| (μmol/L) | *A* | 抑制率(%) | *A* | 抑制率(%) |
| 对照组 | 2.109 ± 0.042 | – | 2.126 ± 0.023 | – |
| 0.5 | 1.949 ± 0.044 | 7.59 ± 0.32[b] | 1.953 ± 0.092 | 8.14 ± 1.03[b] |
| 1.0 | 1.814 ± 0.063 | 13.99 ± 0.93[b] | 1.816 ± 0.049 | 14.47 ± 1.66[b] |
| 2.0 | 1.628 ± 0.067 | 22.81 ± 1.42[b] | 1.657 ± 0.065 | 21.85 ± 2.33[b] |
| 4.0 | 1.443 ± 0.058 | 31.58 ± 2.06[b] | 1.499 ± 0.046 | 29.49 ± 1.45[b] |
| 8.0 | 1.290 ± 0.087 | 38.83 ± 1.38[b] | 1.320 ± 0.048 | 37.91 ± 2.32[b] |
| 16.0 | 1.132 ± 0.034 | 46.33 ± 1.98[b] | 1.105 ± 0.042 | 47.93 ± 2.88[b] |
| 32.0 | 0.548 ± 0.027 | 74.02 ± 2.02[b] | 0.516 ± 0.081 | 75.70 ± 1.64[b] |

[b]$P<0.01$ *vs* 各自细胞对照组.

关. 而本实验研究结果显示，$As_2O_3$对由$CoCl_2$诱导的化学缺氧条件下的人肝癌细胞株BEL-7402仍具有良好的生长抑制这用，同常氧组比较差异无显著性. 缺氧组应用小剂量$As_2O_3$处理后，电镜下观察人肝癌细胞株BEL-7402出现典型凋亡形态学改变；流式细胞术AnnexinV-FIFC染色提示，$As_2O_3$在缺氧时仍能发挥较好的诱导肿瘤细胞凋亡的作用，与常氧组比较作用相近. 因此，同传统的化疗药物相比，$As_2O_3$缺氧时可能发挥更好的抗肿瘤作用.

那么，$As_2O_3$在缺氧时是通过何种机制发挥其抑制肿瘤细胞生长及诱导凋亡作用的？宗建春 *et al*[7]报道在缺氧时，$As_2O_3$明显抑制乳腺癌细胞株MDA-MB-435S VEGF mRNA及VEGF蛋白的表达，且随$As_2O_3$浓度的增加其抑制作用更明显. VEGF mRNA的表达下降提示$As_2O_3$的作用靶点发生在VEGF的上游调控因子. Hideo *et al*[8]认为VEGF增强子区域存在数个转录因子结合位点，如AP-1, AP-2, SP-1和缺氧诱导因子-1(HIF-1). 常氧条件下VEGF的表达主要由SP-1蛋白调节，在缺氧条件下，肿瘤细胞内AP-1, AP-2, SP-1蛋白水平相对常氧增高并不明显，而HIF-1获得大量表达，说明缺氧时肿瘤细胞内VEGF大量表达主要是由HIF-1调控[9]. 因此，我们推测，

表 3 缺氧48 h $As_2O_3$作用后人肝癌细胞株BEL-7402 HIF-1α和mdr1基因表达

| 基因 | 缺氧组(μmol/L) | | | | | 常氧对照组 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 对照 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | (μmol/L) |
| HIF-1α | 1.31 ± 0.07 | 0.95 ± 0.03[b] | 0.86 ± 0.09[b] | 0.77 ± 0.05[b] | 0.60 ± 0.07[b] | 0.51 ± 0.06 |
| mdr1 | 1.19 ± 0.06 | 0.84 ± 0.09[d] | 0.79 ± 0.07[d] | 0.65 ± 0.06[d] | 0.59 ± 0.09[d] | 0.40 ± 0.04 |

[b]$P$<0.01 *vs* 缺氧对照组HIF-1α基因水平; [d]$P$<0.01 *vs* 缺氧对照组mdr1基因水平.

$As_2O_3$在缺氧时可能通过抑制HIF-1表达发挥其抗肿瘤作用.

缺氧诱导因子HIF-1最先由Semenza *et al*[11]在研究缺氧诱导的基因表达时发现. 他是缺氧反应中的中心调控因子, 缺氧时与缺氧反应基因的缺氧反应元件(HRE)上的HIF-1结合位点[12]结合, 促进缺氧反应基因的转录, 引起细胞对缺氧的一系列适应性反应. 目前已发现有60多个基因受其调[13]. HIF-1由α和β两个亚基组成, 其中α亚基是主要的功能亚基, 对HIF-1的转录活性起关键作用. 大量研究资料表明, HIF-1α在缺氧条件下对肿瘤细胞凋亡具有明显的影响. 应用RNA干扰技术高效特异性地抑制人血管内皮细胞上HIF-1的表达后, 在缺氧/复氧条件下培养发现, 使用RNA干扰的人血管内皮细胞凋亡明显比未用RNA干扰的多, 说明HIF-1有抗细胞凋亡的作用[10]. Piret *et al*[14]也发现缺氧或$CoCl_2$可以诱导HIF-1α的表达, 进而抑制肝癌细胞凋亡. Zaman *et al*[15]的实验结果则为HIF-1抗细胞凋亡的作用提供了直接证据, 他们证明铁离子螯合剂能阻止氧化压力诱导的凋亡. Erler *et al*[17]发现在结肠癌细胞, 肝癌细胞中, 缺氧条件下促凋亡分子Bid呈HIF-1依赖性下调, 从而成为细胞存活的原因.

HIF-1可诱导MDR1/P-gp的表达增加[18]. mdr1基因表达产物P-gp除从细胞内逆浓度梯度排出一系列的疏水性抗癌药物, 降低细胞内药物浓度, 无法构成对肿瘤细胞的有效杀伤而引起耐药外, 还通过抑制Caspase-3和Caspase-8的激活而抑制依赖Caspases激活途径的细胞凋亡[16,19]. Wei *et al*[20]采用0.5-5 μmol/L $As_2O_3$对阿霉素耐药的慢性粒细胞白血病K562/ADM细胞分别作用48和96 h, 证实$As_2O_3$逆转其耐药性与抑制P-gp功能有关. 张亚莉 *et al*[21]研究发现, $As_2O_3$降低mdr1和Survivin基因表达, 进而解除P-gp和Survivin对Caspases的抑制效应而促进细胞凋亡.

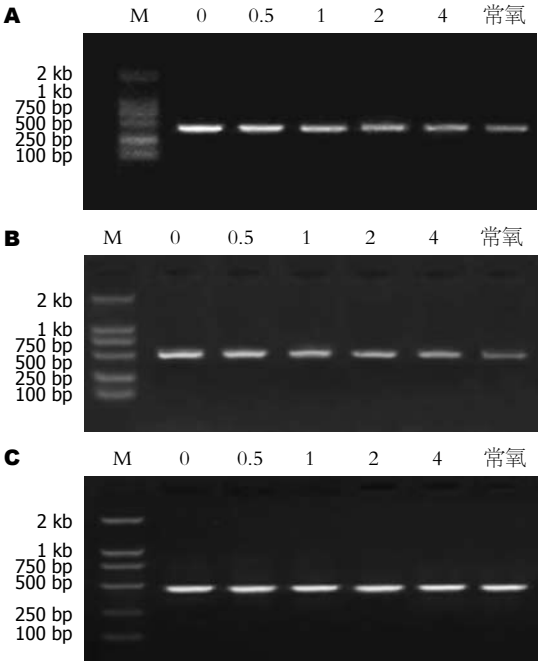



**图 3 不同氧条件不同浓度$As_2O_3$作用48 h后.** A: HIF-1α基因表达水平; B: mdr1基因表达水平; C: β-actin基因表达水平.

本实验结果提示, 化学缺氧48 h对照组与常氧对照组相比, HIF-1α和mdr1基因表达水平有明显增加, 具有统计学意义. 说明缺氧可以诱导HIF-1α和mdr1基因水平表达. 应用小剂量$As_2O_3$后(0.5-4.0 μmol/L), HIF-1α和mdr1的基因表达水平明显下调, 且在一定范围内随$As_2O_3$剂量的增加下调更加明显, 与缺氧对照组相比具有统计学意义, 这可能是$As_2O_3$在缺氧时仍能发挥其对人肝癌细胞株BEL-7402的生长抑制和诱导细胞凋亡的机制之一. HIF-1也是导致肿瘤细胞对化疗药物耐受的重要因素, 降低化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用; 缺氧时HIF-1可启动mdr1基因的转录; 本实验结果中, $As_2O_3$对由缺氧诱导的HIF-1α和mdr1基因表达水平的下调, 提示我们小剂量$As_2O_3$具有不易产生肿瘤治疗中常出现的多药耐药性的优点. 因此在临床治疗过程中, 可考虑将小剂量$As_2O_3$与常规化疗药物联合应用,

**■同行评价**

本文研究了缺氧时三氧化二砷对肝癌细胞株BEL-7402生长及凋亡的影响, 对癌细胞在缺氧情况下, 药物的耐药性及内科治疗的敏感性都有临床指导意义. 同时, 对其中的机制也做了初步研究, 具有先进性, 值得参考.

提高实质肿瘤细胞在缺氧微环境下对化疗药物的敏感性, 发挥化疗药物的最佳作用.

## 4 参考文献


1 Wu Q, Yang SH, Ye SN, Wang RY. Therapeutic effects of RNA interference targeting HIF-1 alpha gene on human osteosarcoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 409-413

2 Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1649-1660

3 Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells* 2002; 7: 143-149

4 Frederiksen LJ, Siemens DR, Heaton JP, Maxwell LR, Adams MA, Graham CH. Hypoxia induced resistance to doxorubicin in prostate cancer cells is inhibited by low concentrations of glyceryl trinitrate. *J Urol* 2003; 170: 1003-1007

5 Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 297-307

6 Tan ZM, Wu Y, Zhang HL, Xiao XZ. CoCl2-induced chemotherapy resistance in SW480 cells and its mechanism. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006; 31: 345-349

7 宗建春, 吴诚义, 吴凯南. 三氧化二砷对乳腺癌细胞血管内皮生长因子表达的影响. 中华实验外科杂志 2005; 22: 532-534

8 Hideo Kimura, Alessandro Weisz, Yukiko Kurashima, Kouichi Hashimoto, Tsutomu Ogura, Fulvio D'Acquisto, Raffaelo Addeo, Masatoshi Makuuchi, and Hiroyasu Esumi. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric 1oxide : control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 2000; 95: 189-197

9 Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 139-145

10 Yu EZ, Li YY, Liu XH, Kagan E, McCarron RM. Antiapoptotic action of hypoxia-inducible factor-1 alpha in human endothelial cells. *Lab Invest* 2004; 84: 553-561

11 Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447-5454

12 Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 2911-2916

13 Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000; 14: 34-44

14 Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. CoCl2, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973: 443-447

15 Zaman K, Ryu H, Hall D, O'Donovan K, Lin KI, Miller MP, Marquis JC, Baraban JM, Semenza GL, Ratan RR. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci* 1999; 19: 9821-9830

16 Ruefli AA, Smyth MJ, Johnstone RW. HMBA induces activation of a caspase-independent cell death pathway to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Blood* 2000; 95: 2378-2385

17 Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ, Dive C. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 2875-2889

18 Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002; 62: 3387-3394

19 Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ. P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* 1999; 93: 1075-1085

20 Wei HL, Yao XJ, Li YN, Wang P, Zhao HS, Bai DC, Peng X, Ma LF. Arsenic trioxide inhibits P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human leukemia K562/ADM cell line that overexpresses mdr-1 gene and enhances their chemotherapeutic sensitivity. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2003; 24: 28-31

21 张亚莉, 魏虎来, 郭璐. 三氧化二砷诱导K562/ADM细胞凋亡中mdr1和Survivin基因的表达. 中华肿瘤防治杂志 2006; 13: 577-581


电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 1989-1994
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

# 代谢综合征小鼠肝脏过氧化物增殖体受体γ共同作用因子–1的表达

刘 聪, 吴 波, 李 莉, 陈 威, 李 玲, 韩 萍, 郑长青

刘聪, 吴波, 李莉, 陈威, 李玲, 韩萍, 中国医科大学附属第二医院内分泌科 辽宁省沈阳市 110003
郑长青, 中国医科大学附属第二医院消化内科 辽宁省沈阳市 110003
刘聪, 1986年中国医科大学本科毕业, 1996年中国医科大学研究生毕业, 2004年中国医科大学博士毕业, 副教授, 主要从事糖尿病分子生物学及遗传学研究.
辽宁省教育厅B类项目, No. 202010795
**通讯作者**: 刘聪, 110003, 沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属第二医院内分泌科. liucongjp@yahoo.com
电话: 024-83956478
收稿日期: 2006-11-18 接受日期: 2007-03-17

## Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ-coactivator–1 in liver of metabolic syndrome mice

Cong Liu, Bo Wu, Li Li, Wei Chen, Ling Li, Ping Han, Chang-Qing Zheng

Cong Liu, Bo Wu, Li Li, Wei Chen, Ling Li, Ping Han, Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China
Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China
Supported by: Education Bureau of Liaoning Province, No. 202010795
Correspondence to: Cong Liu, Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China. liucongjp@yahoo.com
Received: 2006-11-18 Accepted: 2007-03-17

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ-coactivator–1 (PGC-1) in the liver of metabolic syndrome mice.

**METHODS:** Ten female C57BL/6J mice (control group) were fed a normal diet, Fifteen were fed a high fat and sugar diet (metabolic syndrome mice model), made up of 5 fed a high fat and sugar diet for 8 weeks (experimental group: A subgroup) and 10 fed the same diet for 16 weeks (experimental group: B subgroup). Abdominal fat mass, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), fasting blood glucose (FBG), insulin (INS), liver function and liver weight were measured. The lipid content and the protein expression of PGC-1 in liver were detected by Western blot.

**RESULTS:** In the B subgroup mice, abdominal fat mass, serum TC, and FBG were significantly higher than those of the control mice (abdominal fat mass: 3.63 ± 0.62 *vs* 2.99 ± 0.31, $P < 0.01$; TC: 2.31 ± 0.16 mmol/L *vs* 2.04 ± 0.15 mmol/L, $P < 0.01$; FBG: 6.90 ± 1.84 mmol/L *vs* 5.11 ± 1.86 mmol/L, $P < 0.05$). The B subgroup mice had lower levels of serum TP, ALB and A/G compared with the control animals (ALB: 18.12 ± 2.63 g/L *vs* 21.64 ± 3.38 g/L, $P < 0.05$; A/G: 0.89 ± 0.15 *vs* 1.06 ± 0.18, $P < 0.05$). The metabolic syndrome mice had higher levels of serum ALT, ALP and AST than normal controls, the ALP level was significantly differente from the controls (103.80 ± 8.72 U/L *vs* 64.60 ± 10.67 U/L, $P < 0.05$). The TG and TC contents in the liver of the metabolic syndrome mice were more than 2 times higher than the controls (TC: 0.0582 ± 0.0251 mmol/g dry weight *vs* 0.0275 ± 0.0114 mmol/g dry weight, $P < 0.01$; TG: 0.1566 ± 0.0166 mmol/g dry weight *vs* 0.0631 ± 0.0232 mmol/g dry weight, $P < 0.01$). The expression of PGC-1 protein in the liver was higher than in the normal controls, with the experimental B subgroup mice being higher than the experimental A subgroup.

**CONCLUSION:** The C57BL/6J mice, fed a high fat and sugar diet and showing dyslipidmia and fatty liver, presented a kind of metabolic syndrome mice model. The expression of PGC-1 protein in the liver of these metabolic syndrome mice was higher than that of normal mice and may have contributed to the formation of fatty liver.

Key Words: Metabolic syndrome; Nonalcoholic fatty liver disease; Peroxisome proliferator-activated receptor-γ-coactivator–1; Western blot

Liu C, Wu B, Li L, Chen W, Li L, Han P, Zheng CQ. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ-coactivator–1 in liver of metabolic syndrome mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):1989-1994

**■背景资料**
非酒精性脂肪性肝炎与代谢综合征及糖尿病密切相关, 但其发生的机制尚不清楚. PGC-1是核受体家族基因转录的共同作用因子, 参与葡萄糖, 脂肪等能量的代谢, 在肝脏表达丰富, 因而其与糖尿病和胰岛素抵抗的关系受到人们的关注.

■相关报道
国内外研究表明, PGC-1位于染色体4p15.1, 在印第安比马人中, 该区域与人空腹胰岛素浓度相关. PGC-1基因多型性可能与糖尿病及代谢综合征有关. PGC-1对机体的能量代谢起着关键的调节作用. 在线粒体脂肪酸β-氧化酶基因的转录调控中, 他起着重要的作用. 同时, 他也是葡萄糖摄取和肝糖异生及葡萄糖转运的重要作用因子.


## 摘要

**目的:** 探讨代谢综合征小鼠肝脏过氧化物增殖体受体γ共同作用因子-1(PGC-1)表达.

**方法:** 进正常食C57BL/6J小鼠10只、进高脂高糖食8 wk小鼠5只及16 wk小鼠10只. 测定血脂、血清胰岛素(INS)及空腹血糖、肝功、肝脏重质量、腹部瘦肉及瘦肉含量, 肝脏脂质含量及PGC-1蛋白表达采用Western blot免疫印迹, 并做肝脏病理.

**结果:** 进高脂高糖食16 wk的小鼠腹部脂肪量、血清甘油三酯(TC)和空腹血糖(FBG)均明显高于正常小鼠(腹部脂肪量: 3.63±0.62 *vs* 2.99±0.31, $P<0.01$; TC: 2.31±0.16 mmol/L *vs* 2.04±0.15 mmol/L, $P<0.01$; FBG: 6.90±1.84 mmol/L *vs* 5.11±1.86 mmol/L, $P<0.05$). 高脂高糖食的动物血清TP、ALB及A/G低于正常动物, 其中进食16 wk的动物ALB及A/G有显著差异(ALB: 18.12±2.63 g/L *vs* 21.64±3.38 g/L, $P<0.05$; A/G: 0.89±0.15 *vs* 1.06±0.18, $P<0.05$). 血清ALT, ALP及AST高于正常动物, 其中进食16 wk的动物的ALP有显著差异(103.80±8.72 U/L *vs* 64.60±10.67 U/L, $P<0.05$). 高脂高糖食小鼠肝脏有明显脂肪变性, 16 wk重于8 wk的小鼠. 16 wk进高脂高糖食的小鼠肝脏的TC和TG含量显著高于正常动物, 达到正常的2倍以上(TC: 0.0582±0.0251 mmol/g干重 *vs* 0.0275±0.0114 mmol/g干重, $P<0.01$; TG: 0.1566±0.0166 mmol/g干重 *vs* 0.0631±0.0232 mmol/g干重, $P<0.01$). 高脂高糖食小鼠肝脏PGC-1表达高于正常动物, 16 wk强于8 wk的小鼠.

**结论:** 高脂高糖食C57BL/6J小鼠可作为代谢综合征动物模型, 其存在脂肪肝, 肝脏的PGC-1蛋白表达量高于正常食小鼠, 可能其参与脂肪肝的形成.


**关键词: 代谢综合征; 非酒精性脂肪肝; 过氧化物增殖体受体γ共同作用因子–1; 免疫印迹**

刘聪, 吴波, 李莉, 陈威, 李玲, 韩萍, 郑长青. 代谢综合征小鼠肝脏过氧化物增殖体受体γ共同作用因子–1的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(18):1989–1994
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1989.asp

## 0 引言

代谢综合征是21世纪全球重大卫生问题, 日益引起世界各国的广泛关注. 代谢综合征的主要表现是肥胖、糖尿病、血脂异常及胰岛素抵抗, 他不但与糖尿病心血管病变和心血管事件密切相关, 也与非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)密切相关. NASH是由于肥胖、糖尿病、血脂异常及胰岛素抵抗等导致肝脂肪变性和细胞损伤后出现的炎症和纤维化状态[1-4]. 其病因及发病机制比较复杂, 至今尚未完全阐明. 过氧化物增殖体受体γ共同作用因子-1(peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1, PGC-1)是一种过氧化物增殖体受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ, PPARγ)及其他核受体家族基因转录的共同作用因子. 他对机体的能量代谢起着关键的调节作用, 是调节能量代谢基因的辅转录激活物, 在肝脏表达丰富, 参与糖代谢[5-9]. 目前关于代谢综合征及脂肪肝的肝脏PGC-1表达情况报道较少. 本实验通过对代谢综合征小鼠血脂、肝脏变化及肝脏PGC-1表达的观察, 探讨代谢综合征血脂、脂肪肝及肝脏PGC-1间的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 ♀6-8周龄的SPF级C57BL/6J小鼠, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司. PGC-1多克隆抗体购自美国Chemicon生物工程公司. PGC-1表达采用GIS-700D数码凝胶图像处理系统扫描分析结果. 腹部瘦肉及脂肪应用美国NORLAND XR236双能X线骨密度仪测定.

1.2 方法

1.2.1 造模及分组 对照组C57BL/6J小鼠, 喂以正常饮食(每100 g食物中, 含4 g脂肪、24 g蛋白、4.5 g粗纤维), 共10只, 喂养16 wk. 实验组未经处理的小鼠, 其中5只喂以正常食8 wk, 之后喂以高糖高脂食8 wk, 为A亚组; 其中10只喂以高脂高糖食16 wk, 为B亚组. 高糖高脂食(每100 g食物中, 含35.5 g脂肪, 主要是猪油、36.6 g碳水化合物, 主要是蔗糖).

1.2.2 测如下各指标 (1)腹部瘦肉及脂肪测定; (2)测定血脂、血清胰岛素(INS)及空腹血糖(FBG). 禁食12 h后, ip水合氯醛(4 mL/kg体质量)麻醉动物, 眼眶取血法采血, 分离血清, 采用日本HITACHI日立7600-020全自动生化分析仪, 选择性遮蔽法测定血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL); 酶法测定FBG; 测定血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、白蛋白/总蛋白(A/G)、碱性磷酸酶(ALP)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT); 放免法测定INS(试剂购于北京原子能研究所); (3)测定肝脏重质量

表 1 各组的体质量、腹部瘦肉量、脂肪量及脂肪量/瘦肉量

| 分组 | 体质量(g) | 瘦肉量(g) | 脂肪量(g) | 脂肪量/瘦肉量 |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 20.2 ± 1.2 | 7.95 ± 0.80 | 2.99 ± 0.31 | 0.38 ± 0.06 |
| 实验组A亚组 | 20.6 ± 1.2 | 6.30 ± 0.80[b] | 3.43 ± 0.29[b] | 0.55 ± 0.07[b] |
| 实验组B亚组 | 20.5 ± 1.3 | 6.27 ± 1.24[b] | 3.63 ± 0.62[b] | 0.59 ± 0.11[b] |

[b]*P*<0.01 *vs* 对照组.

表 2 各组血清TC, HDL-C, TG, FBG及INS水平

| 分组 | TC(mmol/L) | HDL-C(mmol/L) | TG(mmol/L) | FBG(mmol/L) | INS(mIU/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 2.04 ± 0.15 | 0.97 ± 0.08 | 0.57 ± 0.07 | 5.11 ± 1.86 | 10.83 ± 3.97 |
| 实验组A亚组 | 4.13 ± 0.31[b] | 0.53 ± 0.17[b] | 0.46 ± 0.09[a] | 5.43 ± 1.73 | 11.75 ± 2.74 |
| 实验组B亚组 | 2.31 ± 0.16[b] | 0.92 ± 0.16 | 0.50 ± 0.16 | 6.90 ± 1.84[a] | 12.49 ± 4.25 |

[a]*P*<0.05, [b]*P*<0.01 *vs* 对照组.

表 3 各组肝功情况

| 分组 | TP(g/L) | ALB(g/L) | A/G | ALT(U/L) | ALP(U/L) | AST(U/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 42.25 ± 5.23 | 21.64 ± 3.38 | 1.06 ± 0.18 | 22.26 ± 2.50 | 64.60 ± 10.67 | 101.03 ± 10.61 |
| 实验组A亚组 | 37.56 ± 4.31 | 18.16 ± 1.77 | 0.95 ± 0.15 | 24.40 ± 8.00 | 105.80 ± 13.35 | 102.54 ± 15.20 |
| 实验组B亚组 | 38.82 ± 5.65 | 18.12 ± 2.63[a] | 0.89 ± 0.15[a] | 24.57 ± 3.48 | 103.80 ± 8.72[a] | 108.35 ± 11.43 |

[a]*P*<0.05 *vs* 对照组.

和脂质含量. 将动物肝脏洗尽血迹, 测定肝脏质量. 取少量剪成小块, 置110℃烘至恒定重质量, 精确称取干燥后的肝脏. 磨成细粉, 加氯仿∶甲醇(2∶1, V/V), 再按上述测定血清脂质的方法测脂质含量; (4)肝脏病理检查: 取肝脏一部分40 g/L甲醛固定后, 做石蜡切片, HE染色; (5)Western blot方法测定肝脏SR-B1的表达. 取-70℃保存的各组动物肝组织100 mg, 提取细胞膜蛋白, 经SDS-聚丙酰胺凝胶电泳, 采用兔抗小鼠的PGC-1多克隆抗体(购自美国Chemicon生物工程公司), 测定小鼠肝脏的PGC-1蛋白水平.

**统计学处理** 所有数据以mean±SD表示, 采用*t*检验.

## 2 结果

2.1 各组体质量、腹部脂肪及瘦肉含量 实验组体质量与对照组相似, 但腹部瘦肉量显著低于对照(*P*<0.01), 脂肪量显著高于对照(*P*<0.01), 脂肪与瘦肉量的比值显著高于对照组(*P*<0.01)(表1).

2.2 各组血清TC, HDL, TG, INS及FBG水平 高脂高糖食小鼠血清TC高于正常小鼠, B亚组低于A亚组, B亚组与正常小鼠间有显著差异(*P*<0.01); 血清HDL-C及TG低于正常小鼠, A亚组与正常动物间有显著差异(*P*<0.01, *P*<0.05); 血清FBG及INS高于正常小鼠, B亚组高于A亚组, B亚组的FBG与正常小鼠间有显著差异(*P*<0.05)(表2).

2.3 各组血清肝功水平 高脂高糖食的动物血清TP, ALB及A/G有下降的趋势, 并且与对照组比较B亚组的ALB及A/G有显著差异(*P*<0.05). 血清ALT, ALP及AST有升高的趋势, 与对照组比较B亚组的ALP有显著差异(*P*<0.05)(表3).

2.4 各组肝脏的病理改变 高脂高糖食小鼠肝脏有明显脂肪变性, 肝细胞排列紊乱, 肝细胞增大, 核大小不等, 胞质内有大的脂肪空泡(图1).

2.5 各组肝脏重量及脂质含量 高脂高糖食小鼠肝脏的TC和TG含量显著高于正常动物, B亚组高于A亚组(表4).

2.6 各组肝脏PGC-1表达水平 与对照组比较, 进高脂高糖食8 wk的小鼠肝脏PGC-1蛋白表达增加了1.78倍(*P*<0.05), 进高脂高糖食16 wk的小鼠肝脏PGC-1蛋白表达增加了2.13倍(*P*<0.01)(图2).

**■创新盘点**

有关PGC-1与血糖及能量代谢关系虽有部分文献报道, 但PGC-1与高脂高糖食诱导的代谢综合征小鼠的非酒精性脂肪性肝炎相关性的研究, 国内外报道较少.

**■应用要点**
总结此文章在实际应用中的价值, 或对应用的指导、改进作用, 以及在将来应用中的前景. 对PGC-1的深入研究有利于进一步了解代谢综合征发生非酒精性脂肪性肝炎的分子机制, 为非酒精性脂肪性肝炎的治疗提供一定的理论依据.

表 4 各组肝脏重量及脂质含量

| 分组 | 肝脏重量(g) | TC(mmol/g干重) | TG(mmol/g干重) |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.96 ± 0.04 | 0.0275 ± 0.0114 | 0.0631 ± 0.0232 |
| 实验组A亚组 | 0.95 ± 0.07 | 0.0370 ± 0.0075 | 0.1480 ± 0.0724[a] |
| 实验组B亚组 | 1.02 ± 0.11 | 0.0582 ± 0.0251[b] | 0.1566 ± 0.0166[b] |

[a]$P$<0.05, [b]$P$<0.01 *vs* 对照组.

## 3 讨论

研究表明, 用高脂高糖食喂养C57BL/6J小鼠后, 可使其出现2型糖尿病[10]. 我们发现, 进高脂高糖食后C57BL/6J小鼠出现腹部脂肪增多、血清FBG及INS升高、血清HDL-C降低, 符合2001年ATP(adult treatment panel)报告Ⅲ中关于代谢综合征的诊断标准.

代谢综合征作为21世纪全球健康问题, 正日益引起世界的关注. 代谢综合征不但增加2型糖尿病大血管并发症, 心肌梗塞和中风的绝对风险, 也与脂肪性肝病相关. 代谢综合征的每一项指标如肥胖、糖耐量异常和糖尿病、血脂异常、高血压、高胰岛素血症和胰岛素抵抗(IR)均与脂肪性肝病密切相关. 研究表明, 代谢综合征指标每增加一项脂肪肝的危险性增加1-99倍. 糖尿病或糖耐量异常者肝纤维化的发生率增加7倍[11-15]. 同时, 非酒精性脂肪性肝病也增加了2型糖尿患者发生心血管并发症的风险[16].

本研究中, 与对照组比较, 进高脂高糖食的小鼠血清TC显著增高; 血清HDL-C及TG显著降低; 血清FBG显著增高. 提示在小鼠, 进食高脂高糖饮食可以导致代谢综合征. 高脂高糖食导致代谢综合征的机制可能是: (1)高脂高糖饮食可刺激鼠胰岛素的分泌和肝葡萄糖的输出, 从而导致肥胖和胰岛素抵抗; (2)高脂高糖饮食通过损害线粒体的呼吸导致胰岛素抵抗. 研究表明, 用高脂高糖饮食喂大鼠1 wk后, 可使♂Wistar大鼠肝糖原含量增高, 并通过损害线粒体的呼吸导致胰岛素抵抗. Schreyer *et al*[10]的研究也表明, 高脂高糖饮食可刺激鼠胰岛素的分泌和肝葡萄糖的输出, 从而导致肥胖和胰岛素抵抗. 本研究中进高脂高糖食小鼠血清TC显著高于正常小鼠. 其肝脏重质量高于正常小鼠, 进食16 wk的小鼠每克干燥的肝脏中TC和TG的含量显著高于正常鼠($P$<0.01), 均大于正常小鼠的2倍; 病理检查亦显示实验组肝脏出现明显的脂肪肝表现; 血清A/G低于正常小鼠, 血清ALT, ALP及AST高于正常小鼠, 符合脂肪肝表现. 提示高脂高糖食在诱导小鼠出现IR的同时, 也能导致脂肪肝. 同时也提示, 脂肪性肝病与IR关系密切, 可能是IR的一部分.

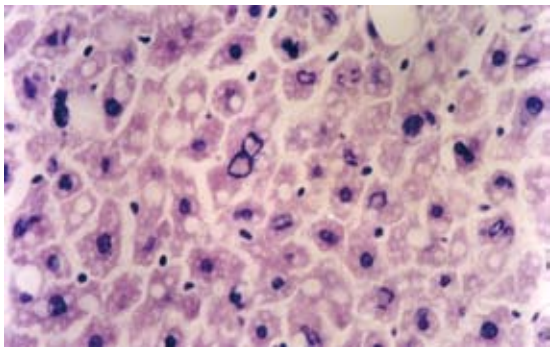


图 1 实验组小鼠肝脏的病理改变(HE × 200).

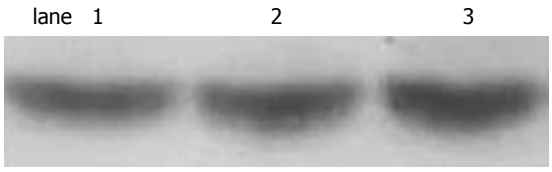



图 2 各组小鼠肝脏PGC-1蛋白的表达. lane 1-3: 正常食小鼠、进高脂高糖食8及16 wk小鼠.

脂肪性肝炎(steatohepatitis)是一种继发于肝脂肪变性和细胞损伤的炎症和纤维化状态. 按其病因分为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和酒精性肝炎(AH). 其病因及发病机制比较复杂, 至今尚未完全阐明. 流行病学研究显示, NASH与肥胖、糖耐量异常和糖尿病、血脂异常、高血压、高胰岛素血症和IR等密切相关. IR时, 肝摄取游离脂肪酸(FFA)增加, 肝细胞内FFA氧化或利用减少, 使细胞内酯化形成TG增多, 同时肝细胞将脂肪转运出肝脏的能力受损, 结果使肝细胞内脂质沉积, 形成脂肪肝. 此外, IR尚可诱导活性氧形成和TNF-α等表达增加, 进一步介导脂肪化的肝脏发生炎症、坏死和纤维化[17-19]. 反过来, NASH患者亦存在肝脏胰岛素的敏感性降低, 对葡萄糖和脂质的代谢作用降低、导致血

脂异常、向心性肥胖、血糖升高等代谢综合征表现. 但代谢综合征时NASH产生的分子机制, 目前尚不清楚, 可能与多种因素有关[18-20], 其中PGC-1的作用受到人们的重视. PGC-1是由染色体4p15.1区域的基因编码的一种核受体家族基因转录的共同作用因子, 他参与葡萄糖, 脂肪的代谢, 因而也是能量代谢的因子, 在肝脏表达丰富[21-22]. 在亚洲印度人, PGC-1的Thr394Thr基因多型性与2型糖尿病相关[23]; 而在代谢综合征青少年中, PGC-1的Gly482 Ser基因多型性与高血压有关[24]. 我们研究中, 高脂高糖食小鼠在血TC, FBG增高, HDL-C降低及肝功能改变的同时, PGC-1蛋白表达量, 进高脂高糖食8和16 wk的小鼠约为正常小鼠的1.78及2.13倍, 此结果与培养的肝细胞对葡萄糖的反应一致, 提示PGC-1可能与代谢综合征及脂肪性肝炎的发生、发展有关. 代谢综合征小鼠肝脏PGC-1蛋白表达的增高的原因尚不清楚, 可能是对代谢紊乱的代偿, 并参与脂肪肝的形成. PGC-1表达增加可能与肝脏血糖及血清TC水平升高有关, 研究表明, PGC-1能通过HNF4α起始肝脏脂肪酸β氧化的限速酶肉毒碱棕榈酰基转移酶(*L-CPT* Ⅰ)基因的转录而影响脂代谢. 同时, PGC-1还可通过诱导胆固醇7α羟化酶基因的表达来调节体内胆固醇的平衡[25]. 在与脂肪细胞分化的关系中, PGC-1作为PPARγ的辅激活因子可激活决定棕色脂肪细胞主要表型的基因, 如解偶联蛋白1、核受体因子等的表达, 提示PGC-1可促进棕色脂肪形成[26]. 另外, PGC-1与糖异生关系密切. PGC-1能诱导糖异生的基因, 磷酸烯醇丙酮酸激酶, G-6-P及1, 6二磷酸果糖酶的mRNA水平的增高, 从而使糖异生增强, 血糖增高. 血清中INS水平是否与PGC-1有关还需进一步研究[27]. 本实验中肝脏的脂质含量的改变比血清中TC和TG变化大, 可能肝脏的脂质含量受餐后脂质水平影响更大. 由于条件所限, 本研究仅测定了空腹血脂, 而未测定餐后血脂, 尚需进一步研究餐后血脂与肝脏脂质含量的关系. 另外2型糖尿病致肝脏的TG含量增高的机制已较清楚, 肝脏中胆固醇含量增高还未受到重视, 胆固醇性脂肪肝的形成机制还不清楚.

总之, 高脂高糖食C57BL/6J小鼠可作为代谢综合征动物模型, 高脂高糖食可致非酒精性脂肪肝, 肝脏的PGC-1蛋白表达量高于正常食小鼠, 并可能参与了代谢综合征和脂肪肝的形成. 本实验仅对进高脂高糖食所致的代谢综合征小鼠进行研究, 还需要进一步观察血脂正常后和/或血糖正常后肝脏PGC-1的表达改变, 并明确其主要影响因素.

## 4 参考文献


1 Parekh S, Anania FA. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 2191-2207
2 Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007; 132: 2169-2180
3 Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 2007; 132: 2087-2102
4 Forgione A, Miele L, Cefalo C, Gasbarrini G, Grieco A. Alcoholic and nonalcoholic forms of fatty liver disease. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007; 53: 83-100
5 Spiegelman BM, Puigserver P, Wu Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 4: S8-10
6 Rohas LM, St-Pierre J, Uldry M, Jager S, Handschin C, Spiegelman BM. A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7933-7938
7 Sadana P, Park EA. Characterization of the transactivation domain in the peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator (PGC-1). *Biochem J* 2007; 403: 511-518
8 Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 2006; 27: 728-735
9 Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* 2006; 3: 333-341
10 Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 136: 17-24
11 范建高, 代谢综合征与脂肪肝. 国外医学内分泌学分册 2002; 22: 273-275
12 Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 193-198
13 Gholam PM, Flancbaum L, Machan JT, Charney DA, Kotler DP. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 399-408
14 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-1850
15 范建高, 朱军, 李新建, 李锐, 戴菲, 宋晓敏, 陈兰, 李锋, 陈世耀. 上海市成人脂肪肝患病率及其危险因素流行病学调查. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 83-88
16 Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, Arcaro G. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1212-1218
17 Baranova A, Randhawa M, Jarrar M, Younossi ZM. Adipokines and melanocortins in the hepatic


**■名词解释**

非酒精性脂肪性肝炎: 是由于肥胖、糖尿病、血脂异常及胰岛素抵抗等导致肝脂肪变性和细胞损伤后出现的炎症和纤维化状态.

**■同行评价**
本文作者采用生化、病理等方法观察了代谢综合征小鼠肝脏过氧化物增殖体受体γ共同作用因子-1(PGC-1)的表达, 立题新颖, 思路清晰, 方法得当, 有较高的理论价值.

manifestation of metabolic syndrome: nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7: 195-205
18 王征, 刘东戈. 非酒精性脂肪性肝炎与细胞因子. 世界华人消化杂志 2007; 15: 266-271
19 郭津生, 沈沪佳, 王吉耀. 非酒精性脂肪性肝炎发病机制的研究进展. 国外医学消化系疾病分册 2005; 25: 269-272
20 Osterreicher CH, Brenner DA. The genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2007; 6: 83-88
21 Master SR, Hartman JL, D'Cruz CM, Moody SE, Keiper EA, Ha SI, Cox JD, Belka GK, Chodosh LA. Functional microarray analysis of mammary organogenesis reveals a developmental role in adaptive thermogenesis. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1185-1203
22 Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 615-622
23 Vimaleswaran KS, Radha V, Ghosh S, Majumder PP, Deepa R, Babu HN, Rao MR, Mohan V. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene polymorphisms and their relationship to Type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabet Med* 2005; 22: 1516-1521
24 Sookoian S, Garcia SI, Porto PI, Dieuzeide G, Gonzalez CD, Pirola CJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its coactivator-1 alpha may be associated with features of the metabolic syndrome in adolescents. *J Mol Endocrinol* 2005; 35: 373-380
25 Shin DJ, Campos JA, Gil G, Osborne TF. PGC-1alpha activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 2003; 278: 50047-50052
26 Louet JF, Hayhurst G, Gonzalez FJ, Girard J, Decaux JF. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J Biol Chem* 2002; 277: 37991-38000
27 Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 2001; 413: 131-138

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 2007 年国际会议

Meeting ESGAR 2007 18th Annual Meeting and Postgraduate Course
12–15 June 2007
Lisbon
fca@netvisao.pt

Meeting Falk Symposium 160: Pathogenesis and Clinical Practice in Gastroenterology
15–16 June 2007
Portoroz
symposia@falkfoundation.de

Meeting 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
27–30 June 2007
Barcelona
meetings@imedex.com

Meeting ILTS 13th Annual International Congress
20–23 June 2007
Rio De Janeiro
www.ilts.org

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation
10 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology
11–12 October 2007
Dresden
symposia@falkfoundation.de

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 1995-1999
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

# 乙型肝炎病毒L蛋白颗粒的真核表达与纯化

曾建平, 易继林, 杨志芳

曾建平, 中国人民解放军总医院肝胆外科 北京市 100853
易继林, 杨志芳, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科 湖北省武汉市 430030
**通讯作者**: 曾建平, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院肝胆外科. zjpdoc@163.com
电话: 010-66937781
收稿日期: 2006-12-10 接受日期: 2007-01-10

## Expression and purification of large hepatitis B virus surface antigen particles produced in eukaryotic cells

Jian-Ping Zeng, Ji-Lin Yi, Zhi-Fang Yang

Jian-Ping Zeng, Department of Hepatobiliary Surgery; General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Ji-Lin Yi, Zhi-Fang Yang, Department of General Surgery, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Jian-Ping Zeng, Department of Hepatobiliary Surgery; General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. zjpdoc@163.com
Received: 2006-12-10 Accepted: 2007-01-10

## Abstract

**AIM:** To explore the expression and purification of hepatitis B virus L particles in eukaryotic cells and to analyze their physical properties and antigenicity.

**METHODS:** COS-7 cell lines were transiently transfected with recombinant eukaryotic expression vector pSVsigLM$^-$S$^-$. The products were purified from cell culture supernatants after 48 h culture by a combination of CsCl isopycnic ultracentrifugation, density gradient ultracentrifugation in sucrose, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Molecular sizes and antigenicity of the purified protein were determined by SDS-PAGE and Western blotting, respectively. The physical properties of samples were characterized by transmission electron microscopy (TEM).

**RESULTS:** L particles were successfully purified from transfected COS-7 cell medium by ultracentrifugation combined with ELISA. Cscl isopycnic ultracentrifugation showed that the area where density was 1.21 g/cm$^3$ was rich in S-antigenicity. L particles exclusively consisted of glycosylated 42 kDa proteins that had S and PreS1 antigenicity. TEM showed that HBsAg produced by COS-7 cells had physical properties very similar to the 22 nm particles derived from human plasma and recombinant yeast cells.

**CONCLUSION:** L protein can translocate into ER lumen and form subviral particles after budding by fusing a secretion signal sequence to the N terminus of the L gene. L particles can be efficiently purified by ultracentrifugation and retain their biochemical activity and physical appearance.

Key Words: Hepatitis B virus; COS-7 cell lines; Recombinant plasmid; Large protein; Ultracentrifugation; Enzyme-linked immunosorbent assay; Western blotting; Transmission electron microscope

Zeng JP, Yi JL, Yang ZF. Expression and purification of large hepatitis B virus surface antigen particles produced in eukaryotic cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):1995-1999

## 摘要

**目的**: 真核细胞中表达和纯化乙肝病毒L蛋白颗粒, 并初步分析其物理特性与抗原性.

**方法**: 真核表达质粒pSVsigLM$^-$S$^-$瞬时转染COS-7细胞, 收集48 h后的培养上清采用CsCl等密度平衡离心、蔗糖密度梯度超速离心和酶联免疫吸附试验(ELISA)3者结合的方法纯化L蛋白, 获得的纯化产物行Western blotting鉴定和透射电镜(TEM)观察.

**结果**: 采用超速离心结合ELISA法可以纯化L蛋白, CsCl等密度平衡离心显示在密度约1.21 g/cm$^3$处富含S抗原性. SDS-PAGE证实产物主要由一种42 kDa的蛋白分子组成, Western blotting证实这种蛋白为同时具有S与PreS1抗原性的L蛋白. 透射电镜显示分泌的L蛋白自行组装成约23 nm的球形颗粒.

**结论**: 融合外源性信号肽能有效的引导L蛋白的组装和分泌. CsCl和蔗糖超速离心能高效纯

**■背景资料**
疫苗是预防HBV感染的重要手段, 然而约10%的接种者对目前的商业化疫苗出现不反应或者低反应的现象. 最近有关PreS1抗原抗体系统在阻止乙肝病毒感染过程中的作用得到广泛的关注, 越来越多的研究者试图采用各种方法将PreS1多肽融合到传统疫苗中以增强疫苗的免疫原性.

化L颗粒并保持其完整的抗原性及颗粒形态.

**关键词:** 乙型肝炎病毒; COS–7细胞系; 重组质粒; 超速离心; 酶联免疫吸附试验; L蛋白; 免疫印迹; 透射电镜

曾建平, 易继林, 杨志芳. 乙型肝炎病毒L蛋白颗粒的真核表达与纯化. 世界华人消化杂志 2007;15(18):1995–1999
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1995.asp

■研发前沿
提高疫苗的免疫原性是目前乙肝疫苗研制的热点, 虽然一些研究者已经成功表达各类包含多种病毒蛋白多肽的融合疫苗, 然而如何提高新型疫苗的产量和纯度, 使之能安全有效的应用是目前疫苗研究普遍遇到的难题.

## 0 引言

乙肝病毒表面抗原由3种分别命名为L蛋白(large protein)、M蛋白(middle protein)、S蛋白(small protein)的跨膜蛋白组成, 其中S蛋白为表面抗原的主要成分, M蛋白包含整个的S蛋白序列以及由55个氨基酸组成的PreS2多肽, L蛋白则包含整个的M蛋白序列以及由约109或168个氨基酸组成的PreS1区[1]. 来源于血清或酵母细胞的传统乙肝疫苗主要是由S蛋白或M蛋白组成的颗粒抗原, 然而约10%的接种者对这种疫苗出现不反应或者低反应的现象[2-3]. 基于PreS1抗原抗体系统在阻止乙肝病毒感染过程中的重要作用, 越来越多的研究者试图采用各种方法将PreS1多肽融合到传统疫苗中以增强疫苗的免疫原性[4-10]. 理论上将包含整个PreS1和PreS2区的L蛋白作为免疫原能最大程度上激发机体对乙肝病毒的清除能力, 然而与S和M蛋白不同的是, 无论是在哺乳细胞还是酵母细胞, L蛋白虽然能插入到细胞的内质网膜但是不能出芽到内质网腔组装成颗粒[11]. 最新的研究发现通过基因工程方法将外源性信号肽融合到PreS1区的氨基端能清除这种出芽阻滞作用[12]. 本实验的目的在于利用一种融合了β内酰胺酶信号肽(β-lactamase signal)部分编码序列的真核表达质粒pSVsigLM$^-$S$^-$, 通过CsCl和蔗糖密度梯度超速离心技术, 纯化并鉴定L蛋白颗粒.

## 1 材料和方法

1.1 材料 真核表达载体pSVsigLM$^-$S$^-$由德国Bruss教授惠赠(pSVsigLM$^-$S$^-$包含全部的乙肝表面抗原编码基因序列(adw2), 编码基因中S和M蛋白的起始密码子ATG通过点突变为ACG, 以阻止S和M蛋白的同期表达, PreSk区的氨基端融合β-内酰胺酶信号肽的5'端32个氨基酸编码序列[12]). COS-7细胞系由华中科技大学同济医学院免疫教研室提供; DMEM培养基为Gibco公司产品、胎牛血清为Hyclone公司产品; 鼠抗HBsAg(ad/ay)、鼠抗PreS1(a.a.132-a.a.137)mAb购自ViroStat公司; ELISA试剂盒购自上海科华公司, 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与蛋白表达 COS-7细胞系常规培养于DMEM培养基, 质粒pSVsigLM$^-$S$^-$采用DEAE-葡聚糖法瞬时转染, 48 h后收集细胞培养上清. DEAE-葡聚糖法参照分子克隆实验指南(第3版).

1.2.2 蛋白颗粒的超离心纯化 细胞培养上清1200 r/min离心10 min以去除细胞碎片, 澄清后的上清缓慢加入终浓度为100 g/L的PEG6000粉末, 室温下搅拌30 min后4℃过夜. 混合物10 000 *g*离心30 min, 沉淀重新融解于10 mL离心缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA), 20 000 *g*离心30 min去除未溶解的物质, 样本做进一步的连续超离心纯化.

CsCl粉末加入样本溶液至终浓度为250 g/L (w/w), 随后转入Ultra-clear离心管160 000 *g*、10℃离心16 h(Beckman SW-41). 从上往下以每管500 μL收集样品, 共收集20管. ELISA法确定并收集富含HBsAg的样品, 4℃透析过夜.

超离心管依次加入浓度为600, 500, 400, 300, 200, 100 g/L各1.5 mL的蔗糖溶液(离心缓冲液配制, w/w), 顶端加入初步纯化的样品1 mL, 120 000 *g*、4℃离心16 h(Beckman SW-41). 从上往下以每管500 μL收集样品, 共收集20管. ELISA法确定并收集富含HBsAg的样品, 4℃透析(PBS)过夜后冻干保存.

1.2.3 纯化产物的SDS-PAGE和蛋白印迹 纯化蛋白电泳前加等体积2×SDS加样缓冲液, 100℃水浴10 min, 冰浴冷却后20 μL加样行120 g/L SDS-PAGE. 蛋白分离后经考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色后JS-300凝胶图像分析仪分析结果. 行Western blotting时蛋白分离后, 电转至硝酸纤维素膜, 一抗(鼠抗PreS1 1∶200、鼠抗S 1∶200)4℃过夜, 二抗室温反应2 h, 增强化学发光法(ECL)显影, 暗室压片.

1.2.4 纯化产物透射电镜 取少量纯化的样品滴于铜网, 20 g/L磷钨酸复染, 透射电子显微镜(FEI Tecnai G2 12型)下观察颗粒形态.

## 2 结果

2.1 表达产物的纯化 S细胞培养上清中的表面抗原颗粒能选择性的被PEG沉淀, 这种沉淀方法被认为能最大程度上回收表面抗原, 最少程度上减少杂质污染[13]. 随后的样品进行CsCl密度

梯度离心, 形成典型的梯度片段, ELISA法证实片段12和13富含HBsAg抗原性, 提示此区段存在密度约1.21 g/cm$^3$的颗粒(图1). 将12, 13管片段合并后透析除去CsCl, 样品继续进行蔗糖密度梯度离心, 分管收集的片段如前行ELISA检测HBsAg抗原性, 证实13-16片段存在S抗原性, 合并片段后透析过夜.

2.2 纯化产物的鉴定 纯化产物行SDS-PAGE后以考马斯亮蓝染色, 证实主要由一种分子量约42 kDa的蛋白分子组成(图2A), Western证实这种蛋白为同时具有PreS1和S抗原性的L蛋白(图2B-C). 进一步采用Braford法和RIA法分别检测总蛋白浓度和L蛋白浓度, 表明L蛋白纯度>90%.

2.3 纯化产物的TEM电镜观察 超离心纯化的产物主要由一种颗粒直径约23 nm的球形中空性颗粒构成, 其结构类似于天然HBsAg颗粒(图3).

## 3 讨论

PreS1抗原抗体系统在阻止乙肝病毒感染的过程中的作用主要基于以下一些发现: (1)乙肝患者血浆中抗PreS1抗体出现在抗S、抗HBc、抗HBe抗体之前[14-15]; (2)PreS1抗原aa21-47被证实是病毒与肝细胞特异性结合的位点[16-17]; (3)针对PreS1抗原的抗体能有效清除HBV的感染[18-20]. 目前包含有PreS1区段的乙肝病毒疫苗主要有2种, 一种如疫苗Hepagene$^{TM}$, 只融合部分的PreS1片段(aa21-47), 因而可能丧失了部分潜在的PreS1区抗原表位[4,10]. 另一种如来源于中国仓鼠卵巢细胞的重组S颗粒(Bio-Hep-B$^{TM}$), 虽然包含含量很低(<3%)的完整L蛋白, 但是其免疫潜能高于任何其他主要由S或M颗粒构成的传统疫苗[5,21-23]. 因此, 纯化一种主要由L蛋白组成的颗粒抗原无疑是具有前景的第4代疫苗.

蛋白工程中常常使用外源性的信号肽以引导目的蛋白的胞外分泌, 德国的Bruss教授通过在PreS1的氨基端融合β内酰胺酶信号肽以试图使PreS1区段正确的易位到内质网腔, 结果显示融合了外源性信号肽的质粒能有效的分泌L蛋白到细胞培养上清, 而没有融合外源性信号肽的质粒其合成的L蛋白大量积聚在细胞的分泌组件附近[12]. 虽然Bruss教授并没有检测上清中L蛋白的物理特性, 然而进入宿主细胞分泌组件的L蛋白, 可能与S及M蛋白类似, 具有自行组装成颗粒性分子的功能. 因此使用这种质粒可能纯化出主要由L蛋白组成的颗粒. 为了避免破坏蛋白本身的免疫原性以及颗粒形态, 我们采用

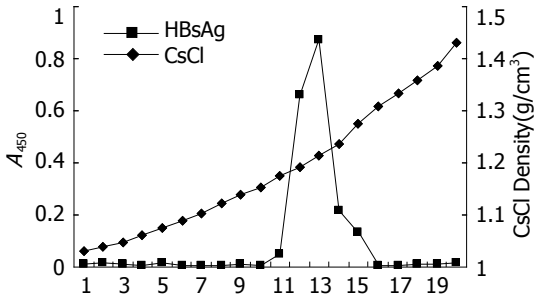



图 1 采用超速离心结合ELISA法纯化L蛋白, CsCl等密度平衡离心显示在密度约1.21 g/cm$^3$处富含S抗原性.

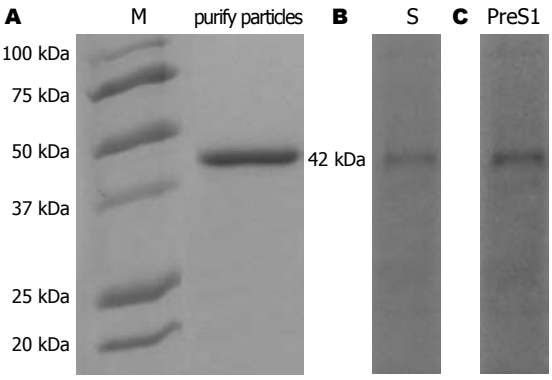



图 2 SDS-PAGE及Western blotting鉴定纯化蛋白. A: SDS-PAGE显示纯化蛋白分子量约42 kDa; B: S抗原性; C: PreS1抗原性.

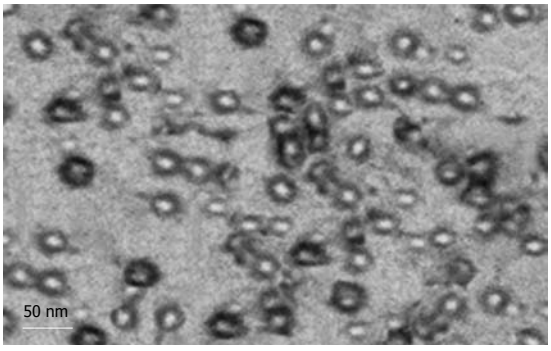



图 3 纯化产物的TEM电镜.

连续的密度梯度超速离心技术来纯化细胞培养上清中的表面抗原. 转化后的细胞培养上清经过包括澄清、蛋白沉淀、连续的超速离心等一系列过程纯化.

纯化后的样本采用SDS-PAGE和Western blotting方法鉴定目的蛋白分子量及抗原性, SDS-PAGE显示纯化样本主要由一种分子量约42 kDa的蛋白组成, Western blotting则证实这种蛋白为同时具有PreS1和S抗原性的L蛋白分子, 这种L蛋白与天然的糖基化L蛋白分子量相同[1], 提示经真核细胞表达的L蛋白能被正确的修饰化. 与此同时, 在理论上S和M蛋白的显色区均未

**■创新盘点**

基于PreS1多肽的出芽阻滞作用, 无论是在哺乳细胞还是酵母细胞, L蛋白虽然能插入到细胞的内质网膜但是不能出芽到内质网腔组装成颗粒. 本研究使用外源性信号肽引导L蛋白的胞外分泌, 通过CsCl和蔗糖密度梯度超速离心技术, 纯化出一种主要由L蛋白组成的颗粒抗原.

