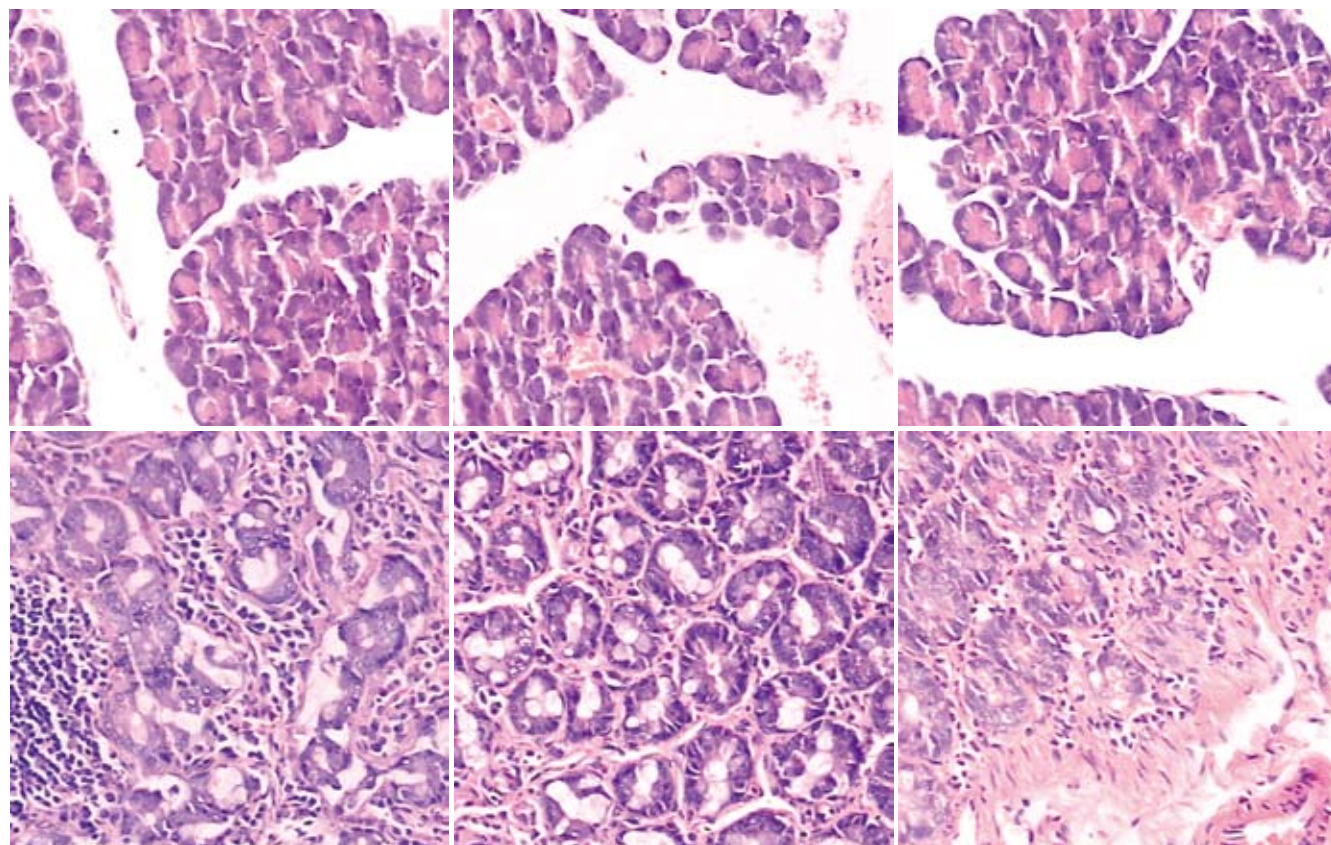


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年9月28日 第17卷 第27期 (Volume 17 Number 27)



27/2009

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
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
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
郭晓钟教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授

马欣主任医师
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
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
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
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师
消化外科学
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
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗副教授

李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
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
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
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
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
汤恢焕教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

王振宁教授	高泽立副教授	沈洪教授	消化中西医结合学	消化病理学
王正康教授	龚国忠教授	唐志鹏研究员	唐文富副教授	杜祥教授
王志刚副主任医师	管世鹤副教授	王富春教授	王学美研究员	李淳副教授
王忠裕教授	何生松教授	王新月教授	魏睦新教授	刘丽江教授
吴河水教授	胡国信副主任医师	谢鸣教授	张春虎副教授	刘勇钢副主任医师
吴健雄教授	林菊生教授	徐列明教授		马大烈教授
吴金术教授	刘正稳教授	许玲副教授	消化基础研究	潘兴华副主任医师
吴泰璜教授	貌盼勇研究员	张声生教授	曹洁副教授	王鲁平主任医师
吴志勇教授	宁琴教授		曹鹏副研究员	王娅兰教授
谢敏主任医师	钱林学主任医师	消化肿瘤学	樊红副教授	魏蕾教授
谢晓华副教授	孙殿兴主任医师	曹秀峰主任医师	高春芳研究员	颜宏利副教授
邢光明教授	谭德明教授	曹志成院士	高国全教授	于颖彦教授
徐大华主任医师	汤华研究员	陈公琰主任医师	高英堂研究员	余宏宇教授
徐迅迪副主任医师	唐霓副研究员	李璦教授	管冬元副教授	张锦生教授
徐泱副主任医师	唐晓鹏教授	刘宝瑞教授	胡旭初副教授	赵景民教授
许戈良教授	王凯教授	刘彬彬副研究员	黄文林教授	朱亮副教授
严律南教授	王怡主任医师	刘云鹏教授	李刚教授	
杨柏霖副主任医师	魏来教授	沈克平主任医师	李杰副教授	
杨家和主任医师	吴建国教授	肖文华主任医师	李永哲副研究员	
杨秋蒙副主任医师	吴君主任医师	熊斌教授	李增山副教授	
杨维良教授	宣世英教授	张凤春教授	刘克辛教授	
伊力亚尔·夏合丁教授	杨江华副主任医师		梅林教授	
殷正丰教授	杨林副研究员	消化影像学	钱睿哲教授	
于聪慧教授	姚鹏副教授	白彬主任医师	任超世研究员	
于则利教授	张继明教授	陈克敏教授	任浩副教授	
郁宝铭教授	张明辉副主任医师	官泳松教授	台桂香教授	
元云飞教授	张占卿主任医师	韩新巍教授	谭学瑞教授	
张佳林教授	赵桂鸣主任医师	李健丁教授	田颖刚副研究员	
张进祥副教授	赵连三教授	龙学颖副主任医师	汪思应教授	
张俊副研究员	周霞秋教授	倪才方教授	吴军研究员	
张群华教授	朱传武主任医师	魏经国教授	吴俊华副教授	
张水军教授	庄林主任医师	肖恩华教授	徐宁志研究员	
张宗明教授		徐爱民副教授	许文燮教授	
周伟平教授	消化中医药学	徐克教授	姚登福教授	
邹小明教授	蔡淦教授	扬业发教授	阴赅宏研究员	
消化感染病学	陈治水主任医师	杨建勇教授	郁卫东副研究员	
陈国凤主任医师	杜群副研究员	赵卫主任医师	喻荣彬副教授	
陈红松研究员	黄恒青主任医师		张青云研究员	
陈建杰教授	李军祥教授	消化内镜及介入治疗学	张学教授	
陈仕珠主任医师	李康副教授	丁佑铭教授	赵平副教授	
陈志辉副主任医师	李勇副教授	郝俊鸣副主任医师	周南进研究员	
党双锁教授	李振华教授	潘林娜教授	周士胜教授	
丁惠国教授	刘成海研究员	孙明军教授	周素芳教授	
范建高教授	刘孟安教授	万军教授	周晓东研究员	
范小玲主任医师	刘平教授	吴硕东教授	周晓武副主任医师	
高润平教授	刘绍能主任医师	袁友红副教授		

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009 年 9 月 28 日 第 17 卷 第 27 期 (总第287期)

述 评

2757 胰腺癌基因治疗的研究现状
周国雄, 秦金丹, 张海峰, 黄介飞

基 础 研 究

2762 RNA干扰HIF-1 α 对食管癌细胞株TE13的生物学特性的影响
金海林, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波

2767 三叶因子2相互作用蛋白基因在胃癌细胞cDNA文库中的筛选
詹晓娟, 任建林, 许鸿志, 董菁, 周飞, 潘金水, 肖鸿敏

2773 拆方益肝康不同药物血清对肝星状细胞胶原代谢及TGF- β 1的影响
房澍名, 姚冬梅, 张晓岚, 姚希贤

2778 芦荟大黄素和吡嗪酮联合治疗对血吸虫肝纤维化小鼠TGF- β /Smad通路的影响
吴艳艳, 何生松, 邓敏

2784 丹红注射液对重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织ET-1、eNOS和iNOS基因表达的影响
范辉, 胡雅兵, 王小红, 沈云志

临 床 研 究

2791 Hep Par 1、CD34及Cytokeratin在血清AFP阴性肝细胞癌诊断中的应用
张婷, 陈旭东, 何松, 王旗春

文 献 综 述

2798 肝病患者肠黏膜屏障功能的变化及谷氨酰胺干预的研究进展
宋怀宇, 杨建荣

2803 细胞凋亡在肝移植免疫耐受中的研究进展
冯继峰, 刘静

2811 原发性胆囊癌基因研究现状
汪斌, 丁佑铭

研 究 快 报

2821 去氨微乳的结肠定向除氨作用
王爱红, 段志军, 田舸, 张文君, 贺高红

2825 大承气汤动物含药血清对Cajal间质细胞三磷酸肌醇受体表达的影响
张栋梁, 齐清会, 李毅, 周丽

2830 贵州省幽门螺杆菌临床菌株的分离培养
胡林, 刘苓, 谭庆华, 周力, 陈峥宏, 刘娅琳

临 床 经 验

2835 胃食管反流病患者食管上皮Occludin的表达及细胞间隙的改变
徐兆军, 张振玉, 黄文斌, 王劲松, 姜宗丹, 罗新华

2840 乙型肝炎病毒大S蛋白基因纵向研究方法及应用
余南, 崔进, 周国宝, 张云娇, 陈晶砾

2846 恩替卡韦对核苷初治HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者的疗效
张权, 程明亮, 刘琴, 穆茂, 张影影, 刘碧芸

2850 肝硬化患者骨密度的改变
付蕾, 周力, 陈晓琴

	2854 SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学实验数据库对结直肠癌血清标志物的鉴定 蔡建, 高春芳, 范乃军, 盛新华, 赵光, 王秀丽
病例报告	2859 重症急性胰腺炎合并G6PD缺乏症1例 胡杨, 陈敏, 杨锦林
致 谢	2862 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2761 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2766 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2790 《世界华人消化杂志》正文要求 2797 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 2820 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2824 中国科技期刊引证报告(核心版)发布《世界华人消化杂志》2007年影响因子0.568 2829 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2839 《世界华人消化杂志》标点符号用法 2845 《世界华人消化杂志》名词术语标准 2849 《世界华人消化杂志》计量单位标准 2853 《世界华人消化杂志》栏目设置 2858 WJG成功通过评审被PMC收录 2861 《世界华人消化杂志》中文摘要要求
封面故事	范辉, 胡雅兵, 王小红, 沈云志. 丹红注射液对重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织ET-1、eNOS和iNOS基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2784-2790 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2784.asp
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李瑞敏; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</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 2009-09-28 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 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 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>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</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(http://wcjd.wjgnet.com), 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>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p> <p>2009年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</p>	<p>邮发代号 82-262</p>	<p>国外代号 M 4481</p> <p>国内定价 每期24.00元 全年864.00元</p> <p>广告经营许可证 1401004000050</p>

World Chinese Journal of Digestology

September 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 27

EDITORIAL	2757 Recent advances in gene therapy for human pancreatic cancer <i>Zhou GX, Qin JD, Zhang HF, Huang JF</i>
BASIC RESEARCH	<p>2762 RNA interference-mediated downregulation of hypoxia-inducible factor-1α attenuates the proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma TE13 cells <i>Jin HL, Shi RH, Zhu H, Ling TS, Hao B</i></p> <p>2767 Identification of genes encoding human trefoil factor 2-interacting proteins by screening a cDNA library of gastric cancer cells <i>Zhan XJ, Ren JL, Xu HZ, Dong J, Zhou F, Pan JS, Xiao HM</i></p> <p>2773 Seropharmacological effects of Yigankang Decoction and its separated recipe on collagen metabolism and transforming growth factor-beta 1 expression in hepatic stellate cells <i>Fang SM, Yao DM, Zhang XL, Yao XY</i></p> <p>2778 Effects of combined use of aloeemodin and praziquantel on the transforming growth factor-β/Smad pathway in mice with schistosomiasis-induced liver fibrosis <i>Wu YY, He SS, Deng M</i></p> <p>2784 Effects of Danhong Injection on the expression of endothelin-1, endothelial nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase mRNAs in the pancreas in rats with severe acute pancreatitis <i>Fan H, Hu YB, Wang XH, Shen YZ</i></p>
CLINICAL RESEARCH	2791 Significance of hepatocyte paraffin-1, cluster of differentiation 34 and cytokeratin expression in the diagnosis of alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma <i>Zhang T, Chen XD, He S, Wang QC</i>
REVIEW	<p>2798 Changes in intestinal mucosal barrier function in patients with liver diseases: effect of glutamine intervention <i>Song HY, Yang JR</i></p> <p>2803 Recent advances in understanding the role of apoptosis in induction of immune tolerance in liver transplantation <i>Feng JF, Liu J</i></p> <p>2811 Advances in research of primary gallbladder carcinoma at the genetic level <i>Wang B, Ding YM</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>2821 Targeted removal of ammonia from the colon using ammonia-removing microemulsion <i>Wang AH, Duan ZJ, Tian G, Zhang WJ, He GH</i></p> <p>2825 Serum from rats medicated with Dachengqitang significantly enhances the expression of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor mRNA in interstitial cells of Cajal in rat jejunum <i>Zhang DL, Qi QH, Li Y, Zhou L</i></p> <p>2830 Isolation and culture of clinical strains of <i>Helicobacter pylori</i> from patients in Guizhou Province <i>Hu L, Liu L, Tan QH, Zhou L, Chen ZH, Liu YL</i></p>
CLINICAL PRACTICE	2835 Expression of tight junction protein occludin and changes in intercellular space in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease <i>Xu ZJ, Zhang ZY, Huang WB, Wang JS, Jiang ZD, Luo XH</i>

	<p>2840 Variations in the large surface protein gene of hepatitis B virus <i>in vivo</i>: a longitudinal study and application <i>Yu N, Cui J, Zhou GB, Zhang YJ, Chen JL</i></p> <p>2846 Efficacy of entecavir in nucleoside-naïve patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B <i>Zhang Q, Cheng ML, Liu Q, Mu M, Zhang YY, Liu BY</i></p> <p>2850 Changes in bone mineral density in patients with liver cirrhosis <i>Fu L, Zhou L, Chen XQ</i></p> <p>2854 Combined use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and empirical proteomic ontology knowledge base for identification of serum biomarkers for colorectal cancer <i>Cai J, Gao CF, Fan NJ, Sheng XH, Zhao G, Wang XL</i></p>
CASE REPORT	<p>2859 Treatment of severe acute pancreatitis with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a report of one case <i>Hu Y, Chen M, Yang JL</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>2862 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Fan H, Hu YB, Wang XH, Shen YZ.</i> Effects of Danhong Injection on the expression of endothelin-1, endothelial nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase mRNAs in the pancreas in rats with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(27): 2784-2790 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2784.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Rui-Min Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date September 28, 2009

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

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

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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com
<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: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION
RMB 24 Yuan for each issue
RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2009 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. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

胰腺癌基因治疗的研究现状

周国雄, 秦金丹, 张海峰, 黄介飞

周国雄, 秦金丹, 张海峰, 黄介飞, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

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

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2004049

江苏省卫生厅重大课题基金资助项目, No. K200602

作者贡献分布: 本文写作由周国雄与秦金丹完成, 秦金丹、张海峰及黄介飞负责收集资料.

通讯作者: 周国雄, 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. zhoughuoxiong@medmail.com.cn

电话: 0513-81161826

收稿日期: 2009-09-16 修回日期: 2009-09-20

接受日期: 2009-09-22 在线出版日期: 2009-09-28

Recent advances in gene therapy for human pancreatic cancer

Guo-Xiong Zhou, Jin-Dan Qin, Hai-Feng Zhang, Jie-Fei Huang

Guo-Xiong Zhou, Jin-Dan Qin, Hai-Feng Zhang, Jie-Fei Huang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2004049; and the Major Program of Health Department of Jiangsu Province, No. K200602

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

Received: 2009-09-16 Revised: 2009-09-20

Accepted: 2009-09-22 Published online: 2009-09-28

Abstract

Gene therapy is an innovative approach for the treatment of pancreatic cancer and has attracted wide attention in recent years. Many gene therapy drugs for pancreatic cancer have now entered clinical trials. The gene therapy techniques for pancreatic cancer include antisense gene therapy, suicide gene therapy, immune gene therapy, and oncolytic virus therapy. In this article, we will review recent advances in gene therapy for pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Gene therapy; Recent advances

Zhou GX, Qin JD, Zhang HF, Huang JF. Recent advances in gene therapy for human pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2757-2761

摘要

胰腺癌的基因治疗作为一种新的治疗手段, 近年来备受关注, 其很多研究已进入临床阶段. 胰腺癌基因治疗的研究主要包括: 反义基因治疗、自杀基因治疗、免疫基因治疗及肿瘤裂解病毒基因治疗等. 本文就近期胰腺癌的基因治疗研究成果与存在的问题作一综述.

关键词: 胰腺癌; 基因治疗; 现状

周国雄, 秦金丹, 张海峰, 黄介飞. 胰腺癌基因治疗的研究现状. *世界华人消化杂志* 2009; 17(27): 2757-2761

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2757.asp>

0 引言

胰腺癌是消化系具有高度恶性的肿瘤, 严重威胁人类健康, 在我国有逐年上升趋势. 胰腺癌早期诊断困难. 手术切除率低, 预后差, 85%的患者在诊断后12 mo内死亡^[1]. 所以积极寻找治疗胰腺癌的新方法成为当务之急. 近年来随着分子生物学的进步, 人们对肿瘤发生、发展机制的认识有了长足的进步, 为胰腺癌的治疗开辟新途径提供了广阔的前景. 而20世纪80年代基因治疗的研究和逆转录病毒载体的开发, 为基因治疗提供了理论依据与技术方法. 基因治疗是指将外源基因或核酸导入人体防治疾病的一种新技术和新的治疗方法. 基于对肿瘤是一种基因病的认识, 加之恶性肿瘤发病率、死亡率较高, 使得肿瘤基因治疗的研究成为近10年来肿瘤治疗的主要研究内容和热点.

目前常用的方法有反义基因治疗、自杀基因治疗、免疫基因治疗、抗血管形成基因治疗、肿瘤裂解病毒基因治疗、受体基因治疗以及特异性启动子基因治疗, RNA干扰技术等.

1 反义基因治疗

这种方法的目的是阻止肿瘤相关基因的转录与翻译, 反义寡核苷酸以互补的形式与特定的DNA或RNA序列结合, 从而阻止DNA的转录或RNA的翻译, 使肿瘤基因无法表达. 由于K-ras基因突

背景资料

基因治疗是指将外源基因或核酸导入人体, 以防治疾病的治疗方法. 近几年来在胰腺癌基因治疗方面取得了一些进展. 但受基因靶位及载体选择的限制, 以及转导的有效性, 表达调控等技术方面的影响, 将基因疗法广泛应用于临床尚待时日.

同行评议者

谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

研发前沿
目前肿瘤的基因治疗研究正成为热点,胰腺癌的基因治疗改变了传统的治疗思路,变被动抗癌为主动抗癌,且相对于单基因缺陷所导致的遗传性疾病,胰腺癌的基因治疗更加具有挑战性。

变在胰腺癌中最为常见,因此许多反义基因治疗都以其为靶点,许多研究表明针对K-ras的反义寡核苷酸对胰腺癌有抑制作用^[2-3]。Morioka *et al*^[4]发现应用针对K-ras的反义寡核苷酸可以抑制胰腺癌细胞HaP-T1的生长,下调活化的基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的量,同时在动物实验中,也发现治疗组动物生存期明显延长,且淋巴结转移时间晚于对照组,活化的MMP-2和MMP-9的量也有明显下调,提示针对K-ras的反义寡核苷酸可以抑制胰腺癌肿瘤的生长和侵袭,该方法有望用于胰腺癌的治疗。韩旭 *et al*^[5]分别用整合素 α V、 β 3及 α V β 3反义基因治疗大鼠胰腺癌,发现其可明显抑制大鼠胰腺癌组织的血管生长,可促进肿瘤细胞的凋亡,进而影响肿瘤生长,联合应用整合素 α V β 3对肿瘤的生长抑制作用更为显著。

2 自杀基因治疗

自杀基因疗法又称前体药物敏感基因疗法(pro-drug sensitive genes therapy),是利用转基因的方法将哺乳动物本身不含有的药物酶基因转入肿瘤细胞内,该基因表达的产物可以将无毒的药物前体转化为有毒性的药物,干扰肿瘤细胞DNA的合成,从而杀死肿瘤细胞,这些基因称“自杀基因”。常用的有胞嘧啶脱氨酶(cytidine deaminase, CD)基因和单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-tk)基因。

2.1 CD基因 CD基因能催化5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)转化为5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU),而5-FU具有高度的细胞毒作用,能抑制RNA和DNA的合成而致细胞死亡^[6-7]。Li *et al*^[8]实验证实,将CD基因克隆成pAd Track-CMV-CD并与pAdEasy-1整合于细菌中,人类胰腺癌细胞系Patu8988和SW1990受这种病毒感染后加入5-FC,结果提示阳性克隆中,病毒脂质中包含CD基因的浓度为 2×10^4 pfu/mL,并发现其有显著的细胞毒性。王金皋 *et al*^[9]应用逆转录病毒方法转导CD和GM-CSF基因,皮下接种胰腺癌细胞TD2,肿瘤局部注射重组表达的pVITR02-CD-GM-CSF,然后给予5-FC治疗,发现小鼠肿瘤体积显著缩小,存活期明显延长,提示CD基因联合细胞因子基因GM-CSF可增强CD的抗肿瘤作用,其疗效要好于GM-CSF或CD基因单独治疗。张世能 *et al*^[10]采用同源重组技术构建重组腺病毒Ad-CD、Ad-CD/UPRT

和Ad-GFP;体外感染人胰腺癌SW1990细胞,检测UPRT mRNA表达以及对5-FC的敏感性及旁观者效应,分析细胞凋亡率;并且建立胰腺癌裸鼠皮下移植瘤模型,瘤体内直接注射腺病毒,观察CD/UPRT自杀基因的原位治疗作用。结果表明转染CD/UPRT的胰腺癌SW1990细胞对5-FC的敏感性明显提高,细胞凋亡率显著上升。CD/UPRT基因转染存在旁观者效应。Ad-CD/UPRT瘤内注射治疗后种植瘤体积缩小明显,提示CD/UPRT自杀基因系统能提高对胰腺癌细胞的杀伤作用。

2.2 HSV-tk基因 HSV-tk基因可催化抗病毒药物丙氧鸟苷(granciclovir, GCV)产生磷酸化反应,通过阻止DNA复制过程发挥细胞毒效应。用于HSV-TK基因疗法的前药有两类,一是嘌呤核苷类似物,包括阿昔洛韦(ACV)及其衍生物GCV、潘洛昔非(PCV)和布洛昔非(BCV),其中GCV对转基因瘤细胞的抑制作用比ACV强10倍,故成为目前肿瘤TK基因治疗中最常用的前药^[11-12]。

研究自杀基因治疗的过程中发现,肿瘤组织中未转染上自杀基因的瘤细胞也受到抑制,这种现象被称为“旁观者”效应。现已证明:几乎所有的自杀基因系统都具有“旁观者”效应,但其作用机制尚不十分清楚。其可能机制有:(1)化疗药物小分子通过细胞间的间隙连接或直接弥散作用进入相邻细胞;(2)凋亡细胞的凋亡小体中含有“自杀”基因片段,通过吞噬作用进入相邻细胞继续发挥作用;(3)自杀基因编码的酶是一种超抗原,能够刺激免疫系统产生各种细胞因子杀伤相邻细胞,产生“旁观者”效应。

3 免疫基因治疗

免疫基因治疗就是将各种细胞因子基因导入肿瘤或其他免疫效应细胞,使其在机体表达分泌细胞因子或利用其他基因分子增强肿瘤细胞的免疫原性或免疫系统功能,以加速肿瘤消退的方法。gammadelta-T细胞具有先天的抗肿瘤特性,能够识别并杀死肿瘤细胞,特别是对上皮细胞起源的恶性肿瘤更为敏感。Liu *et al*^[13]在体外实验中发现,增加gammadelta-T的表达可以使胰腺癌细胞MIA PaCa2, BxPC-3以及PANC-1的凋亡增加,而这与ICAM-1和ICAM-2是否可以呈阳性表达密切相关,如果ICAM-1和ICAM-2呈阴性表达,则gammadelta-T抗肿瘤细胞的作用明显下降,且肿瘤细胞对gammadelta-T的杀

伤作用产生耐药性. 提示gammadelta-T可以用于治疗包括胰腺癌在内的上皮细胞起源的恶性肿瘤, 而细胞间黏附分子作为辅助因子在其中发挥重要作用.

近年来, 对树突状细胞(dendritic cell, DC)免疫功能的研究是免疫基因治疗的又一大热点^[14]. Yang *et al*^[15]利用突变的K-ras基因转染DC细胞, 使DC细胞表面有效表达相应的突变的抗原表位(K-ras-12-Val), 并对胰腺癌小鼠模型进行治疗, 发现治疗组移植瘤体积明显小于同期对照组, 而且其存活时间长于对照组, 存活率亦明显大于对照组, 该实验提示转染突变K-ras基因的DC细胞在胰腺癌中可有效的发挥免疫抗肿瘤作用.

4 抗血管形成基因治疗

肿瘤的生长和存活依赖于生成的血管为它所提供的氧气和营养物质, 没有血管的生成, 肿瘤最大也只能长至1-2 mm³, 这使得抗血管形成治疗成为肿瘤治疗的重要途径之一. 血管内皮生长因子(vascular endothelin growth factor, VEGF)可直接作用于血管内皮细胞, 刺激其发生有丝分裂. 从而促进新生血管的生长, 是最重要的血管形成因子之一. VEGF及其受体在多种恶性肿瘤中均有广泛表达, 因此, VEGF被视为抑制血管形成的最重要的靶向分子之一. VEGF-Trap是一种可溶性重组血管内皮生长因子受体, 作用于VEGF、PDGF VEGF. B, 通过与VEGF结合阻止其与VEGFR结合. VEGF-Trap由VEGFR. 1的前三个抗原区与一个IgG稳定区构成. 相对VEGF单抗而言, VEGF. Trap与VEGF的结合更紧密, 对VEGF功能的抑制更完全^[16-17]. Konner *et al*^[18]在临床前动物模型中已证实VEGF-Trap能有效抑制肿瘤生长和血管形成, 导致肿瘤几乎完全无血供的状态.

5 肿瘤裂解病毒基因治疗

将野生型病毒通过改造, 使其仅能在肿瘤细胞中复制, 从而造成瘤细胞的裂解, 但对正常的细胞没有影响, 这是肿瘤基因治疗包括胰腺癌治疗在内的一种新策略^[19-21]. 腺病毒ONYX-015是E1B(55 kDa)基因缺失的腺病毒, 而E1B基因与肿瘤抑制蛋白P53结合, 能阻断P53介导的转录活性, 目前已经用于治疗胰腺癌^[22]. 在美国Jonsson综合癌症研究中心进行的有关ONYX-015的临床 I、II 期研究试验, 共有21位胰腺癌患

者参与了此次试验. 通过超声内镜引导将腺病毒ONYX-015注射到患者的瘤体内, 每隔1 wk注射1次, 共8 wk. 结果4例患者肿瘤体积较前缩小, 6例患者肿瘤体积无明显变化, 11例患者发现有肿瘤的进展^[23], 50%的胰腺癌患者在应用腺病毒ONYX-015治疗后肿瘤体积缩小或者保持不变, 如果能联合应用化、放疗等手段, 将能更好地提高肿瘤治疗的效果. Nakao *et al*^[24]用HF10治疗有局部进展, 复发的6例乳腺癌患者, 结果取得了较好的效果, 在此基础上, 研究者正打算将此病毒用于治疗无法行手术切除的胰腺癌患者. Caseante *et al*^[25]报道了通过将胸苷激酶与HIV病毒TAT蛋白上一个碱性结构域中的八肽组合成Tat8-TK/GCV系统, 在对体内试验中发现其对胰腺癌细胞有明显的杀伤作用, 35.6%-50%的肿瘤体积减小.

6 受体基因治疗

生长抑素受体SST2介导生长抑素的抗增殖效应, 而人类胰腺癌组织并不表达SST2基因. 若能重新引入SST2基因到人胰腺癌组织, 使其稳定表达, 可唤起自分泌反馈环, 引发SST2的固有活性, 抑制肿瘤细胞增殖^[26-27]. Carrere *et al*^[28]进行了体内实验, 利用PEI将SST2转染至鼠胰腺癌移植瘤中, 发现体内转染SST2后可以导致瘤内微血管密度明显下降, VEGF表达显著下调, 并且强烈抑制胰腺癌的生长, 故认为VEGF和肿瘤的血管化作用是SST2介导的抗胰腺癌的新靶点. 而SST3未发现有相似作用. Feng *et al*^[29]利用腺病毒介导将SST2转染至胰腺癌细胞BXP-3中, 利用Transwell小室了解转染SST2后BXP-3的迁移和侵袭能力, 并且通过RT-PCR和Western blot等方法检测MMP-2和金属蛋白酶组织抑制剂-2(TIMP-2), 发现胰腺癌细胞BXP-3的迁移和侵袭能力明显下降, MMP-2明显下调而TIMP-2上调显著, 提示这种抗迁移和抗侵袭能力可能与MMP-2下调, TIMP-2上调有关.

