

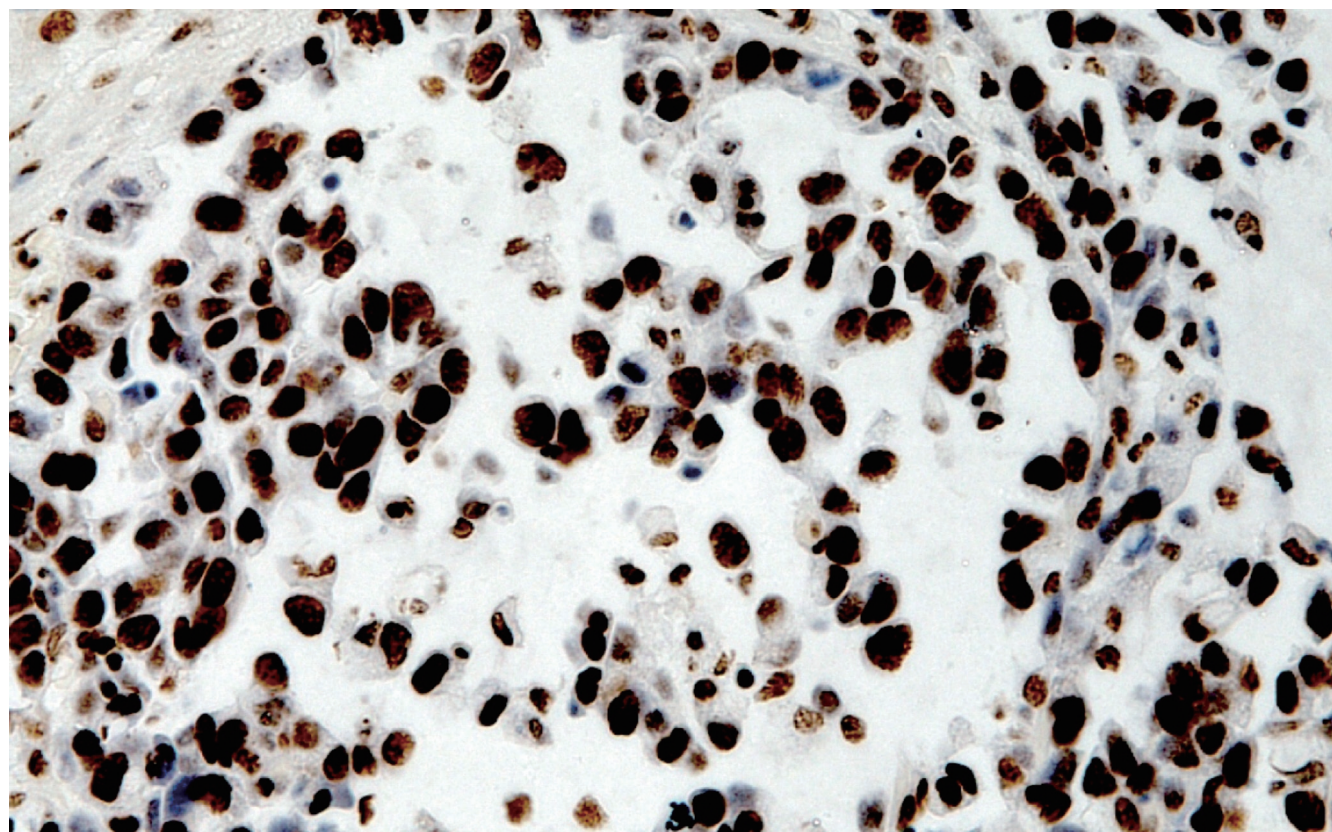
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

2011 年 10 月 8 日 第 19 卷 第 28 期 (Volume 19 Number 28)



**28/2011**

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

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

### 常务编委

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

### 编委

#### 消化内科学

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

邓长生教授  
丁士刚教授  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
樊晓明主任医师  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
关晓辉主任医师  
郭晓钟教授  
郝建宇教授  
何松教授  
洪天配教授  
侯晓华教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
霍丽娟教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
姜相君主任医师  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
廖家智副主任医师  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘海林主任医师  
刘铁夫教授  
刘莹副主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
吕志武教授  
马红主任医师  
马欣主任医师  
毛高平教授

孟庆华教授  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
宋于刚教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
宛新建副教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
王俊平教授  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授  
许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
张晓岚教授  
张筱茵副教授  
张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师  
周国雄主任医师  
周晓东副教授  
周宇教授  
朱春兰主任医师  
邹晓平主任医师  
诸琦教授  
于珮主任医师  
消化外科学  
白雪巍副主任医师

蔡开琳副教授  
蔡三军主任医师  
曹杰主任医师  
陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈力教授  
陈立波教授  
陈凇教授  
陈强谱教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
董明教授  
杜成友教授  
杜顺达副主任医师  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
高成新教授  
葛海燕教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾国利副主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
郝立强副教授  
何超教授  
何晓顺教授  
何裕隆教授  
黄志勇教授  
季加孚教授  
姜卫东教授  
姜波健教授  
蒋龙元副教授  
金山副教授  
黎乐群教授  
李革副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师

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



# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

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

智绪亭教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

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

### 消化中医药学

蔡淦教授

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

### 消化肿瘤学

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

### 消化影像学

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

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

### 消化内镜及介入治疗学

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

### 消化中西医结合学

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

### 消化基础研究

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

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

### 消化病理学

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

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011 年 10 月 8 日 第 19 卷 第 28 期 (总第360期)

## 述 评

2907 Th17细胞及肠道内共生菌群在炎症性肠病中的作用

李睿东, 韩高雄, 陶凯雄

## 基础 研究

2913 沉默CXCR4基因对食管鳞癌EC-9706细胞中MMP-9基因表达的影响

刘剑, 王峰, 朱利楠, 何炜, 王留兴, 樊青霞

2919 ER- $\alpha$ 36对胃癌SGC7901细胞在裸鼠体内生长的影响

王绪明, 刘晶晶, 邓昊, 陈莹, 刘丽江

2925 KDR单克隆抗体对荷人胃癌裸小鼠肿瘤生长的抑制作用

孔桂美, 张小荣, 吴克艳, 赵飞燕, 朱海杭, 张旭东, 廖月霞, 卜平

2931 JDP2在TGF- $\beta$ 1诱导的人胰腺癌细胞系Panc-1上皮向间质转化中的作用

许元鸿, 刘哲, 郭克建, 杜瑞霞, 王春雁

## 临床 研究

2937 Rb/E2F1调控途径在新疆哈萨克族食管鳞癌发生中的作用

马莉莉, 李卉, 王洪江, 陈艳, 郭琼, 尹娜, 李惠武

## 文 献 综 述

2942 骨髓间充质干细胞治疗急性胰腺炎的潜能

赖薇, 邓明明

2947 原发性小肠淋巴瘤临床病理特点及诊治进展

黄小梅, 高青

## 研究 快报

2953 反义锁核酸与拉米夫定在HepG2.2.15细胞中抗HBV作用的比较

朱晓莹, 王燕菲

2958 羽扇豆醇对胰腺癌细胞株SW1990及 $\gamma$ T细胞生长的影响

罗冠琴, 朱炳喜, 陈复兴, 刘军权, 黄菲, 吕小婷

2963 嗜酸乳杆菌对感染人轮状病毒乳鼠肠黏膜的保护作用

高源, 张振, 王宝香, 鲍连生, 彭罕鸣

## 临 床 经 验

2970 黏膜下层早期胃癌淋巴结转移290例

张勇, 彭正, 卫勃, 陈凇

2974 核PTEN和Survivin蛋白在胃癌组织芯片中的表达及意义

王晓茹, 李小宁, 白光辉, 郭云娣

2979 肝脓肿临床分析183例

张海峰, 陈海琴, 丁晓凌, 周国雄

2983 人工肝结合 $^{131}$ I治疗与内科常规治疗40例甲亢合并重症肝损害疗效的比较

杨丽霞, 李小鹏, 张伦理

2987 CCT亚基 $\gamma$ 在人肝细胞癌组织中的表达及意义

谭晓虹, 曹骥, 欧超, 汪多平

2991 巨大型先天性胆管扩张症手术治疗20例

李忠廉, 张西波, 尚海涛, 张鸿涛, 鲍建亨, 郑帅

2995 慢性放射性肠炎并发肠梗阻的治疗

周创业, 周振理, 马军宏, 吕鹏

## 病 例 报 告

2999 成人肝脏未分化胚胎性肉瘤1例

郭威, 陈谦, 喻亚群



附 录	3002 《世界华人消化杂志》投稿须知 3007 2011年国内国际会议预告
志 谢	3008 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2918 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2930 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》 2936 《世界华人消化杂志》正文要求 2941 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2957 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2969 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2973 WJG成功通过评审被PMC收录 2978 招聘生物医学编辑部主任 2982 《世界华人消化杂志》出版流程 2990 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625 2994 WJG总被引频次排名位于第174名 2998 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 3001 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》
封面故事	王晓茹, 李小宁, 白光辉, 郭云娣. 核PTEN和Survivin蛋白在胃癌组织芯片中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2974-2978 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2974.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2974.asp</a>
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 闫晋利; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2011-10-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p><b>编辑</b> 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>出版</b> 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂</p> <p><b>发行</b> 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p><b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p><b>邮购</b> 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<a href="http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx">http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx</a>), 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.</p> <p><b>特别声明</b> 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2011年版权归世界华人消化杂志所有</p>
---	---	---

# World Chinese Journal of Digestology

## October 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 28

<b>EDITORIAL</b>	2907 Role of interaction between Th17 cells and commensal microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease <i>Li RD, Han GX, Tao KX</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	2913 SiRNA-mediated silencing of the CXCR4 gene down-regulates MMP-9 expression in EC-9706 cells <i>Liu J, Wang F, Zhu LN, He W, Wang LX, Fan QX</i> 2919 ER- $\alpha$ 36 promotes the growth of SGC-7901 cells in nude mice <i>Wang XM, Liu JJ, Deng H, Chen Y, Liu LJ</i> 2925 Inhibitory effect of KDR-specific monoclonal antibody on tumor growth in nude mice bearing human gastric cancer <i>Kong GM, Zhang XR, Wu KY, Zhao FY, Zhu HH, Zhang XD, Liao YX, Bo P</i> 2931 JDP2 suppresses transforming growth factor- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cell line Panc-1 <i>Xu YH, Liu Z, Guo KJ, Du RX, Wang CY</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	2937 Clinicopathological significance of Rb and E2F1 expression in esophageal squamous cell carcinoma <i>Ma LL, Li H, Wang HJ, Chen Y, Guo Q, Yin N, Li HW</i>
<b>REVIEW</b>	2942 Potential therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in acute pancreatitis <i>Lai W, Deng MM</i> 2947 Clinicopathological features and treatment of primary small intestinal lymphoma: recent advances <i>Huang XM, Gao Q</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	2953 Inhibitory effect of locked nucleic acid antisense oligonucleotides versus lamivudine on HBV replication in HepG2.2.15 cells <i>Zhu XY, Wang YF</i> 2958 Effect of lupeol on the growth of human pancreatic cancer SW1990 cells and $\gamma$ $\delta$ T cells <i>Luo GQ, Zhu BX, Chen FX, Liu JQ, Huang F, Lv XT</i> 2963 Protective effect of <i>Lactobacillus acidophilus</i> on intestinal mucosa of neonatal mice infected with a human rotavirus <i>Gao Y, Zhang Z, Wang BX, Bao LS, Peng HM</i>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	2970 Predictive factors associated with lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion: an analysis of 290 cases <i>Zhang Y, Peng Z, Wei B, Chen L</i> 2974 Significance of expression of nuclear PTEN and survivin in gastric cancer <i>Wang XR, Li XN, Bai GH, Guo YD</i> 2979 Liver abscess: an analysis of 183 cases <i>Zhang HF, Chen HQ, Ding XL, Zhou GX</i> 2983 Clinical effect of artificial liver combined with $^{131}$ I therapy versus conventional medical treatment in patients with hyperthyroidism and severe liver injury: an analysis of 40 cases <i>Yang LX, Li XP, Zhang LL</i> 2987 Significance of expression of CCT subunit $\gamma$ in human hepatocellular carcinoma <i>Tan XH, Cao J, Ou C, Wang DP</i>

	<p>2991 Surgical treatment of giant congenital bile duct dilatation: an analysis of 20 cases <i>Li ZL, Zhang XB, Shang HT, Zhang HT, Bao JH, Zheng S</i></p> <p>2995 Management of chronic radiation enteritis with intestinal obstruction <i>Zhou CY, Zhou ZL, Ma JH, Lv P</i></p>
<b>CASE REPORT</b>	<p>2999 Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver in adult: a case report <i>Guo W, Chen Q, Yu YQ</i></p>
<b>APPENDIX</b>	<p>3002 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>3007 Meeting events calendar in 2011</p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>3008 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Wang XR, Li XN, Bai GH, Guo YD.</i> Significance of expression of nuclear PTEN and survivin in gastric cancer.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(28): 2974-2978</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2974.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2974.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Jin-Li Yan</i></p> <p>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i></p> <p>Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** October 8, 2011

### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

### RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

### SPONSOR

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

### EDITING

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

### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

### PUBLISHING

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

### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

### SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

### SUBSCRIPTION

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

### CSSN

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

### COPYRIGHT

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

### SPECIAL STATEMENT

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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



# Th17细胞及肠道内共生菌群在炎症性肠病中的作用

李睿东, 韩高雄, 陶凯雄

李睿东, 韩高雄, 陶凯雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 本文综述由李睿东完成; 韩高雄和陶凯雄审核。

通讯作者: 陶凯雄, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 430022, 湖北省武汉市汉口解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科。tao\_kaixiong@163.com

电话: 027-85351619

收稿日期: 2011-07-05 修回日期: 2011-09-29

接受日期: 2011-10-05 在线出版日期: 2011-10-08

## Role of interaction between Th17 cells and commensal microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease

Rui-Dong Li, Gao-Xiong Han, Kai-Xiong Tao

Rui-Dong Li, Gao-Xiong Han, Kai-Xiong Tao, Department of General Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Kai-Xiong Tao, Professor, Department of Laparoscopic Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. tao\_kaixiong@163.com

Received: 2011-07-05 Revised: 2011-09-29

Accepted: 2011-10-05 Published online: 2011-10-08

## Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is an autoimmune disease whose etiology and pathogenesis remain incompletely understood. Th17 cells can secrete cytokines interleukin-17A and interleukin-17F, which play an important role in the pathogenesis of IBD. Some studies have proved that reduction of IL-17A and IL-17F can attenuate intestinal mucosal inflammation. Additionally, many studies reveal that the occurrence of IBD is correlated with commensal microbiota. Commensal microbiota can alter the number of Th17 cells in intestinal mucosa and cause abnormal intestinal mucosal immune responses. Elucidation of relationship between Th17 cells and commensal microbiota in intestinal mucosa is important for understanding the pathogenesis of IBD.

Key Words: Th17 cells; Inflammatory bowel disease; Commensal microbiota

Li RD, Han GX, Tao KX. Role of interaction between Th17 cells and commensal microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2907-2912

## 摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种以慢性肠道炎症性疾病,病因未明,肠道黏膜异常的免疫反应在发病中有着重要作用。最近发现一类辅助T淋巴细胞Th17细胞,能在肠黏膜中大量分泌IL-17A和IL-17F。减少肠道Th17细胞数量和其相关的细胞因子的表达能够缓解肠道炎症反应,预示Th17细胞在IBD发病中起到一定作用。肠道共生菌与IBD的发病也有着密切关系,肠道共生菌群的变化可能导致Th17细胞的数量发生改变引起炎症,或者通过其他机制和途径诱发免疫紊乱,从而使得炎症得以发生。本文就Th17细胞的分化与其在IBD中的作用,以及共生菌群和Th17细胞之间的相互联系作一综述。

关键词: Th17细胞; 炎症性肠病; 共生菌群

李睿东, 韩高雄, 陶凯雄. Th17细胞及肠道内共生菌群在炎症性肠病中的作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(28): 2907-2912

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2907.asp>

## 0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是两种慢性和反复发作性的肠道炎症,病因和发病机制尚未完全明确<sup>[1]</sup>。有证据表明造成CD和UC是遗传和环境多种因素相互作用所致,最终导致机体同自身正常共生菌群作用产生过度的和难以控制的黏膜免疫反应。对IBD体内模型的研究显示,CD4<sup>+</sup>T细胞通过分泌IL-2、干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)等多种细胞因子,在肠道炎症起始和形成中起到重要作用<sup>[2]</sup>。目前将CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞(T help cells, Th)按其功能特点和所分泌的细胞因子种类来划分,可分为4个亚型: Th1, Th2, Th17(IL-17-producing T cells), 调节性T细胞(regulatory

## ■背景资料

随着分子免疫学的理论和研究的不断发展,免疫诊断和治疗已经成为炎症性肠病的研究热点。近年来许多研究表明Th17细胞和肠道共生菌群在炎症性肠病的发生发展中起着重要作用,但确切作用机制以及两者之间相互作用的关系尚不十分清楚。

## ■同行评议者

吴军, 研究员, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所; 陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第二一医院中医科

## ■研究前沿

目前存在争议的是菌体或细菌产物与肠黏膜系统作用,直接诱发了肠道炎症的产生;还是细菌出现于肠道炎症改变之后,然后侵入病变组织,使得病变加重,仍需进一步明确。

T cells, Treg). 在感染和不同微生物的作用下, T 细胞表面受体(T cell receptor, TCR)同特定的体内固有的免疫细胞分泌的细胞因子结合,诱导T细胞分化为各个不同亚型<sup>[3]</sup>. Th1细胞产生IFN- $\gamma$ 和IL-12(interleukin, IL)等细胞因子,抵抗胞内感染和肿瘤. Th1细胞的功能异常与IBD有关, Baumgart等<sup>[4]</sup>发现,抑制Th1细胞的激活,对CD患者有一定的临床治疗效果. Th2细胞分泌IL-4以及IL-5, IL-13等,介导体液免疫应答. Treg细胞在机体免疫平衡中有重要的作用,可维持免疫耐受,介导免疫的负性调节,调节性T细胞最重要的分子标记是一种转录因子Foxp3<sup>[5]</sup>. 最近又发现了一类不同于Th1和Th2的细胞亚群,其与Th1和Th2细胞亚群表达的细胞因子不同,即Th17细胞<sup>[6]</sup>. Th17细胞不仅在抵抗病原感染方面有作用,而且对介导自身免疫疾病也有着重要作用<sup>[7]</sup>.

## 1 Th17细胞功能及其分化

1.1 Th17细胞的发现及其在小鼠中的分化 Th17细胞在实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型中首次被发现. 其标志性的特征就是可以产生IL-17类细胞因子以及表达特异的转录因子孤独受体ROR- $\gamma$ t(retinoid-related orphan nuclear receptor, ROR)和ROR- $\alpha$ <sup>[8]</sup>. IL-17家族包括6个成员(IL-17A-IL-17F),但Th17细胞只产生IL-17A和IL-17F. 除此之外, Th17细胞还生成其他细胞因子,如IL-6, IL-21, IL-22, IL-26和各种趋化因子(如chemokine ligand 20, CCL20)以及抗菌肽(antibacterial peptide)<sup>[9-11]</sup>. IL-17促进炎症的形成,这在动物模型中得到证实. IL-17A可以促进中性粒细胞迁移、扩增,并加强其功能. 除此以外, IL-17A还促进树突状细胞的成熟,以及各种细胞(例如成纤维细胞,内皮细胞,上皮细胞等)产生促炎症介质,促进炎症的发生<sup>[12]</sup>.

在小鼠的体内外实验均已经证实,当TGF- $\beta$ 和IL-6共同存在时,可以刺激初始CD4<sup>+</sup> T细胞表达IL-17A和IL-17F;缺乏IL-6时, TGF- $\beta$ 诱导小鼠初始CD4<sup>+</sup> T细胞分化为FoxP3<sup>+</sup> T调节细胞,机体对自身免疫的反应性也有所降低<sup>[13]</sup>. 基因敲除STAT6(signal transducers and activators of transcription 6, STAT6)和转录因子T-bet的小鼠不能产生Th1和Th2细胞,此时只需要单独的IL-6的刺激就可促进Th17的分化,也由此证明了IL-6为诱导Th17分化的始动因子<sup>[14]</sup>. 而关于TGF- $\beta$ 的作

用,目前认为TGF- $\beta$ 抑制了Th1和Th2细胞亚群分化所需的转录因子的表达<sup>[15]</sup>. 故IL-6和TGF- $\beta$ 两者协同作用,诱导初始CD4<sup>+</sup> T细胞向Th17细胞分化, IL-6诱导初始CD4<sup>+</sup> T细胞分化为Th17细胞,而TGF- $\beta$ 的作用在于抑制了初始T细胞分化为Th1, Th2,从中间接促进了初始CD4<sup>+</sup> T细胞向Th17细胞分化.

1.2 人Th17细胞的分化和特征 人类Th17细胞分化同小鼠比较,有所不同. 小鼠初始CD4<sup>+</sup> T细胞在IL-6和TGF- $\beta$ 作用下启动向Th17的分化,启动后,这种分化效应可被IL-23和IL-21加强和维持,对人类Th17来说, IL-21和IL-23也有维持T细胞分化为Th17的功能. 不同在于,对于人类Th17,其分化起始是源于IL-1 $\beta$ 和IL-6的共同刺激,而非小鼠的IL-6和TGF- $\beta$ <sup>[16]</sup>. 有学者认为初始CD4<sup>+</sup> T细胞分化为Th17过程中TGF- $\beta$ 的刺激并不必需<sup>[17]</sup>. 但有趣的是,另一些研究发现TGF- $\beta$ 在分化环境中的存在为人类Th17分化所必需<sup>[9-11]</sup>. 造成这一相反结论的原因有可能是培养CD4<sup>+</sup> T细胞的培养基的血清中可能本来就含有TGF- $\beta$ ,从而忽略了他的作用. 在此问题上,还存在较大争议.

人Th17细胞也可以产生IL-17A,表达特异转录因子ROR- $\gamma$ t,趋化因子受体(chemokine receptor, CCR)CCR6, CCR4<sup>[18]</sup>. 人的Th1和Th17细胞似乎有着一定的同源性,人的Th17细胞可以表达特异性转录因子ROR- $\gamma$ t和T-bet,后者是Th1细胞的特异性转录因子. Th17细胞表面表达IL-23R(IL-23 receptor)和IL-12R $\beta$ 2受体,在IL-12的刺激下, Th17细胞中T-bet表达上调并且可以产生IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$ 是Th1细胞的标志性的产物,为何Th17细胞却产生Th1细胞的产物,是否Th17细胞是一个T细胞分化的终末状态?有证据表明, IL-17<sup>+</sup> T细胞在一定体内炎性环境下可以分化为Th1细胞<sup>[19]</sup>. 常规认为, Th1和Th2细胞分化稳定,但有研究发现,在病毒感染引起IFN- $\gamma$ 产生的情况下, Th2细胞可被诱导表达T-bet,而T-bet恰恰是Th1分化必须的转录因子<sup>[20]</sup>. 小鼠EAE模型中枢神经系统中,许多产IL-17的细胞都在炎性发生部位存在并且表达IFN- $\gamma$ . 在对鼠类的自身免疫性脑炎的实验中也发现Th17细胞可向Th1细胞转化<sup>[21]</sup>. 因而, T细胞是否可以随环境的改变而改变, Th17细胞是否只是T细胞的一个中间分化状态? 仍需进一步的研究.

相比Th1和Th2细胞, Th17中CD161分子表达上调明显,并且CD161与CCR6两者之间的表达有着密切的联系. 所有产IL-17A的CD4<sup>+</sup> T

细胞其表面CD161均呈阳性<sup>[22]</sup>。有实验证明, CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T和CD161<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T两组初始细胞, 在IL-1 $\beta$ 和IL-23存在的条件下刺激分化, 只有CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞能发展成为产IL-17A的CD4<sup>+</sup>T细胞, 而CD4<sup>+</sup>CD161<sup>-</sup>的T细胞自始至终都不能诱导其产生IL-17A<sup>[15]</sup>。这预示这CD161可能是人Th17细胞的一个表面特异性标志。但目前对CD161在Th17细胞中的功能仍然不清楚。

1.3 Th17细胞的其他产物 IL-23是Th17细胞分泌的细胞因子之一, 并且对Th17细胞本身的功能有重要影响。研究发现IL-23可能与Th17细胞的调节和分化有关, 敲除小鼠IL-23的p19亚基或者IL-23R受体可以导致自身免疫反应表现减轻, 同时小鼠易受到黏膜上病原的感染, 肠道黏膜抵抗力降低, 并且表达IL-17的CD4<sup>+</sup>T细胞的数量明显减少<sup>[23]</sup>。因此IL-23在Th17细胞的分化功能中有一定作用。但是, 初始CD4<sup>+</sup>T细胞在仅受IL-23刺激的情况下并不能分化为Th17细胞, 而是在IL-6和TGF- $\beta$ 存在的情况下才能分化为Th17细胞<sup>[24]</sup>。此外, 小鼠中IL-23R必需在IL-6或IL-21刺激后才能表达在初始CD4<sup>+</sup>T细胞表面, 说明IL-23并不参与Th17细胞的早期分化, 其作用是在Th17起始分化之后, 维持Th17细胞的分化和生存<sup>[25]</sup>。

除IL-6、IL-23和TGF- $\beta$ 外, Th17细胞的分化还需要一系列的转录因子ROR- $\gamma$ t, ROR- $\alpha$ , 和干扰素调节因子4(interferon regulatory factor 4, IRF-4)<sup>[26]</sup>。Th17细胞产生大量的IL-21, 激活自身STAT3, 促进转录因子ROR- $\gamma$ t的表达<sup>[27]</sup>。IL-21还可以促进Th17细胞自身合成上调IL-23R受体, 使Th17细胞对IL-23产生应答<sup>[28]</sup>。以上研究提示Th17细胞在其分化中存在正反馈的循环, 促进自身Th17细胞系的扩增。

1.4 抑制Th17分化的因素 Th17分化抑制因子包括IL-25, IL-27, T-bet以及IFN- $\beta$ 。Kleinschek等<sup>[29]</sup>发现敲除IL-25基因的小鼠相对未敲除组表现出对EAE的高度易感性, 并且给予敲除组IL-25干预后可以诱导IL-13的升高, IL-13可以抑制激活的树突状细胞分泌IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, 从而抑制了Th17细胞的分化。Batten等<sup>[30]</sup>发现IL-27可以明显抑制IL-6和TGF- $\beta$ 诱导T细胞分化为Th17细胞的。当小鼠缺乏IL-27R $\alpha$ 受体时, 炎症反应更为强烈。T-bet是Th1细胞的重要转录因子, Gocke等<sup>[31]</sup>发现T-bet可直接调节IL-23R的转录合成, T-bet升高可以导致IL-23表达下调, 而IL-23在Th17细胞的维持分化方面有重要作用, 其受体的减

少可以使其分化受抑。IFN- $\beta$ -1 $\alpha$ 对Th17细胞也有抑制作用, 其可以作用于树突状细胞, 通过使STAT3磷酸化而介导IL-1 $\beta$ 和IL-23在树突状细胞中合成减少, 同时通过磷酸化STAT1而使IL-27p28表达上调<sup>[32]</sup>。而IL-27合成增多, 前面已经叙述, 可以抑制初始T细胞向Th17的分化。

## 2 Th17细胞及IL-17的作用

传统观点认为, IBD的发生是由于Th1/Th2细胞失衡。CD是由Th1细胞产生TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 和IL-12细胞因子介导发生, UC是由Th2细胞介导发生。最近研究报道Th17细胞在慢性炎症性肠病中有重要作用。对动物模型和IBD患者的研究中发现, Th17细胞数量及其分泌的细胞因子的量, 相比正常肠黏膜, 明显增加<sup>[33,34]</sup>, 提示Th17细胞对IBD的发生发展有重要作用。

IL-17A是一种重要的炎性介质, 正常肠道黏膜中可以检测到一定数量IL-17A的表达, 但是在IBD患者的肠道黏膜中IL-17A mRNA的表达水平相比正常要高出许多。IL-17受体(IL-17R)广泛表达于多种细胞表面, IL-17A和IL-17F均可诱导多种细胞产生促炎因子和趋化因子, 如TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 趋化因子(CXCL8, CXCL1, CXCL10), 粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)粒细胞集落刺激因子(G-CSF), IL-6和金属蛋白酶(metalloproteases), 介导炎症的发生。

对动物模型的研究发现, IL-17A和IL-17F在2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS)诱导的小鼠肠病模型中有高度的致病作用。在TNBS诱导产生结肠炎的小鼠模型中, IL-17R基因敲除的小鼠, 相比正常未敲除的对照组, 肠道的炎症减轻<sup>[35]</sup>。除此之外, 敲除IL-17F基因的小鼠可以免遭右旋葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导产生肠炎, 给予IL-17F则加剧疾病的进展<sup>[36]</sup>。提示IL-17A和IL-17F在IBD中有促炎作用。

但有研究发现, 出了促炎作用以外, IL-17可能还具有抑制炎症的效应。Awasthi等<sup>[37]</sup>发现, IL-17A可以直接抑制Th1细胞从而抑制了肠道炎症的发生。Ogawa等<sup>[38]</sup>的研究也发现, 给予抗IL-17A单克隆抗体反而加剧了DSS诱导的结肠炎反应。这两个实验从另一方面提示了IL-17A的作用并不只是促进炎症的发生, 可能具有抗炎和促炎双重作用。除介导炎症反应外, IL-17A还可以提高肠道上皮防御功能和上调抗菌肽的表达。以上的结果说明, 对于IL-17类细胞因子,

## ■相关报道

国内外多项研究报道, Th17细胞可以产生IL-17类细胞因子, 动物实验证实这类细胞因子可以促进肠道炎症的发生和发展。在对人类的病变部位检测也发现, Th17细胞数量和其分泌的细胞因子的量也有所增加。同时也有研究提示共生菌群和炎症的发生发展有密切关系, 但尚不确切。



#### ■创新盘点

本文着重介绍了Th17细胞功能以及同炎症性肠病发生和发展的关系,并且介绍了肠道中某些共生菌对T细胞的分化有着重要的影响,可能导致肠道T细胞亚群的比例失调而导致炎症发生.通过诱导肠道共生菌群的变化或许能成为一种有前景的治疗新途径.

其功能和效应并不仅仅局限于一个方面,对其生理功能和致病作用的研究,可能将更有利于我们理解IBD的发病机制.

总的来说,IL-17A和IL-17F能使肠道产生持续性的炎症是由于其产生了一系列的促炎的细胞因子和趋化因子.Th17细胞产生的细胞因子IL-17A和IL-17F作用于肠道内皮细胞IL-17受体,使其产生多种促炎效应介质,引起肠道炎症的发生.但也有研究表明,肠道内皮细胞不仅仅表达IL-17受体,还表达IL-22, IL-26等细胞因子受体<sup>[39]</sup>,其中有促炎因子受体,也有抑制炎症因子受体,因而,肠道炎症的发生并不是由于单一的细胞因子而引起,多种细胞因子之间的相互作用的失衡,导致了肠道免疫微环境失衡,最后引起了疾病的发生.

### 3 肠道共生菌群和Th17的联系

人体肠道中有大量的细菌,包括正常菌群和一些暂住菌群.目前研究提示,肠道炎症的发生,同肠道内细菌和细菌产物有着密切的关系.基因多态性导致某些个体易受细菌及其产物的影响而导致自身免疫的发生.虽然目前的资料无法证明某一种细菌的特异性感染而导致IBD的发生,但有实验发现某些微生物的感染可以缓解期IBD复发.提示肠道内微生物环境在IBD的发生发展中起着一定的作用.

肠道中某些共生菌对T细胞的分化有着重要的影响,可能导致肠道T细胞亚群比例失调而导致炎症的发生.分节丝状杆菌(segmented filamentous bacterium, SFB)是肠道中一个共生菌,定居于回肠末端并与肠上皮细胞紧密黏附.有研究发现, SFB存在时,可使Th17细胞在相应部位的肠黏膜固有层的数量增多,两者之间存在对应关系.实验证实,无菌小鼠的肠道中缺乏Th17细胞,在定植了SFB之后,有大量的Th17细胞出现,提高了小鼠对啮齿枸橼酸杆菌(*C. rodentium*)的抵抗力<sup>[40]</sup>.也有报道表明,在无菌小鼠肠道内定植SFB之后,导致了多种CD4<sup>+</sup>T细胞的出现,包括Th1, Th17和Treg<sup>[41]</sup>.以上两个研究的差异可能是由于菌株的差异所造成.于是, Salzman等<sup>[42]</sup>将人 $\alpha$ -防御素通过基因工程使其在小鼠肠潘氏细胞(paneth cells)中表达,结果发现肠道中SFB和Th17细胞在黏膜固有层中的数量均有所减少,但是对于Th1细胞却没有明显影响.以上结果说明, SFB能加强肠黏膜的防御屏障功能,在调节效应T细胞分化中也有着一定的

作用,但是是否肠道共生菌群能诱导Th17形成从而引发炎症,还不明确.因而,肠道细菌微环境在对IBD的形成可具有一定作用,但作用多大和具体机制仍不清楚.目前存在争议的是菌体或细菌产物与肠黏膜系统作用,直接诱发了肠道炎症的产生;还是细菌出现于肠道炎症改变之后,然后侵入病变组织,使得病变加重,仍需进一步明确.

正常情况下,宿主对肠道内共生菌群耐受. IBD的发生,与宿主免疫功能异常,对肠道内正常菌群失去免疫耐受有关系.将处于活动期的IBD患者肠黏膜固有层的单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)同自身细菌的裂解产物共育,可诱导其产生大量细胞因子,并且诱导其增殖,而正常人无此反应<sup>[43]</sup>.提示IBD中,自身正常菌群的耐受被打破.耐受被打破后,是否诱导Th17细胞分化及功能的变化,还未清楚.目前的试验以及临床研究显示,在遗传易感性的基础上,细菌诱发黏膜免疫缺陷,自身耐受紊乱,导致了肠道炎症的发生.

### 4 结论

目前的研究提示,作为一个新发现的细胞亚群, Th17细胞在自身免疫的发生和病原防御中都具有重要作用.但是对其作用规律,其分泌的细胞因子(IL-17A等)的效应机制,与其他CD4<sup>+</sup>T细胞亚群,尤其是与Th1细胞亚群在炎症中的关系,仍未完全清楚.有研究发现,敲除T-bet及STAT-4的小鼠, Th1分化出现障碍,此时Th17细胞大量表达,但是这类小鼠却表现出对实验性EAE的抵抗<sup>[44,45]</sup>,因而提示在自身免疫中, Th17并不能够单独致病,其中还需要Th1的参与.除IBD外, Th17细胞还是多种自身免疫性疾病的效应细胞<sup>[46-50]</sup>.提示可以通过诱导Th17免疫耐受来治疗IBD以及其他自身免疫疾病.

肠道内共生细菌在IBD中作用以及同Th17细胞是否存在关系?从目前的实验研究结果来看, IBD的发病,既与正常共生菌群存在联系,又同个体的遗传易感性有关.目前大部分的关于IBD和共生菌的研究都发现,相比健康对照组, IBD组的肠道内菌群多数不正常.并且肠道内菌群的改变可以导致Th17淋巴细胞数量上的变化,而目前Th17又被认为与IBD的发生有着密切联系.明确肠道菌群与Th17细胞的关系在IBD发病机制中的作用,可能为治疗IBD提供一个新的思路.

## 5 参考文献

- 1 Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, Wang JS, Fei K. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5784-5788
- 2 Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514-521
- 3 Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-793
- 4 Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007; 369: 1641-1657
- 5 Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101: 455-458
- 6 Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6: 1133-1141
- 7 Reiner SL. Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 2007; 129: 33-36
- 8 Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-234
- 9 Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 2008; 9: 641-649
- 10 Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008; 454: 350-352
- 11 Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008; 9: 650-657
- 12 Hirota K, Martin B, Veldhoen M. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol* 2010; 32: 3-16
- 13 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-238
- 14 Das J, Ren G, Zhang L, Roberts AI, Zhao X, Bothwell AL, Van Kaer L, Shi Y, Das G. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J Exp Med* 2009; 206: 2407-2416
- 15 Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, Liotta F, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009; 39: 207-215
- 16 Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 639-646
- 17 Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010; 467: 967-971
- 18 Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; 204: 1849-1861
- 19 Bending D, De la Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, Cooke A. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 565-572
- 20 Hegazy AN, Peine M, Helmstetter C, Panse I, Fröhlich A, Berghaler A, Flatz L, Pinschewer DD, Radbruch A, Löhning M. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)Tbet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 2010; 32: 116-128
- 21 O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, Wraith DC, Anderton SM. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008; 181: 3750-3754
- 22 Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Rodolico G, Querci V, Abbate G, Angeli R, Berrino L, Fambrini M, Caproni M, Tonelli F, Lazzeri E, Parronchi P, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008; 205: 1903-1916
- 23 Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28: 454-467
- 24 Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 2009; 21: 489-498
- 25 Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8: 967-974
- 26 Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008; 28: 29-39
- 27 Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007; 448: 480-483
- 28 Monteleone G, Pallone F, Macdonald TT. Interleukin-21 (IL-21)-mediated pathways in T cell-mediated disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20: 185-191
- 29 Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, Blumenschein WM, McClanahan T, Brombacher F, Hurst SD, Kastelein RA, Cua DJ. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2007; 204: 161-170
- 30 Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, Ghilardi N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by

## ■同行评价

本文从肠黏膜生物屏障、免疫屏障和机械屏障等方面,对嗜酸乳杆菌对感染人轮状病毒乳鼠肠黏膜的保护作用进行了探讨,为嗜酸乳杆菌的进一步临床应用奠定了基础,有一定的实际意义。

- suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2006; 7: 929-936
- 31 Gocke AR, Cravens PD, Ben LH, Hussain RZ, Northrop SC, Racke MK, Lovett-Racke AE. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol* 2007; 178: 1341-1348
- 32 Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S. IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol* 2009; 183: 5418-5427
- 33 Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Schmechel S, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Lohse P, Brand S. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 437-445
- 34 Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 341-352
- 35 Leppkes M, Becker C, Ivanov II, Hirth S, Wirtz S, Neufert C, Pouly S, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Becher B, Littman DR, Neurath MF. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 2009; 136: 257-267
- 36 Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Iwakura Y, Okanoue T, Yoshikawa T, Kataoka K, Mazda O. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 12-16
- 37 Awasthi A, Kuchroo VK. IL-17A directly inhibits TH1 cells and thereby suppresses development of intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009; 10: 568-570
- 38 Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol* 2004; 110: 55-62
- 39 Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, De Toni EN, Göke B, Diepolder HM, Auernhammer CJ, Brand S. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 2009; 58: 1207-1217
- 40 Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009; 139: 485-498
- 41 Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, Rochet V, Pisi A, De Paepe M, Brandi G, Eberl G, Snel J, Kelly D, Cerf-Bensussan N. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009; 31: 677-689
- 42 Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjöberg J, Amir E, Teggatz P, Barman M, Hayward M, Eastwood D, Stoel M, Zhou Y, Sodergren E, Weinstock GM, Bevins CL, Williams CB, Bos NA. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* 2010; 11: 76-83
- 43 Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 448-455
- 44 Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100: 655-669
- 45 Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2004; 200: 79-87
- 46 Ferraccioli G, Zizzo G. The potential role of Th17 in mediating the transition from acute to chronic autoimmune inflammation: rheumatoid arthritis as a model. *Discov Med* 2011; 11: 413-424
- 47 Dolff S, Quandt D, Wilde B, Feldkamp T, Hua F, Cai X, Specker C, Kribben A, Kallenberg CG, Witke O. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R150
- 48 Wang JD, Chang TK, Lin HK, Huang FL, Wang CJ, Lee HJ. Reduced expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and correlated elevation of interleukin-17 and interferon- $\gamma$  in pediatric patients with chronic primary immune thrombocytopenia (ITP). *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 636-640
- 49 Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. Th subset balance in lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 980286
- 50 Lee JJ, Chang YL, Lai WL, Ko JY, Kuo MY, Chiang CP, Azuma M, Chen CW, Chia JS. Increased prevalence of interleukin-17-producing CD4(+) tumor infiltrating lymphocytes in human oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011; 33: 1301-1308

编辑 何基才 电编 何基才



# 沉默CXCR4基因对食管鳞癌EC-9706细胞中MMP-9基因表达的影响

刘剑, 王峰, 朱利楠, 何炜, 王留兴, 樊青霞

刘剑, 王峰, 朱利楠, 何炜, 王留兴, 樊青霞, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052

刘剑, 在读博士, 主要从事肿瘤的生物学治疗的研究.

河南省科技厅科技攻关基金资助项目, No. 72102310054

作者贡献分布: 此课题由樊青霞与刘剑设计; 研究过程由刘剑、王峰及朱利楠操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王峰、王留兴及樊青霞提供; 数据分析由何炜完成; 本论文写作由刘剑完成.

通讯作者: 樊青霞, 教授, 主任医师, 博士生导师, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院肿瘤科. fqx2243@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2011-06-24 修回日期: 2011-08-27

接受日期: 2011-10-06 在线出版日期: 2011-10-08

## SiRNA-mediated silencing of the CXCR4 gene down-regulates MMP-9 expression in EC-9706 cells

Jian Liu, Feng Wang, Li-Nan Zhu, Wei He, Liu-Xing Wang, Qing-Xia Fan

Jian Liu, Feng Wang, Li-Nan Zhu, Wei He, Liu-Xing Wang, Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Foundation of Science and Technology Department of Henan Province, No. 7210231005

Correspondence to: Qing-Xia Fan, Professor, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. fqx2243@yahoo.com.cn

Received: 2011-06-24 Revised: 2011-08-27

Accepted: 2011-10-06 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of small interfering RNA (siRNA)-mediated blockade of CXCR4 signaling on the expression of MMP-9 in human esophageal carcinoma cell line EC9706 and to provide an experimental foundation for further elucidating the role of CXCR4 in metastasis and invasion of esophageal carcinoma (ESCC).

**METHODS:** Two siRNAs targeting the CXCR4 gene and one fluorescence-labeled negative control siRNA were chemically synthesized and transfected into EC9706 cells. Non-transfected EC9706 cells were used as blank controls. The transfection efficiency was evaluated by fluo-

rescence microscopy. Both CXCR4 and MMP-9 mRNA and protein levels were detected by semi-quantitative RT-PCR and Western blot 48 h after transfection. Boyden chamber assay was used to evaluate the invasion capability of cells in vitro and MTT assay was used to evaluate cell growth.

**RESULTS:** The two siRNAs targeting the CXCR4 gene efficiently suppressed the expression of CXCR4 in EC9706 cells at both mRNA and protein levels compared to negative and blank controls (all  $P < 0.05$ ). The expression of MMP-9 mRNA and protein in EC9706 cells transfected with the two siRNAs targeting the CXCR4 gene was also suppressed significantly compared to the two control groups (all  $P < 0.05$ ). Boyden chamber assay results showed that the number of cells that have passed through the membrane were decreased in EC-9706 cells transfected with two CXCR4-specific siRNAs compared to the two control groups (both  $P < 0.05$ ). Transfection of CXCR4-specific siRNAs greatly decreased the growth of EC9-706 cells compared to control cells (both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** CXCR4 may play a role in the metastasis and invasion of ESCC possibly by controlling the expression of MMP-9. CXCR4 may be a potentially valuable therapeutic target for ESCC.

**Key Words:** Esophageal carcinoma; CXC chemokine receptor 4; Matrix metalloproteinase-9; Gene regulation

Liu J, Wang F, Zhu LN, He W, Wang LX, Fan QX. SiRNA-mediated silencing of the CXCR4 gene down-regulates MMP-9 expression in EC-9706 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2913-2918

## 摘要

**目的:** 探讨在食管鳞癌EC-9706细胞中沉默CXCR4基因对MMP-9基因表达的影响, 为阐明CXCR4基因在食管鳞癌侵袭转移中的作用提供实验依据.

## ■背景资料

食管癌是我国特别是河南省最常见的肿瘤之一, 在郑州, 食管癌发生率居全国首位, 虽然手术和放化疗可以挽救一些患者的生命, 但转移的高发却使食管癌的治愈率不理想, 了解其转移的机制就至关重要, 本文就此做了相关研究.

## ■同行评议者

王阔, 教授, 中国人民解放军第三军医大学第三附属医院; 葛海燕, 教授, 同济大学附属东方医院普通外科

## ■研究前沿

本文研究把重点放在CXCR4基因上,对此基因的研究早期主要集中于艾滋病,近年来发现他不仅在艾滋病中具有研究意义,在癌症中特别是在癌症的早期侵袭转移中的研究意义同样重要,因此本文就把重点放在CXCR4在癌症的早期侵袭转移中的作用,把他和与侵袭转移相关的基因MMP-9结合研究是本文的一个重点,下一步作者希望在裸鼠体内再进一步研究。

**方法:** 化学合成2条靶向CXCR4基因的siRNA1和siRNA2,同时设立荧光标记阴性对照和空白对照. 脂质体法转染入EC-9706细胞,荧光显微镜下观察转染效率. 转染48 h后,半定量RT-PCR检测各组细胞CXCR4和MMP-9基因mRNA表达的变化, Western blot检测各组细胞CXCR4和MMP-9基因蛋白表达的变化, 侵袭小室检测各组细胞穿膜细胞数的变化, MTT检测各组细胞的A值.

**结果:** 与阴性对照和空白对照相比, 转染CXCR4 siRNA1和siRNA2组细胞CXCR4 mRNA和蛋白的表达明显降低, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ ); 同时与阴性对照和空白对照相比, 转染CXCR4 siRNA1和siRNA2组细胞MMP-9 mRNA和蛋白的表达同样明显降低, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ ); 转染CXCR4 siRNA1和siRNA2组细胞穿膜细胞数与阴性对照和空白对照相比明显下降, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ ); MTT结果显示转染CXCR4 siRNA1和siRNA2组细胞增殖能力下降, 与阴性对照和空白对照相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ ).

**结论:** 在食管鳞癌EC9706中存在CXCR4基因对MMP-9基因的调控作用, CXCR4基因有可能通过调控MMP-9基因的表达参与食管鳞癌细胞的浸润转移, CXCR4有可能成为食管鳞癌基因治疗的有效靶点.

**关键词:** 食管鳞癌; CXCR4趋化因子受体4; 基质金属蛋白酶-9; 基因调控

刘剑, 王峰, 朱利楠, 何伟, 王留兴, 樊青霞. 沉默CXCR4基因对食管鳞癌EC-9706细胞中MMP-9基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2913-2918  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2913.asp>

## 0 引言

食管鳞癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 由于其早期的浸润转移, 预后不佳. 自Muller等<sup>[1]</sup>首次报道趋化因子受体与肿瘤浸润转移的关系后, 越来越多的趋化因子受体在随后的研究中被发现与肿瘤的发生、发展关系密切. 其中CXC趋化因子受体4(CXC chemokine receptor4, CXCR4)及其配体基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor 1, SDF-1)<sup>[2]</sup>组成的生物轴在至少26中不同类型的肿瘤细胞包括食管鳞癌细胞中表达, 是表达最为广泛的趋化因子受体, 干扰该生物轴的作用可以影响肿瘤细胞的浸润

转移<sup>[3]</sup>. 大量研究证明基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在食管鳞癌中高表达, 且与食管鳞癌早期的浸润转移密切相关<sup>[4,5]</sup>. 本文通过RNAi技术干扰食管鳞癌细胞EC-9706中CXCR4基因的表达, 观察其对MMP-9基因表达的影响, 同时研究其对食管鳞癌细胞EC-9706浸润转移和增殖能力的影响, 为进一步阐明CXCR4在食管鳞癌浸润转移中的作用机制提供理论依据, 为食管鳞癌的基因治疗提供有效靶点.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 食管鳞癌EC-9706细胞、NIH3T3细胞由郑州大学基础医学院保存提供; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 1640培养液购自Gibco公司; 脂质体转染试剂Lipofectamine<sup>TM</sup>2000及RNA提取试剂TRIzol均购自Invitrogen公司; CXCR4兔抗人多克隆抗体、MMP-9多克隆抗体、 $\beta$ -actin兔抗人多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体均购自北京中杉金桥生物技术公司; RT-PCR一步法试剂盒购自大连宝生物工程有有限公司; 胰蛋白酶、MTT均购自美国Sigma公司; Boyden chamber购自江苏海门麒麟医用仪器厂; Matrigel胶购自北京大学医学部细胞生物学实验室; 其他常规试剂均为进口分装或国产分析纯.

### 1.2 方法

**1.2.1 siRNA靶序列的选择及合成:** 根据Gene-Bank中CXCR4基因的序列设计两对靶向CXCR4的siRNA序列, 采用BLAST同源检索确认与人类基因无明显同源性. 分别为: siRNA1序列为: 5'-GCGGCAGCAGGUAGCAAAGdTdT-3'; siRNA2序列为: 5'-CUGGGCAGUUGAUGCCGUGdTdT-3'. 均由郑州创生生物公司合成, PAGE纯化. 同时设计荧光标记的对照组siRNA(与人类基因无同源性).

**1.2.2 细胞培养与转染:** 食管鳞癌EC-9706细胞在含有100 mL/L胎牛血清的1640培养基中, 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养, 细胞培养2 d即更换1次培养液. 转染前24 h, 将EC-9706细胞用胰蛋白酶消化、传代至24孔培养板, 每孔 $2 \times 10^5$ 细胞, 使用不含抗生素1640培养基培养. 实验分为4组: A组为空白对照组, B组为转染阴性siRNA组, C组为转染siRNA1组, D组为转染siRNA2组; 每组设4个复孔, 实验重复3次. EC-9706细胞培养6 h后, 转为全培养液培养, 继续培养48 h, 收获细胞, 进行后续试验.

**1.2.3 半定量RT-PCR检测各组细胞CXCR4和**

MMP-9基因表达变化: 用TRIzol试剂提取细胞总RNA, 样品经琼脂糖凝胶电泳. 根据RT-PCR试剂盒说明书, 将CXCR4与 $\beta$ -actin、MMP-9与 $\beta$ -actin分别进行同管扩增. CXCR4引物为: 上游序列: TCTTCTTAAGTGGCATTGTG, 下游序列: AGAGGTTGACTGTGTAGATG, 扩增片段长度为219 bp; MMP-9引物为: 上游序列: GGATGGAGGTGATATGTGAA, 下游序列: GCAGGCATAAGAGGAGTG, 扩增片段长度为: 121 bp;  $\beta$ -actin引物为: 上游序列: GGCAGCAGGATGAGATTC; 下游序列: GGAGTCTGTAGTCTTCACC, 扩增片段长度为: 391 bp. 引物由赛百胜生物有限公司设计合成. RT-PCR反应体系总体积为25  $\mu$ L, 加入0.5  $\mu$ L的总RNA, 上、下游引物各0.5  $\mu$ L. 50  $^{\circ}$ C 30 min进行逆转录反应, 94  $^{\circ}$ C 2 min使RNase失活, 然后94  $^{\circ}$ C变性30 s, 56  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸1 min, 共进行32个循环, 最后72  $^{\circ}$ C延伸10 min. 取PCR产物5  $\mu$ L行1.2%琼脂糖凝胶电泳, 使用SYNGENE凝胶分析系统软件扫描各条带灰度值, 分析CXCR4和MMP-9基因在各组细胞中的相对表达水平.

1.2.4 Western blot检测各组细胞CXCR4和MMP-9蛋白表达变化: 按照细胞蛋白提取试剂盒说明书, 提取各组细胞总蛋白. 参考《分子克隆操作指南》Western blot操作步骤, 取各组细胞总蛋白各100  $\mu$ g, 分别与2 $\times$ SDS缓冲液按1:1混合, 95  $^{\circ}$ C加热10 min, 与预染的蛋白质分子量标准一起上样, 经12%SDS-PAGE分离, 电泳结束后根据蛋白Marker指示的位置切下含有目的带的胶条, 电转到硝酸纤维素膜上, 用丽春红染色, 确定蛋白是否转移成功. 同时每次实验均检测 $\beta$ -actin(42 kDa)的表达, 以作为上样标准. 5%的脱脂奶粉TBST溶液封闭, 4  $^{\circ}$ C过夜, 加一抗(CXCR4抗体按1:400稀释; MMP-9抗体按1:600稀释)室温孵育2 h, TBST溶液洗涤10 min $\times$ 3次, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:5000)室温下振荡2 h, TBST溶液洗涤10 min $\times$ 3次, ECL化学发光剂于暗室中曝光和显影. 测定蛋白条带的A值, 以表示蛋白的相对表达水平.

1.2.5 Boyden小室检测体外侵袭力: 参照Albin等<sup>[6]</sup>的研究方法并予以改良, Matrigel胶用4  $^{\circ}$ C无血清1640稀释, 均匀铺盖于8  $\mu$ m的聚碳酸酯膜上, 37  $^{\circ}$ C放置30 min使其形成凝胶状, 紫外线照射30 min杀菌. 下室加200  $\mu$ L NIH3T3细胞无血清培养24 h条件培养基作趋化因子, 加盖上述制备好的人工基质胶膜, 上室内滴加浓度为 $5\times 10^5$ 个/mL

的单细胞悬液500  $\mu$ L, 常规培养24 h, 取出小室, 吸弃上室内的细胞悬液, 以棉签小心擦净滤膜上室面的细胞和胶, 950 mL/L乙醇固定, 常规HE染色后中性树脂固封于载玻片上. 用倒置显微镜( $\times 400$ )计数滤膜上5个视野的穿过孔径的细胞数, 取均数. 每株细胞设3个平行样本.

1.2.6 MTT法检测细胞增殖能力: 分别收集处于对数生长期的各组细胞, 于96孔培养板中接种200  $\mu$ L细胞悬液(约5000个细胞/孔); 37  $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱及饱和湿度条件下培养48 h, 加入5 mg/L的MTT溶液20  $\mu$ L, 继续培养4 h; 吸去上清后每孔加入200  $\mu$ L DMSO, 在96孔酶标仪上读取A<sub>570 nm</sub>值. 每组实验至少重复3次, 每次做5个平行孔, 按照公式计算生长抑制率. 抑制率(%) = (1-实验组平均A值/对照组平均A值) $\times 100\%$ .

统计学处理 所有数据采用SPSS11.5软件进行统计处理, 两组均数的比较采用t检验, 检验水准取 $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

2.1 转染效率检测 转染带绿色荧光的阴性对照siRNA后48 h, 随机在荧光显微镜下选取5个视野, 发现带绿色荧光的细胞占有细胞的比例为77.6% $\pm$ 2.33%(图1), 而空白对照组观察不到明显的绿色荧光细胞, 显示转染效率较高.

2.2 CXCR4 siRNA对CXCR4和MMP-9 mRNA表达的影响 半定量RT-PCR检测结果显示, siRNA转染EC-9706细胞48 h后, 与空白组(0.81 $\pm$ 0.03)和转染阴性对照siRNA组(0.76 $\pm$ 0.02)相比, 转染CXCR4 siRNA1组(0.42 $\pm$ 0.09)和转染CXCR4 siRNA2组(0.47 $\pm$ 0.05)细胞CXCR4 mRNA的表达明显下降(图2), 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ). 转染CXCR4 siRNA1组和转染CXCR4 siRNA2组细胞MMP-9 mRNA的表达同样明显下降, 分别为(0.51 $\pm$ 0.07)和(0.55 $\pm$ 0.03)(图3), 与空白组(0.87 $\pm$ 0.04)和转染阴性对照siRNA组(0.90 $\pm$ 0.10)相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ).

2.3 CXCR4 siRNA对CXCR4和MMP-9蛋白表达的影响 Western blot检测结果显示, siRNA转染EC-9706细胞48 h后, 与空白组(0.66 $\pm$ 0.01)和转染阴性对照siRNA组(0.61 $\pm$ 0.07)相比, 转染CXCR4 siRNA1组(0.24 $\pm$ 0.03)和转染CXCR4 siRNA2(0.30 $\pm$ 0.04)组细胞CXCR4蛋白的表达明显下降, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ). 转染CXCR4 siRNA1组和转染CXCR4 siRNA2组细胞MMP-9蛋白的表达同样明显下降, 分别为(0.33

### ■创新盘点

虽然有相关文章研究CXCR4在食管癌发生、发展侵袭转移中的作用, MMP-9在食管癌侵袭转移中的重要作用, 但本文将二者联系起来, 研究表明了CXCR4通过何种途径, 如何参与食管癌发生、发展侵袭转移.



### 应用要点

本研究表明在食管鳞癌EC-9706细胞中阻断CXCR4基因可以下调MMP-9基因的表达式,初步证实了在EC-9706细胞中CXCR4在MMP-9的转录调控中起重要作用,CXCR4可能通过上调MMP-9的表达式在食管鳞癌的侵袭转移中发挥重要作用,CXCR4可作为食管鳞癌基因治疗的一个有效靶点。

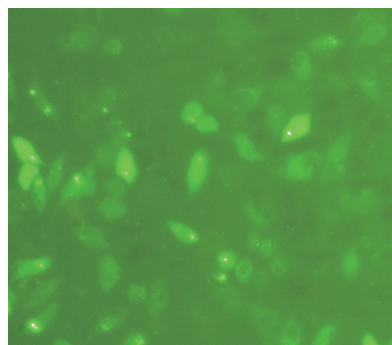


图1 阴性对照siRNA转染效率。

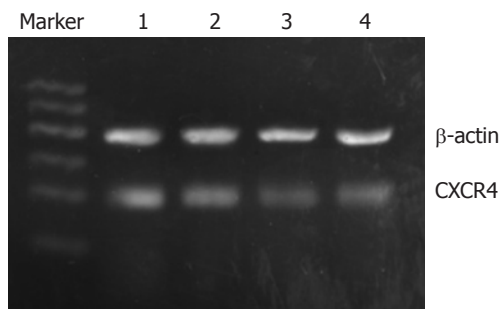


图2 CXCR4 siRNA转染后半定量RT-PCR检测各组CXCR4 mRNA表达结果。1: 空白对照组; 2: 转染阴性siRNA组; 3: 转染siRNA1组; 4: 转染siRNA2组。

$\pm 0.10$ )和 $(0.37 \pm 0.05)$ , 与空白组 $(0.69 \pm 0.09)$ 和转染阴性对照siRNA组 $(0.71 \pm 0.02)$ 相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ , 图4)。

**2.4 CXCR4 siRNA对食管鳞癌细胞EC-9706侵袭能力的影响** 侵袭小室结果显示, 转染CXCR4 siRNA1和转染CXCR4 siRNA2组的EC-9706细胞穿透Matrigal基底膜的细胞数分别为 $(58.30 \pm 13.44)$ 和 $(62.80 \pm 11.20)$ , 显著低于空白组 $(89.00 \pm 14.93)$ 和转染阴性对照siRNA组 $(84.60 \pm 16.41)$ 的穿膜细胞数, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与空白组相比, 转染CXCR4 siRNA1和转染CXCR4 siRNA2组的EC-9706细胞侵袭抑制率分别达到34.8%和30.3%, 说明两对CXCR4 siRNA均能显著抑制体外培养的EC-9706细胞的侵袭转移能力。

**2.5 CXCR4 siRNA对食管鳞癌细胞EC-9706增殖能力的影响** 转染CXCR4 siRNA1和转染CXCR4 siRNA2组的EC-9706在转染48 h后细胞的增殖能力与空白组合转染阴性对照siRNA组相比明显降低, 分别为(转染CXCR4 siRNA1  $0.480 \pm 0.013$ , 转染siRNA2  $0.493 \pm 0.009$ , 空白组  $0.580 \pm 0.017$ 合转染阴性siRNA组 $0.573 \pm 0.008$ ), 可见细胞生长受到明显抑制( $P < 0.05$ ), 表明CXCR4 siRNA可能同时具有抑制细胞增殖的能力, CXCR4基因在食管鳞癌细胞生长过程中同样起

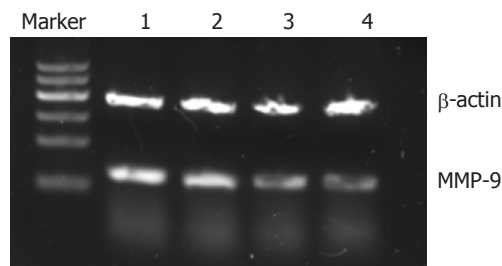


图3 CXCR4 siRNA转染后半定量RT-PCR检测各组MMP-9 mRNA表达结果。1: 空白对照组; 2: 转染阴性siRNA组; 3: 转染siRNA1组; 4: 转染siRNA2组。

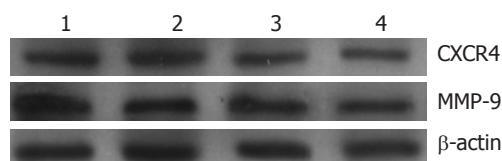


图4 CXCR4 siRNA转染后半定量RT-PCR检测各组CXCR4和MMP-9蛋白表达结果。1: 空白对照组; 2: 转染阴性siRNA组; 3: 转染siRNA1组; 4: 转染siRNA2组。

到重要作用。

### 3 讨论

趋化因子与趋化因子受体的相互作用能诱导靶细胞趋化性的迁移及细胞骨架的重排, 增强靶细胞与内皮细胞的黏附能力, 广泛参与细胞的生长、发育、分化、凋亡等多种生理功能<sup>[7-9]</sup>。趋化因子在肿瘤的生物行为中表现出双向的调节作用。一方面, 趋化因子能通过刺激肿瘤细胞生长, 趋化肿瘤细胞以及促进血管生长和消化细胞外基质的间接作用促进肿瘤的生长和转移<sup>[10,11]</sup>; 另一方面则可以通过抑制血管生成、趋化免疫活性细胞来抵抗肿瘤的生长和转移<sup>[12,13]</sup>。并且, 特定的肿瘤表现出特定的转移方式, 转移的靶器官也不同<sup>[14]</sup>。

趋化因子CXCL12与其特异性受体CXCR4所构成的CXCL12-CXCR4生物学轴在多种肿瘤的播散和器官特异性转移中发挥着重要的作用<sup>[15,16]</sup>。SDF-1是由骨髓基质细胞及其他相关的间皮细胞和上皮细胞分泌的一种趋化蛋白, 系统命名为CXCL12(CXC chemokine ligand 12)。CXCR4是目前已知SDF-1的唯一受体, 与其具有高度亲和力<sup>[17-19]</sup>。自2001年Muller报道了CXCR4及其配体共同决定了乳腺癌的转移模式后<sup>[1]</sup>, 研究不断表明CXCR4也在前列腺癌、B细胞淋巴瘤、星形胶质瘤及慢性淋巴细胞白血病的细胞系等多种肿瘤中表达, 因此CXCR4的作用可能并不限于乳腺癌<sup>[20-22]</sup>。

食管鳞癌是人类最常见的消化系恶性肿瘤之一, 其生物学特征为易复发和早期的侵袭转移, 而大部分的复发是由于癌细胞的侵袭造成的, 因此食管鳞癌预后差, 死亡率高. 因此控制癌细胞的转移已成为食管鳞癌研究中最具意义的课题. 近年来的研究表明在食管鳞癌中存在CXCR4的高表达, 且CXCR4与食管鳞癌的浸润转移关系密切<sup>[23,24]</sup>. 本实验设计合成两对针对CXCR4基因不同位点的siRNA序列转染入食管鳞癌细胞EC-9706中, 侵袭小室实验结果显示, 转染siRNA组的EC9706细胞侵袭转移能力明显下降, 与空白组相比分别下降34.8%和30.3%, 差异具有统计学意义. 说明在食管鳞癌细胞EC-9706中抑制CXCR4基因的表达可有效抑制细胞的侵袭转移能力. MTT试验进一步表明在EC-9706细胞中抑制CXCR4基因的表达同样可以抑制细胞的增殖. 说明CXCR4基因在食管鳞癌的发生、发展中发挥重要作用. 不过CXCR4如何参与食管鳞癌的浸润转移目前报道甚少<sup>[25]</sup>.