**■应用要点**
这种主要由L蛋白组成的颗粒疫苗包含高比例、完整的PreS1多肽, 和目前商业化疫苗以及其他融合疫苗相比, 可能具有更强的免疫原性和阻断乙肝病毒感染的能力.

见明显的条带, 表明样品中不含有S或M蛋白的表达, 其结果与质粒的S蛋白编码启动子突变相符合. 基于这种发现我们认为通过在L蛋白编码基因的氨基端融合外源性信号肽能有效引导L蛋白的胞外分泌. 电镜观察显示这种L蛋白能自行组装成约23 nm的颗粒, 在CsCl中的浮力密度约1.21 g/cm$^3$. 这种物理特性与天然的HBsAg颗粒以及经酵母来源的S及M颗粒类似[24-25], 因此进入到正常分泌途径的L蛋白与S及M蛋白一样可组装成颗粒型抗原. 进一步通过测定总蛋白浓度与L蛋白浓度, 我们证实纯化的样品中L蛋白的纯度>90%. 表明密度梯度离心能很好的分离纯化分泌的L蛋白, 并能保持其本身的免疫原性和颗粒构型.

这些结果表明通过在PreS1的氨基端融合外源性的信号肽能有效的消除PreS1区段对L蛋白的分泌阻滞作用, 而采用简单的超速离心技术即能获得高纯度的L蛋白颗粒, 这种颗粒包含整个的乙肝病毒包膜多肽表位, 理论上能同时激发抗PreS1和PreS2的抗体, 从而具有更强的免疫原性和病毒清除能力. 然而目前这种系统仍然存在较大的缺陷. 例如无法大量制备L颗粒, 其次培养血清中的异种蛋白可能污染疫苗导致临床应用时激发非特异性免疫反应. 一种可行的办法是构建含无血清培养基的稳定表达系统. 如Deml *et al*[26]利用来源于果蝇的Drosophila Schneider-2稳定转染细胞系, 采用无血清培养基加$CuSO_4$诱导, 成功提取高纯度的HBsAg颗粒[26]. 此外甲醇营养型酵母(*Pichia pastoris*)是一种新型的外源蛋白表达系统, 不仅具有原核生物生长快, 操作简便的特点, 而且具备哺乳类细胞翻译后加工和修饰的功能[27-28]. 利用甲醇营养型酵母获得高产量乙肝表面抗原颗粒的实验已经获得成功, 并且证实能被很好的修饰, 能诱发高滴度的抗体形成[29-32]. 因此未来可以构建能在甲醇营养型酵母中表达L颗粒的表达系统以获得高批量、高质量的疫苗.

## 4 参考文献


1 Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-495
2 Iwarson S. New approaches to hepatitis A and B vaccines. *APMIS* 1995; 103: 321-326
3 Wood RC, MacDonald KL, White KE, Hedberg CW, Hanson M, Osterholm MT. Risk factors for lack of detectable antibody following hepatitis B vaccination of Minnesota health care workers. *JAMA* 1993; 270: 2935-2939
4 Shouval D, Ilan Y, Adler R, Deepen R, Panet A, Even-Chen Z, Gorecki M, Gerlich WH. Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines. *Vaccine* 1994; 12: 1453-1459
5 Pride MW, Bailey CR, Muchmore E, Thanavala Y. Evaluation of B and T-cell responses in chimpanzees immunized with Hepagene, a hepatitis B vaccine containing pre-S1, pre-S2 gene products. *Vaccine* 1998; 16: 543-550
6 Yang HJ, Chen M, Cheng T, He SZ, Li SW, Guan BQ, Zhu ZH, Gu Y, Zhang J, Xia NS. Expression and immunoactivity of chimeric particulate antigens of receptor binding site-core antigen of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 492-497
7 Qin S, Tang H, Zhao LS, He F, Lin Y, Liu L, He XM. Cloning of HBsAg-encoded genes in different vectors and their expression in eukaryotic cells. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1111-1113
8 卫军, 刘小金, 李光地, 汪垣, 张祖传, 王玉琴, 陆志檬. 重组乙肝表面抗原前S1(21~47aa)片段与GST融合蛋白的表达、纯化及初步临床应用. 生物化学与生物物理学报 2001; 33: 379-385
9 Zhao Y, Zhan M. The coexpression of the preS1 (1-42) and the core (1-144) antigen of HBV in E. coli. *Chin Med Sci J* 2002; 17: 68-72
10 Shapira MY, Zeira E, Adler R, Shouval D. Rapid seroprotection against hepatitis B following the first dose of a Pre-S1/Pre-S2/S vaccine. *J Hepatol* 2001; 34: 123-127
11 Imamura T, Araki M, Miyanohara A, Nakao J, Yonemura H, Ohtomo N, Matsubara K. Expression of hepatitis B virus middle and large surface antigen genes in Saccharomyces cerevisiae. *J Virol* 1987; 61: 3543-3549
12 Bruss V, Vieluf K. Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* 1995; 69: 6652-6657
13 Youn BW, Samanta H. Purification and characterization of pre-S-containing hepatitis B surface antigens produced in recombinant mammalian cell culture. *Vaccine* 1989; 7: 60-68
14 Neurath AR, Kent SB, Strick N, Taylor P, Stevens CE. Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains. *Nature* 1985; 315: 154-156
15 Petit MA, Zoulim F, Capel F, Dubanchet S, Dauguet C, Trepo C. Variable expression of preS1 antigen in serum during chronic hepatitis B virus infection: an accurate marker for the level of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 1990; 11: 809-814
16 Bock CT, Tillmann HL, Manns MP, Trautwein C. The pre-S region determines the intracellular localization and appearance of hepatitis B virus. *Hepatology* 1999; 30: 517-525
17 Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* 1999; 73: 2052-2057
18 Petit MA, Strick N, Dubanchet S, Capel F, Neurath AR. Inhibitory activity of monoclonal antibody F35.25 on the interaction between hepatocytes (HepG2 cells) and preS1-specific ligands. *Mol Immunol* 1991; 28: 517-521
19 Sominskaya I, Pushko P, Dreilina D, Kozlovskaya T, Pumpen P. Determination of the minimal length of preS1 epitope recognized by a monoclonal

antibody which inhibits attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. *Med Microbiol Immunol* 1992; 181: 215-226
20 Hong HJ, Ryu CJ, Hur H, Kim S, Oh HK, Oh MS, Park SY. In vivo neutralization of hepatitis B virus infection by an anti-preS1 humanized antibody in chimpanzees. *Virology* 2004; 318: 134-141
21 Jones CD, Page M, Bacon A, Cahill E, Bentley M, Chatfield SN. T-cell and antibody response characterisation of a new recombinant pre-S1, pre-S2 and SHBs antigen-containing hepatitis B vaccine; demonstration of superior anti-SHBs antibody induction in responder mice. *Vaccine* 1999; 17: 2528-2537
22 Young MD, Rosenthal MH, Dickson B, Du W, Maddrey WC. A multi-center controlled study of rapid hepatitis B vaccination using a novel triple antigen recombinant vaccine. *Vaccine* 2001; 19: 3437-3443
23 Leroux-Roels G, Desombere I, Cobbaut L, Petit MA, Desmons P, Hauser P, Delem A, De Grave D, Safary A. Hepatitis B vaccine containing surface antigen and selected preS1 and preS2 sequences. 2. Immunogenicity in poor responders to hepatitis B vaccines. *Vaccine* 1997; 15: 1732-1736
24 Miyanohara A, Toh-e A, Nozaki C, Hamada F, Ohtomo N, Matsubara K. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 1-5
25 Kuroda S, Itoh Y, Miyazaki T, Otaka-Imai S, Fujisawa Y. Efficient expression of genetically engineered hepatitis B virus surface antigen P31 proteins in yeast. *Gene* 1989; 78: 297-308
26 Deml L, Schirmbeck R, Reimann J, Wolf H, Wagner R. Purification and characterization of hepatitis B virus surface antigen particles produced in Drosophila Schneider-2 cells. *J Virol Methods* 1999; 79: 205-217
27 Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris. *Biotechnology* (*N Y*) 1993; 11: 905-910
28 Liu RS, Yang KY, Lin J, Lin YW, Zhang ZH, Zhang J, Xia NS. High-yield expression of recombinant SARS coronavirus nucleocapsid protein in methylotrophic yeast Pichia pastoris. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3602-3607
29 Yang JY, Jin J, Kong YY, Wei J, Zhang ZC, Li GD, Wang Y, Yuan HY, Li YY. Purification and Characterization of Recombinant Hepatitis B Virus Surface Antigen SS1 Expressed in Pichia pastoris. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* (*Shanghai*) 2000; 32: 503-508
30 Bo H, Minjian L, Guoqiang H, Zhaoxia L, Zhenyu Z, Lin L. Expression of hepatitis B virus S gene in Pichia pastoris and application of the product for detection of anti-HBs antibody. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38: 683-689
31 Hussain Z, Ali SS, Husain SA, Raish M, Sharma DR, Kar P. Evaluation of immunogenicity and reactogenicity of recombinant DNA hepatitis B vaccine produced in India. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7165-7168
32 Hardy E, Martinez E, Diago D, Diaz R, Gonzalez D, Herrera L. Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from Pichia pastoris. *J Biotechnol* 2000; 77: 157-167

**■同行评价**
本文论述了乙型肝炎病毒L蛋白颗粒的真核表达与纯化, 对乙型肝炎病毒的研究有一定的指导意义, 方法成熟, 资料可信.

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

## 世界华人消化杂志的同行评价

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价, 采用匿名方式. 通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿. 每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿). 文章等级评定: ○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚. 其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2000-2003
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

# 外源性导入抑癌基因FHIT对肝癌细胞Hep3B生长的影响

许荣华, 郑武平, 孟 津, 夏立平, 易继林

■背景资料
研究表明, FHIT基因是一重要的肿瘤候选抑癌基因. 而许多肝癌细胞系包括Hep3B存在FHIT基因的染色体、mRNA和蛋白的异常.

许荣华, 郑武平, 孟津, 夏立平, 海南医学院附属医院肿瘤外科 海南省海口市 570102
易继林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030
许荣华, 医学博士, 讲师, 主治医师, 主要从事肝脏肿瘤的基础与临床研究.
**通讯作者**: 许荣华, 570102, 海南省海口市, 海南医学院附属医院肿瘤外科. xu_ronghua2231@hotmail.com
电话: 0898-66528115
收稿日期: 2007-04-02 接受日期: 2007-04-28

## Effects of fragile histidine triad gene transduction on growth of Hep3B human hepatocellular carcinoma cells

Rong-Hua Xu, Wu-Ping Zheng, Jin Meng, Li-Ping Xia, Ji-Lin Yi

Rong-Hua Xu, Wu-Ping Zheng, Jin Meng, Li-Ping Xia, Department of Oncology Surgery, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, Hainan Province, China
Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Rong-Hua Xu, Department of Oncology Surgery, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, Hainan Province, China. xu_ronghua2231@hotmail.com
Received: 2007-04-02 Accepted: 2007-04-28

## Abstract

**AIM:** To evaluate the effects of the human fragile histidine triad gene on cell proliferation and apoptosis of the Hep3B human hepatocellular carcinoma line.

**METHODS:** A recombinant pcDNA3.1 (+)/FHIT including functional region of human fragile histidine triad gene (FHIT) was constructed for transfer into human hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. mRNA and protein expressions of the gene in the transfected cells were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and Western blot, respectively. MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay was used to assess the effects of FHIT on proliferation. Cell cycle changes and apoptosis were measured by flow cytometry.

**RESULTS:** Hep3B cells expressed high levels of FHIT-mRNA and FHIT protein after infection with pcDNA3.1 (+)/FHIT. The growth of Hep3B cells treated with pcDNA3.1 (+)/FHIT was significantly inhibited. pcDNA3.1 (+)/FHIT-infected Hep3B cells showed a significant increase in $G_0$-$G_1$ phase and FHIT-induced apoptosis compared with controls (72.23 ± 0.84 *vs* 54.36 ± 0.78 and 53.17 ± 0.52, $P < 0.05$, respectively).

**CONCLUSION:** Transfer of the FHIT gene inhibited the growth of human hepatocellular carcinoma cells and induced cell apoptosis.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Gene therapy; Fragile histidine triad gene

Xu RH, Zheng WP, Meng J, Xia LP, Yi JL. Effects of fragile histidine triad gene transduction on growth of Hep3B human hepatocellular carcinoma cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2000-2003

## 摘要

**目的**: 研究外源性人脆性组氨酸三联体(FHIT)基因的高表达对人肝癌细胞Hep3B生长的影响.

**方法**: 构建一个包含FHIT基因的真核表达载体pcDNA3.1(+)/FHIT, 体外转染人肝癌细胞Hep3B, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR), 蛋白印迹(Western blot)分别检测目的基因不同水平的表达, 通过细胞生长试验、流式细胞仪分析技术检测细胞转染前后的细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的变化.

**结果**: 转染pcDNA3.1(+)/FHIT后Hep3B细胞的FHIT-mRNA, FHIT蛋白表达阳性, 转染后对Hep3B细胞的生长有抑制作用, 早期细胞凋亡增加, 与对照组比较差异有显著性(72.23±0.84 *vs* 54.36±0.78, 53.17±0.52, $P<0.05$).

**结论**: FHIT基因通过诱导肿瘤细胞发生凋亡并导致其发生$G_1$期阻滞, 在肿瘤基因治疗方面发挥作用.

**关键词: 肝癌; 基因治疗; 脆性组氨酸三联体**

许荣华, 郑武平, 孟津, 夏立平, 易继林. 外源性导入抑癌基

因FHIT对肝癌细胞Hep3B生长的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2000-2003
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2000.asp

■**创新盘点**
本文的创新之处在于将重要的肿瘤候选抑癌基因FHIT, 转染于存在FHIT基因的染色体、mRNA和蛋白异常的Hep3B肝癌细胞.

## 0 引言

1996年Ohta *et al*[1]采用外显子捕获法(exon trapping)于染色体3p14.2上克隆出FHIT基因. 随后许多学者发现在绝大多数肿瘤中存在FHIT基因的异常, 认为FHIT基因是一重要的肿瘤候选抑癌基因[2-7]. 且肝癌细胞系Hep3B存在FHIT基因的染色体、mRNA和蛋白的异常[8]. 由此我们自行构建一个包含人脆性组氨酸三联体(FHIT)基因的真核表达载体pcDNA3.1(+)/FHIT, 体外转染人肝癌细胞Hep3B, 以探讨FHIT基因在肝癌细胞增殖或凋亡中的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 菌株*E.coli* DH5α和真核表达载体pcDNA3.1(+)为本室保存. PBluescript SK FHIT质粒含FHIT基因全长cDNA(由美国Duke大学Xiaofan Wang教授惠赠). Hep3B细胞株购自上海中科院细胞库. 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自日本TaKaRa公司, FHIT Ab购自美国Zymed公司, 细胞周期检测试剂盒购自美国Becton Dickinson公司.

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建及鉴定 酶切鉴定正确的PBluescript SK FHIT质粒交由上海生工进行DNA序列测定. 在Ep管中建立酶切反应: pcDNA3.1(或PBluescript SK FHIT)、*Bam*HⅠ, *Xba*Ⅰ, 37℃水浴酶切2 h. 取上述酶切产物电泳, 将大小为1.0 kb的FHIT基因片段和5.4 kb线性化的pcDNA3.1用电泳凝胶回收试剂盒回收. 拟构建pcDNA3.1(+)/FHIT, 在Ep管中建立质粒重组反应体系: FHIT基因片段; 线性化的pcDNA3.1; T4连接酶, 16℃水浴12 h, 转化感受态菌DH5α, 挑取克隆进行培养和鉴定.

1.2.2 细胞培养和转染 Hep3B细胞用含100 mL/L特优级胎牛血清(Gibco公司), 加1.0 mmol/L丙酮酸钠, 0.1 mmol/L非必须氨基酸, 在37℃, 50 mL/L $CO_2$饱和湿度下培养. 将生长旺盛的Hep3B细胞接种于6孔板中, 当细胞密度为70%左右时, 按Lipofectamine2000(脂质体转染试剂盒)说明书进行pcDNA3.1(+)/FHIT的转染, 转染后用G418(500 mg/L)进行筛选, G418(250 mg/L)维持筛选. FHIT基因、空载体转染Hep3B细胞分别命名为Hep3B-FHIT和Hep3B-C, 亲本细胞Hep3B作为未转染对照.

1.2.3 RT-PCR 取G418筛选后的Hep3B-FHIT细胞, 用引物扩增FHIT基因外显子5-外显子9(P1: 5'-ATGTCGTTCAGA-3'; P2: 5'-CTGAAAGTACAC-3')[9], 采用TRIzol法抽提细胞总RNA, 先行反转录, 后进行PCR反应, 产物10 g/L琼脂糖凝胶电泳. PCR反应参数: 94℃预变性5 min; 94℃变性1 min、44℃退火1 min、72℃延伸45 s, 30个循环后72℃再延伸7 min.

1.2.4 Western印迹法 取筛选后的Hep3B-FHIT细胞, 细胞裂解液处理细胞, 离心后取上清, 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白转至硝酸纤维膜上, 封闭液封闭, 与FHIT抗体结合, 后用辣根过氧化物酶结合的二抗结合, 增强化学发光法(ECL)显色后照相.

1.2.5 噻唑蓝(MTT)比色法检测转染前后细胞增殖能力 $1\times10^4$细胞(每孔200 μL)接种于96孔培养板, 每组细胞接种6孔, 设3个平行孔, 加入MTT(5 g/L)液后继续孵育4 h, 终止培养再加DMSO. 酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值(波长为570 nm). 每隔24 h同样以上测定, 连续测定6 d, 观察3组细胞增殖能力变化.

1.2.6 流式细胞仪分析细胞周期及凋亡 检测前以胰酶消化细胞, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次, 用预冷的700 mL/L乙醇固定, 4℃过夜. 以PBS洗脱乙醇, 并用PBS制备单细胞悬液, 碘丙锭(PI)染色后, 用流式细胞仪(FCM)分析细胞周期变化及凋亡率.

**统计学处理** 采用SPSS11.5统计软件进行*t*检验. 数据以mean±SD表示, $P<0.05$表示有显著差异.

## 2 结果

2.1 质粒的鉴定 质粒PBluescript SK FHIT送上海生工生物工程公司测序, 与GenBank的FHIT mRNA序列相符(登陆号: NM_002012). 质粒PBluescript SK FHIT经双酶切*Bam*HⅠ和*Xba*Ⅰ后, 琼脂糖凝胶电泳可见1.0和2.7 kb的两条DNA条带(图1). 质粒pcDNA3.1(+)/FHIT经内切酶*Bam*HⅠ和*Xba*Ⅰ后, 琼脂糖凝胶电泳可见1.0和5.4 kb的两条DNA条带(图1), 说明pcDNA3.1(+)/FHIT构建成功.

2.2 质粒转染前后细胞FHIT-mRNA的表达 转染pcDNA3.1(+)/FHIT后, Hep3B-FHIT细胞FHIT-mRNA阳性, 为400 bp条带, 而空载体转染细胞

**■应用要点**

本研究自行构建一个包含人脆性组氨酸三联体(FHIT)基因的真核表达载体pcDNA3.1(+)/FHIT, 重点观察体外转染人肝癌细胞Hep3B后细胞生物学性状的变化, 有利于探讨FHIT基因在肝癌细胞增殖或凋亡中的作用, 为肝癌的基因治疗提供一个有效途径.

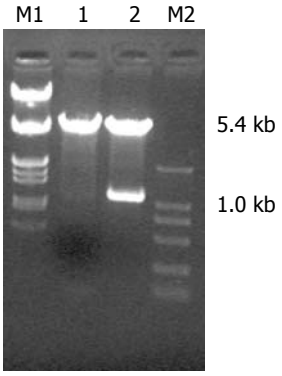



**图 1 质粒pcDNA3.1(+)/FHIT酶切鉴定.** M1: Marker λ/DNA/*Eco*RⅠ+*Hin*dⅢ; M2: Marker DL2000; 1: 质粒pcDNA3.1(+)/FHIT; 2: 酶切后的质粒pcDNA3.1(+)/FHIT.

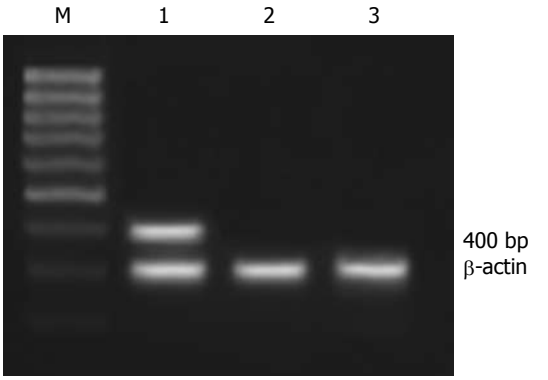



**图 2 转染前后Hep3B细胞FHIT mRNA表达.** M: 1000 bp Marker; 1: Hep3B-FHIT细胞; 2: 空载体转染细胞Hep3B-C; 3: 亲本细胞Hep3B.

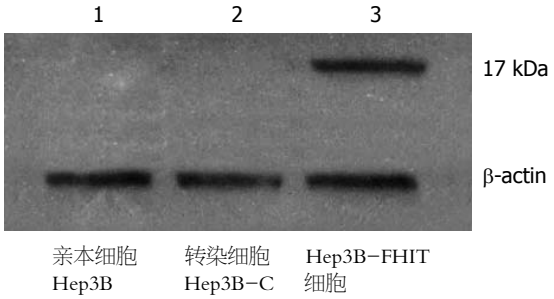



**图 3 转染FHIT后Hep3B细胞的Western结果.**

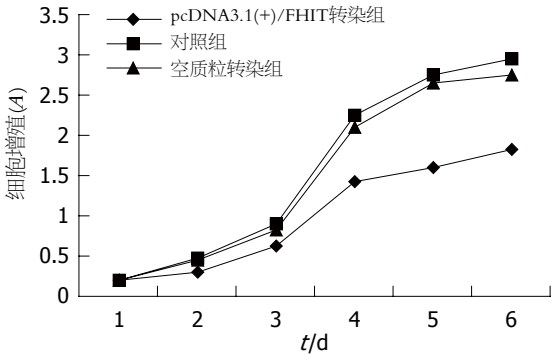



**图 4 人肝癌细胞的生长曲线.**

Hep3B-C和亲本细胞Hep3B未见此条带的表达(图2).

2.3 质粒转染前后细胞FHIT蛋白的表达 转染pcDNA3.1(+)/FHIT后, Hep3B-FHIT细胞中有17 kDa的FHIT蛋白表达, 而空载体转染细胞Hep3B-C和亲本细胞Hep3B未见FHIT蛋白表达(图3).

2.4 噻唑蓝(MTT)比色法检测转染前后细胞增殖能力的变化 FHIT基因转染细胞Hep3B-FHIT较空载体转染细胞Hep3B-C和亲本细胞Hep3B的生长速度明显减慢, 尤其是达到对数生长期后更加明显, 差异有显著性($P$<0.05)(图4).

2.5 Hep3B细胞转染前后生长周期及凋亡率的变化 Hep3B-FHIT细胞$G_2$/M期及S期比例明显下降, $G_0/G_1$期比例明显增加, 凋亡细胞率也明显高于对照组和空质粒转染组($P$<0.05, 表1).

## 3 讨论

目前普遍认为, FHIT是第一个将脆性位点和肿瘤联系起来的抑癌基因, 并且FHIT基因异常是肿瘤发生和发展过程中的早期事件[10]. 脆性位点发生断裂会使包含脆性位点的FHIT基因发生断裂、变异和失活而导致细胞异常增生. 与许多其他肿瘤相似, 肝癌中存在FHIT基因的高度变异或缺失. Yuan *et al*[8]发现64.3%(9/14)的肝癌细胞系存在FHIT基因表达下调, 其中4个出现FHIT mRNA下调的肝癌细胞系均不表达FHIT蛋白; 原位杂交发现29.4%(10/34)的肝癌组织中存在FHIT基因第5外显子的缺失, 61.5%(8/13)的肝癌细胞系中存在LOH或染色体转位; 免疫染色发现50%(5/10)的肝癌细胞系中无FHIT蛋白的表达. Gramantieri *et al*[10]对28例HCC患者的癌组织和非癌组织、10例正常肝组织研究发现, 异常FHIT转录为46.4%(11例发生于肝癌组织、2例发生于HCC患者的非肝癌组织), 而10例正常肝组织未发现异常转录. 最近的研究表明, 在多种因素诱导的大鼠肝癌发生和发展中也发现有明显的FHIT基因异常[11].

FHIT可能主要通过使APnA水解为ATP和AMP来参与调节体内APnA量的变化. APnA是信号转导分子, 由于发生FHIT基因变异, 肿瘤细胞失去或减弱了FHIT将APnA降解为AMP和ATP的能力, 导致细胞内APnA发生积累. 细胞内大量的APnA积累能够加强生长信号转导, 阻断抑制生长途径或凋亡通道而导致癌变. 另外FHIT蛋白能作用于mRNA帽类似物, 影响重要基因mRNA的翻译, 脱帽功能的丧失也可能引起肿瘤[9]. Siprashvil *et al*[12]将野生型FHIT和通过定

表 1 FHIT基因对人肝癌细胞Hep3B的细胞周期和凋亡的影响(mean ± SD)

| 细胞类 | $G_0/G_1$ | S | $G_2/M$ | 细胞凋亡率(%) |
|---|---|---|---|---|
| Hep3B | 54.36 ± 0.78 | 17.40 ± 1.32 | 28.01 ± 1.12 | 3.78 ± 0.36 |
| Hep3B–C | 53.17 ± 0.52 | 18.23 ± 2.51 | 28.55 ± 0.55 | 3.52 ± 0.33 |
| Hep3B–FHIT[a] | 72.23 ± 0.84 | 12.57 ± 0.42 | 15.12 ± 1.31 | 9.74 ± 0.43 |

[a]$P<0.05$ *vs* Hep3B和Hep3B–C.

■同行评价
本文通过研究外源性导入抑癌基因FHIT, 对肝癌细胞Hep3B生长的影响, 了解了肝癌的发生机制, 有一定参考意义. 文章总体思路明晰, 研究目的明确, 方案设计合理, 结果、结论较可靠.

位突变技术制成的没有Ap3A水解酶活性的突变型FHIT转染到缺少FHIT的肿瘤细胞中, 发现FHIT基因异常并不能使细胞获得生长优势, 而可能只是使细胞获得克隆扩增的选择优势, 同时发现他们在抑制成瘤性上差异无显著性. 因此, 认为FHIT蛋白与其底物结合抑制肿瘤发生可能比Ap3A水解酶的活性更重要, 有关FHIT蛋白的功能及作用机制有待进一步研究. 在本实验中, 我们向人肝癌细胞系Hep3B转染含有全长FHITcDNA的真核表达载体, 实验性干预肝癌细胞系Hep3B的基因表达, 以观察转染后肝癌细胞系Hep3B生物学性状的改变. 结果表明, 转染成功的Hep3B细胞, 其FHIT基因的mRNA、蛋白表达阳性. 而空载体转染细胞Hep3B-C和亲本细胞Hep3B未见FHIT基因的mRNA、蛋白表达. 进一步检测转染成功的Hep3B细胞的生物学性状的变化, 我们发现, 成功转染FHIT基因的肝癌细胞其体外增殖能力下降, $G_2/M$期及S期比例明显下降, $G_0/G_1$期比例明显增加, 凋亡细胞率也明显高于对照组和空质粒转染组. 初步证实了FHIT基因有诱导肝癌细胞凋亡的作用.

通过本实验研究, 我们认为FHIT基因可能通过使细胞阻滞于$G_1$期, 在其他凋亡诱导因子的协同作用下, 诱发肿瘤细胞发生凋亡. 本实验也证明了这一点, 为临床治疗肝癌提供了一种方法.

## 4 参考文献


1 Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3; 8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 84: 587-597

2 Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, Tornielli S, Sard L, Huebner K, Pierotti MA, Croce CM, Pilotti S. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res* 1998; 58: 5032-5037

3 Campiglio M, Pekarsky Y, Menard S, Tagliabue E, Pilotti S, Croce CM. FHIT loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. *Cancer Res* 1999; 59: 3866-3869

4 Sorio C, Baron A, Orlandini S, Zamboni G, Pederzoli P, Huebner K, Scarpa A. The FHIT gene is expressed in pancreatic ductular cells and is altered in pancreatic cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 1308-1314

5 Birrer MJ, Hendricks D, Farley J, Sundborg MJ, Bonome T, Walts MJ, Geradts J. Abnormal Fhit expression in malignant and premalignant lesions of the cervix. *Cancer Res* 1999; 59: 5270-5274

6 Thiagalingam S, Lisitsyn NA, Hamaguchi M, Wigler MH, Willson JK, Markowitz SD, Leach FS, Kinzler KW, Vogelstein B. Evaluation of the FHIT gene in colorectal cancers. *Cancer Res* 1996; 56: 2936-2939

7 Huebner K, Croce CM. Cancer and the FRA3B/FHIT fragile locus: it's a HIT. *Br J Cancer* 2003; 88: 1501-1506

8 Yuan BZ, Keck-Waggoner C, Zimonjic DB, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Alterations of the FHIT gene in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 1049-1053

9 Barnes LD, Garrison PN, Siprashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K. Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P1,P3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 1996; 35: 11529-11535

10 Gramantieri L, Chieco P, Di Tomaso M, Masi L, Piscaglia F, Brillanti S, Gaiani S, Valgimigli M, Mazziotti A, Bolondi L. Aberrant fragile histidine triad gene transcripts in primary hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3468-3475

11 Tsujiuchi T, Sasaki Y, Oka Y, Konishi Y, Tsutsumi M. Fhit gene alterations in hepatocarcinogenesis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Mol Carcinog* 2003; 36: 147-152

12 Siprashvili Z, Sozzi G, Barnes LD, McCue P, Robinson AK, Eryomin V, Sard L, Tagliabue E, Greco A, Fusetti L, Schwartz G, Pierotti MA, Croce CM, Huebner K. Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13771-13776


电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2004-2008
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

# SV40T抗原胃壁细胞特异性表达载体的构建与鉴定

陈 辉, 侯艺芳, 乐晓平, 金 辉, 马慧洁, 张钦宪

■背景资料
转基因肿瘤动物模型可为肿瘤发生机制的研究提供十分有用的实验动物, 近年来其研究越来越受到关注. SV40(simian virus 40)属乳多空病毒科多型瘤病毒属中的一种小DNA肿瘤病毒, 具有转化动物细胞和诱发肿瘤的特性. SV40T转基因小鼠模型的发瘤效率很高, 利用SV40T基因已建立了小鼠乳腺癌、脑脉络丛乳头状瘤、胰腺癌等转基因动物模型. 建立在特定细胞中表达SV40T的转基因小鼠将可能诱发特定肿瘤的产生, 提供相应的肿瘤动物模型.

陈辉, 郑州大学基础医学院细胞生物学与医学遗传学教研室; 河南省分子医学重点实验室 河南省郑州市 450052
乐晓平, 金辉, 马慧洁, 张钦宪, 郑州大学基础医学院组织胚胎学教研室 河南省郑州市 450052
侯艺芳, 郑州大学第一附属医院妇产科 河南省郑州市 450052
陈辉, 1990年武汉大学生物系本科毕业, 在读博士研究生, 副教授, 主要从事遗传病诊断与分子遗传学研究.
河南省重大科技攻关计划资助项目, No. 0623031400
**通讯作者**: 张钦宪, 450052, 郑州市大学路40号, 郑州大学基础医学院组织胚胎学教研室. qxz53@zzu.edu.cn
电话: 0371-66658153 传真: 0371-66658153
收稿日期: 2007-01-11 接受日期: 2007-03-23

## Construction and identification of a specific expression vector for SV40 large T antigen in gastric parietal cell

Hui Chen, Yi-Fang Hou, Xiao-Ping Le, Hui Jin, Hui-Jie Ma, Qin-Xian Zhang

Hui Chen, Department of Cell Biology and Medical Genetics, College of Basic Medicine Sciences of Zhengzhou University; He'nan Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China
Xiao-Ping Le, Hui Jin, Hui-Jie Ma, Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China
Yi-Fang Hou, Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China
Supported by: He'nan Provincial Key Technologies R & D Program, No. 0623031400
Correspondence to: Dr. Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China. qxz53@zzu.edu.cn
Received: 2007-01-11 Accepted: 2007-03-23

## Abstract

**AIM:** To construct and identify a eukaryotic specific expression vector of SV40 large T antigen in gastric parietal cell.

**METHODS:** Genome DNA was extracted from liver cells of Kunming mice by a phenol-chloroform method. The $H^+/K^+$ ATPase β subunit promoter gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and the product was named as HK. This was then ligated with the pMT18-T vector after purification. A cloning vector of pcDNA3.1 (-)/HK was constructed by ligating the $H^+/K^+$ATPase β subunit promoter and the eukaryotic vector pcDNA3.1 (-). SV40 large T genes were digested by restricted enzymes from PLITAg recombinant and then inserted into the prokaryotic expression vector pcDNA3.1 (-)/HK. Thus, an expression vector specific for pcDNA3.1 (-)/HKSV was constructed and identified in gastric parietal cell.

**RESULTS:** Three DNA bands were seen when pcDNA3.1(-)/HKSV was digested by *Xba* Ⅰ and *Bam*HⅠ, which were the 1 kb $H^+/K^+$ ATPase β subunit promoter gene, the 2.7 kb SV40T gene and the 5.4 kb pcDNA3.1(-) vector. Two DNA bands, 3.7 kb and 5.4 kb were seen when pcDNA3.1(-)/HKSV was digested by *Xba* Ⅰ and *Kpn* Ⅰ. Another two DNA bands, 2.7 kb and 6.4 kb, were seen when pcDNA3.1(-)/HKSV was digested by *Bam*HⅠ. One DNA band, 9.1 kb, was seen when pcDNA3.1(-)/HKSV was digested by *Eco*RⅠ. All electrophoresis results were consistent with the design. The sequencing results showed that $H^+/K^+$ ATPase β subunit promoter and SV40 large T gene had been successfully cloned into pcDNA3.1(-) eukaryotic vector.

**CONCLUSION:** The recombinant plasmid pcDNA3.1 (-)/HKSV which is specially expressed in gastric parietal cell, is a stable and valuable molecular tool for establishing transgenic mice and animal models of gastric carcinoma.

Key Words: SV40 virus; T antigen; Eukaryotic expression; Vector construction

Chen H, Hou YF, Le XP, Jin H, Ma HJ, Zhang QX. Construction and identification of a specific expression vector for SV40 large T antigen in gastric parietal cell. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2004-2008

## 摘要

**目的**: 构建在胃壁细胞中特异性表达SV40T抗原的真核表达载体并进行鉴定.

**方法**: 采用酚-氯仿法从昆明小鼠肝细胞中提取基因组DNA, 聚合酶链式反应(PCR)扩增

$H^+/K^+$ATPase β亚基启动子, 产物命名为HK. 将PCR产物纯化回收后与pMT18-T载体相连, 并将其克隆至真核表达载体pcDNA3.1(-), 构建pcDNA3.1(-)/HK; 从含SV40T基因片段的质粒pLITAg中酶切回收SV40T基因, 与pcDNA3.1(-)/HK相连, 构建胃壁细胞特异性表达载体pcDNA3.1(-)/HKSV, 并测序鉴定.

**结果:** pcDNA3.1(-)/HKSV用*Xba* Ⅰ、*Bam*HⅠ双酶切可得到1 kb $H^+/K^+$ATPase β亚基启动子, 2.7 kb SV40T基因与5.4 kb pcDNA3.1(-)载体3条DNA条带. 用*Xba* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ双酶切电泳, 可见到约3.7与5.4 kb的两条DNA条带; 用*Bam*HⅠ单酶切电泳, 可见到2.7与6.4 kb的2条DNA条带; 用*Eco*R Ⅰ单酶切, 只见到约9.1 kb的1条DNA条带, 酶切电泳结果均与设计一致. 测序结果显示, $H^+/K^+$ATPase β亚基启动子与SV40T基因成功构建于pcDNA3.1(-)真核表达载体中.

**结论:** 构建在胃壁细胞中特异性表达SV40T基因的真核表达载体, 为进一步转基因小鼠及胃癌动物模型的建立提供了稳定、可靠的分子工具.

**关键词:** SV40病毒; T 抗原; 真核表达; 载体构建

陈辉, 侯艺芳, 乐晓平, 金辉, 马慧洁, 张钦宪. SV40T抗原胃壁细胞特异性表达载体的构建与鉴定. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2004-2008
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2004.asp

## 0 引言

SV40(simian virus 40)是1960年代初发现分离的猿猴肾细胞病毒, 属乳多空病毒科多型瘤病毒属中的一种小DNA肿瘤病毒, 具有转化动物细胞和诱发肿瘤的特性. SV40病毒的细胞转化特性主要是与早期蛋白T抗原有关, 国外诸多研究证实了SV40T转基因小鼠模型的发瘤率很高, 可用于肿瘤发病机制的研究与转基因动物模型的建立, 如利用SV40T基因已建立了小鼠乳腺癌、脑脉络丛乳头状瘤、胰腺癌等转基因动物模型. 胃壁细胞是胃底腺的主要细胞类型之一, 能合成和分泌盐酸, 从而刺激胃肠道内分泌细胞和胰液的分泌. $H^+/K^+$ATP酶基因在胃壁细胞中特异性表达, 和胃酸的合成与分泌有着直接的关系. Gordon建立了在胃壁细胞中特异性表达人生长因子(hGH)、内在因子(INF)的转基因动物模型, 研究了胃黏膜上皮细胞的发生、演化过程, 构建的HKATP/SV40T胃癌转基因小鼠动物模型, 为胃癌的诊断、治疗提供了十分有用的实验材料. 但此方面的研究在国内未见报道, 我们拟构建在胃壁细胞中特异性表达SV40T基因的真核表达载体, 为转基因小鼠及胃癌动物模型的建立提供稳定、可靠的分子工具.

**■创新盘点**
$H^+/K^+$ATP酶基因在胃壁细胞中特异性表达, 我们构建在$H^+/K^+$ATPase β基因启动子调控下的SV40T特异性表达载体将为转基因小鼠及胃癌动物模型的建立提供稳定、可靠的分子工具.

## 1 材料和方法

1.1 *材料* 昆明小鼠由河南省实验动物中心提供, PLITAg由美国Jeffrey I. Gordon 惠赠, 克隆载体pcDNA3.1(-)由中南大学生殖与干细胞工程研究所刘永波博士惠赠, 载体pMD18-T由郑州大学公共卫生学院宋春花博士惠赠. 大肠杆菌DH5α为本室保存. T4 DNA连接酶、DL15000 DNA Marker、限制性内切酶*Bam*HⅠ、*Eco*R Ⅰ、*Kpn* Ⅰ和*Xba* Ⅰ为TaKaRa公司产品; 蛋白酶K、RNA酶A购自Sigma公司; 胰蛋白胨、酵母提取物购自Oxoid公司; 凝胶回收试剂盒购自TaKaRa公司.

1.2 *方法* 采用酚-氯仿法从昆明小鼠肝细胞中提取基因组DNA, 紫外分光光度计测定DNA的浓度和纯度, 置-20℃保存备用.

1.2.1 PCR扩增 以小鼠基因组DNA为模板, 设计引物扩增$H^+/K^+$ATPase β亚基启动子片段, P1: 5'-TCTAGAGCTCTTTCCTCTGGGTC-3'(含*Xba* Ⅰ位点), P2: 5'-CTCGGATTCGTCCTCTCCTGCTT-3'(含*Bam*HⅠ位点). 反应条件为: 94℃预变性3 min; 94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 60 s, 共35个循环, 最后72℃延伸10 min, PCR产物命名为HK. 将PCR产物纯化回收后与pMT18-T载体相连, 转化感受态*E.coli* DH5α细胞, 从转化平板上随机挑取8个单菌落, 37℃摇菌过夜培养, 取菌液提取质粒DNA, *Xba* Ⅰ、*Bam*HⅠ双酶切鉴定出阳性克隆, 命名为pMT/HK, 送北京三博远志生物工程公司测序.

1.2.2 构建pcDNA3.1/HK质粒 将pMT/HK用*Xba* Ⅰ、*Bam*HⅠ双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收约1060 bp的DNA片段, 将回收产物与用*Xba* Ⅰ、*Bam*HⅠ双酶切的pcDNA3.1(-)质粒连接, 目的片段与载体分子摩尔比为3∶1, 45℃水浴5 min, 16℃连接16 h后, 按常规方法转化感受态DH5α细胞, 从转化平板上任意挑单菌落, 提取质粒DNA, 限制性内切酶消化鉴定出阳性重组克隆, 记作pcDNA3.1/HK.

1.2.3 构建pcDNA3.1/HKSV质粒 将PLITAg(含SV40T基因片段)质粒用*Bam*HⅠ酶切, 琼脂糖

■名词解释
转基因动物(transgenic animals): 是指用实验方法导入外源基因在其染色体基因组内稳定地整合并可以表达和传与后代的一类动物.

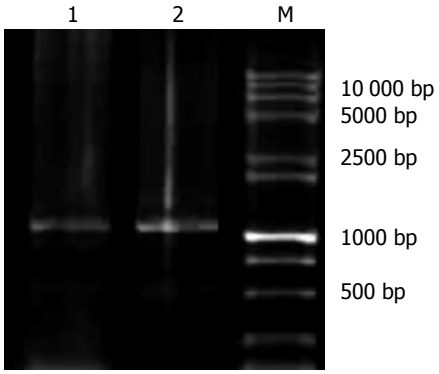



**图 1 PCR电泳结果**. 1: PCR产物; 2: PCR产物纯化; M: DL 15 000 DNA Marker.

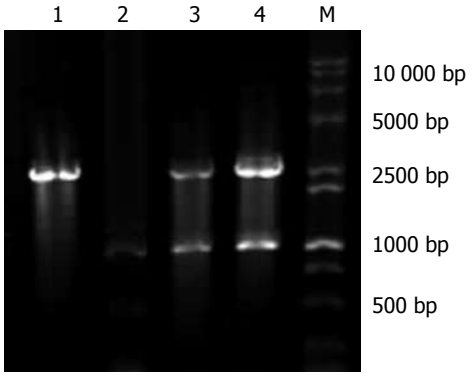



**图 2 pMT/HK酶切鉴定**. 1: T载体; 2: PCR产物; 3-4: pMT/HK质粒酶切后产物; M: DL15 000 DNA Marker.

凝胶电泳, 切胶回收约2700 bp的DNA片段, 将回收产物与用*Bam*HⅠ酶切的pcDNA3.1/HK连接, 目的片段与载体分子摩尔比为3∶1, 反应体积为10 μL, 连接反应体系16℃连接过夜, 取2 μL连接产物转化至*E.coli* DH5α细胞中, 从转化平板上挑取单菌落, 37℃摇菌过夜培养, 取菌液提取质粒DNA, 酶切鉴定重组体, 并送北京三博远志生物工程公司测序鉴定SV40T基因插入的方向及DNA序列, 插入方向正确的重组体记为pcDNA3.1/HKSV.

## 2 结果

2.1 pMT/HK质粒构建与鉴定 $H^+/K^+$ATPase β亚基启动子扩增产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 结果可见约1060 bp的DNA条带(图1), pMT/HK质粒用*Xba*Ⅰ、*Bam*HⅠ双酶切电泳, 可见到1与2.6 kb的两条DNA条带, 与预期结果一致(图2).

2.2 pcDNA3.1/HKSV质粒构建与鉴定 pcDNA3.1/HKSV用*Xba*Ⅰ、*Bam*HⅠ双酶切电泳, 可见到约1, 2.7与5.4 kb的3条DNA条带; 用*Xba*Ⅰ、*Kpn*Ⅰ双酶切电泳, 可见到约3.7与5.4 kb的

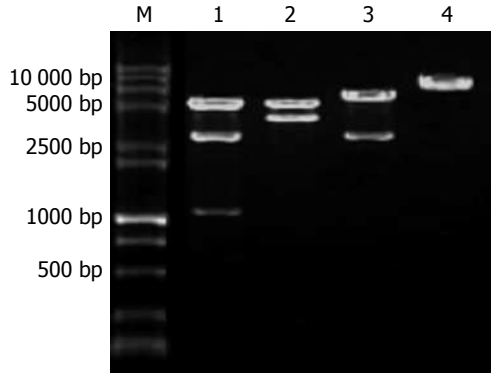



**图 3 pcDNA3.1/HKSV酶切鉴定**. 1: *Xba*Ⅰ、*Bam*HⅠ双酶切; 2: *Xba*Ⅰ、*Kpn*Ⅰ双酶切; 3: *Bam*HⅠ单酶切; 4: *Eco*RⅠ单酶切; M: DL15 000 DNA Marker.

两条DNA条带; 用*Bam*HⅠ单酶切电泳, 可见到2.7与6.4 kb的2条DNA条带; 用*Eco*RⅠ单酶切, 只见到约9.1 kb的1条DNA条带, 酶切电泳结果均与设计一致(图3).

2.3 DNA测序结果 pMT/HK测序显示, PCR扩增的$H^+/K^+$ATPase β亚基启动子长度为1057 bp(-1057～-1), 测序结果与Canfield *et al*[1]发表序列经NCBI网站的Blast 2 sequences 对比分析, 发现在文献起始密码子上游764与765 bp之间有AC碱基的插入; -501与-634 bp之间存在碱基重复序列, 并且不同小鼠扩增产物测序以及与文献序列之间比对发现存在1-2个重复序列的不同, 推测此段序列可能为多态性位点, $H^+/K^+$ATPase β亚基启动子测序结果如下: TCTAGAGCTCTTTCCTCTGGGTCTGTTTGGTGGAACACACAGTTCTGTGTTCTCACACAGTAGAGAAACAGCCTCAGCCCTCCTCCCACAGACACACGATCAGGTCATGCTGACAATCCATGTATGGTCCAGACCCTACTCATGCTTCCAGAACCTCAGAGGTGGAGTTAGGGAAATGGAGCTTTAAAAAGCTCAGTAATAACTCAGCATTTTGTTCACACATGGAGCGCCTCCATGCTCACTGAGAGACAATGGCTGTGACTCTAAGATACCTTCATGCTCTTGGTTGCCAGACCCCAGGCTTGGGTTTGCATACACAAGCTAGCTCTAACCACCCAGGTAATTTCAGGTGCCCAGACCTCTGACTCCAGGCCTACAGGCAATTTCCAGGCCCTGAATACCTAGATCCAGGTTTGTCTAACATGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTAAATATATATATATATATATATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-

GTGTGTATATATATATATATATATATATATA-TATATATATATATATATA**CACATGGGTATG-CATATCTCCACAGGAGAATACTGAGGA-CAGGGCTGTGGGGCCACTCCAGGTAGTT-GTAGGCACACTTTAAGCACCTTCTC-CACCATCTTGAGGAGGAGGGGAGTCTC-CAGGAAGCAGTTCGAGGTCCCAGG GACCTGAGTGGTGAGGTGGCAGGTCTCAG-GCCTAGGGCATTTGACCTAGAAGCTGC-CAGTATGTGTTTTCCCTCCTGAAGGGCAG-GTGAGGCACAACCCAGAGGCTGTTCA-CATCAGACATGCTTCCCTTCAGCTAA-CATCAGGGTAGATGAAGTTGCCAGC-CAAGGGCACCCCAAGGACCAACT-GACTTCTGGGACAGCGGAGGGCAGATAG-CAAGCAAGCTCCAACCCTCCCTTGTGTTT-GTAGAGGCGATAGTAGAGAACTGATAGCC-GGTTCTGATGCCTTTGGCCTCACACAGAG-GAGACTATAAGCCCTAGAGGACGCTTCCT-GGGCCCAGTCCAGGCAAGCAGGAGAGGAC**

注: 下划线为引物序列, 黑色区示AC碱基插入部位, 灰色区示重复碱基序列. pcDNA3.1/HKSV质粒中SV40T基因测序结果与NCBI公布的NC_001669序列完全一致.

## 3 讨论

SV40病毒属乳多空病毒科(papovaviridae)多瘤病毒属(polyomavirus), 其基因组包括5224 bp, 为双股环状DNA, 在病毒DNA复制前编码2种转化蛋白, 即大T抗原(Tag)和小T抗原(tag). 野生型SV40T基因全长2473 bp, 2个外显子连接编码序列长为2127 bp. Tag是一种磷酸化蛋白, 具有ATP酶和DNA解旋酶活性, 能使蛋白质丝氨酸、苏氨酸残基磷酸化、ADP核糖基化和乙酰基化, 另外还有活化宿主细胞核糖体基因、诱导DNA合成、修饰蛋白质合成起始因子等作用, 在细胞转化中起决定性作用, 为细胞转化所必需[2-9]. tag是非磷酸化蛋白, 对细胞转化并非必需, 但可起加强转化作用[10]. SV40T基因除用于细胞转化之外, 还发现与细胞增殖及多种肿瘤的产生相关, 并被广泛应用于转基因动物肿瘤模型的建立研究[11-20]. 如Kim *et al*[21]构建的共表达SV40T/抗利尿激素2转基因小鼠产生了脑瘤与淋巴瘤; Sun *et al*[22]将SV40T基因导入小鼠受精卵建立了前列腺癌的转基因鼠系; Nabarra *et al*[23]建立的在L丙酮酸激酶启动子调控下的SV40T转基因小鼠首先发生胸腺增生, 进而出现恶性胸腺瘤; Thompson *et al*[24]建立的CEA promotor/SV40T转基因小鼠后代在幽门处100%产生肿瘤, 37 d在小鼠胃黏膜层可观察到细胞萎缩, 50 d肿瘤可至黏膜下层, 100-130 d小鼠皆因幽门阻塞而死亡, 但由于CEA promotor/SV40T转基因小鼠基因表达的随机性, 在5000多只子鼠中仅发现一只胃癌转基因小鼠, 因此建立在胃组织特异细胞中表达的SV40T基因真核表达载体, 将为转基因小鼠及胃癌动物模型的建立提供稳定、可靠的分子工具.

胃癌是消化道恶性肿瘤中最多见的癌种, 死亡率居恶性肿瘤之首位, 建立胃癌肿瘤动物模型可为胃癌的早期诊断、治疗和发病机制的研究提供非常有用的实验动物模型[25-28]. Gordon *et al*研究了$H^+/K^+$ATPase β亚基在胃组织中的作用, 并建立了在胃壁细胞中特异性表达hGH, INF, SV40T的转基因动物模型[29-30], 证实了在$H^+/K^+$ATPase β亚基启动子作用下, hGH, INF, SV40T仅在小鼠胃壁细胞中表达, 在小肠、肝、幽门、贲门、大肠等处均不表达, 为胃组织特异性表达载体的构建提供了直接的理论依据. 我们成功构建了在小鼠胃壁细胞中特异性表达SV40T基因的真核表达载体, 为进一步转基因肿瘤动物的建立与研究奠定了基础.

**■同行评价**

本文为建立转基因小鼠及胃癌动物模型而构建了定向表达载体, 为进一步研究致癌机制建立了实验基础, 意义较大.

## 4 参考文献


1 Canfield VA, Levenson R. Structural organization and transcription of the mouse gastric H+, K(+)-ATPase beta subunit gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8247-8251

2 Kirchhoff C, Araki Y, Huhtaniemi I, Matusik RJ, Osterhoff C, Poutanen M, Samalecos A, Sipila P, Suzuki K, Orgebin-Crist MC. Immortalization by large T-antigen of the adult epididymal duct epithelium. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 216: 83-94

3 Bian C, Zhao K, Tong GX, Zhu YL, Chen P. Immortalization of human umbilical vein endothelial cells with telomerase reverse transcriptase and simian virus 40 large T antigen. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6: 631-636

4 Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dettin L, Johnson E, Dym M. Immortalization of mouse germ line stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 200-210

5 Fujii S, Maeda H, Wada N, Kano Y, Akamine A. Establishing and characterizing human periodontal ligament fibroblasts immortalized by SV40T-antigen and hTERT gene transfer. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 117-125

6 Kowolik CM, Liang S, Yu Y, Yee JK. Cre-mediated reversible immortalization of human renal proximal tubular epithelial cells. *Oncogene* 2004; 23: 5950-5957

7 Zhang H, Tsao SW, Jin C, Strombeck B, Yuen PW, Kwong YL, Jin Y. Sequential cytogenetic and molecular cytogenetic characterization of an SV40T-

immortalized nasopharyngeal cell line transformed by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 gene. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 150: 144-152

8 Maruyama M, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Allain JE, Totsugawa T, Okitsu T, Fukazawa T, Weber A, Stolz DB, Leboulch P, Tanaka N. Establishment of a highly differentiated immortalized human cholangiocyte cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation* 2004; 77: 446-451

9 Qiu HY, Fujimori Y, Nishioka K, Yamaguchi N, Hashimoto-Tamaoki T, Sugihara A, Terada N, Nagaya N, Kanda M, Kobayashi N, Tanaka N, Westerman KA, Leboulch P, Hara H. Postnatal neovascularization by endothelial progenitor cells immortalized with the simian virus 40T antigen gene. *Int J Oncol* 2006; 28: 815-821

10 Wen CC, Cheng SA, Hsuen SP, Huang YL, Kuo ZK, Lee HF, Kuo CH, Du JL, Wang WB. SV40 T/t-common polypeptide specifically induces apoptosis in human cancer cells that overexpress HER2/neu. *Cancer Res* 2006; 66: 5847-5857

11 Markovics JA, Carroll PA, Robles MT, Pope H, Coopersmith CM, Pipas JM. Intestinal dysplasia induced by simian virus 40 T antigen is independent of p53. *J Virol* 2005; 79: 7492-7502

12 Ishii K, Shappell SB, Matusik RJ, Hayward SW. Use of tissue recombination to predict phenotypes of transgenic mouse models of prostate carcinoma. *Lab Invest* 2005; 85: 1086-1103

13 Azzoni AR, Ribeiro SC, Monteiro GA, Prazeres DM. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *J Gene Med* 2007; 9: 392-402

14 Robinson C, van Bruggen I, Segal A, Dunham M, Sherwood A, Koentgen F, Robinson BW, Lake RA. A novel SV40 TAg transgenic model of asbestos-induced mesothelioma: malignant transformation is dose dependent. *Cancer Res* 2006; 66: 10786-10794

15 McCabe MT, Low JA, Daignault S, Imperiale MJ, Wojno KJ, Day ML. Inhibition of DNA methyltransferase activity prevents tumorigenesis in a mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 385-392

16 Boissan M, Wendum D, Arnaud-Dabernat S, Munier A, Debray M, Lascu I, Daniel JY, Lacombe ML. Increased lung metastasis in transgenic NM23-Null/SV40 mice with hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 836-845

17 Tani Y, Suttie A, Flake GP, Nyska A, Maronpot RR. Epithelial-stromal tumor of the seminal vesicles in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. *Vet Pathol* 2005; 42: 306-314

18 Strayer DS, Cordelier P, Kondo R, Liu B, Matskevich AA, McKee HJ, Nichols CN, Mitchell CB, Geverd DA, White MK, Strayer MS. What they are, how they work and why they do what they do? The story of SV40-derived gene therapy vectors and what they have to offer. *Curr Gene Ther* 2005; 5: 151-165

19 Konishi S, Naora H, Kimura M, Sato M, Nagasaki M, Yokoyama M, Otani H, Moritake K, Katsuki M. Expression of SV40 T antigen gene in the oligodendroglia induced primitive neuroectodermal tumor-like tumors in the mouse brain. *Congenit Anom (Kyoto)* 2004; 44: 215-224

20 Delgado JP, Parouchev A, Allain JE, Pennarun G, Gauthier LR, Dutrillaux AM, Dutrillaux B, Di Santo J, Capron F, Boussin FD, Weber A. Long-term controlled immortalization of a primate hepatic progenitor cell line after Simian virus 40 T-Antigen gene transfer. *Oncogene* 2005; 24: 541-551

21 Kim SH, Kim MO, Lee SR, Kim KS, Lee TH, Lee HT, Ha JH, Kim TY, Ryoo ZY. Characterization of a brain tumor cell line established from transgenic mice expressing the vasopressin SV-40 T antigen. *Exp Mol Med* 2006; 38: 196-202

22 Sun Q, Feng J, Wei XL, Zhang R, Dong SZ, Shen Q, Dong J, Li HD, Hu YH. Generation and characterization of a transgenic mouse model for pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2785-2788

23 Nabarra B, Pontoux C, Godard C, Osborne-Pellegrin M, Ezine S. Neoplastic transformation and angiogenesis in the thymus of transgenic mice expressing SV40 T and t antigen under an L-pyruvate kinase promoter (SV12 mice). *Int J Exp Pathol* 2005; 86: 397-413

24 Thompson J, Epting T, Schwarzkopf G, Singhofen A, Eades-Perner AM, van Der Putten H, Zimmermann W. A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy. *Int J Cancer* 2000; 86: 863-869

25 Takaishi S, Wang TC. Gene expression profiling in a mouse model of Helicobacter-induced gastric cancer. *Cancer Sci* 2007; 98: 284-293

26 Taketo MM. Mouse models of gastrointestinal tumors. *Cancer Sci* 2006; 97: 355-361

27 Pritchard DM, Przemeck SM. Review article: How useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 841-859

28 Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Osawa H, Hakamata Y, Takeuchi T, Sugano K. Cdx1 induced intestinal metaplasia in the transgenic mouse stomach: comparative study with Cdx2 transgenic mice. *Gut* 2004; 53: 1416-1423

29 Mills JC, Andersson N, Hong CV, Stappenbeck TS, Gordon JI. Molecular characterization of mouse gastric epithelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14819-14824

30 Syder AJ, Karam SM, Mills JC, Ippolito JE, Ansari HR, Farook V, Gordon JI. A transgenic mouse model of metastatic carcinoma involving transdifferentiation of a gastric epithelial lineage progenitor to a neuroendocrine phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4471-4476

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2009-2013
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

# 人胃癌顺铂耐药细胞系的建立过程

潘洪明, 费洪新, 杜静平, 陈正华, 张 涛

潘洪明, 齐齐哈尔医学院生物化学教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
费洪新, 齐齐哈尔医学院组织学与胚胎学教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
杜静平, 陈正华, 亚盛集团博士后科研工作站 北京市 100101
张涛, 佳木斯大学生物化学教研室 黑龙江省佳木斯市 154007
潘洪明, 副教授, 硕士生导师, 主要研究中药多糖抗肿瘤机制.
**通讯作者**: 潘洪明, 161042, 齐齐哈尔市富拉尔基区, 齐齐哈尔医学院生物化学教研室. qyphm@sohu.com
电话: 0452-6731101
收稿日期: 2007-04-13 接受日期: 2007-05-22

## Construction of a cisplatin-induced human gastric cancer drug-resistant cell line

Hong-Ming Pan, Hong-Xin Fei, Jing-Ping Du, Zheng-Hua Chen, Tao Zhang

Hong-Ming Pan, Department of Biochemistry, Qiqihaer Medical College, Qiqihaer 161042, Heilongjiang Province, China
Hong-Xin Fei, Department of Histology and Embryology; Qiqihaer Medical College, Qiqihaer 161042, Heilongjiang Province, China
Jing-Ping Du, Zheng-Hua Chen, Postdoc Workstation of Gansu Yasheng Industrial Co. Beijing 100101, China
Tao Zhang, Department of Biochemistry, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Hong-Ming Pan, Department of Biochemistry, Qiqihaer Medical College, Qiqihaer Fulaerji District, Qiqihaer 161042, Heilongjiang Province, China. qyphm@sohu.com
Received: 2007-04-13 Accepted: 2007-05-22

## Abstract

**AIM:** To establish a cisplatin-induced human gastric cancer drug-resistant cell line and study changes in its resistance.