7 特异性启动子基因治疗

特异性启动子基因治疗即基因的靶向性传递, 是用某些肿瘤相关的特异性启动子, 将相关基因导入癌细胞的治疗方法. 刘金龙 *et al*^[30]以细菌内同源重组法构建含TK基因的腺病毒载体pAdEgr-1-TK, 转染人胰腺癌细胞株PC-3, ⁶⁰Co-γ射线照射后, RT-PCR半定量分析各不同照射剂量组TK基因的mRNA的表达. 加入前药丙氧鸟

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

应用要点
 进一步加强对胰腺癌的基础研究, 寻找更具特异性的检测和治疗靶位点, 对进一步应用于临床治疗肿瘤具有重要的指导价值。

昔(ganciclovir, GCV), MTT法检测其对胰腺癌细胞的杀伤作用, 结果提示, 经⁶⁰Co-γ射线照射后, 与对照组胰腺癌细胞相比, 前药GCV可明显提高对转染pAdEgr-1-TK胰腺癌细胞的杀伤效率。表明由Egr-1启动子调控的TK自杀基因在γ射线作用下可以显著提高杀伤胰腺癌细胞的能力。

8 结论

胰腺癌的基因治疗改变了传统的治疗思路, 变被动抗癌为主动抗癌。相对于单基因缺陷所导致的遗传性疾病, 胰腺癌的基因治疗更加具有挑战性。胰腺癌近几年来在基因治疗方面取得了一些进展, 但受基因靶位及载体选择的限制, 以及转导的有效性, 表达调控等技术方面的影响, 将基因疗法广泛应用于临床尚待时日。因此, 应进一步加强对胰腺癌细胞的增殖、浸润、转移等生物学行为的基础研究, 寻找更具特异性的检测和治疗靶位点。多种肿瘤标志物的联合检测及多基因、多因素联合应用是今后胰腺癌研究的热点和发展方向。因为这不但符合肿瘤发生发展的规律, 而且也弥补了单基因、单一疗法的应用。因此认识到肿瘤发生不足的复杂性及机体在此过程中千变万化的状态, 选择适合的治疗方式, 从多方面入手, 达到几种治疗方式的相辅相成, 或建立治疗的个体化方案, 才能使目前的基因治疗具有突破性的发展, 基因治疗才能真正用于临床, 造福于肿瘤患者。

9 参考文献

- Friess H, Liao Q, Zhao YP, Büchler MW. Surgical treatment for pancreatic cancer. *Chin J Hepatobiliary Surg* 2002; 8: 515-523
- Lebedeva IV, Su ZZ, Emdad L, Kolomeyer A, Sarkar D, Kitada S, Waxman S, Reed JC, Fisher PB. Targeting inhibition of K-ras enhances Ad.mda-7-induced growth suppression and apoptosis in mutant K-ras colorectal cancer cells. *Oncogene* 2007; 26: 733-744
- Shen YM, Yang XC, Yang C, Shen JK. Enhanced therapeutic effects for human pancreatic cancer by application K-ras and IGF-IR antisense oligodeoxynucleotides. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5176-5185
- Morioka CY, Costa FP, Lima EMR, Saito S, Watanabe A, Huang CC, Arai H, Sakamoto T. Can antisense oligonucleotides specific to mutated K-ras gene inhibit the tumor growth, invasiveness, and MMP-2 and MMP-9 expression in hamster pancreatic cancer model in vitro and in vivo? *EJC suppl* 2007; 5: 73
- 韩旭, 李杰, 时昌文, 李捷, 徐宗珍, 孙京杰, 曹莉莉. 整合素αV和β3反义基因抑制大鼠胰腺癌生长的实验研究. *中国现代普外科进展* 2008; 11: 474-476, 480
- Eisold S, Antolovic D, Schmidt J, Wiessner R, Klar E, von Knebel-Doeberitz M, Linnebacher M. Effective antitumoral immune responses are not induced by cytosine deaminase suicide gene transfer in a syngeneic rat pancreatic carcinoma model. *Eur Surg Res* 2006; 38: 513-521
- Fogar P, Navaglia F, Basso D, Greco E, Zambon CF, Fadi E, Falda A, Stranges A, Vannozzi F, Danesi R, Pedrazzoli S, Plebani M. Suicide gene therapy with the yeast fusion gene cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase is not enough for pancreatic cancer. *Pancreas* 2007; 35: 224-231
- Li ZS, Pan X, Xu GM, Cui L, Dai GR, Gong YF, Tu ZX. Killing effects of cytosine deaminase gene mediated by adenovirus vector on human pancreatic cancer cell lines in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 147-151
- 王金皋, 王春英, 李祖国. CD基因联合GM-CSF基因对胰腺癌治疗作用的实验研究. *中国现代普外科进展* 2005; 8: 161-163
- 张世能, 徐凤琴, 于钟, 左海军, 危淑莉, 黄志清. 腺病毒介导CD/UPRT自杀基因系统治疗胰腺癌的实验研究. *胰腺病学* 2007; 7: 372-374
- Kajiwar E, Kawano K, Hattori Y, Fukushima M, Hayashi K, Maitani Y. Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy. *J Control Release* 2007; 120: 104-110
- Tang Q, Zhang D, Wan M, Jin L. Experimental study of the RV-HSV-TK/GCV suicide gene therapy system in gastric cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2007; 22: 755-761
- Liu Z, Guo B, Lopez RD. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 or ICAM-2 is critical in determining sensitivity of pancreatic cancer cells to cytolysis by human gammadelta-T cells: implications in the design of gammadelta-T-cell-based immunotherapies for pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 900-911
- Yamanaka R, Yajima N, Tsuchiya N, Honma J, Tanaka R, Ramsey J, Blaese M, Xanthopoulos KG. Administration of interleukin-12 and -18 enhancing the antitumor immunity of genetically modified dendritic cells that had been pulsed with Semliki forest virus-mediated tumor complementary DNA. *J Neurosurg* 2002; 97: 1184-1190
- Yang B, He Y, Sun DL, Zou Y, Qin XH, Huang BH. [Specific immune against pancreatic cancer induced by dendritic cells pulsed with mutant K-ras peptide] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 1956-1960
- Zhu DM, Li DC, Zhang ZX, Zhang XY. Effect of endothelial PAS domain protein 1 and hypoxia inducible factor 1α on vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 2258-2264
- Elbarbary RA, Takaku H, Tamura M, Nashimoto M. Inhibition of vascular endothelial growth factor expression by TRUE gene silencing. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 924-927
- Konner J, Dupont J. Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer* 2004; 4 Suppl 2: S81-S85
- Kasuya H, Nishiyama Y, Nomoto S, Goshima F, Takeda S, Watanabe I, Nomura N, Shikano T, Fujii T, Kanazumi N, Nakao A. Suitability of a US3-inactivated HSV mutant (L1BR1) as an oncolytic

- virus for pancreatic cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 2007; 14: 533-542
- 20 Sinkovics JG, Horvath JC. Natural and genetically engineered viral agents for oncolysis and gene therapy of human cancers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008; 56 Suppl 1: 3s-59s
- 21 Woo Y, Kelly KJ, Stanford MM, Galanis C, Chun YS, Fong Y, McFadden G. Myxoma virus is oncolytic for human pancreatic adenocarcinoma cells. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 2329-2335
- 22 虞昆, 赵明飞, 吴育连. 溶瘤病毒治疗胰腺癌的研究进展. *国外医学·老年医学分册* 2006; 27: 185-188
- 23 Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, Lahoti S, Reid TR, Soetikno RM, Kirn DH, Freeman SM. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 555-561
- 24 Nakao A, Kimata H, Imai T, Kikumori T, Teshigahara O, Nagasaka T, Goshima F, Nishiyama Y. Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent breast cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 988-989
- 25 Cascante A, Huch M, Rodríguez LG, González JR, Costantini L, Fillat C. Tat8-TK/GCV suicide gene therapy induces pancreatic tumor regression in vivo. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1377-1388
- 26 Rochaix P, Delesque N, Estève JP, Saint-Laurent N, Voight JJ, Vaysse N, Susini C, Buscail L. Gene therapy for pancreatic carcinoma: local and distant antitumor effects after somatostatin receptor sst2 gene transfer. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 995-1008
- 27 Guillermet J, Saint-Laurent N, Rochaix P, Cuvillier O, Levade T, Schally AV, Pradayrol L, Buscail L, Susini C, Bousquet C. Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 155-160
- 28 Carrere N, Vernejoul F, Souque A, Asnacios A, Vaysse N, Pradayrol L, Susini C, Buscail L, Cordelier P. Characterization of the bystander effect of somatostatin receptor sst2 after in vivo gene transfer into human pancreatic cancer cells. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1175-1193
- 29 Feng Y, Huang T, Gao J, Chang Q, Qin R. Inhibition of metastatic progression of SSIR2 gene transfection mediated by adenovirus in human pancreatic carcinoma cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006; 26: 68-71
- 30 刘金龙, 钱清, 刘训良, 郭治源, 杜青, 郭仕英, 李朝军. 由Egr-1调控TK基因灭活胰腺癌细胞的实验研究. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2007; 27: 1244-1247

同行评价

本文综述了胰腺癌基因治疗的研究现状. 内容全面, 专一性强, 思路清晰, 具有较好的学术价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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, 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、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者提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

RNA干扰HIF-1 α 对食管癌细胞株TE13的生物学特性的影响

金海林, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波

背景资料
实体肿瘤微环境存在缺氧与代谢紊乱, 而缺氧诱导因子-1(HIF-1)的表达和活性增强是肿瘤细胞适应缺氧环境的重要原因, 其 α 亚基HIF-1 α 是主要的氧调节亚基和功能亚基。目前已发现人类多数肿瘤中存在HIF-1 α 的过表达。

金海林, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

金海林, 南京医科大学第一附属医院硕士在读研究生, 主要从事消化系统肿瘤早期发病机制研究。

作者贡献分布: 该课题由金海林、施瑞华及朱宏共同设计; 研究过程由金海林与郝波在施瑞华指导下完成; 所用试剂及分析工具由施瑞华提供; 数据分析由金海林、凌亭生及郝波完成; 论文写作由金海林与施瑞华完成。

通讯作者: 施瑞华, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科。ruihuashi@126.com
电话: 025-83718836-6973

收稿日期: 2009-07-28 修回日期: 2009-09-11

接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-09-28

RNA interference-mediated downregulation of hypoxia-inducible factor-1 α attenuates the proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma TE13 cells

Hai-Lin Jin, Rui-Hua Shi, Hong Zhu, Ting-Sheng Ling, Bo Hao

Hai-Lin Jin, Rui-Hua Shi, Hong Zhu, Ting-Sheng Ling, Bo Hao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Rui-hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com

Received: 2009-07-28 Revised: 2009-09-11

Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate the impact of RNA interference-mediated downregulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) on the biological behavior of esophageal squamous cell carcinoma TE13 cells.

METHODS: The plasmid harboring small interfering RNA targeting HIF-1 α was introduced into TE13 cells by liposome-mediated transfection. The expression of HIF-1 α protein was measured by Western blot. The proliferation of TE13 cells was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay. The migration

of TE13 cells was evaluated by Transwell migration assay. Cell cycle analysis was performed by fluorescence-activated cell sorting (FACS).

RESULTS: HIF-1 α expression was markedly downregulated in TE13/12 cell clone (transfected with the plasmid harboring small interfering RNA targeting HIF-1 α). The expression of HIF-1 α protein in TE13/12 cells could not be detected by Western blot. The proliferation of TE13/12 cells decreased significantly compared with untransfected TE13 cells ($P < 0.05$). Transwell migration assay showed that less TE13/12 cells could move through the artificial basement membrane when compared with untransfected TE13 cells (18.2 ± 3.7 vs 103.8 ± 8.5 , $P < 0.05$). The cell cycle of TE13/12 cells was changed. Compared with untransfected TE13 cells, the percentage of TE13/12 cells in G₂/M phase decreased significantly ($5.99\% \pm 1.19\%$ vs $20.47\% \pm 4.30\%$, $P < 0.05$), whereas the percentage of TE13/12 cells in S phase increased remarkably ($64.67\% \pm 1.98\%$ vs $48.53\% \pm 3.89\%$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: RNA interference-mediated downregulation of HIF-1 α can attenuate the proliferation and migration of TE13 cells. Blockade of the HIF-1 α pathway may provide a new approach to the treatment of human esophagus squamous cell carcinoma.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Hypoxia-inducible factor-1 α ; RNA interference

Jin HL, Shi RH, Zhu H, Ling TS, Hao B. RNA interference-mediated downregulation of hypoxia-inducible factor-1 α attenuates the proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma TE13 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2762-2766

摘要

目的: 探讨HIF-1 α 沉默后对食管癌细胞株TE13的生物学行为的影响。

方法: 应用倒置荧光显微镜观察HIF-1 α 的干扰质粒转染食管癌细胞TE13后绿色荧光蛋白

同行评议者
吕宾, 教授, 浙江中医学附属院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

的表达; 采用Western blot方法检测HIF-1 α 蛋白的表达; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测转染前后细胞增殖能力的变化; Transwell方法检测干扰前后细胞迁移能力的变化; 流式细胞术检测干扰前后细胞周期的变化。

结果: TE13/12单克隆干扰效果好, Western blot结果显示无HIF-1 α 表达。HIF-1 α 被干扰后, 细胞增殖能力明显减弱($P<0.05$), 运动迁移能力显著下降, 与未转染的细胞相比穿过人工基底膜的细胞数明显减少(18.2 ± 3.7 vs 103.8 ± 8.5 , $P<0.05$)。与未转染组相比, TE13/12的细胞周期发生变化, G₂/M期细胞明显减少($5.99\%\pm 1.19\%$ vs $20.47\%\pm 4.30\%$, $P<0.05$), S期增加($64.67\%\pm 1.98\%$ vs $48.53\%\pm 3.89\%$, $P<0.05$)。

结论: RNA干扰可引起TE13中HIF-1 α 的沉默, 而HIF-1 α 表达下调后食管癌细胞株TE13的增殖与迁移能力均减弱。推测阻断HIF-1 α 通路有可能成为治疗人食管鳞癌的新靶点。

关键词: 食管鳞癌; 缺氧诱导因子-1 α ; RNA干扰

金海林, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波. RNA干扰HIF-1 α 对食管癌细胞株TE13的生物学特性的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2762-2766

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2762.asp>

0 引言

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是广泛存在于哺乳动物体内的一种核转录因子, 由HIF-1 α 和HIF-1 β 2个亚基组成。其中HIF-1 α 是主要的氧调节亚基和功能亚基。常氧下HIF-1 α 的脯氨酸残基被羟化并通过E3泛素化-蛋白酶体途径迅速降解。缺氧时细胞通过多个通路感受到, 脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylase, PHDs)失活, 泛素-蛋白酶体对HIF-1 α 的降解受阻, 致使HIF-1 α 大量积聚并转移至细胞核中, 与HIF-1 β 聚合形成稳定的HIF-1, 其与靶基因的缺氧反应元件(hypoxia-response element, HRE)结合, 形成转录起始复合物, 启动靶基因转录^[1-2]。已发现大多数肿瘤中存在HIF-1 α 的过表达^[3-4], 并且与肿瘤的复发转移相关。本研究通过建立食管癌细胞TE13的稳定HIF-1 α 干扰株, 探讨HIF-1 α 下调后对TE-13的生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管鳞癌细胞株TE13(中科院上海细胞所), pGCsi-HIF-1 α 和阴性对照环质粒(上海吉凯公司)为携带绿色荧光蛋白(GFP)报

道基因, 并不干扰任何内源基因的短发状RNA载体。FBS和DMEM(Hyclone), LipofectamineTM 2000(Invitrogen), 克隆环(Sigma), 鼠抗人HIF-1 α mAb(Chemicon), 鼠抗人的Tubulin- α mAb(Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染: 转染前1 d取对数生长期的TE13细胞约 2.0×10^5 个接种于35 mm培养皿, 培养于不含抗生素的DMEM培养液, 次日观察细胞长至约90%聚合开始转染。取pGCsi-HIF-1 α 质粒4 μ g和LipofectamineTM 2000 10 μ L分别稀释于250 μ L不含抗生素的DMEM培养液, 5 min内混匀, 室温孵育20 min后加入培养皿。6 h后更换新鲜的含100 mL/L胎牛血清DMEM培养液, 其后每2-3 d更换培养液。TE13细胞转染后24 h按1:12的比例传代, 48 h后开始用含400 mg/L G418(筛选浓度在转染前制杀伤曲线后获得)的选择性培养液进行筛选, 约4 wk后挑取克隆在400 mg/L G418培养液中继续传代, 扩大培养。同步转染阴性对照质粒。倒置荧光显微镜结合Western鉴定干扰效果。

1.2.2 Western blot: 细胞聚合后弃去培养液, 予冷PBS洗细胞2次, 加蛋白裂解液制备总蛋白, 超声破碎后4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心10 min, 取上清。采用BCA法定量蛋白浓度。取总蛋白40 μ g于100 $^{\circ}$ C加热变性5 min后上样, 行40 mA稳流SDS-PAGE电泳, 100 V稳压冰浴电转至PVDF膜, 50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h后TBST漂洗, 5 min \times 3, 加入适当浓度一抗(HIF-1 α 1:500, Tubulin- α 1:4000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日TBST漂洗5 min \times 3后再加HRP标记的二抗(羊抗鼠1:5000)室温孵育1 h, TBST漂洗5 min \times 3。ECL化学发光法显影。

1.2.3 MTT法检测转染前后TE13的增殖: 将不同细胞株按2000/孔接种于96孔板, 与MTT(5 g/L)反应, 连续7 d, 最后1 d每孔加200 μ L DMSO, 摇床振荡15 min溶解后, 在酶联免疫检测仪选择波长490 nm测量各孔的吸光度值(A)。每个时间点设3复孔。根据A绘制干扰前后细胞的增殖趋势图。

1.2.4 Transwell实验检测转染前后TE13的迁移能力: 采用孔径8 μ m的24孔Transwell小室(corning)。用明胶均匀涂在小室下面晾干后, 上室加 1×10^5 个细胞, 总体积为200 μ L。下室加500 μ L含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液。24 h后甲醇固定, HE染色。400倍光镜下随机取5个视野拍照, 计算穿膜细胞数。

1.2.5 流式细胞术检测干扰前后细胞周期的变

研发前沿

关于HIF-1 α 的生物学研究在近几年已经获得了显著的进步, 但其在肿瘤中的作用机制及通路方面的研究仍相对不足。成为该领域的研究热点问题之一。

相关报道

Takahashi *et al*在肝癌中研究提示RNA干扰HIF-1 α 后抑制了肝癌细胞的增殖。Kang *et al*在胰腺癌的研究中也得出与本文相似的结果。这些研究提示HIF-1 α 很可能在肿瘤的发生、增殖过程中发挥了重要的作用。

创新盘点

HIF-1 α 的相关研究虽然较多,但在食管鳞癌中通过RNA干扰技术研究其功能的报道尚少。本文在高度恶性食管癌细胞株TE13中的研究结果为证实HIF-1 α 的生物学作用的普遍性提供了一定的依据。

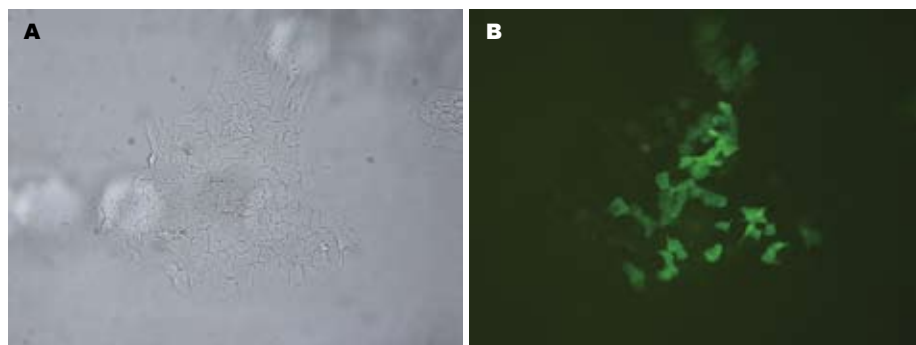


图1 倒置荧光显微镜下观察稳转细胞的绿色荧光蛋白的表达($\times 400$)。A: 光镜下观; B: 同视野荧光镜下观。

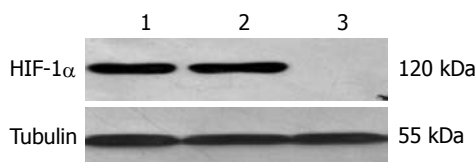


图2 Western blot检测转染后HIF-1 α 的表达。1: 未转染组; 2: 阴性对照组TE13; 3: 干扰组TE13/12。

化: 各组细胞同步培养收集后, 用700 mL/L乙醇固定, 碘化丙啶避光染色30 min后上机检测。

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件处理数据。计量资料, 用mean \pm SD表示。2组数据比较采用成组t检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 单克隆TE13/12的绿色荧光蛋白表达 在所挑出的单克隆中, TE13/12细胞株在倒置荧光显微镜下发出绿色荧光, 证实质粒已转入细胞基因组并稳定表达(图1)。

2.2 Western blot检测干扰效果 TE13/12单克隆无HIF-1 α 的表达, 而转染阴性对照质粒的细胞株HIF-1 α 的表达与未转染的细胞无明显差异(图2)。

2.3 MTT法检测细胞增殖的变化 根据连续7 d A值绘制的生长趋势图提示干扰组明显低于未转染组($P < 0.05$), 而阴性对照组与未转染组无明显差异(图3)。

2.4 Transwell实验结果 HIF-1 α 沉默后, TE13/12的迁移能力明显下降, 穿过人工膜的细胞数明显少于未转染组(18.2 ± 3.7 vs 103.8 ± 8.5 , $P < 0.05$), 而阴性对照组和未转染组穿膜细胞数无统计学差异(96.8 ± 9.4 vs 103.8 ± 8.5 , $P > 0.05$, 图4)。

2.5 细胞周期 干扰组细胞G₂/M期细胞明显少于未转染组($5.99\% \pm 1.19\%$ vs $20.47\% \pm 4.30\%$, $P < 0.05$), 细胞被阻滞于S期($64.67\% \pm 1.98\%$ vs $48.53\% \pm 3.89\%$, $P < 0.05$), 而G₀/G₁期细胞比例变化无统计学意义($28.61\% \pm 3.04\%$ vs $31.00\% \pm$

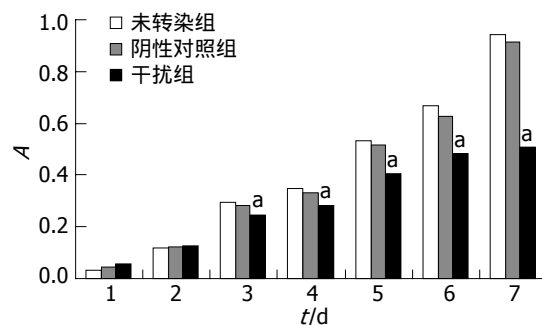


图3 HIF-1 α 沉默前后细胞增殖能力的变化。* $P < 0.05$ vs 未转染组。

0.41%, $P > 0.05$, 图5)。

3 讨论

HIF-1 α 作为一种核转录因子, 能通过对缺氧诱导基因如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血红素氧合酶-1、糖酵解酶等表达的调节, 维持机体对缺氧的适应能力。其功能涉及代谢适应、红细胞生成、血管发生和细胞生长、分化、凋亡等多个方面^[5]。目前研究认为HIF-1 α 与肿瘤患者预后及对治疗的反应密切相关^[6-8]。关于HIF-1 α 的生物学研究在过去几年中已经获得了显著的进步, 但其在血管生成和肿瘤中的作用机制及通路方面的研究仍相对不足^[9]。

RNA干扰是20世纪90年代发现的一种生物学现象, 广泛的存在于各种生物体内, 是一种古老而且分布极为广泛的保护自身遗传物质完整的机制^[10]。其机制为外源性基因随机整合到宿主基因组并利用宿主细胞进行转录时, 宿主细胞常产生一些双链RNA(dsRNA), 随后dsRNA被切割酶Dicer剪切为21-23 bp的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)。siRNA再与酶蛋白结合形成RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), RISC根据碱基互补配对原则与靶向mRNA结合, 最终导致目标mRNA

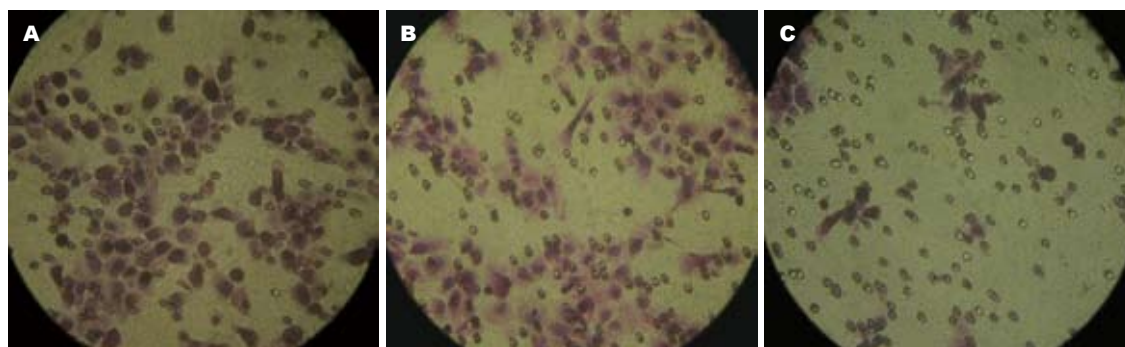


图 4 HIF-1 α 沉默前后细胞迁移能力的变化. A: 未转染组; B: 阴性对照组; C: 干扰组($\times 400$).

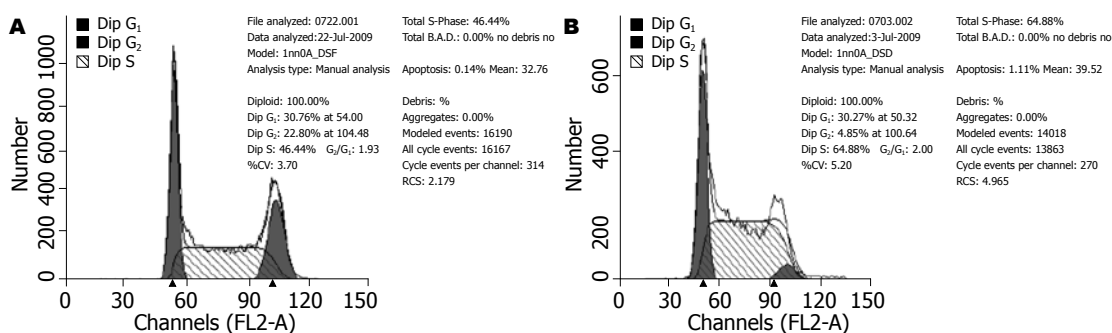


图 5 HIF-1 α 沉默前后TE13细胞周期的变化. A: 未转染组; B: 转染组.

降解, 从而导致基因沉默^[11]. 由于RNAi对目的基因的表达有高效和特异性的抑制作用, 目前在基因的基础研究中占据着不可替代的地位, 并且在某些病毒感染、肿瘤的临床治疗上也显示出了巨大的潜力^[12]. 在前期实验中我们设计合成了3个不同序列的针对HIF-1 α 的干扰质粒pGCsi-HIF1、pGCsi-HIF2和pGCsi-HIF3, 并筛选出干扰效率较高的pGCsi-HIF3^[13]. 本实验中我们应用pGCsi-HIF3干扰质粒稳定转染食管癌细胞TE13, 单克隆扩大培养后, 倒置荧光显微镜下观察, 可见TE13/12克隆有较强的绿色荧光蛋白表达, 提示质粒已整合到基因组中并稳定表达. Western blot结果显示, TE13/12克隆无HIF-1 α 的表达, 进一步在蛋白水平证明了干扰的效果.

HIF-1 α 在肿瘤细胞的生长、分化、增殖及转移过程中发挥着重要作用. 由于肿瘤细胞的恶性增殖, 巨大的细胞团对能量的需求急剧增加的同时形成了局部缺氧的微环境. 于是HIF-1 α 降解减少, 转位进入胞核与 β 亚基结合形成HIF-1, 启动其下游靶基因的表达, 从而促进血管发生、糖酵解及代谢适应等^[14]. 我们在实验中发现, HIF-1 α 被干扰后, 细胞增殖速度明显减慢, 流式细胞术检测细胞周期提示TE13被干扰后, 细胞被阻滞于S期, 而进入分裂期的细胞明显减少, 这也部分解释了MTT的结果. 关于HIF-1 α 促

进肿瘤细胞增殖的机制, 有研究认为是HIF-1 α 刺激了MXI1表达后, 增加了C-MYC降解, 从而降低了肿瘤细胞的氧耗所致^[15]. 另外, 我们还发现在TE13中HIF-1 α 被干扰后, 细胞的迁移能力显著下降, 提示HIF-1 α 在食管癌的转移过程中有重要作用.

我们的实验结果显示, 食管癌细胞株TE13经针对HIF-1 α 的干扰质粒转染, 用G418筛选后再单克隆化, 经Western鉴定的细胞株能稳定的抑制HIF-1 α 的表达. 其后的功能实验进一步提示HIF-1 α 沉默后TE-13的增殖、迁移能力显著下降以及细胞周期发生改变. 这些结果提示HIF-1 α 在食管癌的发生、进展及转移过程中起着重要作用, 有可能成为一个潜在的肿瘤治疗靶点.

目前已有较多的HIF-1 α 抑制剂问世, 比如相关信号通路(PI3K/Akt/mTOR, MAPK及Hsp90系统等)的抑制剂^[16], 但其中大部分并非特异性的抑制HIF-1 α 的表达. 由于缺乏特异性使其作用机制无法确切的评价, 这也限制了其在临床的应用. 因此, 特异性的HIF-1 α 抑制剂的研制成为现代抗肿瘤研究领域的热点. 这类药物的研制成功必定会为肿瘤的治疗带来巨大的进展.

4 参考文献

- 1 Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ. The human side

应用要点
本研究证实RNA干扰可以沉默食管癌细胞株TE13的HIF-1 α 表达, 抑制其增殖与迁移, 为其将来临床应用提供了理论依据.

同行评价

本文采用RNA干扰技术, 沉默HIF-1 α , 研究食管癌细胞株TE13的生物学特征的变化. 设计合理, 方法先进, 结果可信, 有较好的学术价值.

- 2 of hypoxia-inducible factor. *Br J Haematol* 2008; 141: 325-334
- 3 Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 2001; 107: 1-3
- 4 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
- 5 Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157: 411-421
- 6 Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 293-299
- 7 Tzao C, Lee SC, Tung HJ, Hsu HS, Hsu WH, Sun GH, Yu CP, Jin JS, Cheng YL. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF)-D as outcome predictors in resected esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Markers* 2008; 25: 141-148
- 8 Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 1573-1581
- 9 Koukourakis MI, Bentzen SM, Giatromanolaki A, Wilson GD, Daley FM, Saunders MI, Dische S, Sivridis E, Harris AL. Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 α and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial. *J Clin Oncol* 2006; 24: 727-735
- 10 Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ* 2008; 15: 621-627
- 11 Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004; 431: 338-342
- 12 Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 2004; 117: 1-3
- 13 Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 2005; 107: 222-239
- 14 肖斌, 施瑞华, 杜琰萍, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 林艳, 郝波. RNA干扰体外抑制人食管鳞癌细胞Eca-109缺氧诱导因子-1 α 的表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1654-1661
- 15 Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 2007; 80: 51-60
- 16 Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 2007; 11: 407-420
- 17 Diaz-Gonzalez JA, Russell J, Rouzaut A, Gil-Bazo I, Montuenga L. Targeting hypoxia and angiogenesis through HIF-1 α inhibition. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1055-1062

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *L*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), 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*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *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. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

三叶因子2相互作用蛋白基因在胃癌细胞cDNA文库中的筛选

詹晓娟, 任建林, 许鸿志, 董菁, 周飞, 潘金水, 肖鸿敏

詹晓娟, 许鸿志, 董菁, 周飞, 潘金水, 肖鸿敏, 厦门大学附属中山医院消化内科 福建省厦门市 361004

任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门大学消化疾病研究所 厦门市消化疾病中心 福建省厦门市 361004

詹晓娟, 硕士, 主要从事消化系疾病研究.