肿瘤的浸润和转移是一个连续的多步骤过程, 其中细胞基底膜的降解是肿瘤浸润、转移过程中必不可缺的环节<sup>[26]</sup>. MMPs是肿瘤细胞分泌的最主要的降解基底膜的蛋白酶, 因此MMPs的表达与肿瘤侵袭和转移也密切相关<sup>[27]</sup>. MMP-9是MMPs家族中相对分子量最大的酶, 他可以降解所有细胞外基质, 在肿瘤的侵袭、转移过程中发挥重要作用. 在正常生理条件下, MMP-9的表达受到严格的调控并保持平衡状态. 但在恶性肿瘤中, MMP-9的表达增强, 降解细胞外基质的能力增强, 引起浸润和转移, 另一方面MMP-9还可通过参与肿瘤血管新生促进肿瘤的生长和扩散<sup>[28,29]</sup>.

RNA干扰技术是生物进化过程中基因组水平上的免疫监控机制, 作为一种特异性基因沉默技术, 越来越多地在某些疾病的发病机制和治疗等研究中发挥着重要作用<sup>[30]</sup>. 本研究中设计了2对针对CXCR4基因的siRNA片段, 半定量RT-PCR和Western blot检测结果显示, 两对siRNA在食管鳞癌EC-9706细胞中对CXCR4基因和蛋白的表达均有不同程度的抑制作用, 与空白组和转染阴性siRNA组的表达均有统计学意义. 本研究同时检测了siRNA沉默CXCR4基因后, 食管鳞癌EC-9706细胞中MMP-9基因的表达变化, 结果显示, 当CXCR4基因的表达被抑制后, MMP-9的表达无论从mRNA水平或蛋白水平都明显降低, 与空白组和转染阴性siRNA组的表达均有

统计学意义, 说明MMP-9的上调机制有可能被阻断.

本研究表明在食管鳞癌EC-9706细胞中阻断CXCR4基因可以下调MMP-9基因的表达, 初步证实了在EC-9706细胞中CXCR4在MMP-9的转录调控中起重要作用, CXCR4可能通过上调MMP-9的表达在食管鳞癌的侵袭转移中发挥重要作用, CXCR4可作为食管鳞癌基因治疗的一个有效靶点.

#### 4 参考文献

- 1 Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56
- 2 Zhao BC, Zhao B, Han JG, Ma HC, Wang ZJ. Adipose-derived stem cells promote gastric cancer cell growth, migration and invasion through SDF-1/CXCR4 axis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 1382-1389
- 3 Zhao BC, Wang ZJ, Mao WZ, Ma HC, Han JG, Zhao B, Xu HM. CXCR4/SDF-1 axis is involved in lymph node metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2389-2396
- 4 周静, 谢立群, 李轩, 陈小义, 陈莉, 郑艳敏, 李飞. 蛋白酶激活受体2激动剂对食管癌EC109细胞侵袭转移的促进作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1313-1319
- 5 陈超伍, 马洪升. 基质金属蛋白酶在食管癌组织中的表达及与微量元素含量之间的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1995-2000
- 6 Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987; 47: 3239-3245
- 7 邱明远, 李健文, 郑民华. CXCR4和CXCR7在肿瘤中的研究进展. *中国癌症杂志* 2010; 20: 222-226
- 8 Yoon Y, Liang Z, Zhang X, Choe M, Zhu A, Cho HT, Shin DM, Goodman MM, Chen ZG, Shim H. CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. *Cancer Res* 2007; 67: 7518-7524
- 9 刘静, 郭华雄. 趋化因子CXCL12/CXCR4生物轴在肿瘤中的研究进展. *临床与实验病理学杂志* 2010; 26: 477-480
- 10 庞伟, 李玥明. 基质细胞衍生因子-1及其受体CXCR4对造血干细胞调控的研究进展. *武警医学院学报* 2009; 18: 78-81
- 11 Kodama J, Hasengaowa N, Kusumoto T, Hiramatsu Y. Expression of the CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in human endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28: 370-375
- 12 Xu Y, Zhang SZ, Huang PC, Chen J, Cai KR. [Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma cells]. *Ai Zheng* 2004; 23: 136-140
- 13 郑正荣, 杨春康, 戴起宝. 趋化因子受体对肿瘤生物学行为的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 513-518
- 14 Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 597-606
- 15 Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-

#### ■同行评价

本研究通过体外实验, 利用RNA干扰技术探讨了沉默CXCR4基因后食管鳞癌细胞株MMP-9 mRNA和蛋白水平表达的变化, 其所采用的实验思路及实验方法是正确的, 其结果对这一通路的认识具有比较积极意义.

- derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C987-C995
- 16 Zhang JP, Lu WG, Ye F, Chen HZ, Zhou CY, Xie X. Study on CXCR4/SDF-1 $\alpha$  axis in lymph node metastasis of cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 478-483
- 17 Burger JA, Stewart DJ, Wald O, Peled A. Potential of CXCR4 antagonists for the treatment of metastatic lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011; 11: 621-630
- 18 Tseng D, Vasquez-Medrano DA, Brown JM. Targeting SDF-1/CXCR4 to inhibit tumour vasculature for treatment of glioblastomas. *Br J Cancer* 2011; 104: 1805-1809
- 19 Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, Minami T, Nakayama T, Sakurai H, Takahashi Y, Yoshie O, Saiki I. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 2181-2187
- 20 陈友权, 于燕妮. 趋化因子与肿瘤浸润、转移的研究进展. *贵州医药* 2010; 34: 944-948
- 21 卢春来, 葛棣. CXCR4在肿瘤中的研究进展. *复旦学报: 医学版* 2008; 35: 311-313, 318.
- 22 Lee YL, Kuo WH, Lin CW, Chen W, Cheng WE, Chen SC, Shih CM. Association of genetic polymorphisms of CXCL12/SDF1 gene and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and prognosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2011; 73: 147-152
- 23 Wang DF, Lou N, Zeng CG, Zhang X, Chen FJ. Expression of CXCL12/CXCR4 and its correlation to prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ai Zheng* 2009; 28: 154-158
- 24 Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumoto M, Okumura H, Setoyama T, Uchikado Y, Kita Y, Tamotsu K, Sakurai T, Owaki T, Aikou T. Expression of CXCL12 and its receptor CXCR4 correlates with lymph node metastasis in submucosal esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2008; 97: 433-438
- 25 杜雅冰, 樊青霞. CXCR4、MMP-2在食管鳞癌中的表达及其与淋巴结转移的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2322-2326
- 26 刘晓峰, 荀春华, 喻芳菊. 细胞黏附分子的表达与肾癌侵袭转移的关系. *检验医学* 2010; 25: 67-70
- 27 盛丽丽, 喇端端. 基质金属蛋白酶与卵巢癌侵袭转移的关系及研究进展. *诊断学理论与实践* 2011; 10: 182-185
- 28 赵毅, 王强, 邓鑫, 赵滢, 张天彪. 侵袭转移相关因子在胃肠道间质瘤中的检测及其意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 791-797
- 29 王晓兰, 李晓莉, 陈奎生. MMP-9与TIMP-1蛋白在食管鳞癌中的表达及其与肿瘤浸润、转移的关系. *医药论坛杂志* 2009; 30: 1-6
- 30 郭会灿. RNA干扰技术的基础研究与应用. *生物技术通报* 2011; 4: 66-68

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。



# ER- $\alpha$ 36对胃癌SGC7901细胞在裸鼠体内生长的影响

王绪明, 刘晶晶, 邓昊, 陈莹, 刘丽江

王绪明, 刘晶晶, 武汉大学基础医学院 湖北省武汉市 430071  
邓昊, 陈莹, 刘丽江, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室 湖北省武汉市 430056

王绪明, 在读博士, 主要从事胃癌发病机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30870981

湖北省卫生厅科研基金资助项目, No. NX200727

作者贡献分布: 此课题的设计方案及研究所用试剂由刘丽江提供; 研究过程由邓昊、王绪明、刘晶晶及陈莹操作完成; 数据分析及论文撰写由王绪明与刘丽江完成。

通讯作者: 刘丽江, 教授, 430056, 湖北省武汉市, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室. liulijiang@163.com

电话: 027-84226503

收稿日期: 2011-07-25 修回日期: 2011-09-13

接受日期: 2011-09-22 在线出版日期: 2011-10-08

## ER- $\alpha$ 36 promotes the growth of SGC-7901 cells in nude mice

Xu-Ming Wang, Jing-Jing Liu, Hao Deng, Ying Chen, Li-Jiang Liu

Xu-Ming Wang, Jing-Jing Liu, School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Hao Deng, Ying Chen, Li-Jiang Liu, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30870981; and the Science Foundation of Health Department of Hubei Province, No. NX200727

Correspondence to: Li-Jiang Liu, Professor, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China. liulijiang@163.com

Received: 2011-07-25 Revised: 2011-09-13

Accepted: 2011-09-22 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To observe the effect of ER- $\alpha$ 36 on the growth of SGC-7901 cells in nude mice.

**METHODS:** Utilizing lentivirus technology, we developed SGC7901 cell lines stably expressing ER- $\alpha$ 36 siRNA vector (SGC7901-Low36) and ER- $\alpha$ 36 expression vector (SGC7901-High36). Unmanipulated SGC7901 cells were used as controls (SGC7901-Control). These cells were subcutaneously injected into the nude mice to form SGC7901 transplantable tumors. The size and weight of the tumors were measured. Nuclear division was observed after HE staining, and the expression of Ki67 and E-cadherin was detected by immunohistochemistry.

**RESULTS:** Transplantable tumors formed in all nude mice. From day 16 to day 30, tumor size was highest in the SGC7901-High36 group, followed by the SGC7901-Control group, and the SGC7901-Low36 group had the least tumor size. There were significant differences (all  $P < 0.05$ ) in tumor size between any two groups. On day 30, tumor weight was significantly higher in the SGC7901-High36 group than in the SGC7901-Control and SGC7901-Low36 groups ( $2.58 \text{ g} \pm 0.014 \text{ g}$  vs  $1.32 \text{ g} \pm 0.0245 \text{ g}$ ,  $0.471 \text{ g} \pm 0.021 \text{ g}$ ; both  $P < 0.05$ ). The number of nuclear division phases was significantly higher in the SGC7901-High36 group than in the SGC7901-Control and SGC7901-Low36 groups ( $42.33 \pm 6.33$  vs  $28.5 \pm 0.35$ ,  $12.5 \pm 2.5$ ; both  $P < 0.05$ ). The expression of Ki67 was significantly higher in the SGC7901-High36 group than in the SGC7901-Control and SGC7901-Low36 groups ( $86.35 \pm 5.23$  vs  $65.44 \pm 4.56$ ,  $18.25 \pm 2.56$ ; both  $P < 0.05$ ). The expression of E-cadherin in tumors in the SGC7901-High36 group was hardly seen, significantly lower than that in the SGC7901-Control and SGC7901-High36 groups.

**CONCLUSION:** ER- $\alpha$ 36 may play an important role in gastric cancer cell growth and proliferation. ER- $\alpha$ 36 may target tumor cells through adhesion molecules to promote tumor invasion and metastasis.

**Key Words:** Estrogen receptor- $\alpha$ 36; Gastric Cancer; SGC7901 cells

Wang XM, Liu JJ, Deng H, Chen Y, Liu LJ. ER- $\alpha$ 36 promotes the growth of SGC-7901 cells in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2919-2924

## 摘要

**目的:** 观察ER- $\alpha$ 36分子对人胃癌细胞SGC7901在裸鼠体内生长的影响。

**方法:** 利用慢病毒转染技术构建稳定高表达和低表达ER- $\alpha$ 36分子的重组人胃癌SGC7901细胞株。实验分为空白对照组(SGC7901-Control)、ER- $\alpha$ 36低表达组(SGC7901-Low36)和ER- $\alpha$ 36高表达组(SGC7901-High36), 每组

## ■背景资料

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 总体预后不好。雌激素与雌激素受体在胃癌的发生与发展中的机制研究虽有报道, 但未取得突破性的进展。ER- $\alpha$ 36是新发现的雌激素受体 $\alpha$ 的亚型, 与经典的ER- $\alpha$ (ER- $\alpha$ 66)不同, 具有生长因子的作用, 有研究发现, 在雌激素受体阴性的乳腺癌、结肠癌等多种肿瘤中发挥重要作用。

## ■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室; 曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心



## ■ 研究前沿

胃癌与雌激素的关系研究多集中在ER- $\alpha$ 66和ER- $\beta$ , 其结果不一, 而且很难解释流行病学显示的男性胃癌比绝经前女性胃癌发病率高的现象。虽然胃癌不是传统意义上的性激素依赖肿瘤, 胃癌中ER- $\alpha$ 66(经典的ER- $\alpha$ )的表达率很低(2-28%), 所以, 对胃癌中雌激素的作用及机制长期没有受到重视。ER- $\alpha$ 36不同于经典的ER- $\alpha$ , 具有刺激细胞生长和增殖的特性, 与生长因子受体等能发生交叉对话, 对其的深入研究有助于进一步了解雌激素在胃癌发病中所扮演的角色。

各3只雄性裸鼠。将上述细胞( $5 \times 10^6$ 个/mL)接种裸鼠皮下, 建立裸鼠荷瘤模型, 连续观测30 d。采用瘤结节体积测量和称质量、瘤组织HE染色及免疫组织化学法检测Ki67指数和E-cadherin蛋白表达等方法, 鉴定各组细胞生长的情况。

**结果:** 全组实验动物均出现移植瘤。第16天开始, SGC7901-High36组裸鼠肿瘤的体积>SGC7901-Control组裸鼠肿瘤的体积>SGC7901-Low36组裸鼠肿瘤的体积, 两两之间有显著性差异( $P<0.05$ )。第30天, SGC7901-High36组肿瘤的质量( $2.58 \text{ g} \pm 0.014 \text{ g}$ ), 明显大于SGC7901-Control组( $1.32 \text{ g} \pm 0.0245 \text{ g}$ )和SGC7901-Low36组( $0.471 \text{ g} \pm 0.021 \text{ g}$ ), 两两之间有显著性差异( $P<0.05$ )。SGC7901-High36组肿瘤细胞的核分裂数( $42.33 \pm 6.33$ ), 明显高于SGC7901-Control组( $28.5 \pm 0.35$ )和SGC7901-Low36组( $12.5 \pm 2.5$ ), 两两之间有显著性差异( $P<0.05$ )。Ki67阳性细胞计数, SGC7901-High36组( $86.35 \pm 5.23$ ), 明显高于SGC7901-Control组( $65.44 \pm 4.56$ )和SGC7901-Low36组( $18.25 \pm 2.56$ ), 两两之间有显著性差异( $P<0.05$ )。SGC7901-High36组肿瘤细胞几乎不表达E-cadherin蛋白, 明显低于SGC7901-Control组和SGC7901-Low36组。

**结论:** ER- $\alpha$ 36分子在胃癌细胞的生长与增殖中具有重要作用, 并可能通过靶向肿瘤细胞的粘附分子而促进肿瘤的侵袭与转移。

**关键词:** 雌激素受体- $\alpha$ 36; 胃癌; SGC7901

王绪明, 刘晶晶, 邓昊, 陈莹, 刘丽江. ER- $\alpha$ 36对胃癌SGC7901细胞在裸鼠体内生长的影响. 世界华人消化杂志. 2011; 19(28): 2919-2924

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2919.asp>

## 0 引言

雌激素受体- $\alpha$ 36(estrogen receptor- $\alpha$ 36, ER- $\alpha$ 36)是新近发现的ER- $\alpha$ 的同源异构体, 在乳腺癌等的研究中, 已经发现其扮演重要的角色<sup>[1-3]</sup>。长期以来一直认为胃癌是非雌激素依赖的肿瘤, 但胃癌男性多于女性且在绝经后这种差别消失的流行病学特点, 一直暗示我们雌激素可能发挥重要作用。我们前期的工作<sup>[4,5]</sup>发现, 人体胃癌组织和胃癌细胞株中均有ER- $\alpha$ 36 mRNA及蛋白质的表达, 并且明显高于ER- $\alpha$ 66(经典的ER- $\alpha$ )。初步的研究发现, 在癌组织、癌旁组织及正常组织中ER- $\alpha$ 36的表达有差异, 并且与胃癌患者

的年龄、肿瘤的大小、组织学分级以及淋巴结转移相关。提示ER- $\alpha$ 36与胃癌的发生和发展可能存在一定的关联。为证实上述的推测, 我们采用慢病毒转染技术, 构建稳定高表达ER- $\alpha$ 36和低表达ER- $\alpha$ 36的SGC7901人胃腺癌细胞株, 并建立裸鼠移植瘤模型, 观察ER- $\alpha$ 36基因高表达及沉默后其移植瘤生长的情况, 进一步探讨ER- $\alpha$ 36在胃癌发病中的分子机制, 为深入研究提供理论基础和实验数据, 并为胃癌的靶向治疗提供新的思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 雄性BALB/c-nu裸鼠9只, 6-8周龄, 20-25 g, 购自湖北省实验动物研究中心, SPF环境下饲养。本文所用实验动物及所有操作经江汉大学医学院医学伦理学委员会批准, 实验操作过程符合医学伦理学要求。稳定高表达ER- $\alpha$ 36和低表达ER- $\alpha$ 36的胃癌SGC7901细胞株由本实验室构建并鉴定。胃癌细胞株SGC7901用含100 mL/L小牛血清(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco), 置于37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养, 每2-3 d换1次液。以含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基培养。兔抗人ER- $\alpha$ 36多克隆抗体由Zhaoyi Wang教授馈赠; Ki67小鼠抗人单克隆抗体及E-cadherin小鼠抗人单克隆抗体及SP试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 SGC7901荷瘤鼠模型的建立及观测:** 将裸鼠随机分为3组, 每组3只。收集处于对数生长期的SGC7901(SGC7901-Control)、ER- $\alpha$ 36低表达(SGC7901-Low36)和ER- $\alpha$ 36高表达(SGC7901-High36)细胞, 台盼蓝检测细胞活力在90%以上, 分别在每只裸鼠背部皮下接种细胞悬液1 mL( $5 \times 10^6$ 个/mL), 以皮下瘤体结节直径>0.5 cm为接种成瘤标准。出现肿瘤结节前每2 d观察1次, 肿瘤长出后每4 d测量1次, 按照公式计算肿瘤的近似体积 $V(\text{mm}^3)=a \times b^2/2$ , 根据体积的均数, 绘制3组裸鼠的皮下移植瘤生长曲线。接种30 d后, 按照医学伦理学的要求处死动物, 剥离肿块并称重。同时观察有无肝、肺及脑转移。常规40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 常规HE染色及镜下观察, 核分裂象计数每个高倍视野的核分裂个数, 连续计数10个视野为准。

**1.2.2 免疫组织化学染色:** 严格按照免疫组织化学SP试剂盒说明书进行操作, Ki-67阳性定位于细胞核, E-cadherin阳性定位于细胞膜和细胞质。

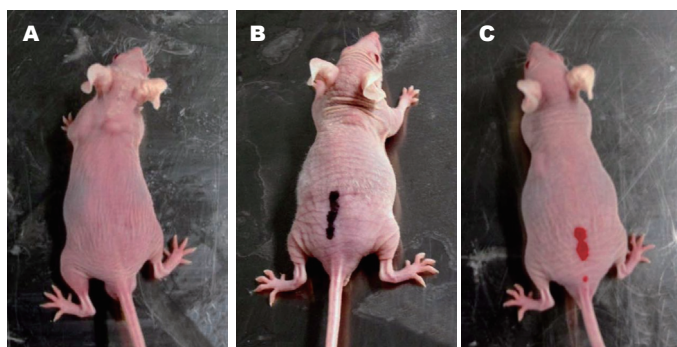


图1 接种的第8天裸鼠肿瘤大体观. A: 第8天接种Control细胞组裸鼠在颈部出现 $\Phi$ 0.5 cm肉眼可见的肿瘤; B: 第8天接种7901-High36细胞组裸鼠在颈部出现 $\Phi$ 0.5 cm肉眼可见的肿瘤; C: 第8天接种7901-Low36细胞组裸鼠在左侧腰部出现 $\Phi$ 0.5 cm肉眼可见的肿瘤.

#### ■ 相关报道

王陆佰与Deng等曾采用半定量RT-PCR及免疫印迹方法在人胃癌组织中肿块、癌旁组织及正常组织中检测到ER- $\alpha$ 36的表达,并在胃癌细胞株中发现给予雌激素的刺激可介导生长信号的传导,并且发现ER- $\alpha$ 36的表达与胃癌的生物学行为相关.



图2 接种第30天三组裸鼠肿瘤标本大体观. A: 第30天接种Control细胞组裸鼠肿瘤被剥除后大体观,肿瘤呈现结节状,包膜完整( $\times 1$ ); B: 第30天接种7901-High36细胞组裸鼠肿瘤被剥除后大体观,肿瘤呈现结节状,包膜完整( $\times 1$ ); C: 第30天接种7901-Low36细胞组裸鼠肿瘤被剥除后大体观,肿瘤呈现结节状,包膜完整( $\times 1$ ).

参照Cousin等<sup>[6,7]</sup>的细胞计数方法,用高倍视野( $\times 400$ )计数100个肿瘤细胞, Ki-67阳性细胞率(%) = 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ . E-cadherin蛋白阳性以(-、+、++)分别表示阴性、阳性和强阳性.

**统计学处理** 全部数据经SPSS12.0统计学软件处理, Ki-67阳性细胞率用单因素方差分析及 $t$ 检验, E-cadherin蛋白表达用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 各组移植瘤的生长** 3组裸鼠均在8 d开始出现肉眼可见的瘤结节(图1),至16 d时,3组间的肿瘤体积出现明显差异,SGC7901-High36组的肿瘤体积明显大于SGC7901-Control组和SGC7901-Low36组( $P < 0.01$ ,表1),至30 d时处死裸鼠,SGC7901-High36组的肿瘤质量为 $2.58 \text{ g} \pm 0.014$ ,明显大于SGC7901-Control组( $1.32 \text{ g} \pm 0.0245 \text{ g}$ )和SGC7901-Low36组( $0.471 \text{ g} \pm 0.021 \text{ g}$ ),差异具有显著性( $P < 0.05$ ,图2).

**2.2 组织学变化特点** 移植瘤细胞呈巢状、弥漫分布,间质稀少、血管丰富,部分区域形成腺管样结构,瘤细胞核仁明显,核分裂象多见. SGC7901-High36核分裂象为( $42.33 \pm 6.33$ ),明显高于SGC7901-Low36组( $28.5 \pm 0.35$ )和SGC7901-Control组( $12.5 \pm 2.5$ ),差异具有统计

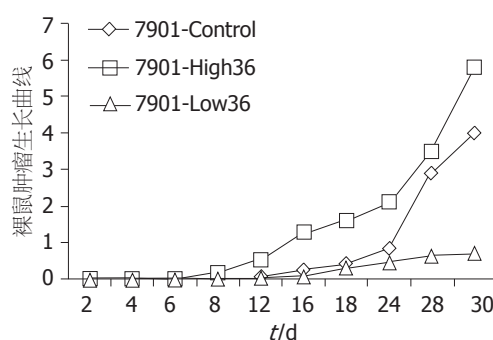


表1 裸鼠肿瘤生长曲线. 3组裸鼠均从8天开始出现肿瘤,接种7901-High36细胞组裸鼠肿瘤生长最快,其次是接种Control细胞组裸鼠肿瘤,接种7901-Low36细胞组裸鼠肿瘤生长最慢.

学意义( $P < 0.05$ ,图3). 肝脏、肺脏及脑组织:组织结构存在,均未见癌细胞.

**2.3 Ki67指数** SGC7901-High36组Ki67阳性细胞数为( $86.35 \pm 5.23$ ),明显高于SGC7901-Control组( $65.44 \pm 4.56$ )和SGC7901-Low36组( $18.25 \pm 2.56$ ),差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图4).

**2.4 E-cadherin蛋白的表达** SGC7901-High36组肿瘤组织中几乎不表达E-cadherin蛋白(-)、SGC7901-Control组E-cadherin蛋白的表达为(+),SGC7901-Low36组E-cadherin蛋白表达为(++)(图5).

## 3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,虽然发病



### ■应用要点

本项研究在胃癌细胞中ER- $\alpha$ 36的表达及信号传导的研究基础之上,通过构建稳定表达的ER- $\alpha$ 36细胞株深入进行体内研究,发现高表达ER- $\alpha$ 36的胃癌细胞具有更为活跃的增殖能力,为进一步证实胃癌细胞中ER- $\alpha$ 36的作用提供了证据。

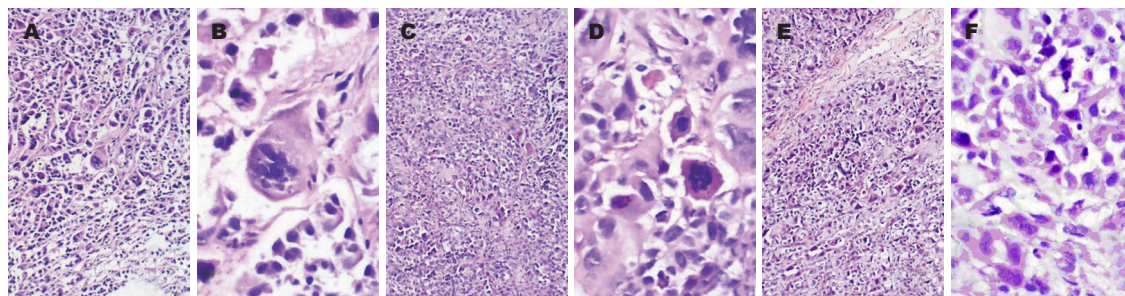


图3 3组裸鼠肿瘤HE染色切片. A: 接种Control细胞组裸鼠肿瘤HE切片( $\times 100$ ); B: 接种Control细胞组裸鼠肿瘤HE切片( $\times 400$ ); C: 接种7901-High36细胞组裸鼠肿瘤HE切片( $\times 100$ ); D: 接种7901-High36细胞组裸鼠肿瘤HE切片( $\times 400$ ); E: 接种7901-Low36细胞组裸鼠肿瘤HE切片( $\times 100$ ); F: 接种7901-Low36细胞组裸鼠肿瘤HE切片( $\times 400$ ).

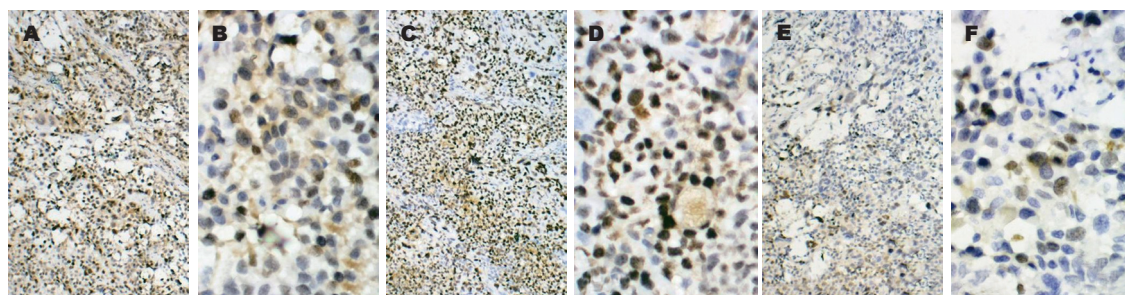


图4 3组裸鼠肿瘤Ki67的表达(免疫组织化学染色). A: 接种Control细胞组裸鼠肿瘤Ki67免疫组织化学染色( $\times 100$ ); B: 接种Control细胞组裸鼠肿瘤Ki67免疫组织化学染色( $\times 400$ ); C: 接种7901-High36细胞组裸鼠肿瘤Ki67免疫组织化学染色( $\times 100$ ); D: 接种7901-High36细胞组裸鼠肿瘤Ki67免疫组织化学染色( $\times 400$ ); E: 接种7901-Low36细胞组裸鼠肿瘤Ki67免疫组织化学染色( $\times 100$ ); F: 接种7901-Low36细胞组裸鼠肿瘤Ki67免疫组织化学染色( $\times 400$ ).

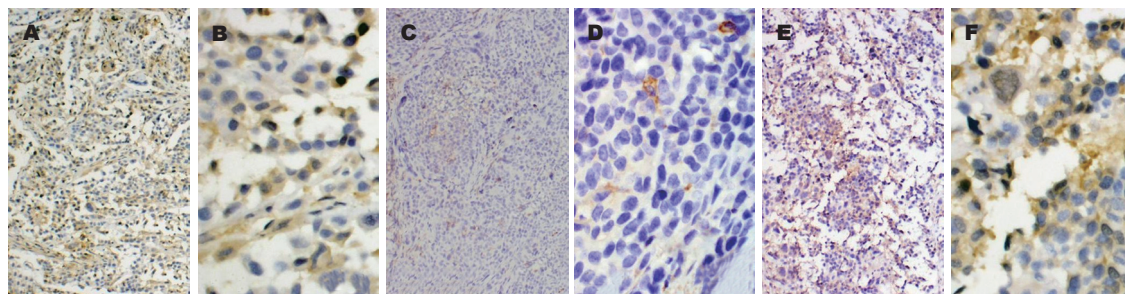


图5 3组裸鼠肿瘤E-cad的表达(免疫组织化学染色). A: 接种Control细胞组裸鼠肿瘤E-cad免疫组织化学染色( $\times 100$ ); B: 接种Control细胞组裸鼠肿瘤E-cad免疫组织化学染色( $\times 400$ ); C: 接种7901-High36细胞组裸鼠肿瘤E-cad免疫组织化学染色( $\times 100$ ); D: 接种7901-High36细胞组裸鼠肿瘤E-cad免疫组织化学染色( $\times 400$ ); E: 接种7901-Low36细胞组裸鼠肿瘤E-cad免疫组织化学染色( $\times 100$ ); F: 接种7901-Low36细胞组裸鼠肿瘤E-cad免疫组织化学染色( $\times 400$ ).

在逐年下降,但是一经发现仍多为进展期,5年生存率低.胃癌的流行病学研究发现,胃癌以男性为主,男女之比为2-3:1,这种性别上的差异,随着女性绝经期的到来而消失,用雌激素治疗前列腺癌的男性的胃癌发病率也降低.用他莫昔芬治疗的妇女其胃癌的发病增加,去除了卵巢的大鼠其胃癌的发病增加,同时给予雌激素治疗则可降低这种风险<sup>[8-11]</sup>.这些研究结果证实,胃癌的发生与发展与雌激素以及雌激素介导的信号传导之间存在着重要的联系.尽管胃癌不是传统意义上的性激素依赖肿瘤,但是雌激素与

胃癌之间的关系并不能完全否定.雌激素(尤其是17 $\beta$ 雌二醇, E2 $\beta$ )通过上调c-Myc和cyclin D1的表达,激活cyclin E-Cdk2的复合体,促进细胞周期的G<sub>1</sub>期向S期的转化,介导细胞的增殖以及肿瘤的形成.雌激素在乳腺癌等雌激素依赖的肿瘤中的研究已经很深入<sup>[12-15]</sup>.由于胃癌中ER- $\alpha$ 66(经典的ER- $\alpha$ )的表达率很低(2%-28%),所以,对胃癌中雌激素的作用及机制的研究长期没有受到重视<sup>[16-20]</sup>.

ER- $\alpha$ 36是Wang等<sup>[1-3]</sup>新近发现的一种ER- $\alpha$ 亚型,分子量约为3 5700 Da.与ER- $\alpha$ 66相比,



ER- $\alpha$ 36缺少转录激活区AF1和AF2, 但其具有细胞因子的作用, 位于细胞膜和细胞质, 介导快速的雌激素信号转导, 产生多种生物学效应, 并与肿瘤细胞的分化与增殖有密切关系<sup>[1-3,7]</sup>. 深入的研究发现, ER- $\alpha$ 36通过激活MAPK/ERK和PI3K/AKT信号通路的机制刺激乳腺癌细胞的生长, 尤其是在雌激素受体阴性的乳腺癌细胞中发挥更为重要的作用.

ER- $\alpha$ 36在胃癌中作用并不清楚, 也未见报道. 我们前期的体外研究发现, 给予17 $\beta$ 雌二醇作用胃癌细胞, 不仅产生应答, 并且细胞增生的效应与ER- $\alpha$ 36的表达相一致<sup>[4,5]</sup>, 上述效应在慢病毒转染构建的稳定过表达和沉默ER- $\alpha$ 36的SGC7901细胞中进一步得到证实(数据未显示). 为进一步印证我们的前期结果和理论推测, 我们进行了体内实验, 将过表达和沉默ER- $\alpha$ 36的胃癌SGC7901细胞, 移植至裸鼠体内, 观察ER- $\alpha$ 36分子对肿瘤细胞生长的影响. 我们推测, ER- $\alpha$ 36可能通过激活MAPK/ERK和PI3K/AKT信号通路促进胃癌细胞的增殖. 结果发现: 高表达ER- $\alpha$ 36的胃癌细胞具有更多的细胞核分裂象、更高的细胞增殖指数(Ki67阳性细胞数), 提示当胃癌细胞过表达ER- $\alpha$ 36分子时, 则具有生长更为活跃、细胞增殖速率更高的特点, 与ER- $\alpha$ 阴性乳腺癌细胞中的研究结果相一致<sup>[1]</sup>.

E-cadherin是分布在上皮组织中的钙依赖性跨膜蛋白, 与细胞间的黏附反应有关, 对维持细胞极性、参与分化调节以及维持组织结构形态和完整性起着重要作用. E-cadherin在肿瘤细胞中的表达减少, 降低了肿瘤细胞相互间的黏附, 使得肿瘤细胞容易脱离癌巢, 由此促进肿瘤细胞的转移<sup>[21-27]</sup>. 我们的结果显示, 高表达ER- $\alpha$ 36的胃癌细胞几乎不表达E-cadherin蛋白, 与对照的低表达ER- $\alpha$ 36胃癌细胞明显不同, 提示ER- $\alpha$ 36分子对E-cadherin蛋白的表达有抑制作用. 已有研究表明, 低表达E-cadherin蛋白的胃癌病例具有高侵袭和高转移的特点<sup>[28-30]</sup>, 但雌激素受体与胃癌细胞E-cadherin蛋白的表达之间相互关系的研究, 尚少有研究报告. 我们在人体胃癌组织样本中发现高表达ER- $\alpha$ 36的胃癌更易发生淋巴结转移的结果<sup>[4,5]</sup>, 支持ER- $\alpha$ 36与胃癌的侵袭转移相关的推论. 因此, 在ER- $\alpha$ 36和E-cadherin蛋白之间是否存在某种调控机制, 还需要进一步研究证实. 此外, 在本实验中并未发现裸鼠出现肺转移和肝转移病灶, 可能与移植

瘤的时间较短有关.

## 4 参考文献

- 1 Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. A variant of estrogen receptor- $\{\alpha\}$ , hER- $\{\alpha\}$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 9063-9068
- 2 Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 1023-1027
- 3 Shi YE, Chen Y, Dackour R, Potters L, Wang S, Ding Q, Wang Z, Liu YE. Synuclein gamma stimulates membrane-initiated estrogen signaling by chaperoning estrogen receptor (ER)- $\alpha$ 36, a variant of ER- $\alpha$ . *Am J Pathol* 2010; 177: 964-973
- 4 Deng H, Huang X, Fan J, Wang L, Xia Q, Yang X, Wang Z, Liu L. A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , ER- $\alpha$ 36 is expressed in human gastric cancer and is highly correlated with lymph node metastasis. *Oncol Rep* 2010; 24: 171-176
- 5 王陆伯, 邓昊, 黄萱, 陈莹, 刘丽江. 胃癌中雌激素受体- $\alpha$ 36与 $\alpha$ 66 mRNA的表达及其临床病理意义. *武汉大学学报(医学版)* 2010; 31: 38-42
- 6 Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 2002; 298: 2296-2297
- 7 Fasanello S, Leonardi E, Cantaloni C, Eccher C, Bazzanella I, Aldovini D, Bragantini E, Morelli L, Cuorvo LV, Ferro A, Gasperetti F, Berlanda G, Dalla Palma P, Barbareschi M. Proliferative activity in human breast cancer: Ki-67 automated evaluation and the influence of different Ki-67 equivalent antibodies. *Diagn Pathol* 2011; 6 Suppl 1: S7
- 8 Chandanos E, Lagergren J. The mystery of male dominance in oesophageal cancer and the potential protective role of oestrogen. *Eur J Cancer* 2009; 45: 3149-3155
- 9 Chung HW, Noh SH, Lim JB. Analysis of demographic characteristics in 3242 young age gastric cancer patients in Korea. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 256-263
- 10 Chandanos E, Lagergren J. Oestrogen and the enigmatic male predominance of gastric cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44: 2397-2403
- 11 Chandanos E, Lindblad M, Jia C, Rubio CA, Ye W, Lagergren J. Tamoxifen exposure and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma: a population-based cohort study of breast cancer patients in Sweden. *Br J Cancer* 2006; 95: 118-122
- 12 Fox EM, Andrade J, Shupnik MA. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 2009; 74: 622-627
- 13 Ariazi EA, Kraus RJ, Farrell ML, Jordan VC, Mertz JE. Estrogen-related receptor  $\alpha$ 1 transcriptional activities are regulated in part via the ErbB2/HER2 signaling pathway. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 71-85
- 14 Diaz-Cruz ES, Furth PA. Deregulated estrogen receptor  $\alpha$  and p53 heterozygosity collaborate in the development of mammary hyperplasia. *Cancer Res* 2010; 70: 3965-3974
- 15 Konduri SD, Medisetty R, Liu W, Kaiparettu BA, Srivastava P, Brauch H, Fritz P, Swetzig WM, Gard-

## ■同行评价

实验对照的设计合理可靠, 统计学处理方法的使用恰当, 文章的科学性、创新性和可读性较好地反映了我国胃癌的发生发展与雌激素关系基础研究的相关水平.

- ner AE, Khan SA, Das GM. Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 15081-15086
- 16 Korenaga D, Orita H, Okuyama T, Kinoshita J, Maekawa S, Ikeda T, Sugimachi K. Sex hormone-receptor-negative tumors have a higher proliferative activity than sex hormone-receptor-positive tumors in human adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Surg Today* 1998; 28: 1007-1014
- 17 Persson C, Inoue M, Sasazuki S, Kurahashi N, Iwasaki M, Ye W, Tsugane S. Female reproductive factors and the risk of gastric cancer in a large-scale population-based cohort study in Japan (JPHC study). *Eur J Cancer Prev* 2008; 17: 345-353
- 18 Wang M, Pan JY, Song GR, Chen HB, An LJ, Qu SX. Altered expression of estrogen receptor alpha and beta in advanced gastric adenocarcinoma: correlation with prothymosin alpha and clinicopathological parameters. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 195-201
- 19 Xu CY, Guo JL, Jiang ZN, Xie SD, Shen JG, Shen JY, Wang LB. Prognostic role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 2503-2509
- 20 Chandanos E, Rubio CA, Lindblad M, Jia C, Tsolakis AV, Warner M, Gustafsson JA, Lagergren J. Endogenous estrogen exposure in relation to distribution of histological type and estrogen receptors in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer* 2008; 11: 168-174
- 21 桑海泉, 王强. 胃癌组织中MTA1, PTEN, E-cadherin的表达及其相互关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1096-1102
- 22 张建新, 毛正发, 王旭青, 王崇高, 吴建农. 胃癌中Ezrin, E-cadherin及CD44的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 776-779
- 23 Pedrazzani C, Corso G, Marrelli D, Roviello F. E-cadherin and hereditary diffuse gastric cancer. *Surgery* 2007; 142: 645-657
- 24 Mimata A, Fukamachi H, Eishi Y, Yuasa Y. Loss of E-cadherin in mouse gastric epithelial cells induces signet ring-like cells, a possible precursor lesion of diffuse gastric cancer. *Cancer Sci* 2011; 102: 942-950
- 25 Batistatou A, Charalabopoulos AK, Scopa CD, Nakanishi Y, Kappas A, Hirohashi S, Agnantis NJ, Charalabopoulos K. Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 2006; 448: 763-767
- 26 Carneiro F, Huntsman DG, Smyrk TC, Owen DA, Seruca R, Pharoah P, Caldas C, Sobrinho-Simões M. Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. *J Pathol* 2004; 203: 681-687
- 27 Al-Moundhri MS, Al-Khanbashi M, Al-Kindi M, Al-Nabhani M, Burney IA, Al-Farsi A, Al-Bahrani B. Association of E-cadherin (CDH1) gene polymorphisms and gastric cancer risk. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3432-3436
- 28 Saad AA, Awed NM, Abd Elkerim NN, El-Shennawy D, Alfons MA, Elserafy ME, Darwish YW, Barakat EM, Ezz-Elarab SS. Prognostic significance of E-cadherin expression and peripheral blood micrometastasis in gastric carcinoma patients. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3059-3067
- 29 Maehata Y, Hirahashi M, Aishima S, Kishimoto J, Hirohashi S, Yao T, Takashima H, Tsuneyoshi M, Oda Y. Significance of dysadherin and E-cadherin expression in differentiated-type gastric carcinoma with submucosal invasion. *Hum Pathol* 2011; 42: 558-567
- 30 Mao Z, Ma X, Rong Y, Cui L, Wang X, Wu W, Zhang J, Jin D. Connective tissue growth factor enhances the migration of gastric cancer through downregulation of E-cadherin via the NF- $\kappa$ B pathway. *Cancer Sci* 2011; 102: 104-110

编辑 李军亮 电编 闫晋利

# KDR单克隆抗体对荷人胃癌裸小鼠肿瘤生长的抑制作用

孔桂美, 张小荣, 吴克艳, 赵飞燕, 朱海杭, 张旭东, 廖月霞, 卜平

孔桂美, 卜平, 扬州大学临床医学院 江苏省扬州市 225001  
张小荣, 吴克艳, 赵飞燕, 廖月霞, 扬州大学 江苏省扬州市 225001

朱海杭, 张旭东, 扬州大学临床医学院 江苏省扬州市 225001  
孔桂美, 讲师, 主要从事抗胃癌新药方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30801497

作者贡献分布: 孔桂美与张小荣对此文所作贡献均等; 此课题由孔桂美、张小荣及卜平设计, 研究过程由吴克艳、赵飞燕及廖月霞操作完成; 研究所用试剂及分析工具由孔桂美、朱海杭及卜平提供; 数据分析由孔桂美、张小荣及张旭东完成; 本论文写作由孔桂美与张小荣完成。

通讯作者: 卜平, 教授, 主任医师, 225001, 江苏省扬州市淮海路11号, 扬州大学临床医学院. yzuboping@163.com  
电话: 0514-87978801

收稿日期: 2011-07-31 修回日期: 2011-09-03

接受日期: 2011-10-02 在线出版日期: 2011-10-08

## Inhibitory effect of KDR-specific monoclonal antibody on tumor growth in nude mice bearing human gastric cancer

Gui-Mei Kong, Xiao-Rong Zhang, Ke-Yan Wu, Fei-Yan Zhao, Hai-Hang Zhu, Xu-Dong Zhang, Yue-Xia Liao, Ping Bo

Gui-Mei Kong, Ping Bo, Clinical Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Xiao-Rong Zhang, Ke-Yan Wu, Fei-Yan Zhao, Yue-Xia Liao, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Hai-Hang Zhu, Xu-Dong Zhang, Clinical Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30801497

Correspondence to: Ping Bo, Professor, Clinical Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. yzuboping@163.com

Received: 2011-07-31 Revised: 2011-09-03

Accepted: 2011-10-02 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To evaluate the anti-cancer activity of monoclonal antibody (mAb) against vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor II (KDR) in nude mice bearing human gastric cancer.

**METHODS:** BALB/c nude mice were subcutaneously inoculated with human gastric cancer cells (SGC-7901) to develop a xenograft model of human gastric cancer. When tumor volume

reached 100-300 mm<sup>3</sup>, all mice were randomly divided into three groups and intraperitoneally injected with KDR-mAb, 5-FU and physiological saline, respectively. Ten days after injection, all tumors were removed, measured, and weighted. The reduced rate of tumor growth was calculated. VEGF expression was quantified by real-time polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry.

**RESULTS:** KDR-mAb inhibited the growth of solid tumors compared to the two control groups (1889.94 mm<sup>3</sup> ± 396.64 mm<sup>3</sup> vs 9398.34 mm<sup>3</sup> ± 7413.96 mm<sup>3</sup>, 1.07 g ± 0.58 g vs 1.68 g ± 0.18 g, both *P* < 0.05), and the reduced rate of tumor growth was up to 36.3%. VEGF expression was significantly inhibited in tumors in the KDR-mAb treated group (*P* < 0.05).

**CONCLUSION:** KDR-mAb can inhibit the growth of solid tumors in a mouse xenograft model of gastric cancer and may be used for clinical treatment of human gastric cancer.

**Key Words:** Vascular endothelial growth factor receptor II; Monoclonal antibody; Gastric cancer; Anti-cancer activity

Kong GM, Zhang XR, Wu KY, Zhao FY, Zhu HH, Zhang XD, Liao YX, Bo P. Inhibitory effect of KDR-specific monoclonal antibody on tumor growth in nude mice bearing human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2925-2930

## 摘要

**目的:** 研究血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)受体Ⅱ单克隆抗体(KDR-mAb)抑制荷人胃癌裸小鼠肿瘤生长的作用。

**方法:** 将人胃癌细胞(SGC-7901)通过背部皮下接种裸小鼠制备荷人胃癌小鼠肿瘤模型。待肿瘤生长至直径100-300 mm<sup>3</sup>时将荷瘤小鼠随机分为3组, 分别腹腔注射KDR-mAb、5-FU和生理盐水进行治疗。10 d后剥离瘤组织, 比较3组肿瘤组织的体积和质量、计算抑瘤率; 通

## ■背景资料

异常活跃的血管发育是恶性肿瘤生长的一个重要条件。VEGF是目前已知活性最强、专属性最高的血管生成因子之一, 在肿瘤血管生成中处于核心地位。VEGF作用的发挥依赖于血管内皮细胞膜上相应受体VEGFR-1(Flt-1)和VEGFR-2(KDR)特异性结合, 认为阻断VEGF-KDR途径可以明显抑制新生血管生成。

## ■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科; 肖文华, 主任医师, 中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤科



## ■ 研发前沿

胃癌的治疗目前仍然是医学一大难题, 胃癌的靶向治疗是目前的研究热点. 随着对胃癌发生、发展和转移过程中分子生物学机制的研究, 从血管生成角度解释并预测胃癌的进展和复发, 并尝试通过抑制血管生成进行治疗. VEGF/VEGFR靶向治疗已用于肺癌、结肠癌、直肠癌等的治疗, 胃癌的治疗也正从实验室走向临床.

过Real-time PCR法和免疫组织化学法分别定量检测VEGF在各治疗组肿瘤组织中的表达.

**结果:** KDR-mAb在体内能显著抑制实体瘤的生长, 抑瘤率为36.3%, 肿瘤大小和肿瘤质量与对照组比较差异显著( $1889.94 \text{ mm}^3 \pm 396.64 \text{ mm}^3$  vs  $9398.34 \text{ mm}^3 \pm 7413.96 \text{ mm}^3$ ,  $1.07 \text{ g} \pm 0.58 \text{ g}$  vs  $1.68 \text{ g} \pm 0.18 \text{ g}$ , 均 $P < 0.05$ ); KDR-mAb能显著抑制肿瘤组织中VEGF mRNA和VEGF蛋白的表达( $P < 0.05$ ).

**结论:** 作为VEGF受体抑制剂, KDR-mAb在荷人胃癌细胞小鼠肿瘤模型中具有明显的体内抗肿瘤活性, 对于人胃癌的临床治疗具有一定的应用前景.

**关键词:** 血管内皮细胞生长因子受体 II; 单克隆抗体; 胃癌; 抗肿瘤活性

孔桂美, 张小荣, 吴克艳, 赵飞燕, 朱海杭, 张旭东, 廖月霞, 卜平. KDR单克隆抗体对荷人胃癌裸小鼠肿瘤生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2925-2930  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2925.asp>

## 0 引言

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 世界范围内胃癌位居肿瘤死亡的第2位<sup>[1]</sup>. 在我国, 胃癌死亡率占所有恶性肿瘤死亡的23%, 居各类癌症死亡的第1位<sup>[2]</sup>. 血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体(Flt-1、KDR)的过度表达与肿瘤的生长、侵袭及转移密切相关<sup>[3-5]</sup>. 其中KDR是促进血管内皮细胞有丝分裂、增殖、迁移、分化、微管形成等生命活动的关键介导体, 阻断VEGF-KDR途径可以明显抑制新生血管生成达到抑制肿瘤的目的<sup>[6]</sup>. KDR胞外7个Ig-样结构域对配体和受体的作用不同, 有研究报道<sup>[7-11]</sup>, 针对胞外1-3区、5-7区和3区的相关片段的表达, 均抑制VEGF的活性. 本研究通过研究KDR胞外3区的mAb在荷瘤小鼠模型体内的抗肿瘤活性, 探讨KDR在抗胃癌研究中的作用, 为胃癌的防治提供新的治疗思路.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** KDR-mAb由本实验室自行研制<sup>[12]</sup>; 5-FU购自上海旭东海普药业有限公司. 胎牛血清(FCS)购自Hyclone公司; 小牛血清(NCS)、PPMI 1640购自Gibco公司; 人胃腺癌细胞株(SGC-7901)由本室保存; 重组人VEGF165购自R&D公司; 商品化KDR单克隆抗体Flk(A-3)购自

Santa Cruz生物公司; SYBR Green PCR Master Mix(2×)购自ABI公司; 第一链cDNA合成试剂盒(AMV First Strand cDNA Synthesis Kit)购自BBI公司; 4-6周龄SPF级BALB/c-nu裸小鼠(18 g  $\pm$  2 g)购自江苏省比较医学中心; 兔抗人VEGF多克隆抗体, DAB显色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司.

## 1.2 方法

### 1.2.1 KDR在SGC-7901细胞中的表达鉴定:

(1)SGC-7901 KDR表达的诱导. 将长成单层的SGC-7901细胞用2.5 g/L的胰酶消化后, 用含10%小牛血清的PPMI 1640培养液调整至合适的浓度, 按 $1 \times 10^5$ 细胞/孔接种于加有盖玻片的6孔细胞培养板, 于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>温箱培养至50%-60%, 按8 ng/孔加入重组人VEGF165诱导16 h; (2)细胞免疫组织化学. 按照文献方法<sup>[13]</sup>将诱导后的SGC-7901细胞用950 mL/L乙醇固定15 min, 室温吹干, PBS洗3次, 每次2 min, 用0.5% Triton X-100和3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后, 依次用1% BSA室温孵育20 min, 1:200稀释的鼠抗人KDR-mAb, 37 °C作用1 h, 和1:200稀释的羊抗鼠HRP-IgG, 37 °C作用30 min. 用新鲜配制的DAB显色, 光镜下观察, 蒸馏水终止反应, 苏木精衬染, 晾干后中性树胶封片. 同时设立不加一抗的阴性对照.

**1.2.2 mAb抑制荷瘤裸鼠胃癌生长:** (1)裸鼠饲养. 将30只BALB/C-nu裸小鼠(雌雄各半)饲养于SPF级小鼠负压隔离器中, 自由饮水和采食<sup>[14]</sup>; (2)动物造模. 取对数期SGC-7901细胞用0.25%的胰酶消化制备细胞悬液, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8$ /mL; 用1 mL注射器在每只裸鼠背部皮下注射细胞悬液0.1 mL注射后轻压5 s; 将小鼠重新放回笼中观察3-5 d, 以背部皮下出现米粒大小质硬的结节作为造模成功标准<sup>[15]</sup>; (3)肿瘤抑制实验. 选取造模成功的裸小鼠, 选取体积达到100-300 mm<sup>3</sup>的裸小鼠进行实验, 随机分为阴性对照组(生理盐水, NS)、阳性对照组(5-FU)、KDR-mAb治疗组3组, 每组6只, 雌雄各半, 治疗时间为10 d. NS组每天腹腔注射生理盐水0.1 mL; 5-FU组每天腹腔注射20 mg/kg 5-FU; mAb治疗组按1  $\mu$ g/只剂量每天腹腔注射KDR mAb. 治疗10 d后, 处死小鼠, 分离皮下瘤组织, 测量瘤组织的纵径(a)和横径(b), 根据公式计算体积, 肿瘤体积(tumor volume, TV)的计算公式:  $TV = 1/2ab^2$ . 计算肿瘤抑制率, 肿瘤抑制率(%) =  $(1 - \text{治疗组平均瘤质量} G_1 / \text{对照组平均瘤质量} G_0) \times 100\%$ <sup>[16]</sup>. (4)荧光定量

PCR检测肿瘤组织中VEGF的表达. 肿瘤组织标本采集后迅速放至液氮中冷冻, 然后转入 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用<sup>[17]</sup>. 使用TRIZOL试剂提取肿瘤组织总RNA, 然后检测吸光度(A)值, 所提取的RNA纯度 $A_{260}/A_{280}$ 均在1.8以上. 按照逆转录试剂盒说明书, 将总RNA逆转录成cDNA, 以GAPDH为内参照进行Real-time PCR. 引物的设计与合成: 参照GenBank中的基因序列, 使用Primer Premier 5.0进行设计. GAPDH引物序列: GAPDH上游引物F: 5'-GTGGTCTCTCTGACTTCAACA-3'; 下游引物R: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3', 扩增片段为136 bp; VEGF引物序列: VEGF上游引物F: 5'-CCCACTGAGGAGTCCAACAT-3', VEGF下游引物R: 5'-ACAGGGATTTTCTTGTCTTGC-3', 扩增片段为144 bp. 上述引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成; PCR反应: 反应体系为20  $\mu\text{L}$ , SYBR Green PCR Master Mix(2 $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各1  $\mu\text{L}$ , 双蒸水7  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ . 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  变性10 min,  $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  1 min, 共40个循环, 扩增完毕后, 进行溶解曲线分析<sup>[18]</sup>, 每个标本均作复管; (3)PCR产物定量的校正和判定分析: 采用GAPDH作为内参照. VEGF mRNA和GAPDH mRNA根据标准曲线得出mRNA的分子拷贝数. 用GAPDH的拷贝数作为校正基数, 即目的基因mRNA精确含量 = 目的基因Ct值/内参照GAPDH Ct值, 以此比值作统计处理; (4)免疫组织化学检测肿瘤组织中VEGF的表达. 取部分瘤组织和其他脏器用40 g/L甲醛溶液固定24 h, 蒸馏水浸泡2 h, 常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 切片, 厚4  $\mu\text{m}$ , 贴于多聚赖氨酸处理的载玻片上,  $4^{\circ}\text{C}$ 保存备用<sup>[19]</sup>. 按照文献方法<sup>[20]</sup>进行免疫组织化学, DAB显色, 光镜下观察胞质或胞核有棕色颗粒者为阳性细胞. 阴性对照不加一抗, 用0.01 mol/L PBS代替, 随机挑选4个视野, 计算表达VEGF阳性细胞数.

**统计学处理** 实验数据均以mean $\pm$ SD表示, 应用SPSS13.0进行统计分析, 组内差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 比较各组间的差别有无显著性意义, 以 $P<0.05$ 为有显著性差异.

## 2 结果

**2.1 VEGF诱导SGC-7901细胞的细胞免疫组织化学结果** 阴性对照组细胞无明显染色, KDR-mAb和Flk(A-3)处理细胞组, 几乎所有细胞胞浆和

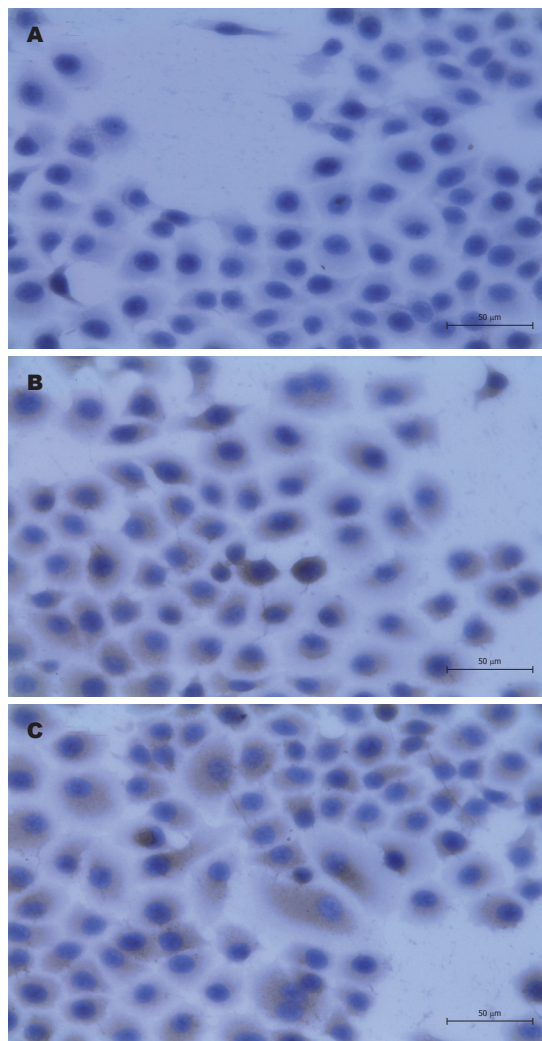


图1 胃腺癌细胞(SGC-7901)胞浆和胞膜上表达KDR. A: 阴性对照组; B: KDR单抗作用组; C: 阳性抗体Flk(A-3)组.