**METHODS:** A resistant gastric cancer cell line (SGC7901/DDP) was established by gradually increasing the dose of cisplatin with intermittent, monthly administration. Drug sensitivity was detected by MTT assay. Changes in biological characteristics were determined using light microscopy, electron microscopy, cell counting by MTT assay, and flow cytometry.

**RESULTS:** The SGC7901/DDP cell line was developed after 4 mo, with stable resistance to cisplatin. The resistance index for each month was 2.13, 5.32, 12.60 and 12.93, respectively. SGC7901/DDP cells exhibited cross-resistance to many other chemotherapeutic agents (e.g., 5-fuorouracil and mitomycin C). The morphology of SGC7901/DDP cells gradually changed; doubling time was gradually prolonged, and the cell numbers in S- and $G_2$/M-phases gradually decreased, while that in $G_0/G_1$ phase gradually increased, compared with parent cells.

**CONCLUSION:** The SGC7901/DDP cell line showed a typical and stable resistant phenotype, multiplication of the SGC7901/DDP cell line gradually decreased, and MTT assay and electron microscopy determined the resistance of the SGC7901/DDP cell line.

Key Words: Gastric cancer; SGC7901/DDP cell line; Cisplatin; Drug resistance

Pan HM, Fei HX, Du JP, Chen ZH, Zhang T. Construction of a cisplatin-induced human gastric cancer drug-resistant cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2009-2013

## 摘要

**目的**: 建立人胃癌顺铂耐药细胞系.

**方法**: 采用逐步递增顺铂浓度, 间歇作用体外诱导法建立人胃癌顺铂耐药细胞系SGC7901/DDP, 每月作相关检测; MTT法测定药物敏感性; 光镜、电镜、MTT法计数活细胞、流式细胞仪等方法观察其生物学特征的改变.

**结果**: 历时4 mo建成人胃癌顺铂耐药细胞系SGC7901/DDP, 1, 2, 3, 4 mo的耐药指数分别为2.13, 5.32, 12.60, 12.93, 并且与5-氟尿嘧啶、丝裂霉素等多种抗癌药有不同程度的交叉耐药性; SGC7901/DDP的细胞形态逐渐发生改变; 体外群体倍增时间较亲代细胞逐渐延长; 细胞周期分析发现其S期与$G_2$/M期细胞逐渐减少, $G_0/G_1$期细胞逐渐增多.

**结论**: SGC7901/DDP细胞具有耐药表型特征, 耐药性能稳定, 增殖能力逐渐下降.

**关键词**: **胃癌**; SGC7901/DDP; **顺铂**; **药物耐受性**

**■背景资料**
肿瘤细胞的耐药机制十分复杂, 肿瘤多药耐药现象是肿瘤化疗研究的热点. 在体外建立多药耐药细胞系是研究肿瘤产生多药耐药性的重要手段.

潘洪明, 费洪新, 杜静平, 陈正华, 张涛. 人胃癌顺铂耐药细胞系的建立过程. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2009-2013
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2009.asp

## 0 引言

顺铂(cisplatin, DDP)抗瘤谱广, 对睾丸肿瘤、卵巢癌、肺癌、鼻咽癌、淋巴瘤、膀胱癌等有效, 是周期非特异性药物, 目前临床大量使用. 但是由于耐药性的产生使其不能发挥应有的治疗作用, 导致化疗的失败. 肿瘤细胞发生耐药的机制是十分复杂的, 在体外建立多药耐药细胞系是研究肿瘤产生多药耐药性(multidrug resistance, MDR)[1-2]的重要手段. 鉴于目前国内外尚缺乏人胃癌SGC7901耐DDP的细胞模型. 我们采用逐步递增DDP的浓度、间歇作用体外诱导法, 建立了人胃癌SGC7901顺铂耐药细胞系, 研究耐药过程中的变化, 为深入研究人胃癌SGC7901顺铂耐药的机制和筛选耐药逆转剂提供理想的模型.

**■名词解释**
1 多药耐药性: 指肿瘤细胞对某种抗肿瘤药物出现耐药性的同时, 对其他多种结构不同、作用靶位点不同的抗肿瘤药物也有耐药性.
2 P-糖蛋白: 是一种能量依赖性转移泵, 这种跨膜糖蛋白由mdr1基因编码, 翻译为1280个氨基酸残基, 氨基端与羧基端两段氨基酸序列对称, 同源性达78%, 每一部分各有6个α-螺旋横跨细胞膜和一个胞内ATP结合点, 分子量为170 kDa.

## 1 材料和方法

1.1 材料 DDP山东齐鲁制药厂生产; 5-氟尿嘧啶(5-FU)上海旭东海普药业有限公司; 长春新碱(VCR)上海华联药业有限公司生产; 丝裂霉素(MMC)日本Kyowa Hakko公司生产; 阿霉素(ADM)澳大利亚F. H. Faulding公司生产; RPMI1640由Gibco/BRL公司提供; MTT试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司. SGC7901为人胃癌细胞系, 亚盛集团博士后科研(北京)工作站提供. 细胞培养在经过0.22 μm滤膜过滤的RPMI1640培养液中(含100 mL/L热灭活胎牛血清, 2 g/L $NaHCO_3$, 青霉素100 U/mL和链霉素100 mg/L), 在37℃, 50 mL/L的$CO_2$, 饱和湿度下培养, 用PBS配制的1.5 g/L的胰蛋白酶(含有0.2 g/L的EDTA)消化细胞传代.

1.2 方法 采用逐步递增DDP浓度间歇作用的方法诱导细胞耐药. 取对数生长期的细胞SGC7901细胞接种于含有RPMI1640培养液中, 从低浓度0.06 mg/L作用48 h后弃去含药的培养液, 加入新鲜的培养液, 继续培养, 待其恢复正常生长, 消化传代后继续用0.06 mg/L的药物浓度处理48 h, 如此反复换液、传代逐步提高DDP浓度间歇诱导细胞, 最终获得一株能耐受0.6 mg/L的细胞系, 命名为SGC7901/DDP, 并且将其培养在含有DDP 0.1 mg/L的完全培养液中.

1.2.1 细胞生长曲线 将5×10$^7$个/L细胞接种于8块96孔培养板中, 每孔200 μL, 一种细胞设3个复孔, 37℃, 50 mL/L的$CO_2$孵箱内培养. 每天取1块培养板, 弃培养液, 加入无血清培养液180 μL, 每孔加入5 g/L MTT 20 μL, 继续培养4 h, 终止培养, 弃培养液, 加入二甲基亚砜150 μL, 振荡5 min, 用自动酶标仪(Bio-Bad E2550型, USA)测定570 nm光密度. 以空白对照孔调零, 时间为横坐标, 光密度为纵坐标, 绘制细胞生长曲线, 求出群体倍增时间, 分析生长曲线.

1.2.2 MTT法测定抗癌药物的细胞毒性 在96孔培养板内每孔加入5×10$^7$个/L单细胞悬液200 μL, 并且加入倍比稀释成5种浓度的各种抗癌药物各20 μL, 每一种浓度重复3个孔, 对照组加入等体积的PBS, 并且设立空白对照组, 放置于37℃, 50 mL/L $CO_2$孵箱中培养68 h后吸去上清液, 每孔中加入无血清的培养液180 μL及5 g/L MTT 20 μL, 继续培养 4 h后小心吸去上清液, 每孔加入二甲基亚砜150 μL, 置于微量振荡器上振荡5 min, 自动酶标仪(Bio-Bad E2550型, USA)测量各孔的吸光度$A$值, 检测波长为570 nm[3]. 按抑制率 = (1-$A_{用药组}/A_{细胞对照组}$)×100%计算每一种浓度的抑制率, 并根据中效方程式[4]计算出各种抗癌药物的半数抑制浓度($IC_{50}$)及其耐药指数(resistance index, RI), RI = $IC_{50}$(耐药细胞)/$IC_{50}$(亲本细胞).

1.2.3 细胞形态和周期 将5×10$^7$个/L单细胞悬液接种于内铺小玻片的24孔培养板内, 置于37℃, 50 mL/L $CO_2$孵箱内培养72 h后用PBS洗涤2次, 瑞氏染液染色10 min, 在用PBS洗涤2次, 室温干燥, 中性树胶封片, 光镜下观察. 用含有胰蛋白酶和EDTA的消化液处理细胞, 收集1×10$^7$个细胞, 用25 g/L的戊二醛固定, 继续用20 g/L的四氧化锇固定, 脱水、包埋、切片和染色按常规处理, 透射电镜(HITACHI-600型, 日本)观察. 再收集1×10$^9$个/L细胞, PBS洗涤2次, 700 mL/L冷乙醇固定过夜, PBS洗涤2次, PI染液冰浴30 min, 在流式细胞仪上(FACS Calibur BD, USA)分析细胞周期分布.

**统计学处理** 实验数据用SAS统计软件处理, 采用$\chi^2$检验进行分析.

## 2 结果

2.1 MTT法检测结果 SGC7901/DDP细胞对DDP的1, 2, 3, 4 mo耐药指数分别是2.1, 5.3, 12.6, 12.9, 并且对另外4种临床常用的抗癌药物也有不同程度的耐药(表1).

2.2 细胞形态学观察 光镜下SGC7901细胞与

表 1 SGC7901与SGC7901/DDP细胞的耐药性

| *t* | 细胞 | DDP | 5-FU | MMC | VCR | ADM |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 mo $IC_{50}$(g/L) | SGC7901 | 0.244 | 0.432 | 0.149 | 0.196 | 0.102 |
| | SGC7901/DDP | 0.279 | 0.421 | 0.157 | 0.210 | 0.096 |
| RI | | 1.1 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.9 |
| 1 mo $IC_{50}$(g/L) | SGC7901 | 0.265 | 0.551 | 0.163 | 0.091 | 0.213 |
| | SGC7901/DDP | 0.564 | 0.954 | 0.213 | 0.098 | 0.256 |
| RI | | 2.1 | 1.7 | 1.3 | 1.1 | 1.2 |
| 2 mo $IC_{50}$(gL) | SGC7901 | 0.255 | 0.562 | 0.143 | 0.101 | 0.250 |
| | SGC7901/DDP | 1.356 | 1.151 | 0.421 | 0.133 | 0.621 |
| RI | | 5.3 | 2.0 | 2.9 | 1.3 | 2.5 |
| 3 mo $IC_{50}$(g/L) | SGC7901 | 0.199 | 0.466 | 0.244 | 0.221 | 0.332 |
| | SGC7901/DDP | 2.521 | 1.596 | 0.658 | 0.253 | 0.724 |
| RI | | 12.6 | 3.4 | 2.7 | 1.1 | 2.2 |
| 4 mo $IC_{50}$(g/L) | SGC7901 | 0.231 | 0.324 | 0.196 | 0.354 | 0.168 |
| | SGC7901/DDP | 2.986 | 1.624 | 0.965 | 0.413 | 0.814 |
| RI | | 12.9 | 5.0 | 4.9 | 1.2 | 4.8 |

**■同行评价**
本实验研究发现化疗药物(顺铂)的耐药特征, 对于指导临床用药、发现耐药菌株有一定的临床意义.

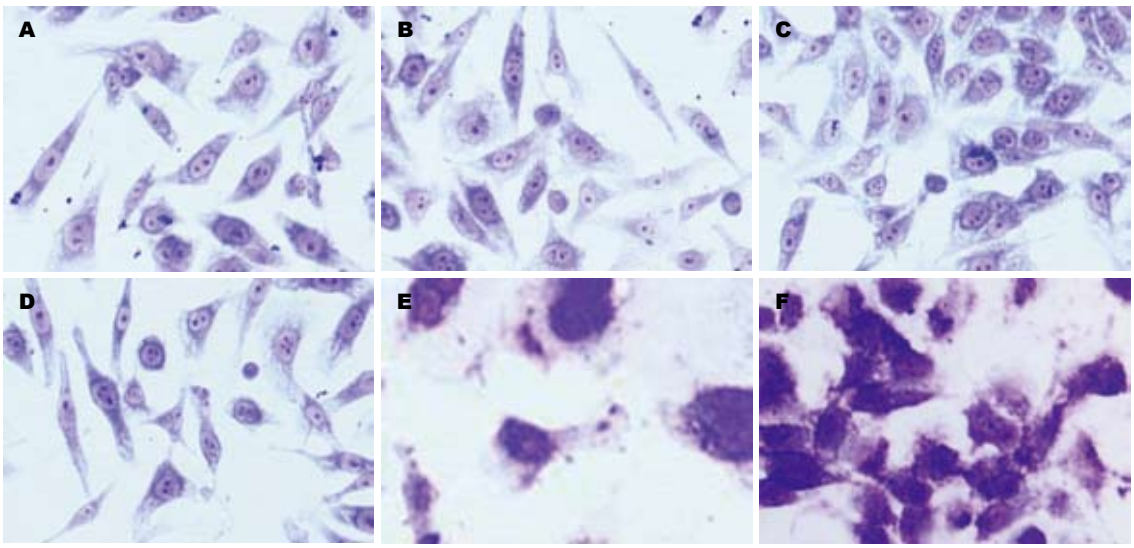



图 1 SGC7901与SGC7901/DDP细胞形态变化(Wright × 400). A: 对照组; B: 1 mo; C: 2 mo; D: 3 mo; E-F: 4 mo.

SGC7901/DDP细胞均呈单层排列, 细胞大小不一, 为多角形; SGC7901细胞边界清楚, 核大, 圆形或椭圆形; SGC7901/DDP细胞随着药物剂量的逐渐加大, 时间逐渐延长, 与加药4 mo出现边界不清, 体积略增大, 核不规则, 出现巨细胞(图1). 透射电镜下, 顺铂加入药物1 mo后SGC7901与SGC7901/DDP细胞微绒毛依然丰富, 顺铂加入药物2 mo后SGC7901与SGC7901/DDP线粒体数目没有差别, 顺铂加入3 mo后SGC7901与SGC7901/DDP糖原减少, 顺铂加入药物4 mo后SGC7901与SGC7901/DDP线粒体数目减少, 可见到假性包涵体.

2.3 细胞生长曲线和群体倍增时间 SGC7901细胞与SGC7901/DDP细胞的增殖速度不同, 两者的群体倍增时间1 mo为57.36和53.76 h; 2 mo为44.88和56.16 h; 3 mo为47.04和68.88 h; 4 mo为54.48和77.52 h; 耐药细胞较亲代细胞在相同的时间条件下分别延长了3.36, 11.28, 21.84和23.04 h, 可以发现细胞的群体倍增时间是逐渐延长的(图2).

2.4 细胞周期分布 SGC7901细胞经过DDP诱导后细胞对数生长期的增殖速度减慢, FCM显示SGC7901/DDP细胞周期发现$G_0/G_1$期细胞增多, S期, $G_2$/M期减少(表2).

## 3 讨论

肿瘤细胞产生耐药的机制是很多的. 在体外建

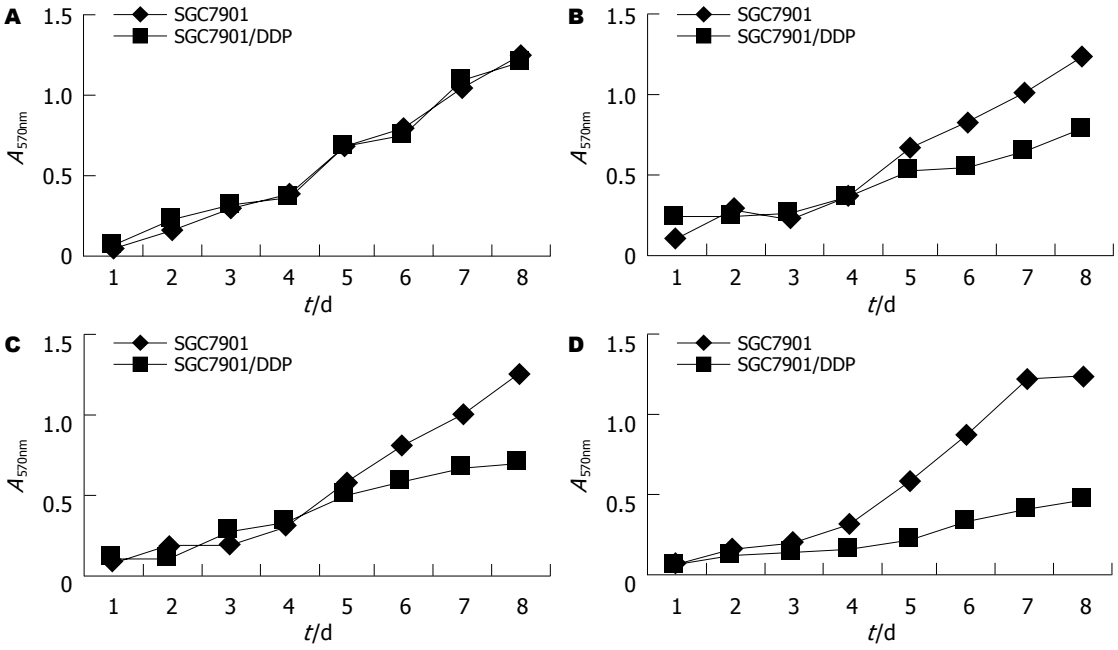



**图 2 SGC7901与SGC7901/DDP细胞生长曲线.** A: 1 mo; B: 2 mo; C: 3 mo; D: 4 mo.

立理想的细胞系仍是研究肿瘤耐药产生的生物学和细胞生物学变化的前提和基础. 目前国内外建立肿瘤MDR细胞系的方法通常是药物浓度递增持续法[5](stepwise continuous selection)和大剂量间歇诱导法[2](high dose intermittent selection). 研究表明, MDR产生是与癌细胞表面过剩表达一种P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)有关[8], P-gp, $M_r$ 1.7×10$^5$[6]. 他具有将抗癌药泵出细胞, 使细胞内药物浓度降低的功能. 最近发现多药耐药基因相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)[7]与非P-gp介导的MDR有关[8]. 引起耐药机制可能是P-gp和MRP的作用底物不同所造成. DDP的转运主要由MRP完成[9]. 尽管MRP基因的过度表达在胃癌的多药耐药机制中起非常重要的作用, 但不能解释全部多药耐药现象. 我们采用逐步递增顺铂浓度, 间歇作用体外诱导法, 历时4 mo建成人胃癌顺铂耐药细胞系SGC7901/DDP. 光镜下观察SGC7901/DDP细胞与其亲本SGC7901细胞存在差异, 体积略增大, 并且伴有巨细胞的形成, 巨细胞的出现表明细胞受到损伤和细胞分裂减少. 在肿瘤的超微结构中, 可以见到细胞核大畸形, 假性包涵体, 细胞表面微绒毛减少, 表明细胞代谢、分裂活动减弱. 通过绘制细胞生长曲线测定[10]群体倍增时间发现, 1, 2, 3, 4 mo耐药细胞较亲代细胞延长分别为3.36, 11.28, 21.84, 23.04 h. 关于肿瘤倍增时间与化疗疗效的关系, 目前认为肿瘤的倍增时间越短, 对化疗越敏感, 疗效越好; 反之, 肿瘤的倍增时间越长, 对化疗的敏感性就下降了. 此研究中SGC7901/DDP细胞的倍增时间延长, 则对化疗的敏感性下降, 治疗耐药胃癌就很棘手. 另外FCM显示SGC7901/DDP细胞周期发现$G_0/G_1$期细胞增多, S期和$G_2$/M期减少($P$<0.01), 也证实SGC7901/DDP细胞增殖速度减慢.

**表 2 SGC7901与SGC7901/DDP细胞的周期分布(%)**

| 细胞系 | $G_0/G_1$ | S | $G_2$/M |
|---|---|---|---|
| SGC7901 | 49.6 | 26.5 | 23.9 |
| SGC7901/DDP 1 mo | 50.2 | 25.3 | 22.1 |
| SGC7901/DDP 2 mo | 52.7 | 25.4 | 20.8 |
| SGC7901/DDP 3 mo[b] | 59.6 | 24.9 | 14.6 |
| SGC7901/DDP 4 mo[b] | 61.5 | 24.7 | 13.8 |

[b]$P$<0.01 *vs* SGC7901.

体外建立的耐药细胞对DDP的相对耐受度较亲代细胞1, 2, 3, 4 mo分别提高的指数是2.13, 5.32, 12.60, 12.93. 表明SGC7901细胞耐药的产生是逐渐发生的, 一般是持续作用3 mo就已经使细胞耐药了, 但是为了使细胞的耐药性能稳定下来, 就应该在持续1 mo加入较大的剂量的药物, 使细胞总是处于一个较大的剂量的药物环境中, 耐药性能方可以稳定下来. SGC7901/DDP细胞脱离DDP作用后2 mo后其对DDP的耐药指数有所下降, 但是仍然保持在65%以上, 表现出较为稳定的耐药性, SGC7901/DDP细胞冻存后复苏后仍然可以稳定生长、增殖. 同时该

细胞系不仅对DDP产生耐药, 而且对从未接触的5-FU, MMC, VCR, ADM等多种抗癌药物也产生了耐药性, Snow *et al*[11]认为耐药指数小于5是低度耐药, 耐药指数5-15是中度耐药, 耐药指数大于15是高度耐药. 按照此标准, SGC7901/DDP细胞DDP, MMC, 5-FU, ADM属于中度耐药, 对VCR属于低度耐药, 说明SGC7901/DDP细胞系耐药性能稳定, 是研究DDP的耐药机制以及为筛选逆转剂建立理想的耐药细胞模型.

总之, 实验中细胞生长曲线、MTT药物敏感性实验、电镜、细胞周期等检测方法是逐渐改变的, 其中MTT药物敏感性实验和电镜与其他的检测相比可以较早地反映出细胞耐药的特征, 但由于电镜成本较高, 建立耐药细胞系的过程中MTT药物敏感性实验仍然是首选的检测方法.

## 4 参考文献


1 Hong L, Zhao Y, Wang J, Han Y, Guo W, Jin H, Zhai H, Bai F, Zhang X, Qiao T, Chen Z, Fan D. Reversal of Multidrug Resistance of Adriamycin-resistant Gastric Adenocarcinoma Cells Through the Up-regulation of DARPP-32. *Dig Dis Sci* 2007

2 Kwak MK, Lee HJ, Hur K, Park DJ, Lee HS, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Guilford P, Yang HK. Expression of Kruppel-like factor 5 in human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007

3 Jie Liang, Yanglin Pan, Dexin Zhang, Changcun Guo, Yongquan Shi, Jingbo Wang, Yu Chen, Xin Wang, Jie Liu, Xuegang Guo, Zheng Chen, Taidong Qiao, Daiming Fan. Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. *The FASEB Journal* 2007; 21: 2247-2256

4 韩锐. 肿瘤化学预防及药物治疗. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1991: 315-320

5 Giovanni Carlo Cesana, Fabrizio Romano, Gaia Piacentini, Marco Scotti, Ambrogio Brenna, Giorgio Bovo, Massimo Vaghi, Giacomo Aletti, Roberto Caprotti, Howard Kaufman, Franco Uggeri. Low-dose Interleukin-2 Administered Pre-operatively to Patients with Gastric Cancer Activates Peripheral and Peritumoral Lymphocytes But Does Not Affect Prognosis. *Annals of Surgical Oncology* 2007; 14: 1295-1304

6 Gouaze V, Yu JY, Bleicher RJ, Han TY, Liu YY, Wang H, Gottesman MM, Bitterman A, Giuliano AE, Cabot MC. Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 633-639

7 Hao Z, Li X, Qiao T, Du R, Hong L, Fan D. CIAPIN1 confers multidrug resistance by upregulating the expression of MDR-1 and MRP-1 in gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 261-266

8 Xia S, Yu SY, Yuan XL, Xu SP. Effects of hypoxia on expression of P-glycoprotein and multidrug resistance protein in human lung adenocarcinoma A549 cell line. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004; 84: 663-666

9 Chung YM, Yoo YD, Park JK, Kim YT, Kim HJ. Increased expression of peroxiredoxin II confers resistance to cisplatin. *Anticancer Res* 2001; 21: 1129-1133

10 Han Y, Bu LM, Ji X, Liu CY, Wang ZH. Modulation of multidrug resistance by andrographolid in a HCT-8/5-FU multidrug-resistant colorectal cancer cell line. *Chin J Dig Dis* 2005; 6: 82-86

11 Snow K, Judd W. Characterisation of adriamycin- and amsacrine-resistant human leukaemic T cell lines. *Br J Cancer* 1991; 63: 17-28


电编 张敏 编辑 程剑侠

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

**本刊讯** 为推动期刊出版事业的繁荣和发展, 中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作. 此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊, 其中, 社科期刊110种、科技期刊86种. 评估结果如下: 一级(优秀)期刊共88种, 其中社科期刊42种, 科技期刊46种, 包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志; 二级期刊共103种, 其中社科期刊64种, 科技期刊39种; 三级期刊共5种, 其中社科期刊4种, 科技期刊1种. (中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅 2007-01-30)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2014-2020
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

# 巨噬细胞金属弹力酶对小鼠原位结肠癌生长及COX-2表达的影响

石 海, 许建明, 胡乃中, 梅 俏, 鲍峻峻

■背景资料
结肠癌是最为常见的消化道恶性肿瘤之一, 易于发生肝转移, 预后差, 迄今尚无令人满意的生物学治疗措施. 在绝大多数实体肿瘤中有聚集浸润的巨噬细胞, 这类细胞可以特异性地表达巨噬细胞金属弹力酶(MME), 是巨噬细胞穿透基底膜和浸润肿瘤组织必不可少的一种活性产物. 近年来的研究显示, 与其他MMPs不同, MME具有独特的抗肿瘤生长转移的作用. 在所有的MMPs中, MME诱导生成血管抑素(angiostatin)的能力最强. MME在肿瘤浸润性巨噬细胞抗肿瘤血管生成活性中具有重要作用, 值得进一步研究其独特的抗肿瘤效应及机制.

石海, 许建明, 胡乃中, 梅俏, 鲍峻峻, 安徽医科大学第一附属医院消化内科 安徽省合肥市 230022
石海, 副教授, 医学博士, 主要从事胃肠道肿瘤的基础与临床研究.
**通讯作者**: 许建明, 230022, 安徽省合肥市, 安徽医科大学第一附属医院消化内科. xjm1017@yahoo.com.cn
电话: 0551-2922039
收稿日期: 2007-03-13 接受日期: 2007-04-13

## Effects of mouse macrophage metalloelastase on growth and cyclooxygenase-2 expression of murine orthotopic colon cancer

Hai Shi, Jian-Ming Xu, Nai-Zhong Hu, Qiao Mei, Jun-Jun Bao

Hai Shi, Jian-Ming Xu, Nai-Zhong Hu, Qiao Mei, Jun-Jun Bao, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China
Correspondence to: Jian-Ming Xu, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China. xjm1017@yahoo.com.cn
Received: 2007-03-13 Accepted: 2007-04-13

## Abstract

**AIM:** To determine correlations between macrophage metalloelastase (MME), microvessel angiogenesis and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the angiogenesis of colon cancer.

**METHODS:** A cDNA fragment coding for domains Ⅰ and Ⅱ of MME was transfected into MME deficient murine CT-26 colon cancer cells. The enzymatic activity of recombinant MME was confirmed by cleavage of native substrate *in vitro*. An orthotopic implantation model was established using MME-transfected and control cells. Tumor samples were subjected to Western blot to detect expressions of MME and COX-2. Microvessel counting was used to assess angiogenesis of murine colon tumors.

**RESULTS:** Primary tumors with volumes and microvessel formation carrying pcDNA3.1-transfected and nontransfected cells were larger than that in the group implanted with MME-transfected (1151.07 ± 35.91 $mm^3$ and 1201.13 ± 42.15 $mm^3$ *vs* 384.83 ± 4.76 $mm^3$, $P < 0.001$; 21.87 ± 0.47 and 22.56 ± 0.71 *vs* 8.48 ± 0.53, $P < 0.001$, respectively). The expression of COX-2 protein was significantly lower in the MME-transfected group than that in the controls by Western blot analysis (2.766 ± 1.22 *vs* 5.77 ± 1.08 and 5.84 ± 0.95, $P < 0.01$, respectively).

**CONCLUSION:** The MME gene when transfected into murine colon cancer cells can effectively suppress the growth of orthotopic tumors by inhibiting vascularity and COX-2 expression.

Key Words: Mouse macrophage metalloelastase; Gene cloning; Colon cancer; Cyclooxygenase-2; Animal model

Shi H, Xu JM, Hu NZ, Mei Q, Bao JJ. Effects of mouse macrophage metalloelastase on growth and cyclooxygenase-2 expression of murine orthotopic colon cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2014-2020

## 摘要

**目的**: 探讨巨噬细胞金属弹力酶(MME)对小鼠原位结肠癌生长、微血管生成及环氧合酶-2(COX-2)表达的影响.

**方法**: 扩增编码MME基因结构域Ⅰ和Ⅱ的cDNA片段, 构建真核细胞表达载体pcDNA3.1-MME并转染小鼠CT-26结肠癌细胞. 建立MME转染组及对照组小鼠原位结肠癌种植模型, 观察重组MME对结肠癌生长的影响, 采用Western blot方法检测肿瘤组织中的COX-2表达和微血管密度(MVD).

**结果**: 4 wk后, 小鼠原位结肠癌的平均体积和微血管密度, 空质粒转染组小鼠和未转染组显著高于MME转染组(1151.07±35.91 $mm^3$, 1201.13±42.15 $mm^3$ *vs* 384.83±4.76 $mm^3$, $P<0.001$; 21.87±0.47, 22.56±0.71 *vs* 8.48±

0.53, $P$<0.001). COX-2蛋白水平在MME转染组中均显著低于对照组(2.766±1.22 *vs* 5.77±1.08, 5.84±0.95, $P$<0.01).

**结论:** 转染入小鼠结肠癌细胞的MME基因通过抑制新生血管的生成和COX-2表达, 从而起到抑制原位结肠癌生长的作用.

**关键词: 巨噬细胞金属弹力酶; 基因克隆; 结肠癌; 环氧合酶-2; 动物模型**

石海, 许建明, 胡乃中, 梅俏, 鲍峻峻. 巨噬细胞金属弹力酶对小鼠原位结肠癌生长及COX-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2014-2020
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2014.asp

## 0 引言

巨噬细胞金属弹力酶(macrophage metalloelastase, MME)是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)家族成员之一, 也称MMP-12. 与其他MMPs成员不同, MME可以分解纤溶酶原, 产生具有抑制血管内皮细胞增殖作用的血管抑素(angiostatin), 进而抑制体内肿瘤细胞的生长, 在抗肿瘤血管生成中具有重要作用[1-6]. 国外研究发现, MME可抑制结肠癌生长, 并与结肠癌的临床病理特征关系密切[7-8]. 然而, 尚未见到在结肠原位移植瘤中探讨MME抗肿瘤活性的报道. 环氧合酶是催化花生四烯酸转化为前列腺素的限速酶, 可分成在许多正常组织中恒定表达的原生性COX-1和在炎症组织中增强表达的诱生性COX-2. 特异性COX-2抑制剂的抑制肿瘤效果更优于非选择性非甾体抗炎药, 提示COX-2与消化肿瘤的发生、发展密切相关[9-10]. 因而, COX-2蛋白表达状况与胃肠道肿瘤的关系备受关注. 为了探讨MME在结肠原位移植瘤生长和微血管生成过程中所起的作用, 以及与COX-2表达的关系, 我们选择无MME基因表达的小鼠CT-26结肠癌细胞作为研究对象[7], 将MME基因转染CT-26细胞, 建立结肠癌小鼠原位移植模型, 以期探讨MME的抗肿瘤活性及其作用机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 pUC9-MME全长cDNA及pcDNA3.1(+)质粒由美国俄亥俄州辛辛那提大学医学院董钟云博士惠赠; XL1-blue、DH5α菌株及CT-26结肠癌细胞株由安徽医科大学病原微生物教研室提供; pGEM-T载体、$T_4$DNA连接酶、TaqDNA聚合酶、DNA纯化试剂盒、*Bam*HⅠ内切酶、*Xba*Ⅰ内切酶均购自Promega公司; 引物合成及G418由上海生工生物工程技术服务有限公司提供; DMEM培养基购自Gibco公司; 6周龄♀BALB/C小鼠80只购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[动物合格证号: SCXK(沪)2003-0002]; MMP-12羊抗鼠多克隆抗体、COX-2羊抗鼠多克隆抗体及羊抗鼠CD34多克隆抗体均购自Santa Cruz公司; 免疫组化SP试剂盒购自福州迈新公司.

1.2 方法 构建及鉴定pcDNA3.1-MME重组质粒的具体方法参见以前的研究报道[11].

1.2.1 细胞培养与转染 CT-26细胞用含100 mL/L胎牛血清的DMEM及抗生素在37℃、50 mL/L $CO_2$条件下培养. 将指数生长期CT-26细胞($5\times10^5$)于转染前1 d接种于6孔培养板中, 以含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养. 采用磷酸钙共沉淀法转染细胞[12]. 转染后再用含800 mg/L G418的选择性培养基进行稳定转染克隆的筛选, 挑取单个稳定转染克隆于含200 mg/L G418的培养基中继续培养, 用于下一步实验.

1.2.2 免疫细胞化学染色 采用SP法. 让细胞爬于盖玻片上生长过夜, 取出爬有CT-26细胞的盖玻片, 用预冷的PBS冲洗3次, 再用冰预冷的丙酮固定10 min, 置-20℃保存, 用于免疫细胞化学染色. 1∶100稀释MMP-12羊抗鼠多克隆抗体, 免疫细胞化学染色步骤按SP法试剂盒操作说明书进行, DAB显色(棕黄色). CT-26细胞质呈明显的棕黄色判定为MME阳性表达.

1.2.3 CT-26细胞裂解上清和原位结肠癌组织中COX-2表达的Western blot分析 实验细胞分为3组, 分别为MME转染组和对照组(空质粒转染组及未转染组). 各组培养的CT-26细胞于检测前48 h换用不含胎牛血清的DMEM培养, 留取细胞裂解上清. 取大约-80℃冻存的结肠癌组织200 mg, 剪碎后置于1 mL冰预冷的TBS缓冲液中融化, 然后匀浆5 min, 4℃ 14 000 r/min离心20 min, 留取上清. 将含有大约40 μg总蛋白的各组样品与等体积的2×SDS-PAGE上样缓冲液混合, 煮沸5 min. Western blot按常规方法进行[1], DAB显色, 标准分子量蛋白用氨基黑10B染色.

1.2.4 重组蛋白酶活性鉴定 首先, 采用超声波破碎细胞法, 分别裂解转染及非转染的3组细胞, 再与不含变性剂的上样缓冲液混合, 不煮沸. 再采用明胶酶谱法[1]进行酶活性鉴定.

1.2.5 原位移植结肠癌模型建立 用1.25 g/L胰蛋白酶溶液收获处于指数生长期的转染及非转染

**■研发前沿**

MME在疾病发展过程中的作用还处于探索研究阶段. 虽然对于MME的研究报道已不少, 但MME对肿瘤生长、转移及预后意义的研究结果还存在分歧, 仍有待于大量的基础实验研究加以论证, 还需要更深入地研究MME在肿瘤等疾病中的确切作用机制(可能不止一种作用机制). 因此, 通过对MME在多种疾病中作用机制的进一步深入研究, 可以预期不久的将来MME可能成为治疗包括肿瘤在内的多种疾病的靶分子, 为进一步开展基因治疗打下理论基础.

**■创新盘点**
虽然国外有研究发现MME表达与结肠癌细胞生长转移呈负相关, MME可以通过产生血管抑素的作用机制而抑制结肠癌生长, 然而, 迄今尚未见到有关巨噬细胞特异性MME原位种植肿瘤模型建立的报道, 也未见有关MME对原位移植肿瘤生长影响及与肿瘤模型中COX-2表达关系的文献报道.

CT-26细胞, 吹打成单细胞悬液, 用Hank's平衡盐溶液(HBSS)洗涤并重悬. 用台盼蓝(trypan blue)清除试验鉴定, 具有90%以上活力的单细胞悬液用于下一步实验. 对照组(各15只)及MME转染组小鼠(15只)用30 mg/kg戊巴比妥钠ip麻醉, 固定后在下腹中线做一切口, 暴露盲肠. 将CT-26细胞($1\times10^9$/L HBSS)注射到盲肠穹窿部肠壁内, 950 mL/L乙醇轻擦注射部位, 关闭切口. 4 wk后处死或随时处死濒死的荷瘤小鼠, 留取肿瘤标本. 濒死小鼠的标本仍计为有效标本. 原发肿瘤体积用公式(宽度$^2\times$长度)/2计算, 同时称瘤体重量. 瘤组织常规石蜡包埋, 另外一部分在液氮中速冻后, -80℃保存, 留做Western blot检测, 方法见上.

1.2.6 免疫组织化学染色检测MVD、MME和COX-2表达 采用SP法. 羊抗鼠CD34多克隆抗体稀释150倍, 羊抗鼠MME多克隆抗体稀释100倍, 羊抗鼠COX-2多克隆抗体稀释100倍. 免疫组化步骤按SP法试剂盒操作说明书进行, DAB显色(棕黄色). MVD计数按文献[13]报道进行.

**统计学处理** 肿瘤体积和MVD值采用*t*检验, 数据以mean±SD表示; 分类变量统计采用$\chi^2$检验. 所有统计分析均在SPSS12.0统计软件上完成.

## 2 结果

2.1 真核表达载体的构建及鉴定 PCR扩增产生一编码MME结构域Ⅰ和Ⅱ的840 bp的cDNA片段. 该片段与载体pGEM-T连接后, 经DNA序列分析, 与GenBank中小鼠MME cDNA序列完全一致. pGEM-T-MME及pcDNA3.1-MME的*Bam*HⅠ和*Xba*Ⅰ双酶切鉴定结果见图1.

2.2 稳定转染的小鼠CT-26结肠癌细胞中MME表达的鉴定 pcDNA3.1(+)-MME转染CT-26细胞的免疫细胞化学染色呈阳性反应, 细胞胞质呈棕黄色(图2).

2.3 重组MME蛋白酶活性鉴定 pcDNA3.1-MME转染的CT-26细胞裂解后, 经明胶酶谱电泳, 可以清楚地看见一条大小约22 ku的明胶分解透亮条带(图3), 与成熟的有酶活性的MME分子量大小一致(结构域Ⅱ).

2.4 MME对小鼠原位结肠癌生长的影响 采用细胞悬液进行结肠癌模型的建立, 共造模67只, 22只未见明显肿瘤生长, 成瘤率为67.16%(45/67). 未转染组小鼠7/15(46.7%)于种植后4 wk内因衰竭而濒死, 空载体转染组小鼠有9/15(60.0%)于种植后4 wk内因衰竭而濒死, 而MME转染组小鼠仅有4/15(26.7%)濒死. MME转染组结肠癌平均瘤重为2.35±0.24 g, 空质粒转染组及未转染组平均瘤重分别为8.08±0.79 g和8.76±0.92 g ($P$<0.01). pcDNA3.1空质粒转染组瘤体大小平均为1151.07±35.91 mm$^3$; 未转染组瘤体大小平均为1201.13±42.15 mm$^3$; pcDNA3.1-MME转染组瘤体大小平均为384.83±4.76 mm$^3$. MME转染组结肠癌体积明显小于空质粒转染组及未转染组($P$<0.001), 而两对照组之间差异无显著性($P$ = 0.374). MME转染组结肠癌平均体积明显小于空

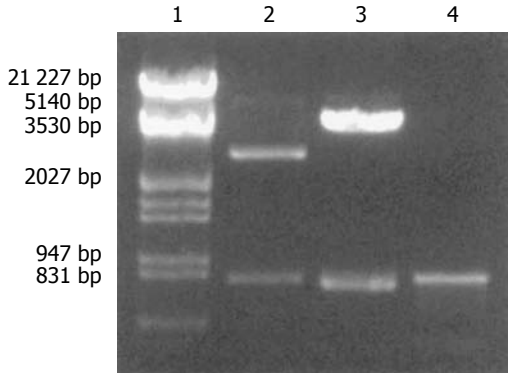



**图 1 真核表达载体pcDNA3.1-MME的PCR鉴定和双酶切鉴定结果**. 1: Lambda DNA/*Eco*RⅠ+*Hin*dⅢ digest marker; 2: *Bam*HⅠ和*Xba*Ⅰ双酶切pGEM-T-MME的产物(大约分别为3.0 kb和830 bp); 3: *Bam*HⅠ和*Xba*Ⅰ双酶切pcDNA3.1-MME的产物(大约分别为5.4 kb和830 bp); 4: pcDNA3.1-MME的PCR鉴定产物.

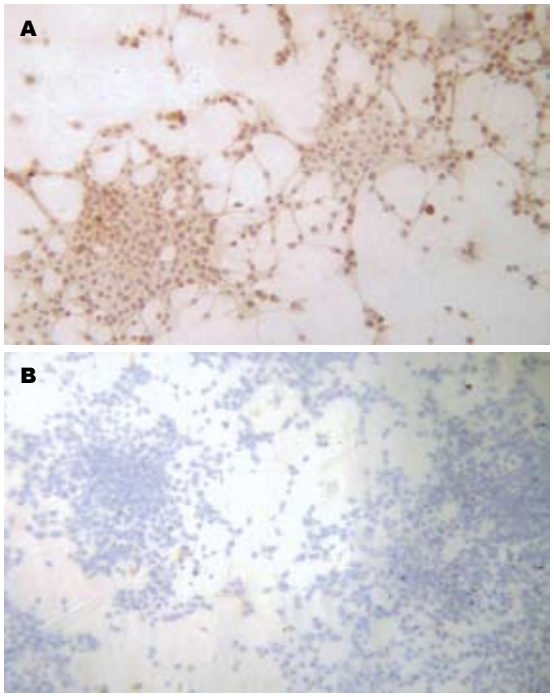



**图 2 各组CT-26细胞的免疫细胞化学染色(×200)**. A: pcDNA3.1-MME稳定转染细胞; B: 未转染组CT-26细胞.

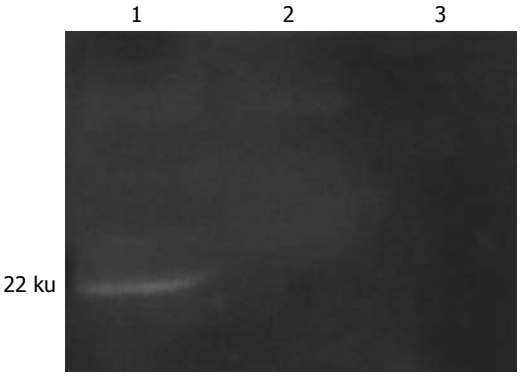



**图 3 明胶酶谱电泳.** 1: pcDNA3.1-MME稳定转染细胞; 2: pcDNA3.1空质粒转染细胞; 3: 未转染细胞. 每孔上样40 μg总蛋白.

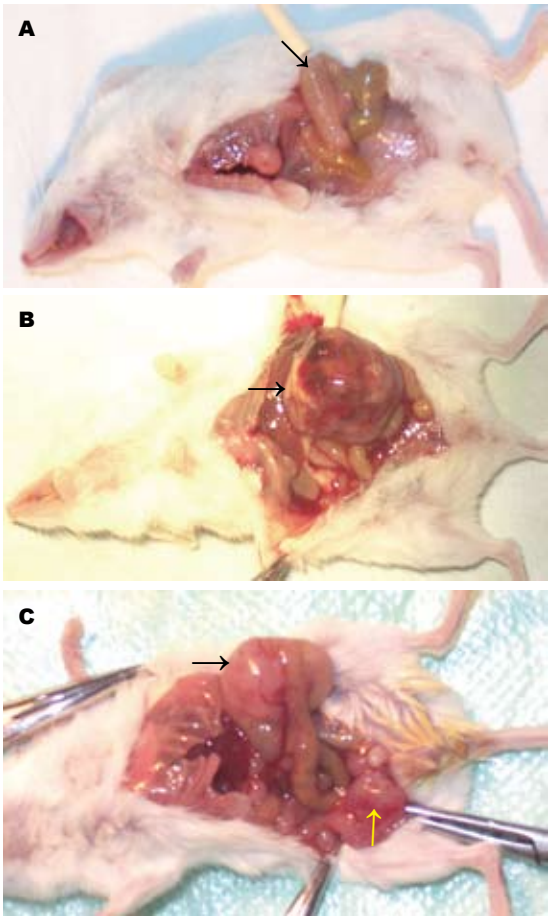



**图 4 MME抑制小鼠结肠原位种植肿瘤的生长.** A: MME转染组; B: pcDNA3.1空质粒转染组; C: 未转染组; 黑箭头指示为原发肿瘤灶, 黄箭头指示为肿瘤腹膜转移灶.

质粒转染组及未转染组($P$<0.001), 而两对照组之间差异无显著性($P$ = 0.374, 图4).

2.5 MME对原位结肠癌组织中MVD的影响 MME转染组MVD值(8.48±0.53)明显低于pcDNA3.1空质粒转染组(21.87±0.47)和未转染组(22.56±0.71) ($P$<0.001). 两对照组之间相比差异

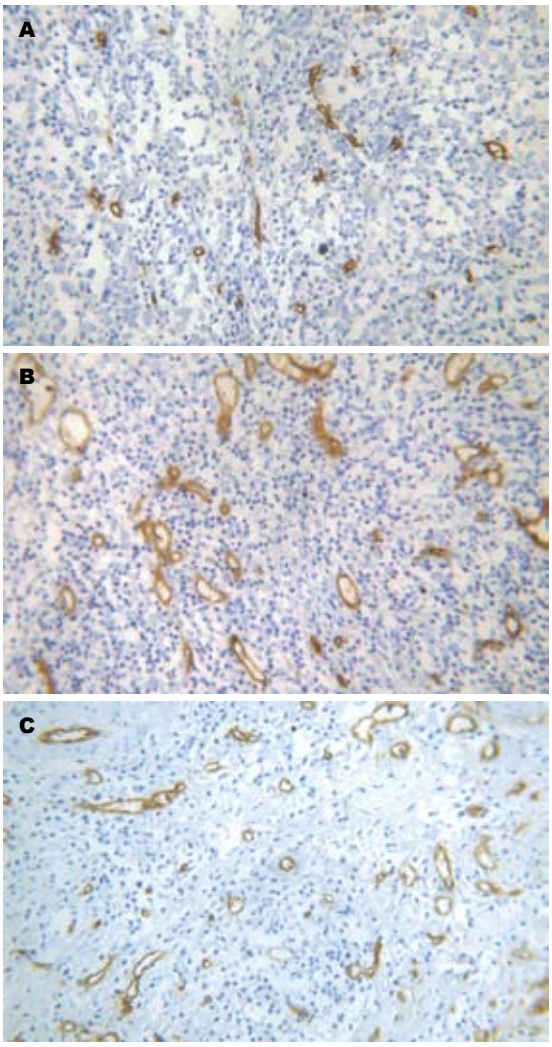



**图 5 三组原位结肠癌组织中MVD计数结果比较(SP法 × 200).** A: MME转染组; B: 空质粒转染组; C: 未转染组.

无显著性($P$ = 0.423). MME转染组MVD值明显低于对照组($P$<0.001), 两对照组之间相比差异无显著性($P$ = 0.423, 图5). MME转染组肿瘤组织中, 棕黄色染色见于大片肿瘤细胞胞质中; 空载体转染组和未转染组肿瘤基质中可见MME蛋白表达, 而肿瘤细胞中未见棕黄色染色. 3组肿瘤组织中COX-2的免疫组化染色结果见图6.

2.6 MME对COX-2表达的影响 对CT-26细胞裂解上清和肿瘤组织进行Western blot检测发现, 3组均可见一条分子量大约为72 ku的免疫印迹条带. 计算机图像分析软件测定MME转染组细胞培养上清条带的平均密度为2.54±0.64, 而空载体转染组和未转染组COX-2条带的平均密度分别为5.77±1.08和5.84±0.95; MME转染组肿瘤组织中条带的平均密度为2.76±0.66, 而空载体转染组和未转染组COX-2条带的平均密度分别为7.31±1.22和6.42±1.03($P$<0.01, 图7).

**■应用要点**

本研究显示MME具有抑制原位结肠癌生长转移的作用, 并且在小鼠原位结肠癌模型中探讨了MME与COX-2表达的关系, 证实MME可能具有抑制COX-2表达的作用, MME和COX-2都与结肠癌血管生成密切相关, 为阻断肿瘤血管生成的靶向基因治疗提供了实验依据.

**■同行评价**
本文通过构建真核细胞表达载体pcDNA3.1-MME, 并把鼠结肠癌细胞的MME基因转入小鼠CT-26结肠癌细胞系, 探讨了MME基因对新生血管生成的抑制作用, 为阻断肿瘤血管生成的靶向基因治疗提供了实验依据.

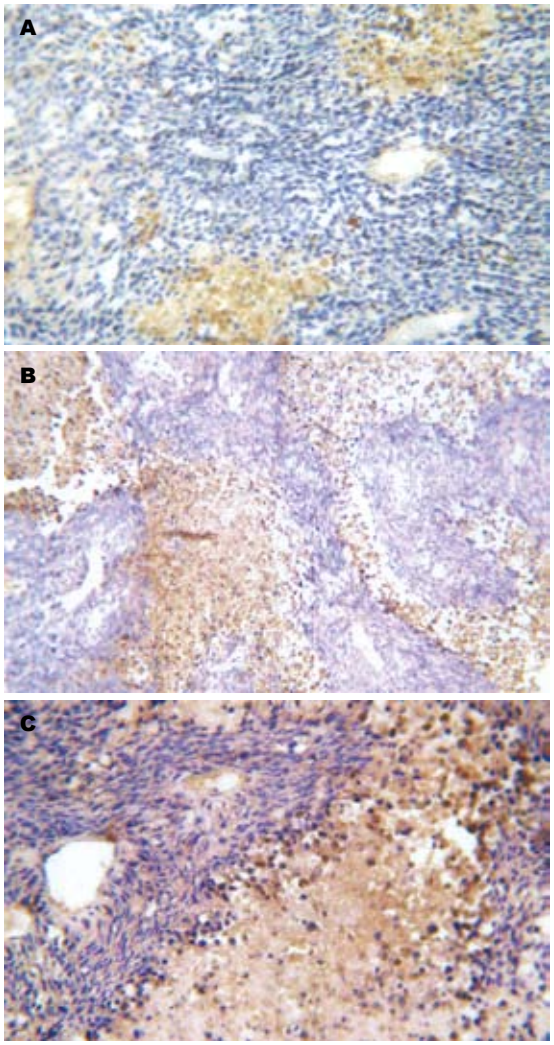



**图 6 三组原位结肠癌组织中COX-2的免疫组化染色结果(SP × 200).** A: MME转染组; B: pcDNA3.1空质粒转染组; C: 未转染组.

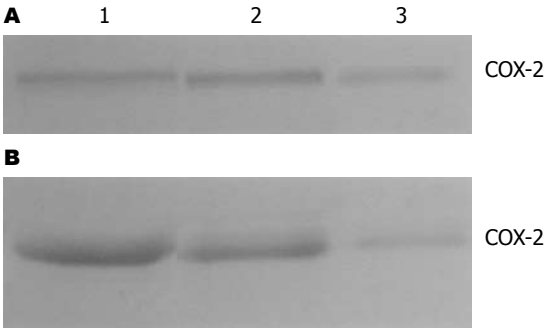



**图 7 Western blot检测CT-26细胞裂解上清和原位结肠癌组织中COX-2的表达.** A: CT-26细胞裂解上清中COX-2的表达: 1: 空载体转染组; 2: 未转染组; 3: MME转染组; B: 原位结肠癌组织中COX-2的表达: 1: 空载体转染组; 2: 未转染组; 3: MME转染组. 每孔上样40 μg总蛋白.