作者贡献分布: 詹晓娟与任建林对此文所作贡献均等; 此课题由任建林、董菁及詹晓娟设计; 研究过程由詹晓娟、董菁、周飞、潘金水、许鸿志及肖鸿敏操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由詹晓娟提供; 数据分析由詹晓娟、董菁及任建林完成; 本论文写作由詹晓娟与任建林完成.

通讯作者: 任建林, 教授, 博士生导师, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病中心. jianlinr@msn.com

电话: 0592-2993170 传真: 0592-2993170

收稿日期: 2009-06-03 修回日期: 2009-08-24

接受日期: 2009-08-31 在线出版日期: 2009-09-28

Identification of genes encoding human trefoil factor 2-interacting proteins by screening a cDNA library of gastric cancer cells

Xiao-Juan Zhan, Jian-Lin Ren, Hong-Zhi Xu, Jing Dong, Fei Zhou, Jin-Shui Pan, Hong-Min Xiao

Xiao-Juan Zhan, Hong-Zhi Xu, Jing Dong, Fei Zhou, Jin-Shui Pan, Hong-Min Xiao, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Affiliated to Xiamen University, Institute of Digestive Diseases Affiliated to Xiamen University, Digestive Disease Center of Xiamen City, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Affiliated to Xiamen University, Institute of Digestive Diseases Affiliated to Xiamen University, Digestive Disease Center of Xiamen City, Xiamen 361004, Fujian Province, China. jianlinr@msn.com

Received: 2009-06-03 Revised: 2009-08-24

Accepted: 2009-08-31 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To identify and clone genes encoding human trefoil factor 2 (TFF2)-interacting proteins by screening a cDNA library of gastric cancer cells.

METHODS: The expression of TFF2 mRNA in gastric cancer was verified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The

TFF2 gene was amplified by PCR, double digested with *Not* I and *Sal* I, and cloned into yeast expression vector pDEST32 to construct TFF2 bait plasmid. The expression of TFF2-GAL4DBD fusion protein by the bait plasmid in yeast cells was confirmed by Western blot. The TFF2 bait plasmid and a prey plasmid (containing a cDNA library of human gastric cancer cells) were co-transfected into Mav203 competent yeast cells. The positive clones were isolated using selective medium and sequenced. The sequenced genes were then compared with sequences deposited in the GenBank database.

RESULTS: RT-PCR analysis proved that TFF2 mRNA was expressed in gastric cancer. The pDEST32-TFF2 bait plasmid was successfully constructed. Western blot analysis confirmed that the TFF2 bait plasmid could correctly express the TFF2-GAL4DBD fusion protein. A total of 35 positive clones were obtained from the yeast two-hybrid screening. Sixteen positive clones were successfully sequenced, of which 12 represented known genes and 4 unknown genes.

CONCLUSION: Multiple genes encoding TFF2-interacting proteins were identified from the cDNA library of gastric cancer cells. These genes may be closely associated with the development and progression of gastric cancer.

Key Words: Trefoil factor family 2; Gastric cancer; Interacting proteins

Zhan XJ, Ren JL, Xu HZ, Dong J, Zhou F, Pan JS, Xiao HM. Identification of genes encoding human trefoil factor 2-interacting proteins by screening a cDNA library of gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2767-2772

摘要

目的: 筛选并克隆人胃癌细胞cDNA文库中与三叶因子2(trefoil factor family 2, TFF2)蛋白相互作用的蛋白基因.

方法: RT-PCR方法验证胃癌细胞存在TFF2 mRNA表达; PCR法扩增TFF2基因, *Not* 与 *Sal* 双酶切后定向克隆到酵母表达载体

背景资料

三叶因子2(TFF2)具有胃黏膜保护作用, 在胃癌的发生发展中起到重要作用, 但其在胃癌的浸润和转移中的作用机制尚未阐明.

同行评议者
葛海燕, 教授, 同济大学附属第十人民医院普通外科; 陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

研发前沿
国内外致力于寻找TFF2结合蛋白,以期深入探讨TFF2在胃癌中作用机制,尚未达成一致意见。

pDEST32, 构建TFF2的诱饵质粒; Western blot验证TFF2诱饵质粒在酵母细胞中相应融合蛋白的表达; 将诱饵质粒和人胃癌-cDNA文库猎物质粒共同转化MaV203酵母感受态细胞, 通过营养缺陷型培养基(Ura、His)与X-gal进行3重筛选阳性克隆, 提取阳性克隆质粒测序, 应用蛋白质数据库及生物信息学技术, 对测序结果进行分析。

结果: RT-PCR法证实胃癌细胞中存在TFF2 mRNA表达; 构建pDEST32-TFF2诱饵表达质粒成功; Western blot法证实诱饵质粒转化酵母细胞后正确表达TFF2-GAL4DBD融合蛋白; 通过酵母双杂交筛选胃癌细胞cDNA文库, 共获得35个表达His、Ura及X-gal报告基因的阳性克隆, 其中测序成功为16个克隆, 包含12个已知蛋白基因与4个未知功能基因。

结论: 从胃癌细胞cDNA文库中筛选出多种TFF2相互作用蛋白基因, 其可能与胃癌的发生发展密切相关。

关键词: 解痉多肽; 胃癌; 相互作用蛋白

詹晓娟, 任建林, 许鸿志, 董菁, 周飞, 潘金水, 肖鸿敏. 三叶因子2相互作用蛋白基因在胃癌细胞cDNA文库中的筛选. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2767-2772
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2767.asp>

0 引言

三叶因子家族(trefoil factor family, TFF)是一群主要由胃肠道黏液细胞分泌的小分子多肽。目前在哺乳动物体内发现的三叶肽(trefoil peptide)有3种, 即乳癌相关肽(pS2或TFF1)、解痉多肽(SP或TFF2)和肠三叶因子(ITF或TFF3), 他们的基因密集在染色体21q22.3上^[1], 其共同特征为含一特殊结构域-P结构域。由一段38-39个氨基酸序列通过3个分子内的二硫键相互连接, 使整个肽链扭曲、折叠形成三叶形结构, 由此得名^[2-3]。这种三叶形结构的稳定性使TFF具有明显的抗蛋白酶水解、抗酸消化及耐热特性, 因而能在消化系统复杂的环境中保持生物活性。TFF通过C端Cys-X-X模序形成二硫键, 产生单体、同源二聚体、异源二聚体3种形式。Calnan *et al*^[4]研究发现TFF1二聚体活性较单体形式更高。

TFF2是TFF成员之一, 含2个三叶结构域, 其单体分子由130个氨基酸组成^[5], 生理情况下主要在胃体及胃窦的黏液颈细胞和下段十二指肠腺细表达^[6-7], 但在病理条件下这种表达专性

消失^[8], 他可在胃肠道黏膜损伤部位表达^[9], 且在损伤部位的表达较正常黏膜明显增高。TFF2具有黏膜保护、上皮重建修复、信号传导、调节细胞凋亡、促进血管生成等^[10]功能。1982年由Jorgensen *et al*^[11]在猪胰腺中提取胰岛素过程中首次分离得到。Thim *et al*^[12]将TFF和黏蛋白混合, 用流变法测定混合后黏液黏度改变, 发现TFF2加入胃黏蛋白后形成了弹性凝胶, 黏度增加了10倍, 正因为TFF2对黏蛋白的强亲和力和, 使他能参与胃黏膜保护及重建功能。May *et al*^[13]发现TFF2在人体胃内是以糖基化的活化形式发挥功能的。Farrell *et al*^[14]制作了TFF2基因敲除小鼠模型, 发现TFF2通过促进损伤上皮再生、减少胃酸分泌机制发挥上皮重建修复功能。同时发现所有小鼠模型胃上皮细胞没有发生癌变, 推测TFF2可能不具有肿瘤抑制作用。Dhar *et al*^[15]应用免疫组织化学染色方法检测111例手术切除的胃癌标本, 44%的肿瘤组织TFF2染色阳性, 其中弥漫性胃癌和伴淋巴结转移组织表达更甚, 同时测定肿瘤组织中血管密度, 发现TFF2表达阳性的肿瘤组织血管密度高于TFF2表达阴性组织。这些表明TFF2在胃癌的浸润和转移中起到了重要作用, 是胃癌的不良预后因子, 但其作用机制迄今尚未明确。

有多种证据表明^[16-17], 三叶因子可能通过与特定受体或蛋白质结合而发挥其生理功能, 但其结合蛋白或受体及在细胞中的信号转导途径尚未明确。国外有不少学者多年来致力于这方面的研究, 也获得了一些TFF2结合蛋白, 但一致性差。2000年, Thim *et al*^[18]提取猪TFF2作为配体进行亲和层析, 发现小肠环磷酸腺苷cAMP受体转导蛋白CRP-ductin(muclin)。2004年, Otto *et al*^[19]在鼠胃中从TFF2-碱性磷酸酶融合蛋白结合伴侣中分离出blottin。目前还没有进一步行突变分析来阐明实际的TFF2结合位点, 至今仍不知晓这2种蛋白的功能。近年来, 酵母双杂交技术被引进于结合蛋白的筛选, 但国内外尚未发现关于酵母双杂交技术用于TFF2结合蛋白筛选的报道。为进一步研究TFF2在胃癌浸润和转移中的作用机制, 本文采用酵母双杂交技术筛选人胃癌细胞cDNA文库中TFF2结合蛋白基因, 间接推测TFF2的功能及在胃癌中的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Proquest2酵母双杂交系统、酵母感受态、醋酸锂、X-a-半乳糖苷酶(Gal)、pENTR11

质粒、BP反应试剂盒、LR反应试剂盒、酵母细胞质粒提取试剂盒等购自Invitrogen公司; 限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Taq酶、dNTP、DNA Marker等购自TaKaRa公司; 酵母YPAD培养基、不含氨基酸的酵母氮碱基等购自Oxoid公司; 各种氨基酸及质粒提取试剂盒等购自博大泰克公司; PCR引物合成、测序由上海英骏公司处理; 酵母裂解液、化学发光试剂购自Phemo公司; 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司; 大肠杆菌DH5 α , 人胃癌细胞cDNA文库, 本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR法验证TFF2 mRNA表达: 用1640+胎牛血清培养基培养胃癌细胞株SGC7901, 收集两板对数生长期细胞($>10^6$), 按RT-PCR试剂盒步骤, 提取胃癌细胞总RNA, 逆转录合成cDNA, 分别以TFF2上下游引物(上游5'-ATG GTC GAC ATG GGA CGG CGA GAC GCC CA-3'; 下游5'-ATG CCG CGG CCG CTA GTA ATG GCA GTC TTC CAC AGA C-3', 产物长度为390 bp)、DAPDH上下游引物(上游5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG G-3', 下游5'-TGG AAG ATG GTG ATG GGA T-3', 产物长度为223 bp)配置PCR反应体系, 取PCR产物15 μ L加5 \times Loading Buffer 4 μ L 10 g/L琼脂糖凝胶电泳80 V, 30 min, 染色后凝胶成像仪成像。

1.2.2 诱饵质粒载体的构建: 购买TFF2-PCMV-SP6(GenBank: NM_005423.3), 聚合酶链反应(PCR)法扩增TFF2蛋白编码基因, 引入Sal I及Not I酶切位点。连接到含attP位点的pENTR11质粒中构建入门克隆, 再与含attR位点的pDEST32质粒经LR反应获得诱饵载体pDEST32-TFF2(gateway技术), 酶切及PCR鉴定后送测序鉴定。在大肠杆菌中扩增、提取诱饵质粒。

1.2.3 优化3AT浓度、验证TFF2靶蛋白表达: 将pDEST32-TFF2诱饵质粒与pDEST22空猎物种载体, 共同转化至Mav203酵母感受态细胞中, SD/-Leu/-Trp两缺固体培养基上生长, 挑取阳性克隆接种于分别含0-100 mmol/L浓度梯度氨基三唑(3-Aminotriazole, 3AT)的SD/-Leu/-Trp/-His三缺培养基上, 观察Mav203细胞的生长情况, 确定最低抑制自激活作用(指Mav203细胞自身能少量表达His)的3AT浓度。

挑取两缺固体培养基上生长的阳性克隆, 用SD/-Leu一缺液体培养基摇菌过夜, 测A值为

0.5-1.0, 4000 r/min离心收集阳性克隆细胞, 细胞干称质量, 加入等体积酵母裂解液裂解细胞, 12000 r/min离心保留上清备用。将样品及阴性对照(仅pDEST32空诱饵载体转化的Mav203细胞)的裂解上清液加入SDS上样缓冲液后100 $^{\circ}$ C煮沸10 min, 迅速置入-20 $^{\circ}$ C 2 min使蛋白充分变性。15% SDS-PAGE胶电泳跑胶, 积层胶60 V, 60 min; 分离胶80 V, 150 min, 直至溴酚蓝跑至胶底缘。80 V电转90 min将胶上的蛋白质电转移到PVDF膜。5% BSA+TBST液封闭膜1 h, 与1:1000抗-TFF2鼠单克隆抗体+BSA 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST在室温下脱色摇床上洗脱3次, 每次10 min。与1:2000羊抗鼠二抗室温孵育2 h, TBST在室温下脱色摇床上洗脱3次, 每次10 min。增强化学发光法进行放射自显影。

1.2.4 酵母双杂交及阳性克隆的筛选: 将pDEST32-TFF2与pDEST22-胃癌细胞cDNA文库共同转化到Mav203酵母细胞中, 转化菌液于含优化浓度3AT的SD/-Leu/-Trp/-His三缺培养基上生长, 所得克隆为表达His报告基因的克隆。将上述克隆接种于SD/-Leu/-Trp/-Ura三缺培养基上, 所得克隆为表达His与Ura报告基因的克隆。最后将上述克隆接种于YPAD培养皿上(含影印硝酸纤维素膜), 培养2 d后, 将影印膜上扩增的克隆用足量液氮裂解, 置于含X-gal底物的Z-buffer反应体系, 变为蓝色克隆为含有 α -半乳糖苷酶活性的阳性菌落, 即为表达His、Ura、LacZ报告基因的阳性克隆。

1.2.5 阳性克隆的生物信息学分析: 共获得35个表达His、Ura、X-gal报告基因的阳性克隆, 提取酵母质粒。应用Invitrogen公司提供的插入胃癌cDNA文库序列两端的pDEST22质粒上引物进行PCR验证, 上游引物: TCGATGATGAAGATACCCACC, 下游引物: CTCGACGTCTTACTTACTTAGC, 阳性克隆长度约为1800 bp的等长片段。转化大肠杆菌后送DNA测序。提交GenBank比对, 进行生物信息学分析。

2 结果

2.1 胃癌细胞TFF2 mRNA表达 RT-PCR反应产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 可见223 bp的GAPDH内参对照条带和390 bp的TFF2特异性扩增条带(图1)。

2.2 诱饵质粒构建及TFF2靶蛋白表达验证 构建pDEST32-TFF2经PCR、双酶切验证成功后

相关报道
2000年, Thim *et al* 提取猪TFF2作为配体进行亲和层析, 发现小肠环磷酸腺苷cAMP受体转导蛋白CRP-ductin(mucln); 2004年, Otto *et al* 在鼠胃中从TFF2-碱性磷酸酶融合蛋白结合伴侣中分离出blottin。目前还没有进一步行突变分析来阐明实际的TFF2结合位点, 至今仍不知晓这2种蛋白的功能。

创新盘点

本研究首次将酵母双杂交技术用于胃癌细胞中TFF2结合蛋白基因筛选,并验证了TFF2蛋白可能具有胃黏膜保护、参与胃癌的发生与发展的功能。

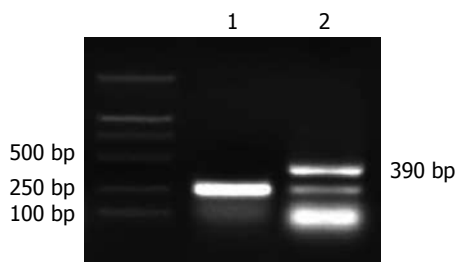


图1 胃癌细胞株SGC901 TFF2 mRNA表达.1: GAPDH; 2: TFF2.

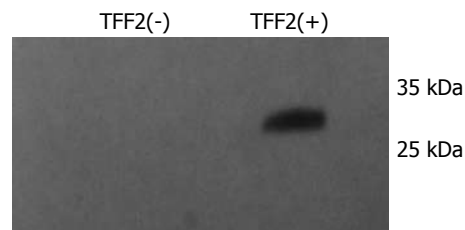


图2 pDEST32-TFF2转化MaV203后Western blot结果. TFF2(+): pDEST32-TFF2和pDEST22空猎物载体; TFF2(-): pDEST32空诱饵载体和pDEST22空猎物载体.

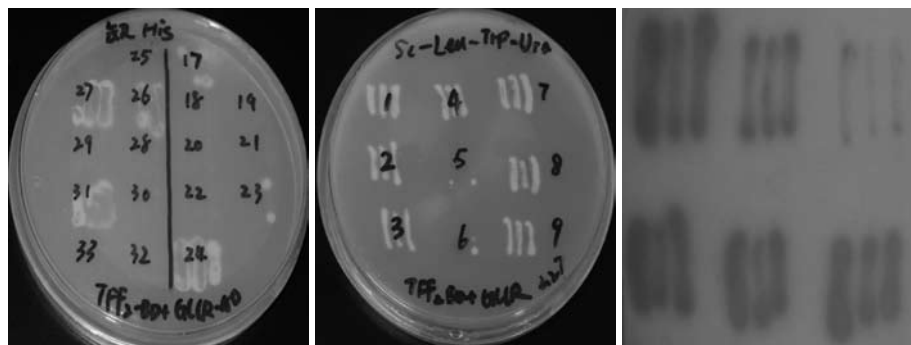


图3 酵母双杂交后报告基因表达情况. A: 缺His培养基; B: 缺Ura培养基; C: 缺LacZ培养基.

送测序,提交GenBank比对后序列正确.诱饵质粒转化酵母细胞后Western blot法可见TFF2 GAL4DBD融合蛋白表达(约31 kDa,图2).

2.3 确定最低抑制hTFF2的3AT浓度 共转化了pDEST32-hTFF2与空猎物载体pDEST22酵母细胞MaV203可在3AT浓度20 mmol/L以下的SD/-Leu/-Trp/-His培养基上生长,在20 mmol/L以上浓度3AT的培养基上则未见生长.由此确定最低抑制hTFF2自激活作用的3AT浓度为20 mmol/L.

2.4 酵母双杂交实验结果 诱饵及猎物载体共转化Mav203酵母细胞后,表达His⁺、Ura⁺、LacZ报告基因的情况如图3所示.

2.5 生物信息学分析 共获得35个表达His、Ura、X-gal报告基因的阳性克隆,其中测序成功16个克隆,包含12个已知蛋白基因和4个未知功能基因.将测序成功的12个蛋白基因翻译成氨基酸序列,与GenBank蛋白数据库进行同源性比较,获得候选的TFF2结合蛋白的基因序列和功能(表1).

3 讨论

该实验应用Invitrogen公司酵母双杂交系统筛选人胃癌文库中与TFF2蛋白候选结合蛋白,通过对已知候选蛋白功能的综述探讨,推测TFF2蛋白可能与上述候选蛋白相互作用后间接启动了胃癌发生的信号转导通路、抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤转移等机制参与了胃癌的发生发展机制.

表1 人胃癌细胞cDNA文库中候选TFF2结合蛋白

基因名	GenBank号	基因长(aa)	基因位置
醛酮还原酶1C1	NM_001353.5	320	292-1252
胃蛋白酶A前体	XM_001129398.1	334	160-1164
免疫球蛋白受体	NM_002644.2	208	3641-4266
丙酮酸激酶	NM_182471.1	142	2072-2498
含硒蛋白质	NM_003009.2	253	134-893
原肌球蛋白	NM_001018020.1	143	1367-1797
丛生蛋白	NM_203339.1	326	577-1555
多配体聚糖	NM_002999.2	167	1725-2228
SP3转录因子	NM_003111.3	296	1902-2792
四聚蛋白重复域	NM_003314.1	321	1-965
WD Repeat Domain (WDR6)	NM_018031.2	291	966-1702
细胞角蛋白7	NM_005556.3	245	966-1702

值得关注的一个候选结合蛋白是肿瘤型M2丙酮酸激酶(M2-pyruvate kinase, M2-PK),为丙酮酸激酶(PK)家族的成员之一,是糖酵解途径的一个关键酶,在三磷酸核苷(ATP)的合成过程中也起着决定性作用,有2种结构基因(L基因、M基因)和4种同工酶(L-PK、R-PK、M1-PK、M2-PK),这4种同工酶的分布表达具有组织特异性,M2-PK主要分布于胃、肠、肺、胚胎以及增殖或未分化的组织中. Schneider *et al*^[20]认为M2-PK可作为检测胃肠癌的具有重要价值的新肿瘤标志物. Kim *et al*^[21]认为M2-PK与其他经典肿瘤

标志物结合,可显著提高各种癌症诊断的灵敏度. Hardt *et al*^[22]认为M2-PK和已知的肿瘤标志物相比,在诊断胃肠癌方面的灵敏度至少是等效的,在结直肠癌中敏感性甚至优于CEA,同时还可以粪便作为非侵袭性筛查,其灵敏度达到68.8%-91.0%,在结直肠癌筛查中甚至优于大便潜血实验. 研究发现, M2-PK在肿瘤细胞中呈过度表达. M2-PK对底物ADP的亲合力大,对ATP抑制敏感性低,且不受激素和饮食调节,故M2-PK可加快糖酵解速度,为肿瘤细胞的快速增殖提供能量. 因此设想M2-PK蛋白与TFF2蛋白相互作用后促进胃癌细胞在缺氧环境下加快糖酵解速度、为胃癌细胞的快速增殖提供能量基础? 这一机制为今后胃癌的能量代谢研究提供了可能的研究方向.

值得关注的另一个候选蛋白是AKR1C1,属于醛酮还原酶(aldo-keto reductases, AKRs)超家族中的AKR1C亚型中的一员. AKR1C1又称20 α -羟基类固醇脱氢酶,是目前唯一已知的NADPH依赖性3-酮类固醇还原酶,具有3 β -HSD活性,能专一性的使5 α -双氢睾酮(5 α -DHT)转换为3 β -双氢雄酮. 3 β -双氢雄酮是一种天然的雌激素受体 β (ER β)的促凋亡性配体,而TFF基因SP1启动子旁存在着雌激素反应元件(estrogen response elements, ERE),因此设想TFF蛋白是否与雌激素受体相关AKR1C1相互作用、并通过共同的雌激素调节途径参与胃癌细胞的代谢机制? 该机制有待进一步研究.

值得关注的另外一个候选蛋白是细胞角蛋白7(cytokeratin 7, CK7),是上皮细胞骨架的组成成分,表达于上皮来源的组织或细胞中. Kirchner *et al*^[25]经实验表明,成人胃癌中CK7阳性表达的上皮细胞是一种去分化细胞,具有干细胞的某些特征,如低增殖性、胎儿样特征,致使胃上皮细胞经由肠化生、上皮内瘤变向早期胃癌发展. Gulmann *et al*^[26]经试验表明,CK7在胃、食管、胃食管交界处腺癌3处中的表达模式无明显差异,因此CK7阳性不能作为进一步鉴别胃癌、食管癌、胃食管交界处癌的肿瘤标志物. 因此我们设想是否CK7蛋白与TFF2蛋白结合后诱导胃黏膜上皮去分化参与胃癌的形成? 该机制有待今后进一步研究.

实验室筛选到多配体聚糖(syndecan 4, SDC4), Bass *et al*^[27]研究发现SDC4是一种广泛存在的跨膜蛋白多糖,是一种细胞信号转导受体,其胞质区域与一系列信号蛋白、结构蛋白

相互作用,胞外区域与一系列配体相结合,如生长因子、胞外基质蛋白等,胞内外结构域共同参与跨膜受体的活化,参与G蛋白、PKC等信号通路的调节. 实验室还筛选到四聚蛋白重复域(tetratricopeptide repeat domain 1, TTR1), Marty *et al*^[28]认为TTR1作为异源三聚体G蛋白和小GTP酶相互作用的衔接蛋白,与活化Ras蛋白结合后参与G蛋白信号通路介导的蛋白质相互作用. 因此推测TFF2蛋白与SCD4或TTCI蛋白直接或间接相互作用启动了胃癌发生机制的信号转导通路,为今后胃癌信号转导通路的研究提供了思路.

实验室筛选到SP3转录因子(SP3 transcription factor),除了已知的双向调节基因转录功能, Essafi-Benkhadir *et al*^[29]证实SP3还具有诱导细胞凋亡、促进肿瘤侵袭的双重作用;筛选到丛生蛋白(clusterin, CLU),他是一种分泌性糖蛋白, Jones *et al*^[30]认为CLU能参与膜脂循环、细胞凋亡、作为应激诱导的分泌性伴侣蛋白等功能;筛选到WDR6蛋白, Li *et al*^[31]认为WDR6主要发挥一系列重要生物学功能如信号转导、转录调节、凋亡等,同时还与一些疾病相关. 因此推测TFF2蛋白可能与SP3、CLU、WDR6等蛋白相互作用,启动了抑制肿瘤细胞的凋亡、延迟细胞G₁-S期转变使细胞更多地保持在G₁期从而降低肿瘤细胞的增殖率、上调抑癌基因的表达等机制,发挥促进或抑制肿瘤生长转移的功能,为今后进一步研究TFF2蛋白抗癌或促癌机制的研究提供了思路.

总之,我们筛选到多个TFF2相互作用蛋白,通过对12个已知候选蛋白功能的综述探讨,验证了TFF2蛋白可能具有胃黏膜保护、参与胃癌的发生发展功能,与目前已知的TFF2功能相一致,为今后研究TFF2在胃癌中的具体作用机制提供了可能的研究思路. 该实验不足之处在于酵母双杂交技术存在一定的假阳性,虽然本实验采用的是Invitrogen公司的酵母双杂交系统ProQuestTM,该系统特点是利用低复制质粒控制猎物基因表达,联合3个报告基因系统以有效的控制双杂交实验中的假阳性,因此上述候选结合蛋白与TFF2靶蛋白结合的可靠性需要进一步后续验证工作如哺乳细胞双杂交、免疫共沉淀、激光共聚焦等细胞学方法进一步研究证实.

4 参考文献

- 1 Seib T, Blin N, Hilgert K, Seifert M, Theisinger B, Engel M, Dooley S, Zang KD, Welter C. The three

应用要点
本研究通过对筛选的候选蛋白功能的综述探讨,验证了TFF2蛋白可能具有胃黏膜保护、参与胃癌的发生发展功能,与目前已知的TFF2功能相一致,为今后研究TFF2在胃癌中的具体作用机制提供了可能的研究思路.

同行评价
本文初步筛选并
克隆人胃癌细胞
cDNA文库中与
三叶因子2蛋白
相互作用蛋白的
基因,具有一定的
理论意义.

- human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics* 1997; 40: 200-202
- 2 Wong WM, Poulsom R, Wright NA. Trefoil peptides. *Gut* 1999; 44: 890-895
- 3 Thim L. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 888-903
- 4 Calnan DP, Westley BR, May FE, Floyd DN, Marchbank T, Playford RJ. The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. *J Pathol* 1999; 188: 312-317
- 5 Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 721-732
- 6 Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol* 2001; 16: 319-334
- 7 Semple JL, Newton JL, Westley BR, May FE. Dramatic diurnal variation in the concentration of the human trefoil peptide TFF2 in gastric juice. *Gut* 2001; 48: 648-655
- 8 Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC. The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1378: F61-F77
- 9 任建林, 罗金燕, 卢雅丕, 王琳, 陈建民, 施华秀, 潘金水. 三叶因子1表达与胃粘膜损伤及胃癌的关系. *第一军医大学学报* 2005; 25: 1178-1180
- 10 Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996; 274: 262-265
- 11 Jorgensen KH, Thim L, Jacobsen HE. Pancreatic spasmodic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept* 1982; 3: 207-219
- 12 Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 519-527
- 13 May FE, Semple JL, Newton JL, Westley BR. The human two domain trefoil protein, TFF2, is glycosylated in vivo in the stomach. *Gut* 2000; 46: 454-459
- 14 Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK, Wang TC. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest* 2002; 109: 193-204
- 15 Dhar DK, Wang TC, Tabara H, Tonomoto Y, Maruyama R, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N. Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6472-6478
- 16 Tan XD, Hsueh W, Chang H, Wei KR, Gonzalez-Crussi F. Characterization of a putative receptor for intestinal trefoil factor in rat small intestine: identification by in situ binding and ligand blotting. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 673-677
- 17 Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* 2000; 46: 312-320
- 18 Thim L, Mortz E. Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul Pept* 2000; 90: 61-68
- 19 Otto WR, Patel K, McKinnell I, Evans MD, Lee CY, Frith D, Hanrahan S, Blight K, Blin N, Kayademir T, Poulsom R, Jeffery R, Hunt T, Wright NA, McGregor F, Oien KA. Identification of blottin: a novel gastric trefoil factor family-2 binding protein. *Proteomics* 2006; 6: 4235-4245
- 20 Schneider J, Schulze G. Comparison of tumor M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA 19-9 and CA 72-4 in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 5089-5093
- 21 Kim CW, Kim JI, Park SH, Han JY, Kim JK, Chung KW, Sun HS. [Usefulness of plasma tumor M2-pyruvate kinase in the diagnosis of gastrointestinal cancer] *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 387-393
- 22 Hardt PD, Ewald N. Tumor M2 pyruvate kinase: a tumor marker and its clinical application in gastrointestinal malignancy. *Expert Rev Mol Diagn* 2008; 8: 579-585
- 23 Penning TM, Byrns MC. Steroid hormone transforming aldo-keto reductases and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1155: 33-42
- 24 Rizner TL, Smuc T, Ruprecht R, Sinkovec J, Penning TM. AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248: 126-135
- 25 Kirchner T, Muller S, Hattori T, Mukaisyo K, Papadopoulos T, Brabletz T, Jung A. Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. *Virchows Arch* 2001; 439: 512-522
- 26 Gulmann C, Counihan I, Grace A, Patchett S, Leen E, Leader M, Kay E. Cytokeratin 7/20 and mucin expression patterns in oesophageal, cardia and distal gastric adenocarcinomas. *Histopathology* 2003; 43: 453-461
- 27 Bass MD, Humphries MJ. Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem J* 2002; 368: 1-15
- 28 Marty C, Browning DD, Ye RD. Identification of tetratricopeptide repeat 1 as an adaptor protein that interacts with heterotrimeric G proteins and the small GTPase Ras. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 3847-3858
- 29 Essafi-Benkhadir K, Grosso S, Puissant A, Robert G, Essafi M, Deckert M, Chamorey E, Dassonville O, Milano G, Auberger P, Pages G. Dual role of Sp3 transcription factor as an inducer of apoptosis and a marker of tumour aggressiveness. *PLoS One* 2009; 4: e4478
- 30 Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 427-431
- 31 Li D, Roberts R. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 2085-2097

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

拆方益肝康不同药物血清对肝星状细胞胶原代谢及TGF- β 1的影响

房澍名, 姚冬梅, 张晓岚, 姚希贤

房澍名, 姚冬梅, 张晓岚, 姚希贤, 河北医科大学第二医院消化科, 河北省消化病重点实验室 河北省消化病研究所 河北省石家庄市 050000

房澍名, 医学博士, 副教授, 主要从事慢性肝病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30872513

河北省中医药管理局基金资助项目, No. 200335

作者贡献分布: 此课题由房澍名、姚冬梅、张晓岚及姚希贤共同设计; 研究过程由房澍名与姚冬梅操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由姚希贤提供; 数据分析由房澍名、姚冬梅及张晓岚完成; 本论文撰写由房澍名完成。

通讯作者: 房澍名, 副教授, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化科, 河北省消化病重点实验室, 河北省消化病研究所。fhm1212@126.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2009-07-08 修回日期: 2009-09-05

接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-09-28

Seropharmacological effects of Yigankang Decoction and its separated recipe on collagen metabolism and transforming growth factor-beta 1 expression in hepatic stellate cells

Shu-Ming Fang, Dong-Mei Yao, Xiao-Lan Zhang, Xi-Xian Yao

Shu-Ming Fang, Dong-Mei Yao, Xiao-Lan Zhang, Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Gastroenterology, Hebei Institute of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872513; and the Foundation of Hebei Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 200335

Correspondence to: Professor Shu-Ming Fang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. fhm1212@126.com

Received: 2009-07-08 Revised: 2009-09-05

Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate the seropharmacological effects of Yigankang Decoction and its separated recipe on collagen metabolism and transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) expression in hepatic stellate cells (HSCs) and explore the antifibrotic mechanism of Yigankang Decoction.