胞膜上都有深黄色颗粒, 说明SGC-7901细胞经VEGF诱导后, 能大量表达KDR(图1).

**2.2 荷瘤小鼠KDR mAb治疗结果** 治疗期间, 阴性对照组, 小鼠精神状态较好, 小鼠肿瘤较大; KDR mAb治疗组小鼠在治疗期间, 精神状态较好, 肿瘤形成较小(图2). 治疗前各组小鼠体质量差异比较差异不显著(表1), 治疗后体质量与对照组相比差异不显著(表1), 但肿瘤体积与对照组相比差异显著( $P<0.05$ , 表2), 肿瘤质量与对照组相比差异显著( $P<0.05$ , 表2), 肿瘤抑制率为36.3%; 5-FU治疗组小鼠, 肿瘤形成较小(图2), 肿瘤抑制率为49.4%, 但由于化疗药对普通细胞也有一定的杀伤性, 小鼠在治疗期间, 精神状态比较萎靡, 吃食饮水量明显下降, 体质量不见明显增长, 治疗后5-FU组与对照组体质量相比较差异显著( $P<0.05$ , 表1); 小鼠处死后剥离的肿瘤体积差异显著( $P<0.05$ , 表2), 肿瘤质量5-FU组与对照组相比差异显著( $P<0.05$ , 表2). 各组裸鼠肝

## ■ 相关报道

孔桂美等研究显示, KDR胞外3区的mAb具有很好的生物学活性, 能明显抑制血管生成和血管内皮细胞的迁移. Gretscher等报道胃癌VEGF的表达率增高, 与癌组织血管密度增高、血管侵犯、淋巴结转移、骨髓微转移及其他远处转移、肿瘤分期有关; Lieto等显示胃癌组织中VEGF和VEGFR高表达. 孔桂美等的研究显示, KDR在胃癌组织中呈异常的阳性表达.



### ■创新盘点

KDR在胃癌的发生、发展过程中发挥了重要的作用,本研究显示以KDR为靶点设计抗肿瘤药物-KDR单抗,能很好地抑制荷人胃癌裸鼠肿瘤的生长,且具有不良反应小的特点;进一步研究显示,KDR单抗能很好地抑制胃癌细胞和血管内皮细胞分泌VEGF.

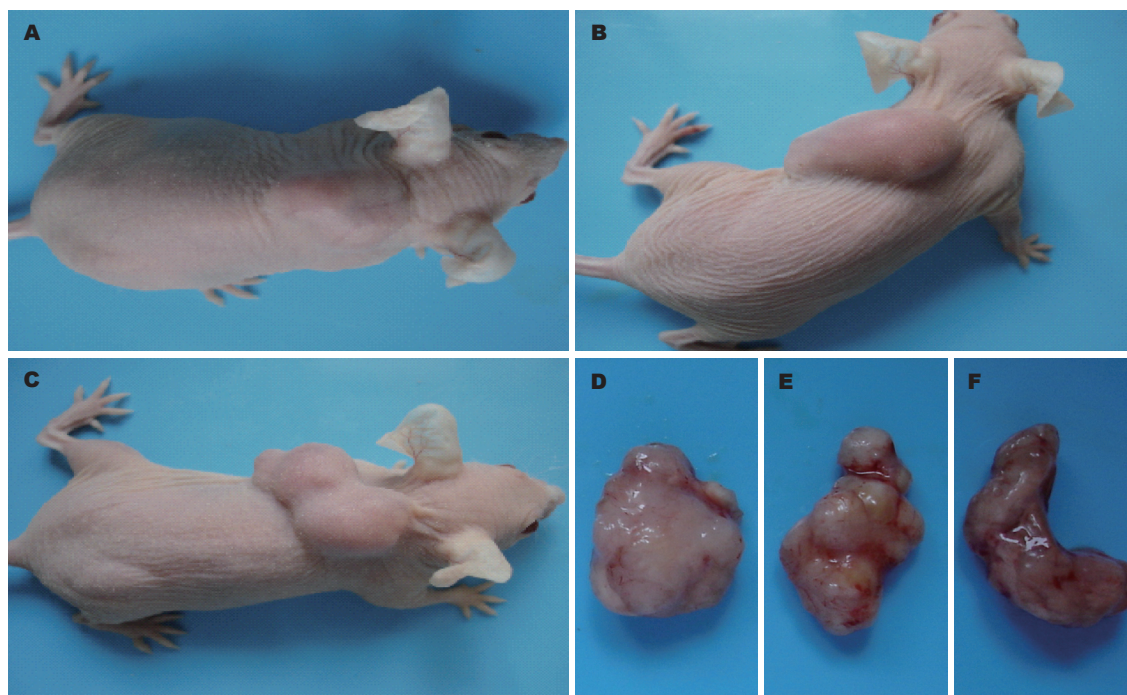


图2 荷瘤小鼠治疗后外观以及剥离瘤组织大小. A, D: 5-FU治疗组; B, E: 阴性对照组; C, F: KDR mAb治疗组; A-C: 外观; D-F: 剥离组织.

表1 荷瘤小鼠治疗前后质量比较 ( $n = 6$ )

分组	治疗前质量(g)	<i>P</i> 值	治疗后(g)	<i>P</i> 值
阴性对照组	18.61 ± 0.52		22.07 ± 2.55	
5-FU	18.45 ± 0.39	0.771	18.48 ± 2.92 <sup>a</sup>	0.024
KDR mAb	18.93 ± 1.55	0.581	22.92 ± 1.79	0.559

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 阴性对照组.

脏、肺脏、胸腹腔均未见转移病灶.

**2.3 治疗后肿瘤组织VEGF mRNA表达** KDR-mAb治疗组和5-FU治疗组VEGF mRNA表达明显低于阴性对照组( $0.2383 \pm 0.052$ ,  $0.7717 \pm 0.011$  vs  $0.9083 \pm 0.071$ ,  $P < 0.01$ 或 $0.05$ ).

**2.4 治疗后肿瘤组织VEGF表达** 治疗后荷瘤小鼠的肿瘤组织经免疫组织化学检测,发现阴性对照组VEGF表达阳性细胞较多,达到( $220.00 \pm 22.39$ )个; 5-FU治疗组VEGF表达阳性细胞数为( $51.25 \pm 6.70$ )个,与阴性对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ), KDR mAb治疗组VEGF表达阳性细胞数为( $22.00 \pm 4.97$ )个,与阴性对照组相比差异显著( $P < 0.05$ , 图3).

### 3 讨论

实体瘤形成过程中VEGF不仅是肿瘤血管内皮细胞生长因子<sup>[21]</sup>,同时又可以作为自分泌或者旁分泌的肿瘤细胞生长调节因子,调控着表达

表2 治疗后肿瘤体积、肿瘤质量 ( $n = 6$ )

分组	肿瘤平均体积(mm <sup>3</sup> )	<i>P</i> 值	肿瘤平均质量(g)	<i>P</i> 值
阴性对照组	9 398.34 ± 7 413.96		1.68 ± 0.18	
5-FU	1 820.32 ± 423.21 <sup>a</sup>	0.039	0.85 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.006
KDR mAb	1 889.94 ± 396.64 <sup>a</sup>	0.050	1.07 ± 0.58 <sup>a</sup>	0.037

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 阴性对照组.

KDR受体的肿瘤细胞的生长、迁移<sup>[22]</sup>. Shen等<sup>[10]</sup>报道VEGF的受体KDR和Flt-1不仅在内皮细胞上表达,还在非内皮细胞如胎盘滋养细胞,巨噬细胞以及恶性肿瘤细胞系中表达. KDR胞外7个Ig-样结构域对配体和受体的作用不同,有研究报道<sup>[7-11]</sup>,针对胞外1-3区、5-7区和3区的相关片段的表达,均抑制VEGF的活性. 目前以KDR和VEGF为靶点的抑制剂有抗VEGF抗体<sup>[23]</sup>、可溶性VEGF的受体<sup>[24]</sup>、抗KDR的抗体<sup>[25]</sup>和小分子KDR抑制剂<sup>[26]</sup>. 除了抗VEGF的抗体于2004年在美国上市以外,其他的抑制剂均处于临床试验或临床前的阶段. 以KDR为靶点进行抗体或可溶性受体片段的表达也有报道<sup>[27-29]</sup>.

KDR mAb是由本室自行研制<sup>[12]</sup>,具有与天然KDR结合的生物学活性,抑制人脐静脉内皮细胞迁移和体外小管形成活性. 同时课题组前期研究发现胃癌患者癌组织中高表达KDR. 本研究在前期研究的工作基础上,通过KDR mAb



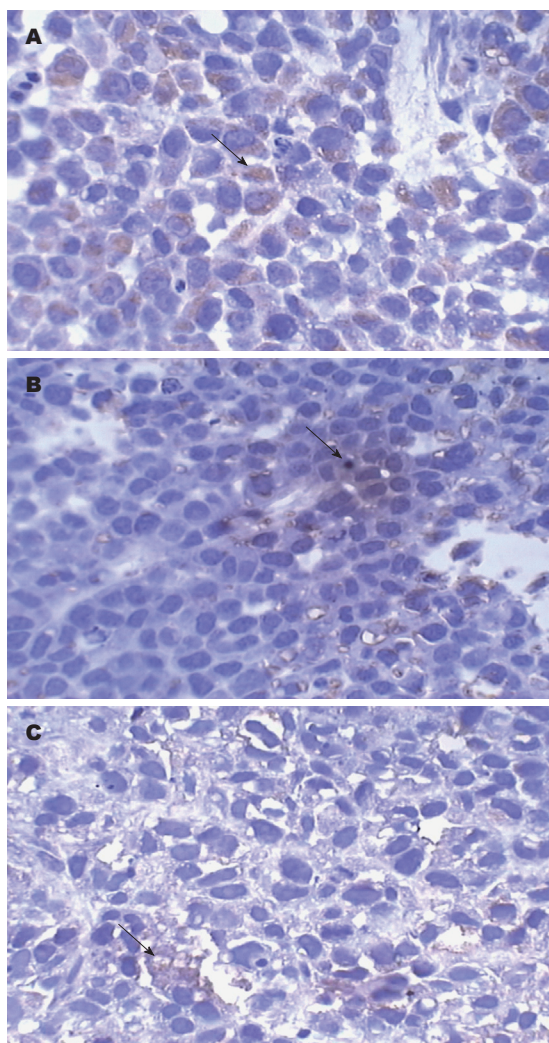


图3 免疫组织化学法检测荷瘤小鼠肿瘤组织中VEGF表达。A: 阴性对照组; B: 5-FU治疗组; C: KDR mAb治疗组。

治疗荷人胃癌裸小鼠研究发现, KDR mAb能显著抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长, 同时能显著抑制肿瘤组织中VEGF的表达; 同时在研究过程中发现KDR mAb治疗期间小鼠精神状态良好, 饮食、饮水量正常, 与对照组无差异; 而5-FU治疗组随着治疗时间的延长, 小鼠精神萎靡, 饮食量和饮水量减少。治疗期间, KDR mAb治疗组小鼠体质量无明显变化, 与对照组相比, 差异不显著, 但剥离的肿瘤体积和肿瘤质量与对照组差异显著, 肿瘤抑制率达到36.3%; 5-FU治疗组小鼠治疗期间体质量明显减轻, 与对照组相比差异显著, 剥离的肿瘤体积和质量与对照组相比差异显著, 肿瘤抑制率达到了49.4%。从以上数据可以看出, 5-FU治疗组肿瘤抑制率明显比KDR mAb治疗组小鼠高, 但是5-FU治疗组随着时间的推移小鼠精神萎靡, 体质量减轻, 这是因为化疗药在杀死肿瘤细胞的对正常细胞有一定的不良反应, 对机体的毒性较大, 这与孙宁等<sup>[19]</sup>和王承

党等<sup>[30]</sup>报道一致。本研究过程中KDR mAb治疗组小鼠精神状态始终保持良好, 可能因为KDR mAb是一种生物制剂, 只针对表达KDR的肿瘤细胞和表达KDR的血管内皮细胞, 具有靶向性和特异性, 而对机体的其他正常细胞没有任何作用, 所以在整个治疗过程中, 小鼠的精神状态和体质量与对照组相比没有异常。这些研究结果都证明该单克隆抗体具有一定的实用性, 可为进一步开发抗肿瘤血管生成药物提供基础。

志谢: 感谢扬州大学兽医学院病理教研室吴力老师和高巍老师在实验过程中给予的帮助。

#### 4 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 2 邓薇, 沈琳. 胃癌靶向药物治疗进展. *中国新药杂志* 2010; 19: 1531-1538
- 3 熊枝繁, 李盛安. 胃癌组织中COX-2、VEGF和MMP-9的表达及临床意义. *中国现代医学杂志* 2008; 18: 3202-3206
- 4 Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1011-1027
- 5 章旻, 方国恩, 毕建威. 胃癌中血管内皮生长因子的表达及其意义. *实用癌症杂志* 2009; 24: 468-451
- 6 梁杰, 黄其佳. 血管瘤中血管内皮生长因子及其受体KDR的表达和血管生成的研究. *中国临床新医学* 2009; 2: 1131-1133
- 7 Lu D, Kussie P, Pytowski B, Persaud K, Bohlen P, Witte L, Zhu Z. Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies. *J Biol Chem* 2000; 275: 14321-14330
- 8 Santos SC, Miguel C, Domingues I, Calado A, Zhu Z, Wu Y, Dias S. VEGF and VEGFR-2 (KDR) internalization is required for endothelial recovery during wound healing. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1561-1574
- 9 Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1998; 273: 11197-11204
- 10 Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, Borden L, Connolly D, Stern D, Kao J. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood* 1993; 81: 2767-2773
- 11 Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, Pytowski B, Kotanides H, Rockwell P, Böhlen P. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 155-161
- 12 孔桂美, 张小荣, 黄瑶, 廖月霞, 卜平. 人VEGF受体Ⅱ胞外Ⅲ区(KDRD3)单克隆抗体研制与生物学活性测定. *扬州大学学报(农业与生命科学版)* 2011; 32: 16-20
- 13 魏建国, 朱建思, 贺修胜, 周建国, 唐微. siRNA干扰survivin对人胃癌SGC-7901细胞的影响. *南华大学学报(医学版)* 2010; 38: 757-761
- 14 吴育晶, 金娟, 胡姗姗, 王迪, 张玲玲, 孙婉莹, 魏伟. 儿茶素对人肝癌细胞HepG2的影响. *中国药理学通报*

#### ■应用要点

本文研究KDR单克隆抗体抑制荷人胃癌裸小鼠肿瘤生长的原因, 可能为以VEGF和KDR为靶点设计抗肿瘤药物, 通过阻断肿瘤血管新生, 达到抑制胃癌的生长、转移的目的。

## ■同行评价

本研究设计合理, 结论可信, 论述清晰, 研究内容具有一定的实用性, 为进一步开发抗肿瘤血管生成药物提供了基础和新思路。

- 2010; 26: 1598-1602
- 15 Wu DD, Xiao YF, Geng Y, Hou J. Antitumor effect and mechanisms of arsenic trioxide on subcutaneously implanted human gastric cancer in nude mice. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 198: 90-96
- 16 何晓松, 孔中雨, 向秋, 黄岚珍, 蒋伟. EGCG对鼻咽癌CNE-2裸鼠移植瘤放疗的增敏作用及机制. *山东医药* 2010; 50: 25-27
- 17 常建兰, 李祖国, 王晓燕, 杨敏慧. P53、malat1、ki-67和 $\beta$ -catenin基因mRNA检测在大肠癌分子诊断中的意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3849-3854
- 18 周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 吴金民. 实时荧光定量PCR检测IL-8 mRNA在大肠癌的表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 450-453
- 19 孙宁, 徐玉芳, 刘粉霞. 氧化苦参碱对人胃癌MGC-803细胞裸鼠皮下移植瘤形态学影响的作用. *中医学报* 2010; 25: 1041-1044
- 20 刘影, 唐军民, 唐岩, 常昕莹, 李枫. 人早期胚中CD20阳性细胞的免疫组织化学定位. *解剖学报* 2007; 38: 238-240
- 21 Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-1039
- 22 Zhao R, Liu XQ, Wu XP, Liu YF, Zhang ZY, Yang GY, Guo S, Niu J, Wang JY, Xu KS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) enhances gastric carcinoma invasiveness via integrin  $\alpha(v)\beta_6$ . *Cancer Lett* 2010; 287: 150-156
- 23 Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 328-335
- 24 Bertin S, Mohsen-Kanson T, Baqué P, Gavelli A, Momier D, Anjuere F, Carle GF, Pierrefite-Carle V. Tumor microenvironment modifications induced by soluble VEGF receptor expression in a rat liver metastasis model. *Cancer Lett* 2010; 298: 264-272
- 25 Hicklin DJ, Witte L, Zhu Z, Liao F, Wu Y, Li Y, Bohlen P. Monoclonal antibody strategies to block angiogenesis. *Drug Discov Today* 2001; 6: 517-528
- 26 Bauer D, Whittington DA, Coxon A, Bready J, Harriman SP, Patel VF, Polverino A, Harmange JC. Evaluation of indazole-based compounds as a new class of potent KDR/VEGFR-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 4844-4848
- 27 Vitaliti A, Wittmer M, Steiner R, Wyder L, Neri D, Klemenz R. Inhibition of tumor angiogenesis by a single-chain antibody directed against vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000; 60: 4311-4314
- 28 Cai M, Zhang H, Hui R. Single chain Fv antibody against angiopoietin-2 inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 946-951
- 29 Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, Takeda A, Liu W, Bucana CD, Hicklin DJ, Ellis LM. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1133-1140
- 30 王承党, 陈艳珊, 刘霞. 奥曲肽对人胃癌SGC-7901裸鼠种植瘤生长的影响. *胃肠病学和肝病学杂志* 2006; 15: 10-11

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

# JDP2在TGF- $\beta$ 1诱导的人胰腺癌细胞系Panc-1上皮向间质转化中的作用

许元鸿, 刘哲, 郭克建, 杜瑞霞, 王春雁

许元鸿, 刘哲, 郭克建, 中国医科大学附属第一医院胰腺外科 辽宁省沈阳市 110001

杜瑞霞, 沈阳医学院附属奉天医院耳鼻咽喉科 辽宁省沈阳市 110024

王春雁, 中国医科大学医学影像系 辽宁省沈阳市 110001

许元鸿, 教授, 主要从事肝、胆、胰、胃肠肿瘤的外科治疗及实验研究工作。

作者贡献分布: 许元鸿、刘哲及郭克建对此文贡献均等; 此题由许元鸿与郭克建设计; 研究过程由刘哲与杜瑞霞完成; 数据分析由刘哲与王春雁完成; 论文撰写由许元鸿、刘哲及郭克建完成。

通讯作者: 许元鸿, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普通外科. xuyuanhongcmu@126.com

收稿日期: 2011-07-27 修回日期: 2011-09-15

接受日期: 2011-10-02 在线出版日期: 2011-10-08

## JDP2 suppresses transforming growth factor- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cell line Panc-1

Yuan-Hong Xu, Zhe Liu, Ke-Jian Guo, Rui-Xia Du, Chun-Yan Wang

Yuan-Hong Xu, Zhe Liu, Ke-Jian Guo, Department of Pancreatic Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Rui-Xia Du, Department of Otorhinolaryngology, Fengtian Hospital, Shenyang Medical University, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Chun-Yan Wang, Department of Imaging Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yuan-Hong Xu, Professor, Department of Pancreatic Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. xuyuanhongcmu@126.com

Received: 2011-07-27 Revised: 2011-09-15

Accepted: 2011-10-02 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To determine the correlation between over-expression of Jun dimerization protein 2 (JDP2) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human pancreatic cancer cell line Panc-1.

**METHODS:** Panc-1 cells were divided into three groups: negative control group, JDP2-transfected group, and empty vector-transfected group. The JDP2-transfected group and empty vector-trans-

fected group were transiently transfected with PCEFL-HA-JDP2 vector and pCEFL vector, respectively. Untreated Panc-1 cells were used as normal controls. Forty-eight hours after transfection, cells were treated with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL). Cell morphological alternations were examined by phase-contrast microscopy. The expression of mesenchymal marker vimentin and epithelial marker E-cadherin was detected by RT-PCR and Western blot. Cell migration was determined by Transwell motility assay.

**RESULTS:** TGF- $\beta$ 1-induced EMT was inhibited in the JDP2-transfected group. Compare to the negative control group, cells in the JDP2-transfected group showed no fibroblastic morphology and no significant changes in the levels of E-cadherin and vimentin and in migration ability ( $48.0 \pm 5.3$  vs  $52.0 \pm 7.2$ ). However, cells in the vector-transfected group showed loss of cell-cell contacts, fibroblastic morphology, decreased expression of E-cadherin (mRNA:  $P < 0.01$ ; protein:  $P < 0.05$ ), increased expression of vimentin ( $P < 0.01$ ) and migration ability ( $48.0 \pm 5.3$  vs  $81.0 \pm 10.7$ ,  $P < 0.01$ ) when compared to the negative control group.

**CONCLUSION:** JDP2 can inhibit TGF- $\beta$ 1-induced EMT in Panc-1 cells and may be a molecular target for pancreatic carcinoma therapy.

**Key Words:** Epithelial -mesenchymal transition; Jun dimerization protein 2; Pancreatic cancer; Transforming growth factor- $\beta$ 1

Xu YH, Liu Z, Guo KJ, Du RX, Wang CY. JDP2 suppresses transforming growth factor- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cell line Panc-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2931-2936

## 摘要

**目的:** 研究JDP2与TGF- $\beta$ 1诱导的人胰腺癌细胞系Panc-1上皮向间质转化之间的关系。

**方法:** 实验分为空白对照组、JDP2转染组、空质粒转染组3组, 并分别用P、P-J-T、P-V-T

## ■背景资料

胰腺癌是常见的恶性肿瘤。由于其早期发生微转移及其临床症状出现较晚而令其治疗效果不佳; JDP2, 作为AP-1类的抑制因子之一, 在多种恶性肿瘤中表达降低, 极可能成为胰腺癌研究的新方向。

## ■同行评议者

谭晓冬, 副教授, 中国医科大学盛京医院胰腺甲状腺外科; 刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科



## ■ 研发前沿

关于恶性肿瘤侵袭、转移机制的研究目前已经成为研究肿瘤发生与发展的热点, JDP2, 作为一种抑癌因子, 通过调控其表达极有可能成为抑制胰腺癌发生、转移的新的分子靶向治疗。

缩写代表. 用pCEFL-HA-JDP2质粒和pCEFL空质粒瞬时转染人胰腺癌细胞系Panc-1, 48 h之后应用TGF- $\beta$ 1分别刺激JDP2转染和空质粒转染组细胞48 h. 以正常的Panc-1细胞为空白对照组, 仅加等量的PSB. 倒置显微镜下观察各组细胞的形态学变化的差异; 应用RT-PCR及Western blot的方法检测E-cadherin及vimentin的蛋白及mRNA表达变化; 应用Transwell侵袭实验观察各组细胞的迁移能力。

**结果:** P-J-T组能够明显抑制由TGF- $\beta$ 1诱导产生的EMT. 与P组相比, P-J-T组大部分细胞没有明确的形态学上的变化, E-cadherin及vimentin蛋白及mRNA表达变化不明显, 迁移能力亦无明确差异( $48.0 \pm 5.3$  vs  $52.0 \pm 7.2$ ), 未成功诱导EMT; 而P-V-T组Panc-1细胞大多数变成长梭形, 细胞间紧密连接丢失, E-cadherin表达明显降低(mRNA表达:  $P < 0.01$ ; 蛋白表达:  $P < 0.05$ ), vimentin蛋白及mRNA表达明显升高( $P < 0.01$ ), 侵袭至小室下室的细胞明显增加( $48.0 \pm 5.3$  vs  $81.0 \pm 10.7$ ,  $P < 0.01$ ), 出现非常显著的上皮向间质转化特征。

**结论:** JDP2具有明显抑制EMT的作用, JDP2转染后的胰腺癌细胞系可以明显抑制由TGF- $\beta$ 1诱导的EMT, 这使得JDP2有可能成为新的胰腺癌的靶向治疗因子。

**关键词:** Jun二聚化蛋白2; 胰腺癌; 上皮向间质转化; 转化生长因子- $\beta$ 1

许元鸿, 刘哲, 郭克建, 杜瑞霞, 王春雁. JDP2在TGF- $\beta$ 1诱导的人胰腺癌细胞系Panc-1上皮向间质转化中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2931-2936  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2931.asp>

## 0 引言

胰腺癌, 是侵袭、转移能力最强的消化系统常见恶性肿瘤之一. 其较早便出现微转移, 大多数患者早期无显著临床症状, 故而一般就诊较晚, 5年生存率不足5%<sup>[1]</sup>. Jun二聚化蛋白2(Jun dimerization protein 2, JDP2), 是以转录活化因子蛋白1(activator protein-1, AP-1)成员之一的c-Jun的结合蛋白分离出来的<sup>[2]</sup>. 其由163个氨基酸组成, 并含有一个碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)结构. 目前已经有越来越多的证据表明, JDP2是一种广泛的AP-1抑制蛋白<sup>[2,3]</sup>. 尽管JDP2在肿瘤的发生、发展过程中的作用有少量报道, 但是其确切作用机制尚不清楚, 其与胰腺癌的关系的研究则更是空白. 我们实验小组在之前

的研究中发现与癌旁相比, JDP2的蛋白表达含量在胰腺癌组织中明显下降<sup>[4]</sup>. 上皮向间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)已经在多种恶性肿瘤中得到证明<sup>[5-7]</sup>. 其典型的特征是细胞极性的消失、细胞和细胞之间黏附能力的丧失、侵袭能力的增强、上皮标志物表达降低以及间质标志物表达的升高. 目前, 关于胰腺癌中JDP2与EMT的关系未见报道. 本研究通过转染pCEFL-HA-JDP2质粒来观察过表达JDP2对胰腺癌EMT形成的影响, 并检测EMT相关因子的表达变化, 以求探讨JDP2在胰腺癌EMT的诱导过程中所发挥的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胰腺癌细胞株Panc-1购自上海中科院细胞库, 培养于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中, 置于37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中, 每2 d换液1次, 每3-4 d传代1次. DMEM培养基和胎牛血清均购自Gibco公司; lipofectamine 2000购自Invitrogen公司; RNAiso plus及逆转录试剂PrimeScript® RT reagent Kit均购自日本TAKARA公司; TGF- $\beta$ 1购自Repro tech公司; Transwell侵袭小室购自Corning公司; Matrigel胶购自B.D.公司; JDP2、E-cadherin、vimentin、GAPDH引物由南京金斯瑞公司合成; 兔抗羊E-cadherin、vimentin单克隆抗体购自Santa Cruz公司, ECL化学发光液购自碧云天公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 转染与EMT构建:** 表达JDP2质粒pCEFL-HA-JDP2由以色列Ami Aroheim教授馈赠. 当细胞在6孔板上培养达到70%-80%融合时, 用lipofectamine 2000将pCEFL-HA-JDP2或pCEFL空质粒按照说明书瞬时转染至Panc-1细胞中, 转染48 h后, 继续用含有TGF- $\beta$ 1(10  $\mu$ g/L)的DMEM培养基培养48 h, 倒置相差显微镜观察细胞形态变化. 成功的转染由RT-PCR验证。

**1.2.2 RT-PCR检测vimentin、E-cadherin、JDP2的表达:** 细胞总RNA的提取: 收集各实验组细胞, 按照TAKARA公司RNAiso plus试剂盒提取RNA, 电泳鉴定RNA质量, A<sub>260</sub>测浓度. 引物序列: JDP2: sense primer: (5'-AGA CCC AGA TTG AGG AGC TG-3'), antisense primer: (5'-AGT GGG TTG CCT TCT GAC CTC-3') 124bp; E-cad: sense primer: (5'-TCC CAT CAG CTG CCC AGA AA-3'), antisense primer: (5'-TGA CTC CTG TGT TCC TGT TA-3') 500bp; Vimentin: sense primer:

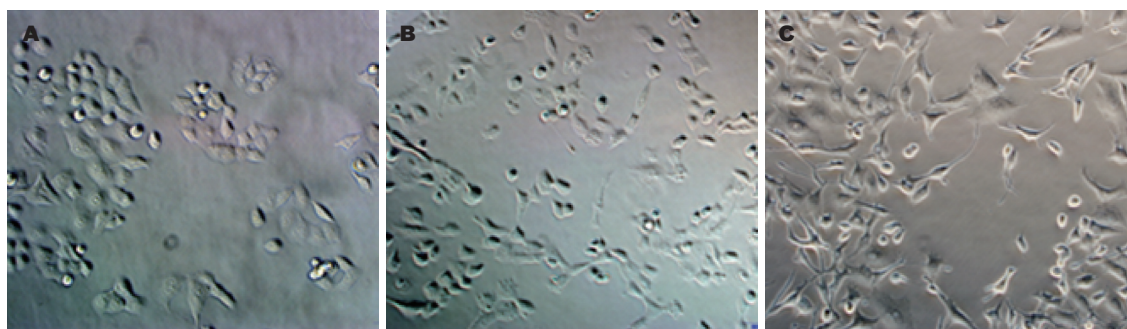


图1 P组、P-J-T组、P-V-T组细胞形态学的差异(光镜 $\times 200$ )。P-J-T组与P组相比细胞与细胞间略有分散,部分细胞变成梭形;P-V-T组细胞形态变化异常明显,绝大部分细胞变成梭形,形成典型的EMT。A: P组; B: P-J-T组; C: P-V-T组。

#### ■ 相关报道

Heinrich等发现,在他们检测的53例取自7种不同类型恶性肿瘤的标本中,JDP2的表达水平在35.8%的癌组织标本呈不同程度下降,而只有在5.8%的样品显示相反的结果。

(5'-CCA GTG CGT GAA ATG GAA G-3'), anti-sense primer: (5'-TCA AGG TCA TCG TGA TGC TG-3')366bp; GAPDH: sense primer: (5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG G-3'), anti-sense primer: (5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3')982bp. PCR扩增条件: 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 57 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 35个循环。2%琼脂糖凝胶电泳,结果采用quantity one 成像分析软件分析。实验重复3次。

**1.2.3 Western blot检测E-cadherin、Vimentin表达:**严格按照RIPA蛋白裂解液试剂盒说明书进行各组蛋白的提取,将蛋白与5 $\times$ 蛋白上样缓冲液以4:1混合后煮沸变性5 min,置于10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,分离的蛋白转移至PVDF膜上之后,用5%脱脂奶粉配置的TBST室温封闭2 h,加入E-cadherin(1:800)、vimentin(1:1000)、GAPDH(1:1500)一抗后4 $^{\circ}$ C封闭过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗室温2 h, TBST洗膜,5 min $\times$ 4次,化学发光法(electrochemiluminescence, ECL)显色。实验重复3次。

**1.2.4 Transwell小室侵袭实验:**Transwell小室上室铺50  $\mu$ L(1 g/L)Matrigel生物胶,下室中加入含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基600  $\mu$ L。所有实验细胞均调整密度为 $2 \times 10^5$ 个/孔,种于小室上室。放于培养箱中培养24 h。之后用4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色,200倍显微镜下计数,任意选取5个视野,以其平均细胞数为侵袭至膜上的细胞数,每组重复3次实验,求取平均数为结果。

**统计学处理** 所有计量资料均采用mean $\pm$ SD表示。采用SPSS13.0软件对结果进行分析,应用t检验统计分析; $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 P组、P-J-T组、P-V-T组细胞的总RNA提取** 细胞总的RNA提取经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**2.2 各组细胞形态学变化** P-J-T组与P组相比,TGF- $\beta$ 1刺激48 h后细胞形态学变化不明显(图1B);P-V-T组与P组相比,TGF- $\beta$ 1刺激48 h后细胞大多数变成长梭形,细胞间紧密连接丢失(图1C)。

**2.3 各组细胞EMT相关标志物及侵袭能力的检测** E-cadherin、vimentin表达及细胞侵袭能力变化与P组相比,P-J-T组E-cadherin的蛋白及mRNA表达略有下调,P-V-T组表达则下调明显(图2A, B);而P-J-T组vimentin的蛋白表达则略有升高,P-V-T组表达升高明显(图2A, B)。成功的JDP2转染由RT-PCR验证(图2C)。同时transwell侵袭实验证明细胞侵袭能力在P-V-T组显著升高(图3)。

## 3 讨论

JDP2,作为一种广泛的AP-1抑制蛋白,可以和自身以及c-Jun, JunB, JunD或ATF-2形成二聚体,并抑制Jun, c-Fos和ATF-2等的转录活性<sup>[3]</sup>。JDP2是通过回收HDAC3(histone deacetylase 3)到原癌基因c-jun的调控领域的方式来抑制其表达<sup>[8]</sup>;还可以直接抑制HAT(histone acetyltransferase)的活性<sup>[9]</sup>;并作为DNA结合蛋白,JDP2具有nucleosome assembly功能<sup>[9]</sup>;Heinrich等<sup>[10]</sup>发现,在他们检测的53例取自七种不同类型恶性肿瘤的标本中,JDP2的表达水平在35.8%的癌组织标本呈不同程度下降,而只有在5.8%的样品显示相反的结果。癌基因k-Ras的突变是胰腺癌发生早期关键事件之一,大约有30%的早期胰腺癌及几乎100%进展期胰腺癌伴有此基因的突变<sup>[11-13]</sup>。被激活的k-Ras可以通过包括MEKK/SEK/JNK/AP-1(ATF-2/Jun)途径在内的多种传导途径来诱导细胞的转化<sup>[11-13]</sup>。c-Jun在胰腺癌中的表达增高,证明Ras/AP-1传导途径有可能参与胰腺癌的发生。JDP2因为可以和自身以及c-Jun, JunB, JunD或ATF-2形成二聚体,并抑制c-Jun, c-Fos和ATF-2等的转录活性,这提示JDP2很可能通过抑制

## ■创新盘点

本研究主要探讨过表达JDP2的胰腺癌细胞系对TGF- $\beta$ 1诱导的上皮向间质转化的抑制作用,为进一步研究胰腺癌的治疗提供了新的方向。

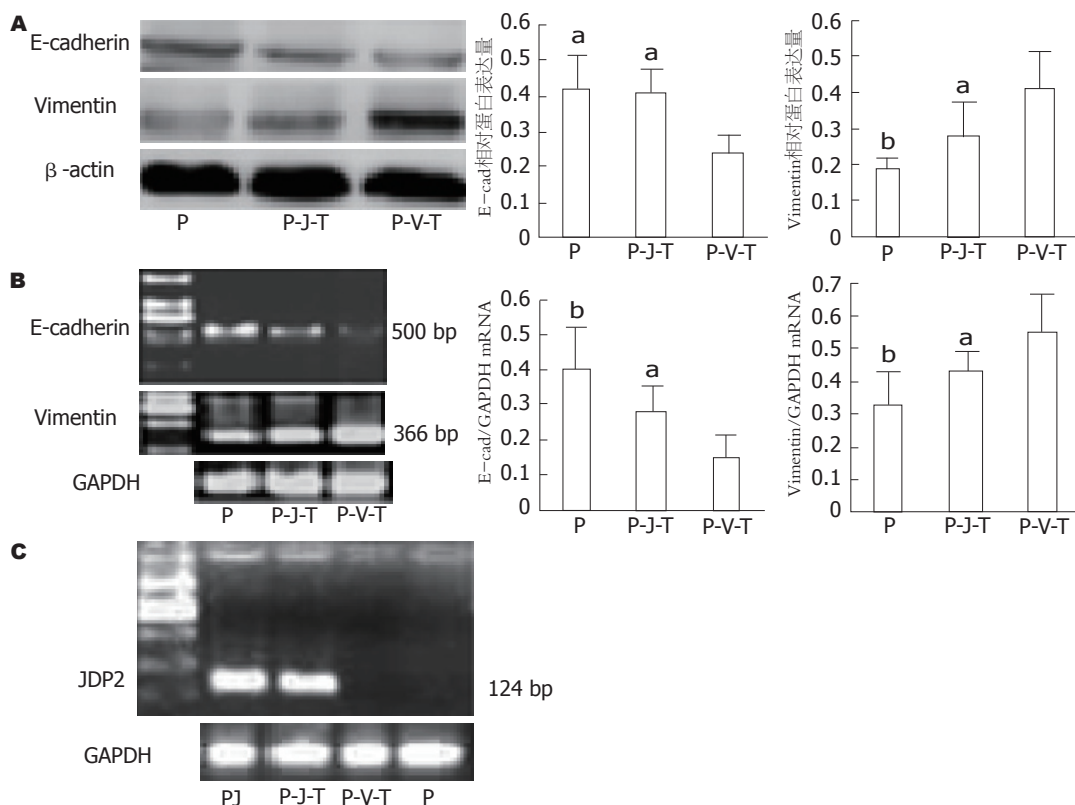


图2 PP组、P-J-T组、P-V-T组E-cadherin及vimentin的表达变化。A: Western blot检测E-cadherin及vimentin蛋白表达变化; B: RT-PCR检测E-cadherin及vimentin的mRNA表达变化; C: RT-PCR验证P-J-T是否成功, 其中P-J为单纯JDP2转染48 h细胞, P-J-T为JDP2转染后加TGF- $\beta$ 1诱导48 h细胞。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs P-V-T组。

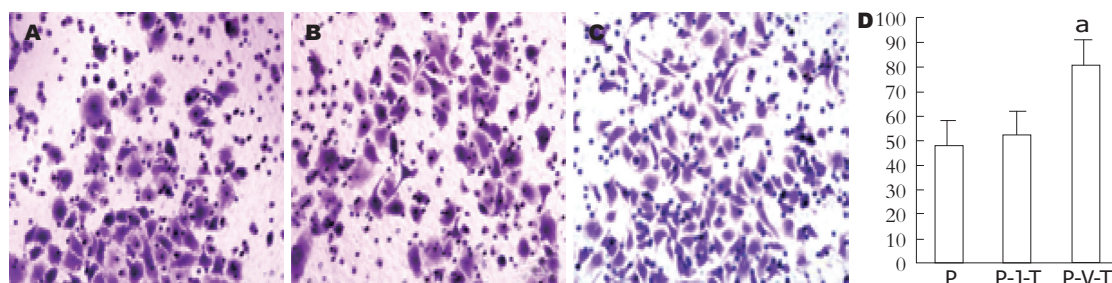


图3 P组、P-J-T组、P-V-T组细胞transwell侵袭实验对比。A-C: 各组细胞光镜下图片(结晶紫染色,  $\times 200$ ); A: P组; B: P-J-T组; C: P-V-T组。D: 各组细胞侵袭数直方图; <sup>a</sup> $P < 0.01$  vs P, P-J-T。

AP-1来阻断Ras信号传导途径。而作为AP-1的重要成员之一的ATF-2, 则可以同C-Jun、CREB形成二聚体<sup>[14,15]</sup>, 在黑色素瘤细胞中, ATF-2的表达与患者的预后密切相关<sup>[16]</sup>。王成等<sup>[17]</sup>证明ATF-2在结直肠癌组织中的表达明显高于癌旁组织。在乳腺癌中ATF-2稳定表达则与肿瘤细胞对DNA的损伤耐受有关<sup>[18]</sup>。ATF-2对脑的正常发育非常关键, 因为敲除ATF-2的小鼠大脑发育异常, 同时造成内耳、小脑及脑室的结构缺陷<sup>[19]</sup>。在人结直肠癌细胞系中加入托芬那酸(Tolfenamic acid, TA)刺激后, 磷酸化的ATF-2表达升高, 同时伴有ATF3的表达水平的升高, 而且ATF-2的表达

升高是通过P38 MAPK、JNK、ERK通路的激活来实现的<sup>[20]</sup>。由上所述, JDP2极可能通过诸如ERK、JNK等通路来抑制如ATF-2或/和c-Jun的表达来调控胰腺癌的EMT, 但是其与胰腺癌的关系, 特别是与胰腺癌的侵袭、转移能力之间的联系, 以及其与胰腺癌EMT之间的关系至今还是空白。

EMT近年来受到越来越多的关注。EMT的证实包括上皮表达标志如E-cadherin表达的下调, 间质表达标志如N-cadherin、vimentin、snail等表达的上调; 同时还有形态学的改变如: 细胞失去极性, 丢失细胞间紧密连接和黏附连接并且



可以观察到细胞获得了更强的浸润、转移的能力。经典的诱导EMT的因子为TGF- $\beta$ , 另外还有EGF、肝细胞生长因子(HGF)等。目前已经在多种癌症中证实<sup>[21-24]</sup>。TGF- $\beta$ 与其受体结合后, 激活细胞内Smad信号通路, 通过抑制E-cadherin的表达来诱导EMT发生<sup>[25,26]</sup>。在人的角质细胞中, 由TGF- $\beta$ 诱导产生的EMT需要Ras基因的激活<sup>[27]</sup>。而在人胰腺癌中, Collagen I通过激活JNK1而使得胰腺癌的N-cadherin表达上调从而增加其侵袭能力的<sup>[28]</sup>。在胰腺癌中, 单独转染带有SNAIL的质粒便可产生EMT<sup>[29]</sup>, 韩磊等<sup>[30]</sup>则发现, Genistein具有明显的抑制EMT的作用。

我们在本实验中, 首先应用pCEFL-HA-JDP2质粒成功转染入人胰腺癌细胞系Panc-1。P-J-T组细胞与P-V-T组细胞在TGF- $\beta$ 1刺激48 h后, 与P组相比, P-J-T组E-cadherin及vimentin变化不大, 侵袭能力也未见明确增加; 相反的, P-V-T组则构建出经典的EMT模型, 侵袭能力也显著提高。这说明, JDP2可抑制由TGF- $\beta$ 1产生的EMT, 提示我们在今后的抗肿瘤研究中可以将JDP2作为靶点, 探明其在胰腺癌治疗中的潜在应用价值。

#### 4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-130
- Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, Elledge SJ, Karin M. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3094-3102
- Jin C, Ugai H, Song J, Murata T, Nili F, Sun K, Horikoshi M, Yokoyama KK. Identification of mouse Jun dimerization protein 2 as a novel repressor of ATF-2. *FEBS Lett* 2001; 489: 34-41
- 汪海洋, 许元鸿, 郭克建. JDP2与胰腺癌侵袭及转移相关性. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2522-2525
- Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118: 277-279
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420-1428
- Jin C, Li H, Murata T, Sun K, Horikoshi M, Chiu R, Yokoyama KK. JDP2, a repressor of AP-1, recruits a histone deacetylase 3 complex to inhibit the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4815-4826
- Jin C, Kato K, Chimura T, Yamasaki T, Nakade K, Murata T, Li H, Pan J, Zhao M, Sun K, Chiu R, Ito T, Nagata K, Horikoshi M, Yokoyama KK. Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 331-338
- Heinrich R, Livne E, Ben-Izhak O, Aronheim A. The c-Jun dimerization protein 2 inhibits cell transformation and acts as a tumor suppressor gene. *J Biol Chem* 2004; 279: 5708-5715
- Torrisani J, Bournet B, Cordelier P, Buscail L. [New molecular targets in pancreatic cancer]. *Bull Cancer* 2008; 95: 503-512
- Mackenzie RP, McCollum AD. Novel agents for the treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9: 1473-1485
- Furukawa T. Molecular pathology of pancreatic cancer: implications for molecular targeting therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: S35-S39
- Benbrook DM, Jones NC. Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* 1990; 5: 295-302
- van Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 2001; 20: 2453-2464
- Berger AJ, Kluger HM, Li N, Kielhorn E, Halaban R, Ronai Z, Rimm DL. Subcellular localization of activating transcription factor 2 in melanoma specimens predicts patient survival. *Cancer Res* 2003; 63: 8103-8107
- 王成, 唐衡, 刘志红. ATF2与ATF3在结直肠癌中表达及临床病理意义. *现代生物医学进展* 2011; 11: 1505-1508
- Papassava P, Gorgoulis VG, Papaevangelidou D, Vlahopoulos S, van Dam H, Zoumpourlis V. Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 8573-8584
- Mei Y, Yuan Z, Song B, Li D, Ma C, Hu C, Ching YP, Li M. Activating transcription factor 3 up-regulated by c-Jun NH(2)-terminal kinase/c-Jun contributes to apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 2008; 151: 771-779
- Lee SH, Bahn JH, Whitlock NC, Baek SJ. Activating transcription factor 2 (ATF2) controls tolfenamic acid-induced ATF3 expression via MAP kinase pathways. *Oncogene* 2010; 29: 5182-5192
- Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res* 2007; 67: 1979-1987
- Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S, Nagayama M. Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Cancer Sci* 2003; 94: 593-597
- Bertran E, Caja L, Navarro E, Sancho P, Mainez J, Murillo MM, Vinyals A, Fabra A, Fabregat I. Role of CXCR4/SDF-1 alpha in the migratory phenotype of hepatoma cells that have undergone epithelial-mesenchymal transition in response to the transforming growth factor-beta. *Cell Signal* 2009; 21: 1595-1606
- Wang Z, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Kong D, Sarkar FH. Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 27-33
- Thuaud S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin CH, Moustakas A. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2006; 174: 175-183

#### ■应用要点

尽管JDP2在肿瘤发生过程中的作用有零星报道, 但其机制尚不清楚, 本研究将pCEFL-HA-JDP2质粒转染至胰腺癌细胞系Panc-1中, 而此高表达JDP2的细胞系则可以明显抑制由TGF- $\beta$ 1诱导的EMT, 此研究国内外未见报道。

## ■同行评价

本文立意有一定新意, 实验设计可行, 结果具有一定的学术价值。

- 26 Thuault S, Tan EJ, Peinado H, Cano A, Heldin CH, Moustakas A. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2008; 283: 33437-33446
- 27 Davies M, Robinson M, Smith E, Huntley S, Prime S, Paterson I. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *J Cell Biochem* 2005; 95: 918-931
- 28 Shintani Y, Hollingsworth MA, Wheelock MJ, Johnson KR. Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res* 2006; 66: 11745-11753
- 29 Nishioka R, Itoh S, Gui T, Gai Z, Oikawa K, Kawai M, Tani M, Yamaue H, Muragaki Y. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo. *Exp Mol Pathol* 2010; 89: 149-157
- 30 韩磊, 郭克建, 周文平, 陈希涛. Genistein对TGF- $\beta$ 1诱导人胰腺癌细胞上皮-间质转化的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2359-2363

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》正文要求

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

# Rb/E2F1调控途径在新疆哈萨克族食管鳞癌发生中的作用

马莉莉, 李卉, 王洪江, 陈艳, 郭琼, 尹娜, 李惠武

马莉莉, 李卉, 陈艳, 郭琼, 尹娜, 李惠武, 新疆医科大学基础医学院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

王洪江, 新疆医科大学附属肿瘤医院胸外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

马莉莉, 在读硕士, 主要从事肿瘤分子生物学的研究。

国家自然科学基金资助项目, NO. 30950012

作者贡献分布: 此课题由李惠武、李卉及马莉莉共同设计; 研究过程由马莉莉操作完成; 研究过程中的指导以及设备器材由李卉、陈艳、郭琼及尹娜提供; 数据统计分析及论文的撰写由马莉莉完成。

通讯作者: 李惠武, 教授, 博士生导师, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学基础医学院。huiwuli1234@163.com

收稿日期: 2011-08-07 修回日期: 2011-10-02

接受日期: 2011-10-06 在线出版日期: 2011-10-08

## Clinicopathological significance of Rb and E2F1 expression in esophageal squamous cell carcinoma

Li-Li Ma, Hui Li, Hong-Jiang Wang, Yan Chen, Qiong Guo, Na Yin, Hui-Wu Li

Li-Li Ma, Hui Li, Yan Chen, Qiong Guo, Na Yin, Hui-Wu Li, Preclinical Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
Hong-Jiang Wang, Department of Thoracic Surgery, Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30950012

Correspondence to: Hui-Wu Li, Professor, Preclinical Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. huiwuli1234@163.com

Received: 2011-08-07 Revised: 2011-10-02

Accepted: 2011-10-06 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of Rb and E2F1 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze their clinicopathological significance.

**METHODS:** Forty-eight ESCC specimens were taken from Xinjiang Kazaks patients and used in the study. Matched normal esophageal mucosal tissues were used as controls. The expression of Rb and E2F1 was detected by RT-PCR. The correlation of Rb and E2F1 expression with the development and progression of ESCC was then analyzed.

**RESULTS:** The positive rate of Rb expression was higher in ESCC than in normal esophageal mucosal tissue (64.6% vs 43.8%,  $P < 0.05$ ). E2F1 expression in ESCC showed no significant difference with that in normal esophageal mucosal tissue (70.8% vs 75%,  $P > 0.05$ ). Rb and E2F1 expression showed no significant correlation with tumor differentiation and stage (both  $P > 0.05$ ). Rb expression was positively correlated with that of E2F1 in ESCC ( $r = 0.867$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** High expression of Rb may be involved in the development and progression of ESCC.

**Key Words:** Esophageal squamous cell carcinoma; Rb; E2F1; RT-PCR

Ma LL, Li H, Wang HJ, Chen Y, Guo Q, Yin N, Li HW. Clinicopathological significance of Rb and E2F1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2937-2941

## 摘要

**目的:** 探讨Rb基因与转录因子E2F1在新疆哈萨克族食管鳞癌中的表达及临床意义。

**方法:** 应用RT-PCR法对48例新疆哈萨克族食管鳞癌组织及其配对的癌旁正常组织进行Rb和E2F1表达检测, 分析Rb/E2F1通路与新疆哈萨克族食管鳞癌发生发展之间的关系。

**结果:** 新疆哈萨克族食管鳞癌组织中Rb的阳性表达高于癌旁正常组织(64.6%, 43.8%)差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 转录因子E2F1的阳性表达率与癌旁正常组织阳性表达率(70.8%, 75%)差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。Rb、E2F1的表达与组织学分级及临床分期无关( $P > 0.05$ )。Rb阳性表达强度与E2F1的阳性表达强度之间呈正相关( $r = 0.867$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** Rb的高表达伴随新疆哈萨克族食管鳞癌的发生, E2F1可能作用于食管癌发生的早期阶段, 二者在新疆哈萨克族食管鳞癌的发生发展中起拮抗作用。

## ■背景资料

食管癌是世界常见十大恶性肿瘤之一, 其发病率随着年龄的增高而升高, 5年生存率在10%。全世界食管癌一半以上发生在中国, 主要为鳞癌。食管癌发病机制尚不明确, 除环境因素和饮食因素外, 高发区相同环境背景下, 不同家族患食管癌的人数有很大差异, 表明遗传因素在食管癌发病中的作用不可忽视。新疆是我国食管癌高发区之一, 尤以哈萨克族发病率最高。

## ■同行评议者

李晟磊, 副主任医师, 郑州大学第一附属医院病理科、河南省肿瘤病理重点实验室、郑州大学医学院病理教研室



## ■相关报道

Robbins等的实验研究表明, c-fos基因的表达能使静止期细胞进入细胞周期, 野生型Rb基因的蛋白产物能够抑制这种位于细胞核内的c-fos癌基因的表达。

**关键词:** 食管鳞癌, Rb, E2F1, 逆转录聚合酶链式反应

马莉莉, 李卉, 王洪江, 陈艳, 郭琼, 尹娜, 李惠武. Rb/E2F1调控途径在新疆哈萨克族食管鳞癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2937-2941

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2937.asp>

## 0 引言

食管癌是世界常见十大恶性肿瘤之一, 其发病率随着年龄的增高而升高, 5年生存率在10%. 全世界食管癌一半以上发生在中国, 主要为鳞癌. 食管癌发病机制尚不明确, 除环境因素<sup>[1]</sup>和饮食因素<sup>[2]</sup>外, 高发区相同环境背景下, 不同家族患食管癌的人数有很大差异, 表明遗传因素在食管癌发病中的作用不可忽视<sup>[3]</sup>. 新疆是我国食管癌高发区之一, 尤以哈萨克族发病率最高. 其调整死亡率是68.88/10万, 高出其他民族调整死亡率(5.13/10万)的10倍之多<sup>[4]</sup>. 在恶性肿瘤的发生中, 细胞周期调控紊乱起着重要的作用. E2F1是细胞周期调控机制中Rb/E2F通路最重要的转录活化因子, 主要调节细胞周期由G<sub>1</sub>期向S期过渡, 是细胞增殖和发育必需环节. 因此, 本实验采用RT-PCR方法检测Rb和E2F1在新疆哈萨克族食管鳞癌组织及相应癌旁正常组织中的表达, 并分析其与临床病理特征的关系, 为研究Rb/E2F1途径的细胞周期调控在新疆哈萨克族食管鳞癌发生、发展中的作用提供依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集新疆医科大学附属肿瘤医院经手术证实的新疆哈萨克族食管鳞癌及配对癌旁正常食管组织48例. 标本组织学分级: 组织分化高中分化39例, 低分化9例; TNM分期T1+T2共11例, T3+T4共37例; 临床分期 I - II期19例, III-IV期29例; 有淋巴结转移31例, 无淋巴结转移17例. RT-PCR扩增基因及内参照GAPDH均由上海生物工程技术有限公司合成, RNA提取试剂TRIzol购自Invitrogen公司, 逆转录试剂盒购自Promega公司, PCR即用试剂盒购自上海生物工程有限公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR法:** 严格按照RNA提取方法及逆转录试剂盒进行组织RNA提取和逆转录CDNA合成. 将食管鳞癌组织与癌旁正常食管黏膜组织在无菌的研钵中液氮研磨, 每100 mg组织加入1 mL TRIzol, 混匀, 其他步骤参照说明书操作. 提取的总RNA用Smart spec3000型紫外分光光度计

测定浓度和纯度, 在紫外透射仪上显示有28S、18S(部分可见到5S)两条rRNA. 说明提取的RNA完整. 取1 μg总RNA量用于反转录合成cDNA. cDNA合成细胞总RNA 2 μL, 50 IU/μL RNA酶抑制剂(RNasin) 0.5 μL, 5×逆转录反应缓冲液 3 μL, 10 mmol/L, 脱氧核糖核苷酸(dNTP)1.5 μL, 50 mg/L随机引物1 μL. 逆转录酶15 U, 25 mmol/L. 硫酸镁(MgCl<sub>2</sub>)0.5 μL, 42 °C反应90 min, 95 °C 5 min终止反应. 以上述逆转录cDNA为模板, 加入引物, 扩增基因片断, 反应总体系20 μL. 基因扩增引物序列及参数如下(表1, 2).

**1.2.2 结果判断标准:** PCR反应结束后, 扩增产物经2%琼脂糖电泳(80 V, 50 min)后, 紫外成像并在凝胶仪进行扫描定量, 以相关基因与内对照GAPDH的比值代表mRNA表达水平.

**统计学处理** 应用SPSS17.0统计软件包处理, 采用 $\chi^2$ 检验和Pearson相关性分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 Rb、E2F1在新疆哈萨克族食管鳞癌组织和癌旁正常组织中的表达** 将实验结果进行统计分下发现(表3), Rb、E2F1在食管鳞癌组织中表达的阳性率为64.6%和70.8%, 在正常食管黏膜组织中表达的阳性率为43.8%、75%. Rb在食管鳞癌组织中的阳性率高于正常黏膜组织, 其差异有统计学意义( $P = 0.028$ ,  $P < 0.05$ ), E2F1在食管鳞癌和正常黏膜组织中的表达无统计学意义( $P = 0.819$ ,  $P > 0.05$ , 表3). Rb与E2F1 mRNA电泳图(图1, 2).

**2.2 Rb、E2F1在新疆哈萨克族食管鳞癌组织中的表达与临床病理特征的关系** 经统计学分析, Rb、E2F1的表达在新疆哈萨克族食管鳞癌组织不同分化程度、TMN分期、临床分期、有无淋巴结转移之间差异均无显著性( $P > 0.05$ , 表4).

**2.3 新疆哈萨克族食管鳞癌中Rb与E2F1表达之间的关系** 食管鳞癌中Rb阳性31例, 阴性17例, E2F1阳性34例, 阴性14例. 经Spearman等级相关检验显示, Rb与E2F1在新疆哈萨克族食管鳞癌呈正相关( $r = 0.867$ ,  $P = 0.000$ ,  $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

各种研究表明, 肿瘤的共同特征是细胞失控性生长, 多步骤多基因的发生, 导致细胞周期机制的紊乱<sup>[5]</sup>. 人们越来越清楚地认识到, 肿瘤是一类细胞周期疾病. Rb基因位于人13号染色体q14,

表 1 基因扩增引物序列

基因名	引物序列	扩增产物(bp)
Rb	上游引物: 5'-AACCTCCTAAACCACTG-3'	490
	下游引物: 5'-GGGCCATTCTTACTATCC-3'	
E2F1	上游引物: 5'-CCCAACTCCCTCTACCCTT-3'	217
	下游引物: 5'-CTCCCATCTCATATCCATCCTG-3'	
GAPDH	上游引物: 5'-CGCGGGCTCTCCAGAACATCAT-3'	298
	下游引物: 5'-CCAGCCCCAGCGTCAAAGGTG-3'	

表 2 扩增反应条件

基因名	反应条件
Rb	95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C 7 min
E2F1	95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C 7 min
GAPDH	95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C 7 min

表 3 Rb、E2F1在食管黏膜组织中的表达 (n = 48)

组织	Rb			E2F1		
	+	-	P值	+	-	P值
食管鳞癌组织	31	17		34	14	
正常食管黏膜	21	29	<0.05	36	12	>0.05



图 1 Rb mRNA(490 bp)琼脂糖凝胶电泳图. M: DNA Marker; 1、3、5、7: 癌组织; 2、4、6、8: 癌旁组织.

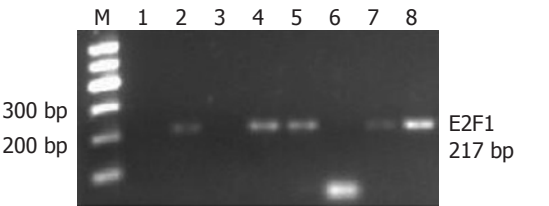


图 2 E2F1 mRNA(217 bp)琼脂糖凝胶电泳图. M: DNA Marker; 1、3、5、7: 癌组织; 2、4、6、8: 癌旁组织.

其产物在细胞周期的控制中起关键作用, 他对肿瘤的抑制作用与转录因子E2F1有关. E2F1是E2Fs转录因子家族的成员之一, 具有激活转录和促进细胞凋亡的作用<sup>[6]</sup>. Rb/E2F1通路是细胞周期中的重要环节, 主要调节细胞越过细胞周期限制点, 由G<sub>1</sub>期向S期过渡, 是细胞增殖和发育的必需环节.

Robbins等<sup>[6]</sup>的实验研究表明, *c-fos*基因的表达能使静止期细胞进入细胞周期, 野生型Rb

基因的蛋白产物能够抑制这种位于细胞核内的*c-fos*癌基因的表达. Cobrinik等<sup>[7]</sup>研究发现, 在G<sub>0</sub>期, *cdc2*含量很低, 而在G<sub>1</sub>到S期转变过程中, *cdc2*的表达量明显升高. 低磷酸化时Rb的作用是抑制原癌基因*c-myc*和*c-fos*等的转录, 阻遏细胞的生长; 高磷酸化时Rb的作用是促进细胞周期. 磷酸化为Rb基因调节细胞生长分化的主要形式. 本实验中, Rb基因的阳性表达率随组织分化程度增高变化不大(66.7%, 64.1%), T1+T2期与T3+T4相当(63.6%, 64.9%). 其表达阳性率在临床分期中变化较明显, III-IV期中表达高于I-II期(72.4%, 52.6%), 在有淋巴结转移组织中表达阳性率高于无淋巴结转移组织(67.7%, 58.8%), 其之间差异均无显著性(P>0.05). Rb基因在食管鳞癌组织中的阳性率高于正常食管黏膜组织(64.6%, 43.8%), 且其表达有显著性差异(P<0.05). 之前, 在对同一批标本*c-myc*、Survivin等基因的表达检测发现, *c-myc*、Survivin在新疆哈萨克族食管鳞癌组织中高表达且有统计学意义<sup>[8,9]</sup>. 这些结果提示在新疆哈萨克族食管鳞癌发生过程中, Rb的高表达也许与上述原癌基因过表达导致肿瘤发生的过程有关, 由于*c-fos*、*cdc2*和*c-myc*的高表达可以引发Rb基因的高表达, 但其确切的机制尚待进一步实验研究证实.