## 3 讨论

实质性肿瘤的生长和转移离不开丰富的血管网提供营养成分, 而肿瘤中的血管生成是受内源性血管生成刺激物(例如VEGF等)和内源性血管生成抑制物(例如血管抑素、内皮抑素等)双重调控的, 他们之间的平衡决定了肿瘤内血管生成的状况[14-16], 近些年抗肿瘤血管生成研究成为抗肿瘤研究的热点之一. 与MMPs其他家族成员的促进肿瘤浸润和转移作用不同, MMP-12(MME)具有很强的分解纤溶酶原而产生血管抑素(angiostatin)的作用, 这种作用在Lewis肺癌小鼠皮下移植模型及体外实验中都得到证实[1-2]. 另外, 肿瘤细胞分泌的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)可以引起巨噬细胞大量分泌MME, 从而产生更多的血管抑素, 抑制肿瘤生长和转移[17-18]. 目前, 对于MMP-12的研究逐渐增多, 但研究显示, 他在不同部位肿瘤及不同疾病的发展过程中扮演不同的角色[19-27]. 在研究人巨噬细胞金属弹力酶(human macrophage metalloelastase, HME)生物学作用中发现, 肝细胞癌患者HME的表达与肝癌组织中血管抑素的产生和肿瘤血管网的丰富程度密切相关[28]. HME过表达结肠癌患者其肿瘤浸润深度、淋巴管及血管浸润程度均好于HME阴性表达者[8]. 以上这些研究都证实MME通过产生血管抑素而在抗肿瘤和抗血管生成方面起着重要作用. 然而, 尚未见有关MME对原位移植肿瘤生长影响及与肿瘤模型中COX-2表达关系的文献报道. 因而本研究对深入研究MME在结肠癌生长、转移过程中的生物学作用及机制具有重要意义.

在本项研究中, 我们首先成功构建了真核细胞表达载体pcDNA3.1-MME, 证实这种真核表达载体可稳定转染至小鼠CT-26细胞, 其成熟的重组MME蛋白(结构域Ⅱ)具有酶活性. 在随后进行的小鼠原位结肠癌动物研究发现, 高水平表达的MME具有明显的抑制原位结肠癌生长的作用, 同时, MME表达与结肠癌组织中MVD值密切相关. 本研究的结果进一步证实了, MME具有重要的抗肿瘤血管生成作用, 这可能是通过分解循环血液中的纤溶酶原, 生成血管抑素, 从而抑制了肿瘤血管内皮细胞增殖而起作用的. 这些研究结果与国外报道的小鼠黑素瘤皮下移植模型研究[29]和小鼠结肠癌皮下移植模型研究[7]的结果相似. 但本项研究在结肠原位移植瘤模型中探讨了MME的抗肿瘤作用. 与皮下移植瘤模型研究比较, 结肠原位种植肿瘤模型的实验结果可以从“土壤”和“种子”学说的角度, 更清晰地探讨MME抑制结肠癌生长转移的体内

作用机制.

肿瘤组织中平均微血管密度(MVD)是衡量肿瘤血管生成的重要指标, 在目前难以测定血管抑素的情况下, 检测肿瘤MVD值, 可以间接反映MME的作用机制. COX-2与肿瘤血管生成密切相关, COX-2作为一种刺激因子在肿瘤发生中能促进肿瘤血管生长, 为肿瘤生长和转移提供必需的营养[30-31]. 本项研究发现, 在MME转染组中, 不仅原位结肠癌组织中MVD明显降低, 而且COX-2的表达亦明显下降, 提示MME也可能具有调节COX-2表达和生成的作用, 其作用机制尚待进一步探讨. 总之, 我们研究显示, MME和COX-2与结肠癌血管生成密切相关, 为阻断肿瘤血管生成的靶向基因治疗提供了实验依据.

## 4 参考文献


1 Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997; 88: 801-810

2 Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 1998; 161: 6845-6852

3 Gronski TJ Jr, Martin RL, Kobayashi DK, Walsh BC, Holman MC, Huber M, Van Wart HE, Shapiro SD. Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem* 1997; 272: 12189-12194

4 Janusz MJ, Hare M, Durham SL, Potempa J, McGraw W, Pike R, Travis J, Shapiro SD. Cartilage proteoglycan degradation by a mouse transformed macrophage cell line is mediated by macrophage metalloelastase. *Inflamm Res* 1999; 48: 280-288

5 Banerji A, Chakrabarti J, Mitra A, Chatterjee A. Effect of curcumin on gelatinase A (MMP-2) activity in B16F10 melanoma cells. *Cancer Lett* 2004; 211: 235-242

6 Saito T, Mizumoto H, Tanaka R, Satohisa S, Adachi K, Horie M, Kudo R. Overexpressed progesterone receptor form B inhibit invasive activity suppressing matrix metalloproteinases in endometrial carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004; 209: 237-243

7 Gorrin-Rivas MJ, Arii S, Mori A, Kaneda Y, Imamura M. Mouse macrophage metalloelastase gene delivery by HVJ-cationic liposomes in experimental antiangiogenic gene therapy for murine CT-26 colon cancer. *Int J Cancer* 2001; 93: 731-735

8 Yang W, Arii S, Gorrin-Rivas MJ, Mori A, Onodera H, Imamura M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer* 2001; 91: 1277-1283

9 Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* 2004; 215: 1-20

10 Perchick GB, Jabbour HN. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits cathepsin D-mediated cleavage of plasminogen to the potent antiangiogenic factor angiostatin. *Endocrinology* 2003; 144: 5322-5328

11 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Wang XL, Mei Q, Song YL. Transfection of mouse macrophage metalloelastase gene into murine CT-26 colon cancer cells suppresses orthotopic tumor growth, angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Lett* 2006; 233: 139-150

12 Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 596-601

13 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1421-1426

14 Gorrin-Rivas MJ, Arii S, Mori A, Takeda Y, Mizumoto M, Furutani M, Imamura M. Implications of human macrophage metalloelastase and vascular endothelial growth factor gene expression in angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2000; 231: 67-73

15 Maehara Y, Kabashima A, Koga T, Tokunaga E, Takeuchi H, Kakeji Y, Sugimachi K. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. *Surgery* 2000; 128: 408-416

16 Perrone G, Vincenzi B, Santini D, Verzi A, Tonini G, Vetrani A, Rabitti C. Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) and clinicopathological features in colon cancer. *Cancer Lett* 2004; 208: 227-234

17 Dong Z, Yoneda J, Kumar R, Fidler IJ. Angiostatin-mediated suppression of cancer metastases by primary neoplasms engineered to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1998; 188: 755-763

18 Kumar R, Dong Z, Fidler IJ. Differential regulation of metalloelastase activity in murine peritoneal macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1996; 157: 5104-5111

19 Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997; 277: 2002-2004

20 Valenca SS, de Souza da Fonseca A, da Hora K, Santos R, Porto LC. Lung morphometry and MMP-12 expression in rats treated with intraperitoneal nicotine. *Exp Toxicol Pathol* 2004; 55: 393-400

21 D'Alessio S, Fibbi G, Cinelli M, Guiducci S, Del Rosso A, Margheri F, Serrati S, Pucci M, Kahaleh B, Fan P, Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Matucci-Cerinic M, Del Rosso M. Matrix metalloproteinase 12-dependent cleavage of urokinase receptor in systemic sclerosis microvascular endothelial cells results in impaired angiogenesis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3275-3285

22 Prescott MF, Sawyer WK, Von Linden-Reed J, Jeune M, Chou M, Caplan SL, Jeng AY. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on progression of atherosclerosis and aneurysm in LDL receptor-deficient mice overexpressing MMP-3, MMP-12,

and MMP-13 and on restenosis in rats after balloon injury. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 179-190
23 Luttun A, Lutgens E, Manderveld A, Maris K, Collen D, Carmeliet P, Moons L. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* 2004; 109: 1408-1414
24 Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1998; 102: 1900-1910
25 Morgan AR, Rerkasem K, Gallagher PJ, Zhang B, Morris GE, Calder PC, Grimble RF, Eriksson P, McPheat WL, Shearman CP, Ye S. Differences in matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 transcript levels among carotid atherosclerotic plaques with different histopathological characteristics. *Stroke* 2004; 35: 1310-1315
26 Kaneko Y, Sakatsume M, Xie Y, Kuroda T, Igashima M, Narita I, Gejyo F. Macrophage metalloelastase as a major factor for glomerular injury in anti-glomerular basement membrane nephritis. *J Immunol* 2003; 170: 3377-3385
27 Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jeskanen L, Hasan T, Pierce R, Starcher B, Raudasoja R, Ranki A, Oikarinen A, Vaalamo M. Accumulation of matrilysin (MMP-7) and macrophage metalloelastase (MMP-12) in actinic damage. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 664-672
28 Gorrin Rivas MJ, Arii S, Furutani M, Harada T, Mizumoto M, Nishiyama H, Fujita J, Imamura M. Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: correlation with angiostatin generation and its clinical significance. *Hepatology* 1998; 28: 986-993
29 Gorrin-Rivas MJ, Arii S, Furutani M, Mizumoto M, Mori A, Hanaki K, Maeda M, Furuyama H, Kondo Y, Imamura M. Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1647-1654
30 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-716
31 Kang S, Kim YB, Kim MH, Yoon KS, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang D, Yoo KY, Kang SB, Lee HP. Polymorphism in the nuclear factor kappa-B binding promoter region of cyclooxygenase-2 is associated with an increased risk of bladder cancer. *Cancer Lett* 2005; 217: 11-16

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊, 《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘（Chemical Abstracts）》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘（EMBASE/Excerpta Medica）》, 俄罗斯《文摘杂志（Abstracts Journals）》收录.

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊.

《世界华人消化杂志》2007年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079，国内统一刊号 CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教研人员、各大图书馆订阅.联系地址: 100023, 北京市2345信箱. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2021-2025
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

# 组蛋白去乙酰酶抑制剂对结肠癌细胞增殖和ID4基因表达的影响

张 波, 陈剑英, 王国斌, 陈道达

张波, 陈剑英, 王国斌, 陈道达, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022
张波, 2003年华中科技大学附属协和医院医学博士, 主治医生, 主要从事结直肠癌和乳腺癌的分子标志物研究.
**通讯作者**: 张波, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科.
unionzhang@yahoo.com
电话: 027-85726494 传真: 027-85756343
收稿日期: 2007-03-30 接受日期: 2007-04-17

## Effects of histone deacetylase inhibitor on colon cancer cell growth and ID4 gene expression

Bo Zhang, Jian-Ying Chen, Guo-Bin Wang, Dao-Da Chen

Bo Zhang, Jian-Ying Chen, Guo-Bin Wang, Dao-Da Chen, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Bo Zhang, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, Hubei Province, China. unionzhang@yahoo.com
Received: 2007-03-30 Accepted: 2007-04-17

## Abstract

**AIM:** To investigate whether Trichostatin A (TSA) possesses anti-tumor activity against human colon cancer cells.

**METHODS:** The human colon cancer cell line Caco2 was treated with different concentrations of TSA, a potent and specific histone deacetylase inhibitor, for 0 to 5 d. The growth of Caco2 cells was observed by MTT assay before and after TSA treatment. The Caco2 cell cycle was analyzed by flow cytometry. The expression of ID4 mRNA was observed by reverse transcription-polymerase chain reaction.

**RESULTS:** Trichostatin A in a dose-dependent fashion significantly inhibited the proliferation of colon cancer cells at 100 μg/L ($P < 0.05$). The inhibition rate increased sharply from day 3 to 5 (57.3% to 70.2%). TSA treatment induced cell cycle arrest at the $G_1$ phase but did not increase apoptotic cell death as shown by flow cytometry. ID4 mRNA was expressed in Caco2 cells after 20 μg/L TSA treatment, but it was only weakly detectable before treatment.

**CONCLUSION:** Our results demonstrated that TSA inhibited colon cancer cell growth *in vitro*, possibly through $G_1$ cell cycle arrest and re-expression of the ID4 gene. This study suggested that TSA may be a potential therapeutic agent for the treatment of colon cancer.

Key Words: Histone deacetylase inhibitor; Colon cancer; ID4 gene

Zhang B, Chen JY, Wang GB, Chen DD. Effects of histone deacetylase inhibitor on colon cancer cell growth and ID4 gene expression. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2021-2025

## 摘要

**目的:** 研究组蛋白去乙酰酶抑制剂曲古菌素A (TSA)对结肠癌细胞Caco2增殖的影响和机制.

**方法:** 5-500 μg/L TSA处理结肠癌Caco2细胞0-5 d, 在药物处理前及36 h后用MTT法检测细胞增殖状况. 流式细胞仪检测细胞周期的改变. RT-PCR检测ID4 mRNA的表达.

**结果:** TSA在100 μg/L浓度以上可以明显抑制结肠癌Caco2细胞的增殖($P<0.05$), 但在5和20 μg/L浓度时抑制作用不明显. 100 μg/L TSA可导致细胞$G_1$期阻滞, 但没有诱导明显的细胞凋亡. RT-PCR显示20 μg/L TSA作用36 h后ID4 mRNA表达增强($P<0.05$), 在100 μg/L其表达显著增强($P<0.01$).

**结论:** TSA可以通过阻滞Caco2细胞的$G_1$期和重新表达ID4来发挥抑癌作用.

**关键词: 组蛋白去乙酰酶抑制剂; 结肠癌; ID4基因**

张波, 陈剑英, 王国斌, 陈道达. 组蛋白去乙酰酶抑制剂对结

**■背景资料**
遗传突变的累积是结直肠癌发病的主要机制, 但对散发型结直肠癌, 肿瘤抑制基因的表观遗传沉默也是肿瘤发生的关键机制. 组蛋白去乙酰酶抑制剂曲古菌素A可明显抑制结直肠癌Caco2细胞的增殖, 并诱导ID4基因的重新表达, 提示组蛋白修饰也是抑癌基因功能失活的重要机制. 这种可逆性的表观遗传修饰为结直肠癌的治疗提供了新的契机.

肠癌细胞增殖和ID4基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2021-2025
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2021.asp

■**创新盘点**
本文采用MTT法和RT-PCR方法研究了组蛋白去乙酰酶抑制剂对结肠癌细胞增殖和ID4基因表达的影响, 为结肠癌的诊断和治疗提供了新的途径.

## 0 引言

核小体中心组蛋白的乙酰化(acetylation)和去乙酰化(deacetylation)是调节染色体结构和基因转录的重要修饰方法[1]. 具有转录活性的基因其中心组蛋白的乙酰化程度非常高, 相反转录抑制的基因则乙酰化程度很低. 组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰酶(histone deacetylase, HDAC)是调节染色体结构和基因表达的关键激酶[2-3]. HAT通过组蛋白乙酰化提高一些转录因子的活性, 以协助启动子区域进入转录复合体; HDAC则起着相反的作用[4-5]. 曲古菌素A(trichostatin A, TSA)是一种抗真菌药物, 也是强大的HDAC抑制剂, 研究显示他可以抑制一些肿瘤细胞的生长[6-9]. 我们探讨TSA调节结肠癌Caco2细胞增殖的机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Caco2细胞于含100 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 g/L链霉素的DMEM培养基(Gibco公司)中, 置含50 mL/L $CO_2$, 37℃的培养箱. Trichostatin A (Sigma公司)溶解于二甲基亚砜(DMSO), 配制成$1\times10^4$ μg/L的储存液, 在培养基中稀释成终浓度为5, 20, 100和500 μg/L的工作液.

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测细胞增殖活性 以每孔$1\times10^3$个细胞接种于96孔板, 各组设6个复孔. 对照组细胞以常规DMEM培养, 药物处理组以含有5, 20, 100和500 μg/L TSA的DMEM中培养. 待细胞贴壁后, 每隔24 h检测1次. 每孔加入5 g/L MTT 20 μL, 置培养箱内温育4 h, 小心吸去培养基, 加入DMSO 150 μL, 37℃水平摇床振摇15 min, 待晶体充分溶解后, 置全自动酶标仪于490 nm波长处读取吸光度(*A*). 细胞增殖能力以平均吸光度(*A*)值分析, 以*A*值为纵坐标, 时间(d)为横坐标, 绘制生长曲线. 细胞生长抑制率% = (1-实验组平均*A*值/对照组平均*A*值)×100%, 以抑制率%为纵坐标, 时间(d)为横坐标, 绘制抑制率曲线.

1.2.2 细胞周期的检测 5, 20和100 μg/L TSA处理的细胞及对照组细胞均以$1\times10^6$个接种于60 mm培养皿中, 各组设平行实验3个. 36 h后用胰蛋白酶消化分别收集对照组和处理组细胞, PBS洗涤细胞2次, 700 mL/L乙醇固定. 检测前离心弃乙醇, PI溶液(含1.5 g/L碘化丙锭, 10 g/L RNase A)于37℃避光染色3 h, 以流式细胞仪(BD公司)进行细胞周期检测.

1.2.3 RT-PCR检测ID4基因的表达 细胞总RNA的提取参照RNAiso试剂盒(TaKaRa公司)操作. 逆转录反应体系10 μL含5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L dNTPs, 167 nKaT RNase抑制剂, 42 nKaT AMV逆转录酶, 25 pmol随机引物及样本RNA, 逆转录反应条件: 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 95℃ 5 min. PCR反应体系50 μL含Taq酶21 nKaT, 特异性上下游引物各25 pmol. ID4基因PCR反应条件: 95℃ 15 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 5个循环; 再将退火温度降至57℃进行32个循环. 扩增产物于25 g/L琼脂糖凝胶电泳分离. 目的基因ID4及内对照β-actin的引物由Primer5.0软件自行设计, 由Invitrogen公司合成. 引物序列如下: ID4 5'-ACTACATCCTGGACCTGC-3', 5'-GAATGCTGTCGCCCTGCT-3'(665-844), 产物片段长度180 bp. β-actin 5'-CGAAACTACCTTCAACTCCATCA-3', 5'-CGGACTCGTCATACTCCTGCT-3', 产物片段长度272 bp.

**统计学处理** 多样本均数比较采用单因素方差分析, SPSS10.0统计软件进行处理, $P<0.05$为统计学上差异有显著性.

## 2 结果

2.1 Caco2细胞生长曲线和抑制率曲线 5和20 μg/L的TSA处理结肠癌Caco2细胞5 d后, 与对照组比较细胞生长速度无显著性差异($P>0.05$); 而100和500 μg/L TSA作用2 d后即明显抑制了细胞的生长($P<0.05$). 100和500 μg/L组间比较, 细胞生长的抑制没有随着剂量的增加和时间的延长而更显著, 即在100 μg/L浓度以上没有出现剂量和时间的依赖性(图1). 5和20 μg/L组的细胞生长抑制率没有显著改变; 而100 μg/L组的抑制率在2-5 d分别为37.4%, 57.3%, 68.7%, 70.2%, 500 μg/L组的抑制率分别为48.8%, 67.4%, 76.7%, 81.8%.

2.2 Caco2细胞周期的变化 TSA处理前结肠癌Caco2细胞处于$G_1$, S和$G_2$期的百分比分别为: 47.6%, 48.3%和4.2%; 5 μg/L TSA处理36 h后, 处于$G_1$, S和$G_2$期的百分比分别为: 48.5%, 41.9%和9.6%; 20 μg/L TSA处理36 h后, $G_1$, S和$G_2$期的百分比分别为: 51.2%, 41.0%和7.8%; 100 μg/L TSA处理36 h后, $G_1$, S和$G_2$期的百分比分别为:

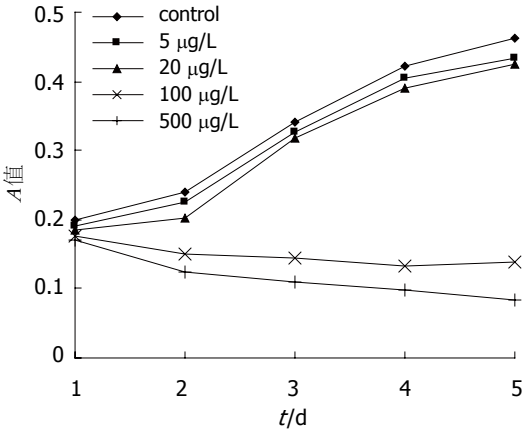



图 1 TSA对Caco2细胞增殖的影响.

55.6%, 25.6%和18.9%. 即100 μg/L TSA使结肠癌Caco2细胞周期出现$G_1$期的阻滞, 而5和20 μg/L TSA与对照组比较没有影响Caco2的细胞周期. 各浓度组都没有显著的诱导Caco2细胞的凋亡(图2).

2.3 Caco2细胞ID4基因mRNA的表达 20, 100和500 μg/L TSA分别处理结肠癌Caco2细胞36 h, 对照组细胞ID4基因mRNA表达很弱, 20 μg/L TSA作用36 h后ID4基因的mRNA表达稍微增强, 而100 μg/L TSA使ID4基因的表达显著增强; 100和500 μg/L TSA组间比较无显著差异. β-actin的表达水平在各种浓度的TSA作用前后无显著改变(图3).

## 3 讨论

结肠癌是全球第3大恶性疾病, 其发病率在35-50/10万人, 在发达国家尤其显著, 发病率平均每年增长4.2%. 常见的高危因素有低纤维、高脂肪饮食, 家族史, 肥胖和炎性结直肠疾病等[10-11]. Vogelstein *et al*[12-13]证实的遗传突变累积学说是公认的结直肠癌发病的主要机制, 即前癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活所累积的遗传缺陷, 使结直肠腺瘤向结直肠癌进展的过程. 然而, 这些被证实的遗传缺陷不足以解释绝大多数的散发型结直肠癌的发病机制[14-15]. 近年研究发现表观遗传机制是调节一些重要基因功能的关键机制. 表观遗传是指通过DNA自身化学修饰方式从转录水平影响基因表达, 但不存在DNA序列改变的遗传改变. 表观遗传修饰包含3个方面: 组蛋白修饰, DNA甲基化和小RNA干扰[16-17]. 也就是说, 细胞可以只有一种遗传密码, 但由于表观遗传修饰的存在使蛋白质表达多种多样, 呈现出细胞分化后的不同形态. 核小

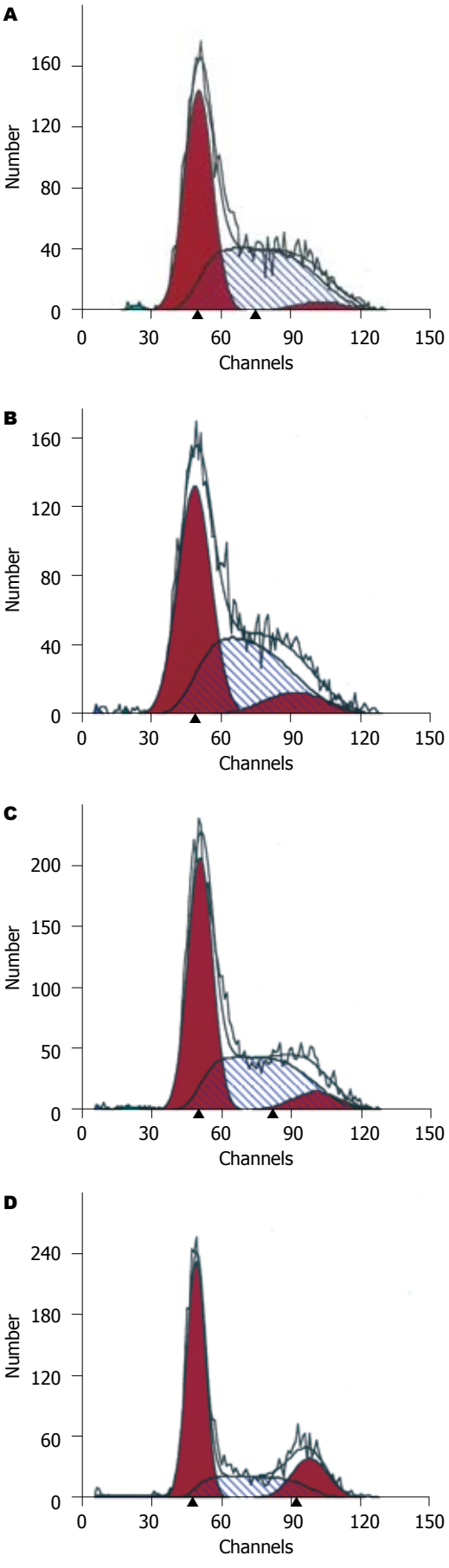



图 2 TSA对Caco2细胞周期的影响. A: 对照组; B: 5 μg/L组; C: 20 μg/L组; D: 100 μg/L组.

**■同行评价**

本文设计合理可靠, 结论较明确, 实验证据充足, 有一定的创新性和可读性, 较好地反映我国胃肠病学临床和基础研究的先进水平.

体是人类染色体的基本组成单位, 由146个碱基对环绕组蛋白的十聚体构成. 组蛋白的共价修饰可以改变染色体的构象由紧密型变为松弛型, 包括乙酰化、甲基化、磷酸化和泛素化[18-19]. 这些可逆性的共价修饰使得基因的表达受到严格控制. HDAC通过调节核小体的构象改变, 在调节基因表达方面起着重要的作用. 在多种肿瘤中HDAC与细胞周期、细胞分化的调控密切相关[20-23].

ID蛋白(inhibition of DNA binding, ID)家族, 是一种独特的HLH(helix-loop-helix)蛋白家族成员. HLH是转录因子的基本结构, 以调节组织特异性基因的表达, 在细胞分化和胚胎发育过程中起着重要作用[24-25]. HLH蛋白必需通过同类或异类二聚化才具有DNA结合活性. ID蛋白含有HLH二聚化功能域, 但缺乏DNA结合功能域, 因此ID蛋白可以和HLH蛋白形成异类二聚体, 并抑制HLH蛋白与DNA的结合及转录[26]. 较早的研究发现ID4基因与少突胶质神经细胞的生长和分化相关[27], 最近的研究显示在30%的原发胃癌中, ID4基因的启动子区域被甲基化, 并导致该基因的低表达[28]. Umetani *et al*[29]发现, 在53%的原发性结直肠癌和73%的有肝转移的结直肠癌中, ID4基因的启动子区域被甲基化; 而在正常结肠组织和结直肠腺瘤中该基因启动子没有被甲基化. 同时这种异常的高甲基化可以通过甲基转移酶抑制剂逆转. 我们的研究发现, TSA在体外可以明显抑制结直肠癌Caco2细胞的增殖, 在100 μg/L浓度以上才表现出明显的生长抑制作用, 但在500 μg/L浓度时(数据没有显示)细胞出现明显的死亡趋势, 这说明TSA的抑制作用具有剂量依赖和相应的毒性作用. 为了寻找TSA抑癌作用的可能机制, 我们用流式细胞仪检测了不同浓度的TSA对细胞周期的影响, 结果发现100 μg/L TSA使该细胞出现$G_1$期阻滞, 而100 μg/L浓度以下没有明显改变, 各浓度组均没有出现显著的细胞凋亡. 这提示TSA的抑癌作用与调节$G_1$到S期转移的相关蛋白密切相关.

既然TSA与组蛋白乙酰化相关, 而组蛋白乙酰化和DNA异常甲基化是紧密相关的表观遗传修饰, 我们假设TSA也可以逆转一些表观遗传改变, 从而调节肿瘤相关基因的表达. ID4基因是新发现的候选抑癌基因, 其异常低表达与结直肠癌和乳腺癌的恶性进展有关. 我们发现100 μg/L浓度以上的TSA可以使Caco2细胞中ID4基因的表达恢复, 因而可以推测TSA恢复肿瘤抑制基因重新表达的作用, 可能是其发挥抑癌作用的关键. 值得进一步研究的是, TSA恢复ID4基因的表达是直接通过乙酰化作用, 还是间接通过去甲基化作用实现的. Ou *et al*[30]最新的研究发现, TSA可以广泛的诱导特定基因去甲基化并重新表达, 并证实组蛋白乙酰化和DNA去甲基化之间通过甲基结合蛋白(methyl-CpG binding proteins, MBDs)实现相互作用(crosstalk).

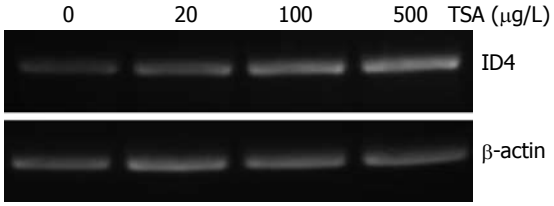



图 3 TSA对Caco2细胞ID4 mRNA表达的影响.

总之, 抑癌基因表观遗传沉默(epigenetic silencing)是其功能失活的第3种机制, 组蛋白去乙酰酶抑制剂TSA能够有效的逆转表观遗传沉默的抑癌基因重新表达, 这为结直肠的诊断和治疗提供了新的途径[31].

## 4 参考文献

1 Espino PS, Drobic B, Dunn KL, Davie JR. Histone modifications as a platform for cancer therapy. *J Cell Biochem* 2005; 94: 1088-1102
2 Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-45
3 Villar-Garea A, Imhof A. The analysis of histone modifications. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764: 1932-1939
4 Lee KK, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 284-295
5 Dey P. Chromatin remodeling, cancer and chemotherapy. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2909-2919
6 Bouchain G, Delorme D. Novel hydroxamate and anilide derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: synthesis and antiproliferative evaluation. *Curr Med Chem* 2003; 10: 2359-2372
7 Chiba T, Yokosuka O, Fukai K, Kojima H, Tada M, Arai M, Imazeki F, Saisho H. Cell growth inhibition and gene expression induced by the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, on human hepatoma cells. *Oncology* 2004; 66: 481-491
8 Kelly WK, Marks PA. Drug insight: Histone deacetylase inhibitors-development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 150-157
9 Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, Coombes RC. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 971-976
10 Rose DJ, DeMeo MT, Keshavarzian A, Hamaker

BR. Influence of dietary fiber on inflammatory bowel disease and colon cancer: importance of fermentation pattern. *Nutr Rev* 2007; 65: 51-62
11 Rennert G. Prevention and early detection of colorectal cancer-new horizons. *Recent Results Cancer Res* 2007; 174: 179-187
12 Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-141
13 Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; 70: 1727-1731
14 Komarova NL, Lengauer C, Vogelstein B, Nowak MA. Dynamics of genetic instability in sporadic and familial colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 685-692
15 Parsons DW, Wang TL, Samuels Y, Bardelli A, Cummins JM, DeLong L, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C, Velculescu VE. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 2005; 436: 792
16 D'Alessio AC, Szyf M. Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 463-476
17 Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* 2006; 5: 2220-2222
18 Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 243-269
19 Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 838-849
20 Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 983: 84-100
21 Chen YX, Fang JY, Zhu HY, Lu R, Cheng ZH, Qiu DK. Histone acetylation regulates p21WAF1 expression in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2643-2646
22 Garcia-Manero G, Issa JP. Histone deacetylase inhibitors: a review of their clinical status as antineoplastic agents. *Cancer Invest* 2005; 23: 635-642
23 Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* 2005; 25: 261-309
24 Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 410-418
25 Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, Ryu B, Alani RM. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2003; 3: 525-530
26 Rotzer D, Krampert M, Sulyok S, Braun S, Stark HJ, Boukamp P, Werner S. Id proteins: novel targets of activin action, which regulate epidermal homeostasis. *Oncogene* 2006; 25: 2070-2081
27 Riechmann V, Sablitzky F. Mutually exclusive expression of two dominant-negative helix-loop-helix (dnHLH) genes, Id4 and Id3, in the developing brain of the mouse suggests distinct regulatory roles of these dnHLH proteins during cellular proliferation and differentiation of the nervous system. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 837-843
28 Chan AS, Tsui WY, Chen X, Chu KM, Chan TL, Chan AS, Li R, So S, Yuen ST, Leung SY. Downregulation of ID4 by promoter hypermethy-lation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 6946-6953
29 Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS. Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7475-7483
30 Ou JN, Torrisani J, Unterberger A, Provencal N, Shikimi K, Karimi M, Ekstrom TJ, Szyf M. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1297-1307
31 Kondo Y, Issa JP. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 29-39

电编 张敏 编辑 何燕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2026-2030
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R



# 胃癌组织VEGF-C和CXCR4的表达与淋巴结转移的关系

安丽文, 刘永军, 赵丹懿, 徐惠绵, 关一夫

■背景资料
胃癌死亡率居我国恶性肿瘤第1位, 其居高不下的原因是复发和转移. 淋巴结转移是胃癌最常见的转移方式, 因此寻找胃癌淋巴结转移的分子指标, 探讨其分子机制对胃癌分期、手术和放化疗均有重要意义, 并将提高胃癌生存率.

安丽文, 关一夫, 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 辽宁省沈阳市 110001
刘永军, 中国医科大学第四附属医院神经外科 中国医科大学第一附属医院肿瘤外科研究生 辽宁省沈阳市 110032
赵丹懿, 徐惠绵, 中国医科大学第一附属医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001
安丽文, 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学专业硕士研究生, 助教, 主要从事胃癌转移相关基因与基因芯片方面的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30470451
**通讯作者:** 关一夫, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室. yfguan@mail.cmu.edu.cn
电话: 024-23255240 传真: 024-23255240
收稿日期: 2007-03-30 接受日期: 2007-04-28

## Correlation of VEGF-C and CXCR4 expression correlates with lymph node metastasis in gastric cancer

Li-Wen An, Yong-Jun Liu, Dan-Yi Zhao, Hui-Mian Xu, Yi-Fu Guan

Li-Wen An, Yi-Fu Guan, Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Yong-Jun Liu, Department of Neurological Surgery, The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China
Dan-Yi Zhao, Hui-Mian Xu, Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30470451
Correspondence to: Yi-Fu Guan, Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yfguan@mail.cmu.edu.cn
Received: 2007-03-30 Accepted: 2007-04-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression and correlation of VEGF-C and CXCR4 in gastric cancer tissue.

**METHODS:** Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction was performed to detect the expression of VEGF-C and CXCR4 according to cancer stage in cancer and adjacent tissues in 50 cases of gastric cancer.

**RESULTS:** The expression index of VEGF-C in gastric cancer stage $pN_1$ (0.34 ± 0.08) was significantly higher than that in gastric cancer stage $pN_0$ without regional lymph node metastasis (0.28 ± 0.09, $P < 0.05$). Significance differences in the expression indexes of VEGF-C and CXCR4 were found between stage $pN_1$ (0.34 ± 0.08, 0.31 ± 0.08) and stage $pN_2$+$pN_3$ (0.40 ± 0.10, 0.43 ± 0.14; $P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). Significance differences were also found in the expression indexes of VEGF-C and CXCR4 between those with or without lymph node metastasis (0.36 ± 0.10 *vs* 0.28 ± 0.09, $P < 0.01$; 0.35 ± 0.12 *vs* 0.26 ± 0.09, $P < 0.05$). The expression indexes of VEGF-C and CXCR4 between stage $pN_0$ (0.28 ± 0.09, 0.26 ± 0.09) and adjacent tissue (0.21 ± 0.12, 0.20 ± 0.11) showed no significant difference. There was a significant correlation between expression of VEGF-C and CXCR4 ($r_s = 0.341$, $P < 0.05$).

**CONCLUSION:** Our results suggest that the expression indexes of VEGF-C and CXCR4 are associated with progression of lymph node metastasis, and the indexes appear useful for clinical evaluation of lymphatic invasion in patients with gastric cancer.

Key Words: Gastric carcinoma; Lymph node metastasis; Vascular endothelial growth factor C; CXC chemokine receptor 4

An LW, Liu YJ, Zhao DY, Xu HM, Guan YF. Correlation of VEGF-C and CXCR4 expression with lymph node metastasis in gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2026-2030

## 摘要

**目的:** 探讨胃癌组织VEGF-C和CXCR4的表达与淋巴道转移的关系以及两者的相关性.

**方法:** 用半定量RT-PCR方法检测50例胃癌组织和相应癌旁组织中VEGF-C和CXCR4的表达水平.

**结果:** 在淋巴结转移阴性组($pN_0$)胃癌组织($n = 12$)中VEGF-C的表达指数为0.28±0.09, 与$pN_1$组(0.34±0.08, $n = 35$)比较差别有显著意义($P<0.05$); VEGF-C和CXCR4在$pN_1$组中的表

达指数(0.34±0.08, 0.31±0.08)与$pN_2$+$pN_3$组(0.40±0.10, 0.43±0.14)比较差别均有显著意义($P$<0.05, $P$<0.01); 在淋巴结转移阳性的胃癌组织($n$ = 38)中VEGF-C和CXCR4的表达指数(0.36±0.10, 0.35±0.12)高于无淋巴结转$pN_0$组(0.28±0.09, 0.26±0.09, $n$ =12), 差别有显著意义($P$<0.01, $P$<0.05). VEGF-C和CXCR4在$pN_0$组中的表达指数(0.28±0.09, 0.26±0.09)与相应癌旁组织比较(0.21±0.12, 0.20±0.11)差别均无显著意义. 经Spearman等级相关分析VEGF-C和CXCR4在胃癌组织中表达之间存在显著相关性($r_s$ = 0.341, $P$<0.05).

**结论:** VEGF-C和CXCR4的表达指数随胃癌淋巴结转移的增加而增加, 两者之间存在一定相关性, 对预测淋巴结转移有重要的临床价值.

**关键词: 胃癌; 淋巴结转移; 血管内皮细胞生长因子C; CXC趋化因子受体4**

安丽文, 刘永军, 赵丹懿, 徐惠绵, 关一夫. 胃癌组织VEGF-C和CXCR4的表达与淋巴结转移的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2026-2030

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2026.asp

## 0 引言

胃癌发病率居世界上恶性肿瘤中的第2位[1], 在我国, 胃癌死亡数占全部恶性肿瘤死亡总数的23.93%, 居恶性肿瘤死亡第1位[2]. 胃癌死亡率居高不下的主要原因是复发和转移, 而淋巴结转移是胃癌最常见的转移方式之一, 但其分子生物学机制仍不十分清楚, 因此寻找胃癌淋巴结转移的分子指标, 探讨胃癌淋巴结转移的分子机制对肿瘤分期、手术和放化疗均有重要意义[3], 并将最终提高胃癌的生存率. 血管内皮生长因子C(vascular endothelium growth factor C, VEGF-C)是诱导淋巴管生成的生长因子, 与其受体VEGFR3相互作用构成的调控系统在肿瘤间质淋巴管生成及淋巴道转移中起关键作用[4]. CXC趋化因子受体4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)是趋化因子受体家族成员, 通过与其配体CXCL12可诱导靶细胞趋化性迁移, 与肿瘤转移靶器官性有关, 是近年研究热点[5]. 胃癌癌旁及癌灶中VEGF-C、CXCR4 mRNA表达水平及其与胃癌淋巴结转移的关系目前尚鲜见报道. 我们采用RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)方法对50例经手术治疗的胃癌组织和配对癌旁组织进行VEGF-C mRNA和CXCR4 mRNA表达水平半定量检测并比较, 对两者相关性进行分析, 旨在探讨VEGF-C和CXCR4与胃癌淋巴结转移的关系.

## 1 材料和方法

1.1 *材料* 2006-06/2007-01中国医科大学附属第一医院肿瘤外科胃癌患者50例, 男35例, 女15例, 年龄35-72(平均57.4)岁. 病理分期按1997年国际抗癌联盟(UICC)标准, 所有病例术前均未行化疗、放疗和其他抗癌治疗, 均进行胃癌标准根治术, 并经术后系统病理学检查确诊. 在手术间切取胃标本新鲜癌组织(去除坏死组织)和正常黏膜组织(相距癌组织5 cm以外, Borrmann Ⅳ在癌旁10 cm以外), 切下标本后马上投入液氮中冷冻0.5 h后转入-80℃冰箱中保存. TRIzol试剂购自Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒(RNA PCR Kit AMV Ver.3.0)、引物均由TaKaRa公司提供. 采用TRIzol一步法提取组织总RNA, 用紫外分光光度仪检测其纯度, 电泳检测其完整性, 并将RNA稀释至500 mg/L.

1.2 *方法* 半定量RT-PCR反应体系依照试剂盒说明, 反转录得cDNA后行PCR扩增, 检测标本VEGF-C和CXCR4 mRNA表达水平. PCR反应选择处于指数生长期的循环数为反应条件, 以确保PCR产物量能够反映最初的模板量; 引物以Primer 3(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)进行设计, 并行生物信息学对比分析; 以无菌双蒸水为阴性对照, 以GAPDH为内对照, 以试剂盒提供的对照RNA样品及其特异性引物的扩增产物为阳性对照. 引物序列、扩增产物大小及PCR反应条件(表1). PCR产物经80 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳, 10 mg/L EB染色, 凝胶成像系统(美国Alpha FluorChem)成像, Image J软件分析灰度值, 计算条带的积分吸光度(积分吸光度 = 平均吸光度×面积)结果判定: 以同一模板CXCR4或VEGF-C与GAPDH基因产物积分吸光度的比值作为CXCR4或VEGF-C的表达指数.

**统计学处理** 在SPSS10.0统计软件包中完成, 所得数据计量资料用mean±SD表示, 比较用$t$检验; 相关性用Spearman等级相关分析. $P$<0.05为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 *VEGF-C和CXCR4的表达* 在癌旁组织中VEGF-C的表达指数为0.21±0.12, 与无淋巴结转移的胃癌组织$pN_0$组(0.28±0.09)比较差别无显著意义($P$>0.05); 依照UICC分期标准其$pN_1$

**■相关报道**
国外研究已证实, VEGF-C在食管鳞状细胞癌和口腔鳞状细胞癌的表达与淋巴管生成、肿瘤淋巴结转移、预后密切相关; CXCR4的表达与宫颈癌患者的年龄、肿瘤大小、浸润程度正相关, 并与淋巴结转移程度显著相关.

**■创新盘点**
本文采用RT-PCR方法对胃癌组织和配对癌旁组织中VEGF-C和CXCR4 mRNA表达水平进行半定量检测. 实验结果表明两者表达随胃癌淋巴结转移增加而增加, 两者之间存在一定相关性, 提示两者在胃癌发生、发展过程中具有协同作用. 关于这方面的研究尚未见报道.

表 1 引物序列、扩增产物大小及PCR反应条件

| 基因 | 引物序列 | 退火温度(℃) | 产物大小(bp) | 循环数 |
|---|---|---|---|---|
| GAPDH | F 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3' | 63 | 234 | 28 |
| | R 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3' | | | |
| VEGF-C | F 5'-GGAAAGAAGTTCCACCACCA-3' | 61 | 248 | 32 |
| | R 5'-TTTGTTAGCATGGACCCACA-3' | | | |
| CXCR4 | F 5'-GGAAAAGATGGGGAGGAGA-3' | 57 | 159 | 34 |
| | R 5'-GCACTTCCAATTCAGCAAGCA-3' | | | |

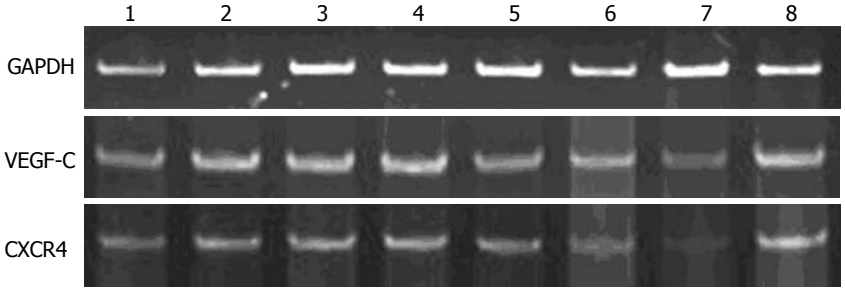



**图 1 胃癌组织中GAPDH, VEGF-C和CXCR4的表达**. 1, 3, 5, 7: 癌旁组织; 2, 4, 6, 8: 胃癌组织.

组(0.34±0.08)与$pN_0$组比较差别有显著意义($P$<0.05), 与$pN_2$+$pN_3$组(0.40±0.10)比较差别有显著意义($P$<0.05); VEGF-C在有淋巴结转移的胃癌组织中的表达指数(0.36±0.10)高于无淋巴结转移$pN_0$组(图1, 表2), 差别有显著意义($P$<0.01). 在癌旁组织中CXCR4的表达指数为0.20±0.11, 与无淋巴结转移的胃癌组织$pN_0$组(0.26±0.09)比较差别无显著意义($P$>0.05); 依照UICC分期标准其$pN_1$组(0.31±0.08)与$pN_0$组比较差别无显著意义($P$>0.05), 与$pN_2$+$pN_3$组(0.43±0.14)比较差别有显著意义($P$<0.01); CXCR4在有淋巴结转移的胃癌组织中的表达指数(0.35±0.12)高于无淋巴结转移$pN_0$组, 差别有显著意义($P$<0.05).

2.2 VEGF-C和CXCR4表达的相关性 经Spearman等级相关分析表明在胃癌组织中两者之间存在显著相关性($r_s$ = 0.341, $P$<0.05).

## 3 讨论

VEGF-C是血管内皮细胞生长因子家族成员之一, 与相应受体VEGFR3结合促进淋巴内皮细胞增殖和淋巴管生成[6]. Mobius *et al*[7]和Siriwardena *et al*[8]的研究分别显示, VEGF-C在食管鳞状细胞癌和口腔鳞状细胞癌的表达与淋巴管生成、淋巴结转移、预后密切相关. 我们应用RT-PCR方法对胃癌组织和配对癌旁组织中VEGF-C mRNA表达水平进行检测并行半定量比较, 结果显示, $pN_1$组胃癌中VEGF-C mRNA表达指数高于$pN_0$组, 提示VEGF-C在转录水平发生了表达上调, 而$pN_0$组胃癌与癌旁组织VEGF-C mRNA表达指数无显著差异, 提示VEGF-C可能是特异的参与胃癌淋巴道转移, 而与癌变及瘤细胞生长无关. 本研究结果还显示在人胃癌组织中VEGF-C的表达指数与有无淋巴结转移以及TNM分期中淋巴结分级正相关, 有统计学意义. Hirakawa *et al*[9]通过转基因小鼠动物模型研究发现, VEGF-C不能增加原发癌灶的生长, 而是在肿瘤淋巴结转移前在前哨淋巴结通过和VEGFR3构成的调控网络为肿瘤转移营造微环境, 肿瘤一旦转移到前哨淋巴结, 该部位淋巴管数目就迅速增加, 从而增加远处淋巴结和器官转移机会. 可见, VEGF-C的改变是转移的早期事件. Su *et al*[10]在非小细胞肺癌研究发现, VEGF-C/VEGFR3生物轴有促进肿瘤细胞运

表 2 胃癌组织VEGF-C和CXCR4的表达(mean ± SD)

| 组织来源 | *n* | VEGF-C | CXCR4 |
|---|---|---|---|
| 癌旁 | 50 | 0.21 ± 0.12 | 0.20 ± 0.11 |
| 癌 | | | |
| $pN_0$ | 12 | 0.28 ± 0.09[a] | 0.26 ± 0.09 |
| $pN_1$ | 25 | 0.34 ± 0.08 | 0.31 ± 0.08 |
| $pN_2$+$pN_3$ | 13 | 0.40 ± 0.10[a] | 0.43 ± 0.14[b] |
| 淋巴结转移 | | | |
| − | 12 | 0.28 ± 0.09 | 0.26 ± 0.09 |
| + | 38 | 0.36 ± 0.10[d] | 0.35 ± 0.12[c] |

[a]$P$<0.05, [b]$P$<0.01 *vs* $pN_1$; [c]$P$<0.05, [d]$P$<0.0 *vs* 无淋巴结转移.

动、增加其侵袭性、促进肿瘤细胞转移的效应, 肿瘤组织中VEGF-C的表达与临床转移发生正相关和生存率负相关. 这些研究与我们的研究结果共同提示, VEGF-C是预测淋巴道转移的早期敏感指标.

趋化因子是一类最早发现控制免疫细胞向炎症定向迁移的细胞因子[11]. 趋化因子的功能由相应受体介导, 作用后可产生诱导靶细胞趋化性迁移等多种生理功能[12]. 近来研究显示, 趋化因子及其受体在某些肿瘤细胞呈高表达, 且不同肿瘤中差异很大, 与肿瘤转移潜能[13]和转移靶器官性如淋巴结转移[14]密切相关. 其中CXCR4与其配体CXCL12构成CXCR4/CXCL12生物轴传导特定信号, 在肿瘤发生发展过程中, 促进肿瘤细胞生长、恶性转化、促进血管生成, 抑制免疫系统, 参与肿瘤转移[15]. Muller *et al*[16]报告, CXCL12/CXCR4共同决定了乳腺癌转移模式: 人乳腺癌原发灶高表达CXCR4, 而在乳腺癌最常见的转移部位如淋巴结、肺、肝脏和骨髓则高水平地表达其配体CXCL12; 并观察到CXCR4与CXCL12的结合可引起癌细胞内骨架蛋白的聚合与再分布, 调节细胞运动和迁移, 且直接呈剂量依赖性诱导癌细胞定向迁移和侵袭. 使用CXCR4拮抗剂T140或通过RNA干扰技术抑制CXCR4基因均可抑制乳腺癌细胞在体外的迁移反应[17-18]. Kodama *et al*[19]研究表明, CXCR4的表达与宫颈癌患者的年龄、肿瘤大小、浸润程度正相关, 并与淋巴结转移程度显著相关($P$<0.0001). Hao *et al*[20]研究显示, 联合检测乳腺癌组织中CXCR4, VEGF和MMP9(matrix metalloproteinase 9, 基质金属蛋白酶9)可预测乳腺癌淋巴结转移. 关于CXCR4在胃癌组织的表达情况鲜有报道. 本研究结果显示, CXCR4的表达指数与有无淋巴结转移以及不同转移程度的各组中存在统计学差异, 提示CXCR4可能与胃癌淋巴结转移机制有关, 推测可能通过CXCL12/CXCR4途径促进肿瘤细胞迁移至淋巴结有关. 这与同行在乳腺癌[21]、结肠直肠癌[22]、食管癌[23]中的有关报道一致.

我们研究了胃癌组织中VEGF-C和CXCR4表达的相关性, 实验结果经Spearman等级相关分析表明两者表达指数正相关($r_s$ = 0.341, $P$<0.05), 提示两者在胃癌发生、发展过程中具有协同作用, 关于这方面的研究尚未见报道.进一步研究探索VEGF-C和CXCR4在胃癌淋巴道转移机制的作用及其相互关系, 将有助于阐明胃癌淋巴道转移机制, 提供候选胃癌转移特异标志物、基因治疗靶点, 为制备预测胃癌转移潜能的基因芯片提供实验基础.

淋巴结转移是胃癌最常见的转移方式之一, 由于肿瘤(特别是胃癌)早期常发生淋巴结的转移, 这提示了淋巴管在肿瘤的转移过程中起着重要作用. 目前TNM分级中淋巴结分级依靠术后手工剪取, 耗时且结果与剪取者经验有关, 而且准确的分级只能在术后获得, 联合检测VEGF-C、CXCR4将为评价胃癌淋巴道转移提供新思路. 综上所述, VEGF-C、CXCR4表达水平与胃癌淋巴结转移正相关, 在胃癌活检组织中定量检测VEGF-C、CXCR4的mRNA水平对预测胃癌淋巴结转移具有重要的临床价值.

**■应用要点**

在胃癌活检组织中定量联合检测VEGF-C、CXCR4的mRNA水平对预测胃癌淋巴结转移具有重要的临床价值.

## 4 参考文献


1 Chen J, Rocken C, Malfertheiner P, Ebert MP. Recent advances in molecular diagnosis and therapy of gastric cancer. *Dig Dis* 2004; 22: 380-385
2 董志伟, 谷铣之. 临床肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 876-877
3 Tille JC, Nisato R, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumour metastasis. *Novartis Found Symp* 2004; 256: 112-131; discussion 132-136, 259-269
4 Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, Chen HY, Hung MC, Kuo ML. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007; 96: 541-545
5 Kucia M, Jankowski K, Reca R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* 2004; 35: 233-245
6 Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62: 179-213
7 Mobius C, Freire J, Becker I, Feith M, Brucher BL, Hennig M, Siewert JR, Stein HJ. VEGF-C Expression in Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Esophagus. *World J Surg* 2007; [Epub ahead of print]
8 Siriwardena B, Kudo Y, Ogawa I, Udagama K, Tilakaratne WM, Takata T. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. *J Clin Pathol* 2007; [Epub ahead of print]
9 Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 2007; 109: 1010-1017
10 Su JL, Yang PC, Shih JY, Yang CY, Wei LH, Hsieh CY, Chou CH, Jeng YM, Wang MY, Chang KJ, Hung MC, Kuo ML. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 2006; 9: 209-223
11 Bendall L. Chemokines and their receptors in disease. *Histol Histopathol* 2005; 20: 907-926
12 Miller RJ, Tran PB. Chemokinetics. *Neuron* 2005; 47: 621-623
13 Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev*

**■同行评价**
本文研究VEGF-C和CXCR-4的表达指数随胃癌淋巴结转移的增加而增加, 两者之间存在一定相关性, 行文流畅, 立题新意, 方法成熟, 对胃癌的基础研究和临床研究有一定的指导意义和参考价值.

2006; 25: 357-371
14 Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. *Contrib Microbiol* 2006; 13: 191-199
15 Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C987-995
16 Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56
17 Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2005; 65: 967-971
18 Lee BC, Lee TH, Zagozdzon R, Avraham S, Usheva A, Avraham HK. Carboxyl-terminal Src kinase homologous kinase negatively regulates the chemokine receptor CXCR4 through YY1 and impairs CXCR4/CXCL12 (SDF-1alpha)-mediated breast cancer cell migration. *Cancer Res* 2005; 65: 2840-2845
19 Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Seki N, Matsuo T, Ojima Y, Nakamura K, Hongo A, Hiramatsu Y. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 70-76
20 Hao L, Zhang C, Qiu Y, Wang L, Luo Y, Jin M, Zhang Y, Guo TB, Matsushima K, Zhang Y. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2007; 253: 34-42
21 Andre F, Cabioglu N, Assi H, Sabourin JC, Delaloge S, Sahin A, Broglio K, Spano JP, Combadiere C, Bucana C, Soria JC, Cristofanilli M. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 945-951
22 Ottaiano A, Franco R, Aiello Talamanca A, Liguori G, Tatangelo F, Delrio P, Nasti G, Barletta E, Facchini G, Daniele B, Di Blasi A, Napolitano M, Ierano C, Calemma R, Leonardi E, Albino V, De Angelis V, Falanga M, Boccia V, Capuozzo M, Parisi V, Botti G, Castello G, Vincenzo Iaffaioli R, Scala S. Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2795-2803
23 Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P, Heinecke A, Pantel K, Izbicki JR. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1840-1847

电编 何基才 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 肝胆胰外科领域新技术研讨会通知

**本刊讯** 为了推动肝胆胰外科临床及科研工作的深入开展, 由哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰外科与世界华人消化杂志共同举办的国家继续教育项目“肝胆胰外科领域新技术研讨会”拟于2007-08-03/05在哈尔滨召开. 届时将邀请日本及国内肝胆胰领域知名专家进行讲座和学术交流, 会议将对活体肝移植供受体手术、肝脏手术、血管技术在肝胆胰手术中的应用、如何提高胰十二指肠手术切除率以及生物人工肝脏等技术的新进展进行深入讨论, 学习该领域国内外先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展. 与会者将被授予国家I类继续教育学分12分. 欢迎各位肝胆胰及相关领域同仁参加.

通讯地址: 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰腺外科. 联系人: 吴祥松 电话: 0451-53643849-5721, 13633621389. E-mail: wxs417@yahoo.com.cn

收费标准: 500元(含资料费及午间工作餐, 统一安排食宿, 费用自理). 报到日期: 2007-08-02.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2031-2036
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

# 遗传性非息肉病性大肠癌组织E-cad, β-cat和MMP-7表达在侵袭转移中的作用

顾国利, 魏学明, 王石林, 任 力, 周晓武, 李德昌, 胡益云

顾国利, 魏学明, 王石林, 周晓武, 中国人民解放军空军总医院普通外科 北京市 100036
任力, 李德昌, 胡益云, 中国人民解放军空军总医院病理科 北京市 100036
顾国利, 2004年中国医科大学外科学普通外科专业硕士生, 主治医师, 讲师, 主要从事大肠癌临床肿瘤学的研究.
**通讯作者:** 王石林, 100036, 北京市, 中国人民解放军空军总医院普通外科. wangshilin@medmail.com.cn
电话: 010-66928302
收稿日期: 2007-04-13 接受日期: 2007-05-13

## Expression of E-cadherin, β-catenin, matrix metalloproteinase-7 and its correlation to invasion/metastasis of hereditary non-polyposis colorectal cancer

Guo-Li Gu, Xue-Ming Wei, Shi-Lin Wang, Li Ren, Xiao-Wu Zhou, De-Chang Li, Yi-Yun Hu

Guo-Li Gu, Xue-Ming Wei, Shi-Lin Wang, Xiao-Wu Zhou, Department of General Surgery, Airforce General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100036, China
Li Ren, De-Chang Li, Yi-Yun Hu, Department of Pathology, Airforce General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100036, China
Correspondence to: Shi-Lin Wang, Department of General Surgery, Airforce General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100036, China. wangshilin@medmail.com.cn
Received: 2007-04-13 Accepted: 2007-05-13

## Abstract

**AIM:** To detect expression of E-cadherin (E-cad), β-catenin (β-cat) and matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and sporadic colorectal cancer (CRC), and to analyze its relationship to the biological behavior of HNPCC.