METHODS: Normal rats and rats with carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis were administered Yigankang Decoction and its separated recipe (containing radix salvia militiorrhizae, astragalus and angelica sinensis), respectively, to prepare medicated sera. After medicated rat sera were incubated with subcultured HSCs, the synthesis of collagen was evaluated by ³H-proline incorporation assay, and the expression of TGF- β 1 mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: All kinds of medicated rat sera prepared in the study could inhibit ³H-proline incorporation at a concentration of 100 or 200 mL/L (normal rat sera at 100 mL/L: 2275.00 \pm 114.30 cpm *vs* 2401.87 \pm 108.50 cpm *vs* 2963.62 \pm 128.01 cpm; fibrotic rat sera at 100 mL/L: 2205.31 \pm 108.97 cpm *vs* 2462.70 \pm 177.02 cpm *vs* 3179.12 \pm 223.34 cpm; normal rat sera at 200 mL/L: 372.96 \pm 123.3 cpm *vs* 2515.37 \pm 98.25 cpm *vs* 3209.38 \pm 110.75 cpm; fibrotic rat sera at 200 mL/L: 2394.29 \pm 150.50 cpm *vs* 2611.25 \pm 126.05 cpm *vs* 3490.46 \pm 183.16 cpm; all *P* < 0.05 or 0.01), and decrease the expression of TGF- β 1 mRNA and protein at a concentration of 100 mL/L (all *P* < 0.01). The sera from rats medicated with Yigankang Decoction had more significant inhibitory effects on ³H-proline incorporation and TGF- β 1 expression than those from rats medicated with the separated recipe (all *P* < 0.01). The sera from medicated fibrotic rats were superior to those from medicated normal rats in the downregulation of TGF- β 1 expression (Yigankang Decoction: TGF- β 1 mRNA, 0.356 \pm 0.032 *vs* 0.568 \pm 0.028; TGF- β 1 protein, 0.458 \pm 0.009 *vs* 0.639 \pm 0.102; the separated recipe: TGF- β 1 mRNA, 0.601 \pm 0.047 *vs* 0.810 \pm 0.051; TGF- β 1 protein, 0.612 \pm 0.126 *vs* 0.860 \pm 0.138; all *P* < 0.05 or *P* < 0.01).

CONCLUSION: Both Yigankang Decoction and its separated recipe can inhibit collagen synthesis in HSCs perhaps through inhibition of TGF- β 1 expression. Sera from rats medicated with Yigankang Decoction and from fibrotic rats were superior to those from rats medicated

背景资料

肝纤维化目前尚无满意的治疗方法, 中医中药显示出良好的前景。中药复方益肝康经多年的临床与实验研究被证实具有抗肝纤维化作用。本研究旨在观察该方及其拆方对HSC胶原代谢及TGF- β 1的影响, 并对血清药理学方法进行探讨。

同行评议者

李勇, 副教授, 上海中医药大学附属中医医院消化科

研究背景

中药复方益肝康具有多层次、多靶点的抗肝纤维化作用,但尚无益肝康与拆方对比、正常大鼠药物血清与肝纤维化大鼠药物血清对比,来观察其对HSC胶原代谢及TGF- β 1影响和机制的研究,这也是中药开发的难点和热点。

with the separated recipe and from normal rats in inhibiting collagen synthesis and decreasing TGF- β 1 expression, respectively.

Key Words: Yigankang Decoction; Hepatic fibrosis; Hepatic stellate cell; Transforming growth factor β -1; Seropharmacology

Fang SM, Yao DM, Zhang XL, Yao XX. Seropharmacological effects of Yigankang Decoction and its separated recipe on collagen metabolism and transforming growth factor- β 1 expression in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2773-2777

摘要

目的: 探讨益肝康抗肝纤维化作用机制、配伍意义,并采用对比血清药理学方法探讨更为科学的中药研究方法。

方法: 分别制备益肝康及其拆方-丹参小复方正常大鼠(A组, A1组: 正常大鼠血清对照组; A2组: 正常大鼠丹参小复方血清组; A3组: 正常大鼠益肝康血清组)与肝纤维化大鼠(B组, B1组: 肝纤维化大鼠血清对照组; B2组: 肝纤维化大鼠丹参小复方血清组; B3组: 肝纤维化大鼠益肝康血清组)药物血清,温育体外培养的HSC, ^3H -脯氨酸掺入法检测胶原合成, Western blot技术检测TGF- β 1蛋白表达, RT-PCR技术检测TGF- β 1 mRNA表达。

结果: 益肝康及丹参小复方正常大鼠与肝纤维化大鼠药物血清均可以抑制HSC胶原合成(100 mL/L时A组: 2275.00 ± 114.30 cpm, 2401.87 ± 108.50 cpm vs 2963.62 ± 128.01 cpm; B组: 2205.31 ± 108.97 cpm, 2462.70 ± 177.02 cpm vs 3179.12 ± 223.34 cpm; 200 mL时A组: 2372.96 ± 123.3 cpm vs 2515.37 ± 98.25 cpm vs 3209.38 ± 110.75 cpm; B组: 2394.29 ± 150.50 cpm vs 2611.25 ± 126.05 cpm vs 3490.46 ± 183.16 cpm, $P < 0.05$ 或 0.01), 100 mL时降低TGF- β 1基因及蛋白表达(均 $P < 0.01$)。2组在胶原合成、TGF- β 1基因及蛋白表达益肝康组作用优于丹参小复方(均 $P < 0.01$), 而益肝康组与丹参小复方组比较则B组血清作用优于A组(益肝康组: TGF- β 1基因: 0.356 ± 0.032 vs 0.568 ± 0.028 ; TGF- β 1蛋白: 0.458 ± 0.009 vs 0.639 ± 0.102 ; 丹参小复方组: 0.601 ± 0.047 vs 0.810 ± 0.051 ; 0.612 ± 0.126 vs 0.860 ± 0.138 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

结论: 益肝康及丹参小复方均可抑制HSC胶原合成,其主要机制之一是抑制TGF- β 1基因和蛋白表达,益肝康更具配伍意义,肝纤维化大鼠药物血清药效优于正常大鼠血清药效。

关键词: 益肝康; 肝纤维化; 肝星状细胞; 转化生长因子 β -1; 血清药理学

房澍名, 姚冬梅, 张晓岚, 姚希贤. 拆方益肝康不同药物血清对肝星状细胞胶原代谢及TGF- β 1的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(27): 2773-2777

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2773.asp>

0 引言

系列研究表明,以丹参等活血化瘀药为主组方的益肝康有较好的抗肝纤维化作用^[1-5]。为深入了解该方的抗肝纤维化作用机制、配伍意义以及探讨更为科学的中药研究方法,我们采用对比血清药理学方法,即分别提取正常大鼠和CCl₄造模肝纤维化大鼠益肝康及其拆方-丹参小复方(丹参、黄芪、归尾)的药物血清,作用于体外培养的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC),探讨该方对HSC胶原代谢及转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)基因与蛋白表达的影响,以探讨新的药物作用靶点及配伍意义,并采用对比血清药理学方法观察在体药物与正常及病态机体相互作用的差异。

1 材料和方法

1.1 材料 益肝康由丹参、黄芪、归尾、赤芍等9味药组成,丹参小复方由丹参、黄芪、归尾3味药组成,丹参小复方组中药物用量与益肝康组单味药用量一致,由河北省消化病研究所制备成浓缩水煎剂灌胃液,生药浓度0.72 kg/L。健康 δ SD大鼠96只,清洁级,体质量280-330 g,购自河北医科大学实验动物中心。 ^3H -脯氨酸(^3H -Pro)购自中国原子能科学研究院。小鼠抗TGF- β 1 mAb购自美国Santa Cruz公司。兔抗鼠Actin多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。HRP标记的山羊抗小鼠IgG、ECL发光试剂盒、浓缩型DAB试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。蛋白Marker购自北京鼎国生物技术有限公司。硝酸纤维素膜与DNA marker购自华美生物工程公司。RT-PCR扩增系统购自美国Promega公司。总RNA提取试剂盒购自北京博大泰克生物技术有限公司。TGF- β 1引物由上海生工生物工程公司合成。其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 药物血清制备: 将大鼠随机分为甲组(正常大鼠药物血清组)和乙组(肝纤维化大鼠药物血清组),每组48只,乙组大鼠给予400 mL/L CCl₄纯制花生油溶液sc,首剂4 mL/kg,以后改为

2 mL/kg, 每周2次, 共9 wk; 甲组大鼠给予纯制花生油sc, 剂量及时间同乙组^[6]. 9 wk后各组随即抽取3只大鼠, 取肝组织进行HE染色, 鉴定造模成功后将2组大鼠各随机分为3小组, 每组15只, 甲1/乙1: 对照组, 甲2/乙2: 丹参小复方组, 甲3/乙3: 益肝康组, 药物组按成人每千克体质量10倍用量每日分2次给予益肝康/丹参小复方水煎剂ig, 连续5 d, 对照组以生理盐水ig. 第6天按常规量再ig 1次, 1 h后, 下腔静脉取血, 静置3 h, 3000 r/min低温离心20 min, 分离血清, 56℃灭活30 min, 过滤除菌, 加入RPMI 1640培养液, 分别配制含50、100、200 mL/L药物/对照血清的培养基.

1.2.2 实验分组: A组: 正常大鼠药物血清组, B组: 肝纤维化大鼠药物血清组, 每组各再分为3小组, A1组: 正常大鼠血清对照组, A2组: 正常大鼠丹参小复方血清组, A3组: 正常大鼠益肝康血清组; B1组: 肝纤维化大鼠血清对照组, B2组: 肝纤维化大鼠丹参小复方血清组, B3组: 肝纤维化大鼠益肝康血清组, 每组6复孔或6培养瓶.

1.2.3 对HSC胶原合成的影响: 采用³H-Pro掺入法. 将HSC以每孔 6.0×10^3 的密度接种于96孔培养板, 培养箱中孵育长至亚单层, 换无血清的RPMI 1640继续培养24 h, 使细胞基本同步化于G₀期; 分别添加50、100及200 mL/L的正常及肝纤维化大鼠益肝康/丹参小复方药物血清, 200 μ L/孔, 温育6 h后, 每孔加入0.3 μ Ci的³H-Pro, 继续温育18 h; 2.5 g/L胰蛋白酶消化, 将细胞抽滤到玻璃纤维纸上, 蒸馏水洗涤抽滤数次, 60℃烘干, 置于闪烁杯中, 加入5 mL闪烁液, 于液体闪烁计数仪上测定样品放射性(cpm).

1.2.4 对HSC TGF- β 1蛋白表达的影响: 采用Western blot方法. 接种 2.0×10^5 - 3.0×10^5 个细胞于25 cm²培养瓶, 孵育至细胞近100%融合时, 换不含胎牛血清的培养液继续培养24 h, 使细胞基本同步化于G₀期后, 分别添加100 mL/L的正常及肝纤维化大鼠益肝康/丹参小复方药物血清, 5 mL/瓶, 温育HSC 24 h后, 提取HSC胞质蛋白, 进行100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳; 冷却状态下转膜, 170 mA, 恒流, 1 h; 1:100小鼠抗TGF- β 1 mAb 4℃密封过夜; 1:1000辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG室温密封摇动孵育2 h; ECL发光剂显色1 min, X光片暗室曝光30 s至数分钟, 显影、定影, 密度扫描分析, 灰度值以TGF- β 1与Actin的积分吸光度(A)的比值表示.

1.2.5 对HSC TGF- β 1 mRNA表达的影响: 采用RT-PCR方法. 接种 2.0×10^5 - 3.0×10^5 个细胞于

25 cm²培养瓶, 孵育至细胞近100%融合时, 换不含胎牛血清的培养液继续培养24 h, 使细胞基本同步化于G₀期后, 分别添加100 mL/L的正常及肝纤维化大鼠益肝康/丹参小复方药物血清, 5 mL/瓶, 温育HSC 24 h后, 提取HSC总RNA, 进行完整性鉴定及纯度和定量检测, 取2 μ g总RNA进行RT-PCR, 使用50 μ L反应体系分别扩增TGF- β 1和 β -actin. TGF- β 1引物序列: 上游5'-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGTGC-3', 下游5'-CACGATCATGTTGGACAACTGCTCC-3'(扩增产物大小为298 bp), β -actin: 上游5'-GTCACCACACTGTGCCCATCT-3', 下游5'-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGAG-3'(扩增产物大小为542 bp), 具体循环参数如下, RT: 48℃, 45 min; PCR: 94℃预变性2 min进入循环, 94℃变性30 s, 60℃退火1 min, 68℃延伸1.5 min, 经40个循环扩增后68℃延伸7 min. 取10 μ L RT-PCR产物及10 μ L DNA Marker进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 采用MULIT IMAGE凝胶图像分析仪进行吸光度扫描, 结果以TGF- β 1与 β -actin的积分吸光度的比值表示.

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析, 应用最小显著差法(LSD)进行两两比较, $P < 0.05$ 为有统计学差异.

2 结果

2.1 对HSC胶原合成的影响 2种方法制备的益肝康及丹参小复方药物血清对HSC的³H-Pro掺入均有抑制作用. A组(正常大鼠药物血清)中, 益肝康及丹参小复方药物血清50 mL/L浓度组对³H-Pro掺入抑制作用与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$), 而100、200 mL/L浓度组均具有显著性差异($P < 0.01$); B组(肝纤维化大鼠药物血清)中: 各浓度益肝康及丹参小复方药物血清组与对照组相比均具有显著性差异($P < 0.05$, 0.01). 相应浓度的益肝康药物血清对³H-Pro掺入抑制作用优于丹参小复方药物血清, 具有显著性差异($P < 0.05$, 0.01). 肝纤维化大鼠药物血清对³H-Pro掺入抑制作用优于正常大鼠药物血清($P < 0.05$, 表1).

2.2 对HSC TGF- β 1蛋白表达的影响 两种方法制备的益肝康及丹参小复方药物血清均可显著抑制TGF- β 1蛋白表达($P < 0.01$), 益肝康作用优于丹参小复方($P < 0.01$), 肝纤维化大鼠药物血清组作用优于正常大鼠药物血清组($P < 0.01$, 图1, 表2).

创新盘点
本研究将益肝康进行拆方, 以HSC胶原代谢及TGF- β 1为靶点探讨该方抗肝纤维化机制及配伍意义, 并将正常大鼠药物血清与肝纤维化大鼠药物血清进行药效学对比, 观察不同状态机体对药物代谢的差异.

应用要点

本研究探讨了中药复方益肝康新的作用靶点及配伍意义,为进一步重组、精简组方及抗肝纤维化中药新药开发提供理论依据,并建立“对比血清药理学方法”,提供了一种具有普遍性的中药研究方法学基础。

表 1 益肝康及丹参小复方不同药物血清对HSC胶原合成的影响 (mean \pm SD, $n = 6$)

分组	放射性(cpm)	抑制率(%)	分组	放射性(cpm)	抑制率(%)
A1组	2604.11 \pm 86.40		B1组	2866.56 \pm 188.19	
A2组	2574.51 \pm 125.25	1.14	B2组	2657.16 \pm 149.36 ^a	7.30
A3组	2555.63 \pm 105.79	1.86	B3组	2453.82 \pm 201.63 ^{bc}	14.48
A1组	2963.62 \pm 128.01		B1组	3179.12 \pm 223.34	
A2组	2401.87 \pm 108.50 ^b	18.95	B2组	2462.70 \pm 177.02 ^b	22.53
A3组	2275.00 \pm 114.30 ^{bc}	23.20	B3组	2205.31 \pm 108.97 ^{bd}	30.68
A1组	3209.38 \pm 110.75		B1组	3490.46 \pm 183.16	
A2组	2515.37 \pm 98.25 ^b	21.62	B2组	2611.25 \pm 126.05 ^b	25.19
A3组	2372.96 \pm 123.30 ^{bc}	26.00	B3组	2394.29 \pm 150.50 ^{bc}	31.47

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs A1组、B1组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs A2组、B2组。

表 2 益肝康及丹参小复方不同药物血清对HSC TGF- β 1蛋白及mRNA表达的影响 (mean \pm SD, $n = 6$)

分组	蛋白		mRNA	
	正常组(100 mL/L)	肝纤维化组(100 mL/L)	正常组(100 mL/L)	肝纤维化组(100 mL/L)
对照组	1.851 \pm 0.150	1.878 \pm 0.153	1.194 \pm 0.042	1.267 \pm 0.045
丹参小复方组	0.860 \pm 0.138 ^b	0.612 \pm 0.126 ^b	0.810 \pm 0.051 ^b	0.601 \pm 0.047 ^b
益肝康组	0.639 \pm 0.102 ^{bd}	0.458 \pm 0.009 ^{bd}	0.568 \pm 0.028 ^{bd}	0.356 \pm 0.032 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 丹参小复方组。

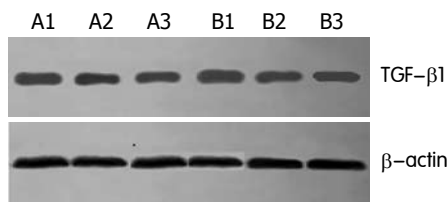


图 1 益肝康及丹参小复方不同药物血清对HSC TGF- β 1蛋白表达的影响。A1: 正常大鼠血清对照组; A2: 丹参小复方正常大鼠药物血清组; A3: 益肝康正常大鼠药物血清组; B1: 肝纤维化大鼠血清对照组; B2: 丹参小复方肝纤维化大鼠药物血清组; B3: 益肝康肝纤维化大鼠药物血清组。

2.3 对HSC TGF- β 1 mRNA的表达 两种方法制备的益肝康及丹参小复方药物血清均可显著抑制TGF- β 1基因表达($P < 0.01$), 益肝康作用优于丹参小复方($P < 0.01$), B组作用优于A($P < 0.01$), 图2, 表2)。

3 讨论

肝纤维化是所有慢性肝病进展成肝硬化的共同病理基础与必经阶段, 是影响慢性肝病预后的重要环节^[7-8]。肝纤维化的病理学基础为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增加, 降解减少, 导致胶原过度沉积^[9]。HSC是肝脏ECM的主要来源, 是肝纤维化形成的细胞学基础^[10-11]。

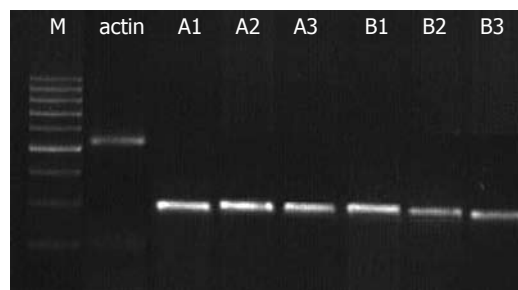


图 2 益肝康及丹参小复方不同药物血清对HSC TGF- β 1 mRNA表达的影响。A1: 正常大鼠血清对照组; A2: 丹参小复方正常大鼠药物血清组; A3: 益肝康正常大鼠药物血清组; B1: 肝纤维化大鼠血清对照组; B2: 丹参小复方肝纤维化大鼠药物血清组; B3: 益肝康肝纤维化大鼠药物血清组。

细胞因子是细胞间信号转导、联系的重要物质基础, HSC活化的启动及延续过程中始终贯穿着细胞因子的网络调节^[12]。由于细胞因子在肝纤维化形成过程中的重要作用, 提示通过控制某些关键细胞因子的活性治疗肝纤维化的可能性。TGF- β 1是目前所知最强大的促胶原生成因子, 与细胞膜上的相应受体结合后可激活HSC, 促进HSC分泌I、III、IV型胶原、纤维连接蛋白和整合素等, 使ECM合成增加, 并通过抑制基质金属蛋白酶及促进基质金属蛋白酶抑制剂和纤溶酶原激活物抑制因子的活性使ECM降解减少,

还可诱导肝细胞凋亡, 促进血小板衍生长因子受体的表达, 是肝纤维化形成与发展过程中最为关键的细胞因子之一^[13-14]. HSC株是从CCl₄诱发的肝硬化大鼠中分离并通过培养使细胞自发获得永久性, 表型为活化的HSC, 是较为理想的肝纤维化研究模型.

肝纤维化属中医“胁痛”、“癥积”、“血瘀”范畴, 病变部位主要关乎肝脾两脏, 肝郁脾虚是本病形成的主要病理基础, 血瘀是本病主要病机特点, 治疗应以活血化瘀为主, 益气健脾为辅. 中药复方益肝康系重用丹参, 辅以当归、赤芍等活血化瘀, 并用黄芪等益气健脾药而成. 为明确益肝康抗肝纤维化的作用机制、配伍意义及进一步简化组方, 本研究所长期以来对该复方有关单味药、丹参小复方及益肝康进行了大量临床与实验研究, 结果表明该方具有减轻症状, 改善肝功能, 抑制HSC活化、增殖, 促进HSC凋亡, 抗脂质过氧化, 保护受损肝细胞及线粒体等细胞器功能等作用, 而且目前尚未发现明显不良反应^[1-5]. 本研究表明益肝康、丹参小复方药物血清均可显著抑制HSC胶原合成及TGF- β 1基因和蛋白表达, 说明该复方作用机制之一是从mRNA和蛋白水平抑制TGF- β 1表达, 从而抑制HSC ECM的合成, 发挥抗肝纤维化作用. 而药物配伍后的益肝康组(A3, B3)较丹参小复方组(A2, B2)具有更为显著的作用, 可能与药物科学配伍后的相辅相乘作用使抗肝纤维化有效成分增加有关, 充分体现了中医君臣佐使配方的整体优势.

血清药理学方法在中药研究中被广泛采用, 但实际临床中服药者大多为病患, 且肝脏作为体内最重要的药物代谢转化器官, 其不同的生理及病理状态对药物代谢转化过程必有不同影响, 而传统血清药理学方法未能解决此类问题. 本部分实验采用“改良血清药理学方法”与传统血清药理学方法进行对比研究, 结果表明肝纤维化大鼠药物血清对HSC胶原合成及TGF- β 1基因与蛋白表达的抑制作用均优于正常大鼠药物血清, 分析原因, 是否系中医辨证论治的特点使得该方对肝纤维化病态机体更具针对性, 疗效更明显? 抑或与肝纤维化大鼠肝功能受损, 对药物的转化、代谢能力降低, 从而导致病态机

体内药物有效成分浓度提高, 作用时间延长, 使抗肝纤维化作用增强有关? 中药作用机制及有效物质的研究一直是中药新药开发的热点和难点, 已成为中药发展的瓶颈, 血清药理学为科学阐明中药复方的有效成分及作用机制提供了一种有力的工具, 但在实验技术上还需要进一步探讨、规范和完善^[15-16].

4 参考文献

- 1 姚希贤, 张亚平, 赵霞. 益肝康抑制肝星状细胞 型胶原合成的作用机制. 中西医结合肝病杂志 2007; 17: 159-161
- 2 房澍名, 姚冬梅, 王军民, 姚金峰, 姚希贤. 益肝康及其拆方对肝星状细胞活化增殖及胶原代谢影响的研究. 河北医药 2008; 30: 1481-1482
- 3 Zhang YP, Yao XX, Zhao X. Interleukin-1 beta up-regulates tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA and phosphorylation of c-jun N-terminal kinase and p38 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1392-1396
- 4 赵霞, 姚希贤, 张亚平, 郑文明. 益肝康等活血化瘀中药抑制IL-1 β 刺激的HSC增殖及TIMP-1的表达. 世界华人消化杂志 2006; 14: 173-178
- 5 Yao XX, Jiang SL, Tang YW, Yao DM, Yao X. Efficacy of Chinese medicine Yi-gan-kang granule in prophylaxis and treatment of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2583-2590
- 6 Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl₄. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 583-587
- 7 Wallace K, Burt AD, Wright MC. Liver fibrosis. *Biochem J* 2008; 411: 1-18
- 8 Rockey DC. Antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 95-107
- 9 Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- 10 Sarem M, Znaidak R, Macias M, Rey R. [Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions] *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 93-101
- 11 Urtasun R, Nieto N. [Hepatic stellate cells and oxidative stress] *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 223-230
- 12 Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 129-140
- 13 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 14 Ma HH, Yao JL, Li G, Yao CL, Chen XJ, Yang SJ. Effects of c-myc antisense RNA on TGF-beta1 and beta1-I collagen expression in cultured hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3662-3665
- 15 李静, 殷飞, 姚树坤. 血清药理学研究进展. 中国中医基础医学杂志 2009; 15: 234-236
- 16 郭功玲, 李吉华. 中药血清药理学实验方法研究进展. 山东医药 2008; 48: 116-117

同行评价
本文思路较清晰, 实验设计合理, 统计学处理恰当, 具有一定的科学性 & 先进性, 为抗纤维化中药研究提供了一种新的思路.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

芦荟大黄素和吡喹酮联合治疗对血吸虫肝纤维化小鼠 TGF- β /Smad通路的影响

吴艳艳, 何生松, 邓敏

背景资料
芦荟大黄素和芦荟素是芦荟主要药用成分, 临床研究表明其具有抗菌、消炎、杀虫、抗癌、泻下、抗衰老等功效。芦荟大黄素作为一种新的可能的药物, 其功效被广泛研究。

吴艳艳, 何生松, 华中科技大学同济医学院协和医院感染科 湖北省武汉市 430022

邓敏, 华中科技大学同济医学院协和医院感染管理科 湖北省武汉市 430022

吴艳艳, 2009年华中科技大学同济医学院博士, 主要从事肝纤维化的研究。

作者贡献分布: 此课题由吴艳艳与何生松设计; 研究过程由吴艳艳、何生松及邓敏操作完成; 研究所用试剂与分析工具由何生松提供; 数据分析由吴艳艳完成; 本论文写作由吴艳艳、何生松及邓敏完成。

通讯作者: 何生松, 教授, 主任医师, 博士生导师, 430022, 湖北省武汉市汉口区解放大道1227号, 华中科技大学同济医学院协和医院感染科. shengshe168@yahoo.com.cn

电话: 027-85726135

收稿日期: 2009-06-11 修回日期: 2009-08-10

接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-09-28

Effects of combined use of aloemodin and praziquantel on the transforming growth factor- β /Smad pathway in mice with schistosomiasis-induced liver fibrosis

Yan-Yan Wu, Sheng-Song He, Min Deng

Yan-Yan Wu, Sheng-Song He, Department of Infectious Diseases, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Min Deng, Department of Infection Control, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Sheng-Song He, Department of Infectious Diseases, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, 1227 Jiefang Avenue, Hankou District, Wuhan 430022, Hubei Province, China. shengshe168@yahoo.com.cn

Received: 2009-06-11 Revised: 2009-08-10

Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of combined use of aloemodin and praziquantel on the transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad pathway in mice with schistosomiasis-induced liver fibrosis.

METHODS: Eighty mice were randomly divided into four groups: normal control group, infec-

tion group, praziquantel treatment group, and praziquantel and aloemodin treatment group. Mice in the infection group and the two treatment groups were infected with 25 *Schistosoma japonicum* cercariae. Eight weeks after infection, mice in the praziquantel treatment group were treated with praziquantel at a dose of 500 mg/(kg·d) for two days, while those in the praziquantel and aloemodin treatment group were treated with praziquantel at the same dose for the same duration followed by treatment with aloemodin at a dose of 0.3 mg/(kg·d) for 8 weeks. At week 16, all mice were sacrificed to take liver tissue samples. Hematoxylin and eosin staining was performed to observe changes in hepatic histopathology. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of Smad2 and Smad7 mRNAs in the liver. Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of TGF- β 1, TIMP-1, and type I and III collagen in liver tissue.

RESULTS: Aloemodin treatment relieved the degree of hepatic fibrosis. The expression levels of Smad2 mRNA and TGF- β 1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP1), and type I and III collagen proteins in liver tissue were significantly lower in the praziquantel and aloemodin treatment group than in the infection group and the praziquantel treatment group ($q = 6.20$ and 4.38 , 6.22 and 4.41 , 6.30 and 4.52 , 6.25 and 4.44 , and 6.29 and 4.48 , respectively; all $P < 0.01$ or 0.05). In contrast, the expression level of Smad7 mRNA was significantly higher in the praziquantel and aloemodin treatment group than in the infection group and the praziquantel treatment group ($q = 6.32$ and 4.62 , respectively; $P < 0.01$ and 0.05 , respectively).

CONCLUSION: Aloemodin exerts anti-fibrotic effects perhaps through downregulation of the expression of Smad2 mRNA and TGF- β 1, TIMP1, and type I and III collagen proteins, and upregulation of the expression of Smad7 mRNA.