越来越多的观点<sup>[10]</sup>认为E2F1在细胞中扮演着“阴”和“阳”的双重作用. 有研究表明, 敲除E2F1基因的小鼠生殖系统、淋巴管、肺脏等多个器官可发生肿瘤<sup>[11]</sup>; 另有报道, 在培养的组织细胞和转基因小鼠中过表达E2F1可诱

**■创新盘点**  
本实验采用 RT-PCR方法检测Rb和E2F1在新疆哈萨克族食管鳞癌组织及相应癌旁正常组织中的表达, 并分析其与临床病理特征的关系, 为研究Rb/E2F1途径的细胞周期调控在新疆哈萨克族食管鳞癌发生、发展中的作用提供依据.

## ■同行评价

本文选题较好,有一定的学术价值.

表 4 Rb和E2F1在新疆哈萨克族食管鳞癌组织中的表达

项目	<i>n</i>	Rb(%)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	E2F1(%)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
浸润程度							
T1+T2	11	7(63.6)	0.000	1.000	6(54.5)	1.832	0.176
T3+T4	37	24(64.9)			28(75.7)		
临床分期							
I - II 期	19	10(52.6)	1.964	1.161	12(63.2)	0.897	0.344
III - IV 期	29	21(72.4)			22(75.9)		
分化程度							
高中分化	39	25(64.1)	0.000	1.000	30(76.9)	2.327	0.127
低分化	9	6(66.7)			4(44.4)		
淋巴结转移							
N0	17	10(58.8)	0.382	0.537	12(70.6)	0.000	0.984
N1	31	21(67.7)			22(71.0)		

导凋亡<sup>[12]</sup>. 也有研究显示, E2F1 的异常表达能够促使细胞过度增殖和恶向转化<sup>[13]</sup>.

在食管癌的发生中, 部分伴有HPV感染. Shen等<sup>[14]</sup>用HPV18 E6/E7体外感染人胚食管上皮, 发现可使细胞永生化, 并在促癌化合物TPA的协同作用下细胞发生了恶性转变. 这一研究结果为HPV与食管癌的病因和发病学的关系提供了直接证据. Whyte等<sup>[15]</sup>认为Rb基因蛋白产物可能是一个细胞对环境抑制信息作出反应的环节, Rb基因蛋白产物丧失, 使细胞对外界的抑制信息失去反应能力, 造成细胞无限制的生长和增殖, 引起肿瘤形成. 在G<sub>1</sub>期活性形式的Rb未磷酸化蛋白由于一些病毒癌基因产物的结合而转为失去活性的复合物形式, 导致细胞进入S期.

E7蛋白是HPV的主要转化蛋白, 具有Rb蛋白的结合位点. 正常情况下, 非磷酸化pRb与E2F1特异结合形成pRb-E2F1复合物, 抑制E2F1对靶基因的转录, 抑制细胞增殖. 这种高亲和性使pRb-E2F1复合物解离, E2F1被游离, 从而发挥其转录因子的作用, 转录由G<sub>1</sub>期进入S期所需的基因, 导致细胞的生长调控特性丧失. 除了结合Rb, E7蛋白还与某些蛋白如p107、p130和一些激酶p33 CDK<sub>2</sub>等结合, 激活E2F1. 本实验中, E2F1在食管鳞癌高中分化组织中高表达(76.9%), 在中低分化组织中低表达(44.4%). 在T3+T4期组织中高于T1+T2期组织(75.7%, 54.5%), 临床分期III-IV期中表达高于I-II期(75.9%, 63.2%), 在有淋巴结转移组织和无淋巴结转移组织中阳性表达率相当(71%, 70.6%), 但其之间差异均无显著性( $P>0.05$ ), 表明由于HPVE7蛋白产物与Rb未磷酸化产物结合而使

E2F1游离, 细胞进入增殖状态, 引起肿瘤发生, Rb基因作为抑癌基因抑制肿瘤的发生, 造成过表达. 而E2F1的高表达很可能是食管鳞癌发生的早期事件, 也许与HPV的感染存在关系, 需要进一步实验确定.

总之, Rb在新疆哈萨克族食管鳞癌组织中高表达, 且与E2F1的表达呈正相关, Rb和E2F1主导的Rb/E2F1调控途径与原癌基因诱发的新疆哈萨克族食管鳞癌的发生发展过程起拮抗作用, 其表达也许与食管癌中*c-fos*、*cdc2*、*c-myc*和Survivin基因的表达及HPV感染有关, 这为进一步研究新疆哈萨克族食管癌发生机制提供了实验依据.

## 4 参考文献

- 1 王瑞林. 食管癌研究进展. 郑州: 河南医科大学出版社, 1996: 11
- 2 van Rensburg SJ. Epidemiologic and dietary evidence for a specific nutritional predisposition to esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 243-251
- 3 徐耀初, 洒荣桂, 沈靖, 钮菊英, 沈洪兵, 叶本法, 吴剑南, 胡旭, 陈瑾. 食管癌遗传流行病学病例对照研究. *南京医科大学学报* 1995; 15: 512
- 4 张月明. 新疆食管癌的分布. *新疆医学院学报* 1988; 11: 139-144
- 5 Lewin B. *Genes*. VII. Oxford: Oxford University Press, 2000: 999-1005
- 6 Robbins PD, Horowitz JM, Mulligan RC. Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product. *Nature* 1990; 346: 668-671
- 7 DeCaprio JA, Furukawa Y, Ajchenbaum F, Griffin JD, Livingston DM. The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1795-1798
- 8 李卉, 王洪江, 陈艳, 庞作良, 张丽萍, 李惠武. c-myc与PCNA在哈萨克族食管癌组织中的表达及其临床相关性研究. *癌变·畸变·突变* 2010; 22: 433-435



- 9 彭辉, 陈艳, 刘涛, 李卉, 张雪, 庞作良, 王洪江, 周新, 赵学信, 李惠武. Survivin基因在哈萨克族食管癌中表达的研究. 地方病通报 2008; 23: 4-6
- 10 Wenzlau JM, Liu Y, Yu L, Moua O, Fowler KT, Rangasamy S, Walters J, Eisenbarth GS, Davidson HW, Hutton JC. A common nonsynonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 2693-2697
- 11 Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* 1996; 85: 537-548
- 12 Holmberg C, Helin K, Sehested M, Karlström O. E2F-1-induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene* 1998; 17: 143-155
- 13 Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 2005; 24: 2810-2826
- 14 Rasschaert J, Malaisse WJ. Glycogen accumulation in cultured tumoral or normal pancreatic islet and acinar cells. *Int J Mol Med* 2001; 8: 63-65
- 15 Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334: 124-129

编辑 李军亮 电编 何基才

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

#### 1 修回稿信件

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

#### 2 稿件修改

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

#### 3 版权

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

# 骨髓间充质干细胞治疗急性胰腺炎的潜能

赖薇, 邓明明

## ■背景资料

急性胰腺炎是胰腺组织水肿、出血甚至坏死的炎症反应,目前缺乏特异性的治疗方法。而骨髓来源的间充质干细胞作为一种具有多向分化潜能、修复及抗炎作用的细胞,已证明有治疗急性胰腺炎的潜能。

赖薇, 邓明明, 泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

作者贡献分布: 本综述由赖薇完成; 邓明明审校。

通讯作者: 邓明明, 教授, 主任医师, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院消化内科。793070544@qq.com

电话: 0830-3165331

收稿日期: 2011-07-31 修回日期: 2011-09-03

接受日期: 2011-10-01 在线出版日期: 2011-10-08

## Potential therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in acute pancreatitis

Wei Lai, Ming-Ming Deng

Wei Lai, Ming-Ming Deng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Ming-Ming Deng, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. 793070544@qq.com

Received: 2011-07-31 Revised: 2011-09-03

Accepted: 2011-10-01 Published online: 2011-10-08

## Abstract

Acute pancreatitis is an inflammatory disease with dropsical, hemorrhagic or even necrotic conditions of the pancreas caused by several factors. It has significant morbidity and mortality, but no specific therapy is available so far. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) have multiple differentiation potential. They can not only differentiate to form endoderm and ectoblast cells, but also participate in tissue regeneration, repair and anti-inflammation. Recent studies have demonstrated that BMSCs have potential therapeutical effect in acute pancreatitis. BMSCs can migrate to injury tissue, multiply, be transformed to pancreatic stem cells and then participate in the process of regeneration. They also renovate vascular endothelium to improve blood circulation, adjust and control the cytokines to decrease inflammation, and regulate immunization. Here we review the recent advances in understanding the role of BMSCs in the treatment of acute pancreatitis.

## ■同行评议者

单云峰, 副主任医师, 温州医学院附属第一医院肝胆外科

**Key Words:** Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Acute pancreatitis; Therapy

Lai W, Deng MM. Potential therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2942-2946

## 摘要

急性胰腺炎是多种病因导致的胰腺水肿、出血,甚至坏死的炎症性疾病,有较高的发病率及死亡率,目前仍缺乏特异性的治疗方法。而骨髓来源的间充质干细胞(marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)作为一种具有多向分化潜能的细胞,可跨越中胚层向内、外胚层的其他组织细胞转化,并具有再生、修复及抗炎的作用。目前的研究已证明, BMSCs有治疗急性胰腺炎的潜能。主要通过向损伤部位迁移并增殖,转化为胰腺干细胞,参与组织再生;修复血管内皮,改善血流;调控炎症相关的细胞因子,减轻炎症反应以及免疫调节功能来发挥其治疗作用,为临床上急性胰腺炎的治疗提供了新的思路。

**关键词:** 骨髓来源; 间充质干细胞; 急性胰腺炎; 治疗

赖薇, 邓明明. 骨髓间充质干细胞治疗急性胰腺炎的潜能. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2942-2946

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2942.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是由多种病因导致的胰腺组织水肿、出血甚至坏死的炎症反应。可按严重程度分为轻型(mild acute pancreatitis, MAP)和重型(severe acute pancreatitis, SAP)。其发病机制尚不完全清楚,目前公认的是腺泡细胞分泌的酶原物质被激活,导致胰腺组织的自身消化<sup>[1-4]</sup>。急性胰腺炎作为胰腺常见的炎症组织环境,因为其显著的发病率和死亡率,成为临床工作中未解决的难题<sup>[1,5]</sup>。酒精和胆结石(包括微结石)是AP最常见的发病原因<sup>[1,5,6]</sup>,其他少见的原因包括:药物、毒素、感染、外伤、组

织缺血、解剖变异、代谢异常(高钙血症及高脂血症)、自身免疫性疾病等等。时至今日,仍然没有治疗AP的特效方法。目前的治疗主要局限于一般的支持治疗,如液体疗法及营养支持、抗炎治疗以及通过ERCP治疗胆石性胰腺炎<sup>[5,7,8]</sup>。因此,开发一种能有效减少AP发病率及死亡率的方法迫在眉睫。

1987年Friedenstein等<sup>[9]</sup>发现在塑料培养皿中培养的贴壁的骨髓单个细胞在一定条件下可分化为多种类型的细胞,而且经过20-30个培养周期仍能保持其多向分化潜能。由于骨髓中的这种多能细胞能够分化为多种中胚层来源的间质细胞,故称之为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。目前研究已证明, MSCs在体内体外均表现出较强的可塑性,能分化出3个胚层来源的多种组织细胞<sup>[10-12]</sup>。近来研究表明,骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)在许多以炎症为基础病变的疾病的治疗中,都发挥了潜在的再生、修复及抗炎作用<sup>[13-15]</sup>。Cui等<sup>[16]</sup>及滕春燕等<sup>[17]</sup>通过移植或回输BMSCs治疗SAP模型或胰腺损伤模型,结果均显示血清淀粉酶水平明显低于对照组,病理检查结果显示治疗组胰腺损伤程度亦轻于对照组,提示BMSCs有助于减轻AP的病情。

BMSCs因取材方便,骨髓穿刺即可获得,创伤小,无伦理道德影响,属于前体干细胞,免疫原性小,方便体外扩增及分离,成为近来研究的热点。本文主要讨论BMSCs在急性胰腺炎中起到的修复胰腺损伤、抑制炎症反应及免疫调节功能方面的作用。

## 1 BMSCs向损伤部位的迁移与增殖

BMSCs发挥治疗作用的关键是到达损伤的部位。已有研究表明,骨髓间充质干细胞可随血液循环到达全身其他器官组织<sup>[16,18,19]</sup>,参与生理更新和病理损伤修复。更有叶海清等<sup>[20]</sup>、陆奕等<sup>[21]</sup>、王建祥等<sup>[22]</sup>及Jung等<sup>[23]</sup>的实验显示,相比于其他组织,被标记BMSCs多出现在被损伤的胰腺组织中。在Jung<sup>[23]</sup>的实验中还发现,重度胰腺炎的胰腺组织中比中度胰腺炎发现更多的BMSCs聚集。此结果与早前Prockop<sup>[24]</sup>的研究一致,即组织损伤可以促进骨髓干细胞的迁入,可能因为损伤部位产生的细胞因子可引导干细胞到达该部位,类似于白细胞的趋化移动。赵航等<sup>[25]</sup>的实验证明,急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pan-

creatitis, ANP)大鼠在12 h内骨髓BMSCs的克隆形成率显著高于对照组,证明ANP时BMSCs的增殖能力增强。

## 2 BMSCs在病损部位转化为胰腺干细胞,并修复血管内皮

胰腺组织有自我修复的能力,提示胰腺中可能存在具有分裂及分化功能的细胞。Bonner-weir等<sup>[26]</sup>切除大鼠90%胰腺后,残存的胰腺组织明显增殖,形成新的胰岛和胰腺外分泌组织,提示胰腺存在能分化成具有特异功能的细胞。Ishiwata等<sup>[27]</sup>在L-精氨酸诱导的胰腺炎的胰腺组织内检测到nestin阳性细胞,而一般认为nestin、c-Kit、CK19和vimentin可能是胰腺成体干细胞的表面标志物<sup>[28,29]</sup>,故提示胰腺成体干细胞参与了胰腺的再生。但是生理条件下,胰腺干细胞数目少,再生和分化能力差,分离纯化较困难,限制了其应用。

BMSCs有转化为胰腺干细胞参与受损胰腺组织修复的能力。Ianus等<sup>[30]</sup>通过将带有GFP基因的骨髓移植给雌鼠后发现,骨髓可以掺入胰腺中,并且分化为有功能的内分泌细胞,而且排除该分化是由细胞融合引起,提示骨髓有可能是胰腺干细胞的另一个居所<sup>[31]</sup>。在江学良等<sup>[32,33]</sup>的2个实验中, BMSCs移植组均出现了CK19荧光染色阳性的细胞。CK19是胰腺干细胞的分子标志物之一,有研究发现,CK19阳性细胞能转分化为具有内分泌功能和外分泌功能的细胞,故CK19在胰腺导管上皮细胞中有明显的表达,在胰岛细胞中CK19表达很少,在腺泡细胞中CK19无表达<sup>[34]</sup>。这表明BMSCs在病损的胰腺组织停留下来,完成了“本地化”,成为胰腺干细胞,参与胰腺组织的修复。在坏死性胰腺炎大鼠的肠组织中也出现荧光标记阳性的细胞,说明BMSCs是机体多种组织干细胞的共同前体细胞,从而证明了骨髓是干细胞库之一。

已有研究结果表明,间充质干细胞在适当的条件下可向包括内皮祖细胞在内的多细胞分化<sup>[35-40]</sup>,而内皮祖细胞可促进血管新生,改善血流<sup>[41,42]</sup>。在陈强等<sup>[43]</sup>的实验中,将体外培养后,用EGFP标记的BMSCs注射至动物胰腺损伤区与完好区交界处,24 h后冰冻切片,共聚焦显微镜观察,组织片中未见荧光标记,仅在片中出现一环状荧光图像,经专家鉴定为小循环系统管腔组织。由此可见间充质干细胞首先到达受损组织的循环系统血管内皮,使小循环修复,改善血

### ■研究前沿

目前关于骨髓间充质干细胞对急性胰腺炎病程的干预作用成为研究的热点,包括其迁移、转化、修复、调控炎症反应以及免疫调节功能。骨髓间充质干细胞的分离、培养及其特征的研究是仍需努力的方向。



### ■相关报道

Jung等的研究将重点放在骨髓间充质干细胞对炎症因子的调控及免疫调节方面,提示骨髓间充质干细胞能显著减少促炎因子TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6的表达,增加抗炎因子IL-4或IL-10的产生,并能产生调节性T细胞,并抑制T细胞增殖,减少组织中T细胞的渗入。这是目前研究中比较新颖的内容。

运情况,从而使受损组织得到供血供氧,达到修复损伤的目的。

### 3 BMSCs对炎症反应的调控

在急性胰腺炎的病理学过程中,炎症反应发挥了极其重要的作用。在AP的发病过程中释放的促炎因子及抗炎因子的活动介导着疾病的临床表现<sup>[44]</sup>,故患者血浆中的许多种细胞因子的活动受到越来越多的关注。主要的促炎因子有TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6<sup>[45-47]</sup>。Ishibashi等<sup>[48]</sup>的实验说明发生SAP时TNF- $\alpha$ 及IL-6的水平增加。Masamune等<sup>[49]</sup>曾报道抗促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6治疗对AP动物模型有保护作用。与促炎因子相反,IL-4及IL-10是阻碍炎症发生的抗炎因子<sup>[50-52]</sup>,尽管此结论存在争议。

Zhang等<sup>[53]</sup>及Guo等<sup>[54]</sup>的报道提示,人类牙龈来源的MSCs能使结肠炎及心肌梗塞患者体内的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 及IL-17水平衰减;Lee SH等<sup>[55]</sup>在应用BMSCs移植治疗博来霉素引起的肺损伤时,发现BMSCs能下调肺组织中促炎因子的水平。另外,研究证明BMSCs能够分泌高水平的IL-1受体拮抗剂<sup>[56]</sup>,而IL-1受体拮抗剂能直接阻断IL-1 $\alpha$ 的作用及抑制活化的巨噬细胞产生TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6等细胞因子。在抗炎因子方面,有报道称<sup>[57]</sup>BMSCs能够分泌IL-10;Semedo等<sup>[58]</sup>报道, MSCs可增强肾损伤患者血浆中IL-4及IL-10的水平;李德泉等<sup>[59]</sup>的实验中, BMSCs治疗组较胰腺炎组各时间点的血清淀粉酶及TNF- $\alpha$ 和IL-6明显降低, IL-10无明显下降。在Jung KH等<sup>[23]</sup>的实验中,对AP大鼠移植BMSCs能显著减少TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6的表达,增加抗炎因子IL-4或IL-10的产生。间充质干细胞合成分泌抗炎因子可能与细胞内NF- $\kappa$ B活性改变,促进相关基因表达有关。Kang等<sup>[60]</sup>在研究NF- $\kappa$ B与胚胎干细胞的关系时发现,干细胞未分化时干细胞内NF- $\kappa$ B的表达和活性都相当低,而当干细胞分化时NF- $\kappa$ B的表达和活性明显增加,但这一机制的具体细节目前仍然不清楚。此外, MSCs还可以抑制NK细胞增殖,减低其细胞毒性作用,减少其细胞因子产生。

### 4 BMSCs的免疫调节功能

MSCs具有免疫调节作用,这也是供体MSCs在受体中可以存活的原因之一<sup>[61]</sup>,他可以抑制过度活跃的免疫细胞的活性<sup>[62]</sup>。有研究表明, MSCs能够产生抑制炎症相关性疾病的调节性T细胞<sup>[63-66]</sup>,且

近来研究的焦点集中在MSCs调控许多炎症介质的能力上,这些炎症介质可通过转录因子3<sup>+</sup>调节性T细胞来抑制免疫反应<sup>[64,67]</sup>,并且转录因子3<sup>+</sup>调节性T细胞也可以诱导嗜中性粒细胞及CD4<sup>+</sup>T细胞的凋亡<sup>[68,69]</sup>(也有研究报道MSCs可以抑制中性粒细胞的凋亡<sup>[70]</sup>)。因此,我们推测BMSCs是否有可能诱导转录因子3<sup>+</sup>调节性T细胞的表达及T细胞的凋亡, Jung等<sup>[23]</sup>的实验揭示了BMSCs能够引起调节性T细胞的产生,并通过凋亡来抑制T细胞增殖,从而减少胰腺组织中T细胞的渗入,从某种程度上证实了我们的推测。详细的机制还需要将来进一步的探讨。

### 5 结论

BMSCs在干预AP的病程中发挥着重要作用。他参与了胰腺干细胞的转化,血管内皮组织的修复,炎症相关的细胞因子的调控,以及免疫调节等过程,充分显示了治疗急性胰腺炎的潜能。未来研究的重点应集中在BMSCs标准化的分离、培养方法及其特征的研究上,还包括AP发生过程中的内源性机制以及细胞的活化等方面。BMSCs是未来治疗AP极有吸引力的崭新途径,在应用于临床前还需要深入地进行评估和实践。

### 6 参考文献

- 1 Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology* 2007; 132: 1127-1151
- 2 Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, Ramaraò P, Saluja M, Steer ML. Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology* 1992; 103: 205-213
- 3 Schmid RM. Pathophysiology of acute pancreatitis. If you believe in mice--it's time for conditional gene targeting! *Digestion* 2005; 71: 159-161
- 4 Weber CK, Adler G. From acinar cell damage to systemic inflammatory response: current concepts in pancreatitis. *Pancreatol* 2001; 1: 356-362
- 5 Forsmark CE, Baillie J. AGA Institute technical review on acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2022-2044
- 6 Lerch MM, Weidenbach H, Hernandez CA, Preclik G, Adler G. Pancreatic outflow obstruction as the critical event for human gall stone induced pancreatitis. *Gut* 1994; 35: 1501-1503
- 7 Mayerle J, Hlouschek V, Lerch MM. Current management of acute pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 473-483
- 8 AGA Institute medical position statement on acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2019-2021
- 9 Friedenstien AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20: 263-272
- 10 Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T,

- Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115: 326-338
- 11 Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M, Kubo T. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 207-216
- 12 孟繁凯, 陈玉芮, 李光民, 陈强, 范洪学. 骨髓间充质干细胞在脑缺血模型大鼠脑组织中的迁徙、定居及组织修复作用. *中国生物制品杂志* 2007; 20: 890-892, 896
- 13 Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1175-1186
- 14 Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westendorp C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F31-F42
- 15 Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 2007; 179: 1855-1863
- 16 Cui HF, Bai ZL. Protective effects of transplanted and mobilized bone marrow stem cells on mice with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2274-2277
- 17 滕春燕, 于庭, 于艳辉, 曲雅琴, 陈玉芮, 金春香. 骨髓间充质干细胞对胰腺损伤模型大鼠血清生化指标的影响. *中国生物制品杂志* 2009; 22: 252-255
- 18 Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 145-152
- 19 Lévesque JP, Winkler IG, Larsen SR, Rasko JE. Mobilization of bone marrow-derived progenitors. *Handb Exp Pharmacol* 2007; (180): 3-36
- 20 叶海青, 范东燕, 刘雅娟, 陈强, 范洪学. 胰腺源间充质干细胞对大鼠胰腺损伤的修复作用. *吉林大学学报(医学版)* 2008; 34: 551-555
- 21 陆奕, 高军, 吴洪玉, 龚燕芳, 赵航, 李兆申. 同种异体骨髓间充质干细胞在急性坏死性胰腺炎大鼠中的迁移和分化. *中华胰腺病杂志* 2011; 11: 40-42
- 22 王建祥, 王平, 吴海龙, 刘峰, 周锐. 骨髓间充质干细胞在大鼠重症胰腺炎中的作用. *中国生化药物杂志* 2010; 31: 381-384
- 23 Jung KH, Song SU, Yi T, Jeon MS, Hong SW, Zheng HM, Lee HS, Choi MJ, Lee DH, Hong SS. Human bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells inhibit inflammation and reduce acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 2011; 140: 998-1008
- 24 Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74
- 25 赵航, 许国铭, 李兆申, 高军, 龚燕芳, 吴洪玉. 急性坏死性胰腺炎大鼠骨髓间充质干细胞增殖能力的变化. *中华胰腺病杂志* 2009; 9: 167-169
- 26 Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7999-8004
- 27 Ishiwata T, Kudo M, Onda M, Fujii T, Teduka K, Suzuki T, Korc M, Naito Z. Defined localization of nestin-expressing cells in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; 32: 360-368
- 28 Peters K, Panienka R, Li J, Klöppel G, Wang R. Expression of stem cell markers and transcription factors during the remodeling of the rat pancreas after duct ligation. *Virchows Arch* 2005; 446: 56-63
- 29 Yalniz M, Pour PM. Are there any stem cells in the pancreas? *Pancreas* 2005; 31: 108-118
- 30 Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; 111: 843-850
- 31 Lee VM, Stoffel M. Bone marrow: an extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cell? *J Clin Invest* 2003; 111: 799-801
- 32 江学良, 李兆申, 崔慧斐. 骨髓间充质干细胞在胰腺生理更新和病理再生中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 398-404
- 33 江学良, 李兆申. 骨髓间充质干细胞在大鼠急性坏死性胰腺炎并发多脏器功能障碍中的作用. *中华胰腺病杂志* 2008; 18: 401-404
- 34 Brembeck FH, Rustgi AK. The tissue-dependent keratin 19 gene transcription is regulated by GKLF/KLF4 and Sp1. *J Biol Chem* 2000; 275: 28230-28239
- 35 Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046-1052
- 36 Grinnemo KH, Månsson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringdén O, Sylvén C, Le Blanc K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 1293-1300
- 37 李立, 应大君, 朱楚洪, 糜建红, 王廷华, 羊惠君. 绿色荧光蛋白转基因小鼠骨髓间充质干细胞向内皮细胞定向分化的能力. *中国临床康复* 2005; 9: 66-67
- 38 杜振宗, 任华, 张超纪, 宋剑非, 郑民, 林峰. 骨髓间充质干细胞诱导为血管内皮样细胞的实验研究. *北京医学* 2008; 30: 714-717
- 39 刘德伍, 李晓亮, 张志安. 血管内皮细胞生长因子联合碱性成纤维细胞生长因子体外诱导人骨髓间充质干细胞分化为血管内皮样细胞. *中国组织工程研究与临床康复* 2008; 12: 9216-9220
- 40 陈毅, 刘丹平. 三种细胞因子体外联合诱导兔骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞的分化. *中国组织工程研究与临床康复* 2008; 12: 4093-4096
- 41 Zammaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells'. Renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 493-503
- 42 Pompilio G, Capogrossi MC, Cannata A, Galanti A, Biglioli P. Endothelial progenitor cells: a potential versatile tool for the treatment of ischemic cardiomyopathies -- a clinician's point of view. *Int J Cardiol* 2004; 95 Suppl 1: S34-S37
- 43 陈强, 王秋静, 杨东旭, 周余来. 骨髓间充质干细胞对大鼠胰腺损伤的修复. *中国组织工程研究与临床康复* 2010; 14: 4252-4256
- 44 Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Viña J, López-Rodas G, Sastre J. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2775-2787

# ■创新盘点

本文创新性的总结了骨髓间充质干细胞干预急性胰腺炎病程转归的机制及途径, 其中免疫调节方面是近来研究的焦点。

## ■同行评价

本文总结了近年来骨髓间充质干细胞治疗急性胰腺炎研究, 显示了其将来的治疗潜能, 选题新颖, 条理清楚, 有较好的学术价值。

- 45 Norman J, Franz M, Messina J, Riker A, Fabri PJ, Rosemurgy AS, Gower WR. Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis. *Surgery* 1995; 117: 648-655
- 46 Zyromski N, Murr MM. Evolving concepts in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Surgery* 2003; 133: 235-237
- 47 庄岩, 杨尹默, 王维民, 万远廉, 黄延庭. 急性胰腺炎鼠白细胞介素(IL)1 $\beta$ 、IL-18、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 转化酶的表达. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 71-72
- 48 Ishibashi T, Zhao H, Kawabe K, Oono T, Egashira K, Suzuki K, Nawata H, Takayanagi R, Ito T. Blocking of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) activity attenuates the severity of acute pancreatitis in rats. *J Gastroenterol* 2008; 43: 79-85
- 49 Masamune A, Shimosegawa T. [Anti-cytokine therapy for severe acute pancreatitis]. *Nihon Rinsho* 2004; 62: 2116-2121
- 50 Christiansen J, Lafvas I, Lindqvist B. Microscopical haematuria after injection of heparin. *Acta Med Scand* 1970; 188: 221-224
- 51 de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209-1220
- 52 Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock* 2005; 24 Suppl 1: 45-51
- 53 Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 2009; 183: 7787-7798
- 54 Guo J, Lin GS, Bao CY, Hu ZM, Hu MY. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation* 2007; 30: 97-104
- 55 Lee SH, Jang AS, Kim YE, Cha JY, Kim TH, Jung S, Park SK, Lee YK, Won JH, Kim YH, Park CS. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. *Respir Res* 2010; 11: 16
- 56 Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 11002-11007
- 57 Götherström C. Immunomodulation by multipotent mesenchymal stromal cells. *Transplantation* 2007; 84: S35-S37
- 58 Smedo P, Palasio CG, Oliveira CD, Feitoza CQ, Gonçalves GM, Cenedeze MA, Wang PM, Teixeira VP, Reis MA, Pacheco-Silva A, Câmara NO. Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 677-682
- 59 李德泉, 吴河水, 潘景业, 周蒙滔, 方军, 吴广宇, 张锦辉. 骨髓间充质干细胞对急性出血坏死性胰腺炎大鼠血清细胞因子浓度的影响. *中华普外科杂志* 2010; 25: 763-764
- 60 Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; 111: 1327-1333
- 61 Beggs KJ, Lyubimov A, Borneman JN, Bartholomew A, Moseley A, Dodds R, Archambault MP, Smith AK, McIntosh KR. Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons. *Cell Transplant* 2006; 15: 711-721
- 62 Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 457-478
- 63 Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 141-150
- 64 Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 2009; 58: 929-939
- 65 Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 241-248
- 66 Nemeth K, Keane-Myers A, Brown JM, Metcalfe DD, Gorham JD, Bundoc VG, Hodges MG, Jelinek I, Madala S, Karpatis S, Mezey E. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 5652-5657
- 67 González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 2009; 136: 978-989
- 68 D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, West EE, Willett MH, Britos MF, Pipeling MR, Brower RG, Tuder RM, McDyer JF, King LS. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest* 2009; 119: 2898-2913
- 69 Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 1353-1362
- 70 Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008; 26: 151-162

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利



# 原发性小肠淋巴瘤临床病理特点及诊治进展

黄小梅, 高青

黄小梅, 高青, 重庆医科大学第一附属医院消化内科 重庆市 400016

作者贡献分布: 本文综述由黄小梅完成; 高青审校。

通讯作者: 高青, 主任医师, 400016, 重庆市, 重庆医科大学第一附属医院消化内科. gaoqing27@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-08-03 修回日期: 2011-09-15

接受日期: 2011-09-24 在线出版日期: 2011-10-08

## Clinicopathological features and treatment of primary small intestinal lymphoma: recent advances

Xiao-Mei Huang, Qing Gao

Xiao-Mei Huang, Qing Gao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Qing Gao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. gaoqing27@yahoo.com.cn

Received: 2011-08-03 Revised: 2011-09-15

Accepted: 2011-09-24 Published online: 2011-10-08

## Abstract

Primary small intestinal lymphoma (PSIL) is an extra-nodal lymphoma whose clinical and histological presentations are usually heterogeneous depending on the site of the lesion. Proper staging criteria are important for clinicopathological diagnosis. Although there is no consensus regarding the role of surgery and chemotherapy in the treatment of PSIL, surgery followed by chemotherapy and radiotherapy is still the main treatment. This review summarizes the clinicopathological features, diagnosis, therapy and prognosis of PSIL.

**Key Words:** Small intestinal tumors; Lymphoma; Diagnosis; Therapy

Huang XM, Gao Q. Clinicopathological features and treatment of primary small intestinal lymphoma: recent advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2947-2952

## 摘要

原发性小肠淋巴瘤(primary small intestinal

lymphoma, PSIL)是一种结外淋巴瘤,其临床表现缺乏特异性,其组织分型、病理形态与结内淋巴瘤有所不同,临床易误诊漏诊,病理诊断较困难,明确其分类、分期标准有助于提高临床及病理诊断水平。其治疗与结内淋巴瘤及其他胃肠道肿瘤不同,目前采取以手术为主以放化疗为辅的综合治疗。本文对该病的临床病理特点、分型、诊治及预后进行综述。

**关键词:** 小肠肿瘤; 淋巴瘤; 诊断; 治疗

黄小梅, 高青. 原发性小肠淋巴瘤临床病理特点及诊治进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(28): 2947-2952

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2947.asp>

## 0 引言

原发性小肠淋巴瘤即指发生于淋巴结外的肠道原发性恶性淋巴瘤,来源于肠壁黏膜下淋巴组织。近年来由于结外淋巴瘤的发生率呈上升趋势,胃肠道淋巴瘤发病率也相应增加,相关因素有病毒感染<sup>[1]</sup>,如乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、EB病毒、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)<sup>[2,3]</sup>、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)<sup>[4,5]</sup>; 免疫性疾病如 Hashimoto's 甲状腺炎<sup>[6]</sup>; 免疫功能缺陷或异常,如获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS),免疫抑制剂大量使用、放化疗后等<sup>[7]</sup>; 其他,如炎症性肠病、腹泻病<sup>[8]</sup>对其发病率均有影响。目前随着影像技术和分子生物学检查技术的发展与提高,小肠淋巴瘤的诊断和治疗受到人们广泛关注。本文就小肠淋巴瘤的临床病理特点及分期、诊治及预后进行综述。

## 1 临床表现与分期

PSIL占原发性胃肠道淋巴瘤的20-30%,可发生于任何年龄,以成年人多见,男性多于女性,好发于回肠<sup>[9]</sup>(60%-65%),其次是空肠(20%-25%),十二指肠(6%-8%),其他(8%-9%)<sup>[10,11]</sup>。其临床表现缺乏特异性,常以腹痛为主要表现,可伴有腹部不适、腹胀、腹部包块、出血、肠穿孔<sup>[12,13]</sup>、恶

## ■背景资料

小肠肿瘤较其他胃肠道肿瘤发病率低,原发性小肠淋巴瘤是最常见的小肠肿瘤,在原发性胃肠道淋巴瘤中仅次于胃淋巴瘤,位居第二。随着肿瘤发病率的上升,以及诊疗技术的提高,小肠淋巴瘤的发病率及检出率都大大提高。

## ■背景资料

刘宝林,教授,中国医科大学附属盛京医院普通外科;王姬兰,教授,重庆医科大学基础医学院病理教研室

## ■ 研发前沿

原发性小肠淋巴瘤的诊断、治疗方法尚无统一标准。找到小肠淋巴瘤独有的特点从而指导制定合理的分期分类,从分子生物、细胞免疫等方面寻求针对此病的特异性检查方法及治疗手段是当前研究的热点及方向。

表 1 PGIL巴黎分期 (Paris staging system)分期 (2003年)

分期	结果	分期	结果
Tx	淋巴瘤范围不能确定	Nx	淋巴结侵犯不能确定
T0	无淋巴瘤证据	N0	无淋巴结侵犯证据
T1	淋巴瘤局限在黏膜/黏膜下层	N1	侵犯局部淋巴结
T1m	淋巴瘤局限在黏膜	N2	侵犯腹腔内淋巴结, 远处与局部淋巴结
T1sm	淋巴瘤局限在黏膜下层	N3	播散到腹腔外淋巴结
T2	淋巴瘤侵犯肌层或浆膜下层		
T3	淋巴瘤穿透浆膜, 但没有侵犯邻近脏器		
T4	淋巴瘤侵犯及邻近脏器		
Mx	远处播散淋巴瘤不能确定	x	侵犯骨髓不能确定
M0	无结外播散证据	0	无骨髓侵犯证据
M1	不连续的胃肠道不同部位的病变	1	病变侵犯骨髓
M2	不连续的其他组织和脏器的病变		
TNMB	临床分期: 肿瘤状态, 淋巴结, 转移, 骨髓		
pTNMB	组织病理学分期: 肿瘤状态, 淋巴结, 转移, 骨髓		
pN	组织学检查通常包括6个或更多淋巴结		

心、呕吐、腹泻、黑便等其他表现,也可伴有发热、消瘦、食欲下降等全身症状,同结内淋巴瘤<sup>[14]</sup>。有时因淋巴瘤的肿块引起肠套叠诱发急性腹痛<sup>[15-17]</sup>,若发生在回盲部极易与阑尾炎混淆,常需急诊手术后明确诊断,故临床上遇到无明显原因的腹痛、消化道出血、腹部包块和肠梗阻时,应警惕小肠淋巴瘤的可能,避免误诊或延迟诊断<sup>[18]</sup>。

临床分期对PGIL的治疗方式选择和预后评估有重要意义。胃肠道淋巴瘤常需考虑肿瘤浸润深度、淋巴结转移、周围脏器受累等因素,故被普遍应用的结内淋巴瘤 Ann Arbor分期标准不太适合PSIL。然而目前国际上对胃肠道淋巴瘤的临床分期也不一致。2003年提出巴黎分期(Paris staging system)<sup>[19]</sup>(表1),他使用了肿瘤分期通用的TNM方法,其容易理解且更适用于临床,有利于对该病的治疗及预后分析。

## 2 诊断

**2.1 临床病理诊断** PSIL临床表现无特异性,临床诊断较困难,必须通过各种实验室检查及影像学检查确定病变累及的部位及范围,即所累及的淋巴结及结外器官,以协助诊断及临床分期。诊断满足淋巴瘤Dawson标准<sup>[20]</sup>: (1)无病理性浅表淋巴结肿大; (2)胸片无纵隔淋巴结肿大; (3)末梢血中无幼稚细胞或异常细胞; (4)肿瘤位于小肠或经淋巴管侵犯附近的淋巴结; (5)肝、脾未受侵犯。

病理诊断手段包括显微镜下观察经传统

HE染色后的细胞形态特征,免疫组织化学标记CD3e、CD79a等指标进行免疫分型,通过聚合酶链反应(PCR)测试B/T细胞的克隆形成能力<sup>[21]</sup>。PSIL区别于其他胃肠道疾病,尤其是炎症性肠病的组织学特点是淋巴细胞浸润,上皮细胞趋性(癌巢或斑块),细胞核大小不均等<sup>[22]</sup>。PSIL组织学类型较其他胃肠道淋巴瘤多,90% PSIL是B细胞来源,最常见的是弥漫大B细胞淋巴瘤<sup>[23]</sup>,极少部分是T细胞淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤。PSIL的病理诊断即确定是否是淋巴瘤以及其组织学类型<sup>[24]</sup>。不同组织学亚型的淋巴瘤其临床病理特点各不相同,MCL常见于50岁以上成人,好发部位为回肠末段及空肠,呈多个息肉样改变,故又称多发性淋巴瘤性息肉病<sup>[25,26]</sup>。IPSID常见于大龄儿童或青年,好发于近段小肠,患者常有腹泻、腹痛表现<sup>[27]</sup>。Burkitt lymphoma常见于儿童,与EBV或HIV相关<sup>[28,29]</sup>。小肠T细胞来源淋巴瘤以肠病相关T细胞淋巴瘤为主,易于Crohn's病混淆<sup>[30]</sup>。滤泡性淋巴瘤常见于十二指肠<sup>[31-33]</sup>。

## 2.2 实验室诊断

**2.2.1 消化道钡餐:** 消化道钡餐检查是消化道病变常规的检查手段,大部分PSIL病例通过影像检查包括气钡双重对比灌肠造影及CT扫描。影像学表现可为肠壁局部或全周性增厚、结节或肿物,邻近肠袢紊乱,也可有表面溃疡,溃疡样不规则形态,坏死性肿块,局段性肠管的狭窄和僵硬,其不足是不能定性诊断,也不能提供是否伴有淋巴结及其他器官累及等方面的信息<sup>[34]</sup>。

**2.2.2 内镜及超声:** 内镜检查在消化系统疾病中

占有非常重要的地位, 十二指肠起始段肿瘤可以通过胃镜发现, 末端回肠可凭借结肠镜作逆行检查, 胶囊内镜是目前筛选小肠疾病的有效无创手段, 对于小肠炎症, 血管病变, 隆起性病变及息肉均可经胶囊内镜发现, 为小肠疾病进一步诊治提供依据<sup>[35-37]</sup>。其阳性率明显高于消化道钡餐造影。其弊端在所获图片资料不能将PSIL与其他小肠疾病鉴别<sup>[38]</sup>, 且不能取活检, 对肠腔狭窄者有发生梗阻的危险。新近在临床上应用的小肠镜<sup>[39]</sup>可对全小肠进行全面的观察, 同时直视下进行活检, 为小肠病变的术前诊断能提供组织学诊断。肿瘤一般生长于小肠黏膜下, 活检组织要包括黏膜下层组织, 否则易漏诊, 必要时需进行多次活检。超声检查对于PSIL敏感性差, 其主要用于检查淋巴结及其他器官有无转移。

**2.2.3 多排螺旋CT及PET/CT:** 多排螺旋CT也有助于PSIL的诊断。其CT征象为肠壁增厚, 肠腔内息肉样肿块, 肠管扩张, 肠套叠等, 增强扫描病灶呈轻至中度强化。再利用虚拟内镜软件对多排螺旋CT图像进行后期处理, 即多排螺旋CT仿真内镜(multi-detector CT virtual endoscopy MDCT-VE), 有文献对MDCT-VE诊断小肠肿瘤进行分析, 其敏感性达90.9%、特异性98.9%、准确率96.8%<sup>[40]</sup>。

将CT高的解剖学分辨率和PET获取的分子水平的功能与代谢信息相结合的<sup>18</sup>F-DG PET/CT<sup>[41]</sup>大大提高了肿瘤的检测率, 被称为“世纪分子”的<sup>18</sup>F-DG是一种天然的葡萄糖类似物, 是目前应用最为广泛的肿瘤显像剂, 主要反映肿瘤的能量代谢, 其摄取强度与肿瘤的恶性程度和预后相关, 由于淋巴肿瘤组织的代谢增强, 葡萄糖酵解增强, 淋巴瘤细胞摄取大量的<sup>18</sup>F-FDG, <sup>18</sup>F-FDG在磷酸己糖激酶作用下形成FDG-6-磷酸长时间停留在淋巴瘤细胞内, 显示放射性浓聚。同属无创性检查, <sup>18</sup>F-FDG PET/CT在结外淋巴瘤的诊断、分期评价中较CT更敏感<sup>[42]</sup>, 能早期发现淋巴瘤病灶, 敏感性和特异性较高, 有助于临床准确诊断、拟定治疗方案和判断预后<sup>[43,44]</sup>。但PET/CT常受淋巴瘤的分化程度、炎性组织及肉芽组织的影响, 存在一定比率的假阳性和假阴性, 尚需寻找一种新的显像剂对其进行甄别和其他影像学手段进行鉴别诊断。

近年来, 也有利用微创腹腔镜检查直接取可疑病灶行病检, 对PSIL的术前评估、术中探查、快速病检均有较大帮助。总之, PSIL暂无特

异性诊断方法, 早期诊断较困难, 确诊必须依赖于内镜下或术后病理活检。CT、PET/CT、超声与内镜检查主要用作非侵袭性方法, 对PSIL分期和患者的随访有重要<sup>[45]</sup>。

### 3 治疗

PSIL的治疗目前尚无统一的最佳方案, 其临床表现分期的不同, 治疗方法和临床效果也有不同, PSIL的治疗方式包括单纯外科手术、化疗、放射治疗及生物治疗以及综合治疗。其中外科手术结合化疗是最主要的治疗方式<sup>[46,47]</sup>。手术可以明确肿瘤的侵犯范围及病理分类, 有助于下一步治疗的选择, 并且切除肿瘤能减轻放疗、化疗的负荷。但也有学者认为手术和放疗加化疗(保守治疗)疗效无差异, 保守治疗能更好地保存小肠的功能。加拿大玛格丽特女王医院的资料表明, 在近10年内应用放、化疗结合使胃肠淋巴瘤的10年生存率较单一手术或放疗的88.0%, 延长到99.5%<sup>[48]</sup>。

**3.1 手术治疗** 小肠淋巴瘤局部手术可切除肿瘤原发灶及部分可能有转移的淋巴结, 可解除梗阻, 疗穿孔、出血等严重并发症, 甚至为病理分型及临床分期提供直接依据, 同时起到诊断和治疗作用<sup>[49,50]</sup>。早期的B细胞来源的PSIL(stage IE)只需行单纯病变肠段切除术。据区域性小肠淋巴瘤的部位选择不同的手术方式: 十二指肠三、四段淋巴瘤可行肠切除术; 若十二指肠近端或累及乳头或已侵犯胰腺的淋巴瘤, 可行胰十二指肠切除术; 回肠淋巴瘤需行右半结肠切除术<sup>[51]</sup>。对有梗阻和穿孔的病变局限的肠段可行手术切除, 并结合全腹的放化疗。有明显淋巴结肿大且术前已有其他脏器转移者需行广泛淋巴结清扫术, 减少淋巴瘤的负荷, 有利于局部病灶的控制, 减少在辅助治疗过程中, 未切除肿瘤引起的出血与穿孔, 进而导致病情的进一步恶化<sup>[52]</sup>。原发性小肠淋巴瘤以弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)最为多见, 高恶度淋巴瘤在小肠占较大比例, 分期和治疗方案与胃淋巴瘤相同, 但肠道晚期病例较多, 手术切除率较低。单纯依靠手术治疗难以达到临床根治效果, 因而辅助治疗成为PSIL治疗的重要组成部分<sup>[53]</sup>。

**3.2 放疗与化疗** 在手术风险大, 手术不能改善预后者或手术不能完全切除或有区域淋巴结转移情况下, 考虑行单纯放、化疗或辅助放化疗, 可明显延长患者的生存期。一些文献报道放疗对局部发生的小肠淋巴瘤有较好治疗效果<sup>[54]</sup>, 尤其

**■创新盘点**  
对小肠淋巴瘤的诊治方案可以结合分子细胞免疫生物学, 更科学的应用于临床, 提高检出率, 促进其预后。



## ■应用要点

此文对临床少见疾病原发性小肠淋巴瘤临床病理特点、诊断、治疗及预后进行了综述,但着重于临床,强调诊断及治疗,具有较强的临床指导意义。

是发生于十二指肠<sup>[55]</sup>,但放疗对小肠的DLBCL作用效果并不佳<sup>[56]</sup>,可能与其多灶性及弥漫性有关。恶性淋巴瘤对化疗均敏感,单纯化疗B淋巴细胞来源较T淋巴细胞来源的小肠淋巴瘤效果好<sup>[57,58]</sup>,可消灭残留组织肿瘤细胞,并提高治疗效果。据文献报道,手术加化疗治疗原发性胃肠道淋巴瘤(PGML),5年生存率可达73%,治疗胃黏膜相关淋巴瘤组织淋巴瘤5年生存率可达90%。Koh等<sup>[59]</sup>报道胃MALT45例,手术加化疗或抗HP治疗加化疗,5年、10年生存率分别为52%、45%。小肠淋巴瘤16例外科手术或加化疗,5、10年生存率均为60%。Samel等<sup>[60]</sup>报道66例肠道大细胞性淋巴瘤,单纯手术占16%,综合治疗占84%,5年生存率为58%,10年生存率为48%,综合治疗组CR率、中位无瘤生存期优于手术治疗,但生存率差异无显著意义。

有些学者主张对于早期无症状的FL(stage IE)采用期待疗法,对于有症状或者晚期的FL则采取手术加化疗或手术加放疗,化疗一般采用CHOP方案。MCL化疗后只能短时间的缓解,其对化疗反应和预后极差。其治疗因患者能否行干细胞移植而异。对于能接受移植的患者,在移植前一般采用R-CHOP或R-Hyper CVAD方案治疗,反之则单独使用Rituximab或者核苷酸类似物联合Rituximab治疗。早期IPSID利用抗生素如四环素联合甲硝唑、氨苄西林,6-12 mo可缓解。中晚期IPSID则需要用蒽环类化疗药联用抗生素治疗<sup>[61]</sup>。有报道66%的EATL术后辅助化疗或行自体干细胞移植术可达到持续完全缓解<sup>[62]</sup>。

应注意的是放、化疗容易引起急性反应,如肠出血、肠穿孔、血管炎、肠炎等<sup>[63]</sup>。对长期放化疗的患者有晚期效应的不良反应,最常见的就是继发恶性肿瘤,心脑血管疾病,对于这类患者应密切随访以及早发现并及时干预治疗。

**3.3 生物治疗** PSIL大多是B细胞非霍奇金淋巴瘤,90%以上B细胞非霍奇金淋巴瘤表达CD20抗原,PSIL生物治疗临床常用美罗华(利妥昔单抗, Rituximab),其定向作用于B细胞表面的CD20抗原。美罗华联合化疗治疗B细胞型非霍奇金淋巴瘤疗效显著,使临床缓解率及中位生存率都明显提高,患者耐受良好,是当前临床治疗CD20阳性的B细胞性NHL的首选方案<sup>[64]</sup>。但其作用效果及对预后的影响仍受争议<sup>[65]</sup>。随着人们对单克隆抗体在胃肠道淋巴瘤发病过程中作用的认识,逐渐研发了第二、三代抗CD20抗体(ofatumumab, veltuzumab, ocrelizumab),抗CD22

抗体Epratuzumab,抗CD30抗体SGN-30,抗CD40抗体SGN-40,抗血管内皮生长因子(VEGF)抗体becacizumab<sup>[66]</sup>,抗CD52抗体阿仑珠单抗(alemtuzumab)治疗T细胞型原发性小肠非霍奇金淋巴瘤也取得一定的疗效<sup>[67]</sup>。

**3.4 其他** 其他治疗方案如造血干细胞移植、免疫增强剂、PET/CT、生物标记、中医中药等治疗均有报道<sup>[68]</sup>。由于大量免疫抑制剂的运用等多种因素影响,PSIL发病率有升高的趋势,所以小肠淋巴瘤的诊断及治疗还需进一步探究和改进。

## 4 结论

影响PISL预后因素有:肿瘤浸润范围,临床分期,组织学类型,免疫表型,有无并发症及严重程度<sup>[69,70]</sup>。目前国际预后指数(IPI)对几乎所有的非霍奇金淋巴瘤有重要参考价值。近年来,小肠疾病的辅助检查方法的不断改进及新的检查方法的出现,PSIL更容易被早期诊断,继而积极采取有效的治疗手段,大大促进了PSIL的预后的改善。随着对恶性淋巴瘤的分子生物学、分子免疫学研究如分子免疫表型研究、单克隆抗体靶向治疗等都取得了一定进展,这对恶性淋巴瘤的诊断、治疗方法的改进都起了一定的促进作用,但仍有不少问题需要深入研究。

## 5 参考文献

- 1 De Falco G, Rogena EA, Leoncini L. Infectious agents and lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 2011; 28: 178-187
- 2 Pârlog G, Murărescu D, Ungureanu C, Danciu M, Mihailovici MS. [Histopathologic and immunohistochemical changes in *Helicobacter pylori* colonised gastric mucosa]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2010; 114: 813-817
- 3 Shinagare AB, Ramaiya NH, O'Regan K, Jagannathan JP, Hornick JL, LaCasce AS. *Helicobacter pylori*-negative gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: e297-e300
- 4 Sharma A, Bajpai J, Raina V, Mohanti BK. HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma: experience from a regional cancer center. *Indian J Cancer* 2010; 47: 35-39
- 5 Bhaijee F, Subramony C, Tang SJ, Pepper DJ. Human immunodeficiency virus-associated gastrointestinal disease: common endoscopic biopsy diagnoses. *Patholog Res Int* 2011; 2011: 247923
- 6 Troch M, Woehrer S, Streubel B, Weissel M, Hoffmann M, Müllauer L, Chott A, Raderer M. Chronic autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis) in patients with MALT lymphoma. *Ann Oncol* 2008; 19: 1336-1339
- 7 Breen EC, Hussain SK, Magpantay L, Jacobson LP, Detels R, Rabkin CS, Kaslow RA, Variakojis D, Bream JH, Rinaldo CR, Ambinder RF, Martinez-Maza O. B-cell stimulatory cytokines and markers of immune activation are elevated several years

- prior to the diagnosis of systemic AIDS-associated non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1303-1314
- 8 Tjon JM, van Bergen J, Koning F. Celiac disease: how complicated can it get? *Immunogenetics* 2010; 62: 641-651
  - 9 Gandhi JS, Mehta A, Sharma A, Kamboj M. Primary Hodgkin lymphoma of the ileum. *J Cancer Res Ther* 2010; 6: 342-343
  - 10 Barr L. Inequality of access to breast reconstruction. *Eur J Surg Oncol* 2011; 37: 16-17
  - 11 Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL, Vigneau FD. The epidemiology and pathogenesis of neoplasia in the small intestine. *Ann Epidemiol* 2009; 19: 58-69
  - 12 Dughayli MS, Baidoun F, Lupovitch A. Synchronous perforation of non-Hodgkin's lymphoma of the small intestine and colon: a case report. *J Med Case Reports* 2011; 5: 57
  - 13 Kim YS, Choi YS, Park JS, Kim BG, Cha SJ, Chi KC, Park SJ, Chang IT, Park SI. Case of small bowel perforation due to enteropathy-type T-cell lymphoma. *Yonsei Med J* 2009; 50: 859-861
  - 14 Li B, Shi YK, He XH, Zou SM, Zhou SY, Dong M, Yang JL, Liu P, Xue LY. Primary non-Hodgkin lymphomas in the small and large intestine: clinicopathological characteristics and management of 40 patients. *Int J Hematol* 2008; 87: 375-381
  - 15 Majdoub Hassani KI, El Bouhaddouti H, Ousadden A, Ankouza A, Boubou M, Tizniti S, Mazaz K, Taleb KA. Non-Hodgkin's lymphoma revealed by an ilio-colic intussusception in a Moroccan patient: a case report. *Pan Afr Med J* 2010; 4: 11
  - 16 Jazayeri M, Shadlen MN. Temporal context calibrates interval timing. *Nat Neurosci* 2010; 13: 1020-1026
  - 17 Salemis NS, Tsiambas E, Liatsos C, Karameris A, Tsohataridis E. Small bowel intussusception due to a primary non-Hodgkin's lymphoma. An unusual presentation and clinical course. *J Gastrointest Cancer* 2010; 41: 233-237
  - 18 Yao T. [Clinicopathological features of small intestinal tumors]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2010; 37: 1436-1439
  - 19 Di Raimondo F, Caruso L, Bonanno G, Naso P, Chiarenza A, Fiumara P, Bari A, Palumbo GA, Russo A, Giustolisi R. Is endoscopic ultrasound clinically useful for follow-up of gastric lymphoma? *Ann Oncol* 2007; 18: 351-356
  - 20 Dawson IM, Cornes JS, Morson BC. Primary malignant lymphoid tumours of the intestinal tract. Report of 37 cases with a study of factors influencing prognosis. *Br J Surg* 1961; 49: 80-89
  - 21 Takanosu M, Tadika T, Kobayashi T. Heteroduplex polymerase chain reaction is essential for canine receptor rearrangement analysis. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 760-763
  - 22 Kiupel M, Smedley RC, Pfent C, Xie Y, Xue Y, Wise AG, DeVaul JM, Maes RK. Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Vet Pathol* 2011; 48: 212-222
  - 23 Naz E, Mirza T, Aziz S, Danish F, Siddiqui ST, Ali A. Frequency and clinicopathologic correlation of different types of non Hodgkin's lymphoma according to WHO classification. *J Pak Med Assoc* 2011; 61: 260-263
  - 24 Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 2008; 112: 4384-4399
  - 25 Hirata N, Tominaga K, Ohta K, Kadouchi K, Okazaki H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe T, Fujiwara Y, Nakamura S, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. A case of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma forming multiple lymphomatous polyposis in the small intestine. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1453-1457
  - 26 Ruskoné-Fourmestraux A, Audouin J. Primary gastrointestinal tract mantle cell lymphoma as multiple lymphomatous polyposis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 35-42
  - 27 Al-Saleem T, Al-Mondhiry H. Immunoproliferative small intestinal disease (IPSID): a model for mature B-cell neoplasms. *Blood* 2005; 105: 2274-2280
  - 28 Biko DM, Anupindi SA, Hernandez A, Kersun L, Bellah R. Childhood Burkitt lymphoma: abdominal and pelvic imaging findings. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 192: 1304-1315
  - 29 Bariakh EA, Kravchenko SK, Kremenetskaia AM, Zvonkov EE, Obukhova TN, Magomedova AU, Vorob'ev AI. [Clinical and epidemiological features of Burkitt's lymphoma]. *Ter Arkh* 2009; 81: 47-53
  - 30 Nishimura M, Tomo K. A case of enteropathy-associated T-cell lymphoma: diagnosis by flow cytometric immunophenotyping and genome analysis using ascitic fluid. *Int J Clin Oncol* 2011 May 24. [Epub ahead of print]
  - 31 Rizvi MA, Evens AM, Tallman MS, Nelson BP, Rosen ST. T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107: 1255-1264
  - 32 Misdraji J, Harris NL, Hasserjian RP, Lauwers GY, Ferry JA. Primary follicular lymphoma of the gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1255-1263
  - 33 Yamamoto S, Nakase H, Yamashita K, Matsuura M, Takada M, Kawanami C, Chiba T. Gastrointestinal follicular lymphoma: review of the literature. *J Gastroenterol* 2010; 45: 370-388
  - 34 Minordi LM, Vecchioli A, Guidi L, Mirk P, Fiorentini L, Bonomo L. Multidetector CT enteroclysis versus barium enteroclysis with methylcellulose in patients with suspected small bowel disease. *Eur Radiol* 2006; 16: 1527-1536
  - 35 Wang X, Shen S, Xiao D, Wang F, Tang W. [Capsule endoscopy in the diagnosis of intestinal diseases]. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2010; 35: 995-999
  - 36 Sandrasegaran K, Maglinte DD, Jennings SG, Chioresan MV. Capsule endoscopy and imaging tests in the elective investigation of small bowel disease. *Clin Radiol* 2008; 63: 712-723
  - 37 Cheung DY, Lee IS, Chang DK, Kim JO, Cheon JH, Jang BI, Kim YS, Park CH, Lee KJ, Shim KN, Ryu JK, Do JH, Moon JS, Ye BD, Kim KJ, Lim YJ, Choi MG, Chun HJ. Capsule endoscopy in small bowel tumors: a multicenter Korean study. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1079-1086
  - 38 Pennazio M. Small-intestinal pathology on capsule endoscopy: miscellaneous. *Endoscopy* 2005; 37: 1149-1154
  - 39 Imaoka H, Higaki N, Kumagi T, Miyaike J, Ohmoto M, Yamauchi K, Murakami T, Murakami H, Ikeda Y, Yokota T, Shibata N, Ninomiya T, Abe M, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M, Umeda M, Horiike N. Characteristics of small bowel tumors detected by double balloon endoscopy. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 2366-2371
  - 40 Su X, Ge Y, Liang B, Wu M, Guo Y, Ma B, Li J. Small

## 同行评价

本文综述了原发性小肠淋巴瘤的临床病理特征及诊治进展, 综述文献合理、全面, 立意新颖, 文章侧重于临床, 有利于对小肠淋巴瘤的临床表现的进一步认识, 结合临床实践, 对临床诊治有指导意义。

- intestinal tumors: diagnostic accuracy of enhanced multi-detector CT virtual endoscopy. *Abdom Imaging* 2011 Jul 7. [Epub ahead of print]
- 41 Ilica AT, Kocacelebi K, Savas R, Ayan A. Imaging of extranodal lymphoma with PET/CT. *Clin Nucl Med* 2011; 36: e127-e138
  - 42 Evans WC, Gilmore D, English J. The role of PET and PET/CT in managing the care of lymphoma patients. *J Nucl Med Technol* 2011; 39: 190-194
  - 43 Abouzied MM, Crawford ES, Nabi HA. 18F-FDG imaging: pitfalls and artifacts. *J Nucl Med Technol* 2005; 33: 145-155; quiz 162-163
  - 44 Anis M, Irshad A. Imaging of abdominal lymphoma. *Radiol Clin North Am* 2008; 46: 265-85, viii-ix
  - 45 Anzidei M, Napoli A, Zini C, Kirchin MA, Catalano C, Passariello R. Malignant tumours of the small intestine: a review of histopathology, multidetector CT and MRI aspects. *Br J Radiol* 2011; 84: 677-690
  - 46 Feng L, Zhang G, Hu Z, Zou Y, Chen F, Zhang G, Tang L. Diagnosis and treatment of 81 patients with primary gastrointestinal lymphoma. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2009; 34: 582-588
  - 47 Turan M, Karadayi K, Duman M, Ozer H, Arici S, Yildirim C, Koçak O, Sen M. Small bowel tumors in emergency surgery. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2010; 16: 327-333
  - 48 Gospodarowicz MK, Pintilie M, Tsang R, Patterson B, Bezjak A, Wells W. Primary gastric lymphoma: brief overview of the recent Princess Margaret Hospital experience. *Recent Results Cancer Res* 2000; 156: 108-115
  - 49 Varga Z, Bálint A, Vitályos T. [Surgical interventions for small bowel tumors at our department in the last 3 years]. *Magy Seb* 2011; 64: 18-21
  - 50 Coco C, Rizzo G, Manno A, Mattana C, Verbo A. Surgical treatment of small bowel neoplasms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14: 327-333
  - 51 Chow AG, Purkayastha S, Zacharakis E, Paraskeva P. Single-incision laparoscopic surgery for right hemicolectomy. *Arch Surg* 2011; 146: 183-186
  - 52 Kako S, Oshima K, Sato M, Terasako K, Okuda S, Nakasone H, Yamazaki R, Tanaka Y, Tanihara A, Kawamura Y, Kiyosaki H, Higuchi T, Nishida J, Konishi F, Kanda Y. Clinical outcome in patients with small-intestinal non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1618-1624
  - 53 Lai YL, Lin JK, Liang WY, Huang YC, Chang SC. Surgical resection combined with chemotherapy can help achieve better outcomes in patients with primary colonic lymphoma. *J Surg Oncol* 2011; 104: 265-268
  - 54 Franco P, Filippi AR, Ciammella P, Botticella A, Namysl-Kaletka A, De Crescenzo A, Tarella C, Ricardi U. Primary duodenal follicular lymphoma: 6-years complete remission after combined radio-immunotherapy. *Acta Gastroenterol Belg* 2011; 74: 337-342
  - 55 Dickson BC, Serra S, Chetty R. Primary gastrointestinal tract lymphoma: diagnosis and management of common neoplasms. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6: 1609-1628
  - 56 Aleman BM, Haas RL, van der Maazen RW. Role of radiotherapy in the treatment of lymphomas of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 27-34
  - 57 Ruskoné-Fourmestiaux A, Dragosics B, Morgner A, Wotherspoon A, De Jong D. Paris staging system for primary gastrointestinal lymphomas. *Gut* 2003; 52: 912-913
  - 58 Raderer M, Troch M, Kiesewetter B, Puspök A, Jaeger U, Hoffmann M, Chott A. Second line chemotherapy in patients with enteropathy-associated T cell lymphoma: a retrospective single center analysis. *Ann Hematol* 2011 Apr 26. [Epub ahead of print]
  - 59 Koh PK, Horsman JM, Radstone CR, Hancock H, Goepel JR, Hancock BW. Localised extranodal non-Hodgkin's lymphoma of the gastrointestinal tract: Sheffield Lymphoma Group experience (1989-1998). *Int J Oncol* 2001; 18: 743-748
  - 60 Zucca E, Conconi A, Pedrinis E, Cortelazzo S, Motta T, Gospodarowicz MK, Patterson BJ, Ferreri AJ, Ponzoni M, Devizzi L, Giardini R, Pinotti G, Capella C, Zinzani PL, Pileri S, López-Guillermo A, Campo E, Ambrosetti A, Baldini L, Cavalli F. Nongastric marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* 2003; 101: 2489-2495
  - 61 Yaguchi T, Imaeda H, Kizaki M, Hosoe N, Suzuki H, Ogata H, Iwao Y, Kameyama K, Ikeda Y, Hibi T. Partial regression of duodenal lesions of intestinal follicular lymphoma after antibiotic treatment. *Dig Endosc* 2010; 22: 316-318
  - 62 Bishton MJ, Haynes AP. Combination chemotherapy followed by autologous stem cell transplant for enteropathy-associated T cell lymphoma. *Br J Haematol* 2007; 136: 111-113
  - 63 Ng AK, Mauch PM. Late effects of Hodgkin's disease and its treatment. *Cancer J* ; 15: 164-168
  - 64 Hennessy BT, Hanrahan EO, Daly PA. Non-Hodgkin lymphoma: an update. *Lancet Oncol* 2004; 5: 341-353
  - 65 Abès R, Gélizé E, Fridman WH, Teillaud JL. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* 2010; 116: 926-934
  - 66 Elstrom RL, Martin P, Leonard JP. New biologic agents and immunologic strategies. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008; 22: 1037-1049, 1037-1049
  - 67 Müller AM, Rawluk J, Thierry V, Brink I, Engelhardt M. [Innovative antibody-therapies for malignant lymphomas]. *Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130: 2783-2788
  - 68 Rathore B, Kadin ME. Hodgkin's lymphoma therapy: past, present, and future. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11: 2891-2906
  - 69 Cao J, Zuo Y, Lv F, Chen Z, Li J. Primary small intestinal malignant tumors: survival analysis of 48 postoperative patients. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 167-173
  - 70 Kim SJ, Choi CW, Mun YC, Oh SY, Kang HJ, Lee SI, Won JH, Kim MK, Kwon JH, Kim JS, Kwak JY, Kwon JM, Hwang IG, Kim HJ, Lee JH, Oh S, Park KW, Suh C, Kim WS. Multicenter retrospective analysis of 581 patients with primary intestinal non-hodgkin lymphoma from the Consortium for Improving Survival of Lymphoma (CISL). *BMC Cancer* 2011; 11: 321

编辑 曹丽鸥 电编 何基才



# 反义锁核酸与拉米夫定在HepG2.2.15细胞中抗HBV作用的比较

朱晓莹, 王燕菲

朱晓莹, 右江民族医学院生物化学与分子生物学教研室 广西壮族自治区百色市 533000

王燕菲, 广州医学院生物化学与分子生物学教研室 广东省广州市 510182

广州市科技攻关计划基金资助项目, No. 2002Z3-E4081

作者贡献分布: 实验由王燕菲与朱晓莹设计; 实验过程由朱晓莹完成; 实验所需经费由王燕菲提供; 数据分析由朱晓莹完成; 论文写作由朱晓莹完成, 王燕菲提出修改意见。

通讯作者: 王燕菲, 教授, 510182, 广东省广州市东风西路195号, 广州医学院生物化学与分子生物学教研室。

yanfeiw@hotmail.com

电话: 020-81340212

收稿日期: 2011-07-29 修回日期: 2011-09-15

接受日期: 2011-10-02 在线出版日期: 2011-10-08

## Inhibitory effect of locked nucleic acid antisense oligonucleotides versus lamivudine on HBV replication in HepG2.2.15 cells

Xiao-Ying Zhu, Yan-Fei Wang

Xiao-Ying Zhu, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Yan-Fei Wang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Foundation of Guangzhou Municipality, No. 2002Z3-E4081

Correspondence to: Yan-Fei Wang, Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical College, 195 Dongfeng Western Road, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China. yanfeiw@hotmail.com

Received: 2011-07-29 Revised: 2011-09-15

Accepted: 2011-10-02 Published online: 2011-10-08

### Abstract

**AIM:** To compare the inhibitory effect of locked nucleic acid antisense oligonucleotides (antisense-LNA) and lamivudine on HBV replication in HepG2.2.15 cells.