**METHODS:** Protein expression of E-cad, β-cat and MMP-7 in 30 specimens of HNPCC, 30 of sporadic CRC and eight of normal colorectal tissues was detected by SP immunohistochemistry. Their corresponding clinical data were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** The positive expression rates of E-cad and membrane β-cat in HNPCC patients were higher than those in sporadic CRC (E-cad, 86.7% *vs* 60.0%; membrane β-cat, 83.3% *vs* 50.0%, all $P < 0.05$). The positive expression rates of cytoplasm β-cat and MMP-7 in HNPCC patients were lower than those in sporadic CRC patients (cytoplasm β-cat, 46.7% *vs* 80.0%; MMP-7, 46.7% *vs* 86.7%; both $P > 0.05$). Positive rates of E-cad, β-cat and MMP-7 in the two groups were significantly related to depth of invasion and lymph node metastasis ($r = 0.732$, $P < 0.05$), but not to sex or the size or position of the tumor. Protein expression of E-cad was positively correlated with expression of membrane β-cat ($r = 0.477$, $P < 0.05$), however, expression of membrane β-cat was negatively correlated with expression of cytoplasmic β-cat ($r = -0.419$, $P < 0.05$), while expression of cytoplasm β-cat was positively correlated with expression of MMP-7 ($r = 0.380$, $P < 0.05$).

**CONCLUSION:** There are remarkable differences in expressions of E-cad, β-cat and MMP-7 between HNPCC and sporadic CRC. This could be the reason that HNPCC tumors are less invasive and have less metastatic potential compared to sporadic cancers.

Key Words: Hereditary non-polyposis colorectal cancer; Sporadic colorectal cancer; E-cadherin; β-catenin; Matrix metalloproteinase-7; Histopathology; Immunohistochemistry

Gu GL, Wei XM, Wang SL, Ren L, Zhou XW, Li DC, Hu YY. Expression of E-cadherin, β-catenin, matrix metalloproteinase-7 and its correlation to invasion/metastasis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2031-2036

## 摘要

**目的:** 探讨上皮钙黏附蛋白(E-cad)、β-连接素(β-cat)和基质金属蛋白酶-7(MMP-7)在遗传性非息肉病性大肠癌(HNPCC)和散发性大肠癌(sporadic CRC)的表达及与遗传性非息肉病性大肠癌(HNPCC)侵袭转移间的关系.

**■背景资料**
Wnt/β-cat信息通路、MMP和HNPCC均是目前肿瘤学的研究热点. Wnt/β-cat信息通路在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移中起着非常重要的作用. β-cat在肿瘤的侵袭转移中却起着双重作用; 其既可与胞膜上的E-cad结合介导上皮细胞黏附、保持肿瘤组织的完整性、阻止肿瘤细胞转移, 又可在胞质和胞核中的积累和异常表达、启动Wnt/β-cat信息通路的下游靶基因. MMP-7就是Wnt/β-cat信息通路的一个靶基因产物. 其可以直接参与降解细胞外基质(ECM), 从而参与肿瘤的侵袭转移. 研究发现E-cad, β-cat, MMP-7与大肠癌的侵袭转移密切相关.

■创新盘点
目前HNPCC的研究集中在基因和临床两端, 研究蛋白水平这个中间环节的报道很少, 本文应用免疫组化方法对E-cad, β-cat, MMP-7在HNPCC和散发性大肠癌组织的表达进行了研究, 分析其表达与临床病理的关系及其表达的相关性和意义, 初步探讨Wnt/β-cat信息通路、MMP-7在HNPCC侵袭转移中可能的作用, 希望为以后深入研究打下基础.

**方法**: 应用免疫组化SP法检测HNPCC ($n$ = 30)、散发性大肠癌(sporadic CRC) ($n$ = 30)和正常大肠黏膜($n$ = 8)中E-cad, β-cat和MMP-7的表达情况.

**结果**: E-cad和胞膜表达β-cat在HNPCC中的阳性表达率高于其在sporadic CRC中的表达率(E-cad: 86.7% *vs* 60.0%; 胞膜β-cat: 83.3% *vs* 50.0%, 均$P$<0.05). 而胞质表达β-cat和MMP-7则相反(胞质β-cat: 46.7% *vs* 80.0%; MMP-7: 46.7% *vs* 86.7%; 均$P$>0.05). 两组中E-cad, 胞膜表达β-cat, 胞质表达β-cat, MMP-7的阳性表达率与患者的性别和肿瘤的大小、部位及分化类型均无关; 而与肿瘤的侵犯深度和转移与否密切相关($r$ = 0.732, $P$<0.05). E-cad与胞膜表达β-cat呈正相关($r$ = 0.477, $P$<0.05), 胞膜表达β-cat与胞质表达β-cat呈负相关($r$ = -0.419, $P$<0.05), 而胞质表达β-cat与MMP-7呈正相关($r$ = 0.380, $P$<0.05).

**结论**: E-cad, β-cat和MMP-7在HNPCC和sporadic CRC中的阳性表达率差异显著. 可能是HNPCC在获得诊断时侵袭弱、转移少和预后较好的原因之一.

**关键词: 遗传性非息肉病性大肠癌; 散发性大肠癌; 上皮钙黏附蛋白; β-连接素; 基质金属蛋白酶-7; 病理; 免疫组化**

顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 周晓武, 李德昌, 胡益云. 遗传性非息肉病性大肠癌组织E-cad, β-cat和MMP-7表达在侵袭转移中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2031-2036
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2031.asp

## 0 引言

遗传性非息肉病性大肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)又称Lynch综合征, 是一种由错配修复基因(mismatch repair gene, MMR)突变引起的常染色体显性遗传病[1]. 作为大肠癌(colorectal cancer, CRC)的一个临床亚型, HNPCC的遗传病因特殊、临床病理特点突出[2-4]. 研究发现, HNPCC虽然具有发病年龄早、病理分化类型差、多原发癌多见的特点, 但其预后却明显好于散发性大肠癌(sporadic colorectal cancer, sporadic CRC)[2-6]. 原因在获得诊断时, HNPCC比sporadic CRC的侵袭更弱、转移更少[6]. 诸多因素参与CRC的侵袭和转移, 其中肿瘤旁分泌和/或自分泌的上皮钙黏附蛋白(E-cadherin, E-cad)、β-连接素(β-catenin, β-cat)和基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)是重要的因素[7-9]. E-cad是一种$Ca^{2+}$依赖性细胞黏附分子, 介导上皮细胞黏附, 保持肿瘤组织的完整性, 阻止肿瘤细胞脱离原发灶, 从而抑制肿瘤转移. E-cad需与β-cat结合才能发挥上述生物作用. β-cat除参与细胞间黏附外, 也是Wnt/β-cat信息通路的关键因子[10]. 而MMP-7则是Wnt/β-cat信号通路的下游靶基因产物, 其直接参与分解基底膜和细胞外基质造成肿瘤侵袭和转移[11]. 因此, E-cad, β-cat和MMP-7的突变或表达异常直接影响肿瘤的侵袭和转移, 并与生存和预后密切相关. 目前, 综合研究3者在CRC病变中表达的报道不多, 而3者在HNPCC中表达及相互关系的研究尚未见报道. 我们采用免疫组化SP染色法检测E-cad, β-cat和MMP-7在HNPCC和sporadic CRC中的表达, 探讨其与HNPCC上述生物学行为之间的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 1980-05/2005-06收治HNPCC 30例(男23例, 女7例; 年龄18-68岁; 结肠21例, 直肠9例; Dukes A2, B19, C7, D2), 全部病例均符合Amsterdam Ⅱ标准[12]. 同期收治年龄≥60岁、没有家族遗传倾向和多原发癌的sporadic CRC患者30例(男20例, 女10例; 年龄60-89岁; 结肠19例, 直肠11例; Dukes A1, B11, C15, D3)和正常大肠组织8例(男6例, 女2例; 年龄45-70岁; 结肠6例, 直肠2例). 标本石蜡固定. 全部肿瘤病例术前均未行放化疗. 均经HE染色确诊. 3组的年龄差异明显(46.0±10.6 *vs* 70.3±7.2, 57.8±8.1, $P$<0.01, $P$<0.05). E-cad鼠抗人mAb(ZM-0092), β-cat鼠抗人mAb(ZM-0442), MMP-7鼠抗人mAb(ZM-0334), SP试剂盒, DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物公司. 试验由LAB vision Autostainer360自动染色仪系统(福建迈新公司)程控完成、镜下图像以Olympus Dp70图像采集分析仪进行采集、分析.

1.2 方法 实验按产品说明书操作. 切片常规脱蜡至水, E-cad和β-cat组微波修复5 min, MMP-7组不需抗原修复. 30 mL/L $H_2O_2$孵育10 min, 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min, 滴加正常兔血清工作液, 孵育10 min后倾去, 不洗; 滴加一抗37℃孵育2 h, PBS冲洗3 min×3次. 滴加二抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次. 滴加三抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次, DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. PBS代替一抗作阴性对照, 正常大肠黏膜上皮表达情况作阳性对照. 在200倍的

表 1 大肠癌组织E-cad, β-cat, MMP-7的阳性表达*n*

| 分组 | *n* | E-cad | β-cat胞膜 | β-cat胞质 | MMP-7 |
|---|---|---|---|---|---|
| HNPCC | 30 | 26[a] | 25[a] | 14 | 14 |
| sporadic CRC | 30 | 18 | 15 | 24 | 26 |
| 正常大肠黏膜 | 8 | 8[a] | 8[a] | 0[a] | 0[a] |

[a]*P*<0.05 *vs* sporadic CRC组.

■应用要点
E-cad, β-cat, MMP-7有可能成为判断大肠癌侵袭能力及预后的一个指标. 目前MMP和β-cat的化学合成的抑制剂已开始用于肿瘤的临床治疗, 本研究为新药物的应用提供了一些有益的参考.

视野下随机选取10个视野, 计数每个视野中正常黏膜或肿瘤细胞的染色情况, 取平均值. E-cad表达定位于细胞膜; 胞膜阳性细胞数≥70%记为E-cad阳性. 从胞膜、胞质两方面观察β-cat的表达[2]. β-cat在胞膜阳性细胞数≥70%记为β-cat胞膜表达, β-cat在胞质阳性细胞数>30%记为β-cat胞质表达. MMP-7定位于胞质. 依据染色强度和阳性细胞率综合计算评分. 染色强度: 0为无染色; 1为染色弱; 2为中等染色强度; 3为染色强. 阳性细胞率: 0为<5%; 1为<25%; 2为<50%; 3为<75%; 4为≥75%. 以染色强度与阳性细胞率之和计算评分, 0-2分为阴性(-), 3-5分为阳性(+), 6-7分为强阳性(++). 两名高年资病理科医生双盲法读.

**统计学处理** 应用SPSS13.0统计软件包进行统计分析. 计数资料采用两个或多个样本率比较的$\chi^2$检验, 正态分布计量资料采用随机设计的两总体均数的*t*检验, 偏态分布计量资料采用两组完全随机设计的Mann-Whitney秩和检验. 积分相关性采用Spearman等级相关分析, *P*<0.05为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 E-cad, β-cat, MMP-7的表达 E-cad和β-cat呈棕黄色细颗粒状主要表达于上皮细胞-细胞接触侧的胞膜上, β-cat也可在胞质和胞核中异常表达; 肿瘤间质不染色或浅染. MMP-7主要表达在胞质, 呈棕黄色颗粒状, 部分胞膜染色, 肿瘤间质不染色. Sporadic CRC组中E-cad, β-cat, MMP-7的表达与HNPCC组和正常黏膜组差异显著(表1). E-cad, β-cat, MMP-7的阳性表达率与患者的性别及肿瘤大小、部位无明显关系(*P*>0.05), 而与肿瘤的侵犯深度和是否转移密切相关, 即与CRC的Dukes分期密切相关, 胞质表达β-cat和MMP-7在侵犯浆膜外组织和有转移者的阳性表达率明显高于侵犯限于浆膜和无转移者(*P*<0.05). 而E-cad和胞膜表达β-cat结果则相反(表2).

2.2 E-cad, β-cat, MMP-7表达的相关性 HNPCC和sporadic CRC两组中E-cad和胞膜表达β-cat的表达均呈正相关, 而胞膜表达β-cat和胞质表达β-cat呈明显的负相关, 胞质表达β-cat和MMP-7呈明显正相关. 其中HNPCC组E-cad与胞膜表达β-cat的$r$ = 0.438, $P$ = 0.015; 胞膜表达β-cat与胞质表达β-cat的$r$ = -0.449, $P$ = 0.013; 胞质表达β-cat与MMP-7的$r$ = 0.393, $P$ = 0.031; 而sporadic CRC组中E-cad与胞膜表达β-cat的$r$ = 0.516, $P$ = 0.004; 胞膜表达β-cat与胞质表达β-cat的$r$ = -0.389, $P$ = 0.034; 胞质表达β-cat与MMP-7的$r$ = 0.367, $P$ = 0.046(表3).

## 3 讨论

在肿瘤的发生、发展过程中存在着多种基因结构或功能改变, 先发生改变的上游基因可能是其下游基因改变的原因. 因此, 上游基因在肿瘤的发生、发展中可能起着更关键的作用[13]. 在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移中, Wnt/β-cat信息通路起着非常重要的作用[14-16]. β-cat是Wnt/β-cat信息通路的关键因子. 研究显示, β-cat在肿瘤的侵袭转移中却起着双重作用; 在胞膜正常表达的β-cat与$Ca^{2+}$依赖性细胞黏附分子——E-cad结合参与介导上皮细胞黏附, 保持肿瘤组织的完整性, 阻止肿瘤细胞脱离原发灶, 从而抑制肿瘤转移[11,13-16]. 而进入胞质中的β-cat如不能被APC分解将造成β-cat在胞质和胞核中的积累和异常表达. 异常表达的β-cat启动Wnt/β-cat信息通路的下游靶基因, 而MMP-7就是Wnt/β-cat信号通路的一个靶基因产物. MMP-7在MMP家族中分子质量最小, 而且是唯一在肿瘤细胞表达、不在肿瘤间质表达的MMP. 因其分子结构中缺乏与组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)相互作用的C末端区域, 使MMP-7具有强大的基质降解功能和广泛的底物特异性, 同时受TIMP的负调节作用较小.

■名词解释
遗传性非息肉病性大肠癌(HNPCC): 是一种由错配修复基因(MMR)种系突变造成的常染色体显性遗传病, 约占全部大肠癌的5%. 国际上多采用Amsterdam Ⅱ标准, 即: (1)家系中至少有3例HNPCC相关肿瘤(包括大肠癌、子宫内膜癌、小肠癌、肾盂输尿管癌)患者; (2)大肠癌至少连续2代发病; (3)至少1例在50岁之前被诊断. 国内2003年杭州会议制定了中国人HNPCC筛检标准. 其临床诊断标准涵盖范围较广, 同时也兼顾了小家系和我国肿瘤谱的特点. 比较符合临床需要.

表 2 大肠癌E-cad, β-cat, MMP-7阳性表达与临床病理的关系*n*(%)

| 分组 | 项目 | | *n* | E-cad | β-cat胞膜 | β-cat胞质 | MMP-7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HNPCC | 性别 | 男 | 23 | 21(91.3) | 20(87.0) | 9(39.1) | 11(47.8) |
| | | 女 | 7 | 5(71.4) | 5(71.4) | 5(71.4) | 3(42.9) |
| | 大小 | <4 cm | 16 | 14(87.5) | 13(81.3) | 8(50.0) | 7(43.8) |
| | | ≥4 cm | 14 | 12(85.7) | 12(85.7) | 6(42.9) | 7(50.0) |
| | 部位 | 右半结肠 | 18 | 16(88.9) | 16(88.9) | 9(50.0) | 10(55.6) |
| | | 左半结肠 | 3 | 3(100) | 2(66.7) | 1(33.3) | 1(33.3) |
| | | 直肠 | 9 | 7(77.8) | 7(77.8) | 4(44.4) | 3(33.3) |
| | 侵袭 | 浆膜内 | 21[a] | 21(100) | 20[a](95.2) | 7(33.3) | 7(33.3) |
| | | 浆膜外 | 9 | 5(55.6) | 5(55.6) | 7[a](77.8) | 7(77.8) |
| | 淋巴结转移 | 无 | 21 | 21[a](100) | 20[a](95.2) | 7(33.3) | 6(28.6) |
| | | 有 | 9 | 5(55.6) | 5(55.6) | 7[a](77.8) | 8(88.9) |
| sporadic CRC | 性别 | 男 | 20 | 11(55.0) | 10(50.0) | 17(85.0) | 18(90.0) |
| | | 女 | 10 | 7(70.0) | 5(50.0) | 7(70.0) | 8(80.0) |
| | 大小 | <4 cm | 13 | 8(61.5) | 7(53.8) | 11(84.6) | 10(76.9) |
| | | ≥4 cm | 17 | 10(58.8) | 8(47.1) | 13(76.5) | 16(94.1) |
| | 部位 | 右半结肠 | 14 | 9(64.3) | 9(64.3) | 12(85.7) | 13(92.9) |
| | | 左半结肠 | 5 | 3(60.0) | 2(40.0) | 3(60.0) | 4(80.0) |
| | | 直肠 | 11 | 6(54.5) | 4(36.4) | 9(81.8) | 9(81.8) |
| | 侵袭 | 浆膜内 | 14 | 12[a](85.7) | 10[a](71.4) | 9(64.3) | 10(71.4) |
| | | 浆膜外 | 16 | 6(37.5) | 5(31.3) | 15[a](93.8) | 16[a](100) |
| | 淋巴结转移 | 无 | 12 | 10[a](83.3) | 9[a](75.0) | 7(58.3) | 8(66.7) |
| | | 有 | 18 | 8(44.4) | 6(33.3) | 17[a](94.4) | 18[a](100) |

[a]$P<0.05$.

表 3 HNPCC和sporadic CRC组织E-cad, β-cat, MMP-7阳性表达的相关性*n*

| 分组 | | | *n* | E-cad | 胞膜β-cat | 胞质β-cat |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HNPCC | 胞膜β-cat | (-) | 5 | 5 | | |
| | | (+) | 25 | 21 | | |
| | 胞质β-cat | (-) | 16 | 12 | 15 | |
| | | (+) | 14 | 14 | 10 | |
| | MMP-7 | (-) | 16 | 12 | 15 | 2 |
| | | (+~++) | 14 | 14 | 10 | 12 |
| sporadic CRC | 胞膜β-cat | (-) | 15 | 6 | | |
| | | (+) | 15 | 12 | | |
| | 胞质β-cat | (-) | 6 | 3 | 5 | |
| | | (+) | 24 | 15 | 10 | |
| | MMP-7 | (-) | 4 | 0 | 0 | 3 |
| | | (+~++) | 26 | 18 | 15 | 21 |

因此, 在CRC的侵袭转移过程中MMP-7的作用比其他MMP成员更重要. MMP-7可直接参与分解基底膜和细胞外基质造成肿瘤侵袭、转移; 同时MMP-7也参与胞膜中的E-cad和β-cat的分解, 加速胞质表达β-cat的积累表达. 因此, E-cad, β-cat和MMP-7与CRC的侵袭、转移密切相关. 本研究结果显示, E-cad和胞膜表达β-cat在CRC中的表达较正常组织减少; 且随肿瘤侵袭深度加深、出现淋巴结转移而表达明显降低, 差异显著; 而胞质表达β-cat和MMP-7的表达则相反. 这说明β-cat的表达异常不但参与了CRC的早期发生, 而且还影响到CRC的侵袭、转移. 目前认

为肿瘤的发生、发展、侵袭、转移属于肿瘤整个生物学进程的不同阶段, 从基因突变意义上可以认为在肿瘤的起源阶段已决定了肿瘤的转移现状[17]. 本研究结果显示, β-cat蛋白表达异常贯穿了CRC从早期发生直至晚期转移的全过程, 与这一理论相吻合.

本研究显示, 在HNPCC和sporadic CRC中E-cad, β-cat和MMP-7表达的差异显著. 因为3者都与CRC的侵袭、转移密切相关. 所以, 这可能是HNPCC在获得诊断时侵袭弱、转移少的一个可能的原因. 分析产生上述结果的原因: HNPCC是由于MMR的种系突变引起, 而sporadic CRC则多是由APC基因的突变引起[18-20], HNPCC中的APC基因突变明显少于sporadic CRC. 突变失活的APC蛋白无法分解胞质中的β-cat复合物, 从而造成浆表达β-cat在胞质中的积累并启动MMP-7的表达, 因此加速了肿瘤的侵袭转移; MMR在引起HNPCC发病的同时, 也造成了其下游基因转化生长因子βⅡ型受体(transforming growth factor β receptor type Ⅱ, TβRⅡ)的突变失活[21]; 这将使转化生长因子β(TGFβ)通过Smad7的介导参与降解胞膜中E-cad和胞膜表达β-cat的能力减弱[22-24], 因此导致HNPCC中E-cad和胞膜表达β-cat的表达较sporadic CRC增加. 这有待我们进一步研究. Johnson *et al*[25]报道HNPCC中β-cat的第3外显子突变较sporadic CRC明显增多, 但此种突变产生的β-cat蛋白仍有其生物活性.

目前化学合成的β-cat抑制剂和MMP抑制剂已开始进入临床并成为肿瘤治疗领域的热点[26-27]. 但目前该类药物价格较昂贵. 我们的研究结果为临床应用选择性β-cat抑制剂和MMP抑制剂治疗CRC的侵袭转移提供了一个有益的参考. 我们认为如同乳腺癌内分泌治疗前需进行雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)等检测一样, 在应用β-cat抑制剂和MMP抑制剂药物对大肠癌患者进行治疗前可能对患者肿瘤组织和/或血清样本进行相应的β-cat, MMP检测是适宜的. 以免造成药物的浪费和增加患者的经济负担. 因此, 本研究结果为临床应用β-cat抑制剂和MMP抑制剂选择性治疗CRC的侵袭转移提供了一个有益的参考.

## 4 参考文献


1 Jass JR. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4943-4950

2 顾国利, 王石林, 魏学明, 周晓武, 黄蓉蓉. 大肠多原发癌临床分析42例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1933-1936

3 王达, 薛英威, 周宪军, 乔凤, 张妍, 李辉, 赵亚双. 遗传性非息肉病性大肠癌13家系分析. 世界华人消化杂志 2005; 13: 180-183

4 Colombino M, Cossu A, Manca A, Dedola MF, Giordano M, Scintu F, Curci A, Avallone A, Comella G, Amoruso M, Margari A, Bonomo GM, Castriota M, Tanda F, Palmieri G. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13: 1447-1453

5 盛剑秋, 李世荣, 杨欣艳, 张英辉, 苏惠, 余东亮, 闫伟, 耿洪刚. 遗传性非息肉病性大肠癌和家族性腺瘤性息肉病腺瘤的预防性干预治疗. 中华医学杂志 2006; 86: 526-529

6 Behrens P, Mathiak M, Mangold E, Kirdorf S, Wellmann A, Fogt F, Rothe M, Florin A, Wernert N. Stromal expression of invasion-promoting, matrix-degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer* 2003; 107: 183-188

7 赵晶, 王凤安, 刘津, 闫庆辉, 张杰英, 薛平, 蔡建辉. 上皮钙粘蛋白在大肠癌转移淋巴结癌细胞中的再表达及意义. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1351-1352

8 顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 郑爱民, 黄蓉蓉, 胡益云. 大肠癌E-cadherin, β-catenin, MMP-7表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2007; 15: 375-380

9 Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231: 20-27

10 Chen WC, Lin MS, Zhang BF, Fang J, Zhou Q, Hu Y, Gao HJ. Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 699-708

11 李琳娜, 袁守军. Wnt/β-catenin信号通路与大肠癌的始发和防治策略. 世界华人消化杂志 2006; 14: 201-206

12 Lenz HJ. First Amsterdam, then Bethesda, now Melbourne? *J Clin Oncol* 2005; 23: 6445-6449

13 Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 1033-1038

14 戴文斌. Wnt通路中APC、β-catenin及c-myc与大肠癌的关系. 广西医学 2006; 28: 233-235

15 Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 477-487

16 Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850

17 Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer-a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001; 11: S44-51

18 张丽娟. β-catenin、APC及C-myc与大肠癌的关系. 实用癌症杂志 2006; 21: 93-96

19 Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, Hayashi Y, Koike M, Shitara N, Iwama T, Kuroki T. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 4506-4509

20 Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* 2003; 2: 41


**■同行评价**

本文选择与大肠癌转移和侵袭密切相关的几个指标检测遗传性非息肉病性大肠癌的转移和侵袭, 文章设计合理, 内容丰富, 有一定的创新性和可读性.

21 Shin KH, Park YJ, Park JG. Mutational analysis of the transforming growth factor beta receptor type II gene in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early-onset colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 536-540
22 Tian YC, Phillips AO. Interaction between the transforming growth factor-beta type II receptor/Smad pathway and beta-catenin during transforming growth factor-beta1-mediated adherens junction disassembly. *Am J Pathol* 2002; 160: 1619-1628
23 Labbe E, Letamendia A, Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8358-8363
24 Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2003; 278: 21113-21123
25 Johnson V, Volikos E, Halford SE, Eftekhar Sadat ET, Popat S, Talbot I, Truninger K, Martin J, Jass J, Houlston R, Atkin W, Tomlinson IP, Silver AR. Exon 3 beta-catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Gut* 2005; 54: 264-267
26 袁云霞, 徐文方, 刘健, 陈明慧, 孟红, 曲显俊. 基质金属蛋白酶抑制剂LY52对人卵巢上皮癌细胞SKOV3中MMP-2, MMP-9表达及其侵袭转移能力的抑制作用. 癌症 2006; 25: 663-670
27 段光杰, 阎晓初, 章容, 卞修武, 王清良, 刘丽梅, 陈春燕. β-catenin和MMP-7表达与大肠癌侵袭转移的关系研究. 第三军医大学学报 2006; 28: 227-230

电编 张敏 编辑 程剑侠

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

**本刊讯** 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平, 《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐市召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”, 邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告. 会议将出论文汇编, 并授予继续教育Ⅰ类学分, 《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文.

## 1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术; 内镜外科的临床应用及进展; 食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等); 消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展; 消化内镜消毒及护理技术, 消化系统疾病的急诊护理.

## 2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印, 并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份; 已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件, 请注明稿号. 应征文章经单位推荐盖公章后, 寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收. 邮编: 210003. 信封左下脚注“征文”字样, 同时汇寄审稿费10元. 请自留底稿, 恕不退稿. 截稿日期2007-05-31. 有关会议的具体事项另行通知. 联系电话: 025-83472831, 86086091.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2037-2041
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

# CDX2基因与肠型胃癌关系的研究进展

武 洋, 辛 彦

武洋, 辛彦, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室 辽宁省沈阳市 110001
**通讯作者:** 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室.
yxin@mail.cmu.edu.cn
电话: 024-83282351 传真: 024-83282375
收稿日期: 2007-04-19 接受日期: 2007-05-22

## Expression of caudal-related homeobox transcription factor caudal-related homeobox transcription factor 2 in intestinal-type carcinoma

Yang Wu, Yan Xin

Yang Wu, Yan Xin, Lad. 4 Cancer Institute, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang City 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Yan Xin, Lad.4 Cancer Institute, The First Affiliated Hospital of China Medical University, No. 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yxin@mail.cmu.edu.cn
Received: 2007-04-19 Accepted: 2007-05-22

## Abstract
Gastric carcinoma can be divided into two types by the Lauren classification: intestinal and diffuse-type carcinoma. Intestinal-type carcinoma is thought to develop from normal mucosa, intestinal metasplasia and dysplasia, ultimately leading to gastric cancer. Caudal-related homeobox transcription factor 2 (CDX2), an intestinal-specific transcription factor, is a member of the caudal- related homeobox gene family and plays an important role in the development and differentiation of intestinal epithelium, and in the maintenance of intestinal phenotype. In normal adults, CDX2 is expressed in mucosa from the duodenum to the distal colon. Recent studies have found that aberrant expression of CDX2 plays a crucial role in intestinal metaplasia formation and intestinal carcinoma.

Key Words: Caudal-related homeobox transcription factor 2; Dysplasia; Intestinal metaplasia; Gastric carcinoma

Wu Y, Xin Y. Expression of caudal-related homeobox transcription factor caudal-related homeobox transcription factor 2 in intestinal-type carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2037-2041

## 摘要
根据Lauren分型, 胃癌分为肠型和弥漫型胃癌两种. 肠型胃癌经历了正常胃黏膜、肠上皮化生到异型增生再到肠型胃癌的多步骤、多阶段逐渐发展的过程. 肠道特异性转录因子(caudal-related homeobox transcription factor 2, CDX2), 对肠黏膜上皮的发育及保持其形态起着重要作用. 正常情况下其产物特异的表达于小肠和结肠上皮中. 迄今的研究发现, CDX2基因的异常表达与胃黏膜肠上皮化生和肠型胃癌的发生密切相关.

**关键词: 果蝇相关同源异型框转录因子2; 异型增生; 肠化生; 胃癌**

武洋, 辛彦. CDX2基因与肠型胃癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2037-2041
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2037.asp

**■背景资料**
关于CDX2在肠型胃癌中的表达的研究中Bai *et al*及Kaimaktchiev *et al*发现CDX2在肠化生及胃癌组织中高表达, 肠型胃癌高于弥漫型. Mizoshita *et al*也认为CDX2表达改变更多地出现于分化型胃癌(即肠型胃癌)的早期阶段. 本文以肠型胃癌的发生、发展为一主线, 将近年关于CDX2基因与肠型胃癌的关系的研究进展及其相关分子机制的研究作一简要概述.

## 0 引言
果蝇相关同源异型框转录因子2(caudal-related homeobox transcription factor 2)即CDX2最早由Mlodzik于果蝇体内分离, 是人体终身在肠道特异性表达的核转录因子, 在肠黏膜上皮细胞的发育及保持形态、结构特征中起着重要作用. 肠型胃癌被认为经历了由正常胃黏膜、肠上皮化生到异型增生再到肠型胃癌的多步骤、多阶段逐渐发展的过程. 迄今越来越多的研究发现[1], CDX2基因的异常表达与胃黏膜肠上皮化生和异型增生以及胃癌的发生密切相关. 本文将近年关于CDX2基因与胃黏膜癌前病变及肠型胃癌的关系以及相关分子机制的研究进展作一介绍.

## 1 CDX2基因的结构与功能
CDX2为果蝇同源异型框基因家族成员之一. 同源异型框基因及相关蛋白是以核转录调节因

■同行评价
本文综述了CDX2基因与肠型胃癌关系的研究概况, 为该领域的前沿内容之一, 有一定新意和可读性, 对胃癌相关领域研究有参考价值.

子的形式调节生物结构及细胞分化, 在生物体的不断演化过程中决定着生物体正常结构, 并始终保持相对的保守性. 根据基因序列及染色体分布区域的异同, 同源异型框基因及相关蛋白可分为两大家族: HOX及PARAHOX家族. 前者包括HOX-A, HOX-B, HOX-C及HOX-D 4类, 后者包含GSH, PDX和CDX(CDX1, CDX2, CDX4)[2].

1.1 CDX2基因及编码蛋白的结构特征 CDX2基因及编码蛋白与PARAHOX家族呈高度的同源性[3]. 近年来人染色体研究表明CDX2基因位于染色体13q12-13, 全长22-23 kb, 由3个外显子和2个内含子构成. CDX2蛋白包含311个单氨基酸, 通过螺旋-环-螺旋的方式结合于DNA的相应区域, 以转录因子的形式调节DNA的表达[4].

1.2 CDX2的功能 CDX2在哺乳动物中的表达决定器官发生、前后极性形成和细胞分化的一致性. CDX2的存在是受精卵种植的必需条件之一. 正常生物体发育过程中CDX2为肠特异性转录因子, 调节着肠上皮细胞的增殖、分化及肠表型的维持. 对消化道特别是结肠和小肠上皮的发育起着关键的作用. Beck *et al*[3]研究发现CDX2可对肠道特异基因的转录进行调节并作为一种肿瘤抑制基因, 人为敲除小鼠CDX2将导致错构的息肉和管状腺瘤的发生. 此外人们在体外细胞系的研究中发现CDX2具有显著的诱导细胞向肠上皮分化的作用[5].

1.3 CDX2在正常组织中的表达 CDX2最初在胎儿期广泛表达, 但从新生儿早期开始表现出明显的组织表达特异性, 渐定位于小肠, 结肠和胰腺小导管上皮, 在整个成年期仅在肠道腺上皮中表达[6]. 在人体正常上皮细胞中CDX2可表达于内胚层来源的肠道上皮及胰腺的导管和腺泡上皮, CDX2在小肠和盲肠中表达较高, 远端结肠表达降低. 但CDX2在其他器官组织如食管、肺、胃、肾、膀胱、乳腺、肝、前列腺和胆总管上皮中没有表达[7], Kaimaktchiev *et al*[8]也观察到了类似的结果, 表明CDX2在正常肠道上皮中具有较高的特异性.

1.4 CDX2在肿瘤中的表达 2003年Werling *et al*[7]观察了476例人消化道肿瘤CDX2蛋白的表达情况, 发现食管、胃、十二指肠、结肠、胰腺、胆囊等消化道上皮肿瘤中均可不同程度检测到CDX2表达, 其中结肠和十二指肠表达最强. 然而CDX2并非特异性在消化道肿瘤中表达, Werling *et al*[7]在较高比例的黏液性卵巢癌及膀胱癌中也发现了CDX2的高水平表达. Kaimaktchiev *et al*[8]发现约10%的子宫内膜组织样癌中有CDX2表达, 但在肺, 乳腺, 肾等各个器官的上皮性肿瘤中均无表达. 有学者报道, 消化道的类癌可出现CDX2的阳性表达, 认为CDX2可能与消化道神经内分泌癌的起源有关[9].

## 2 CDX2与肠型胃癌的关系

2.1 胃黏膜肠上皮化生 研究表明CDX2蛋白在正常胃黏膜中无表达, 在绝大多数胃黏膜肠化生中呈阳性表达, 提示CDX2蛋白在胃黏膜细胞中的异位表达是发生胃黏膜肠化生的重要起始事件, 而CDX2蛋白诱导MUC2等肠道特异性基因的表达最终导致胃上皮细胞转分化为肠型上皮细胞[10]. Eda *et al*[11]研究发现在鸡胚胎中胃上皮细胞向小肠表型细胞的转化过程中, 存在CDX2的诱导表达, 提示CDX2可特异性诱导肠黏膜上皮分化. Eda *et al*[11]首次报道了CDX1和CDX2的mRNA在胃黏膜肠化生中的表达. 他们在对人类胃组织标本进行分析时发现CDX2的表达不仅仅是肠化生的结果, 更是启动肠化生的触发器. Silberg *et al*[12]也发现CDX2异位表达可诱导转基因小鼠胃黏膜肠化生. 利用Foxa顺式调控元件对转基因小鼠进行CDX2导入, 发现小鼠胃黏膜出现肠上皮化生: 出现阿辛蓝阳性的肠型杯状细胞[13]. CDX2的异常表达使胃黏膜上皮转变为肠上皮, 那么其间质是否也由胃型转变为肠型呢? Mutoh *et al*[14]利用CDX2转基因小鼠研究在肠化生中胃黏膜间质是否有腺周成纤维细胞(PCFS)的存在, 以此来检查肠化生中间质的改变情况. 正常情况下PCFS仅存在于肠的小隐窝内, 在正常胃腺中不存在. 研究发现在CDX2转基因小鼠胃的肠化生上皮的基底膜周围有PCFS的存在, 在肠化生隐窝基底的周围也有PCFS的存在, 而在肠型腺癌中完全没有PCFS的存在. 因此Mutoh认为在CDX2诱导的胃黏膜的肠上皮化生中其上皮和间质都由胃表型转变为肠表型. 在胃黏膜肠化生中, 由于化生细胞由胃表型逐渐转化为肠表型, 具有了肠上皮的特征, 因此推测CDX2在该表型转换过程中可能起重要作用. Mizoshita *et al*[12,15-16]先后发现CDX2在胃黏膜的肠化生中呈高水平表达, 在胃癌发生的早期阶段也有表达, 并认为其表达与胃表型向肠表型的转换相关联.

2.2 CDX2与胃黏膜异型增生 胃黏膜的异型增生与CDX2的异常表达有关. Rugge *et al*[17]发现在

一些异型增生(尤其是重度)中有CDX2蛋白表达的缺失, 提示随着异型增生的发展CDX2的表达可呈递减趋势. Bai *et al*[18]的研究中也发现CDX2基因的异常表达与异型增生的形成有关. 但是同时也发现CDX2基因在轻度和中度异型增生中表达较低, 提示部分异型增生的形成及其癌变机制可能有其他的机制或多种机制共同参与. 在一项应用免疫组织化学方法已经诊断为胃癌或非浸润性肿瘤的160例病例中研究CDX2基因的表达情况, 按照Padova分型标准分为60例低度异型增生, 55例高度异型增生和45例肠化生病例. 结果显示CDX2基因在73.3%低度异型增生、85.5%高度异型增生和91.1%的肠化生病例中的表达为阳性. 这个结果意味着CDX2基因可能为胃癌发生的早期事件, 也可以是胃癌进一步发展的一个指标, 还有待进一步的研究[19]. Woodland *et al*[20]与大多数学者的研究结论不一致, 他应用免疫细胞化学染色和HE染色对已有组织蜡块的回顾性研究发现,随着异型增生的发展, CDX2的表达逐渐增高, 但是与异型增生的伴随程度之间无统计学意义.

2.3 CDX2与胃癌 1965年Lauren根据组织形态及组织化学, 将胃癌分为肠型和弥漫型胃癌. 两者不仅形态与组织化学所见不同, 预后和流行病学上也不相同. Ko *et al*[21]在一组胃癌和非胃癌的病例对照研究中也发现在胃腺癌中CDX2表达较高, 尤其在组织结构为管状腺癌, 且分化较好的肠型胃癌中, 而作为对照的正常胃黏膜上皮却为阴性. 同时人们也已经在CDX2转基因小鼠模型中成功诱导出胃黏膜上皮的肠上皮化生并进一步演变成胃腺癌. Bai *et al*[18]及Kaimaktchiev *et al*[22]发现CDX2在肠化生及胃癌组织中高表达, 且其表达与胃癌组织类型独立相关, 肠型胃癌高于弥漫型. Mizoshita *et al*[23]也认为CDX2表达改变更多地出现于分化型胃癌(即肠型胃癌)的早期阶段. 分析原因可能与不同组织类型胃癌其细胞来源不同有关. 但Almeida *et al*[24]则认为在2种类型胃癌中CDX2表达其实并无差异. Mutoh *et al*[25]的研究发现胃黏膜CDX2异位表达之后发生的胃黏膜肠上皮化生, 伴有P53, APC基因突变, 提示在CDX2异位表达后合并发生其他分子事件是导致肠化生进展为胃癌的重要原因. 另一方面, CDX2蛋白表达在肠型胃癌和弥漫型胃癌中的差异提示CDX2蛋白异位表达似与肠型胃癌的发生更为相关, 而CDX2蛋白表达后进一步诱导MUC2等肠道特异性表达基因的表达是肿瘤细胞呈现肠型表型的重要原因[10]. Groisman *et al*[26]和Werling *et al*[7]的研究中发现胃癌肠转移病例中CDX2表达阳性, Barbareschi *et al*[27]在胃癌的肺转移中也发现有CDX2的表达. 而Tornillo *et al*[28]的研究显示在胃癌的卵巢转移中CDX2表达为阴性, Jaffee *et al*[29]在胃癌的肝转移中也发现CDX2的阴性表达. 目前在CDX2与胃癌转移的关系方面的研究不是很多, 对于其关系还有待进一步的研究.

## 3 CDX2在肠型胃癌发生中的作用及相关机制

胃癌的发生、发展是多基因异常引起的渐进性过程. 从正常胃黏膜-肠化生-异型增生再向胃癌的发生、发展中有多种基因的参与, 其中CDX2在肠上皮化生过程中的表达要早于CDX1, SI以及其他肠特异性基因, 可能是肠型胃癌的形成中的早期事件, 他的作用机制涉及同源分子间、细胞内外分子间相互作用的各个方面.

3.1 CDX2与OCT-1 同源域(homeodomain)蛋白是一大类DNA结合蛋白, 代表性的成员有Pit-1, OCT-1, OCT-2和unc-86, 他们都有共同的结构式样, 称为POU结构域, 包括2个亚结构域及其连接区, N端是75氨基酸的POU特异性结构域($POU_S$), C端60氨基酸为POU同源域结构($POU_H$). 根据$POU_H$氨基酸序列和连接区的保守性, Oct-1的$POU_H$和$POU_S$有相似的立体构象, 对八聚体元件ATGCAAAT有高亲和性. Almeida *et al*[30]的研究中发现OCT-1在慢性胃炎尤其是邻近肠化生的区域表达为阳性, 在87%的肠化生中为阳性. 此外74%的胃癌中也表达为阳性, 在肠型胃癌中阳性率更高. 结果还显示OCT-1可能束缚了CDX2的启动, 但是对于OCT-1对CDX2转活的直接效应还有待于进一步证实.

3.2 CDX2与肝肠钙黏连蛋白(LI-钙黏连蛋白) 肝肠钙黏连蛋白(liver intestin-cadherin LI-钙黏连蛋白)作为钙黏连蛋白家族的一员与经典的钙黏连蛋白分子虽具有相同的作用机制, 但是结构却不同. 分子生物学研究表明CDX2可特异性作用于LI-钙黏连蛋白的5端与LI-钙黏连蛋白直接结合, 从而促进LI-钙黏连蛋白的表达. Hinoi *et al*[31]的研究表明CDX2阳性表达的黏膜上皮中80%可以检测到LI-黏连蛋白; CDX2阴性表达的黏膜上皮中LI-黏连蛋白的表达基本为阴性, 二者的表达显示高度的一致性. Ko *et al*[21]发现在胃的肠化生和肠型胃癌中CDX2与LI-钙黏连蛋白的表达也存在高度的联系. 此外, LI-钙黏连蛋

白可能是调节CDX2功能的关键因素, 并以此来决定肠化的细胞命运.

3.3 CDX2与CDX1 CDX2与CDX1同属CDX家族, 在结构上具有高度的同源性. 虽然在胃肠道上皮发育的某些阶段(8.5-12 wk)可同时检测到二者的存在, 但CDX2与CDX1的分布及功能有许多不同之处. 作为核转录因子, CDX1产物主要负责肠道上皮细胞的增殖, 而CDX2产物则负责调控肠型上皮细胞的分化. CDX1基因与生物体的神经系统发育密切相关, 在CDX1基因敲除的小鼠中可以观察到神经系统的发育畸形. CDX2基因的表达可显著诱导未分化细胞向肠上皮分化, 而CDX1则无此作用[29]. Mizoshita *et al*[32]对70例胃癌标本分别用RNA印迹法和免疫组化法对CDX1/2mRNA和蛋白的表达, 得出CDX1/2对于肠表型的维持起重要作用, 在肠型胃癌的发生中起主要的作用, 但是在肠化生的发生中CDX2的表达要早于CDX1, 但是对于CDX1和CDX2表达的分子机制仍不是很清楚.

3.4 CDX2与MUC6 MUC6基因是Kim于1993年从人胃黏膜上皮cDNA文库中所克隆的基因, 他编码一种分泌性黏蛋白, 与其他黏蛋白基因一样, 存在可变数目的重复序列, 该重复序列所指导的氨基酸重复序列中富含苏氨酸、丝氨酸、脯氨酸. MUC6基因在胃黏膜的癌变过程中是下调表达的, 尤其是在肠上皮化生和胃癌组织中更明显、正常黏蛋白基因表达的大量丢失, 与胃癌发生过程可能有关, 至少提示胃癌的恶变过程中涉及黏蛋白基因表达的改变. Hamamoto *et al*[33]研究39例非小细胞肺癌(13例腺癌、18例鳞癌和8例大细胞癌)中CDX2和MUC6的表达, 得出MUC6的表达在异体嫁接(xenograft)腺癌中表达最高, 其次为异体嫁接非小细胞肺癌, 在鳞癌中表达最低. 异体嫁接腺癌在分子形态学属于胃癌的类型, 在异体嫁接腺癌中MUC6基因的表达与CDX2基因的表达紧密相关, 并因此得出在肺癌中CDX2的表达归因于胃癌特征性的MUC6的异常表达.

3.5 CDX2与PTEN PTEN为第一个被发现具有磷酸化酶活性的抑癌基因. PTEN位于10q23, 此区域在乳腺癌及前列腺癌中经常缺失. PTEN编码产物在从正常胃黏膜至肠型胃癌中表达下降, 提示与CDX2相似, PTEN基因的异常遗传学改变可能也参与了从正常胃黏膜至肠型胃癌的恶性转变过程, 可成为胃癌形成早期事件中新的标志物. Kim *et al*[34]的实验发现在结肠癌细胞系中抑癌基因PTEN可以通过刺激CDX2启动子转录活性增强CDX2的表达, 因此提示在肠上皮化生至肠型胃癌的转变中PTEN对CDX2的表达可能起到一定的调节作用, 成为PTEN胃癌抑制作用的新途径. 但在不同类型肠化生中虽然小肠型肠化生中CDX2水平明显高于结肠型肠化生, 而PTEN在不同类型肠上皮化生中的表达没有显著性差异. 表明对于CDX2的表达存在着复杂的调节机制, PTEN只是影响因素之一.

总之, 肠道特异性转录因子CDX2, 在肠黏膜上皮细胞的发育及保持其形态、结构特征中起着重要作用, 在胃黏膜癌前病变研究中受到极大的重视. CDX2基因的异常表达, 可造成胃黏膜肠上皮化生和异型增生, 并与胃癌(尤其是肠型胃癌)的发生、发展有关. 肠型胃腺癌被认为经历了由正常胃黏膜-肠上皮化生-异型增生-胃癌的发展过程, 然而, 对其演变过程的分子机制所知尚少. 目前虽对CDX2在肠化生、异型增生及肠型胃癌中的表达有一定的研究, 但是对于其机制仍不是很清楚, 因此, CDX2基因对肠上皮化生, 异型增生及肠型胃癌的作用机制有待于更深入的研究和探索.

## 4 参考文献


1 Li MK, Folpe AL. CDX-2, a new marker for adenocarcinoma of gastrointestinal origin. *Adv Anat Pathol* 2004; 11: 101-105

2 Beck F. Homeobox genes in gut development. *Gut* 2002; 51: 450-454

3 Beck F, Chawengsaksophak K, Luckett J, Giblett S, Tucci J, Brown J, Poulsom R, Jeffery R, Wright NA. A study of regional gut endoderm potency by analysis of Cdx2 null mutant chimaeric mice. *Dev Biol* 2003; 255: 399-406

4 Song Yan, Li Ling. CDX2, a specifically expressed in the epithelia of duodenom. *World Chin J Digestal* 2004; 12: 443-445

5 Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ, Furness JB. Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7318-7323

6 郭华, 张红英, 魏兵, 步宏. CDX-2——肠源性腺癌的新标记. 中华病理学杂志 2004; 33: 583

7 Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 303-310

8 Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, Korcheva V, Mirlacher M, Loda M, Sauter G, Corless CL. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2004; 17: 1392-1399

9 Moskaluk CA, Zhang H, Powell SM, Cerilli LA,

Hampton GM, Frierson HF Jr. Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays. *Mod Pathol* 2003; 16: 913-919
10 Mesquita P, Jonckheere N, Almeida R, Ducourouble MP, Serpa J, Silva E, Pigny P, Silva FS, Reis C, Silberg D, Van Seuningen I, David L. Human MUC2 mucin gene is transcriptionally regulated by Cdx homeodomain proteins in gastrointestinal carcinoma cell lines. *J Biol Chem* 2003; 278: 51549-51556
11 Eda A, Osawa H, Satoh K, Yanaka I, Kihira K, Ishino Y, Mutoh H, Sugano K. Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa. *J Gastroenterol* 2003; 38: 14-22
12 Eda A, Osawa H, Yanaka I, Satoh K, Mutoh H, Kihira K, Sugano K. Expression of homeobox gene CDX2 precedes that of CDX1 during the progression of intestinal metaplasia. *J Gastroenterol* 2002; 37: 94-100
13 Silberg DG, Sullivan J, Kang E, Swain GP, Moffett J, Sund NJ, Sackett SD, Kaestner KH. Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 689-696
14 Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Osawa H, Tomiyama T, Kita H, Yoshida T, Tamada K, Yamamoto H, Isoda N, Ido K, Sugano K. Pericryptal fibroblast sheath in intestinal metaplasia and gastric carcinoma. *Gut* 2005; 54: 33-39
15 Mizoshita T, Inada K, Tsukamoto T, Kodera Y, Yamamura Y, Hirai T, Kato T, Joh T, Itoh M, Tatematsu M. Expression of Cdx1 and Cdx2 mRNAs and relevance of this expression to differentiation in human gastrointestinal mucosa--with special emphasis on participation in intestinal metaplasia of the human stomach. *Gastric Cancer* 2001; 4: 185-191
16 Mizoshita T, Tsukamoto T, Inada K, Ogasawara N, Hirata A, Kato S, Joh T, Itoh M, Yamamura Y, Tatematsu M. Immunohistochemically detectable Cdx2 is present in intestinal phenotypic elements in early gastric cancers of both differentiated and undifferentiated types, with no correlation to non-neoplastic surrounding mucosa. *Pathol Int* 2004; 54: 392-400
17 Rugge M, Correa P, Dixon MF, Fiocca R, Hattori T, Lechago J, Leandro G, Price AB, Sipponen P, Solcia E, Watanabe H, Genta RM. Gastric mucosal atrophy: interobserver consistency using new criteria for classification and grading. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1249-1259
18 Bai YQ, Yamamoto H, Akiyama Y, Tanaka H, Takizawa T, Koike M, Kenji Yagi O, Saitoh K, Takeshita K, Iwai T, Yuasa Y. Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach. *Cancer Lett* 2002; 176: 47-55
19 Kim HS, Lee JS, Freund JN, Min KW, Lee JS, Kim W, Juhng SW, Park CS. CDX-2 homeobox gene expression in human gastric carcinoma and precursor lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 438-442
20 Woodland JG. CDX-2 and MIB-1 expression in the colorectum: correlation with morphological features of adenomatous lesions. *Br J Biomed Sci* 2006; 63: 68-73
21 Ko S, Chu KM, Luk JM, Wong BW, Yuen ST, Leung SY, Wong J. CDX2 co-localizes with liver-intestine cadherin in intestinal metaplasia and adenocarcinoma of the stomach. *J Pathol* 2005; 205: 615-622
22 Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, Korcheva V, Mirlacher M, Loda M, Sauter G, Corless CL. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2004; 17: 1392-1399
23 Mizoshita T, Tsukamoto T, Nakanishi H, Inada K, Ogasawara N, Joh T, Itoh M, Yamamura Y, Tatematsu M. Expression of Cdx2 and the phenotype of advanced gastric cancers: relationship with prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 727-734
24 Almeida R, Silva E, Santos-Silva F, Silberg DG, Wang J, De Bolos C, David L. Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *J Pathol* 2003; 199: 36-40
25 Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Tamada K, Kita H, Osawa H, Tomiyama T, Sato Y, Yamamoto H, Isoda N, Yoshida T, Ido K, Sugano K. Development of gastric carcinoma from intestinal metaplasia in Cdx2-transgenic mice. *Cancer Res* 2004; 64: 7740-7747
26 Groisman GM, Bernheim J, Halpern M, Brazowsky E, Meir A. Expression of the intestinal marker Cdx2 in secondary adenocarcinomas of the colorectum. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 920-923
27 Barbareschi M, Murer B, Colby TV, Chilosi M, Macri E, Loda M, Doglioni C. CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 141-149
28 Tornillo L, Moch H, Diener PA, Lugli A, Singer G. CDX-2 immunostaining in primary and secondary ovarian carcinomas. *J Clin Pathol* 2004; 57: 641-643
29 Jaffee IM, Rahmani M, Singhal MG, Younes M. Expression of the intestinal transcription factor CDX2 in carcinoid tumors is a marker of midgut origin. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1522-1526
30 Almeida R, Almeida J, Shoshkes M, Mendes N, Mesquita P, Silva E, Van Seuningen I, Reis CA, Santos-Silva F, David L. OCT-1 is over-expressed in intestinal metaplasia and intestinal gastric carcinomas and binds to, but does not transactivate, CDX2 in gastric cells. *J Pathol* 2005; 207: 396-401
31 Hinoi T, Lucas PC, Kuick R, Hanash S, Cho KR, Fearon ER. CDX2 regulates liver intestine-cadherin expression in normal and malignant colon epithelium and intestinal metaplasia. *Gastroenterology* 2002; 123: 1565-1577
32 Mizoshita T, Inada K, Tsukamoto T, Nozaki K, Joh T, Itoh M, Yamamura Y, Ushijima T, Nakamura S, Tatematsu M. Expression of the intestine-specific transcription factors, Cdx1 and Cdx2, correlates shift to an intestinal phenotype in gastric cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 29-36
33 Hamamoto A, Abe Y, Nishi M, Fujimori S, Ohnishi Y, Yamazaki H, Oida Y, Miyazaki N, Inada K, Ueyama Y, Iwasaki M, Inoue H, Nakamura M. Aberrant expression of the gastric mucin MUC6 in human pulmonary adenocarcinoma xenografts. *Int J Oncol* 2005; 26: 891-896
34 Kim S, Domon-Dell C, Wang QD, Chung DH, Cristofano AD, Pandolfi PP, Freund JN, Evers BM. *PTEN* and TNF-α regulation of the intestinal-specific *Cdx-2* homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF-κB-dependent pathway. *Gastroenterology* 2002; 123: 1163-1178

电编 张敏 编辑 程剑侠

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2042-2045
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

# ErbB–2受体与肿瘤多药耐药的研究进展

张 红, 高 青

■背景资料
肿瘤细胞多药耐药是临床肿瘤化疗失败最常见和最难克服的问题之一, 亦是复发、转移的主要原因. 因此肿瘤耐药逆转成为当今肿瘤研究中的热点之一. 近年来, 基于对肿瘤病灶部位分子水平的研究, 发现了许多新的治疗靶点, 为开发新型的高效低毒的新药从而逆转肿瘤多药耐药提供了可能. 以ErbB受体酪氨酸激酶为靶点的药物广泛用于治疗C-erbB-2扩增或过表达的转移性乳腺癌, ErbB-2与肿瘤多药耐药中p-gp, p53的关系, 作用机制及其应用引起人们的关注. 但ErbB-2作为一种新的肿瘤治疗靶点, 其逆转耐药机制尚不十分明确, 需要进一步的研究.

张红, 高青, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆市 400016
**通讯作者**: 张红, 400016, 重庆医科大学255号信箱, 重庆医科大学附属第一医院消化内科. zhanghongdina@sina.com
收稿日期: 2007–03–06 接受日期: 2007–05–16

## Progress in research into the relationship of ErbB-2 and multidrug resistance

Hong Zhang, Qing Gao

Hong Zhang, Qing Gao, Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
Correspondence to: Hong Zhang, Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. zhanghongdina@sina.com
Received: 2007-03-06 Accepted: 2007-05-16

## Abstract
One of the most common yet difficult to resolve problems in clinical tumor chemotherapy is multidrug resistance (MDR). It is also the major factor leading to tumor recurrence, even to metastasis. Hence, investigations into multidrug resistance of tumors have recently become very common. New therapeutic targets have been discovered based on molecular research into tumor lesions as ErbB-2. These should provide possibilities for reversing tumor MDR by developing new types of antitumor drugs that have higher performance and are less harmful than existing treatments.