Key Words: Schistosomiasis; Liver fibrosis; Aloem-

同行评议者
范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

modin; Praziquantel; Transforming growth factor β 1; Smad2; Smad7

Wu YY, He SS, Deng M. Effects of combined use of aloemodin and praziquantel on the transforming growth factor- β /Smad pathway in mice with schistosomiasis-induced liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2778-2783

摘要

目的: 探讨芦荟大黄素和吡喹酮的联合治疗对血吸虫肝纤维化小鼠TGF- β /Smad通路的影响。

方法: 80只小鼠随机分为4组。前3组每只小鼠感染日本血吸虫尾蚴25条。感染8 wk后, 第一组小鼠以吡喹酮500 mg/(kg·d)治疗2 d(吡喹酮组), 第二组小鼠以吡喹酮500 mg/(kg·d)治疗2 d后用芦荟大黄素0.3 mg/(kg·d)治疗8 wk(吡喹酮+芦荟大黄素组), 第三组不作任何治疗(实验对照组), 第四组小鼠作为正常对照。第16周末处死小鼠留取肝脏组织, 应用HE染色法、RT-PCR法和免疫组织化学染色法观察、分析各组小鼠肝脏病理改变与Smad2 mRNA、Smad7 mRNA、TGF- β 1、TIMP-1、I型胶原及II型胶原的表达变化。

结果: 芦荟大黄素治疗后血吸虫肝纤维化程度减轻, 肝组织中Smad2 mRNA、TGF- β 1、TIMP-1、I型胶原、II型胶原的表达明显低于实验对照组和吡喹酮组($q = 6.20, 4.38; q = 6.22, 4.41; q = 6.30, 4.52; q = 6.25, 4.44; q = 6.29, 4.48, P < 0.01$ 或 0.05); 肝组织中Smad7 mRNA的表达, 明显高于实验对照组和吡喹酮组($q = 6.32, 4.62, P < 0.01$ 或 0.05)。

结论: 芦荟大黄素可通过降低肝组织中TGF- β 1、TIMP-1、I型胶原、II型胶原的表达, 抑制Smad2基因的表达, 促进Smad7的表达发挥抗肝纤维化作用。

关键词: 血吸虫; 肝纤维化; 芦荟大黄素; 吡喹酮; 转化生长因子 β 1; Smad2; Smad7

吴艳艳, 何生松, 邓敏. 芦荟大黄素和吡喹酮联合治疗对血吸虫肝纤维化小鼠TGF- β /Smad通路的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(27): 2778-2783
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2778.asp>

0 引言

芦荟作为传统的中药, 具有良好的抗菌、消炎、抗肿瘤、抗辐射损伤、降压降糖、抗衰老及预防艾滋病等药理作用。而芦荟大黄素和芦

荟素是芦荟主要药用成分, 临床研究表明其具有抗菌、消炎、杀虫、抗癌、泻下、抗衰老等功效。Arosio *et al*^[1]发现, 芦荟大黄素对CCl₄所致的小鼠急性肝损害有保护作用, 不仅能阻止肝细胞的死亡, 而且对脂质过氧化引起的炎症反应有保护作用。罗霄山^[2]发现芦荟大黄素能显著抑制CCl₄造成的肝细胞及细胞膜脂质过氧化产物丙二醛(MDA)水平的升高。但目前尚无芦荟大黄素对血吸虫肝纤维化治疗作用及机制的研究。本实验以日本血吸虫尾蚴感染小鼠建立早期血吸虫肝纤维化模型, 经吡喹酮杀虫后再予芦荟大黄素治疗, 观察吡喹酮、芦荟大黄素干预前后肝组织病理改变及Smad2 mRNA、Smad7 mRNA、TGF- β 1、TIMP-1、I、II型胶原的表达变化, 以评估和探讨芦荟大黄素对杀虫治疗后肝纤维化进展的抑制作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 芦荟大黄素(质量分数98%, 批号041006)购自南京替斯艾么中药研究所。TGF- β 1、TIMP-1、I型胶原和II型胶原抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司, 均为多克隆抗体。乙醇、异丙醇、氯仿、溴乙锭(EB)均为分析纯。TRIzol试剂购于美国Gibco BRL公司。一步法逆转录聚合酶链反应试剂盒购自大连TaKaRa公司。DEPC水购于晶美生物工程公司。DNA酶购自美国Promega公司。Smad2引物(购于大连TaKaRa公司, 产物194 bp): 上游: 5'-ATAGTGCAATCTTTG TGCAG-3'; 下游: 5'-CATTCTTATGGTGCACATT C-3'。Smad7引物(购于大连TaKaRa公司, 产物228 bp): 上游: 5'-GTGTTGCTGTGAATCTTACG-3'; 下游: 5'-AGAAGAAGTTGGGAATCTGA-3'。GAPDH引物(购于大连TaKaRa公司, 产物233 bp): 上游: 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG -3'; 下游: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'。

1.2 方法

1.2.1 分组及处理: 清洁级昆明小鼠80只, 雌雄各半, 体质量20-25 g, 4-6周龄(购自同济医学院动物实验中心)。随机均分为4组, 每组20只。吡喹酮组: 每只小鼠感染日本血吸虫尾蚴25条(下同), 感染尾蚴8 wk后用吡喹酮(由华中科技大学同济医学院寄生虫教研室提供)灌胃治疗2 d, 剂量为500 mg/(kg·d), 溶于生理盐水, 每只1 mL/d; 吡喹酮+芦荟大黄素组: 感染尾蚴8 wk后用吡喹酮灌胃治疗2 d后, 继以芦荟大黄素灌胃治疗8 wk, 剂量为0.3 mg/(kg·d), 溶于生理盐水, 每只1 mL/d;

研发前沿
多年来, 国内外学者在血吸虫肝纤维化的发生机制、调节因素、诊断及治疗方面进行了大量卓有成效的研究, 尽管实验药物很多, 但仍缺乏能应用于临床的、高效、无明显不良反应的西药。中医药治疗血吸虫肝纤维化在改善临床症状等方面体现了很大的潜力。

相关报道

Arosio *et al*发现, 芦荟大黄素对CCl₄所致的小鼠急性肝损害有保护作用, 不仅能阻止肝细胞的死亡, 而且对脂质过氧化引起的炎症反应有保护作用。罗霄山发现芦荟大黄素能显著抑制CCl₄造成的肝细胞及细胞膜脂质过氧化产物丙二醛(MDA)水平的升高。

表 1 各组小鼠肝脏纤维化程度 (n)

分组	0	I	II	III	合计
正常对照组	20	0	0	0	20
实验对照组	0	0	4	7	11
吡喹酮组	0	4	4	5	13
吡喹酮+芦荟大黄素组	0	11	2	2	15

实验对照组: 感染尾蚴8 wk后以生理盐水灌胃8 wk, 每只1 mL/d; 正常对照组: 未感染血吸虫尾蚴, 正常方法饲养16 wk。第16周末以2%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉小鼠, 分别取各组小鼠肝组织。

1.2.2 肝组织切片: HE染色检测取肝左叶组织, 用甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE染色, 观察肝组织的病理学变化。肝纤维化程度依病情轻重分4级^[3]: 0级: 正常; I级: 胶原纤维包绕肉芽肿周围并插入其中; II级: 汇管区有大量纤维化, 小叶间仅有少量纤维; III级: 纤维组织大量延伸至小叶间。

1.2.3 肝组织TGF-β1、TIMP-1、I型胶原和III型胶原的检测: 采用免疫组织化学法[链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC法)]检测。肝组织切片3 μm, 脱蜡至水, 用PBS水化10 min。用含5 mL/L H₂O₂的甲醇溶液室温孵育30 min后, PBS洗3次, 每次5 min。滴加正常血清封闭液, 室温孵育30 min后, 甩去多余液体, 不洗。分别滴加兔抗小鼠TGF-β1、TIMP-1、I型胶原和III型胶原抗体(均为1:50), 4℃孵育过夜。PBS洗3次, 每次5 min。滴加生物素标记的羊抗兔IgG, 于37℃孵育30 min后, PBS洗3次, 每次5 min。滴加链霉亲和素-生物素-辣根过氧化物酶(S-A/HRP)工作液, 于37℃孵育30 min后, PBS洗3次, 每次5 min。在0.05% DAB溶液中加入H₂O₂至终浓度为0.03%, 以此作为显色液, 镜下控制显色。显色满意后, 用梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。同时设有阳性对照和阴性对照。TGF-β1、TIMP-1、I型胶原和III型胶原免疫组化染色切片于物镜20倍视野下, 每组随机选取20个视野, 用HMIAS-2000型全自动医学彩色图像分析系统(武汉千屏医学影像技术有限责任公司)测定细胞内棕黄色颗粒的平均吸光度(A)值。

1.2.4 RT-PCR检测肝组织Smad2 mRNA和Smad7 mRNA表达: 使用TRIzol试剂提取RNA, 经反转录和PCR扩增程序得扩增产物。扩增产物用15

g/L琼脂糖凝胶电泳, 加样量为10 μL, 电压120 V, 电泳完毕后在EB中染色, 在紫外灯下观察结果并照相。用Multi-Analyst软件包进行半定量分析。单位肝组织Smad2 mRNA和Smad7 mRNA的相对含量用Smad2和Smad7条带平均积分与GAPDH条带平均积分(A)值表示。

统计学处理 RT-PCR与免疫组织化学结果均以mean±SD表示。使用SPSS12.0软件行方差分析, 两两比较采用SNK-*q*检验。肝脏纤维化程度为等级资料, 用Ridit分析, *P*<0.05表示差异显著, 有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织普通病理变化 光镜下, 正常对照组小鼠肝组织未见任何病变。实验对照组、吡喹酮组以及吡喹酮+芦荟大黄素联合治疗组与正常组相比, 发现众多慢性虫卵肉芽肿, 其虫卵周围包绕梭形细胞和胶原纤维, 亦可见少部分急性虫卵肉芽肿, 汇管区有大量炎性细胞浸润; 肉芽肿和小静脉周围的胶原纤维束向肝小叶周围延伸。在病变程度和病变范围上, 吡喹酮组比实验对照组明显减轻(*P*<0.01); 吡喹酮+芦荟大黄素联合治疗组比吡喹酮组明显减轻(*P*<0.05, 图1)。根据肝纤维化程度级别标准, 统计每组小鼠各级别的鼠数(表1)。

2.2 各组小鼠肝脏组织TGF-β1和TIMP-1蛋白表达的变化 正常对照组肝内未见明显TGF-β1和TIMP-1阳性着色。吡喹酮组、实验对照组肝内TGF-β1和TIMP-1呈棕黄色, 呈片状分布于虫卵肉芽肿内及其周围汇管区、肝血窦。吡喹酮+芦荟大黄素联合治疗组肝内TGF-β1和TIMP-1分布区域同上, 但着色少而浅。吡喹酮+芦荟大黄素联合治疗组小鼠与实验对照组相比, TGF-β1和TIMP-1含量下降非常显著(*P*<0.01); 与吡喹酮组相比, TGF-β1和TIMP-1含量明显下降(*P*<0.05), 但其含量仍比正常组高(*P*<0.01)。吡喹酮组肝组织中TGFβ-1和TIMP-1含量比实验对照组有显著下降(*P*<0.01), 但其含量仍比正常组高(*P*<0.01, 表2, 图2-3)。

2.3 各组小鼠肝组织中Smad2、Smad7基因表达的变化 各组小鼠RT-PCR光带吸光度强弱呈梯度变化(图4)。芦荟大黄素、吡喹酮联合治疗组与实验对照组相比, Smad2 mRNA表达下降非常显著(*P*<0.01), Smad7 mRNA表达上升非常显著(*P*<0.01); 与吡喹酮组相比, Smad2 mRNA表达显著下降(*P*<0.05), Smad7 mRNA表达显著上

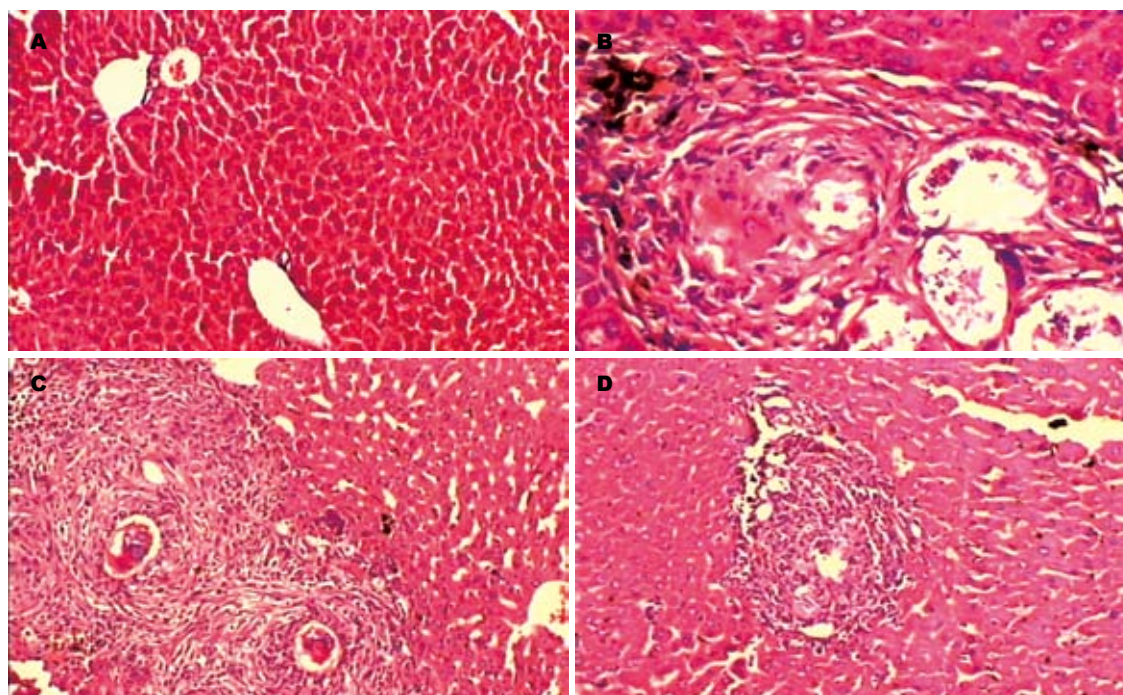


图 1 各组小鼠肝脏组织病理变化(HE \times 100). A: 正常组; B: 实验对照组; C: 吡喹酮组; D: 吡喹酮+芦荟大黄素组.

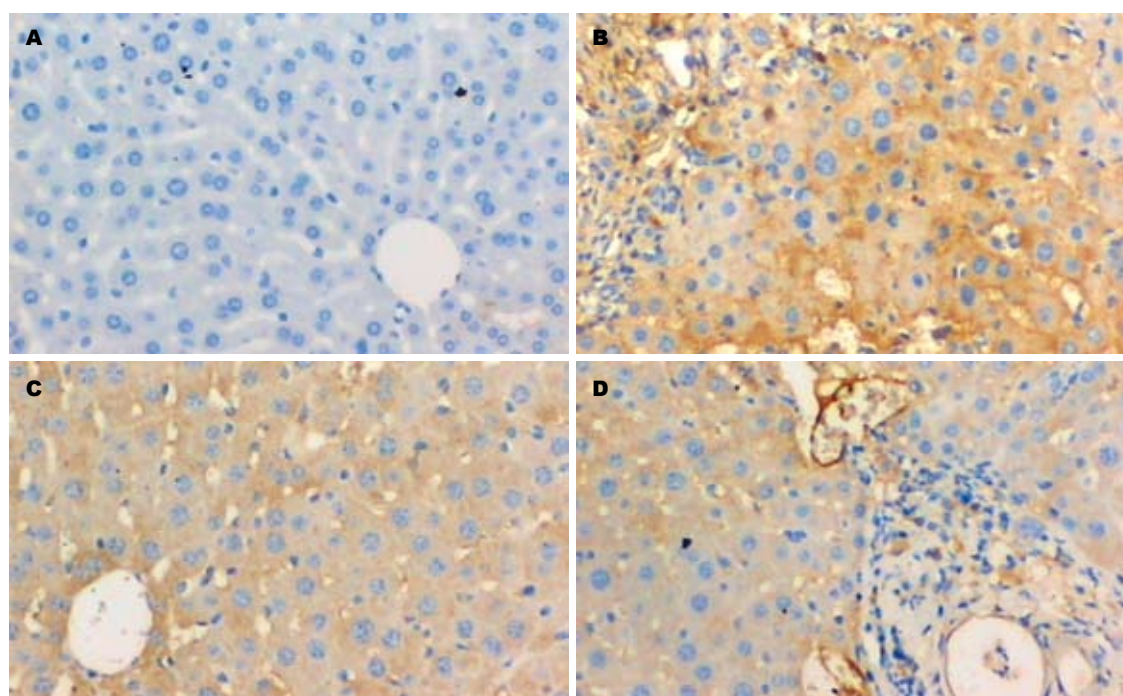


图 2 各组小鼠肝脏组织TGF- β 1蛋白的表达(SABC \times 200). A: 正常组; B: 实验对照组; C: 吡喹酮组; D: 吡喹酮+芦荟大黄素组.

升; 但Smad2 mRNA表达仍比正常组高($P < 0.01$), Smad7 mRNA表达仍比正常组低($P < 0.01$). 吡喹酮组肝组织中Smad2 mRNA表达比实验对照组显著下降($P < 0.05$), 但其含量仍比正常组高($P < 0.01$); 吡喹酮组肝组织中Smad7 mRNA表达比实验对照组显著升高($P < 0.01$), 但其含量仍比正常组低($P < 0.01$, 表3).

2.4 各组小鼠肝组织中 I 型和 III 型胶原含量的变化 正常对照组肝内无明显胶原着色. 吡喹酮组、实验对照组肝内 I 和 III 型胶原呈棕黄色, 密集片状, 主要分布在虫卵肉芽肿内及汇管区. 吡喹酮、芦荟大黄素联合治疗组肝内虫卵肉芽肿普遍较小, 胶原分布较少, 与实验对照组相比, I 和 III 型胶原含量下降非常显著($P < 0.01$);

创新盘点
本实验以日本血吸虫尾蚴感染小鼠建立早期血吸虫肝纤维化模型, 经吡喹酮杀虫后再予芦荟大黄素治疗, 观察吡喹酮、芦荟大黄素干预前后肝组织病理改变及Smad2 mRNA、Smad7 mRNA、TGF- β 1、TIMP1、I、III型胶原的表达变化.

应用要点

芦荟大黄素可通过降低肝组织中TGF- β 1、TIMP-1、 α 1型胶原、 α 2型胶原的表达,抑制Smad2基因的表达,促进Smad7的表达发挥抗肝纤维化作用。

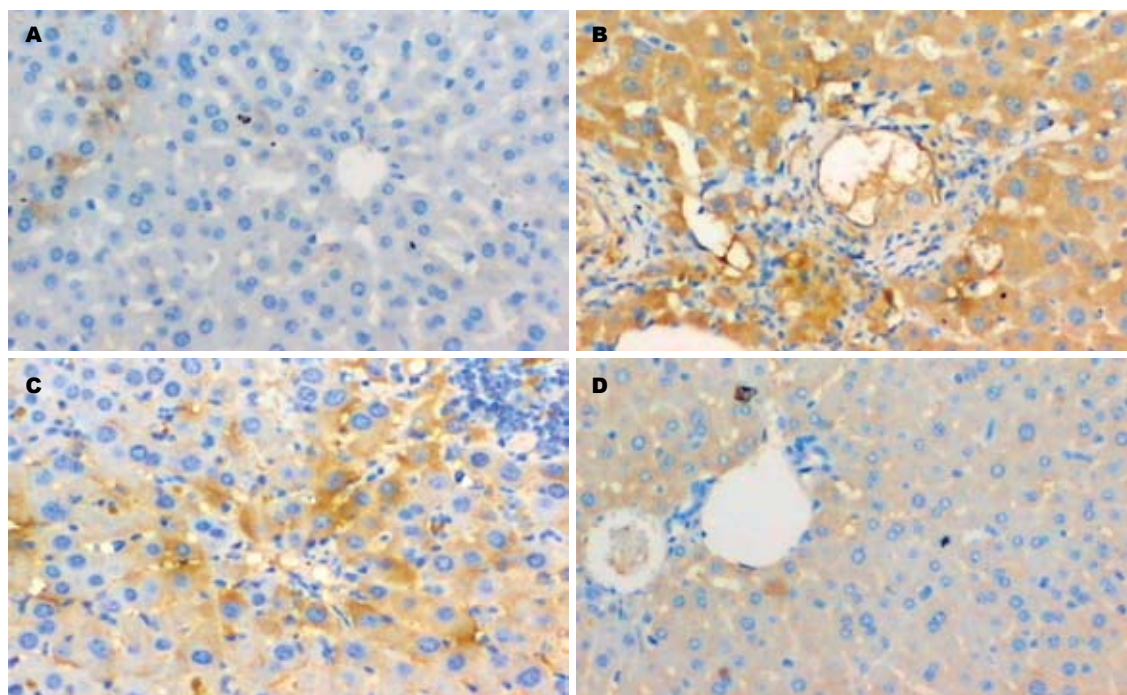


图3 各组小鼠肝脏组织TIMP-1蛋白的表达(SABC $\times 200$)。A: 正常组; B: 实验对照组; C: 吡嗪酮组; D: 吡嗪酮+芦荟大黄素组。

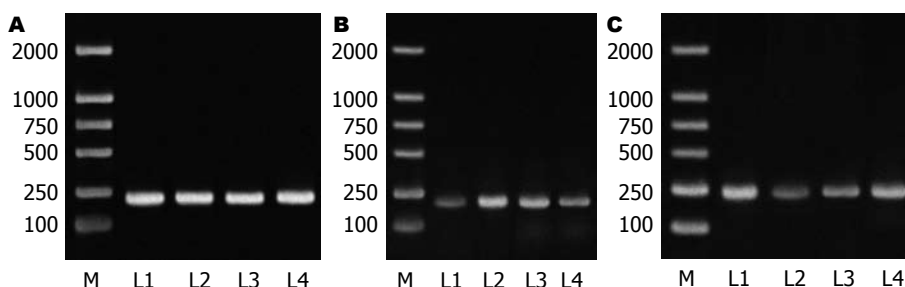


图4 各组小鼠肝脏组织中mRNA表达。A: GAPDH; B: Smad2; C: Smad7。M: Marker; L1: 正常对照组; L2: 实验对照组; L3: 吡嗪酮组; L4: 吡嗪酮+芦荟大黄素组。

表2 各组小鼠肝脏组织TGF- β 1和TIMP-1蛋白表达 (mean \pm SD)

分组	TGF- β 1	TIMP-1
正常对照组	0.0684 \pm 0.0089	0.0530 \pm 0.0116
实验对照组	0.2775 \pm 0.0810 ^b	0.2586 \pm 0.0387 ^b
吡嗪酮组	0.2124 \pm 0.0531 ^{bd}	0.1830 \pm 0.0244 ^{bd}
吡嗪酮+芦荟大黄素组	0.1615 \pm 0.0326 ^{bde}	0.1341 \pm 0.0343 ^{bde}

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^d $P < 0.01$ vs 实验对照组; ^e $P < 0.05$ vs 吡嗪酮组。

表3 各组小鼠肝脏组织Smad2、Smad7 mRNA基因表达 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	Smad2	Smad7
正常对照组	0.1906 \pm 0.0393	0.8139 \pm 0.0795
实验对照组	0.8286 \pm 0.0892 ^b	0.1846 \pm 0.0426 ^b
吡嗪酮组	0.7068 \pm 0.0786 ^{bd}	0.5249 \pm 0.0501 ^{bd}
吡嗪酮+芦荟大黄素组	0.5689 \pm 0.0439 ^{bde}	0.6987 \pm 0.0658 ^{bde}

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^d $P < 0.01$ vs 实验对照组; ^e $P < 0.05$ vs 吡嗪酮组。

与吡嗪酮组相比,其含量显著下降($P < 0.05$);但其含量仍比正常组高($P < 0.01$)。吡嗪酮组肝组织中I和III型胶原含量比实验对照组显著下降($P < 0.01$),但其含量仍比正常组高($P < 0.01$,表4)。

3 讨论

目前认为,在各种损伤性因素的始动作用下,肝

星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活是肝纤维化发生发展的中心环节,激活的“持久化”是HSC激活状态的维持及产生纤维化的过程。HSC就是在各细胞因子,如: TGF- β 1、血小板衍生的生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、肿瘤坏死因子- α (tumor

表 4 各组小鼠肝脏组织 I、III 型胶原表达 (mean \pm SD)

分组	I 型胶原	III 型胶原
正常对照组	0.0811 \pm 0.0004	0.0702 \pm 0.0003
实验对照组	0.2235 \pm 0.0218 ^b	0.1925 \pm 0.0187 ^b
吡喹酮组	0.1895 \pm 0.0232 ^{bd}	0.1623 \pm 0.0192 ^{bd}
吡喹酮+芦荟大黄素组	0.1654 \pm 0.0212 ^{bde}	0.1348 \pm 0.0186 ^{bde}

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^d $P < 0.01$ vs 实验对照组; ^e $P < 0.05$ vs 吡喹酮组。

necrosis factor α , TNF- α)等作用下被激活而发生细胞增殖, 其表面分子及膜受体表达发生改变, 最终转化为肌成纤维细胞, 其中TGF- β 1是最关键的致纤维化因子, 他是通过对HSC、肝实质细胞、肝窦内皮细胞等细胞, 以及对与纤维化有关的其他生长因子和调节基质代谢的各种酶类施加广泛影响, 从而起到致纤维化的作用, 他在肝纤维化的启动、发展乃至肝硬化的形成中发挥了核心作用。TGF- β 必须与靶细胞表面高亲和力的TGF- β 受体(T β R)结合才能发挥生物学效应。TGF- β 1与II型T β R亲和力最高。TGF- β 1二聚体与II型T β R细胞外段结合后, II型T β R胞内段丝氨酸自身磷酸化, 自身激活, 进而与I型T β R结合形成异源四聚体, 磷酸化I型T β R胞内近膜区的GS域的丝氨酸, 使其活化。活化的I型T β R作用于胞质Smad蛋白, 使Smad发生丝氨酸磷酸化, Smad形成同源或异源寡聚体后进入细胞核, 调节相应基因的转录^[4]。目前许多研究表明, 干扰TGF- β 信号途径是治肝纤维化的有效方法^[5]。曾军 *et al*^[6]研究显示, 动物血吸虫肝纤维化往往伴随肝脏组织TGF- β 增加, HSC数量进行性增多, Smad3 mRNA表达显著增高, Smad7则初期升高、中晚期进行性下降, 提示肝纤维化发生发展与TGF- β /Smad信号通路密切相关。Dooley *et al*^[7]研究显示体内基因转移Smad7可以抑制实验性肝纤维化的发生, 对体外培养HSC的研究发现, 其机制可能是抑制TGF- β 信号转导通路和HSC的分化转移。Zhang *et al*^[8]研究显示, 血吸虫肝纤维化时, 肝脏组织Smad2 mRNA水平在血吸虫尾蚴感染小鼠的第12周和第24周均降低。Uemura *et al*^[9]研究显示, Smad3增加HSC纤维蛋白和I型胶原

的沉积, Smad2增加HSC的增生。本实验发现, 血吸虫肝纤维化时, 小鼠肝脏TGF- β 1含量增加, Smad2 mRNA表达增加, 这与Zhang *et al*的研究结果不符, 可能是实验所用的小鼠种系不同。我们的研究显示, 血吸虫肝纤维化时, Smad7 mRNA表达降低, 这与曾军 *et al*研究结果一致。吡喹酮和芦荟大黄素的联合治疗可降低小鼠肝脏TGF- β 1含量, 使小鼠肝脏Smad2 mRNA表达降低, 并且增高小鼠肝脏Smad7 mRNA的表达。在肝脏损害中, Smad7对TGF- β 信号通路的负反馈调节对肝细胞起到保护作用^[10]。以上这些提示: 吡喹酮和芦荟大黄素的联合治疗可能通过影响TGF- β /Smad信号通路发挥抗肝纤维化作用。

4 参考文献

- 1 Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, De Castri D, Moscheni C, Annoni G. Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacol Toxicol* 2000; 87: 229-233
- 2 罗青山. 芦荟大黄素对CCl₄损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用. *中医学药刊* 2003; 21: 1101-1102
- 3 Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002; 35: 62-73
- 4 Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis in vivo and hepatic stellate cell line in vitro. *Pathol Int* 2003; 53: 18-26
- 5 García BL, Gálvez GJ, Armendáriz BJ. [Therapeutical targets for revert liver fibrosis] *Rev Med Chil* 2007; 135: 783-791
- 6 曾军, 杨镇, 李崇健, 邹卫龙, 高志强, 李涛. 实验性血吸虫病肝纤维化中TGF- β 1 Smad3 Smad7的表达变化及意义. *中国血吸虫病防治杂志* 2004; 16: 269-273
- 7 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191
- 8 Zhang BB, Jiao YW, Cai WM, Tao J, Zheng M, Dong FQ, Liu RH. [Studies on Smads at transcription level in liver fibrosis of mice with Schistosomiasis japonica] *Zhongguo Jishengchongxue Yu Jishengchongbing Zazhi* 2004; 22: 154-156
- 9 Uemura M, Swenson ES, Gaça MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4214-4224
- 10 Hamzavi J, Ehnert S, Godoy P, Ciucan L, Weng H, Mertens PR, Heuchel R, Dooley S. Disruption of the Smad7 gene enhances CCl₄-dependent liver damage and fibrogenesis in mice. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2130-2144

同行评价
本文设计合理, 统计学方法应用恰当, 结论有价值, 对临床治疗有一定的指导价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

丹红注射液对重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织ET-1、eNOS和iNOS基因表达的影响

范辉, 胡雅兵, 王小红, 沈云志

背景资料
在重症急性胰腺炎(SAP)的发生过程中,微循环障碍是重要的作用机制之一。而在舒缩血管的活性介质中,以ET-1为代表的缩血管介质和NO、PGI₂代表的舒血管介质起着不同的调节作用。传统观点认为,在脏器微循环障碍的发生过程中由于早期缩血管物质作用过强、舒血管介质不足加重了微循环的损害。

范辉, 胡雅兵, 王小红, 沈云志, 常州市第一人民医院(苏州大学附属第三医院)消化内科 江苏省常州市 213003
范辉, 博士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的基础与临床工作。
作者贡献分布: 所有作者对这篇文章所作贡献均等; 此课题在沈云志教授的指导下, 由范辉与王小红共同探讨和设计; 实验过程由范辉与王小红共同操作完成; 数据分析由胡雅兵与范辉完成; 本论文写作由范辉与胡雅兵完成; 由沈云志教授提出整体思路与修改意见。

通讯作者: 沈云志, 教授, 213003, 江苏省常州市局前街185号, 常州市第一人民医院(苏州大学附属第三医院)消化内科。

shyfan961129@yahoo.com.cn

电话: 0519-86181102

收稿日期: 2009-06-30 修回日期: 2009-08-24

接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-28

Effects of Danhong Injection on the expression of endothelin-1, endothelial nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase mRNAs in the pancreas in rats with severe acute pancreatitis

Hui Fan, Ya-Bing Hu, Xiao-Hong Wang, Yun-Zhi Shen

Hui Fan, Ya-Bing Hu, Xiao-Hong Wang, Yun-Zhi Shen, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Changzhou, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Porfessor Yun-Zhi Shen, Department of Gastroenterology, the First People's hospital of Changzhou, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, 185 Juqian Street, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China. shyfan961129@yahoo.com.cn

Received: 2009-06-30 Revised: 2009-08-24

Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of Danhong Injection on pancreatic injury and the expression of endothelin-1 (ET-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNAs in the pancreas in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Ninety-six male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group ($n = 32$), SAP model group ($n = 32$) and Danhong Injection treatment group ($n = 32$). The

expression of eNOS, iNOS and ET-1 mRNAs in the pancreas was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The contents of ET-1 and nitric oxide (NO) in the blood were detected by radioimmunoassay (RIA) and nitrate reductase method (NRM), respectively. Pancreatic pathological changes were observed and scored.