**METHODS:** Antisense-LNA was introduced into HepG2.2.15 cells by cationic liposome-mediated transfection. Supernatants were collected 2, 4, 6, 8, 10 days after medication. The concentrations of HBsAg and HBeAg in cell supernatants were tested by ELISA. HBV DNA levels in cell

supernatants were determined by FQ-PCR. Cell toxicity of antisense-LNA and lamivudine was detected by MTT assay.

**RESULTS:** Lamivudine only inhibited viral DNA synthesis. Antisense-LNA effectively inhibited the expression of HBsAg and HBeAg and the replication of HBV DNA (67.69%, 59.71%, 62.96%,  $P < 0.05$ ) in a time-dependent manner. Both antisense-LNA and lamivudine showed no obvious cell toxicity.

**CONCLUSION:** The anti-HBV effect of antisense-LNA is more effective than that of lamivudine in HepG2.2.15 cells.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Antisense LNA; Lamivudine; HepG2.2.15 cells; Antiviral activity

Zhu XY, Wang YF. Inhibitory effect of locked nucleic acid antisense oligonucleotides versus lamivudine on HBV replication in HepG2.2.15 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2953-2957

### 摘要

**目的:** 应用反义锁核酸与拉米夫定作用HepG2.2.15细胞, 对他们抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)效果进行比较。

**方法:** 设计针对HBV翻译起始区S基因mRNA的反义寡核苷酸, 并进行锁核酸修饰, 以阳离子脂质体介导反义锁核酸转染HepG2.2.15细胞; 拉米夫定组直接作用HepG2.2.15细胞; 分别于用药后第2、4、6、8、10天收集细胞培养上清液。用ELISA法和FQ-PCR法检测收集上清液HBsAg、HBeAg和HBV DNA的含量。MTT法分别检测反义锁核酸与拉米夫定对细胞存活率的影响。

**结果:** 拉米夫定对HBV DNA具有明显抑制作用, 最高可达46.52%, 但对HBsAg、HBeAg影响较小; 反义锁核酸对HBsAg、HBeAg及HBV DNA均有较强抑制作用, 对HBsAg、HBeAg和HBV DNA的最高抑制率分别达

### ■背景资料

近期, 锁核酸(LNA)作为一种新型的寡核苷酸衍生物, 其结构中 $\beta$ -D-呋喃核糖的2'-O, 4'-C位通过缩水作用形成刚性的核苷酸衍生物。LNA具有强的抗核酸酶水解能力, 与DNA/RNA强大的杂交亲和力和反义活性、水溶性好及体内无毒性等优点, 因此具有广阔的应用研究前景。

### ■同行评议者

杨江华, 副教授, 安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院感染科; 张占卿, 主任医师, 上海市公共卫生中心

## ■研发前沿

由于锁核酸优越的性能和安全性,他被广泛用于基因研究的各个领域及疾病的诊断和治疗研究中,目前研究的热点是三螺旋构象寡核苷酸技术。

67.69%、59.71%和62.96% ( $P < 0.05$ ), 且抑制随时间呈增高趋势。反义锁核酸与拉米夫定对细胞代谢均无明显影响。

**结论:** 反义锁核酸抗HBV作用机制与拉米夫定不同, 反义锁核酸抗HBV作用明显优于拉米夫定。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 反义锁核酸; 拉米夫定; HepG2.2.15细胞; 抗病毒

朱晓莹, 王燕菲. 反义锁核酸与拉米夫定在HepG2.2.15细胞中抗HBV作用的比较. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2953-2957

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2953.asp>

## 0 引言

反义寡核苷酸(antisense oligodeoxy Nucleotide, ASODN)是近年来研究较广泛的一种基因治疗手段, 他通过碱基互补作用, 特意地结合靶基因形成杂交分子, 从而阻断靶基因的表达<sup>[1,2]</sup>。未经任何修饰的ASODN在机体内稳定性较差, 易被核酸酶降解而不能发挥治疗作用。锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是一种带环状结构的核苷酸衍生物, 他与ASODN相比具有良好的热稳定性、较强的分子杂交能力和抗核酸酶降解能力<sup>[3-5]</sup>, 作为一种新型的ASODN具有广阔的应用前景。乙型病毒性肝炎是我国常见的传染性疾病, 严重危害着人们的健康。乙肝治疗目前尚无特效药物<sup>[6-8]</sup>, 拉米夫定(lamivudine, 3TC)是公认的能够抑制HBV复制的药物<sup>[9,10]</sup>。我们前期研究结果表明, 针对HBV DNA S基因设计的反义LNA在体外具有良好的抗HBV基因复制与表达的能力<sup>[11,12]</sup>。为了更好地理解和应用反义LNA的抗HBV作用, 本研究将从HBsAg、HBeAg及HBV DNA等方面对反义LNA与3TC的抗HBV作用进行比较。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HepG2.2.15细胞由本室保存。常规培养于含200  $\mu\text{g/mL}$  G418、10%胎牛血清的高糖型DMEM中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L  $\text{CO}_2$ 条件下, 6-7 d常规传代一次。高糖型DMEM培养基购自Gibco公司; G418购自Merck公司; 胎牛血清购自HyClone公司; HBsAg、HBeAg检测试剂盒购自丽珠生物技术有限公司产品; 乙肝病毒核酸扩增荧光定量试剂盒购自科华生物工程股份有限公司; 阳离子脂质体(Lipofectamine<sup>TM</sup>2000)、Opti-

MEN(脂质体溶媒)购自Invitrogen<sup>TM</sup>公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自Amersco公司; 反义LNA由美国GENELINK公司合成; 3TC购自葛兰素史克制药(苏州)有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 反义LNA片段合成与修饰:** 以Genebank U95551 HBV全基因作为靶序列, 设计针对HBV S基翻译起始区(155-165 nt)的11-聚反义寡脱氧核苷酸片段: GtTcTccAtGt(大写字母代表碱基经过LNA修饰)。

**1.2.2 反义LNA-阳离子脂质体转染混合物的制备:** 经过预实验得出反义LNA: 阳离子脂质体最佳剂量比例为3  $\mu\text{g}$ : 5  $\mu\text{L/mL}$ 。取适量DMEM稀释反义LNA, 室温静置5 min; 取适量Opti-MEM稀释的阳离子脂质体溶液, 室温静置5 min; 将上述两种液体混合, 室温静置20 min形成稳定的反义LNA-阳离子脂质体混合物。

**1.2.3 HepG2.2.15细胞的转染、给药与细胞上清液收集:** 取指数生长期细胞, 常规消化调整细胞密度为 $1.0 \times 10^5$ 个/mL, 接种96孔板, 每孔100  $\mu\text{L}$ , 实验设3个组(即反义LNA组、3TC组和不加药的空白对照组), 每组设6个复孔, 当细胞贴壁并融合度约达60%时, 分别给药。反义LNA组, 将反义LNA-阳离子脂质体混合物加入实验孔中, 每孔100  $\mu\text{L}$ , 转染细胞, 6 h后向实验孔加含20%胎牛血清的DMEM 50  $\mu\text{L}$ 继续培养至48 h; 收集细胞培养上清, 重复转染4次, 连续10 d。3TC组, 3TC浓度参照文献最佳剂量, 在常规培养基中加入3TC(终浓度为5  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>[9]</sup>, 每2 d收集细胞培养上清并重新给药一次, 连续10 d。收集各组细胞上清液于-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存, 统一检测。

**1.2.4 上清液HBsAg、HBeAg含量的测定:** 采用ELISA法, 严格按照试剂盒说明书操作, 重复测3次, 取均值。HBsAg、HBeAg浓度用S/N表示, 抑制率用公式计算: 抑制率(%) =  $[1 - (S/N_{\text{实验组}}) / (S/N_{\text{对照组}})] \times 100\%$ 。

**1.2.5 上清液HBV DNA含量的测定:** 采用FQ-PCR法检测, 严格按照试剂盒说明书操作。扩增条件: 50  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  延伸30 s, 共40个循环。由计算机软件自动分析所收集的荧光信号并计算出HBV DNA平均拷贝数。

**1.2.6 反义LNA与3TC对细胞的毒性检测:** 采用MTT法检测反义LNA、3TC对细胞代谢活性的影响。

**统计学处理** 数据以mean  $\pm$  SD表示, 采用

表 1 反义LNA和3TC对培养上清HBsAg含量的影响 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD)

分组	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
空白对照	0.751 $\pm$ 0.058	0.889 $\pm$ 0.057	1.025 $\pm$ 0.092	1.395 $\pm$ 0.101	1.526 $\pm$ 0.088
3TC	0.585 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	0.723 $\pm$ 0.035 <sup>b</sup>	0.785 $\pm$ 0.028 <sup>b</sup>	0.994 $\pm$ 0.040 <sup>b</sup>	1.055 $\pm$ 0.039 <sup>b</sup>
反义LNA	0.422 $\pm$ 0.021 <sup>bd</sup>	0.445 $\pm$ 0.057 <sup>bd</sup>	0.464 $\pm$ 0.019 <sup>bd</sup>	0.479 $\pm$ 0.045 <sup>bd</sup>	0.493 $\pm$ 0.019 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$ ,  $F = 97.765$  vs 3TC组。

表 2 反义LNA和3TC对培养上清HBeAg含量的影响 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD)

分组	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
空白对照	0.618 $\pm$ 0.061	0.778 $\pm$ 0.017	0.941 $\pm$ 0.081	1.194 $\pm$ 0.086	1.251 $\pm$ 0.077
3TC	0.534 $\pm$ 0.041 <sup>b</sup>	0.637 $\pm$ 0.035 <sup>b</sup>	0.731 $\pm$ 0.033 <sup>b</sup>	0.903 $\pm$ 0.048 <sup>b</sup>	0.952 $\pm$ 0.039 <sup>b</sup>
反义LNA	0.333 $\pm$ 0.035 <sup>bd</sup>	0.358 $\pm$ 0.25 <sup>bd</sup>	0.405 $\pm$ 0.022 <sup>bd</sup>	0.479 $\pm$ 0.038 <sup>bd</sup>	0.504 $\pm$ 0.016 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$ ,  $F = 138.497$  vs 3TC组。

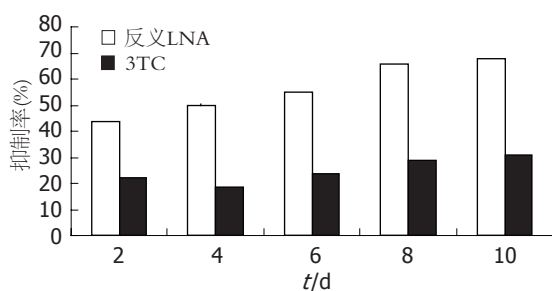


图 1 反义LNA和3TC对培养上清HBsAg含量的抑制率(%)

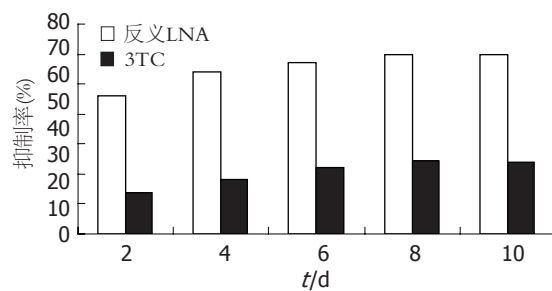


图 2 反义LNA和3TC对培养上清HBeAg含量的抑制率(%)

SPSS13.0软件处理, 各组间均数比较采用双因素方差分析结果,  $P < 0.05$ 为差异具有显著意义。

## 2 结果

**2.1 反义LNA和3TC对HepG2.2.15细胞表达HBsAg、HBeAg的影响** 反义LNA、3TC加入2 d后, 细胞分泌的HBsAg、HBeAg均受抑制。其中3TC对HBsAg、HBeAg抑制作用较弱, 而反义LNA的抑制作用较强; 并随时间增加呈递增趋势(表1, 2, 图1, 2)。

**2.2 反义LNA和3TC对HepG2.2.15细胞HBV DNA复制的影响** 反义LNA和3TC均能抑制细胞HBV DNA的复制, 并随时间增加呈递增趋势(表3, 图3), 反义LNA抗HBV DNA作用优于3TC, 其抑制率最高达65.76%。

**2.3 反义LNA和3TC对HepG2.2.15细胞活性的影响** 用药2 d, 经MTT法测得反义LNA、3TC组OD值如下:  $0.987 \pm 0.132$ 、 $1.124 \pm 0.045$ , 与空白对照( $1.216 \pm 0.042$ )比较( $P > 0.05$ ), 在实验剂量下反

义LNA与3TC对HepG2.2.15细胞的生长无明显抑制作用。

## 3 讨论

HepG2.2.15细胞是由头尾相接的ayw型HBV双拷贝基因组转染人肝癌细胞株HepG2细胞而建立的, 该细胞株能长期稳定地向培养上清液中分泌病毒蛋白HBsAg、HBeAg、完整的病毒颗粒及大量的病毒复制中间体<sup>[13]</sup>。他模拟肝细胞被HBV感染, 病毒基因组整合入肝细胞的状态, 因此以他作为研究对象, 接近于疾病的治疗过程。

HBV属嗜肝DNA病毒科, 基因组由结构紧凑的3.2 kb的双链DNA组成, 具有逆转录病毒的特性。S基因是HBV基因组中4个开发读码框架之一, S基因编码的蛋白是构成HBV外壳蛋白及HBsAg的主要组成部分, 参与HBV Dane颗粒的装配、成熟。成熟的Dane颗粒能向细胞外分泌, 再感染其他正常肝细胞<sup>[14]</sup>。而HBsAg组成的亚病毒颗粒在机体内含量远超过Dane颗粒, 大量的

### ■创新盘点

锁核酸(LNA)具有强的抗核酸酶水解能力, 与DNA/RNA强大的杂交亲和力、反义活性、水溶性好及体内无毒性等优点。因此具有广阔的应用研究前景。本研究在前期工作的基础上, 比较反义LNA与拉米夫定的抗乙肝病毒的活性, 为反义LNA抗乙肝病毒提供可行性报告, 为下一步研究奠定基础。



### ■应用要点

反义LNA以良好的抗乙肝病毒的活性, 低不良反应, 显示出广阔的应用前景, 可以考虑将反义锁核酸作为拉米夫定的辅助治疗, 将更有利于清除机体内的乙肝病毒。

表 3 反义LNA和3TC对培养上清HBV DNA复制的影响 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD,  $\times 10^4$ 拷贝数)

分组	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
空白对照	9.29 $\pm$ 0.348	21.61 $\pm$ 0.421	33.83 $\pm$ 0.342	35.51 $\pm$ 0.452	27.56 $\pm$ 0.517
3TC	6.18 $\pm$ 0.584 <sup>b</sup>	13.87 $\pm$ 0.513 <sup>b</sup>	18.92 $\pm$ 0.528 <sup>b</sup>	18.89 $\pm$ 0.473 <sup>b</sup>	15.42 $\pm$ 0.374 <sup>b</sup>
反义LNA	5.80 $\pm$ 0.531 <sup>bd</sup>	11.85 $\pm$ 0.334 <sup>bd</sup>	13.18 $\pm$ 0.444 <sup>bd</sup>	12.16 $\pm$ 0.388 <sup>bd</sup>	10.19 $\pm$ 0.426 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组; <sup>d</sup> $P < 0.05$ ,  $F = 80.295$  vs 3TC组。

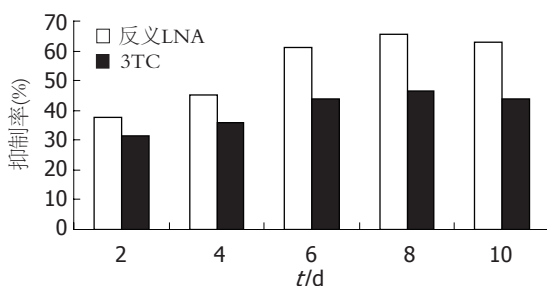


图 3 反义LNA和3TC对培养上清HBV DNA复制的抑制率(%)。

HBsAg持续表达将造成机体炎性浸润、免疫损伤、在肝癌的发生起重要作用<sup>[15-18]</sup>。

研究结果表明, 针对HBV翻译起始区S基因的反义LNA能有效的抗HBV基因的表达, 对HBsAg、HBeAg和HBV DNA的抑制率最高分别达67.69%、59.71%和62.96% ( $P < 0.05$ ); 且抑制随时间呈增高趋势, 说明反义LNA能有效的进入HepG2.2.15细胞, 特异识别并结合HBV S基因及其mRNA, 并封闭HBV S基因的表达, 清除mRNA; 从转录、翻译环节抑制病毒的复制, 破坏病毒的生活结构, 阻断了HBsAg的翻译, 进而影响HBsAg、HBeAg翻译及Dane颗粒的装配、成熟。而HBsAg、HBeAg的低表达将有利于机体免疫调整, 提高肝细胞的存活, 减少肝硬化等慢性肝病的发生<sup>[19]</sup>。此外, 反义LNA对HBV DNA的抑制, 原因可能与LNA良好的抗核酸酶降解能力能使他在细胞内稳定存在, 并通过他良好的脂溶性能透过细胞核, 发挥超强的分子杂交能力结合到HBV S基因上有关。

相比反义LNA, 3TC抗HBV的作用机制主要是阻止病毒逆转录酶的复制作用, 从而减少HBV DNA复制, 使Dane颗粒的装配受抑制, 但对HBV病毒表达HBsAg、HBeAg影响较小。研究结果表明3TC对HBsAg、HBeAg和HBV DNA的抑制率最高分别达30.86%、24.37%和46.5%, 抑制作用低于反义LNA。反义LNA抗HBV作用更全面, 明显优于3TC。此外, 与3TC抗HBV作用相比, 反义LNA有以下优势: 1. 反义LNA具有特

异性 and 高效性; 2. HBV基因组S基因保守序列限制了病毒变异株的形成, 不易耐药; 3. 反义LNA抗HBV不依赖于病毒复制, 将更有利于清除病毒。基于以上优势, 可以考虑将来将反义锁核酸作为拉米夫定的辅助治疗, 将更有利于清除机体内的乙肝病毒。

反义LNA以良好的抗乙肝病毒的活性, 低毒副作用, 显示出广阔的应用前景, 这为根除HBV感染带来了新希望, 同时也为其他疾病的基因治疗带来新的前景。但如何更有效的将反义LNA传递到细胞内, 反义LNA在机体内的生物分布及安全性还需进一步研究。

### 4 参考文献

- Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J* 2005; 7: E61-E77
- Gruegelsiepe H, Brandt O, Hartmann RK. Antisense inhibition of RNase P: mechanistic aspects and application to live bacteria. *J Biol Chem* 2006; 281: 30613-30620
- Wengel J, Petersen M, Frieden M, Koch T. Chemistry of locked nucleic acids (LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties. *Lett Pept Sci* 2003; 10: 237-253
- Inohara H, Obika S, Imanishi T. 2',4'-BNA derivatives bearing an unnatural nucleobase: synthesis and application to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004; (48): 63-64
- Braasch DA, Liu Y, Corey DR. Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 5160-5167
- Zoulim F. Therapy of chronic hepatitis B virus infection: inhibition of the viral polymerase and other antiviral strategies. *Antiviral Res* 1999; 44: 1-30
- Lau DT, Khokhar MF, Doo E, Ghany MG, Herion D, Park Y, Kleiner DE, Schmid P, Condreay LD, Gauthier J, Kuhns MC, Liang TJ, Hoofnagle JH. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 2000; 32: 828-834
- Jonas MM, Mizerski J, Badia IB, Areias JA, Schwarz KB, Little NR, Greensmith MJ, Gardner SD, Bell MS, Sokal EM. Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002; 346: 1706-1713
- Ying C, De Clercq E, Neyts J. Lamivudine, adefovir and tenofovir exhibit long-lasting anti-hepatitis B

- virus activity in cell culture. *J Viral Hepat* 2000; 7: 79-83
- 10 杨永峰, 谭德明, 谢玉桃, 侯周华. 干扰素及拉米夫定抗乙肝病毒的体外实验研究. *疾病控制杂志* 2004; 8: 209-212
  - 11 唐盈, 王燕菲. 针对HBV S基因的反义锁核酸抗乙肝病毒表达的初探. *江西医药* 2006; 41: 205-208
  - 12 邓益斌, 王燕菲. 针对HBV S基因mRNA反义锁核酸设计及其在2.2.15细胞内的抗病毒作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3497-3501
  - 13 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1005-1009
  - 14 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1-32
  - 15 赵超, 田晓晨, 闻玉梅. 乙肝病毒表面抗原持续表达的新致病机制. *生命科学* 2010; 22: 1097-1101
  - 16 Tian X, Zhao C, Zhu H, She W, Zhang J, Liu J, Li L, Zheng S, Wen YM, Xie Y. Hepatitis B virus (HBV) surface antigen interacts with and promotes cyclophilin a secretion: possible link to pathogenesis of HBV infection. *J Virol* 2010; 84: 3373-3381
  - 17 Tian X, Li J, Ma ZM, Zhao C, Wan DF, Wen YM. Role of hepatitis B surface antigen in the development of hepatocellular carcinoma: regulation of lymphoid enhancer-binding factor 1. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 58
  - 18 Hajjou M, Norel R, Carver R, Marion P, Cullen J, Rogler LE, Rogler CE. cDNA microarray analysis of HBV transgenic mouse liver identifies genes in lipid biosynthetic and growth control pathways affected by HBV. *J Med Virol* 2005; 77: 57-65
  - 19 Stoop JN, van der Molen RG, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B. *Virology* 2007; 361: 141-148

#### ■同行评价

本研究的内容较有意义, 研究有一定程度新颖性, 具有较好的参考价值.

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

# 羽扇豆醇对胰腺癌细胞株SW1990及 $\gamma\delta$ T细胞生长的影响

罗冠琴, 朱炳喜, 陈复兴, 刘军权, 黄菲, 吕小婷

## ■背景资料

近年来研究发现 $\gamma\delta$ T细胞以MHC非限制方式杀伤肿瘤细胞在免疫监视中具有重要作用, $\gamma\delta$ T细胞识别谱广泛,对肿瘤细胞的识别不需要抗原提呈细胞加工处理.因此, $\gamma\delta$ T细胞已成为肿瘤患者过继免疫治疗的一个新的候选效应细胞.国外研究表明,羽扇豆醇抗胰腺癌的作用,但是对 $\gamma\delta$ T细胞作用尚无报道.因此,本课题组研究羽扇豆醇对 $\gamma\delta$ T细胞生长的影响及杀伤胰腺癌细胞株SW1990作用的影响.

## ■同行评议者

刘超,副教授,中山大学孙逸仙纪念医院肝胆胰外科;吴泰瑞,教授,山东省立医院肝胆外科

罗冠琴,徐州医学院 江苏省徐州市 221002

朱炳喜,徐州医学院附属医院消化内科 江苏省徐州市 221002  
陈复兴,刘军权,黄菲,吕小婷,中国人民解放军第九七医院实验科 江苏省徐州市 221004

作者贡献分布: 课题设计由罗冠琴、朱炳喜、陈复兴及刘军权完成; 研究过程操作由罗冠琴、刘军权、黄菲及吕小婷完成; 数据分析由罗冠琴与刘军权完成; 本论文写作由罗冠琴与朱炳喜完成.

通讯作者: 朱炳喜, 主任医师, 221002, 江苏省徐州市, 徐州医学院附属医院消化科. 82200496 @163.com

电话: 0516-85802084

收稿日期: 2011-07-31 修回日期: 2011-09-08

接受日期: 2011-10-02 在线出版日期: 2011-10-08

## Effect of lupeol on the growth of human pancreatic cancer SW1990 cells and $\gamma\delta$ T cells

Guan-Qin Luo, Bing-Xi Zhu, Fu-Xing Chen,  
Jun-Quan Liu, Fei Huang, Xiao-Ting Lv

Guan-Qin Luo, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Bing-Xi Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Fu-Xing Chen, Jun-Quan Liu, Fei Huang, Xiao-Ting Lv, Department of Central Laboratory, the 97th Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Bing-Xi Zhu, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China. 82200496 @163.com

Received: 2011-07-31 Revised: 2011-09-08

Accepted: 2011-10-02 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To explore the effect of lupeol on the growth of human pancreatic cancer SW1990 cells and  $\gamma\delta$ T cells.

**METHODS:** Peripheral blood  $\gamma\delta$ T cells, expanded *in vitro*, were used in our study. After SW1990 and  $\gamma\delta$ T cells were incubated with different concentrations of lupeol for different durations (24, 48 and 72 h), cell growth was determined by MTT assay. A blank control and a solvent control were run simultaneously.

**RESULTS:** The Lupeol at doses of 0.4-200  $\mu\text{g/mL}$ , there are significant differences of growth human pancreatic cancer cell line SW1990 cells be-

tween the groups of 24, 48, 72 h and blank control group, the solvent control group ( $P < 0.05$ ), however, no difference had been observed in each groups of three separated times. Harvested 7 d,  $\gamma\delta$ T cells had expanded to 80.2% from 3.61%. in the groups of 24, 48 and 72 h, the effects turned to be advantageous and then depressed as the dose was increasing. there are no differences between the groups of 24 h and blank control group, the solvent control group. there are significant differences between the groups of 48, 72 h and blank control group, the solvent control group ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Lupeol suppressed the growth of SW1990 cells, but produced a facilitative effect first and then inhibitory effect on the growth of  $\gamma\delta$ T cells.

**Key Words:** Lupeol; SW1990 cells;  $\gamma\delta$ T cells

Luo GQ, Zhu BX, Chen FX, Liu JQ, Huang F, Lv XT. Effect of lupeol on the growth of human pancreatic cancer SW1990 cells and  $\gamma\delta$ T cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2958-2962

## 摘要

**目的:** 探讨羽扇豆醇对人胰腺癌细胞SW1990及 $\gamma\delta$ T细胞生长的影响.

**方法:** 采用本实验室体外扩增人外周血 $\gamma\delta$ T细胞,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测不同浓度的羽扇豆醇在不同时间段对人 $\gamma\delta$ T细胞和人胰腺癌细胞SW1990生长的影响. 本实验分3组: 空白对照组、溶剂对照组和实验组,时间段分24、48、72 h组.

**结果:** 羽扇豆醇浓度在0.4-200  $\mu\text{g/mL}$ 时羽扇豆醇对人胰腺癌细胞SW1990在24、48、72 h各组与空白对照组和溶剂对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 而24、48、72 h3组比较差异无统计学意义.  $\gamma\delta$ T细胞培养7 d从扩增前的3.61%增加到80.2%,羽扇豆醇对 $\gamma\delta$ T细胞在24、48、72 h随浓度的增加先增值后抑制作用. 24 h与空白对照组和溶剂对照组比较差异无统计学意义. 48、72 h各组与空白对照组和



溶剂对照组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ).

**结论:**羽扇豆醇对人胰腺癌细胞SW1990有抑制作用, 对 $\gamma\delta$ T细胞随着浓度增加有先促进后抑制作用.

**关键词:**羽扇豆醇; 胰腺癌细胞SW1990;  $\gamma\delta$ T细胞

罗冠琴, 朱炳喜, 陈复兴, 刘军权, 黄菲, 吕小婷. 羽扇豆醇对胰腺癌细胞株SW1990及 $\gamma\delta$ T细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2958–2962

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2958.asp>

## 0 引言

胰腺癌是恶性程度极高的消化系肿瘤, 大约80%胰腺癌在确诊时已经失去手术机会<sup>[1]</sup>, 这部分患者只能采取包括化疗、放疗、生物治疗、支持治疗等各种综合治疗手段来延长患者的生存时间, 近年来肿瘤的生物治疗成为研究的热点. 羽扇豆醇是一种三萜类化合物, 在多种水果、蔬菜以及某些植物中能提取, 如芒果、藕节、夹竹桃、马齿苋、榕树皮中可以提取. 随着对羽扇豆醇生物活性研究的深入, 其在医药领域获得了广泛的重视<sup>[2]</sup>. 近年来羽扇豆醇抗肿瘤作用被国外学者重视并用于研究, 国内研究甚少. 本文重点研究羽扇豆醇对人胰腺癌细胞SW1990和人 $\gamma\delta$ T细胞的生长的影响, 探讨其抗胰腺癌作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胰腺癌细胞株SW1990(中国科学院上海细胞所, 本室传代); 羽扇豆醇(lupeol)(Sigma公司); RPMI 1640培养基、小牛血清、胰蛋白酶(Gibco公司); 四甲基偶氮蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)(Sigma公司); 抗人TCR- $\gamma\delta$ -FITC购自杭州联科生物(immunotech, France); 恒温CO<sub>2</sub>培养箱公司、倒置显微镜(德国Wilovet公司); 超净工作台、低温离心机(北京希亚克技术有限公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 羽扇豆醇原液配制:**羽扇豆醇纯度 $\geq 95\%$ 购于Sigma公司. 用无水乙醇和二甲基亚砜(DMSO)按1:1比例混匀, 配制原液浓度为10 g/L, 放入-20℃冰箱储存, 以备使用.

**1.2.2  $\gamma\delta$ T细胞的培养、鉴定和纯度检测:**按本实验室<sup>[3]</sup>建立的方法进行, 将培养第5天的DC用终浓度为10  $\mu$ mol/L的唑来膦酸预处理48 h后收集DCs, 生理盐水洗涤1次, 用含IL-2 400 U/mL、10%小牛血清的RPMI 1640培养基将DCs配成 $1 \times 10^3$ /mL

的细胞悬液, 与用相同培养基配成 $1 \times 10^4$ /mL的自身PBMC等体积混合(细胞比例为1:10), 于37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养, 每2 d半量换培养基1次, 同时调整细胞密度至 $1 \times 10^5$ /mL. 收集不同培养时间的 $\gamma\delta$ T细胞进行相关功能检测.

**1.2.3 人胰腺癌细胞株SW1990的培养:**将复苏后的细胞配成 $2 \times 10^5$ /mL的细胞悬液, 置于细胞培养瓶中, 在37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养, 2-3 d更换细胞培养液, 细胞达80%瓶底时, 以0.02% EDTA消化脱壁. 收集细胞, 800 r/min离心3 min, 弃去上清备用.

**1.2.4 羽扇豆醇对人胰腺癌细胞SW1990和人 $\gamma\delta$ T细胞生长的影响:**将收集的对数生长期胰腺癌细胞SW1990配成 $3 \times 10^4$ /mL的细胞悬液, 接种于96孔板中, 0.2 mL/孔, 加入羽扇豆醇(浓度分别为200、100、50、25、12.5、6.25、3.2、1.6、0.8、0.4 mg/L). 人 $\gamma\delta$ T细胞配成 $1 \times 10^5$ /mL的细胞悬液, 接种于96孔板中, 0.2 mL/孔, 加入羽扇豆醇(浓度分别为400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.2、1.6、0.8 mg/L). 同时设空白和溶剂(每孔加入与溶解羽扇豆醇的等量溶剂)对照组, 每组设5个复孔. 继续孵育24、48、72 h后每孔加入MTT(5 g/L)液20  $\mu$ L, 37℃孵育4 h后弃上清, 每孔加入DMSO 150  $\mu$ L, 轻轻震荡10 min使甲瓚充分溶解, 在540 nm波长酶标仪上测定各孔吸光度值(A). 每试验重复3次. 求其平均值. 细胞生长抑制率IR(%) = (对照A)-(实验A值)/(对照A)  $\times 100\%$ , 增殖率 = 实验A值-对照A值/对照A值  $\times 100\%$ .

**统计学处理** 采用SPSS16.0软件, 进行统计学处理, 计量资料使用mean  $\pm$  SD表示, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较使用S-N-K法或者Duncan法, 检验水准 $\alpha = 0.05$ ,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1  $\gamma\delta$ T培养形态学及纯度** 人外周血单个核细胞(PBMC)在 $\gamma\delta$ T细胞培养基中培养24 h即可见贴壁生长, 48 h后集落开始变大, 培养7 d可见大的集落和单个贴壁生长细胞, 单个细胞可见细胞呈条梭状, 也有少量悬浮生长细胞. 收集培养7 d时的细胞进行流式细胞术检测并分析结果. PBMC未培养前 $\gamma\delta$ T细胞数为3.61%, 培养7 d的 $\gamma\delta$ T细胞数为80.2%(图1).

**2.2 不同浓度的羽扇豆醇对人胰腺癌细胞**

### ■ 研发前沿

$\gamma\delta$ T细胞以MHC非限制性方式杀伤肿瘤细胞, 现已报告用扩增的自身 $\gamma\delta$ T细胞对人胃癌、淋巴瘤和晚期肾癌进行了治疗, 初步结果是安全有效地. 因此, 如何在体内大量快速扩增, 重点是增强 $\gamma\delta$ T细胞杀伤活性, 深入探讨其作用机制是目前致力于研究的问题.

## ■相关报道

陈复兴等研究发现体外培养的 $\gamma\delta$ T细胞对多种消化系统肿瘤人胃癌、胰腺癌、肝癌细胞株均有较强的杀伤作用。且 $\gamma\delta$ T细胞杀伤肿瘤主要通过颗粒酶、穿孔素、Fas/FasL途径起作用。Corvaisier等发现 $\gamma\delta$ T细胞对自身肿瘤细胞和异体肿瘤细胞均有杀伤活性,而对自身正常细胞无杀伤作用,这种杀伤是MHC非依赖性的,并与 $\gamma\delta$ TCR刺激物的产生和ICAM-1表达密切相关。

表 1 不同浓度羽扇豆醇作用24、48、72h后对SW1990细胞生长的影 (mean  $\pm$  SD)

羽扇豆醇浓度( $\mu$ g/L)	SW1990细胞A值		
	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.1627 $\pm$ 0.0025	0.1353 $\pm$ 0.006	0.1425 $\pm$ 0.0049
溶剂对照组	0.1653 $\pm$ 0.032	0.1360 $\pm$ 0.041	0.1419 $\pm$ 0.003
0.4	0.1450 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.1283 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.1230 $\pm$ 0.0015 <sup>a</sup>
0.8	0.1440 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	0.1273 $\pm$ 0.0015 <sup>a</sup>	0.1180 $\pm$ 0.0045 <sup>a</sup>
1.6	0.1433 $\pm$ 0.0051 <sup>a</sup>	0.1263 $\pm$ 0.0025 <sup>a</sup>	0.1200 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>
3.125	0.1427 $\pm$ 0.0025 <sup>a</sup>	0.1260 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.1193 $\pm$ 0.0025 <sup>a</sup>
6.25	0.1363 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.1250 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.1163 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>
12.5	0.1357 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.1230 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.1160 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
25	0.1230 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.1230 $\pm$ 0.0036 <sup>a</sup>	0.1140 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>
50	0.1110 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.1160 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.1117 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>
100	0.1057 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	0.1067 $\pm$ 0.0035 <sup>a</sup>	0.1100 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
200	0.0827 $\pm$ 0.0116 <sup>a</sup>	0.0880 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	0.0837 $\pm$ 0.032 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组。

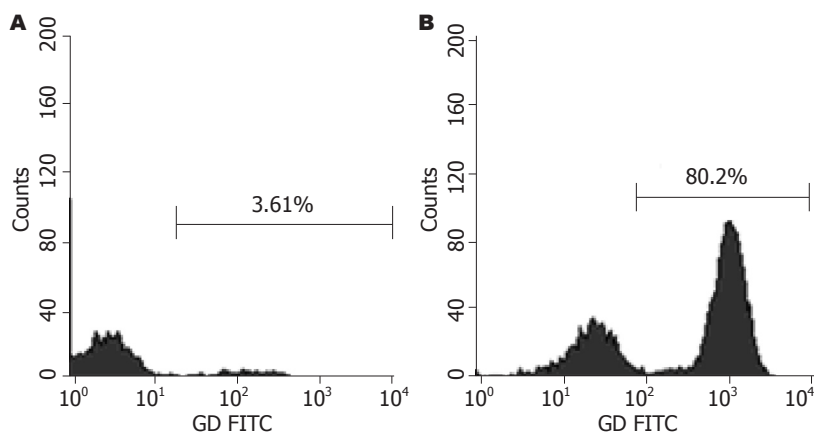
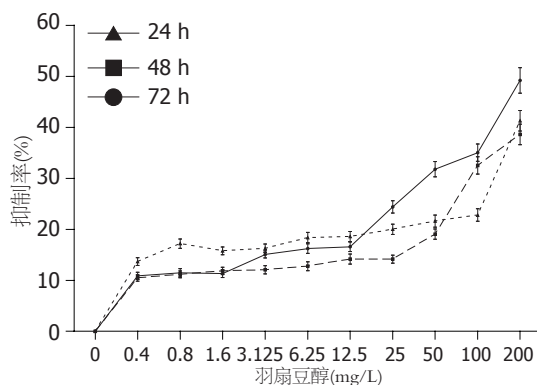
图 1 PBMC培养前后 $\gamma\delta$ T细胞百分数。A: 培养前; B: 培养后。

图 2 不同浓度的羽扇豆醇对SW1990细胞生长的影响。

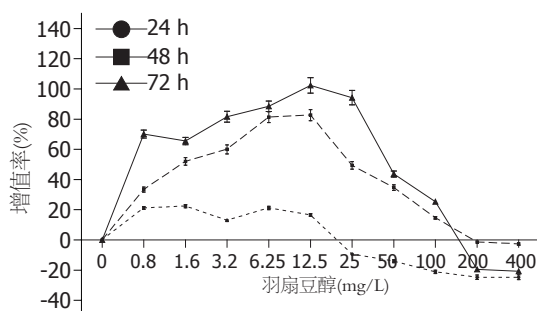
SW1990不同时间段生长的影响 羽扇豆醇浓度在0.4-200 mg/L时能够显著抑制SW1990细胞的生长,且随着浓度的增加抑制率呈上升趋势,24、48、72 h 3个时间段羽扇豆醇对SW1990细胞的抑制率无明显统计学差异(图2)。24、48、

72 h各组的A值与空白对照组和溶剂对照组相比较均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。空白对照与溶剂对照组比较无统计学意义(表1)。

2.3 不同浓度的羽扇豆醇对人 $\gamma\delta$ T细胞不同时间段生长的影响 羽扇豆醇对人 $\gamma\delta$ T细胞24、48、72 h浓度从0.8-12.5 mg/L时对人 $\gamma\delta$ T细胞的生长呈促进作用,随着浓度的升高增值率升高;在浓度12.5-100 mg/L时对促进人 $\gamma\delta$ T细胞的生长现象逐渐减弱。羽扇豆醇浓度在100-400 mg/L时对人 $\gamma\delta$ T细胞生长起抑制作用。图示48、72 h浓度为12.5 mg/L时其增值率最高(图3)。羽扇豆醇对人 $\gamma\delta$ T细胞MTT测得A值分析,24 h与空白对照组比较无统计学意义,48、72 h与空白对照组比较有统计学意义( $P < 0.05$ ),48与72 h比较无统计学意义,空白对照组与溶剂对照组比较无统计学意义(表2)。

表 2 不同浓度羽扇豆醇作用24、48、72 h对人 $\gamma\delta$ T细胞生长的影响 (mean  $\pm$  SD)

羽扇豆醇浓度( $\mu\text{g/L}$ )	$\gamma\delta$ T细胞A值		
	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.0850 $\pm$ 0.0210	0.0753 $\pm$ 0.0095	0.0867 $\pm$ 0.0068
溶剂对照组	0.0880 $\pm$ 0.0450	0.0761 $\pm$ 0.0122	0.0834 $\pm$ 0.0356
0.4	0.1033 $\pm$ 0.0069	0.1003 $\pm$ 0.0101	0.1480 $\pm$ 0.0170 <sup>a</sup>
0.8	0.1047 $\pm$ 0.0015	0.1140 $\pm$ 0.0140 <sup>a</sup>	0.1440 $\pm$ 0.0400 <sup>a</sup>
1.6	0.0960 $\pm$ 0.0144	0.1200 $\pm$ 0.0070 <sup>a</sup>	0.1580 $\pm$ 0.0300 <sup>a</sup>
3.125	0.1033 $\pm$ 0.0196	0.1360 $\pm$ 0.0220 <sup>a</sup>	0.1760 $\pm$ 0.0800 <sup>a</sup>
6.25	0.0993 $\pm$ 0.0286	0.1370 $\pm$ 0.0240 <sup>a</sup>	0.1640 $\pm$ 0.0300 <sup>a</sup>
12.5	0.0770 $\pm$ 0.0200	0.1117 $\pm$ 0.0225	0.1760 $\pm$ 0.0800 <sup>a</sup>
25	0.0730 $\pm$ 0.0050	0.1013 $\pm$ 0.0127	0.1690 $\pm$ 0.0200 <sup>a</sup>
50	0.0667 $\pm$ 0.0176	0.0863 $\pm$ 0.0015	0.1093 $\pm$ 0.0104
100	0.0640 $\pm$ 0.0199	0.0740 $\pm$ 0.0195	0.0700 $\pm$ 0.0098
200	0.0673 $\pm$ 0.1069	0.0730 $\pm$ 0.0173	0.0690 $\pm$ 0.0020

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组.图 3 不同浓度的羽扇豆醇对 $\gamma\delta$ T细胞生长的影响.

### 3 讨论

羽扇豆醇是一种三萜类天然植物提取物, 既往研究表明, 羽扇豆醇在抗炎止痛、抗氧化等方面有很好的药理作用, 而且毒性很低, 具有良好的临床应用潜力, 受到国内外学者的广泛关注<sup>[2]</sup>. 近几年其抗肿瘤作用受到重视, 有研究表明羽扇豆醇对黑色素瘤、前列腺癌、皮肤癌、肝癌都有抗癌作用<sup>[4]</sup>. 对于羽扇豆醇抗胰腺癌的作用, 国内外报道较少. 本研究用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测不同浓度的羽扇豆醇在不同时间段对人胰腺癌细胞SW1990生长的影响, 实验表明羽扇豆醇浓度在0.4-200 mg/L时能够显著抑制胰腺癌细胞SW1990的生长, 且随着浓度的增加抑制率呈上升趋势, 24、48、72 h各组的A值与空白对照组和溶剂对照组相比较均具有统计学意义( $P < 0.05$ ). 本实验提示羽扇豆醇对人胰腺癌细胞SW1990有抑制作用, 其机制可能与羽扇豆醇下调cFLIP的表达、增加caspase-8蛋白的活性、

增强TRAIL对胰腺癌细胞的促凋亡作用有关<sup>[5]</sup>.

人 $\gamma\delta$ T细胞在PBMCL淋巴细胞中仅占0.5%-5.0%, 大多为CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>.  $\gamma\delta$ T细胞主要分布于皮肤、小肠、食管、肺、生殖器官及皮下组织. 外周血中的 $\gamma\delta$ T细胞约占人体总 $\gamma\delta$ T细胞的90%以上, 他识别磷酸化抗原和一些应激分子以及激蛋白的同源分子, 他识别抗原分子不受MHC分子限制, 在固有免疫中发挥重要作用<sup>[6,7]</sup>. 近年来 $\gamma\delta$ T细胞是免疫学的一个研究热点, 国内外学者对其分化和功能进行了广泛深入的研究<sup>[8,9]</sup>. 对其功能研究多集中在抗感染和抗肿瘤等方面<sup>[10,11]</sup>,  $\gamma\delta$ T细胞的抗肿瘤功能与细胞表达的穿孔素、颗粒酶B和NKG2D受体及 $\gamma\delta$ T细胞分泌的细胞因子有关. 在诱导机体固有免疫应答和在肿瘤细胞的预防方面具有重要的作用<sup>[12]</sup>. Kobayashi等<sup>[13]</sup>用自身 $\gamma\delta$ T细胞治疗7例晚期肾癌, 结果证明治疗是安全的, 治疗后能明显增加血中 $\gamma\delta$ T细胞数量和诱发抗肿瘤反应.  $\gamma\delta$ T细胞识别谱广泛, 对肿瘤细胞的识别不需要抗原提呈细胞加工处理, 没有MHC限制性. 因此,  $\gamma\delta$ T细胞已成为肿瘤患者过继免疫治疗的一个新的候选效应细胞. 研究已证实, 在直肠癌、肾癌、肝癌和乳腺癌等实体瘤的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中存在有 $\gamma\delta$ T细胞并具有抗肿瘤作用<sup>[14,15]</sup>. Bani等<sup>[16]</sup>研究发现羽扇豆醇对T细胞生长有抑制作用, Balb/c小鼠每日口服羽扇豆醇12.5-200 mg/kg, 可抑制CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞数量. 随着研究的不断深入, 发现培养的外周血 $\gamma\delta$ T细胞在体外同样具有较强的广谱抗肿瘤作用<sup>[17-19]</sup>, 羽扇豆醇对 $\gamma\delta$ T细胞的作用国内外未有研究. 本实

### ■应用要点

本文研究发现羽扇豆醇在体外能够促进 $\gamma\delta$ T细胞的增殖, 有益于羽扇豆醇应用于肿瘤的过继免疫治疗, 并提供了临床治疗肿瘤的用药依据.



## ■同行评价

本文分析合理, 条理分明, 参考文献恰当, 研究有一定意义。

验采用体外扩增人外周血 $\gamma\delta$ T细胞, 探讨不同浓度的羽扇豆醇在不同时间段对人 $\gamma\delta$ T细胞的影响, 发现羽扇豆醇在24、48、72 h浓度从0.8-12.5 mg/L时对 $\gamma\delta$ T细胞的生长呈促进作用, 随着浓度的升高增值率升高; 在浓度12.5-100 mg/L时对促进 $\gamma\delta$ T细胞的生长现象逐渐减弱。所以羽扇豆醇对 $\gamma\delta$ T细胞的增殖作用有浓度和时间的关系。本实验结果显示羽扇豆醇对 $\gamma\delta$ T细胞的最佳增殖作用在72 h 12.5 mg/L时。关于羽扇豆醇是否增强 $\gamma\delta$ T细胞的杀伤活性, 及其对 $\gamma\delta$ T细胞的信号通路的机制将在今后的研究中深入探讨。

本研究表明羽扇豆醇有促进人 $\gamma\delta$ T细胞体外增殖的作用, 羽扇豆醇具有抗胰腺癌的作用。通过本研究现象, 我们推测可在体外培养胰腺癌患者 $\gamma\delta$ T细胞时选择适当浓度羽扇豆醇和培养一定时间以增加免疫细胞数量和功能, 再回输给胰腺癌患者, 可提高肿瘤生物治疗的效果。本研究为羽扇豆醇在胰腺癌患者生物免疫治疗中的应用提供了一定的理论依据, 羽扇豆醇治疗胰腺癌的确切机制及体内实验结果仍需进一步研究。

## 4 参考文献

- Loos M, Kleeff J, Friess H, Büchler MW. Surgical treatment of pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1138: 169-180
- Fernández MA, de las Heras B, García MD, Sáenz MT, Villar A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 1533-1539
- 吕小婷, 刘军权, 周忠海, 陈玲, 张娟, 张颂, 黄菲, 陈复兴. 一种体外扩增 $\gamma\delta$ T细胞的新方法. *中国免疫学杂志* 2011; 27: 739-747
- 张大伟, 刘建平. 羽扇豆醇抗肿瘤作用研究进展. *实用医学杂志* 2010; 26: 3650-3652
- Murtaza I, Saleem M, Adhami VM, Hafeez BB, Mukhtar H. Suppression of cFLIP by lupeol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-mediated apoptosis in chemoresistant human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2009; 69: 1156-1165
- Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 2008; 213: 173-182
- Kabelitz D, Glatzel A, Wesch D. Antigen recognition by human gammadelta T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 1-7
- Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, Salerno A. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med* 2003; 198: 391-397
- Ferlazzo V, Sferrazza C, Caccamo N, Di Fede G, Di Lorenzo G, D'Asaro M, Meraviglia S, Dieli F, Rini G, Salerno A. In vitro effects of aminobisphosphonates on Vgamma9Vdelta2 T cell activation and differentiation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19: 309-317
- Gong F, Ma Y, Ma A, Yu Q, Zhang J, Nie H, Chen X, Shen B, Li N, Zhang D. A lectin from Chinese mistletoe increases gammadelta T cell-mediated cytotoxicity through induction of caspase-dependent apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; 39: 445-452
- Ma YH, Cheng WZ, Gong F, Ma AL, Yu QW, Zhang JY, Hu CY, Chen XH, Zhang DQ. Active Chinese mistletoe lectin-55 enhances colon cancer surveillance through regulating innate and adaptive immune responses. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5274-5281
- Whang MI, Guerra N, Raulet DH. Costimulation of dendritic epidermal gammadelta T cells by a new NKG2D ligand expressed specifically in the skin. *J Immunol* 2009; 182: 4557-4564
- Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, Uchiyama T, Minato N, Toma H. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 469-476
- Watanabe N, Hizuta A, Tanaka N, Orita K. Localization of T cell receptor (TCR)-gamma delta + T cells into human colorectal cancer: flow cytometric analysis of TCR-gamma delta expression in tumour-infiltrating lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 167-173
- Chen J, Niu H, He W, Ba D. Antitumor activity of expanded human tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 256-263
- Bani S, Kaul A, Khan B, Ahmad SF, Suri KA, Gupta BD, Satti NK, Qazi GN. Suppression of T lymphocyte activity by lupeol isolated from *Crataeva religiosa*. *Phytother Res* 2006; 20: 279-287
- Viey E, Fromont G, Escudier B, Morel Y, Da Rocha S, Chouaib S, Caignard A. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* 2005; 174: 1338-1347
- Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier JF, Scotet E, Bonneville M, Jotereau F. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* 2005; 175: 5481-5488
- 马安伦, 葛海良, 张冬青, 王树军, 周光炎. 一种简单的 $\gamma\delta$ T细胞扩增培养方法及其抗肿瘤生物学功能研究. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2000; 7: 181-183

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 黏膜下层早期胃癌淋巴结转移290例

张勇, 彭正, 卫勃, 陈凇

## ■背景资料

早期胃癌是指局限在黏膜层与黏膜下层的胃癌, 不论肿瘤大小及有无淋巴结转移。随着对早期胃癌淋巴结转移规律的认识和技术的进步, 早期胃癌微创治疗逐渐得到认可与推广。目前对胃黏膜内癌行微创治疗已写入胃癌治疗指南, 而黏膜下癌是否适合行微创治疗尚存争议。

张勇, 彭正, 卫勃, 陈凇, 中国人民解放军总医院普通外科 北京市 100853

作者贡献分布: 此课题由张勇与陈凇设计; 研究过程由张勇、彭正及卫勃操作完成; 数据分析由张勇完成; 本论文写作由张勇与彭正完成。

通讯作者: 陈凇, 教授, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院普通外科。chenlinbj@vip.sina.com  
电话: 010-66938428

收稿日期: 2011-06-25 修回日期: 2011-09-01

接受日期: 2011-09-29 在线出版日期: 2011-10-08

## Predictive factors associated with lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion: an analysis of 290 cases

Yong Zhang, Zheng Peng, Bo Wei, Lin Chen

Yong Zhang, Zheng Peng, Bo Wei, Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of the People's Liberation Army, Beijing 100853, China

Correspondence to: Lin Chen, Professor, Department of General Surgery, General Hospital of the People's Liberation Army, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. chenlinbj@vip.sina.com

Received: 2011-06-25 Revised: 2011-09-01

Accepted: 2011-09-29 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To analyze the predictive risk factors for lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion.

**METHODS:** The clinical data for 290 patients surgically treated for early gastric cancer with submucosal invasion between 1996 and 2010 were reviewed retrospectively. The clinico-pathological variables predicting lymph node metastasis were evaluated.

**RESULTS:** Lymph node metastasis was observed in 21.4% of patients included. Univariate analysis showed that tumor size, histologic type, depth of invasion and presence of vascular or lymphatic invasion were positively correlated with lymph node metastasis. Multivariate analyses revealed that tumor size ( $\geq 2$  cm), histologic type and vascular or lymphatic involvement

were independently related to lymph node metastasis. Histologic type was the strongest predictive factor for lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion.

**CONCLUSION:** Tumor size, histologic type and presence of vascular or lymphatic invasion are independent risk factors for lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion. Minimally invasive treatment, such as endoscopic mucosal resection, may be possible in differentiated submucosal cancer of small size ( $< 2$  cm).