Key Words: Tumor; ErbB-2; Multidrug resistance

Zhang H, Gao Q. Progress in research into the relationship of ErbB-2 and multidrug resistance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2042-2045

## 摘要
肿瘤细胞多药耐药是临床肿瘤化疗失败最常见和最难克服的问题之一, 亦是复发、转移的主要原因. 因此肿瘤耐药逆转成为当今肿瘤研究中的热点之一. 近年来, 基于对肿瘤病灶部位的分子水平的研究, 发现了许多新的治疗靶点, 如ErbB-2, 为开发新型的高效低毒的新药从而逆转肿瘤多药耐药提供了可能.

**关键词**: 肿瘤; ErbB–2; 多药耐药

张红, 高青. ErbB–2受体与肿瘤多药耐药的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2042–2045
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2042.asp

## 0 引言
目前, 化疗是恶性肿瘤治疗中除手术、放疗以外最重要的手段, 肿瘤对化疗药物产生耐药性是目前肿瘤治疗失败的一个重要原因, 已经发现很多机制参与肿瘤耐药性的产生. ErbB受体家族成员在多种人类恶性肿瘤中有表达或高表达, 已知在60%的肿瘤中存在1个或多个ErbB受体过度表达, 尤其在实体瘤中, 如肺癌、乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、头颈部肿瘤等, 人们逐渐发现EerB-2参与耐药的形成. 现就EerB-2与肿瘤多药耐药的研究作一综述.

## 1 EGFR酪氨酸激酶家族
又称ErbB受体家族, 包括4个成员: EGFR, ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4. 他们定位于细胞膜上, 结构相似, 均由胞外的配体结合区、单链跨膜区和胞内的蛋白酪氨酸激酶区3部分组成.

1.1 ErbB-2受体 人的ErbB2基因又称neu基因, 在染色体上定位于17q21. 编码一种具有酪氨酸蛋白激酶(TPK)活性的物质, 其表达产物是一种分子量为$M_r$ 185 000的细胞膜受体, 即ErbB-2受体, 简称P185蛋白. ErbB-2至今仍未发现高亲和力配体. 但是“孤儿受体”ErbB-2却是最优先或最佳二聚化伙伴, 他与家族其他成员形成的异二聚体具有相对较强的信号转导能力, 因此可以说ErbB-2在整个ErbB家族信号网络中处于中心位置. 其重要功能是作为辅助受体蛋白, 以异源二聚体的形式参与信号转导. 在过量表达的情况下他也可以形成不依赖配体的同源二聚体, 继而激活下游信号通路[1].

## 2 MDR机制及其逆转

2.1 MDR的发生机制与多个因素相关 肿瘤细胞耐药相关蛋白过度表达, 酶介导的多药耐药. 其他相关因素还有葡萄糖甲基化神经酰胺的变化; 激素受体亲和力改变; HSP90, ZNRD1人转录相关蛋白[2], MGrl-Ag[3], occludin mRNA, HLH, IR21, CCT5, Tx-P-1和Prota表达增加; COX-2[4-5]高表达等.一些新的相关因素(1)核糖体蛋白RPL6基因过表达[6]; (2)朊病毒蛋白(prion protein, PrPc)[7]; (3)核糖体蛋白RPS13, L23高表达[8]; (4)信号分子Stat3活性降低[9]. 近来人们越来越关注的相关因素: 凋亡抑制, 凋亡途径异常. 甚至有人认为肿瘤的多药耐药与经典的耐药机制关系不大, 而与原癌基因的表达有很大的关系.

2.2 MDR的预防 及时、规范、足量、联合使用化疗药物十分重要. Suzuki *et al*[10]最近报道, 对紫杉醇耐药的胃癌在给予联合使用紫杉醇和5-氟尿嘧啶明显提高了其敏感性.

2.3 MDR的药物逆转治疗 针对P-gp的逆转剂, 先后有3代P-gp的逆转剂问世[11]. 但是西药逆转剂的毒副作用限制了在临床的广泛应用, 低毒的中药逆转剂的研究, 近几年成为新的热点之一. 如三氧化二砷[12], 喜树碱(CPT)等都表现出良好的前景, 新的CPT类似物的研发为耐药的人类肿瘤提供了新的化疗方法[13].

2.4 MDR的基因逆转治疗[14] 目前研究较多的技术有MDR1基因的反义寡聚脱氧核糖核酸(AOD), MDR1基因的反义RNA, 切割MDR1 mRNA的核酶外源性基因植入等技术. 近几年, siRNA介导的基因干扰技术又为多药耐药基因治疗研究提供了一个全新的技术平台[15].

## 3 ErbB-2作用于肿瘤多药耐药逆转

3.1 ErbB-2与MDR的关系 ErbB-2在肿瘤的发生及其演变过程中有重要的角色, C-erbB-2基因蛋白高表达者往往提示预后较差[16]. Yu *et al*[17]将ErbB-2全长导入乳腺癌MDA-MB-435细胞中, ErbB-2表达增加后, 引起Taxol的耐药, 在没有ErbB-2表达时, Taxol可激活P34cdc2/cyclinb, 从而启动凋亡途径; 但一旦细胞中HER-2表达增加, 可通过激活P21 Cipl(周期素依赖性激酶CDK抑制剂), 阻断P34cdc2/cyclinb的活性, 引起凋亡抗性, 提示HER-2的抗凋亡作用与其介导的多药耐受有关. 丁渭 *et al*[18]用MCF-7/HER2细胞高度耐受的Taxol, MMC, VP-16, 5-FU分别处理. 其耐药细胞较对照组细胞的凋亡率明显降低的结果也充分说明凋亡抗性与药物抗性的关系.

另外越来越多的试验证实ErbB-2参与了肿瘤的多药耐药机制, 与MDR1/P-gp有着密切的关系, 但具体机制尚不十分明确, C-erbB-2与多药耐药的关系目前国内的研究较少, 有待进一步的试验探讨. C-erbB-2是一种癌基因, 阳性表达者预后不良, 但作为单项指标, 其对肿瘤的诊断、预后判断尚无积极的指导意义. 所以现在人们更关注于HER-2与经典多药耐药因子的共同表达及其之间的关系. Wang *et al*[19]运用曲妥珠单抗(主要成分为trastuzumab, 为针对胞外区的人源性单抗, 商品名为赫赛汀)联合白细胞素-2(IL-2)作用于肾癌细胞株, 并用SP法对HER-2, MRP1表达进行测定发现曲妥珠单抗联合IL-2对肾癌细胞的生长抑制及耐药性呈时间和剂量依赖性. 药物处理后, HER-2, MRP1表达明显下降($P$<0.05). 从而证实了曲妥珠单抗能有效地抑制肾癌细胞的生长, 对瘤细胞的耐药性也有一定的逆转作用. 进一步证实抑制信号转导因子HER-2, 可同时抑制肿瘤细胞的生长, 促进其凋亡, 降低耐药, 减少药物剂量, 降低药物不良反应, 为临床治疗肿瘤设计靶点、合理用药提供了一条有效的途径. 有研究结果显示, 在胃腺癌中C-erbB-2表达与P-gP表达亦呈正相关($P$<0.05)[20], 因此, 我们认为C-erbB-2与P-gP联合检测, 可作为胃腺癌预后判断和抗药耐药判断的指标. 徐晓妹 *et al*[21]也报道, 在乳腺癌细胞的检测中发现基因扩增/P-gp蛋白阳性表达与C-erbB-2蛋白过表达呈高度相关($P$<0.01), 说明乳腺癌中存在MDR1/P-gP和C-erbB-2共表达, 但其共表达在乳腺癌耐药方面的作用及确切机制尚有待进一步研究阐明. 亦有文献[22]报道在胃腺癌中缺失PTEN而过表达HER2对预后有着显著的影响, 从而为我们打开寻找新的胃癌治疗靶点的途径. Misra *et al*[23]研究发现透明质烷, 磷酸肌醇激酶和ErbB-2在加强MDR1的表达和调节细胞耐药敏感性起正反馈作用. 赵文辉 *et al*[24]通过构建TAM抵抗的细胞系MCF-7/TAMR,并用C-erbB-2 mAb herceptin对其干预, 发现MCF-7/TAMR细胞中C-erbB-2的mRNA和蛋白水平是MCF-7/MT细胞中的2倍, 进一步说明C-erbB-2参与TAM耐药的形成. 上述研究证实了HER-2与多药耐药中MDR1/P-gp途径有着密切的关系, 从而影响了肿瘤对化疗药物敏感性, 增加了其药物抗性.

3.2 ErbB-2受体酪氨酸激酶信号转导干预及以

**■相关报道**
以ErbB受体酪氨酸激酶为靶点的药物近几年有了突破性的进展, 已进入临床试验阶段, 具有广阔的应用前景, 目前关于ErbB-2与肿瘤多药耐药的研究正处于探索中.

**■创新盘点**
国内外关于ErbB-2与肿瘤多药耐药的研究鲜为报道, 本文对ErbB-2的结构, 表达, 作用机制及其应用作了详尽的阐述, 并探讨了与肿瘤多药耐药的作用.

■名词解释
1 肿瘤多药耐药(MDR): 是指肿瘤细胞在接触一种抗肿瘤药产生耐药性后, 对未接触过的, 结构不同, 作用机制各异的其他抗肿瘤药物也具有交叉耐药. 2 ErbB-2受体: 人的ErbB2基因又称neu基因, 在染色体上定位于17q21. 编码一种具有酪氨酸蛋白激酶(TPK)活性的物质, 其表达产物是一种分子量为$M_r$185 000的细胞膜受体, 即ErbB-2受体, 简称P185蛋白.

C-erbB-2为靶点的肿瘤治疗进展 肿瘤细胞中ErbB受体的持续激活能够促进细胞不断增殖, 而很多研究表明, 对ErbB受体信号的干扰能够阻断肿瘤细胞的增殖作用[25]. 当ErbB-2受体活性被抑制后, 胞内的促有丝分裂信号减弱, 从而影响核内的效因子如Myc, Cyclin D, Cyclin E和p27Kipl等, 表现出抗细胞增殖的作用[26].

ErbB-2作为一种酪氨酸激酶受体, 主要是通过自身磷酸化或者与EGFR家族的其他成员结合形成异源二聚体[27], 活化内部的酪氨酸激酶, 从而激活下游信号通道, 参加调节细胞的增殖, 分化, 凋亡等生物学效应. ErbB-2参与调节的下游信号通道主要有PI3K/AKT途径和MAPK激酶途径等, 其信号转导通路中许多分子在化疗耐受的产生中也发挥着一定的作用.

由于ErbB受体信号网络在多种肿瘤的发生、发展中起着非常重要的作用, 通过干预ErbB受体酪氨酸激酶信号转导进行肿瘤治疗成为近年来肿瘤治疗研究的热点. 这些靶点药物具有高效、低毒、特异性强的优点, 目前已有多个针对ErbB受体的抗肿瘤药物进入了临床试验, 另有近百种药物还在实验室研究之中. 抑制ErbB受体信号主要有以下几种途径: (1)阻断ErbB配体、受体的结合; (2)应用反义核苷酸直接抑制ErbB受体表达; (3)应用特异性的抗体抑制ErbB受体功能; (4)应用小分子化合物抑制ErbB受体酪氨酸激酶活性. 由于ErbB配体和受体的结合作用非常复杂, 很难用一个小分子进行阻断, 而且有些突变的受体不需要结合配体就保持活化状态, 所以第一种途径的可操作性相对较差.

以ErbB受体酪氨酸激酶为靶点的药物近几年有了突破性的进展, 目前已经被美国食品和药品管理局(FDA)批准上市的药物有: 针对ErbB-2胞外区的人源化单抗Herceptin (trastuzumab, 1998年)、针对EGFR酪氨酸激酶的小分子抑制剂Iressa(gefitinib, 2003年)、针对EGFR酪氨酸激酶的mAb Erbitux (cetuximab, 2004年)和针对EGFR酪氨酸激酶的小分子抑制剂Tarceva(eflotinib, 2004年). 这类靶点药物在临床应用中常常与化疗联合用药, 表现为协同作用, 具有显著的疗效. Pertuzumab、酪氨酸激酶抑制剂、C-erbB-2肽疫苗、腺病毒E1A基因治疗等亦已进入临床试验阶段, 具有广阔的应用前景. 其中最为成功的例子是针对C-erbB-2胞外区的人源化mAb Hereptin. Herceptin主要成分为trastuzumab, 1998年被美国FDA批准用于治疗C-erbB-2扩增或过表达的转移性乳腺癌, 另一个获得广泛关注的抗C-erbB-2 mAb是pertuzumab(Omnitarg, 2C4). Pertuzumab的抗原结合点位于ErbB-2胞外区的亚区, 主要作用机制是干扰ErbB-2与其他ErbB成员形成二聚体从而阻断细胞信号传递, 而且无论是否存在C-erbB-2过表达, 他均能发挥抗瘤作用. 由于他与trastuzumab的抗原结合位点及作用机制不同, 联合两者进行乳腺癌靶向治疗较之单药治疗将更为有效. 近几年, 用于C-erbB-2检测的新技术不断涌现, 其中比较突出的有CISH (chromogenic in situhybridization), ELISA, RT-PCR(real-time polymerase chain reaction)等. 从而更好的为研究ErbB-2的表达和耐药机制提供了新的手段.

3.3 HER-2 siRNA对肿瘤多药耐药的作用 目前运用小干扰RNA(siRNA)影响ErbB-2受体的表达来研究多药耐药机制, 越来越受到人们的关注. RNAi转录后基因沉默, 也称为RNA干扰, 是指双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)分子阻断或者降低同源基因表达的现象, 细胞内很少的dsRNA分子就可触发有效特异的基因阻断效果. RNAi作为一种新的治疗手段治疗某种疾病, 这种疾病与已知基因的表达增高有关, 如肿瘤、病毒性疾病以及炎症性疾病. 下面是RNAi技术用于各种肿瘤, 从而逆转肿瘤的多药耐药的几项研究报道: 鲁艳明 *et al*[28]试验证实体外转录合成的siRNA能有效抑制SKOV-3细胞中HER-2的表达, 提高细胞对顺铂的敏感性; RNA干扰技术为卵巢癌的治疗提供了一种新策略; ErbB-2原癌基因在大约30%的卵巢癌和乳腺癌中高表达, 并且这种高表达提示预后不良. 运用逆转录病毒介导的小干扰RNA技术, 通过影响多信号途径能够抑制肿瘤的生长[29].

## 4 展望

目前对于肿瘤的多药耐药仍是化疗方案失败的主要因素, 如何逆转肿瘤的多药耐药, 提高肿瘤细胞的药物敏感性, 成为人们越来越关注的话题. ErbB-2作为酪氨酸激酶家族中的一员, 虽然国内外关于ErbB-2与肿瘤多药耐药的研究鲜为报道, 但目前仍有研究发现ErbB-2与MDR1/P-gp有密切关系, 且体外合成ErbB-2 siRNA转染卵巢癌, 乳腺癌耐药细胞株, 能够明显提高其药物敏感性, 一定程度上逆转了肿瘤的多药耐药. ErbB-2作为一种新的肿瘤治疗靶点, 其逆转耐药

机制尚不十分明确, 需要进一步的研究, 但我们相信ErbB-2作为逆转耐药的新靶点有着美好的前景.

## 5 参考文献


1 Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; 19: 3159-3167

2 Zhang YM, Zhao YQ, Yan QJ, Pan YL, Yi H, Fan DM. Expression and function of zinc ribbon gene ZNRD1 in drug-resistant gastric cancer cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2003; 25: 125-129

3 Shi Y, Han Y, Wang X, Zhao Y, Ning X, Xiao B, Fan D. MGr1-Ag is associated with multidrug-resistant phenotype of gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 2002; 5: 154-159

4 Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2002; 277: 38915-38920

5 杨震, 秦成勇, 朱菊人, 任万华, 王旻. 环氧合酶-2对人肝癌细胞增殖和凋亡的调节作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1382-1387

6 Du J, Shi Y, Pan Y, Jin X, Liu C, Liu N, Han Q, Lu Y, Qiao T, Fan D. Regulation of multidrug resistance by ribosomal protein l6 in gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 242-247

7 Du J, Pan Y, Shi Y, Guo C, Jin X, Sun L, Liu N, Qiao T, Fan D. Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. *Int J Cancer* 2005; 113: 213-220

8 Shi Y, Zhai H, Wang X, Han Z, Liu C, Lan M, Du J, Guo C, Zhang Y, Wu K, Fan D. Ribosomal proteins S13 and L23 promote multidrug resistance in gastric cancer cells by suppressing drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2004; 296: 337-346

9 Yu LF, Chen Y, Qiao MM, Zhang YP, Wu YL. The impact of decreased Stat3 activation on 5-fluorouracil resistance of human gastric cancer cell line. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2004; 43: 903-906

10 Suzuki S, Sekikawa K, Fujita S, Abe N, Ishigame T, Okada R, Gonda K, Saito M, Onogi H, Ohki S, Takenoshita S. A case of recurrent gastric cancer effectively treated by combination chemotherapy of weekly paclitaxel and 5'- DFUR after showing resistance to weekly paclitaxel. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33: 385-387

11 Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 2003; 10: 159-165

12 李贺, 熊茂明, 孟翔凌, 耿小平. 三氧化二砷逆转肝癌细胞株HepG2/ADM多药耐药的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2691-2694

13 Ishikawa T, Ikegami Y, Sano K, Nakagawa H, Sawada S. Transport mechanism-based drug molecular design: novel camptothecin analogues to circumvent ABCG2-associated drug resistance of human tumor cells. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 313-325

14 潘光栋, 严律南. Mdr1基因所致肿瘤多药耐药逆转的基因治疗进展. 华西医学 2007; 22: 205-206

15 肖兰, 卢实, 高瑞, 梁铭霖, 刘福安, 王泽华. 小分子干扰RNA对卵巢癌紫杉醇耐药株的多药耐药性逆转的研究. 中国实用妇科与产科杂志 2007; 23: 41-43

16 高凤兰. 直肠癌C-erbB-2、nm23蛋白表达与预后的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1015-1018

17 Yu D, Jing T, Liu B, Yao J, Tan M, McDonnell TJ, Hung MC. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell* 1998; 2: 581-591

18 丁渭, 郑春艳, 贺智敏, 吕辉, 刘孝荣, 余艳辉, 陈主初. HER2介导乳腺癌细胞多药耐药的作用及机制. 国际病理科学与临床杂志 2005; 25: 381-385

19 Wang JJ, Hu ZQ, Ye ZQ. Effect of Trastuzumab in combination with IFN α-2b on HER2 and MRP1 of ACHN. *Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Science)* 2005; 25: 326-328

20 陶晓钰, 顾学文, 肖芹, 崔飞, 田秀春. 胃腺癌组织中P-糖蛋白与p53、c-erbB-2、nm23表达的关系. 实用癌症杂志 2002; 17: 605-607

21 徐晓妹, 周仁祥, 张日民, 黄维青. 联合检测$MDR_1$/P-gp、C-erbB-2在乳腺癌中的表达及临床意义. 中国癌症杂志 2004; 14: 517-520

22 Im SA, Lee KE, Nam E, Kim DY, Lee JH, Han HS, Seoh JY, Park HY, Cho MS, Han WS, Lee SN. Potential prognostic significance of p185(HER2) overexpression with loss of PTEN expression in gastric carcinomas. *Tumori* 2005; 91: 513-521

23 Misra S, Ghatak S, Toole BP. Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *J Biol Chem* 2005; 280: 20310-20315

24 赵文辉, 张清媛, 康欣梅. C-erbB2与乳腺癌三苯氧胺耐药细胞生长关系的研究. 现代生物医学进展 2007; 7: 182-184

25 Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19: 6550-6565

26 Neve RM, Sutterluty H, Pullen N, Lane HA, Daly JM, Krek W, Hynes NE. Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* 2000; 19: 1647-1656

27 Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 385-389

28 鲁艳明, 张淑兰. HER-2 siRNA对卵巢癌细胞顺铂耐药性的影响. 中国医科大学学报 2005; 34: 561-563

29 Yang G, Cai KQ, Thompson-Lanza JA, Bast RC Jr, Liu J. Inhibition of breast and ovarian tumor growth through multiple signaling pathways by using retrovirus-mediated small interfering RNA against Her-2/neu gene expression. *J Biol Chem* 2004; 279: 4339-4345


**■同行评价**

本文对ErbB-2受体与肿瘤多药耐药的关系进行了综述, 目前国内这方面的文章比较少见, 立题新颖, 具有很好的参考价值.

电编 张敏 编辑 程剑侠

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2046-2049
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

# 罗格列酮对小鼠日本血吸虫病肝纤维化基质金属蛋白酶-2的影响

谌 辉, 张景辉, 刘文琪, 贺永文

■背景资料
PPARγ是一类由配体激活的核转录因子, 其功能改变与一些肝脏疾病有相关性. PPARγ与配体结合后被激活, 在肝纤维化形成中的作用已成为肝纤维化研究领域里的一个新热点. 我们在以往的研究中已证实PPARγ配体罗格列酮有抗血吸虫病肝纤维化作用. 为进一步探讨其可能的作用机制, 本实验研究罗格列酮对血吸虫病肝纤维化基质金属蛋白酶-2的影响.

谌辉, 贺永文, 华中科技大学同济医学院附属协和医院传染科 湖北省武汉市 430030
张景辉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院外科实验室 湖北省武汉市 430030
刘文琪, 华中科技大学同济医学院寄生虫学教研室 湖北省武汉市 430022
湖北省自然科学基金, No. 2005ABA170
**通讯作者**: 谌辉, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院传染科. chenhui0515@yahoo.com.cn
电话: 027-85726132
收稿日期: 2007-03-23 接受日期: 2007-05-11

## Effects of rosiglitazone on matrix metalloproteinase-2 in mice with schistosomiasis and liver fibrosis

Hui Chen, Jing-Hui Zhang, Wen-Qi Liu, Yong-Wen He

Hui Chen, Yong-Wen He, Department of Infectious Disease, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Jing-Hui Zhang, Department of Surgical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Wen-Qi Liu, Department of Parasitology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by: The Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2005ABA170
Correspondence to: Hui Chen, Department of Infectious Disease, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. chenhui0515@yahoo.com.cn
Received: 2007-03-23 Accepted: 2007-05-11

## Abstract

**AIM:** To study the effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activator receptor (gamma) ligand, on serum levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2), along with the hepatic expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNA in mice with liver fibrosis caused by *Schistosoma japonicum* infection.

**METHODS:** Fifty mice were divided into five groups: one uninfected group (A), and four schistosomiasis groups (B-E): without any treatment (B), praziquantel treatment (C), rosiglitazone treatment (D), and rosiglitazone and praziquantel treatment (E). Serum levels of MMP-2 and TIMP-2 were measured by ELISA. Hepatic expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNA were determined by real-time quantitative PCR.

**RESULTS:** Serum level and hepatic mRNA expression of MMP-2 were markedly higher in groups D and E [306.0 ± 62.3 μg/L, 312.0 ± 54.3 μg/L; –19.123 ± (–5.965), –20.375 ± (–6.189)] than in group A [221.3 ± 39.2 μg/L, –26.324 ± (–5.314); $P < 0.05$], but were lower than in group B [411.3 ± 57.5 μg/L, –12.227 ± (–4.426), $P < 0.05$] and group C [402.9 ± 57.2 μg/L, –12.804 ± (–4.036), $P < 0.05$]. Serum level and hepatic mRNA expression of TIMP-2 was markedly increased in the four schistosomiasis groups compared to the normal group [209.3 ± 60.5 μg/L, –20.516 ± (–4.716); 213.5 ± 66.0 μg/L, –19.944 ± (–5.052); 223.6 ± 65.3 μg/L, –18.767 ± (–5.509); 224.5 ± 64.4 μg/L, –19.676 ± (–4.320) *vs* 150.4 ± 46.5 μg/L, –27.186 ± (–5.985), $P < 0.05$]; however, there was no significant difference among the schistosomiasis groups ($P > 0.05$).

**CONCLUSION:** MMP-2 plays a role in promoting liver fibrosis. Rosiglitazone can relieve liver fibrosis because it down-regulates the expression of MMP-2 in mice with schistosomiasis and liver fibrosis.

Key Words: Peroxisome proliferator-activator receptor gamma; Fibrosis; Matrix metalloproteinase-2; Tissue inhibitor of metalloproteinase-2

Chen H, Zhang JH, Liu WQ, He YW. Effects of rosiglitazone on matrix metalloproteinase-2 in mice with schistosomiasis and liver fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2046-2049

## 摘要

**目的:** 研究PPARγ配体罗格列酮治疗小鼠血吸虫病肝纤维化, 血清MMP-2与TIMP-2的变化

及肝组织MMP-2与TIMP-2的基因表达.

**方法**: 昆明小鼠50只, 随机分为正常对照组A、感染对照组B、吡喹酮治疗组C、罗格列酮治疗组D及罗格列酮加吡喹酮治疗组E. 除正常对照组外, 其余各组均建立血吸虫病肝纤维化小鼠模型. 用ELISA法检测血清MMP-2及TIMP-2的含量, 实时荧光定量PCR反应观察小鼠肝组织MMP-2 mRNA及TIMP-2 mRNA的表达.

**结果**: D, E组血清MMP-2的含量(306.0±62.3 μg/L, 312.0±54.3 μg/L)及肝组织MMP-2 mRNA的表达[-19.1±(-6.0), -20.4±(-6.2)]高于A组[221.3±39.2 μg/L, -26.3±(-5.3); $P$<0.05], 但明显低于B组[411.3±57.5 μg/L, -12.2±(-4.4), $P$<0.05]和C组[402.9±57.2 μg/L, -12.8±(-4.0), $P$<0.05]. B, C, D和E组血清TIMP-2的含量及肝组织TIMP-2 mRNA的表达均显著高于正常对照组[209.3±60.5 μg/L, -20.5±(-4.7); 213.5±66.0 μg/L, -19.9±(-5.1); 223.6±65.3 μg/L, -18.8±(-5.5); 224.5±64.4 μg/L, -19.7±(-4.3) *vs* 150.4±46.5 μg/L, -27.2±(-6.0), $P$<0.05], 但这4组间TIMP-2值无显著性差异($P$>0.05).

**结论**: MMP-2在血吸虫病肝纤维化形成中起促进作用, PPARγ配体罗格列酮的抗肝纤维化机制与其下调MMP-2的表达有一定关系.

**关键词**: 过氧化物酶体增殖物激活受体γ; 肝纤维化; MMP-2; TIMP-2

谌辉, 张景辉, 刘文琪, 贺永文. 罗格列酮对小鼠日本血吸虫病肝纤维化基质金属蛋白酶-2的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2046-2049
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2046.asp

## 0 引言

在肝纤维化形成过程中, 基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的表达与活性增高[1]. 激活的MMP-2因能降解肝窦状隙内皮下正常基底膜基质而促使肝星状细胞(HSC)活化. 因而在肝纤维化的形成过程中起促进作用. 有文献报道过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferators activator receptors gamma, PPARγ)的配体, 有较好的抗肝纤维化作用[2]. 我们以往的研究也证实了这一点[3]. 但其具体机制尚不完全清楚, 我们研究PPARγ配体罗格列酮治疗小鼠血吸虫病肝纤维化, 血清MMP-2与基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)的变化及肝组织MMP-2与TIMP-2的基因表达, 探讨PPARγ配体抗血吸虫病肝纤维化的可能作用及机制.

**■创新盘点**
目前国内外尚未见PPARγ配体与血吸虫病肝纤维化的关系进行研究. 本文首次研究PPARγ配体对小鼠日本血吸虫病肝纤维化MMP-2及TIMP-2的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 昆明小鼠50只, 体质量16-22 g, 购于华中科技大学同济医学院动物实验中心. 随机分为5组, 每组10只, 除正常对照组外, 模型组均经皮感染日本血吸虫尾蚴40条. 罗格列酮片为葛兰素史克有限公司产品. MMP-2及TIMP-2引物购自上海博亚生物技术有限公司, SYBR Green Ⅰ荧光染料购自美国Biotium公司, TRIzol溶液购自美国Gibco公司. PCR仪: 上海枫岭生物技术有限公司生产的FTC-2000型实时荧光定量PCR仪.

1.2 方法 正常对照组: 常规喂养4 wk后灌服等量的生理盐水至10 wk末; 感染对照组: 感染尾蚴4 wk后灌服等量的生理盐水至10 wk末; 吡喹酮治疗组: 感染尾蚴4 wk后每天用吡喹酮500 mg/kg灌胃, 杀虫治疗2 d后改为等量的生理盐水灌胃治疗至10 wk末; 罗格列酮治疗组: 感染尾蚴4 wk后用每天罗格列酮4 mg/kg灌胃治疗至10 wk末; 罗格列酮加吡喹酮治疗组: 感染尾蚴4 wk后用吡喹酮灌胃(剂量同前)治疗2 d, 每天用罗格列酮4 mg/kg灌胃治疗至10 wk末. 最后断颈法处死小鼠, 取血清置于-20℃冰箱中保存待检, 取部分肝组织置液氮中保存备检.

1.2.1 血清MMP-2及TIMP-2检测 采用ELISA方法, MMP-2及TIMP-2诊断试剂盒为美国R&D Systems公司产品.

1.2.2 肝组织MMP-2及TIMP-2表达 每份标本取组织100 mg加入玻璃匀浆器中, 加入TRIzol溶液1 mL提取总RNA, 以总RNA为模板, 逆转录合成cDNA. 应用SYBR Green Ⅰ荧光染料技术行实时定量PCR反应, 以适量cDNA为模板, 以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照, PCR扩增MMP-2 mRNA及TIMP-2 mRNA基因片段. MMP-2引物设计: MMP-2引物: 上游: 5'-TGGGTGGAAATTCAGAAGGTGC-3', 下游: 5'-ATCTACTTGCTGGACATCAGGGGG-3'. TIMP-2引物: 上游: 5'-GAGATCAAGCAGATAAAGATG-3', 下游: 5'-GACCCAGTCCATCCAGAGGC-3'. GAPDH引物: 上游: 5'-GAGCTCACCGGGTTG

**■应用要点**
本实验显示PPARγ配体罗格列酮能下调日本血吸虫病肝纤维化MMP-2的表达, 为PPARγ配体与血吸虫病肝纤维化的关系提供新的依据.

表 1 小鼠MMP-2和TIMP-2含量和MMP-2和TIMP-2 mRNA的表达(mean ± SD, $n$ = 10)

| 分组 | 血清(μg/L) | | 肝组织 | |
|---|---|---|---|---|
| | MMP-2 | TIMP-2 | MMP-2 mRNA | TIMP-2 mRNA |
| 正常对照 | 221.3 ± 39.2 | 150.4 ± 46.5 | −26.3 ± (−5.3) | −27.2 ± (−6.0) |
| 感染对照 | 411.3 ± 57.5[a] | 209.3 ± 60.5[a] | −12.2 ± (−4.4)[a] | −20.5 ± (−4.7)[a] |
| 吡喹酮 | 402.9 ± 57.2[a] | 213.5 ± 66.0[a] | −12.8 ± (−4.0)[a] | −19.9 ± (−5.1)[a] |
| 罗格列酮 | 306.0 ± 62.3[ac] | 223.6 ± 65.3[a] | −19.1 ± (−6.0)[ac] | −18.8 ± (−5.5)[a] |
| 罗格列酮加吡喹酮 | 312.0 ± 54.3[ac] | 224.5 ± 64.4[a] | −20.4 ± (−6.2)[ac] | −19.7 ± (−4.3)[a] |

[a]$P$<0.05 *vs* 正常对照组; [c]$P$<0.05 *vs* 感染对照组和吡喹酮组.

GTTTTG-3', 下游: 5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'. PCR反应参数: 预变性94℃ 5 min, 然后94℃变性30 s, 53℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共30个循环, 最后72℃延伸10 min. 在延伸的过程中搜集荧光信号. 于每次扩增的同时设置无cDNA的阴性对照, 将PCR产物做熔解曲线, 65℃ Touch-Down PCR, 每个循环温度上升0.2℃, 150个循环, 证实以上PCR反应产物特异性良好. 计算方法: 待测样品相对值 = $2^{\triangle\triangle Ct}$; △△Ct = △Ct待测样品-△Ct β-actin; Ct = Ct阴性对照-Ct待测样品. 统计△△Ct值以比较各组MMP-2 mRNA及TIMP-2 mRNA的表达.

**统计学处理** 采用SPSS11.5软件分析. 计量资料结果以mean±SD示, 采用方差分析, $P$<0.05为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 血清MMP-2和TIMP-2 感染对照组和吡喹酮治疗组血清MMP-2的含量显著高于正常对照组($P$<0.05), 罗格列酮组及罗格列酮加吡喹酮组MMP-2的含量高于正常对照组, 但明显低于感染对照组和吡喹酮治疗组($P$<0.05). 感染对照组, 吡喹酮治疗组, 罗格列酮组及罗格列酮加吡喹酮组血清TIMP-2的含量显著高于正常对照组($P$<0.05), 但这4组间TIMP-2值无显著性差异($P$>0.05)(表1).

2.2 肝组织MMP-2 mRNA和TIMP-2 mRNA表达 感染对照组和吡喹酮治疗组肝组织MMP-2 mRNA的含量显著高于正常对照组($P$<0.05), 罗格列酮组及罗格列酮加吡喹酮组MMP-2 mRNA的含量高于正常对照组, 但明显低于感染对照组($P$<0.05). 感染对照组, 吡喹酮治疗组, 罗格列酮组及罗格列酮加吡喹酮组肝组织TIMP-2 mRNA的含量显著高于正常对照组($P$<0.05). 这4组间TIMP-2 mRNA的表达无显著性差异($P$>0.05)(表1).

## 3 讨论

肝细胞外基质(ECM)的合成与降解处于动态平衡之中, 各种病因引起肝细胞发生坏死和炎症刺激时, 导致ECM合成与降解平衡破坏, ECM合成增多和/或降解减少, 沉积在肝内引起肝纤维化[4]. MMPs是一组蛋白酶类, 具有降解ECM作用. 其活性受基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)调节[5]. TIMPs是MMPs活性组织抑制物, TIMPs与等比例的MMPs以非共价键可逆性结合形成复合体, 从而抑制MMPs的活性. 目前认为, 肝纤维化是一个可逆的动态过程, 该过程反映出ECM代谢的变化, 而MMPs和TIMPs间的平衡决定了ECM的代谢. 因此, MMPs和TIMPs生成、活化及表达的变化是决定肝纤维化进展和消退的关键因素[6-7].

MMP-2又称Ⅳ型胶原酶, 能降解明胶和Ⅳ, Ⅴ, Ⅶ, Ⅹ型基底膜胶原. 一旦激活, 即可降解细胞周围的基底膜成分如Ⅳ型胶原、层黏连蛋白等, 打破细胞与ECM之间正常的关系, 破坏维持HSC于静止状态所必须的基底膜样的基质环境, HSC会被激活并向成纤维细胞转化, 同时大量产生包括Ⅰ, Ⅲ型胶原在内的ECM, 促进肝纤维化的发生和发展[8]. MMP-2的表达与酶活性在肝纤维化的逆转过程中是逐渐降低的, 说明MMP-2与肝纤维化的发生、发展密切相关[9]. TIMP-2主要由肝细胞、HSC等产生, 可在原位抑制MMP-2活力, 使ECM降解减少[10]. MMP-2和TIMP-2的动态变化是决定肝纤维化的关键因素之一. PPARγ是一类由配体激活的核转录因子, 是重要的肝脏代谢功能调节分子, 其功能改变与一些肝脏疾病有相关性[11-13]. PPARγ及其配体在肝纤维化形成中的作用已引起人们的关注, 但其具体机制尚不完全清楚. 目前认为

PPARγ配体作为PPARγ的激活剂, 可抑制肝星状细胞的增殖, 减少肝内胶原积聚和增加肝内胶原酶活性[14]. 但其对在肝纤维化形成中起作用的MMPs是否亦可发挥作用尚不清楚.

我们用日本血吸虫尾蚴感染小鼠建立肝纤维化模型, 并检测血清及肝组织MMP-2和TIMP-2的表达, 发现感染对照组血清MMP-2的含量及肝组织MMP-2 mRNA的表达显著高于正常对照组; IMP-2的含量及表达也较正常对照组升高, 但其表达相较于MMP-2过于低下. 从而使MMP-2的活性得不到抑制而增高, 促进了肝纤维化的形成与发展. 肝纤维化时, TIMP-2表达相对或绝对下调, 而MMP-2表达增多, 结果是除间质胶原外的大部分ECM可及时降解, 这也可能是肝硬化组织和正常肝组织ECM成分存在质和量的不同及组织结构不同的原因. 在肝纤维化早期采用PPARγ配体罗格列酮治疗, 观察血清及肝组织MMP-2和TIMP-2的表达. 发现罗格列酮治疗后MMP-2血清含量及肝组织mRNA表达较感染对照组明显降低, 而TIMP的血清含量及肝组织mRNA表达变化不大, 提示PPARγ配体罗格列酮可通过下调MMP-2的水平, 减轻MMP-2对肝脏正常基底膜的破坏, 从而间接抑制了HSC的激活, 阻止肝纤维化的发展.

一般说来, MMPs是以非活性的酶原形式分泌的, 然后再在细胞外激活, 因此, MMPs可以在血循环中检测到. 由于尚未发现外周血细胞有MMP2的表达, 故认为MMP2是肝脏特异的, 亦即血循环中MMP2水平与肝内MMP2表达密切相关[9]. 我们也发现, 血清MMP-2含量与肝组织MMP-2 mRNA表达基本一致. 本实验显示PPARγ配体罗格列酮的抗日本血吸虫病肝纤维化机制与其下调MMP-2的表达有一定关系.

## 4 参考文献


1 Zhou X, Hovell CJ, Pawley S, Hutchings MI, Arthur MJ, Iredale JP, Benyon RC. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int* 2004; 24: 492-501

2 Lv P, Luo HS, Zhou XP, Chireyath Paul S, Xiao YJ, Si XM, Liu SQ. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 777-788

3 谌辉, 张景辉, 刘文琪, 贺永文. 罗格列酮对日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织核因子-κB和过氧化物酶体增殖物激活受体γ表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 741-745

4 Kershenobich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2003; 2: 159-163

5 Skiles JW, Gonnella NC, Jeng AY. The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem* 2004; 11: 2911-2977

6 Roderfeld M, Hemmann S, Roeb E. Mechanisms of fibrinolysis in chronic liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs). *Z Gastroenterol* 2007; 45: 25-33

7 Xu GF, Li PT, Wang XY, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3621-3627

8 Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159

9 El-Gindy I, El Rahman AT, El-Alim MA, Zaki SS. Diagnostic potential of serum matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as non-invasive markers of hepatic fibrosis in patients with HCV related chronic liver disease. *Egypt J Immunol* 2003; 10: 27-35

10 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 86-90

11 Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, Suzuki Y, Saito H, Kohgo Y, Okumura T. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 215-222

12 Berkenstam A, Gustafsson JA. Nuclear receptors and their relevance to diseases related to lipid metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 171-176

13 Yang L, Chan CC, Kwon OS, Liu S, McGhee J, Stimpson SA, Chen LZ, Harrington WW, Symonds WT, Rockey DC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G902-911

14 Yuan GJ, Zhang ML, Gong ZJ. Effects of PPARg agonist pioglitazone on rat hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1047-1051


**■同行评价**

本文用PPARγ配体罗格列酮干预治疗肝纤维化动物模型, 结果显示罗格列酮抗日本血吸虫病肝纤维化机制与其下调MMP-2的表达有关. 文章设计合理, 有一定的参考价值.

电编 张敏 编辑 程剑侠

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2050-2053
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

# 大鼠梗阻性胆管炎细胞免疫功能降低及中药锦红片的影响

章学林, 张静喆, 顾宏刚, 马恩伟, 朱培庭

■背景资料
梗阻性胆管炎是外科常见危急重症, 常并发多脏器功能损害, 给治疗带来困难, 甚至因多脏器功能衰竭而造成死亡. 应用中医药防治急性胆道感染已近半个世纪, 积累了丰富的经验. 其中具有代表意义的经验方锦红片是名老中医顾伯华、徐长生教授创立的具有清热通下作用、对急性胆道感染有显著疗效的经验方, 主要由大黄、红藤、蒲公英等中药组成.

章学林, 张静喆, 顾宏刚, 马恩伟, 朱培庭, 上海中医药大学附属龙华医院外科 上海市 200032
上海市重点学科课题资助项目, No. T0304
上海市卫生系统百人计划课题经费资助项目, No. 03HBR-29
**通讯作者**: 章学林, 200032, 上海中医药大学附属龙华医院外科. shanghaizxl@sina.com
电话: 021-64385700-3815
收稿日期: 2007-04-04 接受日期: 2007-04-21

## Mechanisms of decreased cellular immune function and the impact of Jinhong Tablets during obstructive cholangitis

Xue-Lin Zhang, Jing-Zhe Zhang, Hong-Gang Gu, En-Wei Ma, Pei-Ting Zhu

Xue-Lin Zhang, Jing-Zhe Zhang, Hong-Gang Gu, En-Wei Ma, Pei-Ting Zhu, Department of Surgery, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
**Supported by:** Scientific Research Project of Shanghai Municipal Key Academic Discipline, No. T0304; One Hundred Talents Scientific Research Project of Health System in Shanghai, No. 03HBR-29
**Correspondence to:** Xue-Lin Zhang, Department of Surgery, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. shanghaizxl@sina.com
**Received:** 2007-04-04 **Accepted:** 2007-04-21

## Abstract

**AIM:** To explore the mechanism of decreased cellular immune function and the effect of Jinhong Tablets, a Chinese herbal medicine, during the course of obstructive cholangitis.

**METHODS:** An obstructive cholangitis model was induced in 24 male Sprague-Dawley rats that were randomly divided into model ($n$ = 8), Jinhong Tablet-treated ($n$ = 8) and simple obstructive cholangitis ($n$ = 8) groups. Four days after modeling, all rats were sacrificed and the interleukin (IL)-2, $CD_3^+$, $CD_4^+$ and $CD_8^+$ levels in plasma were measured by enzyme liked immunosorbent assay (ELISA). The endotoxin content was detected by a reagent kit. The index of apoptosis was determined by Tdt-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling (TUNEL), and ultrastructure changes of the thymus and apoptosis were observed by electron microscopy.

**RESULTS:** Plasma IL-2, $CD_3^+$, and $CD_4^+$ levels and the thymus mass index in the untreated group were significantly lower than those in the Jinhong Tablet-treated and simple ligation groups (IL-2: 28.5 ± 3.0 ng/L *vs* 33.9 ± 3.6 ng/L, 39.6 ± 2.2 ng/L, $P < 0.05$, $P < 0.01$; $CD_3^+$: 54.5% ± 5.5% *vs* 70.7% ± 4.8%, 66.3% ± 7.1%, both $P < 0.01$; $CD_4^+$: 34.5% ± 8.3% *vs* 44.2% ± 3.3%, 44.5% ± 4.2%, both $P < 0.01$; thymus index: 0.89 ± 0.18 *vs* 1.10 ± 0.13, 1.12 ± 0.24, both $P < 0.05$). There were no significant differences among the three groups with regard to the level of plasma $CD_8^+$, while plasma endotoxin and the thymus apoptosis index in the untreated group were significantly higher than in the Jinhong Tablet-treated and simple ligation groups (endotoxin: 0.85 ± 0.14 EU/mL *vs* 0.53 ± 0.10 EU/mL, 0.49 ± 0.11 EU/mL, both $P < 0.01$; thymus index: 25.7 ± 5.1 *vs* 15.8 ± 5.5, 9.0 ± 3.1, $P < 0.05$, $P < 0.01$). More typical apoptosis cells were seen in thymus tissue than in the untreated group. The results demonstrated that intervention by traditional Chinese medicine improved the immune function, endotoxemia and thymus cell apoptosis, even approaching the levels in the simple obstructive cholangitis.

**CONCLUSION:** Decreased cellular immune function and abnormal apoptosis of thymus cells exists in rats with obstructive cholangitis; Jinhong Tablets significantly improve the regulation and maintenance of immune function.

Key Words: Jinhong Tablet; Obstructive cholangitis; Thymus gland; Cellular immune; Apoptosis; Enzyme-linked immunosorbent assay; Tdt-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling

Zhang XL, Zhang JZ, Gu HG, Ma EW, Zhu PT. Mechanisms of decreased cellular immune function and the impact of Jinhong Tablets during obstructive cholangitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2050-2053

## 摘要

**目的:** 探讨梗阻性胆管炎大鼠细胞免疫功能降低的发生机制及清热通下中药锦红片的影响.

**方法:** ♂SD大鼠24只建立急性梗阻性胆管炎模型, 随机分为模型组($n$ = 8)、锦红片治疗组($n$ = 8)和单纯胆管梗阻组($n$ = 8), 检测血浆IL-2, $CD_3^+$, $CD_4^+$, $CD_8^+$, 内毒素, 胸腺指数, 胸腺细胞凋亡指数及电镜下观察胸腺的超微结构及凋亡.

**结果:** 模型组IL-2, $CD_3^+$, $CD_4^+$和胸腺指数显著低于治疗组和单纯胆管梗阻组(IL-2: 28.5±3.0 ng/L *vs* 33.9±3.6 ng/L, 39.6±2.2 ng/L, $P$<0.05, $P$<0.01; $CD_3^+$: 54.5%±5.5% *vs* 70.7%±4.8%, 66.3%±7.1%, 均$P$<0.01; $CD_4^+$: 34.5%±8.3% *vs* 44.2%±3.3%, 44.5%±4.2%, 均$P$<0.01; 胸腺指数: 0.89±0.18 *vs* 1.10±0.13, 1.12±0.24, 均$P$<0.05), $CD_8^+$ 3组间没有统计学差异, 血浆内毒素和凋亡指数明显高于治疗组和梗阻组(内毒素: 0.85±0.14 EU/mL *vs* 0.53±0.10 EU/mL, 0.49±0.11 EU/mL, 均$P$<0.01; 凋亡指数: 25.7±5.1 *vs* 15.8±5.5, 9.0±3.1, $P$<0.05, $P$<0.01), 模型组胸腺可见较多典型的凋亡细胞, 结果显示经中药干预治疗后, 免疫功能、内毒素血症和胸腺细胞凋亡有所改善, 接近单纯胆管梗阻组水平.

**结论:** 梗阻性胆管炎大鼠存在免疫功能降低, 胸腺细胞异常凋亡. 锦红片对维持免疫机能的稳定有积极的意义.



**关键词: 中药锦红片; 梗阻性胆管炎; 胸腺; 细胞免疫; 凋亡; 酶联免疫法; 末端脱氧核苷酸转移酶缺口标记**

章学林, 张静喆, 顾宏刚, 马恩伟, 朱培庭. 大鼠梗阻性胆管炎细胞免疫功能降低及中药锦红片的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2050-2053

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2050.asp


## 0 引言

梗阻性胆管炎是外科常见危急重症, 常并发多脏器功能损害, 给治疗带来困难, 甚至因多脏器功能衰竭而造成死亡. 免疫功能降低是梗阻性胆管炎的基本病理生理改变[1-2], 然其形成机制尚未十分明了; 临床上清热通下中药锦红片对急性胆管炎的治疗有相当的疗效, 但中药的作用机制有待阐明. 为此, 我们进行了以下研究.

## 1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD(Sprague Dawley, SD)♂大鼠24只, 10 wk, 体质量160-180 g, 由上海中医药大学实验动物中心提供. 随机数字方法分为模型组、中药锦红片治疗组(治疗组)、单纯胆管梗阻组(梗阻组)3组. 每组8只. O111B4大肠杆菌由上海市微生物研究所提供标准菌种, 上海中医药大学附属龙华医院中心实验室负责培养、计数. IL-2ELISA试剂盒, 深圳美晶生物工程有限公司产品. $CD_3^+$, $CD_4^+$, $CD_8^+$ mAb, 美国QharMingen公司产品, 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记. 鲎试剂内毒素定量检测试剂盒, 由上海市医学化验所提供. TUNEL(Tdt-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling, TUNEL)试剂盒, Boethringer Mannheim产品.

1.2 方法 模型组与治疗组参照龚建平法建立梗阻性胆管炎模型[3]. 胆管近端注射$5\times10^{12}$/L O111B4大肠杆菌1 mL/kg, 梗阻组胆管近端注射无菌生理盐水1 mL/kg, 自术后第1天开始, 模型组、梗阻组灌喂生理盐水10 mL/kg, 治疗组灌喂浓度为110 g/L的锦红片(由大黄、红藤、蒲公英组成)悬液10 mL/kg, 每天2次, 连续3 d. 第4天取材, 处死大鼠. 血浆IL-2测定采用酶联免疫法(enzyme liked immunosorbent assay, ELISA). 肝素抗凝血40 μL, 加入$CD_3$, $CD_4$, $CD_8$ mAb, 混匀, 洗涤, 固定, 流式细胞检测, 每样本检测10 000个细胞, Cell Quest软件测定T细胞亚群. 内毒素测定按鲎试剂盒使用说明进行检测. 完整取出胸腺后, 电子天平称质量, 计算胸腺指数. 胸腺指数 = 胸腺质量(mg)/体质量(g). TUNEL标记按原位细胞凋亡检测试剂盒(POD法)说明操作. 根据显色情况对细胞凋亡定量分析, 每张切片随机选取3个视野(×400), 计数阳性细胞数和细胞总数, 凋亡指数 = 阳性细胞数/细胞总数×100%. 全自动图像分析系统测定凋亡细胞平均光密度, 每张切片随机取5个视野, 计算均值. 另取1 mm×2 mm的胸腺组织, 用25 g/L戊二醛固定, 梯度脱水, 包埋, 超薄切片, 醋酸铅染色, 电镜下观察细胞凋亡改变.

**统计学处理** 数据用mean±SD表示, 输入电脑, 用SPSS10.0统计软件进行方差分析.

## 2 结果

2.1 血浆IL-2和T细胞亚群 血浆IL-2含量以模型组最低, 治疗组显著高于模型组($P$<0.05), 接近

**■研发前沿**

中药治疗梗阻性胆管炎的研究报道不少, 具有潜在优势, 但大多停留在疗效总结阶段, 作用机制亟待深入研究, 疗效尚待提高. 对内毒素的直接破坏作用可能是中药与抗生素作用机制的重要区别.

**■创新盘点**
本文从细胞免疫中枢胸腺细胞凋亡角度阐述梗阻性胆管炎的病理生理改变及中药经验方锦红片的作用机制, 视角新颖, 对保护胸腺、维持机体免疫功能的稳定起着非常重要的作用.

表 1 大鼠梗阻性胆管炎血浆IL-2和T细胞亚群(means ± SD, $n$ = 8)

| 分组 | IL-2(ng/L) | $CD_3^+$(%) | $CD_4^+$(%) | $CD_8^+$(%) |
|---|---|---|---|---|
| 模型组 | 28.5 ± 3.0 | 54.5 ± 5.5 | 34.5 ± 8.3 | 28.5 ± 3.3 |
| 治疗组 | 33.9 ± 3.6[a] | 70.7 ± 4.8[b] | 44.2 ± 3.3[b] | 25.7 ± 3.2 |
| 梗阻组 | 39.6 ± 2.2[b] | 66.3 ± 7.1[b] | 44.5 ± 4.2[b] | 26.9 ± 4.2 |

[a]$P$<0.05, [b]$P$<0.01 *vs* 模型组.

表 2 梗阻性胆管炎血浆内毒素含量、胸腺指数、凋亡指数及吸光度($n$ = 8)

| 分组 | 内毒素(EU/mL) | 胸腺指数(mg/g) | 凋亡指数(%) | 吸光度 |
|---|---|---|---|---|
| 模型组 | 0.85 ± 0.14 | 0.89 ± 0.18 | 25.7 ± 5.1 | 0.59 ± 0.013 |
| 治疗组 | 0.53 ± 0.10[b] | 1.10 ± 0.13[a] | 15.8 ± 5.5[a] | 0.33 ± 0.017[a] |
| 梗阻组 | 0.49 ± 0.11[b] | 1.12 ± 0.24[a] | 9.0 ± 3.1[b] | 0.23 ± 0.021[a] |

[a]$P$<0.05, [b]$P$<0.01 *vs* 模型组.

梗阻组. $CD_3^+$, $CD_4^+$含量模型组显著低于治疗组和梗阻组模型组($P$<0.01), $CD_8^+$各组间无明显差异(表1).

2.2 血浆内毒素含量模型组显著高于治疗组和梗阻组($P$<0.01), 而胸腺指数明显降低, 胸腺凋亡指数和吸光度明显升高($P$<0.05, $P$<0.01, 表2).

2.3 电镜观察 模型组胸腺可见较多典型的凋亡细胞, 特征为染色质浓缩、边聚、核膜皱缩, 微绒毛消失, 凋亡小体形成, 部分呈新月形, 细胞膜完整, 细胞器存在(图1).

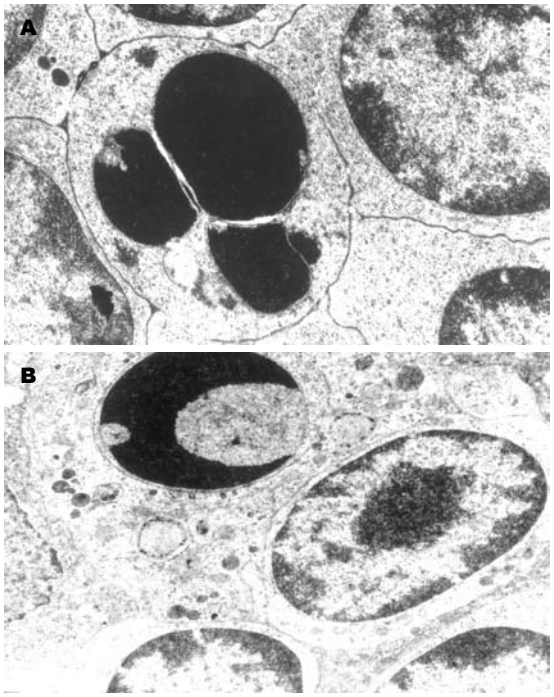



**图 1 胸腺细胞凋亡电镜照片**. A: 治疗组(TEM × 5000); B: 模型组.

## 3 讨论

梗阻性胆管炎常并发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 由此发展为脓毒血症、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)而危及患者生命. 尽管新的抗感染药物不断问世并被广泛应用, 但该病的临床疗效并没得到明显改善. 有学者认为, 机体的免疫功能降低可能是制约感染控制的重要原因[4]. IL-2是一种主要由辅助性T淋巴细胞分泌的淋巴因子, 其主要功能是促进T细胞生长及其他细胞因子的产生, 促进自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的生长分化和B细胞的增殖与抗体的合成, 具有广泛的生物学效应. Th细胞分子表型为$CD_3^+CD_4^+CD_8^-$, 主要分泌IL-2等细胞因子, 能促进B细胞、T细胞和其他免疫细胞的增殖与分化, 协调免疫细胞间的相互作用, 诱导和增强免疫应答. Ts细胞分子表型为$CD_3^+CD_4^-CD_8^+$, 主要分泌抗原特异及非特异抑制因子, 抑制T细胞、B细胞的功能, 起免疫调节的负反馈作用. 我们发现, 模型组$CD_3^+$, $CD_4^+$含量显著低于治疗组和梗阻组. 同时, 模型组血浆IL-2含量也显著低于梗阻组和治疗组. 这一结果提示, 梗阻性胆管炎大鼠存在着免疫机能的降低, 而中药锦红片对降低的免疫功能有一定程度的改善, 这可能是清热通下中药治疗胆道感染的独特优势[5].