RESULTS: Compared with the SAP model group, the expression levels of ET-1 and iNOS mRNAs decreased significantly (ET-1: 4 h: 0.31 ± 0.15 vs 0.58 ± 0.17 , 8 h: 0.45 ± 0.16 vs 0.72 ± 0.31 , 12 h: 0.73 ± 0.19 vs 1.19 ± 0.28 , 24 h: 0.64 ± 0.26 vs 0.92 ± 0.36 ; iNOS: 4 h: 0.32 ± 0.10 vs 0.65 ± 0.11 , 8 h: 0.36 ± 0.14 vs 0.73 ± 0.08 , 12 h: 0.43 ± 0.07 vs 0.87 ± 0.15 , 24 h: 0.32 ± 0.06 vs 0.82 ± 0.16 , all $P < 0.05$), the expression levels of eNOS mRNA increased significantly (4 h: 0.55 ± 0.12 vs 0.25 ± 0.11 , 8 h: 0.53 ± 0.10 vs 0.27 ± 0.12 , 12 h: 0.60 ± 0.12 vs 0.24 ± 0.10 , 24 h: 0.56 ± 0.13 vs 0.28 ± 0.16 , all $P < 0.05$), and pancreatic pathological scores decreased significantly (12 h: 4.73 ± 1.29 vs 7.19 ± 1.28 , 24 h: 5.64 ± 1.26 vs 8.92 ± 2.16 , both $P < 0.05$) in the Danhong Injection treatment group.

CONCLUSION: Danhong Injection could decrease the expression of iNOS and ET-1 genes, increase the expression of eNOS gene in the pancreas, and alleviate pancreatic injury in rats with severe acute pancreatitis.

Key Words: Acute pancreatitis; Nitric oxide synthase; Nitric oxide; Endothelin-1; Gene

Fan H, Hu YB, Wang XH, Shen YZ. Effects of Danhong Injection on the expression of endothelin-1, endothelial nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase mRNAs in the pancreas in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2784-2790

摘要

目的: 探讨重症急性胰腺炎(SAP)大鼠胰腺组织中内皮素-1(ET-1)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)及诱生型一氧化氮合酶(iNOS)基因的影响。

同行评议者
姜慧卿, 教授, 河北医科大学第二医院消化科; 唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

表达与胰腺组织损伤的关系以及中药丹红注射液对其基因表达的影响。

方法: 96只SD雄性大鼠分为对照组(A组)、SAP模型组(B组)及丹红治疗组(C组); 用RT-PCR分别检测不同时间点各组大鼠胰腺组织中ET-1、eNOS及iNOS基因的表达; 分别用放射免疫法、硝酸还原酶法测不同时间点各组大鼠测血液中ET-1、NO浓度; 观察各组不同时间点的胰腺组织病理变化, 并对胰腺组织损伤进行评分。

结果: 与B组比较, C组可明显降低胰腺组织各时间点ET-1、iNOS基因的表达(ET-1: 4 h: 0.31 ± 0.15 vs 0.58 ± 0.17 , 8 h: 0.45 ± 0.16 vs 0.72 ± 0.31 , 12 h: 0.73 ± 0.19 vs 1.19 ± 0.28 , 24 h: 0.64 ± 0.26 vs 0.92 ± 0.36 ; iNOS: 4 h: 0.32 ± 0.10 vs 0.65 ± 0.11 , 8h: 0.36 ± 0.14 vs 0.73 ± 0.08 , 12 h: 0.43 ± 0.07 vs 0.87 ± 0.15 , 24 h: 0.32 ± 0.06 vs 0.82 ± 0.16 , 均 $P < 0.05$), 上调eNOS基因的表达(4 h: 0.55 ± 0.12 vs 0.25 ± 0.11 , 8 h: 0.53 ± 0.10 vs 0.27 ± 0.12 , 12 h: 0.60 ± 0.12 vs 0.24 ± 0.10 , 24 h: 0.56 ± 0.13 vs 0.28 ± 0.16 , 均 $P < 0.05$)。且可明显降低C组大鼠12、24 h时间点胰腺病理评分(12 h: 4.73 ± 1.29 vs 7.19 ± 1.28 , 24 h: 5.64 ± 1.26 vs 8.92 ± 2.16 , 均 $P < 0.05$)。

结论: 丹红注射液可下调重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织中ET-1与iNOS基因的表达, 上调eNOS基因的表达, 改善胰腺组织病理损伤。

关键词: 急性胰腺炎; 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 内皮素; 基因

范辉, 胡雅兵, 王小红, 沈云志. 丹红注射液对重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织ET-1、eNOS和iNOS基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2784-2790

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2784.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是消化内科急腹症, 在SAP病程中、以及由SAP并发的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)及多器官衰竭(multiple organs failure, MOF)过程中, 胰腺和其他脏器的微循环障碍起了重要作用。引起微循环障碍血管活性介质包括缩血管介质和舒血管介质, 前者主要以内皮素(endothelin, ET-1)为代表, 后者主要有一氧化氮(nitric oxide, NO)、缓激肽等。ET-1使胰腺微血

管痉挛, 减少胰腺血流, ET-1还与胰腺腺泡ET-1受体结合, 使腺泡细胞内钙超载, 损伤胰腺细胞, 引起腺泡坏死。在生理状态下, NO由内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)合成, 此时NO具有松弛血管平滑肌细胞, 抑制白细胞黏附和血小板凝聚, 对脏器有保护作用。在病理状态下, 由诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)合成的NO占血液中NO的绝大多数, 过量NO的使脏器毛细血管过度扩张, 微循环淤血, 毛细血管通透性增高, 血管平滑肌对缩血管物质的反应性降低等, 引起严重的低血压和循环衰竭。本研究旨在探讨不同时间点SAP大鼠胰腺组织ET-1、eNOS、iNOS基因表达、血清ET-1、NO浓度与胰腺组织损伤之间的关系, 以及应用中药丹红注射液对SAP大鼠胰腺组织ET-1、eNOS、iNOS基因表达和血清ET-1、NO浓度的影响以及对胰腺损伤的防治作用。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂健康SD大鼠96只, 体质量250-300 g, 由南通大学实验动物中心提供。L-精氨酸(250 g/L)购自上海第一生化制药厂产品(国药准字H31020517)。丹红注射液采用济南步长制药有限公司生产的制剂(国药准字Z20026866)。丹红注射液是由丹参和红花2味药物组成, 其中含丹参素为8.3 g/L, 原儿茶醛为1.3 g/L, 丹参酚酸B为6.4 g/L, 总黄酮5.0 g/L。

1.2 方法

1.2.1 造模及给药方法: 将96只清洁级SD大鼠随机分为3组, 即正常对照组(A组), SAP组(B组)和治疗组(C组), 实验前禁食12 h, 自由饮水。B、C组造模按照文献介绍方法给予腹腔注射25 g/L浓度L-精氨酸(剂量3.2 g/kg质量)2次, 间隔1 h^[1-2], B组于第2次注射L-精氨酸后1 h按照文献[3]报道予以肌注丹红注射液1.6 mL/(kg·d), 分2次, 间隔3 h。对照组动物肌注等量的生理盐水。每组于注射L-精氨酸诱导SAP模型术后4, 8, 12, 24 h 4个时间点采用断颈法各处死动物8只, 开腹腔提取胰腺组织。

1.2.2 光镜检查: 取胰腺头部组织于40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋、切片及HE染色, 由病理科医师按照Rongione^[4]评分法对胰腺组织病理进行双盲评分: (1)水肿: 0 = 缺少; 1 = 于叶间隔部水肿; 2 = 小叶间间隔部水肿; 3 = 腺泡间隔部水肿; 4 = 细胞间间隔部水肿; (2)炎症浸润:

研发前沿
在SAP的发生、发展过程中, 血清中ET-1和NO的浓度如何随病程发展而变化, 其基因表达与血清浓度、病理损害之间关系如何? 目前尚无系统的研究, 探索各个途径的作用及其相互关系是SAP微循环损害的热点、重点问题和难点问题之一。

相关报道

Chen *et al* 使用血小板活化因子(PAF)拮抗剂改善脏器灌注, 并认为PAF拮抗剂能够有效减轻全身和局部炎症反应, 改善患者预后。Jung *et al* 使用活血化淤的中药制剂可以改善急性胰腺炎动物模型和患者血清ET-1浓度, 改善患者临床症状和预后。

表 1 ET-1、eNOS和iNOS引物序列及长度

分组	引物序列	基因	NCBI库号	长度 (bp)
eNOS - F'	AAGACCGATTACACGACATTG	eNOS	NM_021838	278
eNOS - R'	AGTGACATCACCGCAGACA			
iNOS - F'	CAGTTCTGTGCCTTTGCTCA	iNOS	NM_012611	309
iNOS - R'	CATGGTGAACACGTTCTTGG			
ET1 - F'	TTCTCTCTGCTGTTTGTGG	ET1	NM_012548	587
ET1 - R'	CAATGTGCTCGGTTGTG			
Rn-actin - F'	GAGAGGGAAATCGTGCCTGAC	β -actin	NM_031144	453
Rn-actin - R'	CATCTGCTGGAAGGTGGACA			

表 2 各组胰腺组织病理学评分结果 (mean \pm SD)

分组	4 h	8 h	12 h	24 h
A组	0.38 \pm 0.18	0.35 \pm 0.12	0.34 \pm 0.16	0.40 \pm 0.15
B组	3.58 \pm 0.47 ^a	4.72 \pm 1.41 ^a	7.19 \pm 1.28 ^a	8.92 \pm 2.16 ^a
C组	3.31 \pm 0.15	4.25 \pm 1.16	4.73 \pm 1.29 ^c	5.64 \pm 1.26 ^c

^a $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B组。

0 = 缺少; 1 = 位于导管边缘; 2 = 于小叶实质内(<50%); 3 = 于小叶实质内(51%-75%); 4 = 于小叶实质内(>75%); (3)空泡形成; 0 = 缺少; 1 = 导管周围(<5%); 2 = 灶发性(5%-20%); 3 = 扩散性(21%-50%); 4 = 广泛严重性(>50%); (4)坏死: 0 = 缺少; 1 = 1-4/HPF; 2 = 5-10/HPF; 3 = 11-15/HPF; 4 \geq 16/HPF。每只大鼠的胰腺组织病理评分为以上4项评分相加后的分值。

1.2.3 血清ET-1、NO检测: 血清ET-1浓度采用放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)测定, 仪器为CAP-16型放免仪, 放免试剂盒由北京北方生物技术研究所提供, NO采用硝酸还原酶法(nitrate reductase method, NRM)测定, 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 按照说明书的方法测定NO。

1.2.4 RT-PCR检测: 胰腺组织内ET-1、eNOS和iNOS-mRNA表达的检测采用RT-PCR(reverse transcription-PCR)法检测。引物序列见表1。引物由百奥生物技术(南通)有限公司实验室合成。采用两步法RT-PCR, 取5 μ L PCR产物跑1.0%琼脂糖电泳利用凝胶分析软件(Image J), 计算检测基因与 β -actin的积分吸光度(A)比值来表示目的基因的表达量。

统计学处理 应用SAS V8.0统计软件包进行数据处理, 所有数据均用mean \pm SD来表示, 经Levene方差齐性分析, 若方差齐, 采用完全

随机设计多组均数比较的方差分析(analysis of variance), 两两比较行S-N-K检验, 取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺病理改变 A组大鼠胰腺组织未见明显异常病变; B组大鼠胰腺出现出血坏死, 多为凝固性坏死, 残留腺泡呈孤立性分布, 腺管坏死; C组病理改变明显减轻, 胰腺细胞轻度变性水肿, 间质血管扩张、充血、小叶间隔增宽, 少许炎症细胞浸润(表2, 图1)。

2.2 各组胰腺组织ET-1、eNOS和iNOS mRNA表达 B组ET-1 mRNA在SAP诱发后4 h即明显表达, 病程8, 12 h继续升高并且到达顶点, 至24 h有所降低, 但是仍高于相同时间点A组ET-1 mRNA的表达($P < 0.05$)。和B相比, C组大鼠的胰腺病理改变明显减轻, 胰腺各时间点ET-1 mRNA表达明显下调($P < 0.05$), 与A组比较, B组eNOS mRNA表达明显降低($P < 0.05$), 而B组iNOS mRNA的表达则随病程延长逐渐上调, 至12 h达高峰, 但24 h有所下降, 但仍明显高于对照组($P < 0.05$), 经治疗后, C组各时间点iNOS mRNA较B组下调, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表3, 图2)。

2.3 各组血清ET-1、NO浓度 B组血清ET-1在4 h开始升高, 病程12 h到达顶点, 24 h时仍处于较高水平, 各时间点较A组ET-1浓度明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。和B相比, C组大鼠各时间点血清ET-1浓度降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A组各时间点血清NO处于较低水平; B组各时间点血清NO浓度较A组明显升高($P < 0.05$); 经治疗后, C组各时间点NO较B组明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表4-5)。

3 讨论

在SAP的病因和发病机制中, 目前还有很多不

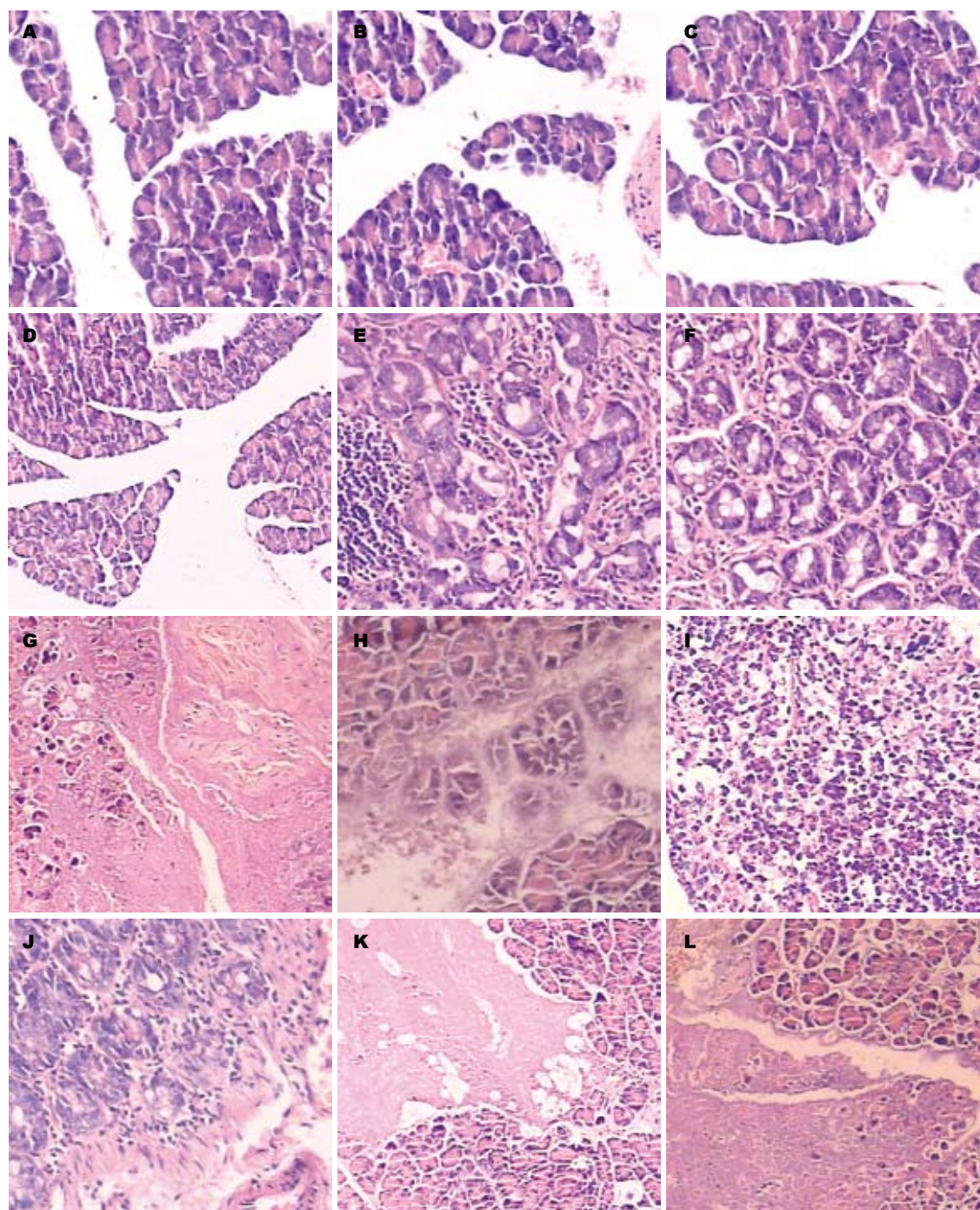


图 1 大鼠胰腺病理检查. A组: A-D; B组: E-H; C组: I-L. A, E, I: 4 h; B, F, J: 8 h; C, G, K: 12 h; D, H, L: 24 h.

创新盘点

本研究从SAP时大鼠胰腺组织不同时间点的形态学、血清生化指标与血管活性介质基因的表达等方面探讨了胰腺组织损害程度与血管活性介质基因表达之间的关联性,证实使用丹红注射液治疗SAP时的抗氧化、改善微循环与对包括胰腺在内多脏器的保护作用,为SAP的临床治疗提供了指导.

明原因,确切机制还不完全清楚^[5].包括细胞凋亡、微循环障碍、凝血机制障碍等多种机制参与了SAP的病程^[6],并且容易导致SIRS和MOF的发生^[7-8].SAP微循环发生障碍时,缩血管介质和舒血管介质两类血管活性物质起了主导作用.缩血管介质主要以ET-1为代表,舒血管介质主要有NO、缓激肽等.ET-1是由内皮细胞合成的缩血管介质,是反映内皮功能的有效指标.ET-1参与了AP微循环障碍的发生,其作用机制包括血管收缩、缺血-再灌注损伤、毛细血管通透性

增加、血液流变学改变、影响白细胞-内皮细胞相互作用等多个方面.首先ET-1作用于血管平滑肌上的受体,通过信号传导使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,引起血管收缩减少微循环灌注.其次,ET-1可使胰腺毛细血管通透性增加,毛细血管渗漏增多.一方面使血液浓缩、红细胞比积增大、血液黏度升高造成血液流变学变化,使血小板容易发生聚集,形成微血栓,造成微循环血液淤滞^[9].另一方面使组织水肿,毛细血管数目相对减少而造成功能性毛细血管密度降低、组织供

应用要点
丹红注射液可下调重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织中ET-1与iNOS基因的表达式,上调eNOS基因的表达式,改善胰腺组织病理损伤。

表 3 各组胰腺组织ET-1、eNOS和iNOS mRNA表达 (mean ± SD)

分组	基因表达水平			
	4 h	8 h	12 h	24 h
ET-1/ β -actin				
A组	0.18 ± 0.08	0.21 ± 0.09	0.20 ± 0.06	0.20 ± 0.05
B组	0.58 ± 0.17 ^a	0.72 ± 0.31 ^a	1.19 ± 0.28 ^a	0.92 ± 0.36 ^a
C组	0.31 ± 0.15 ^c	0.45 ± 0.16 ^c	0.73 ± 0.19 ^c	0.64 ± 0.26 ^c
eNOS/ β -actin				
A组	0.67 ± 0.16	0.68 ± 0.13	0.71 ± 0.18	0.70 ± 0.21
B组	0.25 ± 0.11 ^a	0.27 ± 0.12 ^a	0.24 ± 0.10 ^a	0.28 ± 0.16 ^a
C组	0.55 ± 0.12 ^c	0.53 ± 0.10 ^c	0.60 ± 0.12 ^c	0.56 ± 0.13 ^c
iNOS/ β -actin				
A组	0.17 ± 0.07	0.12 ± 0.08	0.16 ± 0.11	0.20 ± 0.09
B组	0.65 ± 0.11 ^a	0.73 ± 0.08 ^a	0.87 ± 0.15 ^a	0.82 ± 0.16 ^a
C组	0.32 ± 0.10 ^c	0.36 ± 0.14 ^c	0.43 ± 0.07 ^c	0.32 ± 0.06 ^c

^a $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B组。

表 4 各组动物血中ET-1浓度 (mean ± SD, $\mu\text{mol/L}$)

分组	4 h	8 h	12 h	24 h
A组	85.66 ± 11.02	90.02 ± 15.23	89.52 ± 14.06	87.82 ± 17.85
B组	197.13 ± 25.71 ^a	205.43 ± 35.31 ^a	245.31 ± 41.57 ^a	235.62 ± 40.13 ^a
C组	123.13 ± 13.76 ^c	135.43 ± 23.22 ^c	144.34 ± 31.41 ^c	140.32 ± 17.51 ^c

^a $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B组。

表 5 各组动物血中NO浓度 (mean ± SD, $\mu\text{mol/L}$)

分组	4 h	8 h	12 h	24 h
A组	65.73 ± 12.08	72.21 ± 21.09	69.20 ± 11.06	77.32 ± 19.15
B组	167.23 ± 22.21 ^a	185.12 ± 28.34 ^a	205.37 ± 31.28 ^a	195.92 ± 22.36 ^a
C组	110.57 ± 19.31 ^c	125.33 ± 22.51 ^c	134.18 ± 30.71 ^c	100.13 ± 15.91 ^c

^a $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B组。

氧不足^[10]。针对微循环障碍的治疗目前有不同的观点^[11]。晚近有人主张使用血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)拮抗剂改善脏器灌注,并认为PAF拮抗剂能够有效减轻全身和局部炎症反应,改善患者预后^[12-13],但是确切疗效还有待进一步验证。动物实验^[14-16]和临床研究^[17]表明,使用活血化瘀的中药制剂可以改善急性胰腺炎动物模型和患者血清ET-1浓度,改善患者临床症状和预后。本研究结果表明,SAP组大鼠胰腺组织ET-1 mRNA在SAP诱发后4 h即明显表达,病程8, 12 h ET-1 mRNA表达继续升高并且到达顶点,至病程24 h ET-1 mRNA的表达有所

降低,但是仍高于同一时间点正常对照组ET-1 mRNA的表达($P < 0.05$),血清ET-1浓度也呈现类似改变。和SAP组相比,治疗组大鼠的胰腺病理改变明显减轻,胰腺各时间点ET-1 mRNA表达明显水平下调、血清ET-1浓度降低($P < 0.05$),表明丹红注射液对SAP大鼠胰腺组织有一定治疗作用,其发挥作用的可能机制之一在于通过下调ET-1 mRNA表达,减少ET-1的大量生成而发挥其保护作用。

NO是目前公认的一种信息传递分子,在生理状态下和各类急、慢性疾病中的作用日益受到人们的关注。NOS有3种亚型:神经型

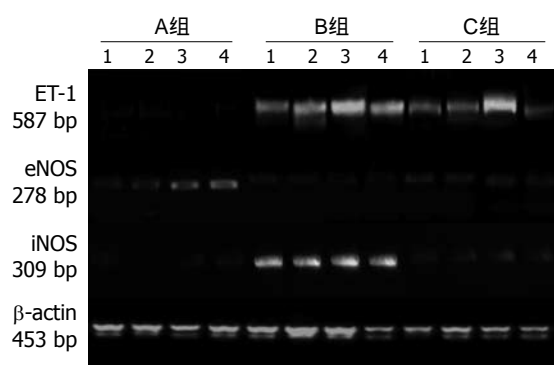


图2 大鼠胰腺组织ET-1、eNOS、iNOS及 β -actin在不同时间点的表达。1: 4 h; 2: 8 h; 3: 12 h; 4: 24 h.

NOS(neuronal NOS, nNOS)、iNOS、eNOS。eNOS为 Ca^{2+} 依赖型, 主要位于内皮细胞eNOS; iNOS为非 Ca^{2+} 依赖型, 主要位于巨噬细胞、嗜中性白细胞、内皮细胞及上皮细胞^[18]。各种组织中的iNOS在生理状态下很少表达, 甚至不可用生物技术和免疫组织化学方法检测出来。在iNOS基因的启动子或增强子区域有NF- κ B的特异性结合位点。脂多糖、内毒素、细胞因子、炎症介质、损伤、缺血、紫外线等因素可将NF- κ B激活, NF- κ B在转录水平参与iNOS表达的调控, 使iNOS mRNA迅速表达合成大量的iNOS^[19]。iNOS编码基因被激活后可长时间内表达iNOS mRNA, 产生的NO是eNOS产生的100-1000倍。在病理状态下, NO的大量生成可引起毛细血管过度扩张, 微循环淤血, 毛细血管通透性增高, 血管平滑肌对缩血管物质的反应性降低等, 引起严重的低血压和循环衰竭。另外, NO是自由基, 当形成 $\text{OO}^{\cdot}\text{NO}^{\cdot}$ 时具有严重的细胞毒性作用。本实验的研究结果显示, SAP组大鼠胰腺组织各时间点eNOS mRNA均低表达, 与正常对照组同时点eNOS mRNA的表达比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与SAP组相比, 治疗组大鼠的胰腺各时间点eNOS mRNA表达明显上调($P<0.05$), SAP时胰腺组织iNOS mRNA表达随时间变化明显上调, 12 h达高峰, 在24 h均处于较高表达水平, 明显高于对照组($P<0.05$), 且与血清NO浓度、胰腺组织损害程度评分呈正相关, 表明SAP时过量NO细胞毒性作用可能加剧了胰腺组织损害。由此提示, 由iNOS诱导产生过量NO可能是造成急性坏死性胰腺炎的重要因素之一。本实验的研究结果还发现, 与SAP组相比, 治疗组的胰腺组织各时间点iNOS mRNA的表达明显下调($P<0.05$)。丹红注射液的活性成分具有多种生物作用, 除了改善微循环、减少病变部位

的缺血缺氧状态外, 还具有很强的抗氧化活性和抗自由基活性, 其保护作用可能与下调SAP大鼠胰腺组织NF- κ B的表达进而抑iNOS mRNA的表达有关^[20]。丹红注射液对L-精氨酸诱导的SAP大鼠胰腺组织具有较好的防治作用。

4 参考文献

- 1 Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Dósa S, Iványi B, Jármai K, Biczó G, Hracskó Z, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varró A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Pandol SJ, Takács T. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit Care Med* 2008; 36: 2117-2127
- 2 Szabolcs A, Reiter RJ, Letoha T, Hegyi P, Papai G, Varga I, Jarmay K, Kaszaki J, Sari R, Rakonczay Z Jr, Lonovics J, Takacs T. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 251-258
- 3 邵明辉, 刘兰梅, 马仁强, 李雪, 庞建新, 徐江平. 丹红注射液一般药理学实验研究. 第一军医大学学报 2005; 25: 335-338
- 4 Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1997; 112: 960-967
- 5 Papachristou GI. Prediction of severe acute pancreatitis: current knowledge and novel insights. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6273-6275
- 6 Wang GJ, Gao CF, Wei D, Wang C, Ding SQ. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1427-1430
- 7 张桂信, 陈海龙, 宫爱霞, 张利. 胰腺腺泡细胞凋亡与急性胰腺炎及其治疗策略. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1115-1120
- 8 张喜平, 吴承钧, 李志军. 重症急性胰腺炎并发肺损伤的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 299-306
- 9 Plusczyk T, Bersal B, Menger MD, Feifel G. Differential effects of ET-1, ET-2, and ET-3 on pancreatic microcirculation, tissue integrity, and inflammation. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1343-1351
- 10 Plusczyk T, Witzel B, Menger MD, Schilling M. ETA and ETB receptor function in pancreatitis-associated microcirculatory failure, inflammation, and parenchymal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G145-G153
- 11 Eibl G, Buhr HJ, Foitzik T. Therapy of microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: what mediators should we block? *Intensive Care Med* 2002; 28: 139-146
- 12 Chen C, Xia SH, Chen H, Li XH. Therapy for acute pancreatitis with platelet-activating factor receptor antagonists. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4735-4738
- 13 Bedirli A, Gokahmetoglu S, Sakrak O, Soyuer I, Ince O, Sozuer E. Beneficial effects of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase and BN 52021 on bacterial translocation in cerulein-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* 2004; 36: 136-141
- 14 石承先, 张莹, 李玉祥. 急性胰腺炎胰腺内皮素mRNA表达与肠壁通透性的关系及丹参的影响. 贵州医药 2009; 33: 14-16
- 15 石承先, 李玉祥, 张莹. 急性胰腺炎胰腺iNOS mRNA的表达与肠壁通透性的关系及丹参对其的影响. 中国

同行评价
本文研究丹红注射液对SAP大鼠胰腺组织ET-1、eNOS和iNOS基因的表达影响, 有一定意义。

- 普通外科杂志 2008; 17: 848-851
- 16 Jung WS, Chae YS, Kim DY, Seo SW, Park HJ, Bae GS, Kim TH, Oh HJ, Yun KJ, Park RK, Kim JS, Kim EC, Hwang SY, Park SJ, Song HJ. Gardenia jasminoides protects against cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6188-6194
- 17 范辉, 沈云志, 王小红, 王爱华, 许留忠, 邹文辉. 丹红对改善急性胰腺炎患者微循环的作用. *北京医学* 2009; 31: 72-74
- 18 杨通印, 邓世雄. iNOS及其在组织创伤后的表达. *重庆医学* 2008; 37: 102-105
- 19 Cooke CL, Davidge ST. Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C395-C402
- 20 满永, 丁莉, 国汉邦, 王蕾, 王抒, 黎健. 丹参红花提取物保护内皮细胞免受氧化损伤的体外实验. *中国临床康复* 2006; 10: 119-122

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

Hep Par 1、CD34及Cytokeratin在血清AFP阴性肝细胞癌诊断中的应用

张 婷, 陈旭东, 何 松, 王旗春

张婷, 王旗春, 湖州师范学院医学院 浙江省湖州市 313000
陈旭东, 何松, 南通市肿瘤医院 江苏省南通市 226001

张婷, 硕士, 主要从事肿瘤病理学研究.

作者贡献分布: 张婷与陈旭东对此文所作贡献均等; 此课题由陈旭东设计; 研究过程由张婷与陈旭东操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈旭东及何松提供; 数据分析由张婷完成; 本论文写作由张婷与王旗春完成.