**Key Words:** Early gastric carcinoma; Submucosal invasion; Lymph node metastasis

Zhang Y, Peng Z, Wei B, Chen L. Predictive factors associated with lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion: an analysis of 290 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2970-2973

## 摘要

**目的:** 研究黏膜下层早期胃癌淋巴结转移的预测因素。

**方法:** 回顾性分析解放军总医院1996-2010年手术治疗的290例黏膜下层早期胃癌中与淋巴结转移相关的临床病理资料。

**结果:** 黏膜下层早期胃癌淋巴结转移率为21.4%。单因素分析表明影响黏膜下层早期胃癌淋巴结转移的因素主要有肿瘤大小、组织学类型、浸润深度和脉管浸润。多因素分析显示肿瘤大小、组织学类型和脉管浸润与黏膜下层早期胃癌淋巴结转移独立相关。

**结论:** 黏膜下层早期胃癌淋巴结转移与肿瘤大小、组织学类型和脉管浸润因素有关。内镜治疗等微创治疗可考虑应用于肿瘤 $< 2$  cm同时为分化型的黏膜下层早期胃癌中。

**关键词:** 早期胃癌; 黏膜下; 淋巴结转移

张勇, 彭正, 卫勃, 陈凇. 黏膜下层早期胃癌淋巴结转移290例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(28): 2970-2973  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2970.asp>

## ■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普通外科

## 0 引言

早期胃癌是指局限在黏膜层与黏膜下层的胃癌, 不论肿瘤大小及有无淋巴结转移, 侵及胃黏膜下层的早期胃癌称为黏膜下层(submucosal, SM)癌。早期胃癌内镜下手术及缩小手术逐渐得到许多学者认可与推广<sup>[1]</sup>。目前对胃黏膜内癌行微创几近共识, 而SM癌是否适合行内镜手术或缩小手术尚存争议。本文回顾性分析我院1996-01/2010-12经外科手术证实的290例SM癌的临床病理资料, 探讨各临床病理因素与其淋巴结转移的关系, 为SM癌的治疗策略提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1996-2010年解放军总医院手术切除的胃癌共4 816例中, 其中病理确诊为早期胃癌719例, 其中累及黏膜下层的共290例。其中男性230例, 女性60例; 年龄26-86岁。

**1.2 方法** 分析其临床病理资料, 包括患者年龄、性别、肿瘤组织学类型、大体类型、大小、部位、侵犯深度、脉管内癌栓等。大体类型分为隆起型(包括I型、IIa型及以I型、IIa型为主的混合型)、平坦型(包括IIb型及以IIb型为主的混合型)、凹陷型(包括IIc型、III型及以IIc型、III型为主的混合型)。肿瘤大小以肿瘤最大径计, 多发肿瘤以最大癌灶计。肿瘤部位分为近1/3、中1/3、远1/3。根据浸润黏膜下层的深度平均分为3层: SM1、SM2、SM3。肿瘤淋巴结病理分期按国际抗癌联盟(UICC)2010年第7版TNM分期进行。

**统计学方法** 应用SPSS17.0软件进行统计学分析。先做单因素分析, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 分析对淋巴结转移有影响的指标, 再选择单因素中分析中有统计学意义的指标作自变量, 以淋巴结转移为因变量, 采用非条件多因素逐步Logistic回归分析, 分析各临床病理因素对黏膜下层胃癌淋巴结转移的影响, 以 $P<0.05$ 有统计学意义,  $P<0.01$ 有显著性统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各临床病理因素与黏膜下层癌淋巴结转移相关性的单因素分析** 290例黏膜下层早期胃癌中, 62(21.4%)例有淋巴结转移。单因素分析显示与淋巴结转移相关的临床病理因素包括肿瘤大小、组织学分型、浸润深度、脉管侵犯(表1)。

**2.2 各临床病理因素与淋巴结分期的关系** 单因素分析与黏膜下层早期胃癌淋巴结转移相关的

表 1 290例黏膜下层早期胃癌的淋巴结转移危险因素的单因素分析

	<i>n</i>	淋巴结阳性 <i>n</i> (%)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)			0.3546	0.5515
<65	180	41(22.7)		
≥65	110	21(19.1)		
性别			0.0565	0.8121
男	230	48(20.9)		
女	60	14(23.3)		
部位			5.8326	0.0541
近1/3	58	6(10.3)		
中1/3	50	12(24.0)		
远1/3	182	44(24.2)		
肿瘤大小(cm)			9.6195	0.0221
<1	17	2(11.8)		
1-2	83	10(12.0)		
2-4	142	34(23.9)		
≥4	48	16(33.3)		
大体类型			3.6809	0.1587
隆起型	45	8(17.8)		
平坦型	37	4(10.8)		
凹陷型	208	50(24.0)		
组织学类型			15.7644	0.0001
分化型	107	9(8.4)		
未分化型	183	53(29.0)		
浸润深度			17.2087	0.0002
SM1	88	9(10.2)		
SM2	80	13(16.1)		
SM3	122	40(32.8)		
脉管浸润			23.4642	0.0000
无	255	43(16.9)		
有	35	19(54.3)		

4个临床病理因素与肿瘤淋巴结分期呈线性相关(表2)。

**2.3 各临床病理因素与黏膜下层癌淋巴结转移相关性的多因素分析** 对单因素分析 $P<0.05$ 的临床病理因素进行logistic回归分析。结果显示, 肿瘤大小、组织学类型及脉管侵犯是黏膜下层早期胃癌淋巴结转移的独立性危险因素(表3)。

## 3 讨论

我国胃癌患者虽然以进展期病例为主, 但随着我国医疗卫生水平的提高和人们健康意识的不断提高, 国内早期胃癌的手术率也不断提高<sup>[2]</sup>。随之而来的对早期胃癌合理治疗的要求及选择是临床医生面临的重大问题。

早期胃癌5年生存率可达90%, 而淋巴结转移是最重要的预后因素<sup>[3-6]</sup>。无淋巴结转移的

### ■研发前沿

确定黏膜下层癌淋巴结转移的高危人群, 制定个体化的微创治疗是早期胃癌治疗当前面临的问题。

### ■相关报道

An的研究表明肿瘤大小及脉管侵犯是SM癌淋巴结转移独立的风险因素, 缩小手术可应用于高度选择性的患者。



## ■创新盘点

本文在大宗病例的基础上进一步分析黏膜下层淋巴结转移的相关因素。

表 2 黏膜下层早期胃癌与淋巴结分期相关的临床病理因素  $n(\%)$ 

	N0	N1	N2	N3	$\chi^2$ 值	$P$ 值
肿瘤大小(cm)		30	25	7	17.4553	0.0420
<1	15(88.2)	1(5.9)	1(5.9)	0(0)		
1-2	73(88.0)	7(8.4)	2(2.4)	1(1.2)		
2-4	108(76.1)	18(12.7)	12(8.4)	4(2.8)		
$\geq 4$	32(66.7)	4(8.3)	10(20.8)	2(4.2)		
组织学类型					18.0539	0.0004
分化型	98(91.6)	6(5.6)	3(2.8)	0(0)		
未分化型	130(71.1)	24(13.1)	22(12.0)	7(3.8)		
浸润深度					22.5374	0.0010
SM1	79(89.8)	7(8.0)	2(2.2)	0(0)		
SM2	67(83.8)	8(10.0)	4(5.0)	1(1.2)		
SM3	82(67.2)	15(12.3)	19(15.6)	6(4.9)		
脉管浸润					23.5328	0.0000
无	212(83.1)	21(8.2)	18(7.1)	4(1.6)		
有	16(45.7)	9(25.7)	7(20.0)	3(8.6)		

表 3 290例黏膜下层早期胃癌的淋巴结转移危险因素的多因素分析

观察指标	相对危险度(95%CI)	$P$ 值
肿瘤大小(cm)		
<1		
1-2	1.423(0.331-6.122)	0.635
2-4	1.969(0.895-4.331)	0.029
$\geq 4$	3.320(1.280-8.612)	0.014
组织学类型		
分化型		
未分化型	3.970(1.820-8.660)	0.001
浸润深度		
SM1		
SM2	1.239(0.884-2.107)	0.083
SM3	1.145(0.724-1.973)	0.075
脉管浸润		
无		
有	0.216(0.098-0.478)	0.000

EGC术后5年存活率为94.2%，有淋巴结转移者术后5年存活率为87.3%<sup>[7]</sup>。胃的黏膜内癌淋巴结转移率较低，其预后较黏膜下癌明显好。因此，大多数黏膜内癌患者可以行内镜下治疗或缩小的胃癌根治术，但黏膜下癌是否适合行内镜手术或缩小手术尚存争议。

已有许多研究评估黏膜下层胃癌的淋巴结转移风险，从而制定黏膜下层胃癌合适的治疗方案。An等<sup>[8]</sup>研究表明肿瘤大小、组织学类型、Lauren分型、肿瘤浸润深度、脉管侵犯、周围神经侵犯与黏膜下层胃癌淋巴结转移相关；而

肿瘤大小及脉管侵犯是淋巴结转移独立的风险因素。本组病例单因素分析显示肿瘤大小、组织学类型、肿瘤浸润深度、脉管侵犯等临床病理因素与黏膜下层胃癌淋巴结转移相关；同时与淋巴结分期呈线性相关；多因素分析显示肿瘤大小、组织学类型及脉管侵犯为黏膜下层胃癌淋巴结转移的独立性危险因素。

对SM癌的治疗，尽管EMR或ESD可以完全切除肿瘤病灶，但由于其较高的淋巴结转移率，目前D2根治术仍然作为SM癌的标准治疗方案<sup>[9,10]</sup>。但SM1癌中无淋巴结转移的病例约占90%以上，所以依据肿瘤的病理生物学行为筛选无淋巴结转移的SM1癌病例予以微创治疗，而不影响预后。一般认为直径<1.5 cm的SM1癌通常不发生淋巴结转移，经内镜切除后不需进一步手术<sup>[11,12]</sup>。SM2、SM3癌的淋巴结转移率达20%以上，因此其内镜治疗根治率明显下降，可行腹腔镜胃癌根治术，与传统胃癌手术相比，在手术时间并发症的发生率及生存率等方面均无明显差别，而手术失血量、住院时间、术后镇痛时间均有减少<sup>[13-15]</sup>。

本组研究提示与SM癌淋巴结转移独立性危险因素包括肿瘤大小、组织学类型及脉管侵犯。但患者术前检查并不能检测到脉管侵犯，因此，我们认为在决定SM癌治疗方法时应充分考虑肿瘤大小、组织学类型这两个危险因素，评估SM癌淋巴结转移风险，选择合适的治疗方法。对于肿瘤直径 $\geq 2$  cm或未分化型的SM癌病例，宜行标准的D2手术。对不具备两个危险因素的SM癌，

## ■应用要点

本文回顾分析了290例黏膜下层早期胃癌中与淋巴结转移相关的临床病理资料，为内镜治疗、腹腔镜治疗等微创方法治疗黏膜下层早期胃癌提供了理论依据。

行经内镜手术等微创手术。

#### 4 参考文献

- 1 范朝刚, 李国立. 早期胃癌的手术方式与淋巴结清扫. 中国实用外科杂志 2010; 30: 400-402
- 2 吴巍, 吴云林, 孙萍胡, 黄玮, 江凤翔, 朱延波, 郭滢, 蔚青, 燕敏, 朱正纲. 早期胃癌手术率的演变及经验. 胃肠病学和肝病学杂志 2008; 17: 205-208
- 3 Roviello F, Rossi S, Marrelli D, Pedrazzani C, Corso G, Vindigni C, Morgagni P, Saragoni L, de Manzoni G, Tomezzoli A. Number of lymph node metastases and its prognostic significance in early gastric cancer: a multicenter Italian study. *J Surg Oncol* 2006; 94: 275-80; discussion 274
- 4 Pelz J, Merkel S, Horbach T, Papadopoulos T, Hohenberger W. Determination of nodal status and treatment in early gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 935-941
- 5 Kim DY, Joo JK, Ryu SY, Kim YJ, Kim SK. Factors related to lymph node metastasis and surgical strategy used to treat early gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 737-740
- 6 王世贺, 王振宁, 徐惠绵. 黏膜下层胃癌的淋巴结转移规律与缩小手术. 世界华人消化杂志 2008; 16: 493-497
- 7 Noh SH, Hyung WJ, Cheong JH. Minimally invasive treatment for gastric cancer: approaches and selection process. *J Surg Oncol* 2005; 90: 188-193; discussion 193-194
- 8 An JY, Baik YH, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Kim S. Predictive factors for lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion: analysis of a single institutional experience. *Ann Surg* 2007; 246: 749-753
- 9 Ishikawa S, Togashi A, Inoue M, Honda S, Nozawa F, Toyama E, Miyanari N, Tabira Y, Baba H. Indications for EMR/ESD in cases of early gastric cancer: relationship between histological type, depth of wall invasion, and lymph node metastasis. *Gastric Cancer* 2007; 10: 35-38
- 10 Li C, Kim S, Lai JF, Oh SJ, Hyung WJ, Choi WH, Choi SH, Zhu ZG, Noh SH. Risk factors for lymph node metastasis in undifferentiated early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 764-769
- 11 Kunisaki C, Shimada H, Nomura M, Akiyama H. Appropriate lymph node dissection for early gastric cancer based on lymph node metastases. *Surgery* 2001; 129: 153-157
- 12 Yamada H, Nihei Z, Yamashita T, Shiota Y, Ichikawa W, Sugihara K. Is lymphadenectomy needed for all submucosal gastric cancers? *Eur J Surg* 2001; 167: 199-203
- 13 李佑, 臧璐, 胡伟国, 王明亮, 陆爱国, 李健文, 马君俊, 冯波, 蒋渝, 吴云林, 朱正纲, 郑民华. 腹腔镜与开腹胃癌根治术治疗早期胃癌的临床对照研究. 中华胃肠外科杂志 2010; 12: 899-902
- 14 Kitano S, Shiraishi N, Uyama I, Sugihara K, Tanigawa N. A multicenter study on oncologic outcome of laparoscopic gastrectomy for early cancer in Japan. *Ann Surg* 2007; 245: 68-72
- 15 Kim W, Song KY, Lee HJ, Han SU, Hyung WJ, Cho GS. The impact of comorbidity on surgical outcomes in laparoscopy-assisted distal gastrectomy: a retrospective analysis of multicenter results. *Ann Surg* 2008; 248: 793-799

#### ■同行评价

与本文类似研究较多, 创新性一般, 但本文设计合理, 纳入病例较多, 有一定的临床价值。

编辑 何基才 电编 闫晋利

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

#### • 消息 •

### WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)

# 嗜酸乳杆菌对感染人轮状病毒乳鼠肠黏膜的保护作用

高源, 张振, 王宝香, 鲍连生, 彭罕鸣

高源, 王宝香, 彭罕鸣, 武汉市妇女儿童医疗保健中心消化科 湖北省武汉市 430016

张振, 鲍连生, 武汉市妇女儿童医疗保健中心检验科 湖北省武汉市 430016

作者贡献分布: 高源与张振对此文所作贡献均等; 此课题由高源与张振设计; 彭罕鸣主任指导; 研究过程由高源、张振、王宝香及鲍连生操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张振提供; 数据分析由高源、王宝香完成; 本论文写作由高源、张振完成。

通讯作者: 张振, 副主任技师, 430016, 湖北省武汉市, 武汉市妇女儿童医疗保健中心检验科. zhangzhen20092010@yahoo.cn  
电话: 027-82433425

收稿日期: 2011-07-02 修回日期: 2011-10-02

接受日期: 2011-10-06 在线出版日期: 2011-10-08

## Protective effect of *Lactobacillus acidophilus* on intestinal mucosa of neonatal mice infected with a human rotavirus

Yuan Gao, Zhen Zhang, Bao-Xiang Wang,  
Lian-Sheng Bao, Han-Ming Peng

Yuan Gao, Bao-Xiang Wang, Han-Ming Peng, Department of Gastroenterology, Wuhan Women and Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, Hubei Province, China

Zhen Zhang, Lian-Sheng Bao, Department of Medical Laboratory, Wuhan Women and Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, Hubei Province, China

Correspondence to: Zhen Zhang, Associate Chief Technician, Department of Medical Laboratory, Wuhan Women and Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, Hubei Province, China. zhangzhen20092010@yahoo.cn

Received: 2011-07-02 Revised: 2011-10-02

Accepted: 2011-10-06 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the possible protective effect of *Lactobacillus acidophilus* (*L.acidophilus*) on intestinal mucosa of neonatal mice infected with a human rotavirus (HRV).

**METHODS:** Sixty 4-day-old Kunming mice were randomly and equally divided into control group, HRV-infected group, *L.acidophilus*-pretreated group (treated before HRV infection) and *L.acidophilus*-treated group (treated after HRV infection). The symptoms in these mice

were observed each day for 8 d. On day 8, nine mice of each group were sacrificed by cervical dislocation. Caecum samples were taken for bacterial isolation and culture to count bacterial colonies. Secretory IgA (sIgA) from the intestinal mucosa and serum interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factors- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected by ELISA. The thickness of intestinal mucosa, height of villus and depth of crypt were measured using Image-Pro Plus 5.1 software.

**RESULTS:** The mice in the normal control group did not suffer from diarrhea, whereas the HRV-infected group showed altered intestinal flora, decreased level of intestinal sIgA, increased serum IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels, and damaged intestinal mucosal barrier. Compared to the HRV-infected group, mice of the *L.acidophilus*-pretreated and -treated groups showed some amelioration in intestinal flora, intestinal sIgA, serum IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , and intestinal mucosal barrier. More obvious protective effect on intestinal mucosa was observed in the pretreatment group than in the treatment group.

**CONCLUSION:** *L.acidophilus* possesses protective effect on intestinal mucosa of HRV-infected neonatal mice. Pretreatment with *L.acidophilus* has better protective effect than *L.acidophilus* treatment.

**Key Words:** Human rotavirus; *L.acidophilus*; Neonatal mice; Intestinal mucosa

Gao Y, Zhang Z, Wang BX, Bao LS, Peng HM. Protective effect of *Lactobacillus acidophilus* on intestinal mucosa of neonatal mice infected with a human rotavirus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 19(28): 2963-2969

## 摘要

**目的:** 观察嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*)对感染人轮状病毒(human rotavirus, HRV)乳鼠肠黏膜的保护作用。

**方法:** 将60只昆明种乳鼠随母鼠按窝随机均分为4组, 给4日龄的乳鼠灌服HRV作为感染组, 灌服HRV的前和后灌服*L.acidophilus*作为

## ■背景资料

嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*)等益生菌是肠道内的正常菌群, 可以维护肠道正常的结构及功能, 具有免疫调节、抗感染等作用。*L.acidophilus*是近几年用于小儿轮状病毒(HRV)腹泻治疗的新型益生菌制剂, 但目前报道的治疗效果不太一致, 且*L.acidophilus*的使用剂量和使用方法也不明确。

## ■同行评议者

邢建峰, 副教授, 西安交通大学医学院



## ■研究前沿

*L.acidophilus*已被用于HRV腹泻的治疗,并被部分研究证实有一定的效果,但其具体的作用机制仍不清楚。

预防组和治疗组,正常对照组灌服同剂量的MEM Eagle细胞培养液。在实验的第8天下午杀死每组9只乳鼠,取乳鼠盲肠内容物分离培养后,进行菌群分析;ELISA法检测肠黏膜分泌性免疫球蛋白(SIgA)、血清干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ );HE法染色乳鼠小肠黏膜切片,利用Image-Pro Plus 5.1图像软件分析各组乳鼠小肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度。

**结果:**与正常对照组比较,HRV感染组乳鼠出现了肠道菌群失调、肠黏膜SIgA下降、血清IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 上升、肠黏膜机械屏障受损,预防组和治疗组乳鼠肠道菌群失调、肠黏膜免疫力下降和肠黏膜机械屏障受损的情况均得到了改善。预防组与治疗组相比,前者对乳鼠肠黏膜受损的保护作用效果更好。

**结论:***L.acidophilus*对感染HRV乳鼠肠黏膜有一定的保护作用,感染前灌服*L.acidophilus*的保护效果好于感染后灌服。

**关键词:**轮状病毒;嗜酸乳杆菌;乳鼠;肠黏膜

高源,张振,王宝香,鲍连生,彭罕鸣.嗜酸乳杆菌对感染人轮状病毒乳鼠肠黏膜的保护作用.世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2963-2969  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2963.asp>

## 0 引言

人轮状病毒(human rotavirus, HRV)是婴幼儿非细菌性腹泻的主要病毒性病原。国内部分地区近期统计:天津市住院腹泻患儿中HRV阳性检出率为37.53%<sup>[1]</sup>;重庆儿童医院就诊的非细菌性急性腹泻婴幼儿大便轮状病毒检测阳性率为50.69%,高峰月份在11-12月,分别为63.27%和62.16%<sup>[2]</sup>;张昕等<sup>[3]</sup>统计我国5岁及以下儿童占人群其他感染性腹泻病例总数的50.98%,病原学诊断90.65%为病毒性,病毒性感染性腹泻以HRV(92.75%)感染为主。虽然婴幼儿HRV感染率很高,但至今尚无理想的HRV感染预防疫苗和特效治疗药物。益生菌可通过激发机体免疫系统中的树突状细胞,增强宿主的免疫防御功能,并可高效定植于肠黏膜上皮细胞,从而抑制多种病原体在肠道上皮细胞上的定植,益生菌也可产生一些小分子蛋白质P40和P70等,这类蛋白质能减轻过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对肠道上皮细胞的氧化伤害<sup>[4-7]</sup>。虽然目前有一些应用益生菌治疗多种腹泻的研究报道,但我们仍然没有完全了解益

生菌复杂的作用机制,通过对益生菌的深入研究,能使其更好地为我们服务。我们先前探讨过*L.acidophilus*对乳鼠感染HRV的预防和治疗作用<sup>[8]</sup>,但未深入研究*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠肠黏膜的保护作用。本文我们进一步探讨*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠肠黏膜生物屏障、免疫屏障和机械屏障的保护作用,结果报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HRV Wa毒株,由中国预防医学科学院病毒研究所提供,用于病毒增殖和测定的细胞为MA104细胞(非洲绿猴胎肾细胞传代细胞系)。MA104细胞在MEM Eagle培养液中生长和传代,采用空斑形成法滴定病毒的感染滴度,待病毒滴度达到10<sup>7</sup>空斑形成单位(plaque forming unit, pfu)时行动物实验。嗜酸乳杆菌:*L.acidophilus* 1.1878购自中国科学院微生物研究所菌种库,实验时配成10<sup>8</sup> cfu/mL的菌液,经口灌服。实验动物:购自武汉大学动物实验中心,SPF级昆明种乳鼠60只,孕晚期购回,乳鼠自然娩出,实验选择雌雄各半的小鼠,体质量2.20 g±0.94 g,小鼠饲养于有空气过滤膜的鼠笼内。动物使用许可证:SYXK(鄂)2008-0013。实验前成年鼠大便HRV抗原均为阴性。肠球菌培养基(EC)、肠杆菌培养基(EMB)、双歧杆菌培养基(TPY)、乳酸杆菌培养基(LBS)均购自青岛海博技术有限公司;SIgA试剂购自Sigma公司;IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 试剂购自上海森雄科技实业有限公司;Ringer缓冲液购自OXOID公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及*L.acidophilus*干预方法:**实验选用60只乳鼠(雌雄各30只),随母鼠按窝均分为4组:正常对照组、HRV感染组、*L.acidophilus*预防组、*L.acidophilus*治疗组,每组15只。HRV感染组按照参考文献<sup>[9,10]</sup>的方法建立乳鼠感染HRV模型,即乳鼠出生的第4天上午用改良的1 mL注射器经口灌服(自然吸吮法)50  $\mu$ L HRV液(3×10<sup>6</sup> pfu/mL);*L.acidophilus*预防组出生后第1天起,每天灌服50  $\mu$ L *L.acidophilus*(10<sup>8</sup> cfu/mL),连续3 d,第4天灌服50  $\mu$ L HRV液(3×10<sup>6</sup> pfu/mL);*L.acidophilus*治疗组第4天灌服50  $\mu$ L HRV液(3×10<sup>6</sup> pfu/mL),1 h后,灌服50  $\mu$ L *L.acidophilus*,次日日起每天灌服50  $\mu$ L *L.acidophilus*,连续4 d。正常对照组出生后第4天灌服50  $\mu$ L细胞培养液。

**1.2.2 临床观察及乳鼠大便HRV抗原检测:**从第

表 1 乳鼠腹泻、死亡数及大便HRV抗原阳性天数 (mean  $\pm$  SD,  $n = 15$ )

分组	腹泻鼠( $n$ )	死亡鼠( $n$ )	时间(d)	
			腹泻	HRV抗原阳性
正常对照组	0	0	0.00	0.00
HRV感染组	15	6	4.20 $\pm$ 0.37	3.88 $\pm$ 0.54
<i>L.acidophilus</i> 预防组	2	0	1.74 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	1.15 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
<i>L.acidophilus</i> 治疗组	4	2	2.17 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	1.32 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 感染组.

4天开始, 每天2次(早晚各1次), 观察乳鼠的腹泻情况, 计数乳鼠死亡数量. 按试剂说明书用ELISA方法检测乳鼠大便HRV抗原. 腹泻的判断分为6级: 1级为无大便; 2级为黄色成型便; 3级为黄色糊状便; 4级为黄色水样黏液便; 5级为黄色蛋汤样便; 6级为完全黄色水样便. 3级(黄色糊状便)及以上的才判断为腹泻, 3、4、5级腹泻为轻型, 6级为重型.

1.2.3 乳鼠盲肠内容物菌群分析: 实验过程的第8天下午, 断头处死每组9只乳鼠, 取盲肠内新鲜粪便0.1 g置于9 mL含半胱氨酸的Ringer稀释液内, 搅拌混匀, 并制成浓度为 $10^{-2}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-8}$  g/mL的4种混悬液, 各取0.1 mL分别接种于肠杆菌选择性培养基(EMB)、肠球菌选择性培养基(EC)、乳酸杆菌选择性培养基(LBS)、双歧杆菌选择性培养基(TPY)中, 每个稀释度接种3个平板. 接种后, EMB、EC置于37  $^{\circ}$ C需氧培养18-24 h, LBS、TPY置于37  $^{\circ}$ C厌氧培养48-72 h, 培养后以菌落形态、Gram染色镜检、生化反应等鉴定菌落并计数每个平板上目的菌的菌落个数, 计算每克粪便的菌落形成单位(colony forming unit, cfu),  $\text{cfu} = \text{菌落数} \times 10^n \times 10$  ( $n$ 为相应的稀释度, 10为换算系数), 结果用相应的对数值表示.

1.2.4 乳鼠肠黏膜SigA测定: 取乳鼠幽门下5 cm至回盲部约10 cm小肠段, 平铺于滤纸上, 纵行剪开, 无菌PBS反复冲洗肠腔表面后, 用载玻片轻刮黏膜表面黏液, 收集于1.5 mL无菌Eppendorf管内, -70  $^{\circ}$ C保存待测. 等所有标本采集完毕, 取出复溶, 取上清液及标准品, 按试剂盒操作, 用ELISA方法检测SigA.

1.2.5 乳鼠血清IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 检测: 断头处死乳鼠后取血2-3 mL, 4  $^{\circ}$ C, 2 500 r/min离心10 min, 吸取血清. 按试剂盒操作, 用ELISA方法检测IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的吸光度值, 制作标准曲线并计算出IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的含量.

1.2.6 乳鼠小肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度测量: 取每组9只乳鼠小肠段2 cm, 10%甲醛固定制成石蜡切片, 每只2张, 共18张, HE染色, 用Image-Pro Plus 5.1图像软件测量所有乳鼠小肠的黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度, 并计算绒毛高度与隐窝深度的比值(绒毛高度/隐窝深度).

统计学处理 各组数据以mean  $\pm$  SD表示, 采用SPSS13.0统计软件对数据进行 $t$ 检验和方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 临床观察及乳鼠大便HRV抗原检测结果 正常对照组乳鼠全过程未见腹泻, 精神良好, 活动正常, 皮肤无皱褶, 无死亡, 死亡率为0%. HRV感染组乳鼠在第4-8天出现明显腹胀, 精神倦怠, 活动减少, 第4-8天排出淡黄色稀水样便, 腹泻率达100%, 其中轻型腹泻4只, 重型腹泻11只, 至第8天死亡6只, 死亡率为40.0%. *L.acidophilus*预防组乳鼠的腹泻数仅2只, 且都为轻型腹泻, 乳鼠精神状态与感染组相比明显好转, 至第8天死亡率为0%. *L.acidophilus*治疗组乳鼠有4只腹泻, 精神状态与感染组相比也有好转, 至第8天死亡率为13.33%. 与HRV感染组相比较, 预防组和治疗组腹泻持续天数及HRV阳性天数明显缩短( $P < 0.01$ ). 预防组和治疗组之间腹泻持续时间及HRV阳性时间没有统计学差异. 总体而言预防组的临床表现好于治疗组(数据剔除死亡乳鼠)(表1).

2.2 乳鼠盲肠内容物菌群分析 除HRV感染组肠杆菌减少外(与对照组比较 $P < 0.05$ ), 其他3组肠杆菌差异无统计学意义; 4组肠球菌差异也无统计学意义; HRV感染组乳酸杆菌和双歧杆菌数量明显低于其他3组( $P < 0.01$ ); 治疗组乳酸杆菌和双歧杆菌数量与正常对照组相比, 差异无统计学意义; 预防组的双歧杆菌数量与正常对照组相比, 差异无统计学意义, 但乳酸杆菌数量差

## ■相关报道

石海砚等发现 *L.acidophilus* 对感染HRV的乳鼠有免疫保护作用, 其机制可能与抑制白细胞黏附分子-1, 增强IFN- $\gamma$ 的表达有关.

## ■创新盘点

本文应用*L.acidophilus*干预感染HRV乳鼠,从肠黏膜屏障(生物屏障、机械屏障与免疫屏障)功能水平探讨了*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠的保护作用。

表 2 乳鼠盲肠内容物活菌计数结果 (lgcfu/g, mean  $\pm$  SD,  $n = 9$ )

分组	肠杆菌	肠球菌	双歧杆菌	乳酸杆菌
正常对照组	4.26 $\pm$ 0.62	5.13 $\pm$ 0.38	6.19 $\pm$ 0.51	6.12 $\pm$ 0.58
HRV感染组	3.32 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	4.65 $\pm$ 0.63	4.28 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	4.22 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>
<i>L.acidophilus</i> 预防组	4.04 $\pm$ 0.48	4.92 $\pm$ 0.27	5.76 $\pm$ 0.44 <sup>d</sup>	7.25 $\pm$ 0.56 <sup>ade</sup>
<i>L.acidophilus</i> 治疗组	3.78 $\pm$ 0.45	4.77 $\pm$ 0.34	5.41 $\pm$ 0.67 <sup>d</sup>	5.96 $\pm$ 0.74 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 感染组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 治疗组。

表 3 乳鼠肠黏膜SIgA及血清IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 测定结果(mean  $\pm$  SD,  $n = 9$ )

分组	SIgA( $\mu$ mol/L)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
正常对照组	1.08 $\pm$ 0.46	27.16 $\pm$ 3.87	75.31 $\pm$ 10.28
HRV感染组	0.62 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	37.54 $\pm$ 5.66 <sup>b</sup>	90.45 $\pm$ 16.13 <sup>a</sup>
<i>L.acidophilus</i> 预防组	2.27 $\pm$ 0.62 <sup>bde</sup>	45.21 $\pm$ 4.21 <sup>bde</sup>	73.36 $\pm$ 8.67 <sup>c</sup>
<i>L.acidophilus</i> 治疗组	1.68 $\pm$ 0.71 <sup>ad</sup>	39.36 $\pm$ 6.12 <sup>b</sup>	81.06 $\pm$ 9.14 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 感染组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 治疗组。

表 4 各组乳鼠小肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度IPP5.1测量结果 (mean  $\pm$  SD,  $n = 9$ )

分组	黏膜厚度( $\mu$ m)	绒毛高度( $\mu$ m)	隐窝深度( $\mu$ m)	绒毛高度/隐窝深度
正常对照组	332 $\pm$ 32.4	308 $\pm$ 24.2	35 $\pm$ 2.4	8.8 $\pm$ 0.62
HRV感染组	324 $\pm$ 28.1	294 $\pm$ 36.5	43 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	6.8 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>
<i>L.acidophilus</i> 预防组	338 $\pm$ 40.3	312 $\pm$ 40.2	36 $\pm$ 4.2 <sup>c</sup>	8.7 $\pm$ 0.46 <sup>d</sup>
<i>L.acidophilus</i> 治疗组	326 $\pm$ 33.5	302 $\pm$ 38.4	35 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>	8.6 $\pm$ 0.71 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 感染组。

异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与治疗组相比, 预防组乳酸杆菌( $P < 0.05$ )恢复得更快(表2)。

2.3 乳鼠肠黏膜SIgA测定 HRV感染组与正常组比较, SIgA明显下降( $P < 0.01$ ), IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 都有不同程度的上升; 预防组和治疗组乳鼠肠黏膜SIgA、血清IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 都恢复到了正常水平, 而且预防组肠黏膜SIgA、血清IFN- $\gamma$ 明显高于正常对照组( $P < 0.01$ ); 预防组与治疗组相比肠黏膜SIgA、血清IFN- $\gamma$ 升高明显( $P < 0.05$ ), 表明预防组对HRV的免疫应答效果更好(表3)。

2.4 乳鼠小肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度测量 4组乳鼠肠黏膜厚度基本无差异, 绒毛高度差别也不大, 但隐窝深度有差别, HRV感染组低于其他3组( $P < 0.05$ ); 绒毛高度/隐窝深度也有明显差别, HRV感染组与其他3组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。表明*L.acidophilus*能够帮助感染HRV乳鼠肠黏膜隐窝深度及绒毛高度/隐窝

深度恢复到正常水平(表4)。

### 3 讨论

HRV感染组15只乳鼠在感染HRV的第2天全部出现腹泻症状, 大便HRV病毒抗原检测全为阳性, 检测感染组中的6只乳鼠小肠HRV结构蛋白VP7基因全为阳性, 病理切片显示乳鼠小肠黏膜上皮细胞出现广泛的空泡样变性, 感染HRV乳鼠全都出现了肠黏膜受损的情况<sup>[8]</sup>。这表明我们建立的HRV感染乳鼠模型是成功的。

肠黏膜屏障主要由3部分组成: 正常微生物形成的生物屏障、免疫球蛋白(SIgA为主)和免疫因子(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 等)形成的免疫屏障以及完整的肠黏膜结构形成的机械屏障<sup>[11-13]</sup>。在营养不良、创伤、严重感染等情况下, 肠黏膜屏障可能会被破坏, 继而会导致肠道菌群失调、病原体黏附和入侵、内毒素入血等一系列严重症状, 甚至可发展为全身性炎症反应综合征(systemic



inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能衰竭综合征(multiple organs deficiency syndrome, MODS)<sup>[14]</sup>.因此,在某些疾病可能导致肠黏膜屏障破坏的早期,采取有效措施保护肠黏膜屏障功能,有助于控制病情<sup>[15]</sup>.

生物屏障由定植于肠黏膜表面的常驻菌群形成.正常情况下,肠黏膜表面生长着大量的厌氧菌(乳酸杆菌、双歧杆菌等),他们可通过黏附作用与肠上皮细胞紧密结合,有序定植于肠上皮表面,形成菌膜.这种菌膜一方面起占位性保护作用,另一方面可产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等物质,抑制病原菌黏附和生长繁殖.此外,乳酸杆菌还可促进受损肠黏膜修复,防止致病菌在肠上皮细胞间易位,产生短链脂肪酸、乳酸等营养成分<sup>[16-19]</sup>.本实验中的乳鼠感染HRV后,肠黏膜中的乳酸杆菌、双歧杆菌显著减少,需氧菌相对增多,导致菌群紊乱,肠黏膜生物屏障受损.*L.acidophilus*是乳酸杆菌中比较重要的一大类,他们定植于肠道内,可阻止致病菌或病毒对黏膜细胞的侵入,促进肠道内正常菌群的生长繁殖,对引起急慢性腹泻的多种致病菌和病毒均有抑制作用<sup>[20,21]</sup>.本实验结果显示,感染HRV乳鼠灌服*L.acidophilus*后,肠道菌群完全恢复正常,提示*L.acidophilus*不仅能补充乳酸杆菌数量,还能刺激双歧杆菌等其他益生菌增殖,同时抑制需氧菌(肠杆菌、肠球菌等)的生长,使肠道菌群失衡得到改善.我们的实验还显示,在HRV感染前灌服*L.acidophilus*比感染后灌服更有利于保持肠道常驻菌群的稳定,提示*L.acidophilus*在乳鼠肠道感染HRV前灌服的效果好于感染后治疗.

肠黏膜免疫屏障是由多种免疫成分组成的.肠黏膜SIgA是黏膜表面主要的体液免疫成分,是防御病原体在黏膜黏附和定植的重要防线.SIgA可抑制细菌或病毒黏附在肠上皮表面,抑制病毒的装配和在细胞间的释放,对减少病毒在黏膜上的复制起着重要的作用<sup>[22,23]</sup>.本实验显示,乳鼠感染HRV后,SIgA分泌减少,在灌服*L.acidophilus*后,肠黏膜SIgA分泌显著增加,提示*L.acidophilus*是刺激感染HRV乳鼠肠黏膜SIgA分泌增加的有效诱因.另有研究显示,正常菌群与肠道黏膜间具有高度适应性,能促使肠道黏膜分泌IgA,其分泌量是整个免疫系统分泌量的417倍<sup>[24]</sup>.本实验显示,*L.acidophilus*在乳鼠肠道感染HRV前定植更能有效刺激肠黏膜SIgA的分泌.

IFN- $\gamma$ 主要由活化Th1细胞和NK细胞产生,

是机体抗HRV病毒感染中最重要的细胞因子之一,是一种多功能的免疫活性物质,具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等作用. IFN- $\gamma$ 能增强细胞毒性T细胞和NK细胞杀伤靶细胞的能力,增强巨噬细胞的杀伤能力,并促进单核巨噬细胞的抗病毒功能. HRV感染小鼠小肠上皮黏膜细胞后,可刺激CTL和Th1细胞产生IFN- $\gamma$ 等细胞因子<sup>[25,26]</sup>.石海帆等<sup>[27]</sup>研究发现,HRV感染乳鼠小肠黏膜IFN- $\gamma$ 表达细胞数及灰度值均显著高于正常组,表明HRV感染乳鼠小肠黏膜IFN- $\gamma$ 表达细胞数增多.本实验显示,感染组与正常对照组相比血清IFN- $\gamma$ 明显增加,提示细胞免疫已被激活.与感染组相比,预防组和治疗组血清IFN- $\gamma$ 又有明显升高,提示*L.acidophilus*可通过提高IFN- $\gamma$ 水平来调节感染HRV乳鼠的细胞免疫功能.预防组与治疗组相比,IFN- $\gamma$ 水平又有明显升高,提示预防组免疫因子提升得更快.

TNF- $\alpha$ 主要由激活的单核巨噬细胞产生,在机体受到损伤性时,可很快产生并在短时间内达到高峰. TNF- $\alpha$ 可促使中性粒细胞聚集,被激活后可释放大量的活性氧代谢产物(reactivated oxygen species, ROS)、弹性蛋白酶(elastase, ET)、杀菌性通透性增加蛋白酶(bactericidal permeability increasing protein, BPIP)、防御素等,对血管内皮细胞和肠黏膜上皮细胞造成损伤. TNF- $\alpha$ 还可刺激诱导型一氧化氮合成酶(iNOS),使其活性增加,生成大量的一氧化氮(NO),并通过其毒性代谢产物过氧亚硝基阴离子损伤肠黏膜<sup>[28]</sup>; TNF- $\alpha$ 还能通过交感-肾上腺髓质系统使儿茶酚胺分泌增加,儿茶酚胺可促进多种血管活性物质释放,如白三烯(LT)、前列腺素(PG)、血栓素A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)、PAF等,加剧微循环障碍,加重肠黏膜屏障损伤; TNF- $\alpha$ 还能引起发热、食欲减退等,间接引起肠黏膜屏障损伤.总之, TNF- $\alpha$ 在应激状态下,可激活一系列的炎症因子,并不断相互作用循环促进,形成“瀑布样”反应,在引起一系列炎症病理变化的同时引起肠黏膜屏障的损伤<sup>[29,30]</sup>.另有研究证实HRV肠炎时,肠黏膜的病理损伤与TNF- $\alpha$ 的高表达有关<sup>[31,32]</sup>.本实验显示,感染HRV乳鼠血清TNF- $\alpha$ 水平升高,肠黏膜出现了病理损伤,经*L.acidophilus*治疗后, TNF- $\alpha$ 水平降低,肠黏膜炎症减轻,提示*L.acidophilus*可通过下调TNF- $\alpha$ 水平来减轻感染HRV乳鼠肠黏膜的损伤.

用光镜观察肠黏膜厚度、绒毛高度和隐窝深度,可直接从结构上反映肠黏膜的机械屏障

#### ■应用要点

*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠有预防和治疗作用,而且在乳鼠感染HRV前灌服10<sup>8</sup> cfu/mL浓度*L.acidophilus*的效果比感染后灌服好.*L.acidophilus*对感染HRV乳鼠的预防和治疗作用与其能够保护小鼠肠黏膜免受损伤有关.

## ■同行评价

本文从肠黏膜生物屏障、免疫屏障和机械屏障等方面,对嗜酸乳杆菌对感染人轮状病毒鼠肠黏膜的保护作用进行了探讨,为嗜酸乳杆菌的进一步临床应用奠定了基础,有一定的实际意义。

情况. 本实验显示, HRV感染组与正常对照相比, 黏膜厚度和绒毛高度变化不大, 但隐窝深度加大, 绒毛高度/窝深度显著减低. 从形态上可见感染HRV乳鼠肠上皮细胞出现广泛的空泡样变性<sup>[8]</sup>, 但测量绒毛高度并无太大变化, 分析其原因可能有二: 感染HRV乳鼠肠绒毛有水肿、萎缩发生, 但脱落并不明显; 与测量时间有关. 陈军华等<sup>[33]</sup>研究认为, 乳鼠感染HRV后第1-2天绒毛高度与正常对照组比较差异有统计学意义, 第3天后差异就不明显了; 乳鼠感染后第2、3、4天正常对照组与感染组肠隐窝深度差异有显著性. 我们在乳鼠感染HRV后第4天检测, 发现隐窝深度加大、绒毛高度/隐窝深度显著减低, 这与陈军华等的研究基本一致. 在灌服 *L.acidophilus* 后, 感染HRV乳鼠的小肠隐窝深度及绒毛高度/隐窝深度都恢复到了正常水平, 提示 *L.acidophilus* 对感染HRV乳鼠肠黏膜机械屏障有保护作用.

总之, *L.acidophilus* 对感染HRV乳鼠肠黏膜的生物屏障、免疫屏障和机械屏障均有一定的保护作用, 感染前灌服 *L.acidophilus* 的保护效果好于感染后灌服, 但 *L.acidophilus* 对感染HRV乳鼠肠黏膜菌群调节的机制、免疫调节的通路等尚有待进一步研究.

志谢: 感谢艾洪武、王晓梅及刘冰波在本实验中给予的大力帮助.

## 4 参考文献

- 马慧, 黄敬孚, 林书祥, 李丽静, 王瑞雪, 彭林. 儿童轮状病毒腹泻的流行病学研究. 中国实用儿科杂志 2010; 25: 52-53
- 廖炆, 陈军华, 朱朝敏, 许红梅, 刘作义. 重庆婴幼儿轮状病毒分子流行病学特征及相关临床资料分析. 第三军医大学学报 2010; 32: 77-80
- 张昕, 高永军, 冯子健, 王子军, 冉陆. 2008年全国其他感染性腹泻报告病例信息分析. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3370-3375
- Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, Cominelli F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 454-459
- Spinler JK, Taweekhotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008; 14: 166-171
- Shanahan F. Probiotics in perspective. *Gastroenterology* 2010; 139: 1808-1812
- Seth A, Yan F, Polk DB, Rao RK. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1060-G1069
- 张振, 王宝香, 周诗琼, 鲍连生, 刘冰波. 嗜酸乳杆菌对乳鼠感染人轮状病毒的预防和治疗作用观察. 中华消化杂志 2010; 30: 465-469
- 杨蒙蒙, 罗佳波, 陈文, 杨占秋, 张琰. 人轮状病毒感染昆明小鼠乳鼠模型的建立. 中国比较医学杂志 2009; 19: 45-49
- 夏群, 陈兰举, 陈名武, 周瑞, 沈怀云, 丁周志, 徐家丽, 薛莲, 刘欣. 轮状病毒肠道外感染乳鼠模型的建立. 蚌埠医学院学报 2010; 35: 1-3
- Liboni KC, Li N, Scumpia PO, Neu J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *J Nutr* 2005; 135: 245-251
- Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006; 55: 1512-1520
- Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv Physiol Educ* 2008; 32: 25-34
- Walser EM, Nealon WH, Marroquin S, Raza S, Hernandez JA, Vasek J. Sterile fluid collections in acute pancreatitis: catheter drainage versus simple aspiration. *Cardiovasc Intervent Radiol* ; 29: 102-107
- 杨书良, 李兰梅, 陈育民. 肠黏膜屏障的构成与功能研究进展. 临床荟萃 2008; 23: 1809-1811
- Foligné B, Nutton S, Steidler L, Dennin V, Goudercourt D, Mercenier A, Pot B. Recommendations for improved use of the murine TNBS-induced colitis model in evaluating anti-inflammatory properties of lactic acid bacteria: technical and microbiological aspects. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 390-400
- Fuentes S, Egert M, Jiménez-Valera M, Ramos-Cormentzana A, Ruiz-Bravo A, Smidt H, Monteoliva-Sanchez M. Administration of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Res Microbiol* 2008; 159: 237-243
- Kwon HK, Lee CG, So JS, Chae CS, Hwang JS, Sahoo A, Nam JH, Rhee JH, Hwang KC, Im SH. Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2159-2164
- Foligne B, Nutton S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, Dewulf J, Brassart D, Mercenier A, Pot B. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 236-243
- Beausoleil M, Fortier N, Guénette S, L'ecuyer A, Savoie M, Franco M, Lachaine J, Weiss K. Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* C1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Gastroenterol* 2007; 21: 732-736
- Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8344-8351
- De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005; 33: 1125-1135
- 高金生, 杨书良. 肠黏膜屏障损伤的原因与机制研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1540-1544
- Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; 303: 1662-1665
- 徐锦, 杨毅, 孙家娥, 丁韵珍, 苏犁云, 邵彩虹. 急性轮

- 26 殷坚, 彭芝配, 滕久祥, 伍参荣, 张国民, 王丽, 唐曦. 秦香颗粒对人轮状病毒感染乳鼠血清IFN- $\gamma$ 的影响. 湖南中医药大学学报 2010; 30: 25-27
- 27 石海矾, 陈益平, 徐志伟, 狄军波. 嗜酸乳杆菌对人轮状病毒感染乳鼠小肠黏膜白细胞黏附分子-1、 $\gamma$ -干扰素表达的影响. 实用医学杂志 2010; 26: 1314-1317
- 28 Vallance BA, Dijkstra G, Qiu B, van der Waaij LA, van Goor H, Jansen PL, Mashimo H, Collins SM. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G865-G874
- 29 张嘉, 刘瑞林, 刘牧林. 肠道屏障功能损伤机制的研究进展. 蚌埠医学院学报 2005; 30: 277-279
- 30 杨武, 肖桦, 黄勇坤. 肠屏障功能障碍发生机制与诊断治疗. 实用儿科临床杂志 2007; 22: 1514-1515
- 31 Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004; 126: 1358-1373
- 32 苏平五, 计学理, 孙巧玲. 小儿轮状病毒肠炎致全身炎症反应综合征IL-2、IL-6及TNF的变化及意义. 世界中西医结合杂志 2009; 4: 335-337
- 33 陈军华, 解元元, 凌华, 刘作义. 轮状病毒感染乳鼠致病机制的实验研究. 第三军医大学学报 2007; 29: 1230-1233

编辑 何基才 电编 何基才

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

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

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

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

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



# 核PTEN和Survivin蛋白在胃癌组织芯片中的表达及意义

王晓茹, 李小宁, 白光辉, 郭云娣

## ■背景资料

PTEN是一种抑癌基因, 与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关, Survivin是细胞凋亡抑制蛋白家族的新成员, 具有抑制细胞凋亡的作用, 在肿瘤进展中起着关键的作用。

王晓茹, 李小宁, 郭云娣, 苏州卫生职业技术学院 苏州检验医学生物技术重点实验室 江苏省苏州市 215009

白光辉, 苏州市立医院 江苏省苏州市 215008

作者贡献分布: 王晓茹、李小宁、白光辉及郭云娣共同参与实验设计与撰稿; 李小宁主要负责标本的制作; 白光辉主要负责临床标本的收集; 王晓茹与郭云娣负责SPSS数据库的建立、统计及论文撰写。

通讯作者: 郭云娣, 215009, 江苏省苏州市, 苏州卫生职业技术学院. gyd1964@163.com

收稿日期: 2011-07-27 修回日期: 2011-09-15

接受日期: 2011-10-06 在线出版日期: 2011-10-08

## Significance of expression of nuclear PTEN and survivin in gastric cancer

Xiao-Ru Wang, Xiao-Ning Li, Guang-Hui Bai, Yun-Di Guo

Xiao-Ru Wang, Xiao-Ning Li, Yun-Di Guo, Suzhou Health College; Suzhou Key Laboratory of Biotechnology for Laboratory Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu Province, China

Guang-Hui Bai, Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yun-Di Guo, Suzhou Health College; Suzhou Key Laboratory of Biotechnology for Laboratory Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu Province, China. gyd1964@163.com

Received: 2011-07-27 Revised: 2011-09-15

Accepted: 2011-10-06 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of nuclear PTEN and survivin in gastric cancer and to evaluate their clinicopathological significance.

**METHODS:** The expression of nuclear PTEN and survivin was measured in 116 cases of gastric cancer and 35 cases of normal gastric mucosa tissue on tissue array sections by EnVision immunohistochemical method. The relationship of their expression with lymph node metastasis and Lauren's classification, as well as the correlation between nuclear PTEN and survivin expression were evaluated.

**RESULTS:** The positive rates of nuclear PTEN and survivin in normal gastric mucosa were higher than those in gastric cancer (100% vs 57.1%; 100% vs 44.0%). The expression of nuclear

PTEN and Survivin was significantly correlated with lymph node metastasis in gastric cancer ( $P < 0.05$ ). Nuclear PTEN was significantly related to Lauren's classification and differentiation (both  $P < 0.05$ ). The expression of nuclear PTEN had a significant correlation with that of survivin ( $r = 0.088$ ,  $P = 0.001$ ).

**CONCLUSION:** Nuclear PTEN and survivin are lowly expressed in gastric cancer. Nuclear PTEN and survivin may be good predictors of metastasis and prognosis of gastric cancer.

**Key Words:** Gastric cancer; Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; Survivin; Tissue microarray

Wang XR, Li XN, Bai GH, Guo YD. Significance of expression of nuclear PTEN and survivin in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2974-2978

## 摘要

**目的:** 探讨核PTEN和Survivin蛋白在胃癌组织芯片中的表达、临床病理学特征及其意义。

**方法:** 在116例胃癌35例正常胃黏膜组织芯片上, 应用免疫组织化学EnVision法检测核PTEN和Survivin表达水平, 分析核PTEN和Survivin在胃癌的表达与患者淋巴结转移状态、Lauren's分型等的关系及其相互关系。

**结果:** 核PTEN和Survivin在正常胃黏膜组织中表达率为100%, 核PTEN在胃癌组织中的阳性表达率为51.7%(60/116); Survivin的阳性表达率为44.0%(51/116), 核PTEN和Survivin与患者淋巴结转移状态相关( $P < 0.05$ ), 同时, 核PTEN还和肿瘤分化程度、Lauren's分型密切相关( $P < 0.05$ )。核PTEN和Survivin二者之间呈正相关( $r = 0.088$ ,  $P = 0.001$ )。

**结论:** 胃癌组织中存在核PTEN和Survivin低表达; 同时检测胃癌组织中的核PTEN和Survivin的表达对判断肿瘤的恶性程度和估计预后有一定意义。

## ■同行评议者

高国全, 教授, 中山大学中山医学院生化系; 周素芳, 教授, 广西医科大学科技处

**关键词:** 胃癌; 第10号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因; Survivin; 组织芯片

王晓茹, 李小宁, 白光辉, 郭云娣. 核PTEN和Survivin蛋白在胃癌组织芯片中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2974-2978  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2974.asp>

## 0 引言

第10号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)是一重要的抑癌基因, 广泛表达于人类正常组织中, 同时具有脂质磷酸酶活性和蛋白磷酸酶活性: 参与调节细胞的生长、增殖、迁移与凋亡过程<sup>[1-3]</sup>. Survivin<sup>[4]</sup>是近年新发现的一个凋亡抑制因子. 本组研究采用免疫组织化学方法在已构建好的组织芯片中检测正常胃黏膜组织(癌旁7 cm以上)及手术切除的胃癌组织中核PTEN和Survivin的表达, 探讨核PTEN和Survivin在胃癌中的表达及其相互关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集胃癌组织118例, 为苏州市立医院2006-2009年的存档蜡块, 均为住院患者, 有详细的临床资料, 年龄32-84(中位年龄64.1)岁. 其中2例在制作组织芯片后肿瘤组织过少, 予以剔除. 本实验可用标本共116例. 其中有淋巴结转移者88例, 未见淋巴结转移者28例. 患者术前均未行新辅助放、化疗及内分泌治疗.

### 1.2 方法

1.2.1 组织芯片的构建: 组织标本经40 g/L甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋制片, HE染色后, 在显微镜下定位、对应找出蜡块上相应无坏死的肿瘤组织并做标记. 自制(专利号: 200920350099.2)8×16组织芯片蜡块(64例×2点), 即组织阵为每例组织块取2个组织芯, 其直径为1.6 mm, (有定位用的空位), 正常胃黏膜35例每例取2点制成1个独立芯片, 共制备组织芯片3个.

1.2.2 标本处理: 兔抗人PTEN(产品编号: RAB-0110)、Survivin(产品编号: RAB-0536)多克隆抗体及二抗均购自福州迈新公司. 常规石蜡包埋, 4 μm厚连续切片. 采用Envision免疫组织化学法, 实验中以PBS液代替一抗作为阴性对照; 以试剂公司提供的阳性对照片作为阳性对照.

1.2.3 结果判定: 核PTEN阳性表达于肿瘤细胞核(有5例细胞核及细胞质均表达), Survivin阳性表达于肿瘤细胞质或细胞核, 呈现棕黄色颗粒

为阳性信号. 结果判定方法按照Fromovitz<sup>[5]</sup>方法: 表达强度由染色深度(A)及阳性细胞百分比(B)共同评分. A: 阳性细胞染色深度按无着色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别计0、1、2、3分; B: 阳性细胞所占百分比按: 阳性细胞数≤5%、5%-25%、25%-50%、50%-75%、>75%分别计0、1、2、3、4分. A+B即为免疫组织化学评分. 评分≥4者为阳性, <4者为阴性.

统计学处理 核PTEN和Survivin表达与临床病理特征之间的相关性(包括: 分化程度、淋巴结转移、肿瘤浸润深度等)采用 $\chi^2$ 检验, 核PTEN和Survivin之间的相关关系采用Spearman相关性分析, 所用统计软件为SPSS13.0.  $P \leq 0.05$ 被认为差异有显著性.

## 2 结果

2.1 核PTEN和Survivin在正常胃黏膜组织及胃癌组织中的表达 核PTEN和Survivin在35例正常胃黏膜均呈强阳性表达100%(35/35). 核PTEN和Survivin在116例胃癌中的阳性表达率分别为51.7%(60/116)、44.0%(51/116)(图1).

2.2 核PTEN和Survivin的表达与胃癌组织临床病理特征的关系 在116例胃癌中, 核PTEN的表达与患者性别、肿瘤浸润深度无关, 但与淋巴结转移、Lauren's分型、肿瘤分化程度、年龄相关; Survivin的表达与患者年龄、性别、浸润深度、分化程度、Lauren's分型无关, 但与淋巴结转移相关(表1).

2.3 胃癌组织中核PTEN和Survivin相关性分析 核PTEN和Survivin二者均阳性者为35例、均阴性者40例, 核PTEN阳性 Survivin阴性者25例, 核PTEN阴性Survivin阳性者16例. Spearman等级相关分析结果显示, 核PTEN和Survivin在胃中的表达呈正相关( $r = 0.088$ ,  $P = 0.001$ ).

## 3 讨论

胃癌是一种常见的恶性肿瘤, 目前认为, 胃癌的发生、发展是一个多阶段、多步骤、有序的过程, 是多因素的综合结果, 而抑癌基因的失活和癌基因的活化可能在其中发挥了重要的作用. PTEN基因是一种由多功能磷酸酶编码的具有酪氨酸、磷酸丝氨酸/苏氨酸双功能的特异性磷酸酶活性的抑癌基因<sup>[1-3]</sup>, 于1997年先后被Steck等3个国际科研小组发现并命名.

抑癌基因在肿瘤发生过程中持续丧失功能是导致细胞恶变的重要事件之一. 基因突变、

### ■研究前沿

作为近期发现的凋亡抑制蛋白之一, 人们逐渐认识到其在胃癌的发生、发展、诊断、判断预后、复发和治疗等均有重要价值. 有些学者认为PTEN和Survivin有可能有基因协同作用的可能, 认为正常细胞转化为癌细胞和浸润、转移是复杂的多阶段的过程, 至少有2个或2个以上功能不同的异常激活的基因各自发挥作用, 并在空间和时间上相互配合, 协同促进了细胞的癌变.



## ■相关报道

Deng等报道118例胃癌PTEN和Survivin的阳性率分别为52.5%(62/118)和76.2%(98/118), PTEN和Survivin呈正相关( $P = 0.04$ ).

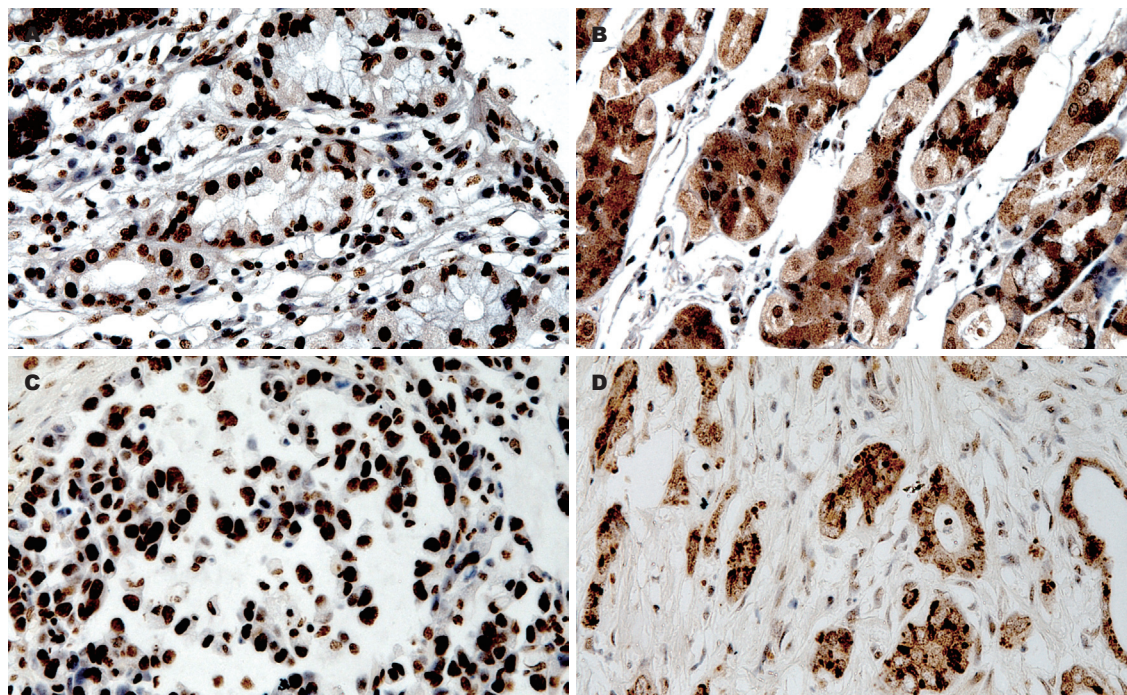


图1 核PTEN和Survivin在正常胃黏膜组织及胃癌组织中的表达(HE × 400). A: 正常胃黏膜组织核PTEN染色, 细胞核阳性; B: 正常胃黏膜组织Survivin染色, 细胞核/细胞质阳性; C: 胃癌组织核PTEN染色, 细胞核阳性; D: 胃癌组织Survivin染色, 细胞核/细胞质阳性.