梗阻性胆管炎的发病基础是胆道梗阻和感染, 可导致体内高胆盐、高胆红素、高胆汁酸、高肿瘤坏死因子血症、肠道细菌移位以及内毒素血症等病理生理学变化, 并由此而引起机体强烈的全身炎性反应. 本结果显示, 模型组外周血浆内毒素显著增高, 其形成原因是注入胆道系统内的大量O111B4大肠杆菌释出的脂多糖经受损的肝血窦进入血循环、肠道细菌大量增殖及肠黏膜屏障损害, 细菌移位及胆管炎时肝脏清除内毒素功能降低[6]. 而锦红片治疗组外周血浆内毒素有一定程度降低, 显著低于模型组, 同单纯梗组相近, 提示中药锦红片能降低内毒素含量, 推测其机制可能在于具清热通下功效的锦红片有较强的通便和一定的抑杀细菌作用, 能缩小内毒素池. 并且锦红片可能也具备如文献报道的直接破坏内毒素的中药功效[7]. 胸腺是机体对应激刺激最敏感的器官, 内毒素、严重创伤、应激等均可引起胸腺细胞的凋亡[8-9]. 我们发现, 模型组胸腺指数较单纯梗阻组显著降低, 凋亡指数增高. 电镜观察发现, 无论是模型组还是梗阻组, 都较易发现典型的胸腺凋亡细胞(图1), 而未见明显胸腺细胞坏死, 提示梗阻性胆管炎大鼠胸腺发生明显的萎缩性改变, 其萎缩主要是通过细胞凋亡形成的. 胸腺是机体的细胞免疫中枢, 大量产生短命细胞, 未成熟的T淋巴细胞通过在胸腺内的分化、发育, 成熟后释放入血, 以维持外周T淋巴细胞池的衡定, 大多数胸腺淋巴细胞未发育成熟即已凋亡[10]. 脂多糖iv能引起胸腺细胞凋亡, 并且伴有血浆TNF-α含量显著升高[11]. 我们发现, 外周血浆内毒素升高同胸腺萎缩、胸腺细胞凋亡呈正相关, 表明梗阻性胆管炎大鼠免疫功能降低的机制在于高内毒素血症引起胸腺细胞超正常大量凋亡. 有效控制内毒素血症, 对于维持机体免疫功能, 保护机体有重要意义.

锦红片是名老中医顾伯华、徐长生教授创立的具有清热通下作用、对急性胆道感染有显著疗效的经验方, 主要由大黄、红藤、蒲公英等中药组成[12]. 我们发现, 锦红片治疗组血浆内毒素含量、胸腺凋亡指数显著低于模型组、胸腺指数和血浆IL-2, $CD^+3$, $CD^+4$含量均明显高于模型组, 这些都说明中药锦红片在干预梗阻性胆管炎中可能发挥了诱导机体内毒素耐受作用, 这对保护胸腺、维持机体免疫功能的稳定起着非常重要的作用, 但具体作用环节有待进一步探讨.

**■同行评价**

本文研究了中药锦红片对梗阻状胆管炎细胞免疫功能的影响, 目的比较明确, 方法可靠, 对阐明中药的作用机制有一定的帮助, 总体上有一定的指导意义.

## 4 参考文献


1 智绪亭, 侯向前, 李涛, 孙凯, 刘凤军, 寿楠海. 胆总管梗阻解除前后脑肠肽及免疫水平变化的实验研究. 中国现代普通外科进展 2004; 7: 229-231

2 严东旺, 张炳彦, 王炳煌, 郭永章. 血小板活化因子对梗阻性黄疸机体细胞免疫功能的影响. 肝胆外科杂志 2003; 11: 473-475

3 龚建平, 韩本立, 罗丁, 段恒春, 彭志明. 急性胆道感染时肠粘膜屏障损伤的研究. 中华实验外科杂志 1991; 8: 115-116

4 胡明华, 李涛, 房淑彬, 刘中金. 梗阻性黄疸细胞免疫功能变化的发生机理. 皖南医学院学报 2002; 21: 143-146

5 张静喆, 章学林, 高炬, 沈平, 马恩伟, 顾宏刚, 朱培庭. 清热通下中药对胆管炎大鼠肠屏障保护和炎症反应调控的研究. 中西医结合学报 2005; 3: 211-215

6 Yee SB, Ganey PE, Roth RA. The role of Kupffer cells and TNF-alpha in monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury. *Toxicol Sci* 2003; 71: 124-132

7 常明向, 章晶, 陈科力. 单味中药及活性成分体外抗内毒素实验研究. 中国药师 2007; 10: 18-20

8 McKean DJ, Huntoon CJ, Bell MP, Tai X, Sharrow S, Hedin KE, Conley A, Singer A. Maturation versus death of developing double-positive thymocytes reflects competing effects on Bcl-2 expression and can be regulated by the intensity of CD28 costimulation. *J Immunol* 2001; 166: 3468-3475

9 丁丽, 蔡德鸿, 蒋定文. 超抗原SEB体外诱导胸腺细胞凋亡的研究. 中国免疫学杂志 2005; 21: 121-123

10 陈拥彬, 刘德明. 小鼠胸腺的结构、功能与日龄的关系. 实验动物科学与管理 2005; 22: 6-8

11 汪泱, 胡峰, 郭菲, 袁铿, 胡银英. 氯化镧拮抗内毒素效应的小鼠体内研究. 中华医学杂志 2004; 84: 242-247

12 朱培庭, 张静喆, 高炬, 章学林, 王志刚, 沈平, 宋华荣, 李培成, 严敏瑜, 姜维洁, 陈同钧. 锦红片对急性胆道感染大鼠细胞因子调节和肠黏膜屏障保护作用的实验研究. 上海中医药杂志 2001; 35: 39-42


电编 张敏 编辑 程剑侠

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2054-2058
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

# 隐匿性慢性乙型肝炎肝内$CD_4^+$和$CD_8^+$的表达与相关分析

肖影群, 章 萍

■背景资料
隐匿性慢性乙型肝炎是指血清HBsAg阴性, 但血清和(或)肝组织中HBV DNA阳性, 并有慢性乙型肝炎的临床表现. 另约有20%隐匿性慢性乙型肝炎患者除HBV DNA阳性外, 其余HBV血清学标志均为阴性. 由于长期持续感染, 病变活动潜隐, 进展常较难完全预料. 易导致重度肝炎和肝硬化, 严重威胁人类健康.

肖影群, 章萍, 江西省南昌市第九医院(南昌大学医学院附属感染医院)病理科 江西省南昌市 330002
**通讯作者:** 肖影群, 330002, 江西省南昌市洪都中大道167号, 江西省南昌市第九医院(南昌大学医学院附属感染医院)病理科. xiaoyq2008@126.com
电话: 0791-7069554 传真: 0791-7069636
收稿日期: 2007-03-07 接受日期: 2007-04-02

## Expression of $CD_4^+$ and $CD_8^+$ in liver of patients with occult hepatitis B virus infection

Ying-Qun Xiao, Ping Zhang

Ying-Qun Xiao, Ping Zhang, Department of Pathobiology, Ninth Hospital of Nanchang (Affiliated Infectious Disease Hospital of Nanchang University), Nanchang 330002, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Ying-Qun Xiao, Department of Pathobiology, Ninth Hospital of Nanchang, 167 Hongdu Central Road, Nanchang 330002, Jiangxi Province, China. xiaoyq2008@126.com
Received: 2007-03-07 Accepted: 2007-04-02

## Abstract

**AIM:** To study the relationship between the expression and distribution of $CD_4^+$ and $CD_8^+$ T lymphocytes and disease severity in liver with occult HBV infection.

**METHODS:** Sixty-three in-patient cases without clinical syndromes or signs but shown to be HBV infected by pathological diagnosis of liver tissue obtained by needle aspiration biopsy were studied. $CD_4^+$ and $CD_8^+$ were detected by immunohistochemical staining, and HBV DNA was detected by *in situ* hybridization in formalin-fixed and paraffin-embedded sections.

**RESULTS:** $CD_4$ positive cells showed increased expression in liver of patients with occult HBV infection in the areas having mononuclear macrophages. $CD_4$ and $CD_8$ positive cells were significant among pathological types ($\chi^2 = 12.709$, $P < 0.05$). There was no obvious difference of $CD_4^+$ between chronic hepatitis and occult hepatitis B virus infection.

**CONCLUSION:** Mononuclear macrophages were seen in areas of piecemeal and bridging necrosis in portal areas and their circumference. As liver damage developed, more $CD_4^+$ and $CD_8^+$ cells were expressed.

Key Words: Occult Hepatitis B; Pathobiology in live tissue; Immunohistochemical staining; *In situ* hybridization; $CD_4^+$; $CD_8^+$

Xiao YQ, Zhang P. Expression of $CD_4^+$ and $CD_8^+$ in liver of patients with occult hepatitis B virus infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2054-2058

## 摘要

**目的:** 研究隐匿性乙型肝炎患者肝穿组织中$CD_4^+$和$CD_8^+$表达与慢性肝病病变活动的相关分析.

**方法:** 收集HBV感染临床发病隐匿、经肝穿病理诊断的住院病例63例, 用免疫组化法检测$CD_4^+$和$CD_8^+$, 原位杂交法检测HBV DNA, 镜下观察.

**结果:** $CD_4^+$和$CD_8^+$在隐匿性乙型慢性肝炎患者肝内单个核细胞浸润区中随着肝损害程度加重, 表达增加, $CD_4^+$表达显著增加, $CD_4^+$和$CD_8^+$表达与病理类型间的关系具有显著性差异($\chi^2 = 12.709$, $P<0.05$), 在慢性肝炎与隐匿性肝炎中$CD_4^+$表达无显著性差异($P>0.05$).

**结论:** 随着肝损害程度加重, 在隐匿性乙型慢性肝炎患者的单个核细胞浸润区中$CD_4$和$CD_8$阳性细胞数都增加, 且$CD_4$阳性细胞增加更为显著.

**关键词:** 隐匿性乙型肝炎; 肝组织病理; 免疫组化; 原位杂交; $CD_4^+$; $CD_8^+$

肖影群, 章萍. 隐匿性慢性乙型肝炎肝内$CD_4^+$和$CD_8^+$的表达与相关分析. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2054-2058
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2054.asp

## 0 引言

隐匿性慢性乙型肝炎是指血清HBsAg阴性, 但血清和(或)肝组织中HBV DNA阳性, 并有慢

性乙型肝炎的临床表现. 患者可伴有血清抗-HBs、抗-HBe和(或)抗-HBc阳性. 另约有20%隐匿性慢性乙型肝炎患者除HBV DNA阳性外, 其余HBV血清学标志均为阴性. 诊断需排除其他病毒及非病毒因素引起的肝损害[1]. 隐匿性HBV感染的发病机制尚不清楚, 他可以导致肝硬化和原发性肝癌[2]. 近年来, 隐匿性HBV感染的发病机制及干预性研究是国内外肝病研究领域的热点之一. 我院的临床病理资料发现, 在一些HBsAg阴性慢性HBV感染者以及经抗病毒治疗的乙型肝炎患者中, 血清HBV DNA定量(-)(即<$10^6$ copies/L), 临床症状无或轻, 肝功能基本正常或长期低水平的范围内(血清ALT, AST水平一般低于100 U/L)反复异常. 经肝穿病理组织检查, 发现多数患者已进展到重度慢性肝炎或肝硬化, 进行肝组织HBV DNA原位杂交, 阳性信号定位于少数或多数肝细胞的胞核和/或胞质, 免疫组化亦有HBsAg或HBcAg的表达. 目前, 对于这部分患者的肝组织病理变化及HBV低水平复制状态下细胞免疫应答激发病变活动的相关研究较少. 我们的目的是对63例隐匿性乙型肝炎患者肝穿组织中$CD_4^+$, $CD_8^+$表达与慢性肝病病变活动进行相关分析, 旨在为探讨隐匿性乙型肝炎的发病机制和防治应用提供新的思路.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2002-05/2006-05, HBV感染、临床发病隐匿, 经肝穿病理诊断的住院患者63例, 其中男56例、女7例, 年龄18-51(平均32)岁. 全部病例均是血清HBV DNA定量阴性(<$10^6$ copies/L), HBsAg阴性, 而在肝穿组织中有HBV DNA阳性信号定位和HBsAg或HBcAg的表达, 病程在6 mo以上, 最长病程18 a, 均排除甲、丙、丁、戊、庚型肝炎及自身免疫性肝炎. 所有病例的诊断均符合2000年全国第十次传染病寄生虫病学术会议(西安)所制定的诊断标准[3], 其中轻度和中度慢性肝炎12例, 重度23例, 活动性肝硬化28例. 慢性乙型肝炎73例作对照组[4].

1.2 方法

1.2.1 组织标本的制备 肝穿刺标本经40 g/L中性甲醛固定, 固定时间>4-6 h, 但不超过20 h. 石蜡包埋连续切片, 厚4 μm, 分别行HE和网状纤维, Masson, VG三项特染及免疫组化、原位杂交观察.

1.2.2 HBV DNA原位杂交检测 原位分子杂交采用福建泰普生物科学有限公司生产的超敏检测HBV DNA生物素探针试剂盒, HBV探针为随机引物Dig标记的全基因测序, 操作步骤严格按产品说明书进行. 阴性对照液代替探针作阴性对照, 已知阳性片作阳性对照.

1.2.3 HBsAg, HBcAg免疫组化检测 HBsAg mAb (MAB-0234), HBcAg mAb (RAB-0090)和Envison试剂盒均购自Maixin-Bio公司. 一抗稀释度均为1∶50, 步骤均按Envison 2步法进行, PBS代替一抗作阴性对照, 已知阳性片作阳性对照.

1.2.4 T细胞亚型免疫组化检测 $CD_3$ mAb (MAB-0030), $CD_{45RO}$ mAb (MAB-0039), $CD_{20}$ mAb (MAB-0020), $CD_{79a}$ mAb (MAB-0258), $CD_4$ mAb (MAB-0251), $CD_8$ mAb (RMA-0514)和Envison试剂盒均购自Maixin-Bio公司. 一抗的稀释度均为1∶50, 步骤按Envison 2步法进行, 正常肝组织和PBS代替一抗作阴性对照, Maixin-Bio公司提供的标准阳性片为阳性对照. 阳性结果判断: $CD_3$, $CD_{45RO}$, $CD_{79a}$, $CD_4$表达定位于细胞膜和细胞质, $CD_{20}$, $CD_8$表达定位于胞膜. 镜下观察到$CD_3$, $CD_{45RO}$着色的单个核细胞占65%-70%以上, 而$CD_{20}$, $CD_{79a}$着色的单个核细胞仅占20%以下. 以每一标本的炎症活动度高[5-6]的汇管区、桥接坏死区和小叶内点、灶状融合坏死区进行$CD_4^+$, $CD_8^+$计数. 判断标准: $CD_4$阴性(-): 不显色; 阳性(+): 每高倍视野棕色单个核细胞<20个; 强阳性(++): 每高倍视野棕色单个核细胞≥20个. $CD_8$阴性(-): 不显色或个别极少数显色; 阳性(+): 每高倍视野棕色单个核细胞<30个; 强阳性(++): 每高倍视野棕色单个核细胞≥30个[4].

**统计学处理** 分析63例隐匿性慢性乙型肝炎患者肝功能ALT指标, 采用$t$检验; 分析肝内$CD_4^+$, $CD_8^+$表达与病理类型的关系, 资料统计采用有序分组资料的线性趋势$\chi^2$检验; 分析$CD_4^+$表达情况与慢性肝炎和隐匿性肝炎类别的关系, 资料统计采用四格表资料$\chi^2$检验; 分析35例隐匿性肝炎肝内$CD_4^+$表达与病理类型的关系, 资料统计采用四格表资料的Fisher确切概率.

## 2 结果

2.1 肝组织病理检查及肝功能ALT指标结果 63例隐匿性HBV感染患者肝组织检查结果中, 轻和中度慢性肝炎12例(占19.05%), 重度23例(占36.51%), 活动性肝硬化28例(占44.44%), 重度肝炎和活动性肝硬化(占80.95%). 提示隐匿性慢性肝炎患者由于长期持续感染, 病变活动常潜隐, 进展常较难完全预料. 本研究组63例患者肝组织原位杂交HBV DNA均有阳性信号(图1A),

**■研发前沿**
对于隐匿性慢性乙型肝炎的肝穿组织病理变化及HBV DNA低水平复制状态时, 进行肝内HBV特异细胞毒性T细胞$CD_4^+$, $CD_8^+$表达的分析, 和细胞免疫应答病变活动的相关研究.

**■相关报道**
本文作者曾在2005年研究过“慢性乙型肝炎肝组织T淋巴细胞亚型与病变关系”、“慢性乙型肝炎肝组织T淋巴细胞亚型与病变关系的病理临床研究”, 研究慢性乙型肝炎患者肝内$CD_4^+$、$CD_8^+$的表达、分布与病变关系, 并探讨了$CD_4^+$、$CD_8^+$分布与肝功能改变、HBV DNA载量的相关性. 该项病理研究为肝病的免疫学病理检查, 提供了一种新的方法, 同时对慢性乙型肝炎临床疗效观察, 预后判断、免疫调节治疗, 具有重大的指导意义.

**■创新盘点**
本文就隐匿性慢性乙型肝炎HBV感染的诊断和在HBV低水平复制状态下, 仍有针对HBV的特异性T淋巴细胞免疫应答, 导致感染肝细胞的损伤.

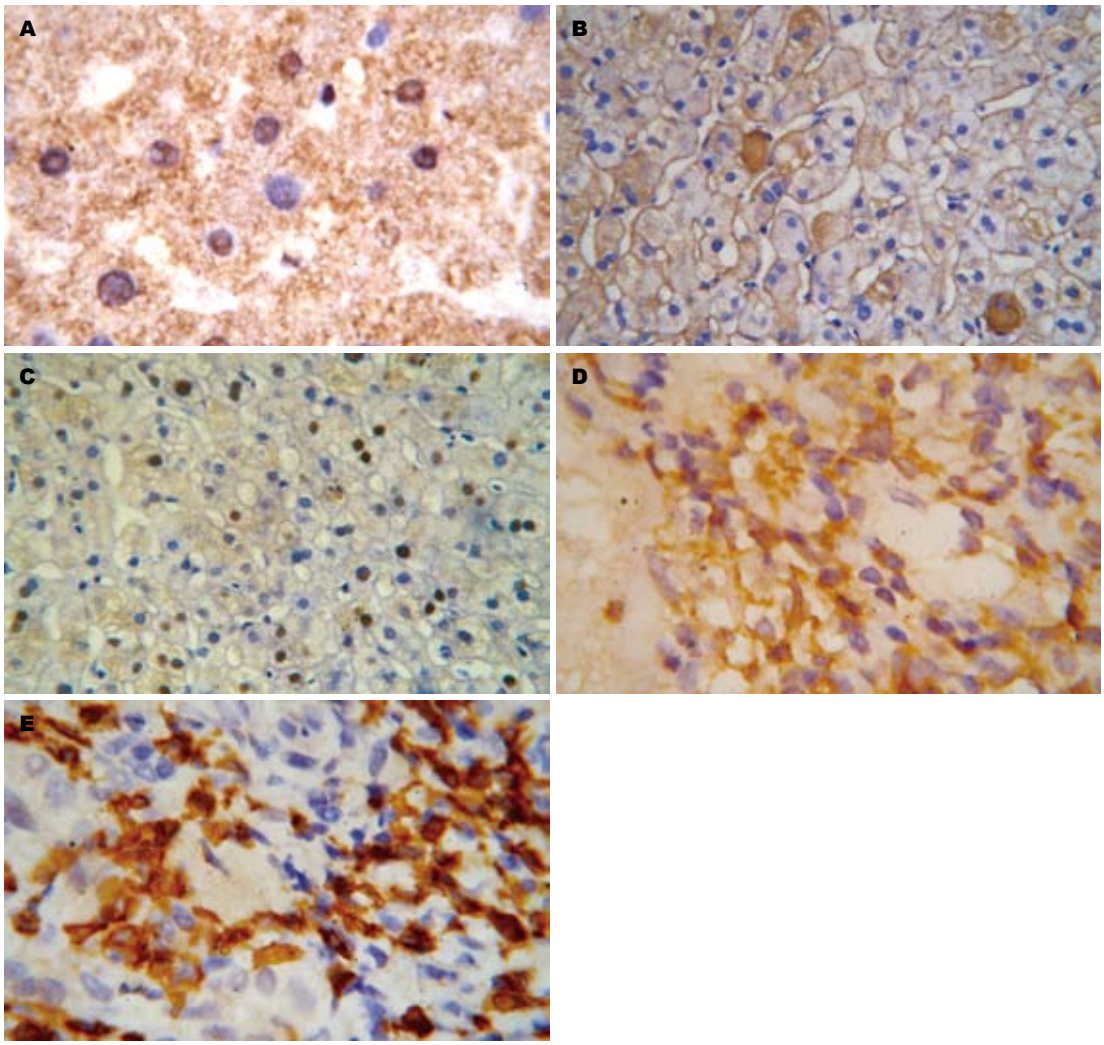



图 1 隐匿性乙型肝炎肝组织(A: 原位杂交; B–E: Envision法, 高倍放大). A: HBV DNA; B: HBsAg; C: HBcAg; D: $CD_4$; E: $CD_8$.

是HBV感染及复制的重要依据. 其病理诊断结果、肝内HBsAg, HBcAg阳性检出率(图1B-C)、肝功能ALT指标统计见表1.

2.2 隐匿性慢性肝炎患者肝组织中$CD_3$, $CD_{45RO}$, $CD_{20}$, $CD_{79a}$的表达 $CD_3$, $CD_{45RO}$对T细胞有较高的特异性表达, $CD_{20}$, $CD_{79a}$常见于B细胞表达. 本研究组63例肝组织中, $CD_3^+CD_{45RO}^+$细胞为炎症浸润的单个细胞中的主要成份, 而$CD_{20}^+$ $CD_{79a}^+$细胞占极少数.

2.3 肝组织$CD_4^+$, $CD8^+$表达类型及分布特征 $CD_4$, $CD_8$在肝组织中的染色显棕色, 呈散在、弥漫或片状分布, 表达于肝内炎症坏死活动区浸润的单个核细胞中(图1D-E).

2.4 肝组织$CD_4^+$, $CD_8^+$表达与肝组织病变损伤的关系 63例患者肝穿刺标本切片中, $CD_4^+$表达阴性的有17例, 表达阳性(+)的有24例, 阳性(++)的有22例; $CD_8^+$表达阴性的12例, 表达阳性(+)的有26例, 阳性(++)的有25例. 63例隐匿性慢性肝炎患者肝内$CD_4$表达与病理类型的关系, 三者差异有统计学意义($\chi^2 = 12.709$, $P<0.05$, 表2-3).

2.5 $CD_4^+$在慢性肝炎与隐匿性肝炎中的表达结果表明二者差异无统计学意义($\chi^2 = 0.637$, $P>0.05$, 表4).

2.6 35例隐匿性肝炎肝内$CD_4^+$表达与病理类型的关系(表5) 二者差异有显著意义($P<0.05$).

## 3 讨论

隐匿性HBV的发生机制仍不十分清楚, 目前认为可能有多种机制[7-8]. (1)HBV低水平复制; (2)HBV与宿主染色体整合; (3)机体免疫状态; (4)HBV基因变异, HBV基因S区突变和相关区的基因重排, 致HBsAg抗原性发生改变[9]; (5)HBV的免疫复合物[10].

HBV低复制状态与隐匿性慢性肝炎的相关性. 本研究组资料提示HBsAg阴性、肝功能长期低水平的范围内反复异常的患者中, 存在较

**■应用要点**
有必要对HBsAg阴性的HBV感染引起重视, 虽然大部分隐匿性HBV感染患者的HBV DNA水平低, 仍病变活动程度较严重, 结合实际考虑抗病毒治疗.

表 1 63例肝组织原位杂交HBV DNA阳性的隐匿性慢性肝炎患者病理诊断结果, HBV标志和ALT

| 病理类型 | *n*(%) | HBsAg阳性*n*(%) | HbcAg阳性*n*(%) | ALT(mean ± SD, U/L) |
|---|---|---|---|---|
| 轻度和中度慢性肝炎 | 12(19.05) | 11(91.67) | 10(83.33) | 64.00 ± 27.44 |
| 重度慢性肝炎 | 23(36.51) | 19(82.61) | 15(65.22) | 65.22 ± 28.33 |
| 活动性肝硬化 | 28(44.44) | 25(89.29) | 11(39.29) | 53.29 ± 20.85 |

表 2 63例隐匿性慢性肝炎患者肝内$CD_4$表达与病理类型的关系

| 病理类型 | $CD_4^+$ | | | 合计 |
|---|---|---|---|---|
| | − | + | ++ | |
| 轻度和中度慢性肝炎 | 8 | 2 | 2 | 12 |
| 重度慢性肝炎 | 6 | 12 | 5 | 23 |
| 活动性肝硬化 | 3 | 10 | 15 | 28 |
| 合计 | 17 | 24 | 22 | 63 |

$\chi^2 = 12.709$, $P<0.05$.

表 3 63例隐匿性慢性肝炎患者肝内$CD_8$表达与病理类型的关系

| 病理类型 | $CD_8^+$ | | | 合计 |
|---|---|---|---|---|
| | − | + | ++ | |
| 轻度和中度慢性肝炎 | 2 | 8 | 2 | 12 |
| 重度慢性肝炎 | 5 | 8 | 10 | 23 |
| 活动性肝硬化 | 5 | 10 | 13 | 28 |
| 合计 | 12 | 26 | 25 | 63 |

$\chi^2 = 1.110$.

表 4 $CD_4^+$在慢性肝炎与隐匿性肝炎中的表达

| 病理类型 | $CD_4$ | | *n* | 阳性率 |
|---|---|---|---|---|
| | − | +~++ | | |
| 慢性肝炎 | 23 | 50 | 73 | 68.5 |
| 隐匿性肝炎 | 14 | 21 | 35 | 60 |
| 合计 | 37 | 71 | 108 | 65.7 |

$\chi^2 = 0.637$.

表 5 隐匿性肝炎肝内$CD_4^+$表达与病理类型的关系

| 病理类型 | $CD_4$ | | *n* |
|---|---|---|---|
| | − | +~++ | |
| 轻型和中度慢性肝炎 | 8 | 4 | 12 |
| 重度慢性肝炎 | 6 | 17 | 23 |
| 合计 | 14 | 21 | 35 |

$P<0.05$.

高的隐匿性HBV感染. 这可能是由于病毒复制和表达水平过低, 体内HBV复制正处于低谷期, 因而血清中HBV载量很低, 约为$10^{5-6}$ copies/L,每个肝细胞含有0.01-0.1 copies[2]. 说明病毒隐匿于细胞中与肝细胞核整合, 肝组织感染HBV的阳性表达机会多于血清, HBV血清标志呈阴性的肝病患者, 采用原位杂交技术[10], 能从肝细胞中检出极为微量的HBV DNA, 有利于提高对HBV感染的诊断, 弥补检测血清HBV标志的不足. 同时表明HBV低复制状态时, 大部分肝细胞内仍有病毒抗原表达, 表达S抗原多见(表1), 可能和S基因位线型HBV DNA分子中部区域, 在整合过程中不易被破坏有关, 说明HBsAg, HBcAg均有可能作为对肝细胞引起免疫攻击的靶抗原, 激发免疫应答引起肝细胞凋亡, 造成肝细胞损害, 虽然肝功能正常或长期低水平的范围内反复异常, 仍有部分患者进入重度肝炎、肝硬化或肝癌.

机体免疫应答失调与隐匿性慢性肝炎的相关性. 隐匿性慢性肝炎的HBV低复制状态时, 仍有针对HBV的特异性T淋巴细胞免疫应答. 说明, 肝细胞内HBV低复制状态下, 仍产生HBsAg颗粒和病毒体, 这两种类型的颗粒均被抗原递呈细胞捕获, 经处理后递呈给结合了主要组织相容性抗原(MHC) Ⅰ或Ⅱ类分子的细胞表面, 这些特异的抗原可以分别被$CD_4^+$或$CD_8^+$ T细胞识别[11]. 在$CD_4^+$ T细胞的协助下, 促发病毒特异性$CD_8^+$ T细胞、识别感染的肝细胞MHC Ⅰ链上呈现出来的病毒抗原, 导致感染的肝细胞直接溶解. 所以, 特异性T淋巴细胞在慢性损伤性免疫应答中亦发挥重要作用[12].

本研究结果表明, (1)隐匿性乙型肝炎患者肝内单个核细胞浸润区$CD_3^+$ T细胞数显著增高(占65%-70%以上), 但因病理类型不同, T细胞亚群$CD_4$, $CD_8$的表达情况不同; (2)在汇管区、桥接坏死和程度不同的小叶内坏死的单个核细胞浸润区, 随着肝损害程度加重, 除有$CD_8$阳性细胞逐渐大量表达外, $CD_4$阳性细胞表达数量增加, 并且各病理类型间比较, 差异具有显著性

■名词解释

隐匿性慢性乙型肝炎: 是指血清HBsAg阴性, 但血清和(或)肝组织中HBV DNA阳性, 并有慢性乙型肝炎的临床表现. 患者可伴有血清抗-HBs、抗-HBe和(或)抗-HBc阳性. 另约有20%隐匿性慢性乙型肝炎患者除HBV DNA阳性外, 其余HBV血清学标志均为阴性. 诊断需排除其他病毒及非病毒因素引起的肝损害.

**■同行评价**
本文对63例隐匿性乙型肝炎肝内$CD_4^+$, $CD_8^+$的表达研究显示, $CD_4$, $CD_8$在阴匿性乙型肝炎发展的重要性, 选题合理, 实验方法可信, 有一定的参考价值.

($P$<0.05), 说明$CD_4^+$辅助性T细胞可以促进肝内细胞炎症反应, 介导肝细胞损伤引起严重的免疫病理反应, 造成肝脏炎症持续性存在. 但是肝内$CD_8^+$的表达, 虽然随病变的加重而数量增加, 但差异无显著意义($P$>0.05). 以上统计学结果与本作者的“慢性乙型肝炎肝组织T淋巴细胞亚型与病变关系”研究结果基本一致. 说明研究$CD_4^+$, $CD_8^+$在隐匿性HBV感染的慢性肝病中表达与相关分析同样很重要[4]; (3)由于肝脏炎症浸润的单个核细胞中$CD_8^+$的表达, 虽然随病变的加重亦数量增加, 但统计学上差异无显著意义, 认为与肝脏病理损伤严重程度并不一致. 所以进行$CD_4^+$表达情况的比较. 在慢性肝炎与隐匿性肝炎类别的关系比较中($P$>0.05), 说明还不能认为两组$CD_4$阳性率有差别. 而35例隐匿性肝炎肝内$CD_4^+$表达与病理类型的关系($P$<0.05), 说明肝内$CD_4^+$的表达, 随病变的加重而数量增加, 主要是肝组织内后期大量增生的巨噬细胞可以表达高水平的MHCⅡ类分子, 他们能高效地呈递病毒抗原给HLA-Ⅱ类分子限制的$CD_4^+$ T细胞, 促进其释放自身一系列的细胞因子, 典型的迟发型变态反应在感染的肝细胞中也是激活状态的, 即通过淋巴因子来发挥其免疫效应[13], 因此过高的$CD_4^+$导致免疫过强引起免疫损伤, 更加重肝损害.

所以, 在隐匿性慢性肝病时, 病变活动隐匿性进展过程中, 机体免疫调控异常起了重要作用, 导致了长期慢性感染. 需要进行适当的免疫调节治疗, 以减轻免疫性肝损伤, 使其临床过程趋向缓解与稳定[14-15].

## 4 参考文献


1 中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
2 罗生强, 张玲霞. 第14届亚太地区肝病学术会议纪要. 传染病信息 2005; 18: 46-48
3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
4 肖影群, 章萍, 涂相林. 慢性乙型肝炎肝组织T淋巴细胞亚型与病变关系. 江西医学院学报 2005; 45: 1-2, 5
5 Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513-1520
6 骆抗先. 乙型肝炎临床与活体组织病理. 北京: 科学出版社, 2001: 81-86
7 江红, 汤正好. 隐匿性乙型肝炎. 临床肝胆病杂志 2004; 20: 311-312
8 刘爱平, 庞晓鹰, 周大明, 王开林, 耿爱文. 隐匿性乙型肝炎79例临床与病理分析. 中西医结合肝病杂志 2006; 16: 13-15
9 史宇晖, 庄辉. 隐匿性乙型肝炎研究现状. 传染病信息 2005; 18: 97-99
10 Mariscal LF, Rodriguez-Inigo E, Bartolome J, Castillo I, Ortiz-Movilla N, Navacerrada C, Pardo M, Perez-Mota A, Graus J, Carreno V. Hepatitis B infection of the liver in chronic hepatitis C without detectable hepatitis B virus DNA in serum. *J Med Virol* 2004; 73: 177-186
11 朱立平. 感染性疾病免疫学. 北京: 化学工业出版社, 2005: 257-265
12 Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 771-778
13 邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵军, 周光德, 潘登. HBV慢性感染患者免疫耐受期肝组织内T、B淋巴细胞的变化. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1529-1534
14 陈紫榕. 病毒性肝炎. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 89-112
15 池肇春. 实用临床肝病学. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 272-273


电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2059-2062
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

# 老年人急性药物性肝病临床分析30例

林 静, 王亚丽, 王海燕

林静, 王亚丽, 王海燕, 清华大学第一附属医院消化内科 北京市 100016
**通讯作者:** 林静, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化内科. wanghaiy@sohu.com
电话: 010-64312901
收稿日期: 2006-12-30 接受日期: 2007-01-10

## Review of 30 cases of acute drug induced liver disease in the elderly

Jing Lin, Ya-Li Wang, Hai-Yan Wang

Jing Lin, Ya-Li Wang, Hai-Yan Wang, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Tsing Hua University, Beijing 100016, China
Correspondence to: Jing Lin, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Tsing Hua University, Beijing 100016, China. wanghaiy@sohu.com
Received: 2006-12-30 Accepted: 2007-01-10

## Abstract

**AIM:** To review common inducing drugs and their clinical manifestations, to discuss the grouping and prognosis of acute drug induced liver disease (ADLD) in the elderly, and to enhance the diagnosis capabilities and management of ADLD.

**METHODS:** A retrospective-study to 30 cases of ADLD, chosen according to diagnosis standards.

**RESULTS:** The types of drugs inducing ADLD were as follows: 9 cases of traditional and herbal drugs (30.3%); 5 of antibiotics (16.7%); 3 each of nonsteroidal anti-inflammatory, iodized oil roentgenograph, and anti-hyperthyroidism drugs (30.0%); and 7 others (23.3%). Manifestations were: acute hepatocellular lesions, 20 cases (66.7%); acute cholestasis, 3 cases (10.0%); mixed type, 7 cases (23.3%). Curative effects were: 18 cases of a cure (60.0%), 8 improvements (26.7%), 2 deteriorations (6.7%), and 2 deaths (6.7%).

**CONCLUSION:** The elderly are more sensitive and have less reserved organ functions than younger age groups. Thus it is easier for acute drug induced liver disease to occur in the elderly, especially in patients with other chronic diseases. As side-effects can be very serious, clinicians need to pay attention to ADLD and exercise great care regarding drug use in the elderly.

Key Words: Elderly; Acute drug inducing liver diseases; Side-effect

Lin J, Wang YL, Wang HY. Review of 30 cases of acute drug induced liver disease in the elderly. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2059-2062

## 摘要

**目的:** 探讨老年人急性药物性肝病的常见诱发药物、临床表现、分型及预防, 以提高对该病的诊断水平.

**方法:** 对符合诊断标准的30例急性药物性肝病患者的临床资料进行回顾性分析.

**结果:** 诱发老年人急性药物性肝病的药物中, 中草药9例(30.3%), 抗生素5例(16.7%), 解热镇痛药, 碘油造影剂和抗甲亢药均3例(10.0%), 其他7例(23.3%). 临床表现为急性肝细胞型20例(66.7%), 急性胆汁淤积型3例(10%), 混合型7例(23.3%). 其中治愈18例(60.0%), 好转8例(26.7%), 恶化2例(6.7%), 死亡2例(6.7%).

**结论:** 老年人对药物敏感性增加, 容易引起急性药物性肝损伤和不良反应, 临床医生必须加以高度重视, 谨慎用药.

**关键词: 老年; 急性药物性肝病; 不良反应**

林静, 王亚丽, 王海燕. 老年人急性药物性肝病临床分析30例. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2059-2062
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2059.asp

**■背景资料**
目前, 随着人口的老龄化, 老年人用药不断增多, 药物性肝损伤的发病率也越来越高. 认识这方面疾病的发生发展特点, 使之得到有效的预防和治疗, 显得尤为重要.

## 0 引言

随着人口的老龄化, 老年人用药机率的增加, 各种药物对老年人肝脏的不良反应和毒副作用日益显现出来, 已经成为肝脏疾病中发病较高, 需临床高度重视的一种疾病, 我科近5 a来已收治因药物导致的肝损伤的老年患者30余例, 我们对临床资料进行总结回顾性分析如下.

■创新盘点
本文结合老年人药物代谢的特点, 认真分析总结了老年人在服用不同药物后出现急性肝损伤的各方面特点.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2000-01/2004-12在我院住院的肝病患者30例, 其中男16例, 女14例, 年龄60-79(平均69.5)岁.

1.2 方法 通过本院病案管理软件, 以关键词“药物性肝病”检索出相关病例, 根据诊断标准剔出不相符的病例后, 共收集30份病历, 分别记录一般资料、既往史、用药史、临床表现、实验室检查和治疗方案等, 并进行数据分析. 根据1997年MARIA *et al*[1]提出的“药物性肝病损害的诊断标准”进行评分, 总分>14分者, 同时符合江绍基 *et al*[2]提出的药物性肝病诊断标准者入选. 按照世界卫生组织所属医学科学国际组织委员会制定的急性肝损伤诊断标准[3], 肝功能异常持续时间不超过3 mo. 临床分析标准参照国际药物性肝损伤分型标准[4]分为3型: ALT(谷丙转氨酶)升高>2倍, ALT/碱性磷酸酶(ALP)≥5为肝细胞型, ALT/ALP≤2为肝内胆汁淤积型, ALT和ALP均升高, ALT和ALP在2-5之间为混合型. 治疗效果判断标准: (1)治愈: ALT、AST、总胆红素恢复至正常上限的2倍以内; (2)好转: 上述指标有所恢复, 但仍超过正常上限的2倍; (3)恶化: 上述指标恶化, 临床表现加重或出现新的并发症; (4)死亡: 在住院期间死亡.

## 2 结果

2.1 诱发急性药物性肝病的药物 其中中草药所占比例最大, 为30%, 其次为抗生素等(表1).

2.2 肝功能情况 停用导致肝损伤的药物, 并应用保肝药物后, ALT、AST等酶学指标明显下降, 但总胆红素(TBiL), 直接胆红素(DBiL)下降缓慢(表2).

2.3 急性药物性肝炎的临床表现 多不典型, 纳差、腹胀、黄疸为常见的表现, 部分患者出现腹水和肝性脑病(表3).

2.4 合并其他肝病 除有4人乙肝抗体阳性, 1人丙肝抗体阳性外, 余者肝脏病毒学检查均阴性, 5人做了免疫学检查, 其中4人抗核抗体(ANA)1∶160, 1人抗线粒体抗体(AMA)1∶160, 1人AMA 1∶80, 1人抗胃壁细胞抗体1∶320, 余均阴性.

2.5 急性药物性肝病的临床分型 急性肝细胞型20例, 占66.7%; 急性胆汁淤积型3例, 占10%; 混合型7例, 占26.7%.

2.6 治疗及预后 本组病例一经临床确诊, 立即停用可能导致肝损害的相关药物, 静脉给予甘草酸二胺、还原型谷胱甘肽、维生素C, 口服水蓟飞制剂. 治愈18例(60%), 好转8例(26.7%), 恶化2例(6.7%), 死亡2例(6.7%).

## 3 讨论

从本组临床资料分析来看, 老年人急性药物性肝损伤以急性肝细胞损伤为主, 其次是混合型, 单纯胆汁淤积型占少数. 老年人对药物反应敏感性增加, 不良反应出现率高, 肝损害频率也高. 究其原因主要是由于老年人胃肠道血流量降低, 蠕动减慢, 药物在体内滞留时间延长; 老年人机体内水分相对减少, 脂肪比例增加, 脂溶性高的药物在脂肪组织积蓄, 作用时间延长; 老年人肝血流量低下, 肝重量减少, 肝内药物代谢酶活性低下, 酶亚群变异增加; 老年人肾血流量降低, 肾滤过率低下, 肌酐清除率下降, 对主要由肾脏排泄的药物作用缓慢; 随年龄增加, 某些药物(如钙通道阻滞剂、苯二氮卓类)与药物的靶细胞或靶器官的药效学反应性发生变化, 敏感性增强[5]; 老年人合并有心脏、肝、肾等慢性疾病多, 运动减少, 联合应用多种药物的概率增加, 更易出现药物间的相互作用, 使血药浓度明显升高. 因此, 临床上对于老年人用药应注意根据药物动态特征来给药, 且有必要加以监控, 给药时应注意小量、简单和短程原则, 合用药物最好不要超过5种以上[6], 这样才能有效地避免药物性不良反应, 尤其是药物性肝病的发生. 在本组引起肝脏损伤的药物中, 抗心律失常药、降糖药、调脂药、冠脉碘油造影剂引起者占了一定的比例. 在降糖药物中, 二甲双胍是基础、常用药物, 价格低廉, 作用肯定, 但因药物在肝脏中降解, 对于年龄>65岁患者应谨慎用药, 用量应减少. 碘油造影剂是诊断血管性疾病常用药物, 其主要不良反应是过敏反应, 但对于糖尿病患者, 因其本身可能潜在有肝、肾功能不良, 碘剂显影后, 尤其是造影剂量偏大时, 也可以出现肝功损伤. 本组这3例患者均为糖尿病患者造影后出现了肝功异常.

本组患者中比例较大的是应用各种中草药制剂引发了不良反应的患者. 由于中药受安全和无毒性传统观念的影响, 许多老年人患病后不到正规医院看病, 而是听广告宣传自行选择各种中草药治疗. 特别是一些糖尿病患者, 服用各种降糖茶、降糖秘方后引起肝脏损伤者不断增多. 目前国内报道的引起肝脏损伤的单味中药有50种之多[7-8], 如黄药子、马兜铃、贯众、

表 1 30例急性药物性肝病的诱发药物统计

| 分类 | 药名 | *n*(%) | 服药时间(d) |
|---|---|---|---|
| 抗心律失常药 | 心律平 | 1(6.6) | 15 – 20 |
| | 黄杨宁 | 1 | |
| 中草药 | | 9(30) | 10 – 30 |
| 碘油造影剂 | | 3(10) | |
| 降糖药 | 二甲双胍 | 2(6.6) | 14 – 30 |
| 抗甲亢药 | 他巴唑 | 3(10) | 30 – 360 |
| 抗生素 | 诺氟沙星 | 2(16.7) | 2 – 5 |
| | 左旋氧氟沙星 | 3(10) | |
| 解热镇痛药 | 安乃近 | 2(10) | 10 – 15 |
| | 感冒通 | 1 | |
| 抗结核药 | 利福平 | | |
| | 吡嗪酰胺 | 2(6.7) | 15 – 90 |
| 调脂药 | 辛伐他汀 | 1(3.3) | 30 |

中草药包括参芪降糖粉、太极通天液、感康胶囊、通心络、腰痛宁、皮肤止痒剂各1例. 其余为中药汤剂, 用药不详.

表 2 各项肝功能检查情况

| 肝功能 | 入院时 | 3 d后 | 1 wk后 |
|---|---|---|---|
| ALT | (135.2–1743.3) | (86–804) | (34–198) |
| (U/L) | 808.8 | 345.7 | 193.9 |
| AST | (63.1–1357.7) | (51–461.2) | (28.1–278.5) |
| (U/L) | 631.8 | 195.0 | 162.7 |
| GGT | (57.5–443.2) | (35.1–278.5) | (35.1–131.9) |
| (U/L) | 253.7 | 237.1 | 79.5 |
| ALP | (73–270.6) | (105–362) | (105–125.4) |
| (U/L) | 214.4 | 139.6 | 106.4 |
| TBiL | (23.8–452.6) | (52.7–547.7) | (30.8–429.6) |
| (μmol/L) | 181.0 | 260.2 | 223.1 |
| DBiL | (12.6–364.1) | (33.6–413.5) | (5.8–407.1) |
| (μmol/L) | 148.8 | 184.4 | 146.1 |

表 3 各种临床表现情况

| 临床表现 | *n*(%) |
|---|---|
| 黄疸 | 16(53.8) |
| 腹胀 | 17(63.3) |
| 纳差 | 25(83.3) |
| 腹痛 | 10(33.3) |
| 肝大 | 8(26.6) |
| 脾大 | 7(23.3) |
| 腹水 | 6(20.0) |
| 肝性脑病 | 3(10.0) |

■应用要点

通过此篇文章提醒同行, 在对老年人, 尤其是患有各种慢性疾患的老年人, 药物治疗一定要谨慎小心, 要防止急性药物性肝损伤的发生. 如果已经发生肝损伤, 要及时给予正确的诊断和治疗, 避免延误病情.

黄芩、首乌等. 另外, 中成药内包含了西药被禁用的化学制剂, 以便加大治疗作用, 但在说明书中未注明, 误导患者服用等[9]. 我们应当教育患者, 部分中药及其代谢产物可直接损害肝脏, 亦可引起过敏反应. 中药炮制不当, 服用时间过久, 剂量过大, 种类过多, 更易出现肝损害.

他巴唑是治疗甲状腺机能亢进症的基础用药, 肝损伤的发生率为37.7%, 大多发生于服药后1 mo内(92.9%). 肝损害类型以肝内胆汁淤积为主. 本组3例肝损害中, 有两例是发生在服药1 mo内, 而另一例是发生在服用他巴唑维持量5 mg/d, 10 a后出现了严重的混合型肝损害. ALT升至1365.4 U/L, AST 1357.7 U/L, GGT 420.3 U/L, ALP 156.9 U/L, TBiL从入院时387.2 μmol/L, 3 d后升至547.7 μmol/L, DBiL 从312.2 μmol/L升至413.5 μmol/L, 曾一度出现肝性脑病, 血氨高达400.7 U/L, 出现腹水. 甲、乙、丙、戊型肝炎病毒学检查均阴性, 肝穿病理提示, 肝细胞弥漫性灶状变性坏死, 伴毛细胆管胆栓形成, 肝细胞内有胆色素沉着, 部分汇管区有少数慢性炎细胞浸润. 此患者经各方面积极抢救治疗, 3 mo后病情恢复. 在抗生素应用中容易出现肝损伤的是喹诺酮类药物. 本组5例患者中, 其中一女性患者在服用氟哌酸0.2 tid, 3 d后出现急性肝细胞损伤表现, 另外4例出现了胆汁淤积肝损害. 其中较重一人是在静脉点滴左氧氟沙星0.4 qd, 3 d后出现了严重黄疸. TBIL最高达536.6 μmol/L, DBIL 374.8 μmol/L, ALT1227.5 μ/L, AST 676.2 U/L, GGT 131.9 U/L, ALP 185.9 U/L, 曾一度出现腹水, 肝性脑病, 查甲、乙、丙、戊、庚型肝炎病毒学检查均阴性, 经治疗4 mo后病情恢复.

本组病例从肝功能情况分析, 在停用导致肝损伤的药物, 应用保肝药物后, 急性药物性肝细胞损伤在3 d后ALT、 AST有了明显下降, 1 wk后部分患者降至正常. 但胆汁淤积型和混合型肝损伤, ALT、AST下降较慢, TBiL, DBiL, GGT及ALP 3 d后还会继续升高, 1 wk后仍在较高水平, 严重者持续升高3 wk后才会缓慢下降. 另外, 药物性肝损害一是由于药物的直接毒性作用所为, 二是由于免疫介导引起, 由免疫介导引起的肝损害有不可预测性, 仅发生在某些人或人群(特异体质), 或有家族集聚现象, 与用药剂量和疗程无关, 具有免疫异常指征. 本组病例中有4例ANA 1∶160, 1例AMA 1∶160, 1例AMA 1∶80, 1例抗胃壁细胞抗体1∶320. 而4例均有轻度发热, 关节痛, 皮疹等肝外表况, 血液学检查嗜酸性粒细胞增多, 病情好转后复查以上指标均

■同行评价
本文探讨老年人急性药物性肝病的常见诱发药物、临床表现、分型及预防, 以提高对该病的诊断水平, 在较多的同类研究中有一定的创新性和先进性, 而且为老年人药物性肝病提供了一些有价值的信息, 对临床认识老年人药物性肝病有一定的应用价值.

转为正常. 其中1例是上述的甲亢患者, 用他巴唑5 mg/d, 10 a后出现了严重的药物性肝损伤, 以上抗体均呈阳性反应, 这说明循环中免疫复合物阳性不是器官特异性的自身抗体, 而是由药物过敏产生的相关自身抗体, 在这方面ANA没有特异性, 抗线粒体抗体AMA是原发性胆汁淤积性肝硬化的特异指标, 但在药物性肝损伤中也可能出现, 应注意两者的鉴别诊断.

药物性肝损伤的转归与患者原来的一般状况及肝脏是否合并有其他疾病密切相关. 在本组死亡的二者病例中, 一例是79岁的女性, 肥胖, 高血压心脏病, 重度脂肪肝及糖尿病, 在服用参芪降糖中药后, 患者迅速出现黄疸, 肝功能恶化, 肝衰竭死亡. 另一例患者是丙型肝炎患者, 男, 69岁, 在确诊为糖尿病服用二甲双胍后, 迅速出现肝功恶化而死亡. 但在一般状况良好, 没有基础肝病的其他人, 虽然有的严重者肝功能衰竭, 肝性脑病发生, 但经积极抢救治疗, 全部好转, 恢复健康. 因此, 临床上对于老年人主要器官功能不良, 患有基础肝病如病毒性肝炎、糖尿病非酒精性脂肪肝, 酒精性肝病者, 选用药物需更加小心谨慎, 以免发生严重不良后果.

## 4 参考文献


1 MARIA VA, VITORINO RM. Development and Validation of a Clinical Scale for the Diagnosis of Drug-Induced Hepatitis. *Hepatology* 1997; 26: 664
2 江绍基, 姚光弼, 巫协宁. 临床肝胆系病学. 上海: 上海科学技术出版社 1992: 475
3 Bénichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol* 1990; 11: 272-276
4 厉有名. 药物性肝损伤的临床类型及诊断策略. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 445-446
5 陈成伟, 马洪年, 傅青春. 药物与中毒性肝病. 上海: 上海科学技术出版社 2002: 528-533
6 乌羽研二, 秋下雅弘, 北野有三. 药剂起因性疾患. 日本医志 1999; 36: 181-185
7 谬莉琴. 试析中药致药物性肝损害. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 60-62
8 周世明, 贾杰. 中草药致药物性肝病96例临床分析. 中国热带医学 2004; 4: 765-766
9 姚光弼. 重视中药和草药引起的肝损害. 肝脏 2005; 10: 1


电编 何基才 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 消化内镜诊疗技术研讨班通知(第一轮)

**本刊讯** 2007年国家级继续医学教育项目“消化内镜诊疗技术研讨班”(项目编号2007-03-03-046)将于2007-11在青岛市举办, 由青岛大学医学院附属医院主办、世界华人消化杂志协办, 特邀国内外著名专家进行专题讲座和现场演示, 欢迎消化内镜工作者投稿参会, 优秀稿件可优先发表. 回执或投稿请于2007-09底前寄青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心, 刘希双收, 邮编: 266003, E-mail: liuxishuang1@sina.com, 电话: 0532-82911525, 13864215672.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2063-2066
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

# 心理状态变化与自主神经功能改变及胃电节律紊乱在功能性消化不良中的相互关系

李迎春, 赵宝龙, 周 红, 王 军, 王 萍, 王井红

李迎春, 周红, 上海市宝山中心医院消化内科 上海市宝山区 201900
赵宝龙, 王井红, 上海市宝山中心医院精神心理科 上海市宝山区 201900
王军, 王萍, 上海市宝山中心医院物理诊断科 上海市宝山区 201900
**通讯作者**: 李迎春, 201900, 上海市友谊路181号, 上海市宝山中心医院消化内科. alanycLi@yahoo.com.cn
电话: 021 – 56601100 – 353
收稿日期: 2007-04-25 接受日期: 2007-05-16

■背景资料
功能性消化不良是临床常见病, 病因及发病机制未明确, 现有研究多从各个侧面对FD进行研究, 割裂了疾病之间的联系, 故临床治疗局限于某个方面入手, 效果并不理想.

## Correlations of psychological and autonomic nerve changes and gastric electrical activity in functional dyspepsia

Ying-Chun Li, Bao-Long Zhao, Hong Zhou, Jun Wang, Ping Wang, Jing-Hong Wang

Ying-Chun Li, Hong Zhou, Department of Gastroenterology, Baoshan Hospital, Shanghai 201900, China
Bao-Long Zhao, Jing-Hong Wang, Department of Spirit and Psychology, Baoshan Hospital, Shanghai 201900, China
Jun Wang, Ping Wang, Department of Physics Diagnosis, Baoshan Hospital, Shanghai 201900, China
Correspondence to: Ying-Chun Li, Department of Gastroenterology, Baoshan Hospital, Shanghai 201900, China. alanycLi@yahoo.com.cn
Received: 2007-04-25 Accepted: 2007-05-16

## Abstract

**AIM:** To study correlations of psychological and autonomic nerve changes and gastric electrical activity in functional dyspepsia (FD).

**METHODS:** Eighty FD patients and 30 healthy normal individuals were tested using the Hamilton Depression (HAMD), Hamilton Anxiety (HAMA) and SCL-90 scales and heart rate variability and electrogastrography.

**RESULTS:** The FD patients showed some abnormalities in psychology, autonomic nerve and gastric electrical activity, demonstrating more obvious changes than normal people ($P < 0.01$). The influence of psychological change on the autonomic nerve was greater and had more oscillation ($P < 0.01$, C = 0.4908) than that of the autonomic nerve on psychological state ($P < 0.05$, C = 0.2519). The influences of autonomic nerves and gastric electric activity were equal ($P < 0.01$, C = 0.4279). There was no relationship between psychological change and gastric electric activity ($P > 0.05$, C = 0.1866).

**CONCLUSION:** FD patients were more influenced by psychological changes affecting the autonomic nerve than were healthy normal individuals. Changes of the autonomic nerve and gastric electric activity were related, whereas psychological changes and gastric electric activity were not directly related.

Key Words: Psychology; Autonomic nerve; Gastric electric activity; Functional dyspepsia

Li YC, Zhao BL, Zhou H, Wang J, Wang P, Wang JH. Correlations of psychological and autonomic nerve changes and gastric electrical activity in functional dyspepsia. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2063-2066

## 摘要

**目的**: 探探讨在功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)患者中心理状态变化, 自主神经功能改变和胃电节律紊乱之间的相互关系.

**方法**: 按罗马Ⅲ标准前瞻性分析FD患者85例和正常人30例的HAMD他评抑郁量表, HAMA他评焦虑量表及SCL-90项症状自评量表, 同步检测自主神经功能变化及胃电节律紊乱情况.

**结果**: FD患者普遍存在心理状态异常及自主神经功能损害和胃电节律紊乱, 与正常人相比均有显著性差异($P<0.01$); 心理状态变化对自主神经功能改变有关且影响很大($P<0.01$, C = 0.4908), 后者对前者的改变及影响程度较低($P<0.05$, C = 0.2519); 自主神经功能改变与胃电节律紊乱有关且相关性相同(P<0.01, C = 0.4279); 心理状态异常与胃电节律紊乱相关性无统计学意义($P>0.05$, C = 0.1866).