通讯作者: 张婷, 313000, 浙江省湖州市学士路1号, 湖州师范学院医学院. grape_chang@163.com

电话: 0572-2322569

收稿日期: 2009-07-01 修回日期: 2009-08-30

接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-09-28

Significance of hepatocyte paraffin-1, cluster of differentiation 34 and cytokeratin expression in the diagnosis of alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma

Ting Zhang, Xu-Dong Chen, Song He, Qi-Chun Wang

Ting Zhang, Qi-Chun Wang, School of Medicine, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China

Xu-Dong Chen, Song He, Nantong Tumor Hospital, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Ting Zhang, School of Medicine, Huzhou Teachers College, 1 Xueshi Road, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China. grape_chang@163.com

Received: 2009-07-01 Revised: 2009-08-30

Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate the significance of hepatocyte paraffin-1 (Hep Par-1), cluster of differentiation 34 (CD34) and cytokeratin (CK) expression in the diagnosis of alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma (AFP(-)HCC) and in the differential diagnosis among AFP(-) HCC, intrahepatic cholangiocellular carcinoma (ICC) and metastatic adenocarcinoma (MAC).

METHODS: Paraffin-embedded surgical specimens were collected from 70 AFP(-)HCC patients, 6 ICC patients and 24 MAC patients at Nantong Tumor Hospital from 1989 to 2007. All specimens were stained immunohistochemically for Hep Par 1,

CD34 and CK.

RESULTS: There were statistically significant differences in the positive expression rates of Hep Par 1 and CD34 in AFP(-)HCC, ICC and MAC (Hep Par 1: $\chi^2 = 50.7937$, 9.5745 and 37.4532, respectively; CD34: $\chi^2 = 67.0330$, 9.9836 and 49.3927, respectively; all $P < 0.01$). Significant differences were also noted in the positive expression rates of Hep Par 1, CD34, CK20 and CK19 between poorly and well differentiated AFP(-)HCC (all $P < 0.01$ or 0.05). The accuracy, sensitivity and specificity of combined immunohistochemical detection of Hep Par 1, CD34 and CK in the differential diagnosis among AFP(-) HCC, ICC and MAC were 90.7%, 89.8% and 93.3%, respectively.

CONCLUSION: Combined detection of Hep Par 1, CD34 and CK can improve the accuracy of diagnosis of AFP(-)HCC and of differential diagnosis among AFP(-)HCC, ICC and MAC.

Key Words: AFP-negative hepatocellular carcinoma; Hepatocyte paraffin-1; CD34; Cytokeratin; Immunohistochemistry

Zhang T, Chen XD, He S, Wang QC. Significance of hepatocyte paraffin-1, cluster of differentiation 34 and cytokeratin in the diagnosis of alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2791-2797

摘要

目的: 探讨Hep Par 1、CD34及Cytokeratin在血清[AFP(-)HCC]诊断及其在ICC、MAC鉴别诊断中的意义.

方法: 选取南通市肿瘤医院1989-2007年手术切除的70例[AFP(-)HCC]、6例ICC及24例MAC的石蜡标本, 免疫组织化学染色法检测Hep Par 1、CD34及Cytokeratin在血清[AFP(-)HCC]中的表达.

结果: Hep Par 1、CD34在血清AFP(-)HCC、ICC及MAC中的表达差异性均具有显著统

背景资料

血清甲胎蛋白 (AFP)目前是诊断原发性肝细胞癌的首选血清标志物. 但近年来发现血清AFP阴性肝癌有增多趋势, 尚有其他肿瘤可出现血清AFP升高, 进一步增加了血清AFP阴性肝癌的漏诊率和误诊率. 选取HCC和ICC一线抗体并优化组合成诊断谱有助于提高血清AFP阴性肝癌诊断与鉴别诊断的正确率.

同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

研究前沿
HCC的早期诊断近年来成为临床医学研究热点之一。联合应用特异性、敏感性、准确性更强的HCC血清学指标(如DcR3、leptin、VEGF等与AFP联用)、免疫组织化学诊断谱(Hep Par 1、CD34、CK家族、Raf-1等联用)及基因家族蛋白标志物(Aurora-B、survivin、RASSF1A、CYP3A5、Plk1等)等多种诊断技术已引起肿瘤学界的高度重视。

计学意义(Hep Par 1: $\chi^2 = 50.7937$ 、 9.5745 及 37.4532 ; CD34: $\chi^2 = 67.0330$ 、 9.9836 及 49.3927 , 均 $P < 0.01$)。在分化不良组与分化较好组血清AFP(-)HCC中表达差异性的比较中, Hep Par 1与CD34、CK20、CK19的表达均有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。联合应用Hep Par 1、CD34对AFP(-)HCC与ICC、MAC的鉴别诊断评价准确度、灵敏度及特异度分别为: 90.7%、89.8%及93.3%。

结论: 联合应用Hep Par 1、CD34及Cytokeratin可提高血清AFP(-)HCC的诊断准确率及其与ICC、MAC的鉴别诊断准确率, 为临床治疗方案的选择与预测评估提供了病理依据。

关键词: 血清AFP阴性肝细胞肝癌; Hep Par 1; CD34; Cytokeratin; 免疫组织化学

张婷, 陈旭东, 何松, 王旗春. Hep Par 1、CD34及Cytokeratin在血清AFP阴性肝细胞肝癌诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2791-2797
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2791.asp>

0 引言

当肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)血清AFP呈阴性(以 $\text{AFP} < 10 \mu\text{g/L}$ 为AFP(-)HCC)或病理类型不确定(如低分化或透明细胞型HCC)时, HCC的诊断及其与肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocellular carcinoma, ICC)、肝转移性腺癌(metastatic adenocarcinoma, MAC)等的鉴别诊断就成为外科病理诊断中的难题。

Hep Par 1是目前肝细胞分化标志物中较敏感和特异的标志物, 在HCC中呈胞质颗粒染色^[1]。但Hep Par 1在低分化HCC中表达率不高, 而低分化HCC更易与低分化ICC、MAC混淆。CD34在HCC中呈微血管均匀染色, 而在ICC和MAC中呈微血管不均染色^[2]。Cytokeratin(CK)家族的CK7、CK19是ICC与HCC鉴别诊断的标志物^[3-4]。

本研究通过联合应用Hep Par 1、CD34及CK家族, 探讨这3类免疫组织化学标记在AFP(-)HCC及ICC、MAC鉴别诊断中的意义, 为AFP(-)HCC及ICC、MAC的临床治疗方案的选择和预测评估提供病理依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选取南通市肿瘤医院1989-2007年手术

切除的70例AFP(-)HCC、6例ICC及24例MAC(分别来源于6例肺腺癌、6例肾透明细胞癌、6例胃腺癌、6例卵巢透明细胞癌)的石蜡标本, 每例切4 μm 切片, 分别作HE染色及免疫组织化学标记, 重新阅片观察。

1.2 方法

1.2.1 HE染色: 石蜡组织连续切片, 常规HE染色、封片。结果判断: 根据病理分化分级(Edmondson-Steiner分级), 分为I、II、III及IV级。将I、II级作为分化较好组, 将III、IV级作为分化不良组。AFP(-)HCC镜下组织学形态显示瘤细胞胞质有大量糖原或脂质积蓄呈透明状, 则诊断为AFP(-)HCC透明细胞亚型。

1.2.2 免疫组织化学染色: 免疫组织化学染色采用SP法。实验操作按试剂盒说明进行, DAB显色, 以PBS代替第一抗作阴性对照, 用已知阳性切片作阳性对照。即用型鼠单克隆抗体Hep Par 1、即用型鼠抗CD34 mAb、即用型兔抗人CK20 mAb、即用型兔抗人CK19多克隆抗体、即用型鼠抗人mAb CK7、SP即用型试剂盒和DAB显色试剂盒均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。免疫组织化学结果判断: Hep Par 1在HCC中呈胞质均匀棕黄色颗粒染色; CD34在HCC中呈微血管长条状或分支状染色, 管壁纤细、管腔狭窄、分布均匀弥漫(如呈血管不均匀染色则判断为阴性); CK7、CK19、CK20呈胞质均匀棕黄色颗粒染色。染色结果观察采用双盲法, 由两位病理科医生在不知病理分级与临床资料的情况下阅片, 每个切片观察5个视野(400倍)计算阳性细胞数, 计算总细胞数不少于1000个, 按阳性细胞所占百分数分为: 阳性细胞率 $\leq 5\%$ 为阴性(-), $> 5\%$ 为阳性(+).

统计学处理 应用Stata 10.0统计软件对计数资料进行四格表 χ^2 检验。统计结果以 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为有显著统计学差异。以准确度、灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、Youden指数作为诊断价值的评价指标。

2 结果

2.1 Hep Par 1、CD34及CK在AFP(-)HCC中的表达 Hep Par 1呈胞质颗粒状染色(表达率82.9%); CD34呈血管均匀染色(表达率87.1%); CK家族多呈阴性(CK7、CK20、CK19的表达率分别为31.4%、10.0%和20.0%(表1-2, 图1)。

分化不良组与分化较好组比较, Hep Par 1的

表 1 Hep Par 1、CD34及CK分别在AFP(-)HCC、ICC及MAC中的染色 (n = 100)

	AFP(-)HCC	ICC	MAC			
			肾透明细胞癌	卵巢透明细胞癌	胃腺癌	肺腺癌
Hep Par 1	胞质	-	-	-	膜浆+/-	膜浆+/-
CD34	血管均匀	-	-	-	-	-
CK7	+/-	胞质	+/-	胞质	胞质	胞质
CK20	+/-	+/-	胞质	-	-	-
CK19	+/-	胞质	胞质	-	胞质	胞质

-: 阴性; +/-: 阳性表达或阴性.

表 2 Hep Par 1、CD34及CK分别在AFP(-)HCC、ICC及MAC中的表达 (n = 100)

	AFP(-)HCC (n = 70)				ICC (n = 6)				MAC (n = 24)			
	+(%)	-	χ^2 值	P值	+(%)	-	χ^2 值	P值	+(%)	-	χ^2 值	P值
Hep Par 1	58(82.9)	12	50.7937	<0.01	0(0)	6	9.5745	<0.01	2(8.3)	22	37.4532	<0.01
CD34	61(87.1)	9	67.0330	<0.01	0(0)	6	9.9836	<0.01	0(0)	24	49.3927	<0.01
CK7	22(31.4)	48	19.9448	<0.01	5(83.3)	1	3.5815	>0.05	19(79.2)	5	13.9846	<0.01
CK20	7(10.0)	63	0.2383	>0.05	2(33.3)	4	3.2520	>0.05	2(8.3)	22	0.2294	>0.05
CK19	14(20.0)	56	28.9289	<0.01	5(83.3)	1	5.8785	<0.05	18(75.0)	6	19.5624	<0.01

表 3 Hep Par 1、CD34、CK在不同病理分化分级AFP(-)HCC中的表达 (n = 70)

	分化较好组						分化不良组						χ^2 值	P值
	I (n = 9)		II (n = 44)		I、II (n = 53)		III (n = 11)		IV (n = 6)		III、IV (n = 17)			
	+(%)	-	+(%)	-	+(%)	-	+(%)	-	+(%)	-	+(%)	-		
Hep Par 1	9(100)	0	39(88.6)	5	48(90.6)	5	8(72.7)	3	2(33.3)	4	10(58.8)	7	9.1305	<0.01
CD34	9(100)	0	40(90.9)	4	49(92.5)	4	7(63.6)	4	5(83.3)	1	12(70.6)	5	5.4920	<0.05
CK7	2(22.2)	7	15(34.1)	29	17(32.1)	36	3(27.3)	8	2(33.3)	4	5(29.4)	12	0.0424	>0.05
CK20	1(11.1)	8	2(4.5)	42	3(5.7)	50	2(18.2)	9	2(33.3)	4	4(23.5)	13	4.5665	<0.05
CK19	1(11.1)	8	6(13.6)	38	7(13.2)	46	4(36.4)	7	3(50.0)	3	7(41.2)	10	6.2930	<0.05

表达率显著降低($P<0.01$), CD34的表达率有所降低($P<0.05$); 而CK19、CK20的表达率有所升高($P<0.05$, 表3).

Hep Par 1、CD34在AFP(-)HCC透明细胞亚型中的表达率均较高(分别为87.0%和78.3%), 而CK家族表达率均较低(CK7、CK20及CK19分别为26.1%、4.4%和21.7%).

2.2 Hep Par 1、CD34及CK在ICC中的表达
Hep Par 1呈阴性; CD34部分呈血管不均染色; CK19、CK7呈胞质均匀棕黄色颗粒染色, CK20有部分表达(表1-2, 图2).

2.3 Hep Par 1、CD34及CK在MAC中的表达
Hep Par 1在部分胃腺癌、肺腺癌中呈膜浆颗粒状染色. CK7、CK19在胃腺癌、肺腺癌中呈胞质颗粒状染色. CK19、CK20在肾透明细胞癌中呈胞

质颗粒状染色. CD34在MAC中均呈血管不均染色(表1-2, 图3).

此外, Hep Par 1、CD34在AFP(-)HCC透明细胞亚型与肾透明细胞癌、卵巢透明细胞癌的表达具有显著性差异($P<0.01$, χ^2 值分别为19.1020, 16.3429).

联合应用Hep Par 1与CD34对AFP(-)HCC与ICC、MAC的灵敏度比单独使用单一标志物有所增高(表4).

3 讨论

AFP是临床上诊断原发性HCC最常用的肿瘤标志物之一, 在肝癌普查、早期诊断和疗效判定等方面发挥着重要作用. 通过血清AFP检测HCC的诊断率约为70%, 但是仍有30%左右的HCC血

相关报道
丛文明 *et al*发现HCC的一线抗体由Hep Par 1和CD34组成, 二线抗体由pCEA和AFP组成; ICC的一线抗体为CK19, 二线抗体为CA19-9. 由3种一线抗体组合成肝癌的核心免疫组织化学谱, 酌情使用二线抗体, 可以较好地对HCC、ICC和肝MAC进行鉴别诊断. 而此诊断谱在血清AFP阴性HCC诊断及鉴别诊断中的作用则需要进一步研究.

创新盘点

本研究首次将免疫组织化学诊断谱用于血清AFP阴性HCC的诊断及其与ICC、肝MAC的鉴别诊断;并发现此诊断谱有助于评估HCC分化程度。

表 4 联合应用Hep Par 1与CD34对AFP(-)HCC与ICC、MAC的鉴别诊断评价 (%)

标志物	准确度	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	Youden指数
Hep Par 1	86.0(86/100)	82.9(58/70)	93.3(28/30)	96.7(58/60)	70.0(28/40)	76.2
CD34	91.0(91/100)	87.1(61/70)	100.0(30/30)	100.0(61/61)	76.9(30/39)	87.1
Hep Par 1+CD34	90.7(107/118)	89.8(79/88)	93.3(28/30)	97.5(79/81)	75.7(28/37)	83.1

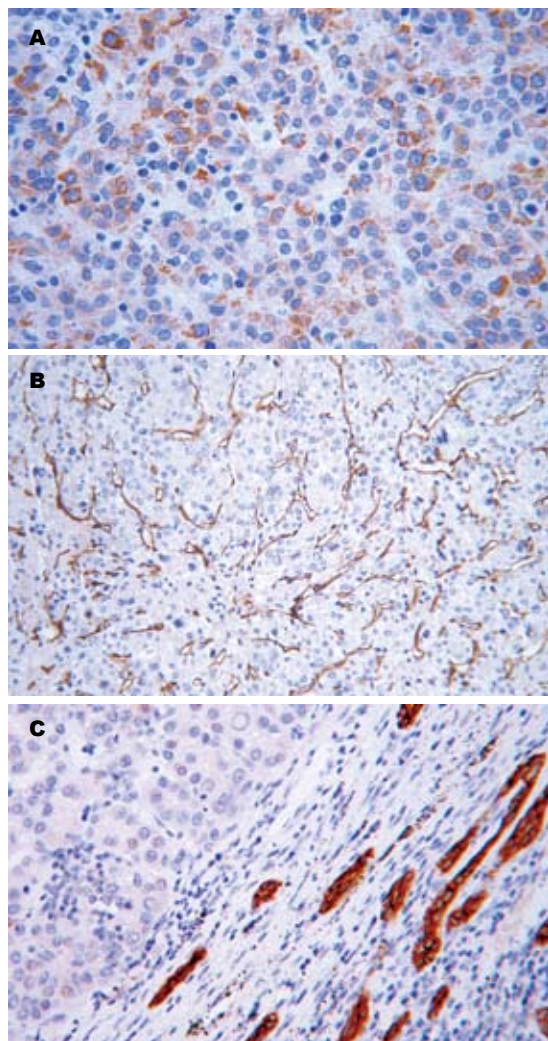


图 1 Hep Par 1、CD34及CK19在AFP(-)HCC中的表达(SP × 200). A: Hep Par 1呈颗粒状染色; B: CD34呈微血管长条状染色, 管壁纤细、管腔狭窄、弥漫分布; C: CK19呈阴性, 而周围正常胆管呈强阳性。

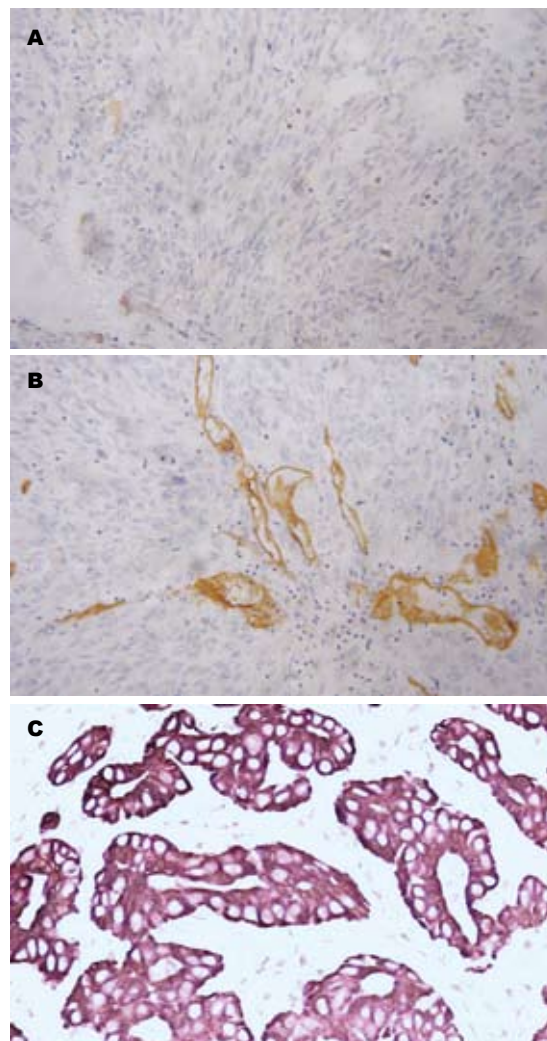


图 2 Hep Par 1、CD34及CK19在ICC中的表达(SP × 200). A: Hep Par 1呈阴性; B: CD34血管染色呈干枝状、稀疏杂乱; C: CK19呈胞质均匀棕黄色颗粒染色。

清AFP为阴性^[5]. 有研究发现AFP检测HCC的敏感性较低(70%左右), 特异性也较低(64%)^[6], 因此单独应用AFP诊断HCC容易造成漏诊和误诊. 因此, 寻找阳性率高、特异性强的肝癌标志物是当前肝癌研究的重要课题。

Hep Par 1是1993年由美国Pittsburgh大学Wennerbery *et al*以石蜡包埋肝组织作为抗原而获得的一种单克隆抗体OCH1E5.2.10^[7]. 文献^[1]报道Hep Par 1对HCC特异性和敏感性比

以往的抗体都高(Hep Par 1对HCC的敏感性为75%-99%), 被认为是HCC器官特异性抗体. Chu *et al*^[8]报道Hep Par 1在HCC中的表达率为92%. 另有报道Hep Par 1免疫组织化学标记在HCC患者的骨髓中也有所表达^[9]. 从文铭 *et al*^[10]报道Hep Par 1对HCC的敏感性为83.7%、特异性为96.7%, Hep Par 1除了在HCC中表达外, 还在50%的胃腺癌、胃和胆囊的肝样腺癌、内胚窦及肝母细胞瘤局灶性表达; 在结肠、肺、子宫颈、卵巢、胰腺和膀胱腺癌也可局灶表达, 而在肾

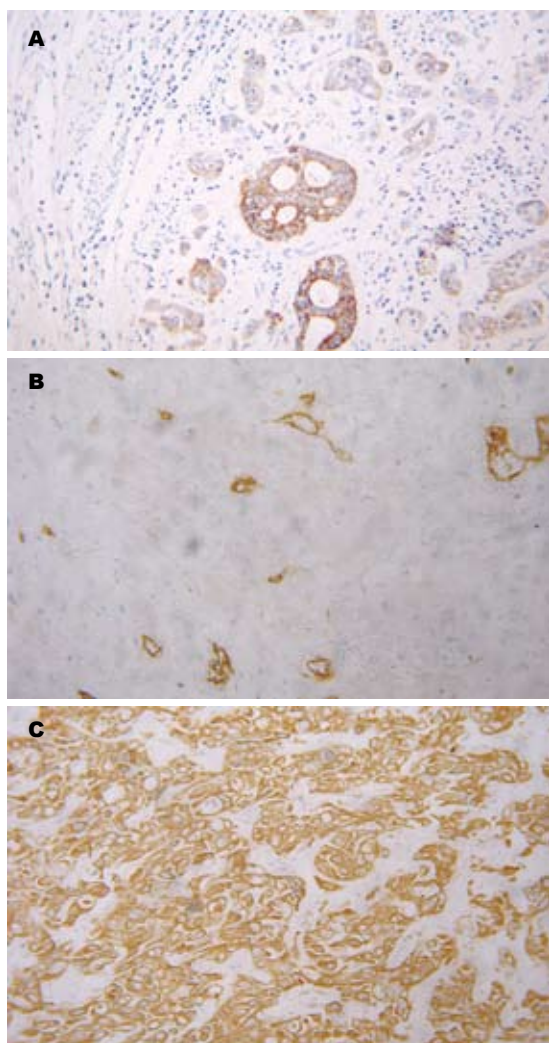


图3 Hep Par 1、CD34及CK7在ICC中的表达(SP×200)。A: Hep Par 1在肝转移性胃腺癌中的表达, 呈膜浆颗粒状染色; B: CD34肝转移性胃腺癌中血管染色呈干枝状、稀疏杂乱; C: CK7在肝转移性胃腺癌呈胞质均匀棕黄色颗粒染色。

透明细胞癌、乳腺癌、黑色素瘤和间皮瘤不表达。我们的研究发现, Hep Par 1在部分胃腺癌、肺腺癌中也有表达, 表明Hep Par 1对于HCC的诊断并无绝对特异性。这为Hep Par 1应用于HCC诊断带来了一定困难。

有研究发现Hep Par 1对于良恶性肿瘤是比较敏感和特异的指标, 在ICC中几乎不表达^[8,11]。但后来又有研究发现在某个患有HCC的特殊类型纤维板层癌与ICC的患者, 其HCC与ICC的成分都有Hep Par 1的表达^[12]。虽然Hep Par 1是鉴别HCC、ICC及MAC较好的指标, 但不是所有的Hep Par 1阳性的就是HCC或起源于肝细胞的肿瘤^[8,13-16]。所以单独的Hep Par 1的诊断显得非常单薄, 在本研究中我们对于HCC的诊断以及与ICC及MAC的鉴别诊断联合了其他的标记。

Hep Par 1的染色模式在分化较好的HCC

和分化较差的HCC中差别很大, 在分化较好的HCC中可达到100%的肿瘤细胞染色, 而在部分分化较差的HCC中只有<5%的肿瘤细胞染色, 这一结果很容易引起假阴性^[17], 在我们的研究中也由此发现。

CD34是血管源性肿瘤的特异性标志物之一, 属于HCC相对特异性抗体。据报道CD34在HCC微血管中阳性表达, 呈特殊的长条状或分支状、管壁纤细、管腔狭窄、分布均匀弥漫, 而在ICC和MAC微血管中分布不均, 呈干枝状、稀疏杂乱^[11,18]。我们研究发现CD34这种特殊表达方式对于HCC的诊断具有一定的作用。

CK家族属于ICC及MAC相对特异性抗体, 有报道CK7、CK19是ICC与HCC鉴别诊断的标志物^[3-4]。我们研究发现CK在HCC中多呈阴性, 在部分ICC及MAC中有所表达, 这在HCC的鉴别诊断中发挥了重要的作用。

近年来国内外研究发现, 联合使用多种HCC敏感性、特异性强的多种标志物可显著增加HCC诊断与鉴别诊断正确率。丛文铭 *et al*^[10]报道了HCC免疫组织化学谱, 一线抗体由Hep Par 1和CD34组成, 二线抗体由pCEA和AFP组成; ICC的一线抗体为CK19, 二线抗体为CA19-9。由3种一线抗体组合成肝癌的核心免疫组织化学谱, 酌情使用二线抗体, 可以较好地解决对HCC、ICC和MAC之间的免疫病理诊断和鉴别诊断。

本研究通过探讨Hep Par 1、CD34及CK免疫组织化学标记分别在AFP(-)HCC、ICC与MAC中的表达, 表明联合应用这些标记可提高AFP(-)HCC的诊断准确率及其与ICC、MAC的鉴别诊断准确率, 为临床治疗方案的选择和预测评估提供了病理依据。

同时联合应用Hep Par 1、CD34及CK免疫组织化学标记检测不同病理分化分级AFP(-)HCC, 为不同病理分化分级AFP(-)HCC选择最佳免疫组织化学标记组合。我们的研究发现, AFP(-)HCC中Hep Par 1、CD34的表达率随着肿瘤分化程度降低而减低; 而CK19、CK20的表达率随着肿瘤分化程度的降低而升高, 提示联合应用这些标记可作为诊断AFP(-)HCC并确定其分化程度的一种重要手段。

在以往对于HCC鉴别诊断的研究中, ICC、MAC作为对照组多为随机选择的癌组织, 大多数根据HE形态即可明确ICC、MAC的诊断。本研究特别选择了较易与HCC混淆的低分化

应用要点
本研究选取HCC和ICC一线抗体组合成诊断谱, 综合比较了Hep Par 1、CD34及CK家族对血清AFP阴性HCC与ICC、肝MAC鉴别诊断的准确度、灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值、Youden指数; 选择了较易与肝细胞癌混淆的低分化ICC、低分化肝MAC作为对照组, 具有较大的鉴别诊断实用价值。

同行评价
本文研究血清AFP呈阴性是HCC的阳性率高、特异性强的标志物,对临床诊断有一定的意义。

ICC、低分化肺腺癌及胃腺癌、低分化肾及卵巢透明细胞癌等肝MAC作为对照组。我们的研究发现, Hep Par 1在AFP(-)HCC中呈胞质颗粒状染色,在部分MAC中(胃腺癌、肺腺癌)呈膜浆颗粒状染色,在ICC、肾透明细胞癌、卵巢透明细胞癌中呈阴性; CD34在AFP(-)HCC中呈血管均匀染色,在ICC、MAC中均呈血管不均染色; CK家族在AFP(-)HCC中多呈阴性,在部分ICC及MAC中呈胞质颗粒状染色。我们还发现, Hep Par 1、CD34在AFP(-)HCC透明细胞亚型与肾透明细胞癌、卵巢透明细胞癌的表达具有显著性差异($P<0.01$),这对于AFP(-)HCC透明细胞亚型与其他透明细胞肿瘤的鉴别具有重要的实用价值。

有研究发现, Hep Par 1、CD34的联合使用不仅可以鉴别HCC与ICC、MAC,有时候 Hep Par 1、CD34可以用于鉴别HCC与肝腺瘤样肿瘤^[19]。

我们的研究发现,联合应用Hep Par 1与CD34对AFP(-)HCC与ICC、MAC的灵敏度比单独使用单一标志物有所增高。而CK家族的加入使得ICC及MAC的诊断更具准确性。

除了联合应用各种免疫组织化学标记,我们还需不断发现更多有价值的标志物开展进一步的研究。近年来研究发现的某些标志物进一步提高了HCC的诊断正确率,如Raf-1在早期肝癌中的高表达,使其具备了良好的早期诊断能力^[20], Aurora-B的检测可以作为肝癌的初步筛选指标^[21]。

4 参考文献

- Amarapurkar AD, Rege JD, Joshi AS, Vaiphei K, Amarapurkar DN. Utilization of antihepatocyte clone OCH1E5 (Hep Par 1) in histological evaluation of liver tumors. *Indian J Pathol Microbiol* 2006; 49: 341-344
- 张树辉, 丛文铭. 免疫组织化学在肝细胞肿瘤诊断中的应用. *诊断病理学杂志* 2004; 11: 53
- Srisomsap C, Sawangareetrakul P, Subhasitanont P, Panichakul T, Keeratichamroen S, Lirdprapamongkol K, Chokchaichamnankit D, Sirisinha S, Svasti J. Proteomic analysis of cholangiocarcinoma cell line. *Proteomics* 2004; 4: 1135-1144
- Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, Shuto T, Ogawa M, Tanaka H, Tanaka S, Kaneda K, Hirohashi K. Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer Sci* 2003; 94: 851-857
- Wudel LJ Jr, Chapman WC. Indications and limitations of liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2003; 12: 77-90, ix
- Soresi M, Magliarisi C, Campagna P, Leto G, Bonfissuto G, Riili A, Carroccio A, Sesti R, Tripi S, Montalto G. Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23: 1747-1753
- Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB. Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol* 1993; 143: 1050-1054
- Chu PG, Ishizawa S, Wu E, Weiss LM. Hepatocyte antigen as a marker of hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical comparison to carcinoembryonic antigen, CD10, and alpha-fetoprotein. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 978-988
- Sutcliffe R, Maguire D, Murphy P, Portmann B, Rela M, O'Sullivan G, Mufti G, Heaton N. Detection and clinical significance of bone marrow micrometastases in patients undergoing liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transplantation* 2005; 80: 88-94
- 丛文铭, 谭璐, 张树辉, 冼志红, 吴伟清, 潘晶, 张秀忠. 肝癌免疫组化诊断谱的研究和应用. *中华肿瘤杂志* 2002; 24: 553-556
- Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2002; 33: 1175-1181
- Tanaka K, Honna T, Kitano Y, Kuroda T, Tanaka K, Morikawa N, Matsuda H, Kawashima N, Matsuoka K, Miyauchi J. Combined fibrolamellar carcinoma and cholangiocarcinoma exhibiting biphenotypic antigen expression: a case report. *J Clin Pathol* 2005; 58: 884-887
- Minervini MI, Demetris AJ, Lee RG, Carr BI, Madariaga J, Nalesnik MA. Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. *Mod Pathol* 1997; 10: 686-692
- Fan Z, van de Rijn M, Montgomery K, Rouse RV. Hep par 1 antibody stain for the differential diagnosis of hepatocellular carcinoma: 676 tumors tested using tissue microarrays and conventional tissue sections. *Mod Pathol* 2003; 16: 137-144
- Siddiqui MT, Saboorian MH, Gokaslan ST, Ashfaq R. Diagnostic utility of the HepPar1 antibody to differentiate hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration samples. *Cancer* 2002; 96: 49-52
- Zimmerman RL, Burke MA, Young NA, Solomides CC, Bibbo M. Diagnostic value of hepatocyte paraffin 1 antibody to discriminate hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration biopsies of the liver. *Cancer* 2001; 93: 288-291
- Leong AS, Sormunen RT, Tsui WM, Liew CT. Hep Par 1 and selected antibodies in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma, combined tumours and metastatic carcinoma. *Histopathology* 1998; 33: 318-324
- Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, Sakai T, Fujikawa K, Wagayama H, Takase K, Nakano T. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated chronic liver diseases. *Hum Pathol* 2001; 32: 1363-1370
- Nagata S, Aishima S, Fukuzawa K, Takagi H,