过度甲基化等构成了核PTEN表达下调的分子基础. 研究发现<sup>[6]</sup>, 无论是从mRNA还是从蛋白水平上, 胃癌组织中核PTEN基因都有较高的阴性表达率. 正常胃黏膜上皮核PTEN蛋白表达阳性率100%(与本组实验结果相一致); 胃癌组织核PTEN蛋白阳性率66%<sup>[7]</sup>, 本组实验中核PTEN阳性表达率为51.7%, 与文献报道相接近, 同时, 本实验核PTEN蛋白的表达与胃癌的组织分化程度呈正相关( $P = 0.033$ ), 组织分化程度高、恶性程度低者, 表达率高, 且多为强阳性表达, 而核PTEN蛋白失表达或弱阳性表达则多见于组织分化程度低、恶性程度高者. 除与胃癌组织分化程度有关外, 核PTEN蛋白表达还与淋巴结转移( $P = 0.005$ )、Lauren's分型( $P = 0.043$ )明显相关, 核PTEN蛋白表达水平越低, 患者预后越差. 这些结果均与Zheng等<sup>[7]</sup>的研究结果相一致. 另外, 本组实验核PTEN的失表达多见于年龄小于60岁患者, 可能这些人群更易于基因突变或细胞凋亡失衡有关.

Wang等<sup>[8]</sup>的一项研究也发现, 60例进展期胃癌中有17例(28.3%)存在核PTEN基因的突变, 包括8例错义突变、5例沉默突变、2例无义突变、1例碱基缺失和1例内含子拼接供体位点突变, 认为PTEN基因突变在进展期胃癌的发生中可能起重要作用. 本组实验中, 患者均为进展

期胃癌, 我们认为, 核PTEN的失表达是胃癌发生、发展的晚期事件.

核PTEN具有参与调节细胞凋亡过程的功能<sup>[1-3]</sup>, 凋亡失衡与肿瘤的发生密切相关, 作为凋亡抑制因子之一的Survivin与肿瘤的关系正在被逐渐认识, 他在人类许多肿瘤中都有表达<sup>[9]</sup>. Survivin在胃癌中的表达已有一些学者做了检测. Kania等<sup>[10]</sup>检测了55例胃癌患者的胃镜活检癌组织标本及癌旁组织标本, Survivin mRNA及蛋白在癌组织及癌旁组织中均有显著表达. 但亦有一些研究显示Survivin在胃癌组织中的表达率仅为15.4%、34.5%不等<sup>[9]</sup>. 文献中Survivin的表达与临床病理特征及预后之间的关系各项研究不尽相同. 如Ikeguchi等<sup>[11]</sup>的研究显示: Survivin的表达与淋巴结转移有关, 有淋巴结转移的患者其Survivin阳性率及表达水平均显著高于淋巴结阴性的患者; 而Kazuhito等<sup>[9]</sup>认为Survivin低水平表达者高于高表达者. 本组实验中, Survivin在癌旁正常胃黏膜组织中表达率为100%, 而胃癌(进展期)组织中的表达率为44%, 且其失表达者更易于淋巴结转移( $P = 0.040$ ). 与本实验的另一指标PTEN的蛋白表达水平与淋巴结转移的关系相同, 提示有可能在胃癌淋巴结转移上核PTEN和Survivin有协同作用, 也正符合了核PTEN和Survivin相关关系的统计结果: 核PTEN



表 1 PTEN和Survivin表达与胃癌临床病理特征的关系

临床病理参数	n	PTEN阳性			Survivin阳性		
		%	$\chi^2$ 值	P值	%	$\chi^2$ 值	P值
年龄(岁)							
<60	30	33.3			30.0		
≥60	86	58.1	5.481	0.019	48.8	3.204	0.073
性别							
男	90	52.2			41.1		
女	26	50.0	0.040	0.842	53.8	1.328	0.249
分化程度							
高、中分化	49	63.3			49.0		
低分化	67	43.3	4.525	0.033	40.3	0.866	0.352
淋巴结转移							
无	28	75.0			60.7		
有	88	44.3	8.008	0.005	38.6	4.203	0.040
浸润深度							
未达浆膜	26	61.5			53.8		
浆膜及外	90	48.9	1.293	0.256	41.1	1.328	0.249
Lauren's分型							
肠型	61	60.7			42.6		
胃型	55	41.8	4.110	0.043	45.5	0.094	0.759

## ■应用要点

同时检测胃癌组织中的核PTEN和Survivin的表达对判断肿瘤的恶性程度和估计预后有一定意义。

与Survivin呈现正相关( $r = 0.088$ ,  $P = 0.001$ ), 与Hwang等<sup>[12,13]</sup>的研究相同: 核PTEN<sup>[14]</sup>可能通过调控胰岛素样生长因子而抑制细胞生长, 而核PTEN/胰岛素样生长因子共同通过PI3K/Akt信号转导通路起作用。核PTEN低表达可能通过调节PI3K/Akt途径使Survivin表达下调, 使抑制血管内皮细胞和肿瘤细胞的凋亡紊乱, 从而促进肿瘤细胞的增殖和血管生成促进肿瘤生长、侵袭和转移<sup>[15]</sup>。同时检测胃癌组织中的核PTEN和Survivin的表达对判断肿瘤的恶性程度和估计预后有一定意义。

目前, 将抑癌基因作为靶分子是肿瘤基因治疗的基本策略之一, 在肿瘤中增加核PTEN/Survivin的表达有可能可以抑制其生长或者提高化疗敏感性<sup>[16]</sup>, 但其机制还有待于进一步的研究。

## 4 参考文献

- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-362
- Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; 57: 2124-2129
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993; 67: 2168-2174
- Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, Finkel G, Grimson R, Lundy J. ras p21 expression in the progression of breast cancer. *Hum Pathol* 1987; 18: 1268-1275
- Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinnozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 2766-2774
- Zheng HC, Sun JM, Li XH, Yang XF, Zhang YC, Xin Y. Role of PTEN and MMP-7 expression in growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. *Pathol Int* 2003; 53: 659-666
- Wang JY, Huang TJ, Chen FM, Hsieh MC, Lin SR, Hou MF, Hsieh JS. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in advanced gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2003; 442: 437-443
- Miyachi K, Sasaki K, Onodera S, Taguchi T, Nagamachi M, Kaneko H, Sunagawa M. Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2003; 6: 217-224
- Kania J, Konturek SJ, Marlicz K, Hahn EG, Konturek PC. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 266-271

## ■应用要点

本文研究对胃癌组织发病机制及临床预后判断有一定意义。

- 11 Ikeguchi M, Kaibara N. Changes in survivin messenger RNA level during cisplatin treatment in gastric cancer. *Int J Mol Med* 2001; 8: 661-666
- 12 Hwang PH, Kim SY, Lee JC, Kim SJ, Yi HK, Lee DY. PTEN/MMAC1 enhances the growth inhibition by anticancer drugs with downregulation of IGF-II expression in gastric cancer cells. *Exp Mol Med* 2005; 37: 391-398
- 13 Deng H, Wu RL, Zhou HY, Huang X, Chen Y, Liu LJ. Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1013-1017
- 14 杨桢, 吕农华. PTEN在胃癌中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 608-613
- 15 叶新青, 陈发龙. Survivin和PTEN在胃癌中的研究进展. *中国癌症防治杂志* 2011; 2: 149-151
- 16 李子珊, 杨慧龄. PTEN基因与胃癌相关性研究进展. *社区医学杂志* 2010; 8: 35-37

编辑 李军亮 电编 何基才

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

## • 消息 •

## 招聘生物医学编辑部主任

**本刊讯** 百世登出版集团(Baishideng Publishing Group Co., Limited, BPG)已经为各位编辑部主任搭建好整体架构, 希望培养出对编辑与出版行业真正感兴趣甚至愿意将其作为终身事业的专业人才, 成为BPG的核心人物. 欢迎应届毕业生加盟BPG团队, 请将您的简历E-mail发至: j.l.li@wjgnet.com

## ■工作职责

- 1 贯彻执行员工手册、编辑手册、编委手册和作者手册.
- 2 根据作者指南及学科发展动向和读者的需求, 制订期刊的总体发展规划, 负责编辑、出版、发行和经营管理.
- 3 策划年度编委会成员的社论和专题亮点等栏目约稿, 并按照计划负责监督落实.
- 4 负责期刊同行评议和定稿会, 按期编排、加工, 发排稿件, 发排后参与校对或审核校样、核红、签字付印.
- 5 组织期刊印刷版或网络版出版后审读, 发现问题及时修改.

## ■职位要求

硕士及以上学历, 具有生物医学专业学科背景及丰富的写作和发表生物医学文章者优先录用.

## ■薪资待遇面议

## ■培训流程

第一步学习手册; 第二步编务; 第三步排版制作; 第四步编辑; 第五步投稿办公系统操作; 第六步期刊网络系统学习; 第七步期刊管理培训; 第八步BPG管理委员会考核; 第九步考核通过后正式签订劳动合同, 并颁发编辑部主任聘任书.

# 肝脓肿临床分析183例

张海峰, 陈海琴, 丁晓凌, 周国雄

张海峰, 陈海琴, 丁晓凌, 周国雄, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

作者贡献分布: 此课题由张海峰与周国雄设计; 资料收集由张海峰与陈海琴完成; 数据分析由张海峰、陈海琴及丁晓凌完成; 本论文写作由张海峰与陈海琴完成, 贡献均等。

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

zhouguoxiong@medmail.com.cn

电话: 0513-81161826

收稿日期: 2011-07-18 修回日期: 2011-10-06

接受日期: 2011-10-07 在线出版日期: 2011-10-08

## Liver abscess: an analysis of 183 cases

Hai-Feng Zhang, Hai-Qin Chen, Xiao-Ling Ding, Guo-Xiong Zhou

Hai-Feng Zhang, Hai-Qin Chen, Xiao-Ling Ding, Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

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

Received: 2011-07-18 Revised: 2011-10-06

Accepted: 2011-10-07 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To summarize our experience of diagnosis and treatment of liver abscess.

**METHODS:** The clinical data for 183 patients with liver abscess treated at our hospital from January 2001 to June 2011 were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** Of 183 patients, 152 had single abscess, 31 had multiple abscesses; 107 had diabetes mellitus; 5 had septic shock. The maximal abscess cavity was 139 mm × 115 mm and the smallest was 17 mm × 16 mm. One hundred and seventy-eight cases were treated with conservative internal medicine and all were cured. Two cases were referred for surgery and three cases were discharged themselves. One hundred and seven cases underwent BUS-guided percutaneous needle aspiration, and the number of needle aspirations ranged from 1 to 7 times.

**CONCLUSION:** Liver abscess is closely related

to diabetes. BUS-guided percutaneous needle aspiration is easy to operate, has good effect, and therefore represents the first choice of treatment for liver abscess.

**Key Words:** Liver abscess; Diagnosis; Treatment; Diabetes; Puncture

Zhang HF, Chen HQ, Ding XL, Zhou GX. Liver abscess: an analysis of 183 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2979-2982

## 摘要

**目的:** 总结肝脓肿的诊断和治疗经验, 提高诊疗水平。

**方法:** 回顾性分析本院2001-01/2011-06收治的183例肝脓肿诊断和治疗的临床资料。

**结果:** 男112例, 女61例, 年龄最小18岁, 最大83岁。左肝脓肿65例, 右肝脓肿110例, 混合型脓肿8例。单腔脓肿152例, 2个以上脓腔31例。脓腔最大139 mm × 115 mm, 最小17 mm × 16 mm; 合并糖尿病、空腹血糖受损、糖耐量减低107例, 感染性休克5例。好转治愈178例, 2例转外科手术, 3例自动出院; B超引导下穿刺抽脓107例, 穿刺次数1-7次。

**结论:** 肝脓肿与糖尿病密切相关; 病原菌以肺炎克雷伯菌多见; B超引导下肝脓肿穿刺操作简便, 效果好, 可作为肝脓肿局部治疗的首选治疗方法。

**关键词:** 肝脓肿; 诊断; 治疗; 糖尿病; 穿刺

张海峰, 陈海琴, 丁晓凌, 周国雄. 肝脓肿临床分析183例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(28): 2979-2982

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2979.asp>

## 0 引言

随着医疗技术的发展, 肝脓肿的诊断和治疗水平已有较大提高, 并发症和病死率明显减低, 绝大多数患者通过相应的治疗即可达到痊愈。近年来, 其发病原因、致病菌、感染途径等临床

## ■背景资料

近年来, 肝脓肿的发病原因、致病菌、感染途径等临床表现以及并发症的发生率、诊断、治疗较前发生极大的变化。今作回顾性分析, 进一步加深对肝脓肿的诊疗认识。

## ■同行评议者

周伟平, 教授, 上海东方肝胆外科医院肝外三科



## ■相关报道

随着影像学的发展和诊疗手段的进步,肝脓肿的诊断和疗效有了显著的提高,并发症和病死率明显减低。国外有相关报道,病死率已由原来的70%下降到近年来的0%-15%,因此及时诊断和正确治疗十分重要。

表现以及诊断、治疗较前发生极大的变化。现将我院自2001-01以来收治的183例肝脓肿患者诊断、治疗进行回顾性分析,进一步加深对肝脓肿的诊疗认识。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集2001-01/2011-06我院住院患者中的肝脓肿资料183例,均经临床及影像学诊断肝脓肿。

1.2 方法 综合临床表现、并发症、影像学检查、病原学检查、实验室检查情况及治疗情况。疗效观察时间自入院至出院。判断标准:(1)痊愈:症状、体征消失,脓肿完全吸收;(2)好转:症状、体征消失,影像学提示脓肿呈吸收期改变;(3)无效:症状、体征无好转,脓肿大小无变化或加重。其中痊愈、好转为有效治疗。

## 2 结果

2.1 一般资料 本组183例细菌性肝脓肿患者,年龄18-83岁,中位年龄62.61岁。男112例,女61例。从发病至确诊1-60 d,平均10.2 d。临床表现以畏寒、发热为主要症状128例(69.9%),右上腹痛45例(24.6%),腹胀、纳差10例(5.5%)。135例中存在合并症,糖尿病是肝脓肿最多见的合并症107例,其中69例入院时即有糖尿病史,20例入院后确诊糖尿病,空腹血糖受损、糖耐量减低18例;其次肝、胆系疾病有25例、合并高血压45例、冠心病26例、慢性支气管炎16例。

2.2 影像学资料 B超+CT和(或)MRI确诊71例,单独B超确诊102例,10例患B超+CT和(或)MRI检查未能明确后经B超引导下肝穿刺确诊。单腔脓肿152例,2个以上脓腔31例;脓腔最大139 mm×115 mm,最小17 mm×16 mm;左肝脓肿38例(左内叶23例、左外叶15例),右肝脓肿137例(右前叶58例、右后叶79例),混合型脓肿8例。

2.3 实验室检查 145例外周血白细胞升高( $>10 \times 10^9/L$ );谷丙转氨酶、谷草转氨酶升高56例;黄疸指数升高21例;血糖异常107例,最高随机血糖为25.8 mmol/L。

2.4 病原学检测及药敏实验结果 183例患者中77例行血液细菌培养,其中12例病原学结果阳性,阳性率15.58%,其中8例为肺炎克雷伯杆菌,3例为大肠埃希氏菌,1例为星座链球菌。穿刺脓液培养74例,阳性36例,阳性率48.6%,其中30例为肺炎克雷伯杆菌,6例为大肠埃希氏菌。所检肺炎克雷伯杆菌,对阿莫西林、替卡西林、哌拉

西林、头孢噻吩、头孢呋辛耐药,对其余抗生素如头孢吡肟、亚胺培南、环丙沙星、阿米卡星、加酶抑制剂抗生素等均敏感。检出的大肠埃希氏菌耐药性较强,对阿莫西林、替卡西林、哌拉西林、头孢噻吩、头孢呋辛、头孢西丁、氨曲南、环丙沙星多种抗生素耐药,其中1例仅对亚胺培南敏感,余皆耐药。1例星座链球菌对红霉素耐药,对青霉素、左氧氟沙星等敏感。

2.5 治疗措施 单纯抗生素治疗76例,抗生素+B超引导下经皮肝脓肿穿刺抽脓107例。抗生素治疗多为青霉素类、头孢类、喹诺酮类、硝基咪唑类、硫霉素类等选择联用,一般经验性选用三代头孢+硝基咪唑类或喹诺酮类,血培养或脓液培养阳性根据药物敏感试验用药。合并糖尿病的患者有效控制血糖,包括控制饮食、给予短效胰岛素、精蛋白锌胰岛素或门冬胰岛素;加强营养支持,补充优质蛋白、多种维生素及维持电解质平衡;脓腔局部治疗,以B超引导下穿刺抽脓+冲洗为主,冲洗液为甲硝唑或奥硝唑+生理盐水,平均1-3次,最多7次。

2.6 预后 好转治愈178例,2例转外科手术治疗,3例自动出院(1例自动出院后随访死亡,2例因费用自动出院后当地治疗好转)。B超引导下穿刺抽脓107例,穿刺次数1-7次,平均1-3次。平均住院天数20.12 d,最长46 d;平均住院医疗费用21 902元。

## 3 讨论

肝脓肿发病率较消化系出血、消化系肿瘤、胰腺炎等相比明显偏低,目前临床上肝脓肿以细菌性肝脓肿多见,而阿米巴性肝脓肿以及其他特殊的感染发病率越来越低。细菌性肝脓肿是由于细菌经各种途径进入肝脏,在肝实质内滞留引起局部和全身炎症反应和肝实质坏死液化形成脓腔<sup>[1-5]</sup>。毕文俊等<sup>[2]</sup>报道其临床表现多见为畏寒、发热、右上腹痛、腹胀、纳差等消化系症状,其中以畏寒发热最为多见,我们的统计发现183例中以畏寒、发热为主要症状128例(69.9%),与此十分符合,故临床上对不明原因的发热患者需警惕此病。

随着现代影像学的发展,肝脓肿的诊断已不是难题,朱文静等<sup>[3-8]</sup>认为超声检查对肝脓肿病灶定位、定性诊断准确,是对肝脓肿患者诊治首选的影像学方法;不能明确诊断的不典型肝脓肿病灶可结合CT和MRI进行诊断,对于少部分高度怀疑的患者可行超声引导下经皮肝穿刺获得确诊。我们的资料显示: B超+CT和(或)MRI

确诊71例, 单独B超确诊102例, 10例经B超引导下肝穿刺确诊, 其中左肝脓肿38例, 右肝脓肿137例. 均提示目前的影像学检查完全可以做出明确的诊断, 对积极的治疗带来了极大的帮助.

既往肝脓肿多继发于腹腔感染、胆道疾病等, 但近年由于医疗条件的极大改善以及抗生素广泛应用, 上述疾病引起的肝脓肿明显减少, 而糖尿病并发肝脓肿的发生率有明显上升趋势. 糖尿病患者由于蛋白质合成能力减弱, 分解代谢加速, 氮负平衡, 细胞免疫和体液免疫功能下降; 长期高血糖可抑制白细胞趋化和吞噬能力; 单核巨噬细胞及调理素活性下降, 抗体生成减少, 且高血糖状态有利于细菌的生长繁殖, 细菌易经血液循环或胆道进入肝脏引起肝脓肿. 目前糖尿病患者已成为细菌性肝脓肿的高发人群<sup>[9,10]</sup>. 我们的研究发现183例患者中, 69例既往有明确的糖尿病史, 20例入院后确诊糖尿病, 另外空腹血糖受损、糖耐量低减18例, 均提示糖尿病与肝脓肿密切相关, 高血糖是肝脓肿的重要发病因素. 因此, 我们临床上对于糖尿病患者出现反复的畏寒发热、右上腹痛等消化系症状时, 应尽快予以影像学检查排除肝脓肿的存在; 对于既往无糖尿病病史的肝脓肿患者入院后的应加强血糖监测, 以便及早发现高血糖并采取相应的治疗, 以免延误病情, 影响感染的控制.

近年研究发现, 肺炎克雷伯菌已经取代了大肠埃希菌成为肝脓肿的致病菌中的第一位, 是细菌性肝脓肿最常见的致病菌<sup>[11-15]</sup>. 本研究显示, 血液细菌培养病原学结果阳性8例为肺炎克雷伯杆菌, 3例为大肠埃希氏菌, 1例为星座链球菌3; 脓液培养阳性30例为肺炎克雷伯杆菌, 6例为大肠埃希氏菌. 提示肺炎克雷伯杆菌已成为肝脓肿优势菌, 而过去被认为是肝脓肿常见致病菌的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌等明显减少. 但所检肺炎克雷伯杆菌对抗生素敏感性较好, 除对阿莫西林、替卡西林、哌拉西林、头孢噻吩低档抗生素耐药外, 对三、四代头孢和喹诺酮类敏感性较好. 但所检出的大肠埃希氏菌耐药性较强, 对多种抗生素耐药, 其中1例仅对亚胺培南敏感, 提示目前由于抗生素的不适当使用、使用过多导致大肠埃希氏菌的耐药性较严重. 万建华等<sup>[16]</sup>认为临床上常用的绝大多数 $\beta$ -内酰胺类抗菌药物可以有效抑制、杀灭大多数肝脓肿的致病菌(>90%), 比如头孢三代、四代、碳青霉烯类或选用含 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的复合制剂, 可以有效控制感染, 稳定病情,

但当细菌培养结果出来, 尤其是病情好转、稳定后应及时调整抗菌药物, 尽可能选择窄谱的抗菌药物, 以减轻抗生素的选择压力, 以便能较长时间的使用, 尽量减少细菌耐药的产生.

肝脓肿的治疗方法有单纯抗生素治疗、抗生素+肝脓肿穿刺治疗、手术治疗. 随着介入超声技术的快速发展, B超引导下经皮肝脓肿穿刺抽脓成为肝脓肿主要的保守治疗手段, 大部分患者避免了脓肿手术切开引流以及置管引流所带来的不便. 蒋辉等认为<sup>[9,10]</sup>: 超声介入治疗具有危险性低、损伤小、患者耐受性好、操作简单等优点, 而且经皮肝脓肿穿刺抽脓可迅速减轻患者的毒血症状和缩小脓腔, 所取脓液可以送细菌培养、指导用药, 对于疑难病例还可进一步确诊. 本组107的患者采用此法治疗, 最少1次, 最多7次, 效果良好, 未发生不良事故, 有效促进了脓肿的吸收, 缩短病程、减少治疗费用. 其中只有74例患者穿刺脓液送细菌学培养, 这与早期条件受限以及医生的意识不到位有关, 建议所穿刺的脓液尽量送检, 力求明确致病菌, 以便根据药敏结果合理使用抗生素. 穿刺冲洗液多为甲硝唑或奥硝唑, 随着肺炎克雷伯杆菌所致的肝脓肿的增多, 可考虑选用庆大霉素16万单位加入生理盐水冲洗脓腔, 可达有效、减少费用的目的.

总之, 我们认为目前单纯抗生素治疗仍是肝脓肿的一线治疗方案, 也是治疗肝脓肿的基本方法; 肝脓肿与糖尿病密切相关, 高血糖是肝脓肿发病的高危因素; 肝脓肿病原菌以肺炎克雷伯菌多见; B超引导下肝脓肿穿刺操作简便, 效果好, 应作为肝脓肿局部治疗的首选.

#### 4 参考文献

- 1 邹建华, 陈磊, 郑起, 林擎天. 肝脓肿的诊断和治疗. 肝胆胰外科杂志 2009; 21: 379-380
- 2 毕文俊, 范竹萍. 肝脓肿的临床分析. 中华消化杂志 2008; 28: 88-90
- 3 吕文才, 付维利, 谭文翔, 孙红梅. 70例细菌性肝脓肿的诊治体会. 肝胆外科杂志 2005; 14: 120-122
- 4 赖忠盟, 林枫. 细菌性肝脓肿64例临床分析. 肝胆外科杂志 2004; 12: 371-372
- 5 潘朝霞, 何权瀛. 内科治疗肝脓肿41例分析. 中华全科医师杂志 2008; 7: 567
- 6 朱文静, 周振芳, 王秀云, 张羽, 杨秀华. 超声在肝脓肿诊断及治疗中的应用价值. 中华医学超声杂志(电子版) 2010; 7: 1925-1929
- 7 邹利光, 廖翠薇, 陈垦, 戚跃勇, 程相晨. 细菌性肝脓肿的CT诊断. 世界华人消化杂志 2003; 11: 353-355
- 8 Kim SB, Je BK, Lee KY, Lee SH, Chung HH, Cha SH. Computed tomographic differences of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae* and non-*Klebsiella pneumoniae*. *J Comput Assist Tomogr* 2007; 31: 59-65
- 9 蒋辉, 陈思瑞, 吴泓, 曾勇. 多发性细菌性肝脓肿手术和经

#### ■应用要点

对肝脓肿的及时、准确诊断, 合理使用抗菌药物、减少细菌耐药的产生, 并对合适的病例采用微创治疗、减轻患者痛苦, 促进其早日康复.

## ■应用要点

本文从临床常见病出发,用大量样本来说明肝脓肿的易发因素,诊断和治疗,并在治疗中强调了微创治疗肝脓肿的观点,值得临床借鉴。

- 10 Singh O, Gupta S, Moses S, Jain DK. Comparative study of catheter drainage and needle aspiration in management of large liver abscesses. *Indian J Gastroenterol*; 28: 88-92
- 11 李婧,符颖,王吉耀,曾蒙苏,涂传涛,沈锡中,蒋炜.肺炎克雷伯杆菌肝脓肿的临床及影像学特征. *中华消化杂志* 2010; 30: 230-235
- 12 Pastagia M, Arumugam V. Klebsiella pneumoniae liver abscesses in a public hospital in Queens, New York. *Travel Med Infect Dis* 2008; 6: 228-233
- 13 Li J, Fu Y, Wang JY, Tu CT, Shen XZ, Li L, Jiang W. Early diagnosis and therapeutic choice of Klebsiella pneumoniae liver abscess. *Front Med China* 2010; 4: 308-316
- 14 Lee NK, Kim S, Lee JW, Jeong YJ, Lee SH, Heo J, Kang DH. CT differentiation of pyogenic liver abscesses caused by Klebsiella pneumoniae vs non-Klebsiella pneumoniae. *Br J Radiol* 2011; 84: 518-525
- 15 赵宗珉,赵金瀛,万建华.肺炎克雷伯杆菌肝脓肿与非肺炎克雷伯杆菌肝脓肿的临床比较. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1582-1586
- 16 万建华,赵金满,宋建.细菌性肝脓肿致病菌及耐药性分析138例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 367-376

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

## ●消息●

## 《世界华人消化杂志》出版流程

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



# 人工肝结合<sup>131</sup>I治疗与内科常规治疗40例甲亢合并重症肝损害疗效的比较

杨丽霞, 李小鹏, 张伦理

杨丽霞, 李小鹏, 张伦理, 南昌大学第一附属医院传染科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 杨丽霞与李小鹏设计课题; 杨丽霞完成研究过程, 杨丽霞与李小鹏完成病例收集、数据分析; 杨丽霞、李小鹏及张伦理共同完成论文写作。

通讯作者: 杨丽霞, 主治医师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院传染科. ylx35366@163.com

收稿日期: 2011-08-01 修回日期: 2011-09-02

接受日期: 2011-09-24 在线出版日期: 2011-10-08

## Clinical effect of artificial liver combined with <sup>131</sup>I therapy versus conventional medical treatment in patients with hyperthyroidism and severe liver injury: an analysis of 40 cases

Li-Xia Yang, Xiao- Peng Li, Lun- Li Zhang

Li-Xia Yang, Xiao- Peng Li, Lun- Li Zhang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Li-Xia Yang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. ylx35366@163.com

Received: 2011-08-01 Revised: 2011-09-02

Accepted: 2011-09-24 Published online: 2011-10-08

### Abstract

**AIM:** To evaluate the clinical effect of artificial liver combined with <sup>131</sup>I therapy versus conventional medical treatment in patients with hyperthyroidism and severe liver injury.

**METHODS:** The clinical data for 40 patients with hyperthyroidism and severe liver injury who were treated at our hospital over the past 6 years were retrospectively analyzed to compare the efficacy of artificial liver combined with <sup>131</sup>I therapy versus conventional medical treatment.

**RESULTS:** Twenty-five patients underwent artificial liver treatment, and of them 20 had a response and 5 had disease progression. The

response rate was 80%. Fifteen patients received conventional medical treatment, and of them 6 had a response and 59 had disease progression, with a response rate of only 40%. Artificial liver treatment significantly improved liver function and thyroid function, shortened PT time and increased the cure rate.

**CONCLUSION:** Artificial liver combined with <sup>131</sup>I therapy can significantly improve prognosis and reduce mortality in patients with hyperthyroidism and severe liver injury.

**Key Words:** Artificial liver; <sup>131</sup>I therapy; Hyperthyroidism; Severe hepatitis

Yang LX, Li XP, Zhang LL. Clinical effect of artificial liver combined with <sup>131</sup>I therapy versus conventional medical treatment in patients with hyperthyroidism and severe liver injury: an analysis of 40 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2983-2986

### 摘要

**目的:** 对人工肝结合<sup>131</sup>I治疗与内科常规治疗甲状腺功能亢进(甲亢)合并重症肝损害患者的临床疗效进行比较。

**方法:** 对近6年来我院40例甲亢合并重症肝损害患者的临床表现、实验室检查、治疗方式及预后进行回顾性分析, 比较采用人工肝[方式有分子吸附再循环系统(molecular adsorbent recirculating system, MARS)、血浆置换]结合<sup>131</sup>I与内科常规治疗的疗效和预后。

**结果:** 人工肝组有25例患者, 20例好转, 5例病情恶化, 内科常规治疗组共15例患者, 6例好转, 9例恶化, 人工肝组好转率(80%)明显高于内科常规治疗组(40%), 人工肝治疗能显著改善患者肝功能、甲状腺功能指标, 缩短凝血酶原时间, 提高治愈率。

**结论:** 甲亢合并重症肝损害病情复杂, 治疗棘手, 根据病情需要行人工肝治疗, 在肝功能改善后行<sup>131</sup>I能明显改善预后, 提高生存率, 降低

### ■背景资料

甲状腺功能亢进(甲亢)合并严重肝功能损害常病情重, 合并症及并发症多, 病死率高, 常规治疗效果差。

### ■同行评议者

郑素军, 副主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院

## ■创新盘点

本文采用人工肝结合<sup>131</sup>I治疗甲状腺合并重症肝功能损害患者,探讨其对患者疗效、肝功能、凝血功能、甲状腺功能和治愈率的影响,并与常规内科治疗进行比较。

病死率。

**关键词:** 肝; 人工;<sup>131</sup>I治疗; 甲状腺功能亢进; 重型肝炎

杨丽霞, 李小平, 张伦理. 人工肝结合<sup>131</sup>I治疗与内科常规治疗40例甲状腺合并重症肝损害疗效的比较. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2983-2986

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2983.asp>

## 0 引言

甲状腺功能亢进症(甲亢)是由甲状腺激素分泌过多所引起的一中常见的内分泌疾病,以弥漫性毒性甲状腺肿(Graves病)最多见。甲状腺激素和肝脏有密切的关系,甲亢本身可并发多种肝脏损害,抗甲状腺药物有时可加重肝损害<sup>[1]</sup>,而我国是病毒性肝炎高发国家,甲亢性肝病、甲亢合并病毒性肝炎、甲亢合并药物性肝炎等导致的严重肝损害在我国并不少见<sup>[2]</sup>,仍是临床上治疗颇为棘手的一类疾病,我科自2005-03/2011-03共收治甲亢合并严重肝损害40例,现将其临床特点及治疗情况总结如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 40例均为我院住院患者,男26例,女14例,年龄(16-65)岁,平均36岁,住院周期2-80(平均31) d。甲亢合并病毒性肝炎25例,其中急性肝炎7例,慢性肝炎8例,重型肝炎10例,病原方面:甲型肝炎1例,丙型肝炎1例,戊型肝炎5例,乙型肝炎16例,乙丙丁型肝炎、乙戊型肝炎重叠感染各1例;甲亢性肝病5例;药物性肝损害合并甲亢10例,其中3名患者分别服用治疗疥疮、白癜风、骨折的中草药(成分不明)导致严重肝损害,服用丙基硫氧嘧啶2 wk-1 mo后出现肝损害的5例,服用甲巯咪唑(商品名他巴唑、赛治)2 wk-1 mo后出现肝损害的2例。40例患者根据不同治疗方案分为人工肝治疗组及内科治疗组。

## 1.2 方法

**1.2.1 甲状腺机能情况:** 甲亢诊断均按临床表现及实验室资料确诊,40例患者中24例有甲亢病史,病程0.5-15年,这些病例均有应用过抗甲状腺药物甲巯咪唑或丙基硫氧嘧啶,疗程长短不一(2 mo-6年),仅个别患者完成正规疗程,大多数患者在症状改善后自行停药,且未定期检测肝功能。16例患者在入院前(1-6 mo)已有明显甲亢症状,但未就诊,入院后确诊。

**1.2.2 肝功能损害情况:** 所有患者均有明显肝功

表 1 人工肝组与内科常规组治疗甲亢合并重症肝损害治愈率比较

分组	好转	恶化	合计	好转率(%)
人工肝治疗组	20	5	25	80.0
内科常规治疗组	6	9	15	40.0
合计	26	14	40	65.0

采用 $\chi^2$ 检验计算,  $\chi^2 = 6.593$ ,  $P = 0.01 < 0.05$ 。

能损害,入院时血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)41-1140 U/L,总胆红素(total bilirubin, TBIL)116.4-810.5  $\mu$ mol/L,白蛋白(albumin, ALB)23-42.7 g/L,凝血酶原时间(prothrombin time, PT)11.3-55.9 s。

**1.2.3 治疗方法:** 患者入院后停用一切肝损害药物,卧床休息,并予以高营养食品及多种维生素,维持水电解质平衡,给予常规护肝、退黄疸、促进肝细胞再生等药物治疗,予心得安控制心率,甲亢灵胶囊减轻甲亢症状,并补充白蛋白、新鲜冰冻血浆、抗感染等综合治疗,有核苷类似物抗病毒治疗指针即给予相应抗病毒治疗。人工肝治疗组:在内科综合治疗的基础上有25例接受了分子吸附再循环系统(molecular adsorbent recirculating system, MARS)或血浆置换支持疗法,平均1.4次/例,治疗后在患者临床症状改善、肝功能有所恢复时,16例患者加用<sup>131</sup>I同位素治疗甲亢。内科治疗组:15例患者采取与人工肝治疗组相同的综合治疗措施,其中8例患者行<sup>131</sup>I同位素治疗甲亢。本研究疗效判断标准为出院时甲亢及肝功能指标恢复正常为治愈;甲亢及肝功能等指标均有好转,或甲亢治愈而肝功能指标好转或甲亢好转而肝功能指标正常均为好转,病情加重放弃治疗为无效,住院患者抢救无效为死亡。

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件包处理,配对 $t$ 检验分别比较人工肝治疗组和内科常规组入院及出院时肝功能、PT、甲状腺功能指标改善情况, $\chi^2$ 检验比较两组的治愈好转率(%)。

## 2 结果

**2.1 人工肝治疗组与内科常规治疗组治愈好转率比较** 人工肝组25例,15例治愈,5例好转,3例分别因肝性脑病、肝肾综合征、呼吸衰竭放弃治疗,2例死亡。内科治疗组15例,6例好转,7例因病情反复放弃治疗,2例因并发肠穿孔死亡。人工肝组治愈好转率(80.0%)明显高于内科治疗组

表 2 治疗前(入院时)和治疗后(出院时)肝功能指标比较 (mean ± SD)

分组	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	TB(TBIL)	DB(DBIL)	PT(s)
正常参考值		<40	<40	<20	<7	10-13
人工肝 治疗前	25	112.5 ± 22.5	115.6 ± 21.1	505.3 ± 84.3	332.1 ± 71.2	23.8 ± 8.7
治疗组 治疗后	25	72.1 ± 14.9	78.0 ± 16.3	313.1 ± 81.5	195.6 ± 54.6	16.4 ± 7.6
P值		0.006	0.011	0.001	0.001	0.033
内科常规 治疗前	15	122.5 ± 25.7	114.4 ± 18.1	478.3 ± 96.4	298.1 ± 85.2	23.5 ± 7.9
治疗组 治疗后	15	110.1 ± 27.9	120.1 ± 17.3	501.3 ± 10.6	304.6 ± 78.7	24.7 ± 8.1
P值		0.184	0.320	0.460	0.310	0.240

ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; TB: 总胆红素; DB: 结合胆红素; PT: 凝血酶原间; 人工肝组治疗前后比较: 均 $P < 0.05$ ; 内科常规治疗前后比较, 均 $P > 0.05$ , 两组比较差异有统计学意义。

表 3 治疗前后(入院及出院时)甲状腺功能指标比较 (mean ± SD)

分组	n	FT3(ng/L)	FT4(μg/L)	sTSH(mIU/L)
正常参考值		2.00-40.40	0.93-1.70	0.270-4.200
人工肝 治疗前	25	16.15 ± 10.01	7.41 ± 2.82	0.025 ± 0.023
治疗组 治疗后	25	12.26 ± 8.07	5.05 ± 2.19	0.138 ± 0.208
t值		4.02 <sup>b</sup>	3.98 <sup>b</sup>	3.46 <sup>c</sup>
内科常规 治疗前	15	16.75 ± 8.28	8.48 ± 3.54	0.043 ± 0.028
治疗组 治疗后	15	17.62 ± 7.01	8.22 ± 4.72	0.063 ± 0.038
t值		1.35	1.25	0.97

FT3: 游离甲状腺原氨酸; FT4: 游离甲状腺素; sTSH: 促甲状腺激素释放激素; 人工肝组治疗前后比较: <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 内科常规组治疗前后比较, 均 $P > 0.05$ , 两组比较差异有统计学意义。

(40.0%)(表1)。

**2.2 人工肝支持治疗与内科常规治疗比较** 人工肝支持治疗与内科常规治疗相比, 可显著的降低患者ALT、AST、TB、DB水平, 缩短PT时间, 明显改善肝功能、凝血功能(表2)。

**2.3 人工肝支持治疗与内科常规治疗比较** 人工肝支持治疗较内科常规治疗可有效降低血液中FT3、FT4水平, 提高sTSH水平, 有助于改善患者甲亢症状(表3)。

### 3 讨论

肝脏在甲状腺激素代谢方面有重要作用, 也是甲状腺激素作用的靶器官之一。甲亢与肝脏损害互相影响, 甲状腺激素升高, 可引起大量代谢产物及有毒物质堆积, 加重肝脏负担, 机体耗氧增多, 导致肝脏相对缺血缺氧和肝脏营养不良, 同时分解代谢亢进, 蛋白质缺乏, 导致体内负氮平衡, 加重肝损害, 严重肝功能损害时, 由于肝细胞大量坏死, 甲状腺激素的代谢和灭活受到严重影响<sup>[3]</sup>。而临床上常用的抗甲状腺药物(ATD)对肝脏都有不同程度的损害, ATD疗程长,

作用较慢, 复发率较高, 易发生药物性肝损害<sup>[4,5]</sup>, 且多数患者未按正规疗程服药, 就诊时肝功能损害已经很严重了。而我国又是病毒性肝炎高发国家, 急性、慢性、重型肝炎本身可导致严重肝功能损害。病毒性肝炎、甲亢、药物等因素共同影响, 导致治疗极为棘手。临床上应注意鉴别是甲亢并发病毒性肝炎, 还是甲亢性肝病, 或是抗甲亢药物性肝损害<sup>[2]</sup>。正确的诊断对指导治疗和估计预后非常重要。我们的体会是急性戊型、甲型肝炎预后较好, 而慢性乙型肝炎重度、重型患者预后较差, 可能与急性期患者肝脏基础好有关。

女性甲亢的发病率明显高于男性, 但本组40例甲亢并重症肝损害患者中男26例, 占65%, 女14例, 占35%, 男性发病率明显高于女性, 且1例急性甲型肝炎、5例急性戊型性均为男性患者, 谢仕斌等<sup>[6]</sup>推测男性发病率高于女性与男、女感染病毒性肝炎的机会不同及男性由于社会交往较多, 感染急性甲、戊型肝炎机会较多有关。

目前甲亢治疗的方法主要有: (1)抗甲亢药物治疗; (2)手术治疗; (3)<sup>131</sup>I治疗<sup>[7]</sup>。而对于合并

### ■应用要点

本研究表明人工肝治疗较内科常规治疗可改善患者肝功能、凝血功, 降低甲状腺毒素水平、改善患者甲亢症状, 提高生存治愈率。



#### ■同行评价

本文对甲亢合并严重肝功能损害进行了人工肝(方式有MARS、血浆置换)结合<sup>131</sup>I治疗以及内科常规治疗临床疗效比较,有一定临床实践指导意义。

严重肝功能损害的患者药物治疗和手术治疗都可能进一步加重肝功能损害,不易采用。<sup>131</sup>I治疗甲亢疗效确切,且严重肝功能损害合并甲亢不是<sup>131</sup>I治疗的禁忌证<sup>[8,9]</sup>,但治疗须十分谨慎,因<sup>131</sup>I治疗后至2 wk甲状腺滤泡破坏而释放大量的甲状腺激素,可引起甲亢症状一过性加重,进而加重肝功能损害,或致甲亢危象等并发症,严重者危及生命<sup>[10]</sup>。在甲亢合并严重肝功能损害时,若患者有高黄疸、PT时间明显延长,则应用<sup>131</sup>I治疗风险较大。人工肝支持系统是一种肝脏体外替代疗法,近年来该疗法迅速发展,治疗重型肝炎疗效显著<sup>[11]</sup>。人工肝支持治疗可减少和净化血液中的毒性物质,补充白蛋白、凝血因子起到辅助性肝支持作用,减轻肝功能损害,同时可清除甲亢的致病因子及降低血液中过高的甲状腺激素水平,纠正高代谢,利于患者度过危险期,为进一步治疗提供条件<sup>[12]</sup>。在甲亢症状得到及时控制,在病情相对稳定时再结合<sup>131</sup>I治疗有助于改善临床症状和促进肝功能恢复正常<sup>[13]</sup>。本组资料显示人工肝治疗可显著降低ALT、AST、TB、DB、FT3、FT4水平,提高sTSH,缩短凝血酶原时间,较内科常规组比较有显著差异,且16例患者在行人工肝治疗后及时行<sup>131</sup>I控制甲亢,最终均痊愈出院,提示<sup>131</sup>I结合人工肝支持系统治疗甲亢合并严重肝功能损害疗效肯定,可有效降低病死率,提高治愈率,为患者提供了一条新的治疗途径,值得推广。

甲亢并发严重肝功能损害患者,病因复杂,病情变化快,肝性脑病、肝肾综合征、感染、心房纤颤、肠穿孔等并发症较多,病情危重,病死率较高,应强调多学科的通力合作,传染科(肝

病科)、内分泌科、心内科、核医学科、人工肝中心等相关科室应密切协作,制定出适合患者的最佳治疗方案,根据病情变化及时调整治疗,选择适合个体的优化治疗方案。

#### 4 参考文献

- 1 田竹芳,施秉银,赵新,高珊,胡文华. Graves病患者甲亢性肝损害及其相关因素分析. 西安交通大学学报(医学版) 2010; 31: 205-207
- 2 王怡. 53例甲状腺功能亢进症并发肝脏损害临床分析. 肝脏 2003; 8: 60-61
- 3 钱静,刘勇钢. 甲状腺与肝脏疾病关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1167-1170
- 4 Kim HJ, Kim BH, Han YS, Yang I, Kim KJ, Dong SH, Kim HJ, Chang YW, Lee JI, Chang R. The incidence and clinical characteristics of symptomatic propylthiouracil-induced hepatic injury in patients with hyperthyroidism: a single-center retrospective study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 165-169
- 5 Khoo AL, Tham LS, Lee KH, Lim GK. Acute liver failure with concurrent bupropion and carbamazole therapy. *Ann Pharmacother* 2003; 37: 220-223
- 6 谢仕斌,黄桂梅,李建国,崇雨田,姚集鲁. 甲状腺机能亢进症合并病毒性肝炎33例临床分析. 中华传染病杂志 1999; 17: 61
- 7 廖二元,超楚生. 内分泌学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 664-689
- 8 李少林,张永学. 核医学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 344
- 9 黄盛才,施荣虎,彭盛梅. 131碘治疗合并严重肝功能损害的甲亢(附60例报告). 广西医科大学学报 2003; 20: 378-379
- 10 胡晖,张阳德,邓豪余,李新辉,梁昌华. <sup>131</sup>I结合人工肝支持系统治疗甲亢合并重型肝炎. 中华核医学杂志 2006; 26: 115-117
- 11 段仲平. 人工肝脏治疗学. 北京: 中国医药科学技术出版社, 2002: 3
- 12 张伦理,陈士彬,何江龙,史宇飞,杨小兰,王芝花. 分子吸附再循环系统治疗甲状腺功能亢进合并严重肝损害的临床研究. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 707-708
- 13 李芹,李显蓉,邓存良. 病毒性肝炎合并甲状腺功能亢进症11例临床分析. 寄生虫病与感染性疾病 2004; 2: 109-110

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# CCT亚基 $\gamma$ 在人肝细胞癌组织中的表达及意义

谭晓虹, 曹骥, 欧超, 汪多平

谭晓虹, 广西医科大学附属肿瘤医院化疗三科 广西壮  
族自治区南宁市 530021

曹骥, 欧超, 广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部 广西壮  
族自治区南宁市 530021

汪多平, 广西医科大学附属肿瘤医院头颈外科 广西南宁市  
530021

广西科技厅自然科学基金资助项目, No. 桂科回0991017

作者贡献分布: 此课题由谭晓虹、曹骥及欧超设计; 研究过程由  
谭晓虹、欧超及汪多平操作完成; 数据分析和论文写作由谭晓  
虹与欧超完成。

通讯作者: 曹骥, 副研究员, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广  
西医科大学附属肿瘤医院实验研究部. caojicn@yahoo.com.cn  
电话: 0771-5330855

收稿日期: 2011-08-08 修回日期: 2011-10-02

接受日期: 2011-10-06 在线出版日期: 2011-10-08

## Significance of expression of CCT subunit $\gamma$ in human hepatocellular carcinoma

Xiao-Hong Tan, Ji Cao, Chao Ou, Duo-Ping Wang

Xiao-Hong Tan, the Third Department of Chemotherapy, Can-  
cer Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nan-  
ning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Ji Cao, Chao Ou, Experimental Research Department, Can-  
cer Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nan-  
ning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Duo-Ping Wang, Department of Head and Neck Surgery,  
Cancer Hospital Affiliated to Guangxi Medical University,  
Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region,  
China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi,  
Gui Ke Hui No.0991017

Correspondence to: Ji Cao, Associate Professor, Exper-  
imental Research Department, Cancer Hospital Affiliated  
to Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi  
Zhuang Autonomous Region, China. caojicn@yahoo.com.cn

Received: 2011-08-08 Revised: 2011-10-02

Accepted: 2011-10-06 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To evaluate the significance of expression  
of CCT subunit  $\gamma$  in human hepatocellular carci-  
noma (HCC).

**METHODS:** The expression of CCT subunit  $\gamma$   
was detected by immunohistochemistry in 35  
cases of HCC and tumor adjacent tissue and 12  
cases of normal liver tissue.

**RESULTS:** The positive rate of CCT subunit  $\gamma$   
expression in HCC was significantly higher than

those in tumor adjacent and normal liver tissues  
(88.57% vs 62.86%, 41.67%, both  $P < 0.05$ ). The  
expression of CCT subunit  $\gamma$  was not correlated  
with age, hepatitis B surface antigen, portal  
venous tumor emboli, AFP level, tumor size or  
clinical stage (all  $P > 0.05$ ), but was negatively  
correlated with tumor differentiation ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** CCT subunit  $\gamma$  is overexpressed  
in HCC, and CCT overexpression may be related  
with HCC carcinogenesis.

**Key Words:** CCT subunit  $\gamma$ ; Hepatocellular carci-  
noma; Immunohistochemistry

Tan XH, Cao J, Ou C, Wang DP. Significance of expression  
of CCT subunit  $\gamma$  in human hepatocellular carcinoma.  
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(28): 2987-2990

## 摘要

**目的:** 探讨CCT亚基 $\gamma$ 在人肝细胞癌组织中的  
表达和意义。

**方法:** 用免疫组织化学一步法检测35例肝癌及  
癌旁组织、12例正常肝组织中的CCT亚基 $\gamma$ 表达。

**结果:** CCT亚基 $\gamma$ 在肝癌组织的阳性表达率为  
88.57%(31/35), 在癌旁组织中的阳性表达率为  
62.86%(22/35), 在正常肝组织中的阳性表达率  
为41.67%(5/12)。CCT亚基 $\gamma$ 在肝癌组织中的表  
达明显高于癌旁组织和正常肝组织, 具有显  
著性差异( $P < 0.05$ )。CCT亚基 $\gamma$ 的表达与肝癌患  
者年龄、乙肝表面抗原、有无门静脉癌栓、  
AFP水平、肿瘤直径及临床分期均不相关  
( $P > 0.05$ ), 但CCT亚基 $\gamma$ 的过度表达与肝癌患者  
肿瘤细胞分化程度相关( $P < 0.05$ ), 肿瘤细胞分  
化程度越低, CCT亚基 $\gamma$ 的表达越高。

**结论:** CCT亚基 $\gamma$ 在人肝细胞癌组织中表达增  
高可能与肝细胞的癌变有关。

**关键词:** CCT亚基 $\gamma$ ; 肝细胞癌; 免疫组织化学

谭晓虹, 曹骥, 欧超, 汪多平. CCT亚基 $\gamma$ 在人肝细胞癌组织中的  
表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2987-2990  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2987.asp>

## ■背景资料

肝癌是一种常见  
的恶性肿瘤, 严  
重危害着人类健  
康. 肝癌的发生和  
发展是一个多因  
素、多步骤、多  
基因作用的复杂  
过程, 找出肝癌中  
具有异常表达的  
基因或蛋白并对  
其进行研究, 对肝  
癌的诊治与治疗  
具有重要的意义.  
研究表明分子伴  
侣蛋白可能参与  
了肝癌的发生发  
展过程。

## ■同行评议者

周晓武, 副主任医  
师, 中国人民解放军  
空军总医院普  
通外科

## ■研究前沿

研究发现肝癌、胃癌、结直肠癌等肿瘤组织中出现分子伴侣蛋白的异常表达,但其具体机制尚不明。

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的恶性肿瘤,严重危害着人类健康。2002年世界卫生组织发表的全球肿瘤统计分析报告表明,全世界新患肝癌人数约为626 000,死亡人数约为598 000;新患肝癌病例中的55%发生在中国<sup>[1]</sup>。肝癌的发生和发展是一个多因素、多步骤、多基因作用的复杂过程,分子伴侣蛋白可能参与了肝癌的发生发展过程<sup>[2,3]</sup>。伴侣蛋白携带t复合多肽1(the chaperonin containing tail-less complex polypeptide 1, CCT),是存在于真核细胞胞质中重要的分子伴侣<sup>[4]</sup>,主要功能是能够特异地帮助细胞内新生的肌动蛋白、微管蛋白、周期蛋白E等折叠<sup>[5,6]</sup>。哺乳动物CCT由7-9种不同的亚基组成,而且每个亚基的作用互不相同<sup>[7]</sup>。目前国内外关于CCT亚基 $\gamma$ 和肝细胞癌的研究报道很少,本实验通过免疫组化检测人HCC、癌旁组织和正常肝组织中CCT亚基 $\gamma$ 的表达,初步探讨CCT亚基 $\gamma$ 在HCC发生和发展过程中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集广西医科大学附属肿瘤医院2006-2010年初治,经手术切除,有完整临床背景资料的肝细胞癌及癌旁组织石蜡标本各35例。男33例,女2例,年龄24-60(平均年龄47)岁,术后均经病理证实为肝细胞性肝癌。12例正常肝组织作为对照。兔抗CCT3(CCT亚基 $\gamma$ )多克隆抗体购自美国Proteintech Group, Inc,鼠抗兔IgG购自天津津脉基因测绘技术有限公司,DAB显色试剂盒购自福州迈新公司,磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH7.5)、柠檬酸盐抗原修复液(0.01 mol/L, pH6.0)为国产分析纯试剂,用双蒸水配置。

1.2 方法 常规制片,按免疫组织化学一步法进行染色,用已知标准片作为阳性对照,以磷酸缓冲液代替一抗作阴性对照。由两名经验丰富的病理科医师对结果进行判断。随机采集10个具有代表性的视野进行计数,取平均数值。结果判断标准:细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞,(-)为无阳性细胞,弱阳性(+)为阳性细胞数 $\leq 25\%$ ,中等阳性(++)为阳性细胞数25%-50%,强阳性(+++)为阳性细胞数 $\geq 50\%$ 。

统计学处理 实验结果采用SPSS16.0统计软件进行统计分析,计数资料的差异性分析使用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 CCT亚基 $\gamma$ 在肝癌组织、癌旁组织、正常肝组织中的表达 CCT亚基 $\gamma$ 阳性表达定位于细胞质(图1)。肝癌组织中CCT亚基 $\gamma$ 阳性细胞呈弥漫性或小巢状分布,CCT亚基 $\gamma$ 阳性表达率(88.57%)明显高于癌旁组织(62.86%)及正常肝组织(41.67%)(表1)。

2.2 CCT亚基 $\gamma$ 与肝癌临床病理特征的关系 CCT亚基 $\gamma$ 的过度表达与肝癌患者年龄、乙肝表面抗原、有无门静脉癌栓、AFP水平、肿瘤直径及临床分期均不相关( $P>0.05$ ),但CCT亚基 $\gamma$ 的过度表达与肿瘤细胞分化程度相关( $P<0.05$ ),即肿瘤细胞分化越低,CCT亚基 $\gamma$ 的过度表达率就越高(表2)。

## 3 讨论

分子伴侣素或称分子伴侣蛋白(chaperonin)是一类能特异地结合和释放底物蛋白的蛋白分子,他们帮助底物蛋白实现正确折叠、寡聚体组装、向特定细胞器转运或变换活化/去活化构象等。分子伴侣素是进化上最为保守的蛋白之一,从结构上可以分为两类,一类见于原核细胞和真核细胞器,以GroEL和HSP60为代表;另一类见于古细菌和真核细胞,以thermosome和CCT为代表。CCT是一种广泛存在于真核细胞胞质中的异型杂合寡聚蛋白,由8个亚基CCT  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ 和 $\theta$ 组成,在肌动蛋白、微管蛋白的组装和折叠中发挥重要的作用<sup>[8-10]</sup>。

目前国内外对分子伴侣蛋白与肿瘤关系的研究陆续均有报道,陈志芬等<sup>[11]</sup>报道HSP60在胃癌中的阳性率和过表达率均明显高于胃癌前病变,因此认为HSP60可能与胃癌的发生、发展有关。Coghlin等<sup>[12]</sup>采用比较蛋白组学检测到CCT亚基 $\beta$ 和亚基 $\epsilon$ 在结直肠癌中过表达,并且CCT亚基 $\beta$ 的表达与病人的预后有关。王廷峰等<sup>[13]</sup>报道CCT6A在结直肠癌组织中高表达,与肿瘤浸润深度和肿瘤大小有关,认为CCT6A可作为诊断结直肠癌的潜在标志物。王葵等<sup>[14]</sup>用cDNA芯片研究人原发性肝癌伴和不伴门静脉癌栓形成的基因表达差异,结果发现CCT亚基 $\gamma$ 基因表达共同上调。Yokota等<sup>[15]</sup>通过免疫组化检测发现肝细胞癌和结肠癌组织高表达CCT亚基 $\beta$ ,并与癌旁组织表达存在显著性差异。

本实验发现肝癌组织中CCT亚基 $\gamma$ 表达明显高于癌旁组织及正常肝组织,并呈现正常肝组织、癌旁组织、肝癌组织表达逐渐增高的趋势,



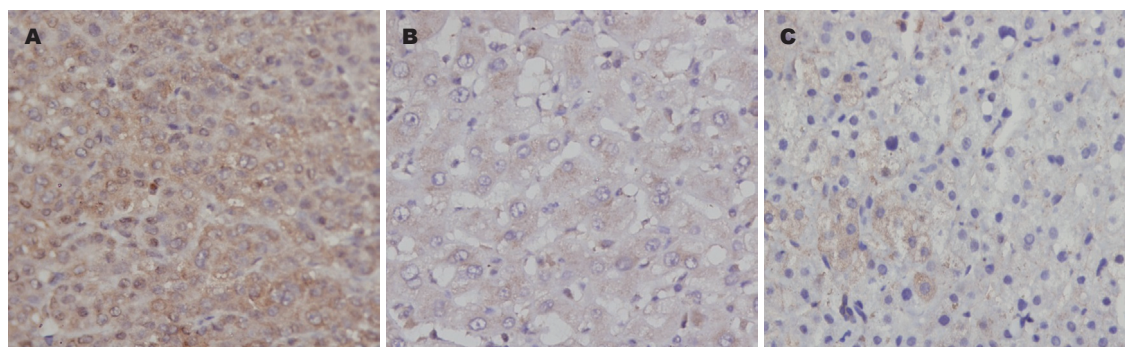


图 1 CCT亚基 $\gamma$ 在肝癌组织、肝癌癌旁组织、正常肝组织中的表达(免疫组织化学 $\times 200$ ). A: 肝癌组织; B: 癌旁组织; C: 正常肝组织.

#### ■ 相关报道

王葵等用cDNA芯片研究人原发性肝癌伴和不伴门静脉癌栓形成的基因表达差异, 结果发现CCT亚基 $\gamma$ 基因表达共同上调.

表 1 CCT亚基 $\gamma$ 在肝癌组织、癌旁组织和正常肝组织中的表达

分组	<i>n</i>	+++	++	+	-	阳性表达率(%)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
肝癌组织	35	11	17	3	4	88.57		
癌旁组织	35	2	10	10	13	62.86		
正常肝组织	12	0	0	5	7	41.67	11.3258	0.0035

表 2 CCT亚基 $\gamma$ 与肝癌临床病理特征的关系 *n*(%)

临床特征	<i>n</i>	(++)-(+++)-表达 (-)-(+)-表达	<i>P</i> 值
年龄(岁)			0.689
≤47	22	17(77.3) 5(22.7)	
>47	13	11(84.6) 2(15.4)	
HBsAg			0.381
阳性	25	21(84.0) 4(16.0)	
阴性	10	7(70.0) 3(30.0)	
分化程度			0.008
高分化	3	1(33.3) 2(66.7)	
中分化	21	16(76.2) 5(23.8)	
低分化	11	11(100.0) 0(0.0)	
门静脉癌栓			0.383
有	13	9(69.2) 4(30.8)	
无	22	19(86.4) 3(13.6)	
AFP水平( $\mu$ g/L)			0.415
<400	19	14(73.7) 5(26.3)	
≥400	16	14(87.5) 2(12.5)	
肿瘤直径			0.381
<5cm	10	7(70.0) 3(30.0)	
≥5cm	25	21(84.0) 4(16.0)	
临床分期			0.415
I-II	16	14(87.5) 2(12.5)	
III-IV	19	14(73.7) 5(26.3)	

这提示CCT亚基 $\gamma$ 有可能参与了肝细胞癌的发生发展. CCT亚基 $\gamma$ 的过度表达与肝癌细胞分化程度相关, 细胞分化越低, CCT亚基 $\gamma$ 的过度表达率就越高. 推测CCT亚基 $\gamma$ 有可能通过影响细胞肌

动蛋白、微管蛋白的组装和折叠, 导致微管蛋白和微丝蛋白失去正常构象而参与细胞的恶性转化<sup>[16]</sup>.

本研究通过免疫组织化学检测发现肝癌组织中CCT亚基 $\gamma$ 表达增高并与肿瘤细胞分化程度呈负相关, 初步表明CCT亚基 $\gamma$ 可能参与肝癌的分子发病机制, 但具体机制尚待深入研究.