**结论**: FD患者心理状态异常与自主神经功能改变的关系最密切, 自主神经功能变化与胃电节律紊乱之间有一定关系, 心理状态异常与胃电节律紊乱之间无直接关系.

**关键词: 心理状态; 自主神经; 胃电节律; 功能性消化不良**

李迎春, 赵宝龙, 周红, 王军, 王萍, 王井红. 心理状态变化与自主神经功能改变及胃电节律紊乱在功能性消化不良中的相互关系. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2063-2066
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2063.asp

**■创新盘点**
1 方法上采用切实可行的、依从性好的、客观的检测手段.
2 时间上采用实时、同步检测, 排除干扰因素, 较真实地反映FD的病理生理变化.
3 选题的角度从临床出发, 以系统论做指导, 用联系的方法分析了FD患者的心理状态、自主神经功能及胃电节律紊乱之间的相互影响关系和密切程度, 对认识FD产生的原因及指导临床治疗有一定意义.

## 0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是临床常见的胃肠功能性疾病之一, 病因及发病机制尚未明确. 对FD患者的心理状态, 自主神经功能及胃电节律进行同步系统的研究较少报道, 本研究通过前瞻性和同步系统的检测FD患者85例和正常人30例, 从临床角度探讨心理状态异常, 自主神经功能变化及胃电节律紊乱之间的关系和影响程度, 为探讨病因和提高临床治疗效果提供依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2003-06/2005-12在我院消化内科就诊, 符合罗马Ⅱ诊断标准并纳入研究对象的患者的临床检测资料, 重新按照罗马Ⅲ标准[1]进行判断, 分析符合FD新标准的85例临床资料(FD组), 其中男31例, 女54例, 年龄19-70(平均38.4)岁, 病程为3-49 mo. 正常对照组: 随机抽取同期来我院体检的健康成年人30例, 男12例, 女18例, 年龄20-59(平均36.8)岁. 两组在性别, 年龄, 职业, 文化程度等方面无统计学差异.

1.2 方法

1.2.1 心理状态测评 对入选者进行汉密尔顿抑郁他评量表(HAMD), 汉密尔顿焦虑他评量表(HAMA), 90项症状自评量表(SCL-90)评定. 各量表均有2名专业医务人员联合检查评定并独立评分, 一致性>90%.

1.2.2 自主神经功能测定 采用较为客观的心率变异性(heart rate variability, HRV)分析法[2]间接定量地评价自主神经功能, 分析交感和副交感神经的张力及平衡状态. 专人操作Cardiosee 99型心电工作站对入选人员进行心率变异性的检测, 由计算机自动进行HRV短时程频域分析. 记录低频功率(LF, 主要反映交感及副交感神经的双重活性)、高频功率(HF, 只反映副交感神经活性)、低频功率与高频功率的比值(LF/HF, 反映自主神经系统的平衡状态)、总功率(TP, 反映HRV大小)参数.

1.2.3 胃电节律检查 专人操作WDL-2000型胃电图诊断治疗仪(江西维格科技有限公司), 按胃电图检查及其评判标准[3-4]对入选人员进行检查. 检测胃电正常慢波节律百分比(N%)及胃电节律紊乱的百分比(胃动过缓B%和胃动过速T%).

**统计学处理** 计量资料以mean±SD表示, 两大样本(组间)均数采用$u$检验. 计数资料采用$\chi^2$检验, 相互关系的密切程度计算Pearson关联系数C. $P$<0.05为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 FD组与正常对照组的心理状态变化、自主神经功能改变和胃电节律紊乱的比较 FD组85例中, 心理状态异常83例, 其中单纯抑郁32例(37.6%), 单纯焦虑30例(35.3%), 抑郁焦虑均有21例(24.7%). 无抑郁无焦虑2例(2.4%). 对照组无抑郁或焦虑. FD组HAMA抑郁量表和HAMD焦虑量表的各项指标参数与正常对照组比较均有显著差异($P$<0.01), 具体$u$值为HAMA的躯体和精神分别为13.80和13.12. HAMD的焦虑9.81, 体质量4.00, 认知障碍9.38, 日夜变化8.79, 迟缓8.36, 睡眠障碍6.84和绝望感9.92. SCL-90症状评分: 躯体化9.67, 强迫8.47, 人际关系5.43, 抑郁9.71, 焦虑13.15, 敌对3.69, 惊恐3.83, 偏执2.14, 精神病理3.69和其他7.90. FD组85例患者中, 副交感神经张力降低85例, 其中79例交感神经张力降低或增高致自主神经平衡状态发生变化失平衡, 占92.9%; 6例交感副交感神经张力保持平衡状态, 占7.1%. 正常对照组30例只有2例(6.7%)失平衡, 28例(93.3%)平衡, 两者之间有显著差异($\chi^2$ = 79.26, $P$<0.01). FD组HRV各项参数与正常对照组比较均有显著差异($P$<0.01), 具体$u$值: LF8.84, HF8.38, LF/HF7.96和TP12.42. FD组85例中胃电正常慢波节律N%10例; 胃电节律紊乱75例, 其中胃动过缓B%57例, 胃动过速T%18例; FD组餐前和餐后的N%, B%和T%与正常对照组比较均有显著差异($P$<0.01), 具体$\chi^2$值N%(餐前66.68和餐后71.32), B%(32.37和31.1), T%(6.01和8.54).

2.2 FD组心理状态变化与自主神经功能改变及胃电节律紊乱之间关系及密切程度 研究结果显示: (1)临床上FD患者普遍存在心理状态变化(抑郁、焦虑情绪, 表现为精神和躯体两方面的症

表 1 FD组的心理状态变化与胃电节律紊乱、自主神经功能改变三者间的关系 *n*(%)

| 心理状态 | *n* | 胃电节律 | | | 自主神经张力 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 过缓 | 正常 | 过速 | 失平衡 | 平衡 |
| | | *n* = 57 | *n* = 10 | *n* = 18 | *n* = 79 | *n* = 6 |
| 抑郁和焦虑 | 83 | 56(67.5) | 9(10.8) | 18(21.7) | 79(95.2) | 4(4.8) |
| 非抑郁和焦虑 | 2 | 1(50.0) | 1(50.0) | 0 | 0 | 2(100.0) |
| $\chi^2$ | 3.07 | | | | 26.97 | |
| *P* | >0.05 | | | | <0.01 | |
| C | 0.19 | | | | 0.49 | |

表 2 FD组的自主神经功能改变与胃电节律紊乱、心理状态变化三者间的关系 *n*(%)

| 自主神经张力 | *n* | 胃电节律 | | | 心理状态 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 过缓 | 正常 | 过速 | 抑郁和焦虑 | 非抑郁焦虑 |
| | | *n* = 57 | *n* = 10 | *n* = 18 | *n* = 83 | *n* = 2 |
| 失平衡 | 79 | 56(70.9) | 6(7.6) | 17(21.5) | 78(98.7) | 1(1.3) |
| 平衡 | 6 | 1(16.7) | 4(66.7) | 1(16.7) | 5(83.3) | 1(16.7) |
| $\chi^2$ | 19.05 | | | | 5.76 | |
| *P* | <0.01 | | | | <0.05 | |
| C | 0.43 | | | | 0.25 | |

表 3 FD组的胃电节律紊乱与自主神经功能改变、心理状态异常三者间的关系 *n*(%)

| 胃电节律 | *n* | 自主神经张力 | | 心理状态 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 失平衡 | 平衡 | 抑郁和焦虑 | 非抑郁焦虑 |
| | | *n* = 79 | *n* = 6 | *n* = 83 | *n* = 2 |
| 过缓 | 57 | 56(98.2) | 1(1.7) | 56(98.2) | 1(1.8) |
| 正常 | 10 | 6(60.0) | 4(40.0) | 9(90.0) | 1(10.0) |
| 过速 | 18 | 17(94.4) | 1(5.6) | 18(100) | 0 |
| $\chi^2$ | | 19.05 | | 3.07 | |
| *P* | | <0.01 | | >0.05 | |
| C | | 0.43 | | 0.19 | |

状), 自主神经功能改变(副交感神经功能障碍及交感副交感神经张力失平衡)和胃电节律紊乱. (2)其中心理状态变化和自主神经功能改变有关且对后者影响最大, 后者对前者的影响程度较低; 自主神经功能改变与胃电节律紊乱有关且相互影响的程度相同; 心理状态变化与胃电节律紊乱关系不密切. 总之三者间相互作用并相互影响(表1-3).

## 3 讨论

本研究采用HAMD和HAMA他评量表方法并结合SCL-90症状自评量表, 排除文化差异等干扰因素, 能较客观的反映患者心理状态. 心率变异性检测自主神经功能已得到公认[2], 能准确的反映受检测者的自主神经功能状态. 胃电图检测与胃浆膜下胃电活动有较好的相关性, 能反应胃电节律和胃的收缩活动[3-4]. 我们对FD患者采用上述客观、依从性好的检测方法, 同步系统地检测自主神经功能、胃电节律及心理状态, 排除了既往研究中由于功能性疾病临床表现缺少稳定性而带来的干扰, 可实时并真实的反映其病理生理变化情况.

FD的发病机制虽尚未阐明, 现有从不同侧面的研究分别提示FD可出现多方面的异常, 如胃肠动力障碍[5-6], 胃肠激素的变化[7], 内脏感知过敏, 胃肠内病原菌(如幽门螺杆菌)感染及心理障碍[8-10], 自主神经功能异常[11-12]等, 罗马Ⅲ标准认为功能性胃肠疾病(FGID)是一类独立的临床

**■应用要点**

此文的方法简便、易行, 所用设备基层医院均有, 便于在临床推广应用, 对提高综合性医院对功能性胃肠病的诊断和治疗水平, 有实际的意义.

**■同行评价**
本文分析和探讨了在功能性消化不良中心理, 自主神经, 胃电节律三者之间的关系, 为该病的临床治疗提供了理论基础和指导作用.

疾病, 在发病机制上强调了胃肠功能和动力、感知, 中枢神经系统(CNS)、脑肠轴及肠神经系统(ENS)网络的关系. 现代神经胃肠病学认为, 胃肠运动是在CNS, 自主神经系统和ENS的共同参与下进行的. 中枢神经活动与胃肠道运动与感知之间的相互联系构成脑肠轴. 外界的刺激或内部的信息等通过脑肠轴影响到胃肠道的感知、运动和分泌; 同样自主神经本身的损害或张力的变化也会对胃肠的运动产生影响. 心理状态异常加上各种因素对中枢神经系统的不断刺激, 可能通过降低迷走神经张力为中间机制影响胃肠动力, 并可导致机体各器官功能改变[13-14]. 本文研究的结果与上述报道相一致, 并进一步系统地明确了FD患者心理状态变化与自主神经功能改变及胃电节律紊乱之间的相互影响关系及密切程度.

我们认为: (1)FD的发病与多因素及多方面的病理生理变化有关; (2)在FD的病因和发病机制中, 自主神经功能状态为较重要的中间环节, 自主神经功能损害与心理状态异常及胃电节律紊乱之间相互影响; 心理状态异常为较重要的因素之一, 心理状态异常影响自主神经功能的密切程度最高, 也可通过自主神经功能的变化进而影响胃电节律; (3)临床治疗方面, 在针对不同的病理生理变化进行个体化治疗的同时, 要提高对患者心理状态变化的认识和识别, 考虑到心理及自主神经功能等多方面因素的影响, 进行综合性治疗, 以提高疗效.

## 4 参考文献


1 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. Gastroenterology 2006; 130: 1377-1390
2 中华心血管病杂志编委会心率变异性对策组. 心率变异性检测临床应用的建议. 中华心血管病杂志 1998; 4: 252-254
3 孙晓红, 方秀才, 周吕. 中华医学会全国胃电图和胃肠动力研讨会纪要. 中华内科杂志 2002; 9: 633-634
4 柯美云, 周吕. 胃电图检查及其评判标准(草案), 中华消化杂志 2000; 6: 402-404
5 刘新光. 功能性消化不良与胃肠动力异常. 中华消化杂志 2002; 22: 147-150
6 张晚光, 胡品津, 林金坤, 陈为. 功能性消化不良患者近端胃容受性的研究. 胃肠病学 2003; 3: 151-153
7 瞿宏丽. 功能性消化不良胃肠动力障碍与胃肠激素的关系. 胃肠病学和肝病学杂志 2003; 12: 318-321
8 陈小良, 戈兰, 周汉建, 田虹. 功能性消化不良患者焦虑和抑郁调查分析. 广东医学 1999; 20: 858-859
9 李长城, 石丽楠. 功能性消化不良与心理障碍. 中原医刊 2002; 3: 41
10 陈燕敏, 华敦维, 任森洋, 李建阳. 功能性消化不良患者中抑郁障碍的诊断和治疗. 浙江临床医学 2004; 4: 307-308
11 周成元, 胡飞鹏, 贺卫权. 功能性消化不良患者植物神经功能状态的检测. 临床荟萃 2000; 3: 412
12 苗其云, 田长承, 唐丕斌, 王长春, 刘海红. 非溃疡性消化不良与自主神经功能的关系. 临床荟萃 2001; 16: 104-105
13 Mine K, Kanazawa F, Matsumoto K, Tsuchida O, Hosoi M, Kubo C. A depressive disorder in patients with irritable bowel syndrome and non-ulcer dyspepsia. *Nippon Rinsho* 1994; 52: 1329-1333
14 Haug TT, Svebak S, Hausken T, Wilhelmsen I, Berstad A, Ursin H. Low vagal activity as mediating mechanism for the relationship between personality factors and gastric symptoms in functional dyspepsia. *Psychosom Med* 1994; 56: 181-186


电编 何基才 编辑 何燕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 世界华人消化杂志在线办公系统

**本刊讯** 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.wjgnet.com/wcjd/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. 凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2067-2070
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

# 老年消化道癌症患者抑郁与免疫抑制酸性蛋白的关系

李 荣, 许 青, 郭 静, 钱建新, 顾小强, 武 清, 原凌燕, 王杰军

李荣, 许青, 郭静, 钱建新, 顾小强, 武清, 原凌燕, 王杰军, 中国人民解放军第二军医大学长征医院肿瘤科 上海市 200070
**通讯作者**: 王杰军, 200070, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长征医院肿瘤科. jiejunw@csco.org.cn
电话: 021-66540109-7045
收稿日期: 2007-03-01 接受日期: 2007-03-31

## Relationship between depression and serum immunosuppressive acid protein in patients with advanced digestive tract cancers

Rong Li, Qing Xu, Jing Guo, Jian-Xin Qian, Xiao-Qiang Gu, Qing Wu, Ling-Yan Yuan, Jie-Jun Wang

Rong Li, Qing Xu, Jing Guo, Jian-Xin Qian, Xiao-Qiang Gu, Qing Wu, Ling-Yan Yuan, Jie-Jun Wang, Department of Medical Oncology, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai, 200070, China
Correspondence to: Jie-Jun Wang, Department of Medical Oncology, Changzheng Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai, 200070, China. jiejunw@csco.org.cn
Received: 2007-03-01 Accepted: 2007-03-31

## Abstract

**AIM:** To explore the relationships among depression, the degree of immunosupressive acidic protein (IAP), and the percentage of CD3, CD4, CD8, and NK in elderly patients with advanced digestive tract cancers; and to determine the effects of antidepressant therapy.

**METHODS:** Forty-three elderly patients with advanced digestive tract cancers were randomly enrolled in the study and divided into two groups. The degree of depression was evaluated by the Zung self-rating depression scale (SDS). IAP was examined by simple agar diffusion. Immunological parameters such as the percentage of T-lymphocyte subsets and natural killer (NK) cells in peripheral blood were determined and compared between the two groups of patients by flow cytometry. Patients who were depressed according to the scores of the SDS took antidepressant therapy. After patients were assessed as normal, the immunological parameters were again determined.

**RESULTS:** The depression rate was 44%. SDS was positively correlated with the level of IAP ($r$ = 0.549, $P$ < 0.01), negatively correlated with the percentages of CD3 and CD4 ($r$ = -0.163, $P$ < 0.001 and $r$ = -0.163, $P$ < 0.001), and had no relationship with the percentages of NK or CD8 ($r$ = 0.262, $P$ > 0.05 and $r$ = 0.611, $P$ > 0.05). The two groups showed significant differences of IAP, CD3 and CD4 (IAP: 908.33 ± 275.75 mg/L *vs* 537.60 ± 282.64 mg/L, $P$ < 0.01; CD3: 67.05 ± 13.12 *vs* 73.27 ± 8.03, $P$ < 0.05; and CD4: 36.68 ± 11.29 *vs* 43.72 ± 9.16, $P$ < 0.05) between the depressed and non-depressed groups. The change of IAP before and after antidepressant therapy was statistically significant ($P$ < 0.01). The levels of CD3, CD4, CD8, and NK between the two groups showed no obvious changes ($P$ > 0.05).

**CONCLUSION:** There is a high rate of depression in elderly patients with cancers of the digestive tract. Antidepressant treatment was found to improve immune function.

Key Words: Depression; Immunosupressive acidic protein; Simple agar diffusion; Flow cytometry; Immunity; Neoplasm; Elderly

Li R, Xu Q, Guo J, Qian JX, Gu XQ, Wu Q, Yuan LY, Wang JJ. Relationship between depression and serum immunosuppressive acid protein in patients with advanced digestive tract cancers. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2067-2070

## 摘要

**目的**: 研究晚期消化道癌症患者抑郁与免疫抑制酸性蛋白(immunosupressive acidic protein, IAP)等之间关系, 并观察抗抑郁治疗后上述指标的变化, 探讨抑郁与免疫功能之间关系.

**方法**: 采用Zung量表对晚期消化道癌症患者43例行抑郁测评的同时采用单向免疫琼脂扩散法检测外周血IAP含量, 采用流式细胞仪检测外周血CD3, CD4, CD8和NK细胞百分比, 根据Zung测评结果, 以百忧解对抑郁患者进

**■背景资料**
免疫抑制酸性蛋白(IAP)是首先由Tamura *et al* 1981年于晚期胃癌患者腹水中分离出的一种与正常血清成份α1酸性糖蛋白的糖链结构不同的糖蛋白, 在肿瘤性疾病和非肿瘤性疾病患者血清内都会有所升高.

■研发前沿
本研究以IAP与肿瘤合并抑郁之间的关系为锲入点, 以老年消化道癌症患者为研究对象, 通过分析认为二者之间存在密切联系, 但仍待大样本量研究的进一步验证.

行干预, 抑郁纠正的同时再次检测上述指标.

**结果**: 本组患者抑郁的发生率为44%; 抑郁评分与IAP呈正相关($r$ = 0.549, $P$<0.01), 与CD3, CD4呈负相关($r$ = -0.163, $P$<0.001; $r$ = -0.163, $P$<0.001), 与NK, CD8无相关($r$ = 0.262, $P$>0.05; $r$ = 0.611, $P$>0.05); 抑郁组与非抑郁组数据分析表明IAP, CD3和CD4有显著差异(IAP: 908.33±275.75 mg/L *vs* 537.60±282.64 mg/L, $P$<0.01; CD3: 67.05±13.12 *vs* 73.27±8.03, $P$<0.05; CD4: 36.68±11.29 *vs* 43.72±9.16, $P$<0.05); 抗抑郁治疗后IAP变化明显($P$<0.05), CD3, CD4, CD8, NK无明显变化(均$P$>0.05).

**结论**: 老年晚期消化道癌症患者抑郁与免疫功能相关, 伴发抑郁的患者免疫功能低下, 抗抑郁治疗后免疫功能改善.

**关键词: 抑郁; 免疫抑制酸性蛋白; 免疫; 单向免疫琼脂扩散法; 流式细胞仪; 癌症; 老年人**

李荣, 许青, 郭静, 钱建新, 顾小强, 武清, 原凌燕, 王杰军. 老年消化道癌症患者抑郁与免疫抑制酸性蛋白的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2067-2070
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2067.asp

## 0 引言

随着中国步入老龄化社会, 老年人的身心健康倍受关注. 而在老龄化社会进程中, 消化道肿瘤发病率逐年增高, 抑郁的发生率也呈现攀升趋势. 研究老年晚期癌症患者抑郁与免疫功能的关系对提高患者生活质量进而改善肿瘤患者的预后具有深远意义.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2003-08/2005-04第二军医大学附属长征医院肿瘤科收治的癌症患者. 入组标准: (1)病理确诊的Ⅳ期消化道癌症患者; (2)年龄≥60岁; (3)入组前半个月未接受化疗、放疗和手术治疗; (4)既往无精神病史、家族中无抑郁症病史, 无严重认知障碍, 自愿合作, 共入组43例, 胃癌16例, 大肠癌24例, 食管癌3例, 其中男27例, 女16例. 年龄60-85(平均67±6.5)岁; IAP试剂盒购自中科院上海细胞生物研究所, T细胞亚群及NK细胞检测试剂购自晶美生物工程有限公司, 流式细胞仪为Cytomics™ FC500系列, 美国Beckman Coulter公司.

1.2 方法

1.2.1 抑郁自评量表的填写 由入组患者在完全安静状态下填写Zung氏抑郁自评量表(Zung's self-rating depression scale, SDS). 按照国内常规结果, SDS评分大于或等于42分者为抑郁组. SDS评分小于42分者为非抑郁组. 抑郁组和非抑郁组的患者在第2天晨起抽取静脉血进行检测.

1.2.2 抑郁组 在患者知情同意的情况下从第2天早晨开始给予百忧解(20 mg)进行干预, 2 wk后, 再次填写Zung氏抑郁自评量表, 对于SDS评分变为小于42分者为抑郁情绪纠正, 停止干预, 抽血检测. SDS评分依然大于42分者, 为抑郁情绪未纠正, 继续干预. 在第4周再次填写量表, 如果SDS评分小于42分, 则停止干预的同时采血检测. 在干预4 wk后仍未纠正者出组.

1.2.3 外周血液中IAP, NK, CD3, CD4, CD8的检测 采取患者空腹静脉血, 严格按照试剂盒说明书, 采用单向免疫琼脂扩散法检测IAP; 采用免疫荧光法, 在上海市长征医院基因治疗中心实验室应用流式细胞仪检测NK细胞, T淋巴细胞亚群.

**统计学处理** 所有结果均输入计算机来用SPSS 11.5统计软件处理.

表 1 SDS评分与免疫检测指标之间相关性分析

| | CD3 | CD4 | NK | CD8 | IAP |
|---|---|---|---|---|---|
| 抑郁评分 | | | | | |
| Pearson Correlation | −0.449[b] | −0.481[b] | 0.170 | 0.221 | 0.572[b] |
| Sig.(2−tailed) | 0.002 | 0.001 | 0.274 | 0.153 | 0.000 |

[b]$P$<0.01.

## 2 结果

2.1 抑郁测评结果 非抑郁组(SDS评分<42分), 共24例, 占56%. 抑郁组(SDS评分≥42分)19例, 占总数的44%, 共有18例患者接受了干预治疗, 抑郁纠正的共11例.

2.2 SDS评分与免疫检测指标之间的相关性 SDS评分与IAP呈正相关($r$ = 0.549, $P$<0.000), 与CD3($r$ = -0.163, $P$<0.001), CD4($r$ = -0.163, $P$<0.001)呈负相关, 与NK($r$ = 0.262, $P$>0.05), CD8($r$ = 0.611, $P$>0.05)无相关(表1).

2.3 免疫检测指标 抑郁组IAP高于非抑郁组, CD3, CD4低于非抑郁组, 差别有显著统计学意义, 而NK, CD8之间差别无显著统计学意义(表2).

2.4 抑郁患者干预前后免疫功能变化 肿瘤患者抑郁情绪纠正后IAP的变化有显著统计学差异($P$<0.05), 而CD3, CD4, CD8, NK的变化无显著

表 2 2组患者IAP, CD3, CD4, CD8, NK的比较(mean ± SD)

| 抑郁与否 | CD3(%) | CD4(%) | NK(%) | CD8(%) | IAP(mg/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| 抑郁 | 67.05 ± 13.12[a] | 36.68 ± 11.29[a] | 16.99 ± 13.11 | 31.69 ± 6.49 | 908.33 ± 275.75[b] |
| 非抑郁 | 73.27 ± 8.03 | 43.72 ± 9.16 | 13.81 ± 7.34 | 29.85 ± 5.96 | 537.60 ± 282.64 |

[a]$P$<0.05, [b]$P$<0.01.

统计学意义($P$>0.05)(表3).

表 3 抑郁患者干预前后自身对照

| | $t$ | df | Sig. (2-tailed) |
|---|---|---|---|
| IAP-干预后IAP | 2.583 | 10 | 0.027 |
| NK-干预后NK | 0.499 | 10 | 0.629 |
| CD3-干预后CD3 | 0.544 | 10 | 0.598 |
| CD4-干预后CD4 | -0.590 | 10 | 0.568 |
| CD8-干预后CD8 | 1.022 | 10 | 0.331 |

## 3 讨论

年龄是影响抑郁发病率的重要因素之一, 抑郁的发病率随年龄的不同而变化, 30岁左右的患者抑郁发病率开始增高, 中年发病率下降, 60岁后又逐渐升高, 80岁后老年人的发病率直线上升[1]. 肿瘤患者更容易罹患抑郁, 合并抑郁的肿瘤患者预后差[2], 对这种现象的解释是抑郁情绪通过下丘脑-垂体-肾上腺素轴影响免疫功能. 但是关于抑郁与免疫功能之间关系研究的结果不一, 有报道认为合并抑郁者的免疫功能低下, 主要表现为细胞免疫功能的下降, 相反, 有些研究发现合并抑郁者的免疫功能激活, 主要表现为细胞因子的分泌及急性期蛋白的增多[3]. 考虑这种研究结果的不一致性除了与研究方法不同有关外, 也与纳入研究对象的标准不同有关. 根据Walford的衰老自身免疫学说, 随着人体的衰老, T细胞的免疫功能明显下降. 而且, 不同部位、不同分期的肿瘤患者免疫功能的差异显著[4]. 因此在研究抑郁与免疫功能之间关系时, 应该排除年龄、不同部位肿瘤、肿瘤的不同分期等混杂因素的影响. 但是, 至今未见以晚期老年消化系统肿瘤为研究对象的报道.

在既往研究抑郁与免疫功能之间关系时, 最常采用的免疫检测指标是体现细胞免疫的T淋巴细胞亚群. 在本实验中, 除采用了常用的T淋巴细胞亚群外, 还采用了在研究肿瘤预后方面常用的监测指标-IAP. IAP是首先由Tamura *et al*[5]于1981年从晚期胃癌患者的腹水中分离出的一种糖蛋白, 是由肝细胞、巨噬细胞、粒细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞及肿瘤细胞合成和分泌的. Nakashima *et al*[6]通过体外实验证实IAP可抑制植物血凝素诱导的淋巴细胞的增殖, 并对NK细胞活性有抑制作用. Shibata *et al*[7]通过动物实验证实IAP可延缓变态反应的发生, 还可以抑制抗体产生. 大量文献报道肿瘤患者体内IAP呈不同程度增高, 并与肿瘤的进展呈负相关, 不同研究通过对食管癌[8]肾癌[9]的分析表明IAP可在一定程度上提示患者的预后, IAP高的往往预后差. 但是, 未见关于IAP与抑郁之间关系的报道. 通过采用双变量相关分析癌症患者抑郁评分与IAP、T细胞亚群、NK细胞之间的关系, 发现本组癌症患者抑郁发生率为44%, 国内马博 *et al*[10]对消化系统癌症患者抑郁情绪进行调查的研究结果与此相似.

我们还发现伴随抑郁评分的增高, IAP升高, CD3, CD4降低, 进一步分析表明抑郁组和非抑郁组IAP, CD3, CD4的差别有显著统计学差异, 经抗抑郁治疗后IAP变化显著($P$<0.01), 提示老年肿瘤患者抑郁与免疫功能密切相关, 合并抑郁的患者免疫功能低下, 抗抑郁治疗后免疫功能改善. 研究中发现抑郁组与非抑郁组CD3, CD4阳性前T细胞亚群差别有意义, CD8, NK并没有差别, Zhou *et al*[11]的研究结果与此不一致. 在国内外采用T细胞亚群作为免疫检测指标研究肿瘤患者抑郁与免疫功能之间关系的研究结果并不完全一致, 除了与不同实验方法有关外, 也与T细胞亚群的不同功能有关. 同样表达CD3表面抗原的T细胞亚群的免疫细胞既可以发挥免疫辅助作用(CD3CD4), 也可以发挥免疫抑制作用(CD3CD32), 由此导致检测T细胞亚群的结果并不完全一致.

目前抑郁的诊断主要依靠主观判断, 没有客观的实验室指标, 给抑郁的诊断和治疗带来不便, 可能也是目前抑郁识别率低的原因之一[12]. 本研究发现IAP不仅与抑郁评分密切相关, 而且

**■相关报道**

大量研究发现, IAP既可以抑制细胞免疫, 也可以抑制体液免疫, 并在肿瘤的筛查、诊断、分期、评定肿瘤治疗效果以及协助选择治疗方法等方面具有重要的价值. 但是关于IAP与抑郁之间关系的报道, 至今未见.

**■同行评价**
本文分析了老年人消化道肿瘤与IAP之间的关系, 提示老年肿瘤患者在治疗的同时应注意情绪的变化, 文章层次清楚, 结构合理, 文笔流畅, 有一定的科学性.

抑郁组与非抑郁组IAP水平有明显差别, 抗抑郁治疗后IAP的变化有显著意义, 提示在晚期老年消化系统癌症患者中IAP与抑郁密切相关. 由此, 作者推测, 在晚期老年消化系统肿瘤患者中, IAP可以作为作为评价抑郁的客观指标, 但有待大样本量的临床试验的验证.

## 4 参考文献


1 Lavretsky H, Kumar A. Practical geriatrics: clinically significant nonmajor geriatric depression. *Psychiatr Serv* 2003; 54: 297-299
2 Mitchell AJ, Subramaniam H. Prognosis of depression in old age compared to middle age: a systematic review of comparative studies. *Am J Psychiatry* 2005; 162: 1588-1601
3 Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 201-217
4 Lutgendorf SK, Sood AK, Anderson B, McGinn S, Maiseri H, Dao M, Sorosky JI, De Geest K, Ritchie J, Lubaroff DM. Social support, psychological distress, and natural killer cell activity in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7105-7113
5 Tamura K, Shibata Y, Matsuda Y, Ishida N. Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascitic fluids of cancer patients. *Cancer Res* 1981; 41: 3244-3252
6 Nakashima T, Tanaka M, Okamura S. Survey of immunosuppressive acidic protein and other immunological parameters in head and neck cancer patients. *J Laryngol Otol* 1991; 105: 939-945
7 Shibata Y, Tamura K, Ishida N. In vivo analysis of the suppressive effects of immunosuppressive acidic protein, a type of alpha 1-acid glycoprotein, in connection with its high level in tumor-bearing mice. *Cancer Res* 1983; 43: 2889-2896
8 Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Miyazawa Y, Shihratori T, Hayashi H, Aoki T, Sugaya M, Gunji Y, Kobayashi S, Ochiai T. Prognostic value of preoperative serum immunosuppressive acidic protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2003; 16: 102-106
9 Nakaigawa N, Yao M, Kondo K, Kishida T, Noguchi K, Kubota Y, Nagashima Y, Kawano N, Inayama Y, Nozawa A. Chromophobe renal cell carcinoma: a clinicopathological study of 16 cases. *Hinyokika Kiyo* 2006; 52: 1-6
10 马博, 李中琦, 马志敏. 消化系统癌症病人抑郁情绪和细胞免疫的研究. 中国行为医学科学 2002; 11: 49-50
11 Zhou FL, Zhang WG, Wei YC, Xu KL, Hui LY, Wang XS, Li MZ. Impact of comorbid anxiety and depression on quality of life and cellular immunity changes in patients with digestive tract cancers. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2313-2318
12 Lloyd-Williams M. Difficulties in diagnosing and treating depression in the terminally ill cancer patient. *Postgrad Med J* 2000; 76: 555-558


电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 中国学术期刊综合引证报告(2006)

**本刊讯** 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI “中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心] .

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2071-2073
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

# 原发性腹茧症合并隐睾术前误诊4例

秦春和, 张宗明, 陈以安, 陈 军, 罗 宁, 许建林

秦春和, 张宗明, 陈以安, 陈军, 罗宁, 许建林, 清华大学第一附属医院消化医学中心普外科 北京市 100016
**通讯作者**: 秦春和, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院普外科. guzhuxianren@yahoo.com.cn
电话: 010-64372362 传真: 010-64361322
收稿日期: 2007-04-24 接受日期: 2007-05-11

## Diagnosis and treatment of four patients with primary abdominal cocoon accompanied with undescended testicle

Chun-He Qin, Zong-Ming Zhang, Yi-An Chen, Jun Chen, Ning Luo, Jian-Lin Xu

Chun-He Qin, Zong-Ming Zhang, Yi-An Chen, Jun Chen, Ning Luo, Jian-Lin Xu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China
Correspondence to: Chun-He Qin, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China. guzhuxianren@ yahoo.com.cn
Received: 2007-04-24 Accepted: 2007-05-11

## Abstract

**AIM:** To improve diagnosis and treatment of abdominal cocoon.

**METHODS:** Four patients with primary abdominal cocoon who were admitted to our hospital from January to December 2006 were analyzed. All patients were diagnosed with an acute intestinal obstruction. Unilateral undescended testicle was found in all patients during physical examination, and all underwent emergency operation.

**RESULTS:** The diagnosis of abdominal cocoon was confirmed after the operation. Partial or total capsule resection, lysis of any intestinal adhesion, and internal stenting was adopted in all four cases. All recovered uneventfully after surgery.

**CONCLUSION:** As patients with abdominal cocoon present with no specific clinical features, preoperative diagnosis is difficult. The possibility of abdominal cocoon should be considered when a patient with an intestinal obstruction has an undescended testicle. Laparotomy is an effective treatment for abdominal cocoon.

Key Words: Abdominal cocoon; Undescended testicle; Intestinal obstruction; Laparotomy

Qin CH, Zhang ZM, Chen YA, Chen J, Luo N, Xu JL. Diagnosis and treatment of four patients with primary abdominal cocoon accompanied with undescended testicle. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(18):2071-2073

## 摘要

**目的:** 提高腹茧症的诊治水平.

**方法:** 我院2006-01/12收治的原发性腹茧症患者4例临床资料, 以急性肠梗阻入院, 查体发现均合并单侧隐睾, 全部病例行剖腹探查.

**结果:** 术中证实腹茧症诊断, 手术方案采取全部或部分包膜切除、肠黏连松解、肠排列术等, 均痊愈出院.

**结论:** 腹茧症临床表现无特异性, 术前诊断困难, 对合并隐睾的肠梗阻应考虑到腹茧症的可能, 手术治疗是腹茧症有效的治疗方法.

**关键词: 腹茧症; 隐睾; 肠梗阻; 外科手术**

秦春和, 张宗明, 陈以安, 陈军, 罗宁, 许建林. 原发性腹茧症合并隐睾术前误诊4例. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2071-2073
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2071.asp

## 0 引言

原发性腹茧症是一种少见的腹部疾病, 由Foo *et al*[1]于1978年首先报道并命名, 其特点是全部或部分腹腔脏器被一层致密、灰白色的纤维膜所包裹. 由于腹茧症少见、且缺乏特异性临床表现, 因此术前确诊困难. 我院2006-01/12收治伴有单侧隐睾的原发性腹茧症患者4例. 现结合文献资料分析如下.

**■背景资料**
原发性腹茧症是一种少见的腹部疾病, 缺乏特异性临床表现, 多以急慢性肠梗阻就诊, 术前确诊困难. 并且病因不明, 可能与大网膜发育不良有关, 可与其他发育异常并存, 如大网膜缺如、左肝缺如、隐睾、小肠或结肠旋转不良等. 手术治疗是腹茧症有效的治疗方法, 术中应尽可能的松解黏连, 不强调同时行阑尾切除. 是否行肠排列术还有争议.

**■创新盘点**
腹茧症术后恢复缓慢, 不同于一般肠梗阻患者. 本组患者均有短期内胃肠功能恢复后又出现肠梗阻症状, 表现腹痛, 大量呕吐, 行泛影葡胺口服造影表现为胃蠕动减慢, 排空障碍. 治疗上采用静脉滴注红霉素、胃复安封闭足三里及中成药补益通理合剂灌肠治疗对胃肠功能恢复有一定的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 原发性腹茧症4例, 均男性, 年龄37-55(平均45)岁. 因阵发性腹痛伴有恶心、呕吐及停止排气排便1-3 d入院. 无腹部外伤、手术史, 无长期服药史, 无其他慢性病史. 其中2例既往有慢性腹痛史多年. 查体: 腹略膨隆, 全腹压痛, 以脐周明显, 触之饱满, 但无明显包块, 无腹肌紧张及反跳痛, 肠鸣音活跃, 无高调肠鸣音及气过水声. 其中3例伴有左侧隐睾, 1例右侧隐睾. 立位腹平片可见小肠轻度扩张, 散在气液平, 无明显肠袢. 入院诊断为急性肠梗阻. 给予持续胃肠减压、中成药补益通理合剂灌肠、补液、抗炎等对症治疗, 患者腹痛、腹胀无明显缓解, 遂行手术探查.

1.2 方法 取右侧中上腹旁正中切口, 打开腹膜后见全部小肠黏连包裹成团, 表面由一层乳白色、质韧包膜覆盖, 与腹壁黏连, 进腹困难(图1). 打开包膜, 探查发现均为大网膜缺如, 其中1例部分十二指肠及升结肠、横结肠缺如, 内脏旋转不良, 十二指肠降部直接与空肠相连, 无屈氏韧带, 回肠在左上腹与降结肠相连, 阑尾正常存在. 肝、胆、脾及胃、膀胱等均未被包裹, 1例出现结肠部分包裹. 手术切除包膜, 分离肠间及肠系膜间黏连, 见黏连疏松, 呈透明状, 易于分离, 分离后小肠浆膜完整, 无明显血运障碍, 未见明显折叠成角, 充分游离小肠直至肠系膜根部, 反复冲洗腹腔. 其中3例行肠内排列术, 术后2 wk拔除肠排列管. 4例均经手术证实为腹茧症. 术后予全身营养支持, 持续胃肠减压及抗炎治疗, 患者生命体征平稳.

## 2 结果

3例于术后3-5 d排气排便, 肠功能恢复, 但少量进食后又出现腹痛及剧烈呕吐, 以30%泛影葡胺口服行消化道造影示胃蠕动减弱、排空障碍, 小肠造影剂通过缓慢. 给予行肠外营养支持、继续胃肠减压, 静脉滴注红霉素, 同时用胃复安封闭足三里, 中成药补益通理合剂灌肠等治疗, 术后10-14(平均12.5)d, 胃肠功能恢复. 另1例(部分十二指肠及结肠缺如、术中行肠排列术者)术后一直不排气排便, 胃液每天1500-2000 mL, 持续11 d后胃肠功能恢复正常. 所有病例均治愈出院. 随访3 mo, 未有肠梗阻及腹痛症状发作.

## 3 讨论

腹茧症少见, 其病理解剖特点是部分或全部小肠被一层灰白、致密、坚韧的纤维膜包裹, 形似蚕茧可致小肠梗阻. 腹茧症分为原发性与继发性两种, 后者多有相对清楚的致病原因[2]. 发病原因不明, 无腹部手术外伤史者为原发性腹茧症, 推测在胚胎发育过程中, 由于大网膜发育不良, 膜状的大网膜沿横结肠下行将小肠包裹形成纤维包膜和分隔[3]. 也有人认为纤维包膜由腹膜、小肠系膜或大网膜畸变而成[4]. 腹膜的变异可与其他发育异常并存, 如大网膜缺如、左肝缺如、隐睾、小肠或结肠旋转不良等[2]. 本组4例患者均伴有隐睾及大网膜缺如, 同时1例患者伴有部分十二指肠及结肠缺如, 支持上述观点. 另外病毒感染[5]、性别及地域因素、药物影响、血源性亚临床型腹膜炎(原发性腹膜炎)等[6], 也可能是致病因素.



图 1 全部腹腔脏器被一层致密的纤维膜包裹.

腹茧症术前诊断困难, 本组病例术前皆未获明确诊断. 但有共同特点: (1)中青年男性, 以肠梗阻就诊, 查体全腹压痛, 无肌紧张及反跳痛, 未及明显包块, 肠鸣音活跃. 都有隐睾症存在, 可以提示腹茧症的诊断; (2)立位腹平片无特征性表现, 仅有小肠轻度扩张、积气. 可能因为小肠被包裹固定, 不能充分扩张或移动. 虽然有人认为可行消化道钡餐造影, 显示菜花征[7]可提示诊断, 但因在肠梗阻存在的情况下进食钡剂有加重肠梗阻的危险, 因此应慎重选用消化道钡餐造影检查; (3)术中见小肠无明显血运障碍, 无明显转折成角, 黏连易于分离. 手术是腹茧症主要治疗方法[8]. 主张非手术治疗的作者认为, 在腹茧症当中的肠管黏连不同于其他机械性肠梗阻, 前者似乎较符合生理, 较少引起完全性或绞窄性肠梗阻[6]. 是否行肠排列术还有争议[9]. 本组3例行肠内排列术患者与未行肠排列术患者在术后恢复时间上无明显差别; (4)腹茧症术后恢复缓慢, 不同于一般肠梗阻患者. 本组患者均有短期内胃肠功能恢复后又出现肠梗阻症状,

**■应用要点**
作为临床少见的腹膜病变, 腹茧症术前诊断困难. 对于病因难以明确的急慢性肠梗阻病例, 尤其是男性患者, 如果伴有隐睾, 应考虑到腹茧症可能.

表现腹痛, 大量呕吐, 每天胃肠减压量大于1500 mL. 行泛影葡胺口服造影表现为胃蠕动减慢, 排空障碍. 出现这种症状的原因可能与手术创伤激活抑制性交感神经反射系统, 使胃肠交感神经系统活动增强, 并通过抑制胃肠神经丛的兴奋性神经元抑制胃动力; 同时交感神经末梢释放的儿茶酚胺直接与胃平滑肌细胞膜上的α和β受体结合抑制平滑肌收缩; 也可能与胃的神经网发育不良, 致胃电活动异常, 胃电节律紊乱使胃产生逆向移行性慢波, 胃收缩运动减弱或缺乏, 干扰胃肠道对内容物的清扫运动有关; 另外, 术后再次肠黏连, 致胃肠运动的不协调以及应激状态等都是胃瘫的可能因素. 治疗上采用静脉滴注红霉素、胃复安封闭足三里及中成药补益通理合剂灌肠治疗对胃肠功能恢复有一定的作用; (5)预后良好. 所有患者术后生命体征平稳, 出院后随访未有明显肠梗阻症状发作.

总之, 作为临床少见的腹膜病变, 腹茧症术前诊断困难. 对于病因难以明确的急慢性肠梗阻病例, 尤其是男性患者, 如果伴有隐睾, 应考虑到腹茧症可能. 手术治疗是腹茧症有效的治疗方法, 术中应尽可能的松解黏连, 不强调同时行阑尾切除[10]. 术后出现的肠梗阻、胃瘫等, 经积极的保守治疗多能治愈, 避免急于再次手术, 增加小肠损伤的机会.

**■同行评价**
本文对4例原发性腹茧症合并隐睾的诊治情况作了论述, 行文流畅, 篇幅合适, 引用文献较新, 讨论较充分, 有一定的临床参考意义.

## 4 参考文献


1 Foo KT, Ng KC, Rauff A, Foong WC, Sinniah R. Unusual small intestinal obstruction in adolescent girls: the abdominal cocoon. *Br J Surg* 1978; 65: 427-430
2 王洪山. 腹茧症的临床特征及发病机制. 外科理论与实践 2006; 11: 75-77
3 Sahoo SP, Gangopadhyay AN, Gupta DK, Gopal SC, Sharma SP, Dash RN. Abdominal cocoon in children: a report of four cases. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 987-988
4 屠金夫, 黄秀芳, 朱冠保, 廖毅, 蒋飞照. 腹茧症203例综合分析. 中华胃肠外科杂志 2006; 9: 133-135
5 Fowler R. Primary peritonitis: changing aspects 1956-1970. *Aust Paediatr J* 1971; 7: 73-83
6 林清. 腹茧症. 国外医学・外科学分册 1997; 24: 279-281
7 Navani S, Shah P, Pandya S, Doctor N. Abdominal cocoon-the cauliflower sign on barium small bowel series. *Indian J Gastroenterol* 1995; 14: 19
8 杨建芬, 李宁, 黎介寿. 原发性腹茧症的诊断与治疗. 中华外科杂志 2005; 43: 561-563
9 杨凤平, 邱法波, 张圣林, 卢华军, 吴力群, 杨楠. 腹茧症3例. 中国现代普通外科进展 2005; 8: 127-128
10 张庆. 腹茧症1例报告. 中国实用外科杂志 2000; 20: 160


电编 张敏 编辑 程剑侠

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 世界华人消化杂志关于作者署名的声明

**本刊讯** 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. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年6月28日; 15(18): 2074-2075
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

病例报告 CASE REPORT

# 重症急性胰腺炎并胃溃疡穿孔1例

谢守勇, 张 颖, 黄宗文

■背景资料
急性胰腺炎是一种常见的急腹症, 其中的重症急性胰腺炎容易导致全身多器官/系统的损害, 胃肠道损害以肠麻痹, 上消化道出血较为多见, 而胃溃疡穿孔较为罕见, 并且症状和体征不典型, 再加之基础疾病本身的影响, 使得诊断较为困难.

谢守勇, 宜宾市第一人民医院中西医结合科 四川省宜宾市 644000
张颖, 黄宗文, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610000
**通讯作者:** 谢守勇, 644000, 四川省宜宾市, 宜宾市第一人民医院中西医结合科. xieshouyong2000@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-01-07 接受日期: 2007-04-21

## 摘要
报道1例重症急性胰腺炎并发的胃溃疡穿孔, 较为罕见, 临床症状体征不典型, 容易误诊. 此例患者通过手术获得治愈.

**关键词: 急性胰腺炎/重症; 胃溃疡/穿孔; 上消化道出血**

谢守勇, 张颖, 黄宗文. 重症急性胰腺炎并胃溃疡穿孔1例. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2074-2075
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2074.asp

## 0 引言
急性胰腺炎是一种常见的急腹症, 其中重症急性胰腺炎容易导致全身各个器官的损害. 胃肠道损害以肠麻痹, 上消化道出血较为常见, 而发生胃溃疡穿孔则较为罕见. 在此报道1例重症急性胰腺炎并发的胃溃疡穿孔.

## 1 病例报告
患者为49岁女性, 因“腹痛13 d”入院. 13 d前, 患者无明显诱因出现中上腹疼痛伴恶心, 呕吐入当地医院; B超示胆囊颈部结石嵌顿、胰腺肿大; 血淀粉酶增高、HGB 150 g/L; 给予胃肠减压、补液、防治感染、制酸、中药及硫酸镁口服治疗后腹痛无缓解, 并出现双下肢水肿而转入院. 既往有30 a支气管哮喘史, 但近年未发作, 10 a前发现胆囊结石, 1 a前曾患胆囊炎, 无返酸、打呃、腹部隐痛史. 入院查体: T 37.1℃、P 102次/min、R 24次/min, BP 16.2/10.0 kPa; 急性病容, 贫血貌, 神清合作, 皮肤巩膜无黄染, 双下肺略叩浊, 双肺少量湿鸣; 腹膨隆, 左上腹及剑下压痛及反跳痛, 肝浊音界存在, 双腰肋部轻度肿胀, 双膝关节以下轻度凹陷性水肿. 辅查: TP 53.8 g/L, ALB 29.2 g/L, LIP 62.2 IU/L, Ca 1.60 mmol/L, RBC 2.18×$10^{12}$/L, HGB 63 g/L, PLT 464×$10^{9}$/L, WBC 18.7×$10^{9}$/L; 大便、小便常规正常; 胸片示双胸腔少量积液, 双肺片状阴影; B超示胆囊结石, 小网膜囊区局限性积液伴坏死组织形成, 左胸少量积液; CT示胰腺体积无明显增大, 胰周肿胀, 小网膜囊, 双肾旁前间隙, 左肾旁后间隙积液, 双肾筋膜肿胀, 左胸少量积液. 入院后经输人血蛋白、脂肪乳、氨基酸支持, 雷尼替丁制酸, 头胞他啶防止感染等治疗患者, 一般情况好转. 复查肝功及血常规示ALB 37.9 g/L, RBC 2.41×$10^{9}$/L HGB 72 g/L, HCT 0.226, PLT 406×$10^{9}$/L 2, WBC 12.2×$10^{9}$/L. 后无诱因突然解柏油样稀便400 mL后出现休克, 未觉腹痛, 查: 上腹部局限性膨隆, 压痛, 肝浊音界存在. 急查血RBC 1.56×$10^{9}$/L, HGB 48 g/L, PLT 391×$10^{9}$/L, WBC 12.73×$10^{9}$/L, 给予输血、络赛克、善宁、凝血酶等治疗, 患者继续出血, 予血管造影未发现出血点, 转外科急诊手术, 术中见(1)胃体前壁一巨大溃疡型病变区, 面积约6 cm×6 cm, 中央穿孔, 穿孔区约2 cm×2 cm, 该区被大网膜黏贴覆盖, 打开胃体, 见胃内积血约2000 mL, 溃疡壁黏膜消失. 余黏膜水肿明显; (2)肠道内积血; (3)胰腺水肿, 胰周多量坏死组织, 以胰尾部为甚, 并有脓液样分泌物; (4)胆囊内多发结石, 胆总管内未扪及异常; (5)上腹部组织器官黏连明显. 术后病理显示: 溃疡穿孔, 溃周大量中性白细胞浸润, 复性肉芽组织形成, 伴大片脂肪. 术后第2天体温39℃, 脓液培养为真菌与细菌的混合感染, 给予支持, 抗感染等治疗患者痊愈出院.

## 2 结果
该患者在急性胰腺炎的基础上合并上消化道大出血, 胰腺脓肿, 因此诊断重症急性胰腺炎明确. 急性胰腺炎合并上消化道出血比较常见, 而合并胃溃疡穿孔则罕见. 该患者既往无消化性溃疡的历史, 在外院入院时血红蛋白也正常, 因此, 患者的贫血和胃溃疡穿孔与此次急性胰腺炎发作有明显的关系. 急性胰腺炎导致胃溃疡穿孔

的可能与以下因素有关: (1)应激时内脏血流量减少, 胃、肠黏膜缺血, 胃腔内$H^+$向黏膜内的反向弥散致应激性溃疡的形成[1]; (2)肿大的胰腺压迫致胃壁血运障碍; (3)大量胰酶的释放对胰周组织特别是对胃壁的损伤作用[2]; (4)胰腺炎诱发的全身炎症因子的释放可能在溃疡的发生中发挥了作用[3-4]. 一旦溃疡穿孔发生, 死亡率高[5]. 及时的发现和外科干预是关键. 但胰腺炎并发胃肠道穿孔时可由于穿孔处被大网膜黏贴覆盖, 且有胰腺炎病情的掩盖, 而使胃穿孔的临床症状体征不典型, 腹部平片亦不能发现太少的和隐蔽的胃肠外游离气体. 此时, 螺旋CT常能帮助作出早期的诊断, 且能揭示病变周围组织的情况(如周围炎、脓肿等)[6-7].

## 3 参考文献


1 金薰铭, 王建枝. 病理生理学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 144-157

2 杨植, 王立平, 刘东坡. 重症急性胰腺炎并发十二指肠穿孔一例. 中华普通外科杂志 2004; 19: 416

3 Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995; 82: 6-13

4 Hynninen M, Valtonen M, Markkanen H, Vaara M, Kuusela P, Jousela I, Piilonen A, Takkunen O. Intramucosal pH and endotoxin and cytokine release in severe acute pancreatitis. *Shock* 2000; 13: 79-82

5 Fernandez-Cruz L, Navarro S, Castells A, Saenz A. Late outcome after acute pancreatitis: functional impairment and gastrointestinal tract complications. *World J Surg* 1997; 21: 169-172

6 Furukawa A, Sakoda M, Yamasaki M, Kono N, Tanaka T, Nitta N, Kanasaki S, Imoto K, Takahashi M, Murata K, Sakamoto T, Tani T. Gastrointestinal tract perforation: CT diagnosis of presence, site, and cause. *Abdom Imaging* 2005; 30: 524-534

7 Pinto A, Scaglione M, Romano L. Perforation of a gastrojejunal anastomosis due to acute pancreatitis revealed by helical computed tomography. *Acta Radiol* 2003; 44: 572-573


**■同行评价**

本文通过1例重症急性胰腺炎并发胃溃疡穿孔的病例报告旨在加深临床医生对并发胃溃疡更深刻的认识, 减少漏诊和误诊, 学术价值较高.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

**• 消息 •**

# 2007年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知

**本刊讯** 为促进国内肝脏移植领域的交流与合作, 为拟开展肝脏移植的同道提供技术支持, 提高我国肝移植的技术水平, 推动肝移植的健康发展, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心将于2007-08-29/09-02与《世界华人消化杂志》合作举办“原位肝肝脏植新技术及进展”学习班, 由中山大学器官移植研究所所长陈规划教授主持, 并邀请海内外肝移植知名专家授课, 就目前我国肝移植存在的重点和难点问题以及近几年来肝移植技术的新进展进行学术讲座.

中山大学附属第三医院肝脏移植中心是广东省器官移植研究所和中山大学器官移植研究所挂靠单位, 也是广东省卫生厅重点专科和广东省器官移植学会主任委员单位. 目前, 已开展近1000例肝脏移植术, 术后1 a生存率超过80%, 居国内领先水平. 本中心已举办3期肝脏移植技术学习班, 并协助国内60余家单位开展了肝脏移植术. 本项目为2007年国家级继续医学教育项目, 项目编号为: 2007-04-10-024, 授予Ⅰ类学分14分. 授课内容主要涉及肝脏移植手术技巧、高危受者的麻醉管理、重症感染病人的无肝素化持续血液净化治疗、个体化免疫抑制方案、术后随访管理系统、抗乙肝病毒治疗新策略、西罗莫司及超声造影技术在肝脏移植中的应用等方面. 学习对象为省级、地市级医院的医护人员. 收费标准: 培训费900元/人(统一安排食宿, 费用自理)

通讯地址: 510630, 广州市天河路600号, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心. 联系人: 汪根树 电话: 020-87595523 传真: 020-87595523 E-mail: chengying_827@163.com.

• 致谢 •

# 致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!

曹秀峰 主任医师
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心科

陈立波 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈耀凯 副教授
第三军医大学西南医院感染病科

程英升 副教授
上海交通大学附属第六人民医院科教处

戴冬秋 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

杜雅菊 主任医师
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

傅春彬 主任医师
吉化集团公司总医院消化内科

高泽立 副教授
上海交通大学医学眼院附属第三人民医院消化科

管冬元 副教授
上海中医药大学基础医学院实验中医学教研室

李定国 教授
上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

李华山 副主任医师
中国中医科学院广安门医院肛肠科

李胜 研究员
山东省肿瘤防治研究院

刘宝瑞 主任医师
南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

牛建昭 教授
北京中医药大学细胞生物化学实验室与中加抗纤维化研究中心

乔岐禄 主任医师
北京大学第一医院外科二病房

秦波 教授
重庆医科大学附属第二医院感染病科

田晓峰 教授
大连医科大学附属第二医院普通外科

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

闻勤生 教授
第四军医大学唐都医院消化科

徐列明 教授
上海中医药大学肝病研究所

阎晓初 教授
第三军医大学西南医院病理学研究所

杨希山 教授
广东省中医药局

杨昭徐 教授
首都医科大学附属北京天坛医院消化科

于颖彦 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所与器官移植中心

展玉涛 副主任医师
首都医科大学附属同仁医院消化科

张吉翔 教授
南昌大学第二附属医院消化内科

张继明 教授
复旦大学附属华山医院肝炎研究室

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

周士胜 教授
大连大学医学院医学研究中心