#### 4 参考文献

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Pang R, Tse E, Poon RT. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2006; 240: 157-169
- 李冬, 张建中. 肝细胞癌基础研究的某些进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1592-1601
- Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 603-647
- Won KA, Schumacher RJ, Farr GW, Horwich AL, Reed SI. Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 7584-7589
- McCallum CD, Do H, Johnson AE, Frydman J. The interaction of the chaperonin tailless complex polypeptide 1 (TCP1) ring complex (TRiC) with ribosome-bound nascent chains examined using photo-cross-linking. *J Cell Biol* 2000; 149: 591-602
- 常晓燕, 陈杰. 伴侣素CCT的结构及与肌动蛋白、微管蛋白的作用机制. 国外医学·生理病理科学与临床分册 2003; 23: 596-598
- Fares MA, Wolfe KH. Positive selection and subfunctionalization of duplicated CCT chaperonin subunits. *Mol Biol Evol* 2003; 20: 1588-1597
- Valpuesta JM, Martín-Benito J, Gómez-Puertas P,

## ■同行评价

本文应用免疫组织化学初步研究了CCT亚基 $\gamma$ 在肝癌组织中的表达及意义,具有一定的新颖性,有一定的临床实用价值.

- Carrascosa JL, Willison KR. Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS Lett* 2002; 529: 11-16
- 10 Kubota H. Function and regulation of cytosolic molecular chaperone CCT. *Vitam Horm* 2002; 65: 313-331
- 11 陈志芬, 邓长生, 夏冰, 朱尤庆, 曾俊, 龚玲玲. HSP60和CD44V6在胃腺癌中的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 988-991
- 12 Coghlin C, Carpenter B, Dundas SR, Lawrie LC, Telfer C, Murray GI. Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *J Pathol* 2006; 210: 351-357
- 13 王廷峰, 冯波, 马君俊, 王磊, 郑民华, 陆爱国. 伴侣素CCT6A在结肠直肠癌中的表达及其意义. *外科理论与实践* 2009; 14: 335-338
- 14 王葵, 沈锋, 丛文铭, 施乐华, 吴孟超. 肝癌伴门静脉癌栓的基因表达研究. *癌症进展* 2005; 3: 417-422
- 15 Yokota S, Yamamoto Y, Shimizu K, Momoi H, Kamikawa T, Yamaoka Y, Yanagi H, Yura T, Kubota H. Increased expression of cytosolic chaperonin CCT in human hepatocellular and colonic carcinoma. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6: 345-350
- 16 张瑜, 张怡, 林秋华. 孕激素对子宫内膜癌细胞系Ishikawa影响的蛋白质组学研究. *南方医科大学学报* 2006; 26: 1110-1113

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

## ● 消息 ●

## 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布.《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示,2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次,影响因子0.625,综合评价总分49.4分,分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位,分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位;其他指标:即年指标0.112,他引率0.79,引用刊数473种,扩散因子15.72,权威因子1 170.03,被引半衰期4.0,来源文献量752,文献选出率0.93,地区分布数30,机构分布数30,基金论文比0.39,海外论文比0.01.

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊). (编辑部主任:李军亮 2010-11-28)

# 巨大型先天性胆管扩张症手术治疗20例

李忠廉, 张西波, 尚海涛, 张鸿涛, 鲍建亨, 郑帅

李忠廉, 张西波, 尚海涛, 张鸿涛, 鲍建亨, 天津市南开医院肝胆外科 天津市 300100

郑帅, 天津医科大学研究生院 天津市 300070

作者贡献分布: 尚海涛、张鸿涛及鲍建亨对此文所作贡献均等; 此手术由李忠廉主刀, 张西波、尚海涛、张鸿涛及鲍建亨当助手共同完成; 回顾分析病例由李忠廉主持、张西波、尚海涛、张鸿涛、鲍建亨及郑帅完成; 数据分析张西波完成; 本论文写作由李忠廉、张西波及郑帅完成。

通讯作者: 李忠廉, 主任医师, 教授, 300100, 天津市, 天津市南开医院肝胆外科. lizhonglian@medmail.com.cn

电话: 022-27435237

收稿日期: 2011-07-11 修回日期: 2011-09-27

接受日期: 2011-10-02 在线出版日期: 2011-10-08

## Surgical treatment of giant congenital bile duct dilatation: an analysis of 20 cases

Zhong-Lian Li, Xi-Bo Zhang, Hai-Tao Shang, Hong-Tao Zhang, Jian-Heng Bao, Shuai Zheng

Zhong-Lian Li, Xi-Bo Zhang, Hai-Tao Shang, Hong-Tao Zhang, Jian-Heng Bao, Department of Hepatobiliary Surgery, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China  
Shuai Zheng, Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Correspondence to: Zhong-Lian Li, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China. lizhonglian@medmail.com.cn

Received: 2011-07-11 Revised: 2011-09-27

Accepted: 2011-10-02 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To discuss our experience of surgical treatment of giant congenital bile duct dilatation.

**METHODS:** The clinical data for 20 patients with giant congenital bile duct dilatation who underwent cyst excision at our hospital from June 2001 to August 2010 were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** According to the Todani classification, 19 patients had type 1 disease and 1 had type IV disease. After surgery, bile leakage occurred in two cases, pancreatic leakage in two cases, and wound infection in two cases. Ninety patients were followed up (follow-up rate, 95%) for 3 mo to 8 years. The average follow-up duration was 53.6 mo. During follow-up, mild cholangitis occurred in three cases, anastomotic

stenosis in two cases, and no malignant transformation was found.

**CONCLUSION:** Cyst resection and biliary-enteric Roux-en-Y anastomosis is the preferred radical surgery for congenital bile duct dilatation.

**Key Words:** Congenital biliary dilatation; Giant; Surgery

Li ZL, Zhang XB, Shang HT, Zhang HT, Bao JH, Zheng S. Surgical treatment of giant congenital bile duct dilatation: an analysis of 20 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2991-2994

## 摘要

**目的:** 探讨巨大型先天性胆管扩张症手术治疗的经验体会。

**方法:** 回顾分析2001-06/2010-08我科收治的巨大型先天性胆管扩张症20例手术治疗资料。按Todani分类法分型: I型19例, IV型1例。所有病例均行囊肿切除。

**结果:** 术后胆汁漏2例, 胰漏2例, 经非手术治疗治愈, 切口感染2例。20例中获随访19例, 随访率为95%, 随访3-96 mo, 平均随访53.6 mo, 3例表现轻度胆管炎, 2例吻合口狭窄, 余下疗效皆为优, 未发现恶变者。

**结论:** 囊肿切除、胆肠Roux-en-Y吻合术是根治先天性胆管扩张症首选手术方法。对于巨大型先天性胆管扩张症在选择手术时, 术前行PTCD治疗以改善肝功能和凝血异常。

**关键词:** 先天性胆管扩张症; 巨大型; 手术治疗

李忠廉, 张西波, 尚海涛, 张鸿涛, 鲍建亨, 郑帅. 巨大型先天性胆管扩张症手术治疗20例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(28): 2991-2994

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2991.asp>

## 0 引言

先天性胆管扩张症(congenital biliary dilatation, CBD)又称胆管扩张症或先天性胆总管囊肿, 可

## ■背景资料

先天性胆管扩张症又名先天性胆总管囊肿, 病变可以发生在肝内、肝外胆道的任何部位, 好发于胆总管。根据其部位、形态、数目等有多种类型。其治疗方法主要包括外引流术、囊肿与肠道间内引流术以及胆管扩张部切除胆道重建术等, 根据其类型不同, 须采取不同的手术方式。因此, 根据不同分型探讨其手术治疗方式意义重大。

## ■同行评议者

黎乐群, 教授, 广西医科大学第一附属医院肝胆外科; 许戈良, 教授, 安徽省立医院肝胆外科



## ■研究前沿

先天性胆管扩张症一经确诊应尽早手术, 否则可因反复发作胆管炎导致肝硬化、癌变或囊肿破裂等严重并发症。单纯囊肿-胃肠道吻合术, 虽能暂时解除梗阻和缓解症状, 但由于囊肿的存留, 胰液、肠液的反流, 可导致感染、结石、吻合口狭窄和癌变等严重后果。

## ■相关报道

近年主张具有根治意义的切除胆管扩张部位以及胆道重建的方法, 从而达到去除病灶, 使胰胆分流的目的。可采用生理性胆道重建术, 将空肠间置于胆管与十二指肠之间, 或加用防返流瓣, 或采用胆管空肠 Roux-en-Y 式吻合术、胆管十二指肠吻合术等, 均能取得良好效果。主要的是吻合口必须够大, 以保证胆汁充分引流。

以发生在肝内、外胆管的任何部分, 是胆道畸形中最常见的一种类型。本文回顾分析我科收治的20例巨大先天性胆管扩张症手术治疗的临床资料。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2001-06/2010-08我科共收治巨大先天性胆管扩张症20例, 女12例, 男8例。年龄17-52岁, 平均年龄28.9岁。临床表现为右上腹疼痛14例(70%), 腹部包块15例(75%), 间歇性黄疸9例(45%), 同时具有腹痛、黄疸和腹部包块8例(40%)。兼有反复发作胆管炎8例(40%), 慢性胆囊炎、胆囊结石11例(55%), 胆总管结石6例(30%), 1例合并妊娠。均无癌变发生。

### 1.2 方法

1.2.1 影像学检查及分型: 全组18例行B超检查, 确诊14例(77.8%); 行CT检查14例, 确诊13例(92.9%); 行MRCP检查9例, 均得以确诊。根据直接影像学检查及术中观察, 按Todani分类法分型<sup>[1]</sup>: I型19例, IV型1例。囊肿最大直径: 8-19 cm, 平均13.7 cm。本文巨大先天性胆管扩张症指囊肿最大直径 $\geq 8$  cm。

1.2.2 术前准备: 本组病例术前均予以对症治疗, 合并黄疸、肝功能异常者给予经皮肝穿刺胆道引流(percutaneous transhepatic cholangial drainage, PTCD), 待囊肿缩小、肝功能改善后行手术治疗; 合并胆囊炎者给予抗生素治疗; 合并凝血异常给予补充脂溶性维生素和适量含凝血因子药物; 合并贫血和低蛋白血症给予纠正贫血和低蛋白血症; 合并水、电解质紊乱者给予维持水电解质平衡。

1.2.3 手术方式: 本组17例行囊肿切除、胆肠 Roux-en-Y 吻合术。患者取仰卧位, 采用右上腹经腹直肌切口。进入腹腔即可见圆球状扩大的胆管, 完全游离囊肿壁, 切除囊肿后同时切除胆囊, 使囊肿残端呈漏斗状, 切除范围上界至左右肝管交界处下方1.0-1.5 cm, 下界达狭窄部总胰管上方, 远端残存囊壁的黏膜用无水乙醇烧灼。在十二指肠悬韧带下15 cm处切断空肠及其系膜。将空肠远侧端自横结肠后上提, 与肝总管接近, 并与之行端侧吻合。吻合口大小在1.5 cm以上, 再将空肠近侧端与远侧空肠袢做端侧吻合。两个吻合口相距30-40 cm, 缝闭横结肠系膜及空肠系膜孔隙。2例行囊肿前壁和侧壁切除、后壁黏膜剔除, 胆管空肠Roux-en-Y吻合术。1例一期切除囊肿前壁, 在囊肿远、近端各放置引流管

体外引流胆汁和反流胰液, 二期行囊肿切除、胆肠Roux-en-Y吻合术<sup>[2,3]</sup>。

## 2 结果

急诊手术1例, 择期手术19例, 囊肿切除、胆肠 Roux-en-Y 吻合术17例; 部分囊肿壁切除、黏膜剔除、胆肠Roux-en-Y吻合术2例, 即Lilly法。1例因腹部外伤囊肿破裂、胰腺损伤, 急诊行囊肿外引流术, 限期行囊肿切除、胆肠Roux-en-Y吻合术, 先后二期完成手术。术后胆汁漏2例, 胰漏2例, 经非手术治疗治愈, 切口感染2例。20例中获随访19例, 随访率为95%, 随访3-96 mo, 平均随访53.6 mo, 3例表现轻度胆管炎, 2例吻合口狭窄, 余下疗效皆为优, 未发现恶变者。

## 3 讨论

先天性胆管扩张症的病因及发病机制至今尚不明确, 一般认为与以下因素有关: (1)胰胆管合流异常学说<sup>[4]</sup>: 胆总管和胰管在十二指肠壁外汇合并且超出Oddi's括约肌的控制范围被定义为胰胆管合流异常(anomalous pancreaticobiliary junction, APBJ), 正是由于这一特殊的解剖特征使得共同通道超出Oddi's括约肌的控制和调节胰液和胆汁范围, 从而导致分泌压较高的胰液逆流到分泌压较低的胆管内, 逆流胰液中的胰蛋白酶被激活, 致使胆总管黏膜损伤, 长期炎症使管壁变薄弱, 局部膨出, 从而形成囊肿。Tashiro等<sup>[5]</sup>在对所有日本文献中CBD回顾性研究后发现, 虽然存在胰胆管合流异常的患者并不一定会发生先天性胆管扩张, 但是100%的CBD患者都存在胰胆管合流异常; (2)胆道发育异常学说: 胚胎早期胆管发生过程中胆管上皮增殖速度不一, 空泡化不均匀, 造成远段狭窄, 由于胆管内压力升高, 近段胆管管壁薄弱, 发展成CBD; (3)胆总管远端神经、肌肉发育不良学说<sup>[6]</sup>: 胆总管囊状扩张, 囊肿壁缺乏神经节细胞, 认为神经节细胞缺乏是胆管囊性扩张的病因。

本病分型方法较多, 目前尚无统一标准, Todani分型<sup>[1]</sup>在临床上应用较多, 共分5型: I型为囊状扩张; II型为憩室样扩张; III型为胆总管末端囊肿; IV型为肝内外胆管多发囊肿; V型为肝内胆管囊状扩张(Caroli病)。以I型发病率最高<sup>[7]</sup>, 占85%-90%, 本组此型占95%。

先天性胆管扩张症的典型临床表现是腹痛、黄疸和腹部包块, 但同时具备这3个典型特征的病例很少。本组因选取病例特殊, 同时

具备这3个典型特征的占40%。目前临床上主要依据B超、CT、磁共振胰胆管成像(magnetic resonance cholangio-pancreatography, MRCP)等检查诊断。B超是首选的辅助检查方法,但是不能清楚显示胆管、胰胆共同管及胰管的细微结构。CT对诊断胆道系统疾病的准确率大大提高,其不受组织器官发育程度、周围脏器重叠和肠腔气体的干扰,但二维成像不能完整显示胰胆管系统,难以明确左、右肝管,胆囊管与扩张胆管的解剖关系。MRCP能够显示胰胆管系统,能准确的显示由于畸形而致的狭窄、扩张及充盈缺损的程度,可以作为确诊检查及术前指导手术方案的依据。随着设备的提高和技术的进步,MRCP有望成为术前诊断评估胆总管囊肿的首选方法<sup>[8]</sup>。本组18例行B超检查,准确率77.8%。14例行CT扫描,准确率92.9%。9例行MRCP检查,准确率100%。经皮肝穿刺胆管造影(percutaneous transhepatic cholangiography, PTC)和经内镜逆行胰胆管造影(encoscopic retrograde cholangio-pancreatography, ERCP)可直接显示胆胰管系统,明确分型。尤其是ERCP,在诊断胰胆合流异常方面有价值,但是二者均为有创性检查,因而也增加了患者胆管出血、胆道感染及胆漏等并发症发生的危险性。因此,这两种检查方法的应用范围已经受到了很大的限制。

胆管囊性扩张症,其远端出口绝对或相对性狭窄,往往伴有胰胆管汇合异常,胰液返流入胆道,导致黏膜损伤、炎症,加上胆汁滞留,是胆道感染、结石形成和囊壁癌变的病理基础<sup>[8]</sup>,只有切除囊肿、胰胆分流,才能中止本病的病理过程。因此,先天性胆管扩张症根治性手术的治疗原则是切除病灶,阻断胰液反流,通畅胆汁引流<sup>[9]</sup>。

治疗本病常用的手术方法有囊肿外引流术、囊肿局部切除和囊肿内引流术,囊肿切除、胆道重建术3种:(1)囊肿外引流术。他是一种操作简单,创伤小的急救手术。适用于囊肿破裂、严重感染、重度营养不良、全身极度衰竭、及伴肝功能严重损害或全身情况差的不能耐受根治术的危急重患者。先行一期囊肿外引流手术,待病情恢复(3 mo左右)后再行囊肿切除、胆道重建术。本组有1例患者因腹部外伤囊肿破裂、胰腺损伤,先行外引流术,3 mo后行囊肿切除、胆肠Roux-en-Y吻合术;(2)囊肿局部切除和囊肿内引流术。由于术后难以获得通畅引流,肠液、胰液返流问题不能解决,易并发胆道感染、结石

形成、肝硬化、吻合口狭窄和闭合等。由于术后囊壁仍存在,癌变率也较其他术式高<sup>[10]</sup>,并且能加速囊肿发生癌变,现已不再应用;(3)囊肿切除、胆道重建术。是目前应用较多的术式,常用的胆道重建术有胆肠Roux-en-Y吻合术、肝总管十二指肠吻合术及肝总管空肠间置吻合术3种。囊肿切除、胆肠Roux-en-Y吻合术切除了囊肿,去除了潜在的炎性病灶,避免了术后逆行感染和癌变可能,且操作简单、防反流效果好、术后并发症少等优点,已成为公认的治疗胆管囊肿的首选术式<sup>[11-13]</sup>。本组最终有18例采用此种手术方式,取得良好效果。

我们的体会是:(1)巨大型先天性胆管扩张症囊壁都很薄同时合并肝功能和凝血机制异常,直接手术切除难度较大且术后并发症较多,对于合并黄疸、肝功能异常、有明显压迫症状者如术前给予PTCD治疗待囊肿缩小和肝功能改善后再行手术切除则可一次达到根治性切除目的。本组有11例术前行PTCD引流,待囊肿缩小、肝功能改善后手术切除囊肿取得良好效果;(2)囊肿壁上纤维组织增生,毛细血管网丰富,在剥离囊肿壁上纤维组织时应彻底止血,以免术后严重渗血;(3)对于部分巨大型胆管囊肿,由于术前反复感染,囊肿与周围组织及重要大血管紧密粘连,如强行分离,则可能因出血导致严重后果,完全切除较为困难,其前外侧游离部分可全层切除,其余囊壁尤其后壁宜在内膜与纤维层之间剥离,保留外纤维层,对于剥离不全的予以无水酒精处理破坏其残存内膜,然后再对胆道进行重建。本组有2例采用此法切除;(4)术中注意探查胆总管远端及左右肝管内有无结石或蛋白栓,如发现应取出或用生理盐水彻底冲洗干净,以免术后反复发生胰腺炎;(5)在切除囊肿远端时应注意其出口和胰管开口。囊肿出口一般以狭窄多见,应保留0.5 cm长的囊壁,破坏其黏膜后关闭出口;(6)结扎囊肿下端和总胆管之间的纤维条索时,应仔细分离避免误伤胰管;(7)囊肿近端以在切净囊肿的基础上行大口吻合为原则,残留“喇叭口”状近端囊肿壁来扩大吻合口的方法会导致术后吻合口部狭窄或吻合口近端狭窄,应该放弃采用此法<sup>[14]</sup>。扩大肝门部肝管,注意解除肝门部狭窄,必要时行胆道整形,作胆肠Roux-en-Y吻合,可用可吸收缝线连续缝合;(8)对于IV型胆管扩张症,肝外胆管囊肿手术切除是治疗标准,但对肝内囊肿的处理仍存在争议。有学者认为应该连同部分肝组织一并切

#### ■创新盘点

对于巨大型先天性胆管扩张症在选择手术时,术前行PTCD治疗以改善肝功能和凝血异常;囊肿远端在保证胰液引流通畅,不损伤胰管开口的基础上,尽量切净囊肿内膜,防止术后发生胰漏。

#### ■应用要点

囊肿切除、胆肠Roux-en-Y吻合术是根治先天性胆管扩张症首选手术方法。对于巨大型先天性胆管扩张症在选择手术时,术前行PTCD治疗以改善肝功能和凝血异常;处理囊壁外纤维组织时应彻底结扎止血;切除囊肿时不可强行切除后壁;囊肿近端以尽量切净囊肿行大口吻合为原则;囊肿远端尽量切净囊肿内膜,防止术后发生胰漏。根据不同类型采取合理的手术方法,可以减少术后并发症的发生。

## ■名词解释

Caroli病: Caroli于1958年首先描述肝内末梢胆管的多发性囊状扩张病例,因此先天性肝内胆管扩张症又称Caroli病,属于先天性肝脏囊性纤维性病变,认为系常染色体隐性遗传,以男性为多,主要见于儿童和青年。

## ■同行评价

本文探讨了该病的手术方法、术中注意事项和围手术期的治疗观察要点,目的明确,表述清晰,具有一定的临床实用价值。

除肝内囊肿,有些学者则认为肝内囊肿应不予以处理<sup>[15]</sup>。本组1例单纯行肝外胆管囊肿切除、胆肠Roux-en-Y吻合,术后效果良好。

囊肿切除、胆肠Roux-en-Y吻合术是根治先天性胆管扩张症首选手术方法。对于巨大型先天性胆管扩张症在选择手术时,术前行PTCD治疗以改善肝功能和凝血异常;处理囊壁外纤维组织时应彻底结扎止血,避免术后严重的渗血;切除囊肿时不可强行切除后壁,防止损伤大血管和周围组织;囊肿切除时,囊肿近端以尽量切净囊肿行大口吻合为原则,防止术后吻合口狭窄;囊肿远端在保证胰液引流通畅,不损伤胰管开口的基础上,尽量切净囊肿内膜,防止术后发生胰漏。

## 4 参考文献

- 1 Todani T, Watanabe Y, Narusue M, Tabuchi K, Okajima K. Congenital bile duct cysts: Classification, operative procedures, and review of thirty-seven cases including cancer arising from choledochal cyst. *Am J Surg* 1977; 134: 263-269
- 2 Lipsett PA, Pitt HA. Surgical treatment of choledochal cysts. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 352-359
- 3 Kobayashi S, Asano T, Yamasaki M, Kenmochi T, Nakagohri T, Ochiai T. Risk of bile duct carcinogenesis after excision of extrahepatic bile ducts in pancreaticobiliary maljunction. *Surgery* 1999; 126: 939-944
- 4 Babbitt DP. [Congenital choledochal cysts: new etiological concept based on anomalous relationships of the common bile duct and pancreatic bulb]. *Ann Radiol (Paris)* 1969; 12: 231-240
- 5 Tashiro S, Imaizumi T, Ohkawa H, Okada A, Katoh T, Kawaharada Y, Shimada H, Takamatsu H, Miyake H, Todani T. Pancreaticobiliary maljunction: retrospective and nationwide survey in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 345-351
- 6 Shimotake T, Iwai N, Yanagihara J, Inoue K, Fushiki S. Innervation patterns in congenital biliary dilatation. *Eur J Pediatr Surg* 1995; 5: 265-270
- 7 张春燕, 杨云生, 孙刚, 李闻, 令狐恩强, 蔡逢春, 杜红, 孟江云, 王向东. 先天性胆管扩张症132例临床研究. *中国实用内科杂志* 2009; 29: 544-545
- 8 Liu CL, Fan ST, Lo CM, Lam CM, Poon RT, Wong J. Choledochal cysts in adults. *Arch Surg* 2002; 137: 465-468
- 9 Lee KF, Lai EC, Lai PB. Adult choledochal cyst. *Asian J Surg* 2005; 28: 29-33
- 10 Chijiwa K, Tanaka M. Late complications after excisional operation in patients with choledochal cyst. *J Am Coll Surg* 1994; 179: 139-144
- 11 张中广, 曲修水, 于国庆, 田亚丽, 徐兆云. 胆总管囊肿切除后一种防返流的胆肠吻合术式. *中国临床医学* 2005; 12: 609-610
- 12 莫瑞祥, 胡虞乾. 成人胆管囊肿的诊断与治疗体会. *实用医学杂志* 2009; 25: 258-259
- 13 Hara H, Morita S, Ishibashi T, Sako S, Otani M, Tanigawa N. Surgical treatment for congenital biliary dilatation, with or without intrahepatic bile duct dilatation. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 638-641
- 14 李龙, 张金山. 胰胆合流异常与先天性胆总管囊肿病因的关系及治疗原则. *中国实用外科杂志* 2010; 5: 348-353
- 15 Mabrut JY, Bozio G, Hubert C, Gigot JF. Management of congenital bile duct cysts. *Dig Surg* 2010; 27: 12-18

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

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

## • 消息 •

## WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)*被Science Citation Index Expanded (SCIE)和MEDLINE等国际重要检索系统收录,在国际上享有较高声誉和影响力。*WJG*在PubMed Central (PMC)统计,单月独立IP地址访问58 257次,全文网络版(HTML Full Text)下载94 888次,全文PDF下载59 694次。另外根据基本科学指标库(essential science indicators)统计,2000-01-01/2010-12-31, SCIE检索的临床医学(clinical medicine)期刊有1 105种,总被引频次排名, *WJG*位于第174名。(2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)



# 慢性放射性肠炎并发肠梗阻的治疗

周创业, 周振理, 马军宏, 吕鹏

周创业, 天津医科大学研究生院 天津市 300070  
周振理, 马军宏, 吕鹏, 天津市南开医院第一外科 天津市 300100  
作者贡献分布: 本文写作由周创业完成; 病例收集及统计由周创业与吕鹏完成; 文章由周振理与马军宏审核。  
通讯作者: 周振理, 教授, 主任医师, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院第一外科. zhouwaiyike@163.com  
电话: 022-27435252 传真: 022-27435257  
收稿日期: 2011-07-30 修回日期: 2011-09-03  
接受日期: 2011-10-02 在线出版日期: 2011-10-08

## Management of chronic radiation enteritis with intestinal obstruction

Chuang-Ye Zhou, Zhen-Li Zhou, Jun-Hong Ma, Peng Lv

Chuang-Ye Zhou, Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300700, China  
Zhen-Li Zhou, Jun-Hong Ma, Peng Lv, Department of Surgery (Division I), Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China  
Correspondence to: Zhen-Li Zhou, Professor, Department of Surgery (Division I), Tianjin Nankai Hospital, 122 Sanwei Road, Nankai District, Tianjin 300100, China. zhouwaiyike@163.com  
Received: 2011-07-30 Revised: 2011-09-03  
Accepted: 2011-10-02 Published online: 2011-10-08

## Abstract

**AIM:** To evaluate the effect of various treatment methods for chronic radiation enteritis with concurrent intestinal obstruction.

**METHODS:** The clinical data for 21 patients with chronic radiation enteritis and intestinal obstruction was retrospectively analyzed.

**RESULTS:** Five of seven patients who received conservative treatment experienced relapse, and the cure rate was only 28.6%. Fourteen patients who underwent surgical treatment (of them ten patients underwent intestinal resection and anastomosis) had satisfactory outcome, and the cure rate was as high as 90.0%. One patient developed intestinal fistula, and re-operation confirmed that it was caused by residual radiation enteritis.

**CONCLUSION:** Surgical treatment is the best

way for treatment of chronic radiation enteritis with intestinal obstruction. All intestinal lesions should be surgically removed to avoid intestinal fistula.

**Key Words:** Chronic radiation enteritis; Intestinal obstruction; Surgical management

Zhou CY, Zhou ZL, Ma JH, Lv P. Management of chronic radiation enteritis with intestinal obstruction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2995-2998

## 摘要

**目的:** 探讨慢性放射性肠炎并发肠梗阻的治疗方法及其疗效。

**方法:** 回顾分析21例慢性放射性肠炎并发肠梗阻的临床资料, 对其进行总结。

**结果:** 7例保守治疗的病例中有5例复发, 治愈率仅(28.6%, 2/7), 保守治疗效果不佳。14例手术患者总体疗效满意。10例行肠切除吻合术的患者, 治愈率达(90.0%, 9/10), 可见手术治疗为慢性放射性肠炎并发肠梗阻的最佳方法。1例出现吻合口瘘的患者, 再次手术证实为第1次手术切除肠管过少, 残留病变肠管所致。

**结论:** 慢性放射性肠炎并发肠梗阻的最佳治疗方法为手术治疗, 手术方式应尽量行肠切除一期吻合术, 手术时应尽量切除全部病变肠管, 避免出现吻合口瘘。同时肠造口术或旁路手术也是必要术式, 应根据具体情况选择。

**关键词:** 慢性放射性肠炎; 肠梗阻; 外科手术

周创业, 周振理, 马军宏, 吕鹏. 慢性放射性肠炎并发肠梗阻的治疗. *世界华人消化杂志* 2011; 19(28): 2995-2998  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2995.asp>

## 0 引言

放射性肠炎(radiation enteritis, RE)是腹腔、盆腔或腹膜后恶性肿瘤经放射治疗后引起的肠道并发症, 可发生于肠道任何节段, 发生率为

## ■背景资料

近年来, 随着放疗技术的广泛开展及放化疗的联合应用, 放疗已成为恶性肿瘤综合治疗的一个重要部分, 并发症发生率也有增加趋势。慢性放射性肠炎的治疗方案仍存有争议。

## ■相关报道

Shiraishi等的回顾性研究发现, 肠切除手术的远期生存状况明显比短路手术好, 但切除的范围应尽量大, 这样可以保证吻合口两端肠管无明显放射性损伤, 避免出现肠瘘。

5%-17%<sup>[1]</sup>。近年来, 随着放疗技术的广泛开展及放化疗的联合应用<sup>[2]</sup>, 放疗已成为恶性肿瘤综合治疗的一个重要部分, 并发症发生率也有增加趋势<sup>[3]</sup>。慢性放射性肠炎的治疗方案仍存在争议<sup>[4]</sup>。慢性放射性肠炎在此基础上会出现严重的并发症, 其中最常见的并发症为肠梗阻。现将我院2004年-2010年收治的21例慢性放射性肠炎并发肠梗阻患者总结如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 慢性放射性肠炎并发肠梗阻患者21例, 男性6例, 女性15例, 男女之比2:5; 年龄(40-77)岁, 平均(47.3±11.7)岁。原发病: 直肠癌9例, 宫颈癌6例, 膀胱癌2例, 卵巢癌3例, 子宫内膜癌1例。所有患者术后均接受放射治疗, 开始放疗至发生慢性放射性肠炎并发肠梗阻的时间为9-132 mo, 平均(10.6±21.9) mo。所有行手术治疗的病例, 术后病理诊断均为慢性放射性肠炎。所有患者均在放疗后曾间断出现腹部绞痛、伴腹泻, 大便不成形症状。21例患者中完全性肠梗阻8例, 不完全性肠梗阻14例, 其中17患者均反复出现间歇性腹胀, 腹部隐痛, 时有排气排便不畅; 4例患者为首次发生肠梗阻, 入院前突发腹部胀痛, 停止排气排便, 伴恶心、呕吐; 4例伴有黏液脓血便。检查: 所有患者均行CT和X线检查提示: 部分肠壁增厚、僵硬, 肠管狭窄, 近端肠管不同程度扩张, 伴有气液平面。其中13例患者置入肠梗阻导管深部减压, 6例患者症状仍不能缓解, 经肠梗阻导管消化道造影: 自肠梗阻导管注入造影剂, 显示腹盆腔小肠肠管扩张, 多发气液平, 盆腔小肠造影剂通过受阻, 中下腹局部小肠管腔狭窄, 并略成角, 位置较固定。

### 1.2 方法

**1.2.1 保守治疗** 有7例患者行保守治疗后缓解。具体方案包括禁食、胃肠减压、补液、营养支持、抑制消化液分泌、中药复方大承气汤灌肠等基础治疗。5例在胃肠减压效果不佳后X引导下经鼻置入300 cm长的肠梗阻导管至梗阻上端, 持续负压引流使肠腔减压, 改善肠蠕动功能, 导管前端的充水球囊随肠蠕动带动导管不断向小肠远端移行, 直达回肠末端。置管后5-8(3.2±5.5) d, 腹痛腹胀症状缓解, 气液平消失, 肛门开始排气排便, 开始带管流质进食。

**1.2.2 手术治疗及手术方法** 14例患者术前均给予补液, 静脉营养支持治疗, 纠正水电解质及酸碱失衡, 调整营养状态。其中4例急症经鼻置

入肠梗阻导管, 术后肠梗阻导管引流量当日约2 500-4 500 mL。以后每日约1 000-2 000 mL, 给予肠道充分减压、复方大承气汤经肠梗阻导管注入、洗肠等综合治疗后曾有少量稀便, 无排气, 但肠梗阻仍未解除。其余10例均给予胃肠减压、石蜡油、中药胃管注入、肥皂水灌肠及穴位封闭等中西医结合非手术治疗, 其中2例在48-72 h梗阻症状加重, 遂置入经鼻型肠梗阻导管后稍缓解。经非手术治疗后, 14例患者肠梗阻仍未解除, 均行手术治疗。10例行肠切除一期吻合术, 2例行回肠升结肠侧侧捷径吻合术, 2例行病变肠段切除, 近端结肠造口术, 其中1例6-12 mo后行二期肠造口回纳术, 恢复肠道连续性, 1例行永久性造瘘术。

## 2 结果

术后病理显示: 部分肠管粘连、融合; 镜下示肠系膜小血管内皮增生, 管腔狭窄; 肠黏膜糜烂、黏膜、黏膜下水肿; 浆膜增厚, 纤维组织增生, 淤血及出血。

7例保守治疗的患者6例获得随访2-3年, 其中5例又间断出现肠梗阻复发, 3例最终行手术治疗。

行肠切除一期吻合术的患者有1(10%, 1/10)例出现吻合口瘘, 再次手术切除病变小肠范围超过20 cm, 后治愈。术后病理显示二次手术的肠管仍存在放射性病理改变, 考虑为第一次手术切除范围过小所致。14例手术的患者中11例(78.5%, 11/14)术后获随访2-3年, 有1例死于肿瘤复发转移。其余均存活至今, 无并发症出现, 肠功能改善良好, 效果满意, 1例造瘘口排便通畅。

## 3 讨论

放射性肠炎是盆腔、腹腔、腹膜后肿瘤经放射治疗引起的肠道并发症之一。一般发生于放疗结束后12-24 mo, 也可能在数十年后出现<sup>[5]</sup>, 为一个进行性的病理过程, 并且和放射剂量有关, 当剂量达65 Gy时, 发生率高达50%, 而这些剂量与常见肿瘤的治疗剂量十分接近<sup>[6]</sup>。其70%-90%发生在直肠, 25%-30%发生小肠。其发生率国外文献报道为5%-15%, 国内为2.7%-20.1%<sup>[7]</sup>。放射性肠炎分为急性和慢性。急性放射性肠炎多发生在放射治疗后数周, 一般能自行愈合, 如症状持续3 mo以上, 则为慢性放射性肠炎<sup>[8]</sup>。从病理生理学角度, 放射性肠炎可分为三个阶段<sup>[9]</sup>: (1) 急性放射性肠炎主要影响黏膜层。多发生于放

疗辐射期或辐射期后; (2)亚急性期则主要表现在黏膜下层. 起始于照射后2-12 mo; (3)慢性放射性肠炎则影响肠壁全层. 隐匿期可达数月至数年. 本研究中手术病例术后病理显示应为慢性放射性肠炎合并肠梗阻. 由于进行性血管炎导致小肠终末小动脉和小动脉闭塞, 小静脉因管腔被泡沫细胞和纤维斑阻塞而发生闭锁. 弹性纤维和蛋白原性血栓将更小的脉管阻塞, 这些病理变化最终导致肠管缺血, 使小肠黏膜萎缩变薄, 黏膜下层致密纤维化, 浆膜纤维化增厚, 小肠多处无规则粘连和萎缩狭窄.

慢性放射性肠炎患者最终有1/3将会发生各种外科并发症. 依次主要有: 肠梗阻, 肠痿, 肠穿孔, 肠出血<sup>[10]</sup>. 慢性放射性肠炎患者中约有三分之一的患者在病程中会因为放射性肠炎的外科并发症而需要手术治疗<sup>[11]</sup>, 肠梗阻是慢性放射性肠炎的主要手术指征. 慢性放射性肠炎合并肠梗阻的治疗方法包括保守治疗和手术治疗. 对于慢性放射性肠炎引起的不全性肠梗阻的患者可以考虑保守治疗, 经鼻肠减压管由于减压范围广、效果好, 在肠梗阻保守治疗中具有较好的应用价值<sup>[12]</sup>. 本组研究中, 有7例慢性放射性肠炎早期合并肠梗阻的患者, 经胃肠减压及X线下置入肠梗阻导管后梗阻均解除, 保守治疗后缓解. 但随访有5例出现复发, 3例最终手术治疗, 可见保守治疗并非慢性放射性肠炎合并肠梗阻的有效治疗方法. 当肠梗阻反复发作时, 首先要考虑外科手术治疗, 目的主要是解除梗阻, 恢复肠道的功能. 常用的术式包括病变肠切除一期吻合术及保留病变肠管的转流手术(旁路吻合术或肠造口术). 肠切除一期吻合术用于病变单一而局限的肠腔内狭窄引起的肠梗阻, 其优点是术后症状比较少, 但吻合口瘘发生率较高. 1999 Meissner<sup>[13]</sup>复习了41篇相关文献后认为, 如果条件允许, 切除病变肠管是最理想的手术方案, 其主要缺点是吻合口瘘的发生率达17%, 相关病死率达14%. 旁路手术多用于肠黏膜严重不易松解或姑息性处理受损肠段, 行小肠间或小肠-结肠侧侧吻合, 其优点是发生肠痿机会较少, 且不会干扰黏膜的肠襻, 但因手术为没有去除病变肠管. 因此存在病损肠管出血、穿孔、梗阻、感染及盲杆菌群易位的危险. 本研究中2例行回肠升结肠侧侧捷径吻合术, 患者吻合口均未发生破裂. 肠管侧侧吻合对肠管的血供破坏更小, 这很可能是2例患者术后未发生吻合口破裂的原因之一. 肠造口术对患者创伤

小, 还可以避免吻合口瘘, 但由于不符合肠道生理学要求, 术后患者生活质量较差. 近年来随着围手术期营养支持的发展、手术技巧改进、吻合器的应用和术后监护水平的提高, 放射性肠炎术后发生吻合口瘘的发病率明显降低. Onodra等<sup>[14]</sup>研究了39例放射性肠炎并发肠梗阻的患者, 其中有32例患者行肠切除吻合术, 无1例出现吻合口瘘.

放射性肠炎并发肠梗阻的手术方式应根据患者的病变情况及营养状况确定. 患者营养状况较好, 肠管黏膜不严重时, 可以首选肠切除一期吻合术. Shiraishi<sup>[15]</sup>等的回顾性研究发现, 肠切除手术的远期生存状况明显比短路手术好. 但切除的范围应尽量大, 这样可以保证吻合口两端肠管无明显放射性损伤, 避免出现肠痿. 本研究中1例出现肠痿的患者, 分析原因可能因为术中切除肠管过短, 吻合口处仍存在放射性病理改变, 二次手术病理也证实了这种假设. 患者营养状况较差, 无法耐受较大的手术, 肠管与周围组织黏膜致密时, 可选择肠造口术或旁路手术. 由于肠管的放射性损伤是慢性发展的过程, 简单肠黏膜松解后病变肠管并未解除, 因此肠黏膜松解术一般不做为常规术式.

对于慢性放射性肠炎所致肠梗阻, 需考虑一下问题: (1)患者通常为肿瘤患者, 术前检查应详尽细致, 必须辨明肠梗阻是否为肿瘤复发、转移所致; (2)术前应常规放置肠梗阻导管行梗阻近端肠道减压, 纠正患者长时间梗阻造成的大量液体丢失, 氮的负平衡和内环境紊乱, 促使扩张的肠管回缩至正常生理状态; 减轻肠壁水肿; (3)慢性放射性肠炎是个渐进加重的过程, 手术时机宜选择肠管病变稳定之后, 否则, 即使术后短期效果良好, 远期仍可能再发肠梗阻; (4)放射导致的闭塞性血管内膜炎和间质纤维化使肠管易受损伤, 愈合能力差, 微小的损伤即可致瘘, 且难愈合. 所以手术应切除全部病变肠管, 避免导致吻合口瘘; (5)术前及围手术的营养支持至关重要. 不仅可以改善患者的营养状况和免疫功能, 增强患者对手术的耐受力, 减少术后并发症的发生, 同时可减少消化液分泌, 缓解腹痛、腹泻等临床症状. 另外谷氨酰胺是肠黏膜细胞的特异性营养物质, 可以起到肠黏膜的再生及维护肠屏障的作用, 从而最大程度减少肠痿的发生率<sup>[6]</sup>.

总之, 慢性放射性肠炎并发肠梗阻, 在首次出现肠梗阻时可选择保守治疗, 在保守治疗无

#### ■应用要点

慢性放射性肠炎并发肠梗阻, 在首次出现肠梗阻时可选择保守治疗, 在保守治疗无效的情况下应积极采取手术治疗, 手术方式应尽量行肠切除一期吻合术, 在保证不出现短肠综合征的前提下, 必要时可预防性的扩大切除范围, 避免吻合部位残留病变肠管出现吻合口瘘.



## ■同行评价

本文结论对临床治疗有一定的参考价值,值得借鉴.

效的情况下应积极采取手术治疗,手术方式应尽量行肠切除一期吻合术,在保证不出现短肠综合征的前提下,必要时可预防性的扩大切除范围,避免吻合部位残留病变肠管出现吻合口瘘.另外肠造口术或旁路手术也是必要术式,应根据具体情况选择.

## 4 参考文献

- 1 董凯,毕伟.放射性肠炎并发肠梗阻的外科治疗.中国临床实用医学 2008; 2: 35-36
- 2 Nguyen NP, Antoine JE, Dutta S, Karlsson U, Sallah S. Current concepts in radiation enteritis and implications for future clinical trials. *Cancer* 2002; 95: 1151-1163
- 3 Havlik E, Pirich C, Preitfellner J, Karanikas G, Schaffarich P, Hefner A, Sinzinger H. Radiation exposure from patients treated with <sup>165</sup>Dy-ferric hydroxide. *Nucl Med Commun* 2001; 22: 79-82
- 4 Onodera H, Nagayama S, Mori A, Fujimoto A, Tachibana T, Yonenaga y. Reappraisal of surgical treatment for radiation enteritis. *World J Surg* 2005; 29: 456-463
- 5 李宁.放射性肠炎的病程和外科治疗.中国实用外科杂志 2004; 24: 385-389
- 6 沈历宗,华一兵,吴文溪,王国梁,陈国玉.慢性放射

性肠炎外科治疗探讨.中国实用外科杂志 2004; 24: 490-492

- 7 李宁,朱维铭,任建安,李元新,赵允召,江志伟,李幼生,黎介寿.慢性放射性肠炎的外科治疗.中华外科杂志 2006; 44: 23-26
- 8 李宁.放射性肠炎.中国实用外科杂志 2001; 21: 712-714
- 9 吴孟超,仲剑平.外科学新理论与新技术.第1版.上海:上海科技教育出版社,1996: 265-269
- 10 汪华媛,华海清.放射性肠炎的中西医治疗研究进展.现代肿瘤医学 2009; 17: 591-593
- 11 Regimbeau JM, Panis Y, Gouzi JL, Fagniez PL. Operative and long term results after surgery for chronic radiation enteritis. *Am J Surg* 2001; 182: 237-242
- 12 姚宏伟,傅卫,袁炯,张同琳.经鼻肠减压管在治疗急性粘连性小肠梗阻中的作用研究.中华普通外科杂志 2006; 21: 754-755
- 13 Meissner K. Late radiogenic small bowel damage: guidelines for the general surgeon. *Dig Surg* 1999; 16: 169-174
- 14 Onodera H, Nagayama S, Mori A, Fujimoto A, Tachibana T, Yonenaga Y. Reappraisal of surgical treatment for radiation enteritis. *World J Surg* 2005; 29: 459-463
- 15 Shiraishi M, Hiroyasu S, Ishimine T, Shimabuku M, Kusano T, Hiqashi M, Muto Y. Radiation enterocolitis: overview of the past 15 years. *World J Surg* 1998; 22: 491-493

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

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

# 成人肝脏未分化胚胎性肉瘤1例

郭威, 陈谦, 喻亚群

郭威, 陈谦, 喻亚群, 桂林医学院附属医院肝胆外科 广西壮族自治区桂林市 541001

作者贡献分布: 此课题的数据整理及相关文献查找由郭威与喻亚群完成, 论文写作由郭威完成, 审校由陈谦完成.

通讯作者: 陈谦, 教授, 541001, 广西壮族自治区桂林市乐群路15号, 桂林医学院附属医院肝胆外科. qianchen98@yahoo.com  
收稿日期: 2011-07-29 修回日期: 2011-09-21

接受日期: 2011-10-01 在线出版日期: 2011-10-08

## Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver in adult: a case report

Wei Guo, Qian Chen, Ya-Qun Yu

Wei Guo, Qian Chen, Ya-Qun Yu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Qian Chen, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 15 Lequn Road 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. qianchen98@yahoo.com

Received: 2011-07-29 Revised: 2011-09-21

Accepted: 2011-10-01 Published online: 2011-10-08

## Abstract

Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver (UESL) is a rare disease that is easily misdiagnosed. Advances in diagnostic imaging and hepatic surgical technique have increased the detection rate of this disease. Here we report a case of UESL in adult and review the relevant literature focusing on the diagnosis and treatment of this rare disease.

**Key Words:** Undifferentiated embryonal sarcoma; Liver; Adult

Guo W, Chen Q, Yu YQ. Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver in adult: a case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(28): 2999-3001

## 摘要

成人肝脏未分化胚胎性肉瘤, 临床极其罕见, 容易误诊. 随着影像诊断及肝脏外科的迅速发展, 对其发现可能会有所增加, 作者就经治的1例此病并复习文献加以讨论, 以提高对本病的诊治.

**关键词:** 未分化胚胎性肉瘤; 肝脏; 成人

郭威, 陈谦, 喻亚群. 成人肝脏未分化胚胎性肉瘤1例. 世界华人消化杂志 2011; 19(28): 2999-3001

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2999.asp>

## 0 引言

肝脏未分化胚胎性肉瘤(undifferentiated embryonal sarcoma of liver, UESL)是1978年由Stocher和Ishak首先报道并命名, 又名肝脏间叶性恶性肿瘤, 之前有学者称之为恶性间叶瘤(malignant mesenchymoma of liver)或纤维粘液肉瘤(fibromyxoid sarcoma). 本病是一种少见的肝脏恶性肿瘤, 好发于6-10岁儿童, 成人极其罕见, 性别无明显差异<sup>[1]</sup>.

## 1 病例报告

男, 59岁, 因“体检发现肝脏占位8 d”于2011-06-28入我院治疗. 无腹痛、寒战、高热等不适, 大小便正常, 体重无明显减轻. 既往“乙肝病史10余年”余无特殊. 查体: 皮肤巩膜无黄染, 可见肝掌, 颈部及前胸可见数枚蜘蛛痣, 腹平坦, 无压痛及反跳痛, 肝脾肋缘下未触及, 胆囊触诊(-), murphy征(-), 余无特殊. 实验室检查: ALT, AST轻度升高, 乙肝小三阳, CEA、CA199、AFP均正常. B超提示: 肝左外叶囊性占位性病变, 内可见血流, 结合病史考虑HCC可能性大. CT提示: 肝左外叶囊实性占位性病变, 大小约7 cm×5 cm, 增强实性病变及分隔明显强化, 内容物未见强化, 静脉期强化减弱. 腹膜后未见肿大淋巴结. 考虑HCC可能性较大. 见图2. 临床诊断: 左肝占位性病变(肝囊肿? 肝细胞癌?)

患者于2011-07-01在全麻下行肝左外叶(II、III段)切除术, 术中见肝左外叶大小约8 cm×6 cm实质性肿块, 质硬, 边界尚清, 包膜较完整. 切面呈鱼肉状. 术后病检提示: (肝左外叶肿物)间叶组织源性恶性肿瘤, 具体分型: 符合未分化肉瘤. CK(-)、Vim(+), HepPar-1(-)、CK8(-)、CK18(-)、CK19(-)、CD34(-)、Actin(-)、Syn(-),

## ■背景资料

肝脏未分化胚胎性肉瘤最常见于儿童, 成人极其罕见, 临床表现多无特异性, 儿童患者多以可触及腹部包块而就诊可伴有或不伴有腹痛<sup>[2]</sup>, 有一些患者是以一些不典型的胃肠道症状或体征, 比如体重减轻, 恶心或食欲减退, 呕吐, 黄疸, 腹泻以及发热等而就诊, 多无明显特异性.

## ■同行评议者

唐南洪, 教授, 福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

### ■应用要点

采用手术切除加化疗的综合治疗,可使肝未分化胚胎性肉瘤患者5年生存率提高到15%。

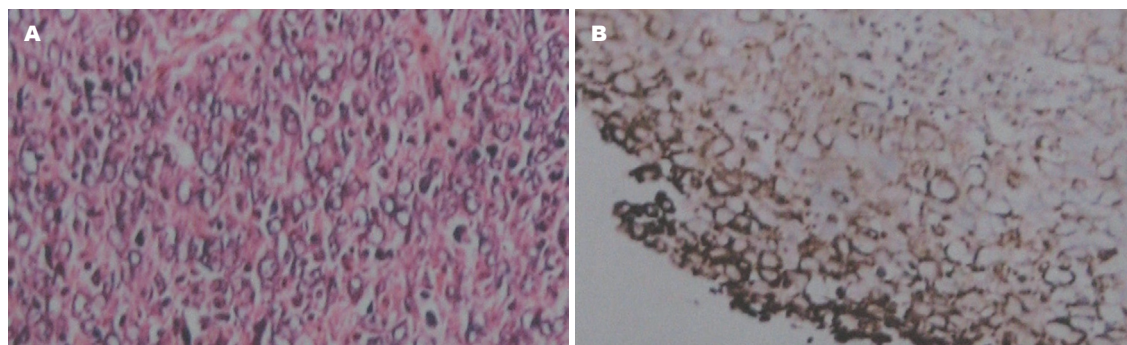


图1 UESL组织HE染色及Vim的表达。A: 20×10 HE; B: 20×10免疫组织化学 Vim。

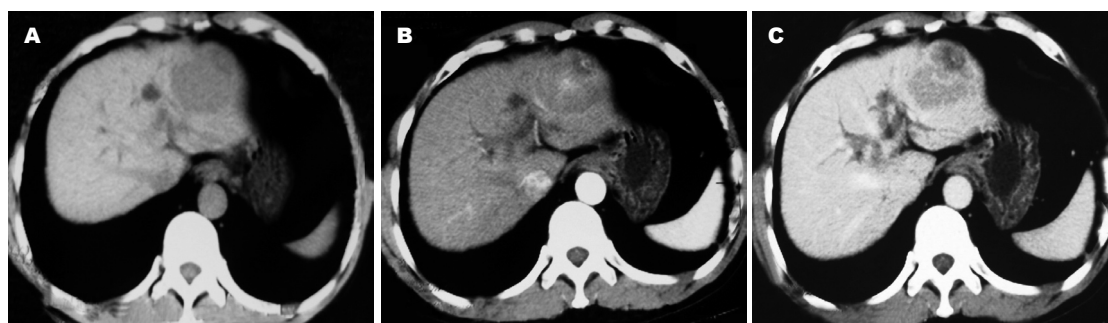


图2 肝未分化胚胎源性肉瘤CT三期扫描。A: 平扫期; B: 动脉期; C: 静脉期。

见图1。肝切缘无肿瘤残留。术后给予抗炎、护肝、抗肿瘤等对症治疗,术后12 d出院。

## 2 讨论

UESL最常见于儿童,成人极其罕见,临床表现多无特异性,儿童患者多以可触及腹部包块而就诊可伴有或不伴有腹痛<sup>[2]</sup>,有一些患者是以一些不典型的胃肠道症状或体征,比如体质量减轻,恶心或食欲减退,呕吐,黄疸,腹泻以及发热等而就诊<sup>[3]</sup>,多无明显特异性。通过对文献复习我们可以得知,UESL与肝炎和肝硬化无关,并且肝功能及肿瘤标志物如AFP, CEA, CA19-9大多数情况下是正常的,影像学提示肿瘤多位于右叶,且多为单发,直径为10-30 cm。多呈囊性或囊实混合性不均质低密度包块,CT增强扫描强化方式多样<sup>[4]</sup>,但UESL总体上仍被认为是少血供肿瘤。肿块多呈圆形或类圆形,边界较清,多数文献报道病灶边缘可见较完整的包膜存在。

肉眼观,UESL多为一巨大,实性的,边界较清的肿块,切面呈灰白或暗红色,多伴有出血、坏死及囊性变。镜下显示肿瘤细胞呈束状、编制状或弥漫分布,可见细胞稀疏区与致密区交替排列。核分裂像多见,并可出现多核巨细胞,间质为丰富的粘液样基质,内含薄壁血管。最具特征性的是瘤细胞胞质内或细胞外基质中可见

PAS阳性的嗜酸性球形小体。免疫组化提示Vim和I型胶原呈阳性反应,而上皮性、肌源性、组织细胞源性、神经组织源性标志抗体呈阴性反应。

本病的术前诊断非常困难,确诊需依靠病理学检查。如不能确定可行免疫组织化学和电镜检查。多需与以下几种肝脏肿瘤相鉴别:恶性纤维组织细胞瘤,肉瘤样肝细胞肝癌,肝脏血管肉瘤,本例患者由于合并乙肝,术前极易误诊为肝细胞性肝癌,在良性囊性占位中,最易与UESL混淆的是肝间叶性错构瘤、肝包虫病和肝囊肿。

由于本病恶性程度极高,生长迅速,常发生远处转移,尤以肺转移最为常见。手术切除是最有效的治疗方法,因本病多不伴有肝硬化且多为单发,有包膜,故即使肿瘤已占据三叶,只要肝功能正常,均应手术探查,肿瘤过大不应作为手术禁忌证<sup>[5]</sup>。对术后复发及无法切除的肿瘤只要肝功能正常可先行介入治疗及放疗,使肿瘤缩小后再手术切除。大部分未治疗的患者生存时间不足1年<sup>[7]</sup>。采用手术切除加化疗的综合治疗,可使UESL患者5年生存率提高到15%<sup>[6]</sup>。Bisogno等报道一组病例,其中12例儿童肝未分化肉瘤患者经综合治疗后,生存期达2.4-20年<sup>[7]</sup>。由此可以看出,手术切除是首选,手术结合术后综合治疗是提高患者生存时间及生存率的关键。



### 3 参考文献

- 1 Stocker JT, Ishak KG. Undifferentiated (embryonal) sarcoma of the liver: report of 31 cases. *Cancer* 1978; 42: 336-348
- 2 Baron PW, Majlessipour F, Bedros AA, Zuppan CW, Ben-Youssef R, Yanni G, Ojogho ON, Concepcion W. Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver successfully treated with chemotherapy and liver resection. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 73-75
- 3 Pachera S, Nishio H, Takahashi Y, Yokoyama Y, Oda K, Ebata T, Igami T, Nagino M. Undifferentiated embryonal sarcoma of the liver: case report and literature survey. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15: 536-544
- 4 杨炼, 陈立波, 潘华雄. 成人肝脏未分化(胚胎性)肉瘤的临床表现和CT诊断. *放射学实践* 2008; 23: 1325-1328
- 5 Tang ZY. Primary liver Cancer. Berlin: Springer-Verlag; Beijing; China Academic Publishers, 1989: 435-436
- 6 从文铭, 谭璐, 张树辉, 宁洪艳, 朱忠政, 潘晶, 吴孟超. 肝脏少见原发性间叶肿瘤101例的临床病理研究. *第二军医大学学报* 2003; 24: 369-372
- 7 Bisogno G, Pilz T, Perilongo G, Ferrari A, Harms D, Ninfo V, Treuner J, Carli M. Undifferentiated sarcoma of the liver in childhood: a curable disease. *Cancer* 2002; 94: 252-257

### ■同行评价

本文的文献复习较完整, 对临床医师有一定的参考价值.

编辑 何基才 电编 闫晋利

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

### • 消息 •

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

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

# 《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCES权威、核心期刊排行榜与指南》和

中国知识资源总库收录。2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}$ /L, WBC数用 $1 \times 10^9$ /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.



《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) $t$ 检验用小写 $t$ ; (2) $F$ 检验用英文大写 $F$ ; (3)卡方检验用希腊文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希腊文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写 $n$ ; (7)概率用英文斜体大写 $P$ . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 统计学显著性用 $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.01$ ; 第三套为 $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg  $\pm$  0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm  $\pm$  0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq \text{分母} \leq 1000$ , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

### 3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用:  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP<0.05$ ,  $^dP<0.01$ ; 第3套为 $^eP<0.05$ ,  $^fP<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

## 6 修回稿须知

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

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

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



## 2011年国内国际会议预告

2011-08-20/22

第十五次全国中西医结合儿科学术会议

会议地点: 兰州市

联系方式: zxyek@sina.com

2011-08-26/27

第四届福瑞肝纤维化论坛

会议地点: 上海市

联系方式: bstract@cosoman.com

2011-08-31/09-02

腹腔间室综合征的护理进展

会议地点: 延吉市

联系方式: qiyan68@126.com

2011-09

中华医学会超声医学分会第十一次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: <http://www.nccsum.org/>

2011-09-14/17

第六届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 兰州市

联系方式: office@cnsld.org

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会

会议地点: 福州市

联系方式: 010-67726451

2011-09-16/18

第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会

会议地点: 济南市

联系方式: xiaohuahuiyi@126.com

2011-09-24

2011中国消化病学大会

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-09-25/26

2011北京消化内镜节

会议地点: 北京市

联系方式: 010-51292005-105

2011-10-07/09

第八届亚太肝病学会主题会议

会议地点: 北京市

联系方式: info@apaslstc.org

2011-10-13/16

2011年亚太地区国际肿瘤生物学和医学学术会议

会议地点: 上海市

联系方式: clinimmunchina@yahoo.com

2011-10-14/16

中华医学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国

热带病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: www.nccsid.org

2011-10-21/23

中华医学会病理学分会第十七次学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: leighdai@cma.org.cn

2011-10-22/26

第19届欧洲肠胃病学联合组织(UEG)会议周

会议地点: 斯德哥尔摩

联系方式: uegw2011@cpo-hanser.de

2011-10-28/11-02

2011美国胃肠病学会年度科学会议

会议地点: 华盛顿

联系方式: annualmeeting@acg.gi.org

2011-11-04/08

第62届美国肝病研究学会(AASLD)年会

会议地点: 旧金山

联系方式: medical\_conference@263.net

2011-11-18/23

第十一届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2011全

国内镜/介入/放疗新技术国际论坛

会议地点: 北京市

联系方式: doctor302@163.com

2011-11-25/27

2011年全国消化道静脉曲张及其伴发消化疾病内镜诊治研讨会

会议地点: 西安市

联系方式: 2011varices@sina.com

2011-12-08/11

第11次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: csgdabstract@126.com

2011-12-09/11

江苏省第四次胃肠外科学术会议

会议地点: 南京市

联系方式: jswcwk@yahoo.com.cn

## 志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

江米足 教授

浙江大学医学院附属儿童医院儿科

冯志杰 主任医师

河北医科大学第二医院消化内科

张必翔 主任医师

华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科

吕宾 教授

浙江中医学院附属医院消化科

汪思应 教授

安徽医科大学实验动物中心

李淑德 主任医师

中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

樊红 教授

东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

杜奕奇 副教授

中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

刘连新 教授

哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科三病房

刘改芳 主任医师

河北医科大学第三医院消化内科

刘海林 主任医师

上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

黄颖秋 教授

本溪钢铁有限责任公司总医院消化内科

倪润洲 教授

南通大学附属医院消化内科

王姬兰 教授

齐重庆医科大学基础医学院病理教研室

李瑜元 教授

广州市第一人民医院内科

葛海燕 教授

同济大学附属东方医院普通外科

何晓顺 教授

中山大学附属第一医院器官移植科

牛英才 副研究员

齐齐哈尔医学院医药科学研究所

李康 副教授

广东药学院药科学院药物分析教研室

王振宁 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

宣世英 教授

山东省青岛市市立医院肝病内科

殷正丰 教授

中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

沈琳 主任医师

北京大学临床肿瘤医院消化内科

邱伟华 副主任医师

上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

齐清会 教授

北京协和医院肝外科

王德盛 副教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

李军祥 教授

北京中医药大学附属东方医院消化内科

袁红霞 教授

天津中医药大学消化科

姜相君 主任医师

青岛市市立医院消化科