- Yonemasu H, Iwashita Y, Kinoshita T, Wakasugi K. Adenomatoid tumour of the liver. *J Clin Pathol* 2008; 61: 777-780
- 20 殷飞, 赵雅娟, 姚树坤. Raf-1在肝细胞肝癌组织的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17: 618-622
- 单人锋, 周福庆, 吴波, 肖国胜, 饶雪峰, 彭贵主. Aurora-B在肝癌组织中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 270-272

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	19	44	-0.98	0.059	44	-0.89
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	4431	1	3.46	0.745	10	0.38
G803	肝脏	467	28	-0.53	0.537	17	-0.01
G938	国际呼吸杂志	521	25	-0.48	0.386	32	-0.29
G415	国际内分泌代谢杂志	654	20	-0.34	0.520	19	-0.04
G939	国际脑血管病杂志	662	19	-0.33	0.480	22	-0.11
G501	临床肝胆病杂志	497	26	-0.50	0.318	36	-0.41
G291	临床骨科杂志	689	18	-0.31	0.455	25	-0.16
G658	临床荟萃	1169	13	0.18	0.233	40	-0.57
G257	临床内科杂志	651	21	-0.35	0.367	34	-0.32
G855	临床消化病杂志	292	36	-0.71	0.394	30	-0.27
G261	临床心血管病杂志	866	17	-0.13	0.474	24	-0.12
G293	临床血液学杂志	341	34	-0.66	0.347	35	-0.36
G491	岭南心血管病杂志	157	41	-0.84	0.110	43	-0.79
G662	内科急危重症杂志	276	37	-0.72	0.318	36	-0.41
G746	实用肝脏病杂志	297	35	-0.70	1.100	3	1.04
G190	世界华人消化杂志	2353	5	1.37	0.568	15	0.05
G800	胃肠病学	376	33	-0.62	0.372	33	-0.31
G326	胃肠病学和肝病学杂志	468	27	-0.53	0.399	29	-0.26
G451	现代消化及介入诊疗	84	43	-0.92	0.230	41	-0.58
G083	心肺血管病杂志	214	40	-0.78	0.206	42	-0.62
G419	心血管病学进展	467	28	-0.53	0.419	27	-0.23
G260	心脏杂志	523	24	-0.47	0.392	31	-0.28
G610	胰腺病学	223	38	-0.78	0.282	38	-0.48
G234	中国动脉硬化杂志	869	16	-0.13	0.521	18	-0.04
G422	中国脑血管病杂志	223	38	-0.78	0.503	21	-0.07
G267	中国实用内科杂志	2121	7	1.13	0.601	13	0.11
G211	中国糖尿病杂志	1284	11	0.29	0.931	7	0.72
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	616	23	-0.38	0.599	14	0.11
G633	中国血液净化	449	31	-0.55	0.478	23	-0.12
G119	中国循环杂志	643	22	-0.35	0.411	28	-0.24
G231	中华肝脏病杂志	2746	4	1.76	1.056	4	0.95
G235	中华高血压杂志	982	15	-0.01	0.757	9	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	143	42	-0.86	0.235	39	-0.57
G876	中华老年心脑血管病杂志	465	30	-0.53	0.431	26	-0.20
G150	中华老年医学杂志	1010	14	0.02	0.510	20	-0.06
G155	中华内分泌代谢杂志	1548	9	0.56	1.032	5	0.91
G156	中华内科杂志	3238	3	2.26	0.847	8	0.57
G161	中华肾脏病杂志	1477	10	0.49	1.018	6	0.88
G285	中华消化内镜杂志	1271	12	0.28	0.607	12	0.12
G168	中华消化杂志	2249	6	1.26	1.123	2	1.08
G892	中华心率失常学杂志	384	32	-0.61	0.568	15	0.05
G170	中华心血管病杂志	3705	2	2.73	1.217	1	1.25
G172	中华血液学杂志	1632	8	0.64	0.633	11	0.17
	平均值	994			0.541		

以上数据摘自《中国科技期刊引证报告》(2008年版). 科学技术文献出版社, 160-161.

肝病患者肠黏膜屏障功能的变化及谷氨酰胺干预的研究进展

宋怀宇, 杨建荣

背景资料
在急性胰腺炎、严重烧伤、多脏器衰竭等危重疾病中, 肠黏膜屏障功能的变化对疾病的发生、发展有重要的影响, 这已得到公认。对各种严重急性慢性肝病患者肠黏膜屏障功能变化的研究也在不断深入。本研究对此加以概述。

宋怀宇, 广西壮族自治区人民医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530000
杨建荣, 广西壮族自治区人民医院肝胆科 广西壮族自治区南宁市 530000
广西科学基金资助项目, No. 桂科回0639013
作者贡献分布: 宋怀宇负责论文撰写; 杨建荣负责审校。
通讯作者: 杨建荣, 主任医师, 530021, 广西壮族自治区南宁市桃源路6号, 广西壮族自治区人民医院肝胆科。
yangjrgx@sohu.com
电话: 0771-2186545
收稿日期: 2009-07-23 修回日期: 2009-08-24
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-09-28

Changes in intestinal mucosal barrier function in patients with liver diseases: effect of glutamine intervention

Huai-Yu Song, Jian-Rong Yang

Huai-Yu Song, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Jian-Rong Yang, Department of Hepatobiliary, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0639013
Correspondence to: Jian-Rong Yang, Department of Hepatobiliary, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, 6 Taoyuan Road, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yangjrgx@sohu.com
Received: 2009-07-23 Revised: 2009-08-24
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-09-28

Abstract

Intestinal mucosal barrier dysfunction is involved in the development and progression of many severe diseases. The research on changes in intestinal mucosal barrier function in patients with liver diseases has attracted wide attention. Numerous studies have proved that intestinal mucosal barrier dysfunction occurs in the development of severe liver diseases, and glutamine can reverse intestinal mucosal barrier dysfunction, as it can promote the healing processes of hepatic and intestinal cells.

Key Words: Liver disease; Intestinal mucosal bar-

rier function; Glutamine

Song HY, Yang JR. Changes in intestinal mucosal barrier function in patients with liver diseases: effect of glutamine intervention. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2798-2802

摘要

随着人们对肠黏膜功能障碍在各种危重疾病发生、发展中所起的重要病理生理作用的不断认识, 针对肝病患者肠黏膜屏障功能变化的研究及其临床干预日益受到学者的关注。绝大多数研究认为严重肝病患者存在肠黏膜屏障功能的异常, 并证实了谷氨酰胺对纠正肝病患者肠黏膜屏障异常、促进肝细胞及肠上皮细胞的恢复有一定的作用。

关键词: 肝病; 肠黏膜屏障功能; 谷氨酰胺

宋怀宇, 杨建荣. 肝病患者肠黏膜屏障功能的变化及谷氨酰胺干预的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2798-2802
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2798.asp>

0 引言

许多研究表明^[1-12], 严重急性慢性肝病及肝硬化患者常出现肠黏膜屏障功能的异常变化, 导致肠黏膜屏障异常-肠源性内毒素血症-疾病进展的恶性循环, 这一恶性循环在上述疾病的发生发展过程中有非常重要的病理生理意义。加用谷氨酰胺(GLN)进行临床干预, 有一定的肠道及肝细胞保护作用, 现将近年来相关研究的进展作一综述。

1 肝病患者肠黏膜屏障功能的变化

1.1 急慢性肝病时肠黏膜屏障功能的变化 Feld *et al*研究56例原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)和69例丙型肝炎患者肠黏膜通透性的变化, 发现患者的肠黏膜通透性(L/M)与正常人相比均明显升高, 但PBC患者和丙肝患者相比, 并无明显差别^[1]。而Cariello *et al*

同行评议者
谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

研究83例进展期肝病患者的肠黏膜通透性,发现与正常健康人群相比,进展期肝病患者肠黏膜通透性异常升高,且这种升高与门脉高压、糖尿病等因素有关。而肠黏膜通透性升高的患者,其血清炎症因子也明显升高,提示肠源性内毒素血症对机体的炎症反应有明显的促进作用^[2]。动物实验也发现大鼠急性肝衰竭时肠黏膜通透性增加,肠黏膜出现淤血、水肿、糜烂、肠肥大细胞脱颗粒等多种病理变化。同时肠道超微结构出现肠微绒毛倒伏、脱落、细胞间紧密连接破坏等变化^[3]。有研究发现^[4],重度慢性乙型肝炎患者肠黏膜通透性增高,并且主要表现为肠细胞间紧密连接的异常,其可能的机制有:(1)肠黏膜的缺血、缺氧及缺血-再灌注损伤;(2)低白蛋白血症和肠黏膜局部谷氨酰胺缺乏;(3)炎症介质及细胞因子的直接损伤;(4)NO的作用;(5)肠道运动障碍的影响;(6)肠上皮细胞的凋亡。

1.2 肝硬化患者肠黏膜屏障功能的变化 De Palma *et al*通过胶囊内镜检查发现肝硬化门脉高压患者小肠段黏膜可出现水肿、红斑、血管性病变等多种病变^[5]。而Kalaitzakis *et al*^[6]及Lee *et al*^[7]采用不同的检测方法测定肝硬化患者肠道通透性的变化,均发现肝硬化患者存在肠道通透性的异常。研究发现肝硬化患者肠化生和肠道萎缩的发生频率较正常人明显升高^[8]。而动物实验发现^[9],肝硬化鼠肠黏膜和肠平滑肌的细菌动力学较正常组明显增高,提示在肝硬化时,受损的肠黏膜屏障可以加速肠黏膜细菌移位。并且肝硬化时,由于氧化应激反应的异常,肠道的糖基化作用发生变化并伴有黏膜管腔细菌疏水性的增加,导致细菌更容易黏附在肠黏膜细胞上,促进肠细菌移位的发生^[10]。赵灏探讨病毒性肝炎后肝硬化与肠道通透性的关系,发现患者Child-Pugh分级各组中二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)的活性和L/M与正常组间差异有显著性,并自发细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)组与非SBP组间差异有显著性,认为病毒性肝炎后肝硬化患者肠道黏膜受损是导致SBP的主要原因之一,而测定血清中DAO活性及L/M比值可以探知肠黏膜结构及其功能有无损害^[11]。黄宏春的研究同样发现肝硬化SBP患者存在肠黏膜通透性异常,且肠黏膜通透性改变与内毒素血症成正相关^[12]。

肠黏膜屏障的异常变化在危重疾病患者病情发展过程中起着“枢纽”的作用。肝病患者

同样如此。肠道屏障功能的异常改变导致大量内毒素通过肠道途径进入血液循环或肠道细菌移位到腹腔内,加重炎症反应,大量释放的炎症介质、内毒素、细胞因子的共同作用导致对肝脏的“二次打击”从而恶化病情,同时反过来加重对肠黏膜屏障功能的损伤,甚至导致肠道功能衰竭。这种肠黏膜屏障功能损伤-肠道细菌移位和/或肠源性内毒素血症-病情进展之间的恶性循环是肝病患者病情加重的一个重要病理生理机制。因此,如何早期发现肝病患者肠黏膜屏障功能的损伤并及时的施以临床干预,从而打断这一恶性循环的病理生理过程,是亟待研究解决的重要临床问题。

2 GLN对肝病患者肝细胞和肠细胞的保护

近年来研究表明, GLN对肠道黏膜屏障功能损伤有较明确的保护作用。因此针对肝病患者的肠黏膜屏障功能损伤,许多学者尝试应用GLN进行干预治疗,试图修复肠黏膜损伤,打断肠黏膜屏障功能损伤-肠源性内毒素血症-病情进展的恶性循环,改善肝病患者的预后。大量研究表明, GLN可以从以下几个方面发挥保护肝细胞及肠道上皮细胞的作用。

2.1 提供细胞代谢能源, 促进肠黏膜上皮细胞的修复 GLN是肠黏膜上皮细胞的主要能源物质,提供DNA复制和细胞分裂所需的能量和核苷酸碱基,在严重肝病时,大量内毒素和炎症因子的释放可以抑制肠上皮细胞对GLN的摄取和氧化,导致GLN的缺乏,使得肠黏膜细胞凋亡增加和增殖减少,导致肠黏膜萎缩。同时GLN缺乏使得其调节肠上皮细胞紧密连接的能力减弱,肠黏膜通透性出现异常^[13]。而外源性补充GLN则可以促进肠上皮细胞表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的表达,减轻炎症介质对肠上皮细胞紧密连接的破坏,修复肠上皮细胞旁细胞途径的损伤,加速肠黏膜通透性的修复^[14-15]。方和平及汤照峰的研究发现门静脉高压患者术后加用谷氨酰胺和生长激素(GLN+rhGH),其L/M的变化,十二指肠黏膜绒毛高度、陷窝深度及肠黏膜增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)指数的变化均优于对照组。提示联用GLN和rhGH对门静脉高压患者有较好的修复肠黏膜屏障损伤和改善营养状态的作用^[16-17]。另有研究发现, GLN+rhGH组治疗后肝硬化患者小肠黏膜通透性有显著降低,十二指肠黏膜绒毛高度和隐窝

研究前沿
在各种急性慢性肝病患者中肠黏膜屏障功能有何变化?他对肝病患者的病情进展有何影响?如何积极地进行临床干预?其病理生理如何?是本研究关注的焦点。

创新盘点
对各种急慢性肝病患者肠黏膜屏障功能的变化及其病理生理意义,谷氨酰胺干预的影响及其机制,目前国内外也有一些研究,但对这些研究进行概括总结的综述性文章目前国内仍较少。本文就近年来相关研究进展作一综述,以期对该领域的研究方向起到引导作用。

深度有显著性的增高,认为GLN与rhGH联合应用能减低肠道黏膜的通透性并维持其形态学的完整^[18]。而动物实验表明,肝硬化鼠经GLN治疗后空肠黏膜谷胱甘肽含量及空、回肠黏膜厚度、绒毛高度显著增加^[19]。GLN干预治疗后非酒精性脂肪肝炎大鼠门静脉血清中内毒素、腹主动脉血浆中D-木糖、小肠组织匀浆中丙二醛(MDA)含量与模型组相比明显降低,肠黏液中可溶性IgA(sIgA)的水平和小肠组织匀浆中超氧化物歧化酶(superoxidase dismutase, SOD)与模型组相比明显升高,证实GLN有抗氧化及保护肠黏膜的作用^[20]。

2.2 改善营养状态,纠正低蛋白血症 GLN是蛋白质,核酸等生化代谢的中间体,机体蛋白质的合成速率与GLN的血浆浓度成正相关,因此补充GLN能够增强蛋白质的合成。郭银燕发现,肝硬化低蛋白血症的患者,在静滴含谷氨酰胺的营养液10 d后,血清白蛋白较治疗前明显增加,提示GLN可增加白蛋白的合成,改善肝硬化患者的营养状况^[21]。此外采用GLN和GH强化的肠外营养支持的方法能增强肝细胞的合成功能,明显提高血清白蛋白水平,并且能改善肝功能^[22]。动物实验发现, GLN能促进肝脏蛋白质合成,而GLN的这种促肝蛋白质合成作用可被肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)所抑制^[23]。

2.3 防止肠黏膜上皮细胞,肝细胞的过度凋亡 有研究表明,严重肝病时,在缺血、缺氧/再灌注损伤以及诸多炎症介质的影响下,常发生肝细胞和肠上皮细胞的过度凋亡^[24-25],从而加速肝脏损伤及肠黏膜旁细胞通路通透性的异常。研究发现GLN治疗能够使肝组织中MDA含量下降,而还原型谷胱甘肽(GSH)水平增高,血清ALT、AST、LDH含量均明显降低, Bcl-2 mRNA表达显著增强。提示GLN能够减轻肝组织损伤,上调肝脏Bcl-2 mRNA的表达,抑制肝细胞凋亡的发生^[26]。程雷 *et al* 同样证实GLN能够降低阻塞性黄疸肝细胞凋亡,增加Bcl-2蛋白表达,降低Bax蛋白表达^[27]。同样GLN对肠道上皮的过度凋亡也有防治作用^[28-29]。

2.4 防止肠道细菌移位,降低内毒素水平 针对急性肝衰竭(acute hepatic failure, AHF)大鼠的研究显示,造模前提前GLN干预组无论是肠系膜淋巴结细菌移位、平均组织含菌量、回肠绒毛高度和隐窝深度均明显优于对照组,同时肝脏病理评分明显降低,提示GLN可改善急性肝衰

竭大鼠的肠道黏膜屏障功能,减少AHF大鼠肠道细菌移位的发生^[30]。而梗阻性黄疸大鼠加用GLN后,肠壁蛋白质和DNA含量明显高于对照组。黏膜厚度、绒毛高度及绒毛表面积等指标也明显优于对照组,且肠道细菌易位率及门静脉内毒素水平明显低于对照组^[31]。而荆科 *et al* 研究提示GLN通过抑制TLR2、4 mRNA的表达,可以减轻内毒素引起的肠组织损伤^[32]。

2.5 抗炎,抗氧化及防止肠道,肝脏的缺血再灌注损伤 GSH能够对抗氧自由基诱导的细胞凋亡,但肠黏膜细胞不能直接摄取谷氨酸合成GSH,只能依赖外源性GLN在细胞内转化成谷氨酸作为合成原料。严重肝病时肠黏膜细胞不能摄取足够的GLN并合成GSH,结果导致机体抗氧化能力持续降低。而输注GLN可以提升细胞总GSH、还原型GSH含量,使其充分发挥抗氧化作用,保护肠上皮细胞和肝细胞^[33-35]。研究发现GLN能够使肝门阻断大鼠肝组织与肠道中MDA含量下降,而GSH及SOD水平增高;血清TNF- α 及内毒素水平明显降低。提示GLN具有保护肝细胞和肠道屏障,减少内毒素及细菌易位、减轻炎症因子释放的作用。同时GLN可以增加热休克蛋白70(heat shock factor-70, HSP70)的表达,促进抗炎因子的分泌^[36-39]。但崔凯 *et al* 研究术前术中持续输注GLN预防大鼠肝脏缺血再灌注损伤后发现GLN组ET, ALT水平显著高于对照组、肝组织ICAM-1表达较对照组明显增强。认为加用GLN预防大鼠肝脏缺血再灌注损伤可能是有害的,其作用不宜夸大^[40]。因为目前这一方面的研究多局限于动物实验,所采用的动物模型及评判方法不尽相同,因此结论也有所差异。但绝大多数的研究认为GLN对抗炎,抗氧化及减轻缺血再灌注损伤有积极的作用。

2.6 调节全身及肠道局部免疫的作用 细胞因子(TNF- α , IL-10)等是免疫反应的主要调节因子,来源于被激活的巨噬细胞,而GLN可以调节细胞因子的合成,促进淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞的增生和分化,具有一定的调节免疫反应的功能。同时GLN可以促进肠黏膜淋巴组织分泌sIGA,降低细菌附着力,减少细菌移位至肠壁及肠系膜淋巴结^[41]。邓宇 *et al* 发现GLN+rhGH治疗后,肝硬化患者的淋巴细胞计数以及淋巴细胞百分比都有显著意义的升高^[42]。动物实验也证明阻塞性黄疸大鼠应用GLN后免疫功能得到改善^[43]。同时GLN的缺乏可以导致机体能量代谢障碍,肝脏库普弗细胞的吞噬功能受阻,导致内毒素

不能被库普弗细胞及时清除. 而补充GLN则可以增强肝脏库普弗细胞的吞噬功能, 加速肝脏对细菌及内毒素的清除^[44].

2.7 保护肝细胞的作用 临床和动物实验研究表明, GLN对急慢性肝脏损伤有一定的保护作用. 研究发现^[45], 重度慢性病毒性乙型肝炎患者在常规治疗的基础上加用谷氨酰胺颗粒后, 无论是肠黏膜通透性, 内毒素血症还是肝功能指标均较对照组有较好的改善. 动物实验也证实GLN能够降低血清ALT、AST水平, 抑制肝组织核因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)及TNF- α 的表达, 改善肝组织损伤, 对急性肝损伤有明确的保护作用^[46-47]. 同时联合应用谷氨酰胺与地塞米松可以对抗内毒素造成的肝损伤, 减轻脓毒症幼年大鼠的肝脏损伤和重塑^[48].

3 结论

随着人们对肠道屏障功能障碍在肝病患者发生, 发展过程中病理生理意义的日益重视, 对各种急慢性肝病患者肠道屏障功能损伤及其预防的研究也逐步深入. 虽然研究结论不尽一致, 但绝大多数研究均认为在严重肝病及肝硬化患者存在肠道屏障功能的异常损伤, 肠黏膜屏障功能损伤-肠道细菌移位和/或肠源性内毒素血症-病情进展之间的恶性循环是肝病患者病情加重的一个重要病理生理机制. 而GLN干预治疗则对急慢性肝患者的肠道屏障功能和肝脏功能有一定的保护作用. 但目前这一领域的研究也存在不少的问题, 主要有: (1)评价肠黏膜屏障功能的方法不统一, 并且所采用的方法不能反映肠黏膜的完整功能. 目前临床比较常用的反映肠黏膜屏障功能的指标(L/M, DAO等), 侧重对肠黏膜物理屏障的反映, 而针对肠道黏液屏障、免疫屏障、细菌屏障的检测则极为繁琐, 没有适合临床常规开展的检测项目. 特别是针对肠黏膜屏障早期损伤的评价, 尚缺乏规范、定量的测定手段. (2)目前的研究无论是肝病患者肠黏膜屏障功能变化的研究还是GLN干预治疗的研究均以动物实验居多, 临床研究偏少, 并且临床观察例数偏少, 结论也不尽一致. (3)采用GLN干预治疗, 目前的研究在给药途径(口服、静脉或肠内营养), GLN的给药剂量, 是否合并用药等方面均不能协调一致, 以探索性研究为主, 以致所得结果可比性较差. 今后需大力加强大样本, 多中心联合, 随机对照的临床试验研究, 以期获得更多符合循证医学的支持证据.

4 参考文献

- 1 Feld JJ, Meddings J, Heathcote EJ. Abnormal intestinal permeability in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1607-1613
- 2 Cariello R, Federico A, Sapone A, Tuccillo C, Scialdone VR, Tiso A, Miranda A, Portincasa P, Carbonara V, Palasciano G, Martorelli L, Esposito P, Carteni M, Del Vecchio Blanco C, Loguercio C. Intestinal permeability in patients with chronic liver diseases: It's relationship with the aetiology and the entity of liver damage. *Dig Liver Dis* 2009 Jun 5. [Epub ahead of print]
- 3 段美丽, 王彦军, 韩德五. 急性肝功能衰竭时肠黏膜屏障损伤的研究. *中国病理生理杂志* 1999; 15: 906-908
- 4 宋怀宇, 姜春华, 杨建荣, 陈秋虹, 黄云花, 梁列新. 重度慢性乙型病毒性肝炎患者肠黏膜通透性的变化及其机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3561-3565
- 5 De Palma GD, Rega M, Masone S, Persico F, Siciliano S, Patrone F, Matantuono L, Persico G. Mucosal abnormalities of the small bowel in patients with cirrhosis and portal hypertension: a capsule endoscopy study. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 529-534
- 6 Kalaitzakis E, Johansson JE, Bjarnason I, Björnsson E. Intestinal permeability in cirrhotic patients with and without ascites. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 326-330
- 7 Lee S, Son SC, Han MJ, Kim WJ, Kim SH, Kim HR, Jeon WK, Park KH, Shin MG. Increased intestinal macromolecular permeability and urine nitrite excretion associated with liver cirrhosis with ascites. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3884-3890
- 8 İbrişim D, Cevikbaş U, Akyüz F, Poturoğlu S, Ahishali E, Güllüoğlu M, Demir K, Beşişik F, Boztaş G, Özdiş S, Cakaloğlu Y, Mungan Z, Okten A, Kaymakoglu S. Intestinal metaplasia in portal hypertensive gastropathy: a frequent pathology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 874-880
- 9 Palma P, Mihaljevic N, Hasenberg T, Keese M, Koepfel TA. Intestinal barrier dysfunction in developing liver cirrhosis: An in vivo analysis of bacterial translocation. *Hepatol Res* 2007; 37: 6-12
- 10 Natarajan SK, Ramamoorthy P, Thomas S, Basivireddy J, Kang G, Ramachandran A, Pulimood AB, Balasubramanian KA. Intestinal mucosal alterations in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis: changes in glycosylation and luminal bacteria. *Hepatology* 2006; 43: 837-846
- 11 赵灏, 李晓欧, 王佩, 姜国强, 陈伟平, 屠士行, 赵国根. 病毒性肝炎后肝硬化患者肠道的通透性. *中华传染病杂志* 2002; 20: 105-107
- 12 黄宏春, 王秀敏, 王永亮, 李继昌. 肠黏膜通透性改变对肝硬化自发性细菌性腹膜炎的影响. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 17: 852-853
- 13 Li N, Lewis P, Samuelson D, Liboni K, Neu J. Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G726-G733
- 14 Seth A, Basuroy S, Sheth P, Rao RK. L-Glutamine ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G510-G517
- 15 张媛莉, 何惠娟, 姚华国. 谷氨酰胺对慢性酗酒大鼠肠道上皮细胞间连接蛋白表达的影响. *广东医学院学报* 2008; 26: 370-376
- 16 方和平, 邓美海, 汤照峰, 林楠, 许瑞云. 谷氨酰胺和生长激素对门静脉高压术后营养状态和肠黏膜屏障

名词解释

肠黏膜屏障功能: 肠黏膜屏障功能由肠黏膜上皮的物理屏障、黏液屏障、免疫屏障、细菌屏障等多个屏障组成, 是肠黏膜上皮抵御肠道细菌和毒素入侵的门户. 在临床实践中, 较为可行的, 能够反映肠黏膜屏障功能变化的指标多肠黏膜通透性(L/M), 二胺氧化酶(DAO)等间接反映.

同行评价

本文有先进性, 文字通顺, 表达良好, 整体评价良好, 综述全面, 特别是谷氨酰胺干预的作用和机制的综述和评价全面, 对临床有指导意义。

- 的影响. 中华实验外科杂志 2008; 25: 792-794
- 17 汤照峰, 凌云彪, 郝峥, 林楠, 许瑞云. 谷氨酰胺和重组人生长激素对门静脉高压症患者术后肠黏膜屏障功能的影响. 中国临床营养杂志 2006; 14: 296-299
- 18 刘波, 邓宇, 许瑞云. 谷氨酰胺与重组人生长激素对肝硬化患者肠黏膜屏障的影响. 医学临床研究 2006; 23: 1598-1600
- 19 赵平, 董蕾, 罗金燕. 谷氨酰胺对肝硬化大鼠肠黏膜的保护作用. 西安医科大学学报 1999; 20: 332-334
- 20 李生, 吴万春, 何池义, 韩真, 金道友. 谷氨酰胺对非酒精性脂肪肝大鼠肠黏膜屏障的保护作用. 临床消化病杂志 2008; 20: 241-244
- 21 郭银燕. 谷氨酰胺对肝硬化患者低蛋白血症的临床研究. 临床肝胆病杂志 2007; 23: 417-418
- 22 刘敦贵, 刘新明, 邱国光, 邹声泉. 谷氨酰胺和重组生长激素强化的肠外营养对低蛋白血症的影响. 临床内科杂志 2005; 22: 79-81
- 23 周济宏, 李幼生, 曹亚澄, 朱明芳, 韩勇, 黎介寿. 肿瘤坏死因子对谷氨酰胺调控大鼠肝蛋白质合成的影响. 肠外与肠内营养 2006; 13: 197-199
- 24 宋红丽, 吕飒, 刘沛. 暴发性肝衰竭小鼠肠黏膜上皮细胞凋亡的研究. 中国医科大学学报 2005; 34: 223-224
- 25 周英, 陈奕慧, 李文胜. 肝组织FasL表达与病程演变关系的研究. 海南医学 2006; 17: 115-116
- 26 刘国平, 朱闻溪, 杨广顺, 周文平, 程广明. 谷氨酰胺对大鼠肝门阻断后肝脏Bcl-2 mRNA表达的影响及其保护作用. 中国现代普通外科进展 2008; 11: 297-300
- 27 程雷, 谭广, 王举, 石爱平, 谭毓铨, 王忠裕. 谷氨酰胺对阻塞性黄疸大鼠肝细胞凋亡和相关基因Bcl-2及Bax表达的影响. 吉林大学学报·医学版 2005; 31: 675-677
- 28 Evans ME, Jones DP, Ziegler TR. Glutamine inhibits cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells via the pyrimidine pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G388-G396
- 29 孙敬平, 马洪升. 谷氨酰胺对冷束缚应激状态下大鼠小肠黏膜细胞凋亡和增殖的影响. 临床消化病杂志 2008; 20: 29-32
- 30 刘寿荣, 娄国强, 黄文豹. 谷氨酰胺防治急性肝衰竭大鼠肠道细菌移位实验研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2007; 21: 126-128
- 31 姜旭生, 李少芬. 谷氨酰胺治疗梗阻性黄疸大鼠肠黏膜屏障损伤的实验观察. 山东医科大学学报 1999; 37: 18-20
- 32 荆科, 孙梅. 谷氨酰胺对内毒素血症肠组织TLR2、4表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3122-3126
- 33 Wu GH, Wang H, Zhang YW, Wu ZH, Wu ZG. Glutamine supplemented parenteral nutrition prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2592-2594
- 34 杨艳萍, 许瑞龄, 尹镭. 谷氨酰胺对半乳糖胺/脂多糖诱导急性肝损伤发生的影响. 山西医科大学学报 2005; 36: 414-416
- 35 贾昌俊, 戴朝六, 张旭, 徐锋, 崔凯, 许永庆. 谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时肝组织谷胱甘肽含量和细胞凋亡相关基因Bcl-2、Bax蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2297-2301
- 36 刘国平, 朱闻溪, 杨广顺, 周文平, 程广明. 谷氨酰胺对肝门阻断后肝脏损伤影响的实验研究. 中国误诊学杂志 2007; 7: 2943-2945
- 37 刘国平, 朱闻溪, 杨广顺, 周文平, 程广明. 谷氨酰胺对肝门阻断后肠道损伤的影响及其意义. 中国现代普通外科进展 2007; 10: 131-134
- 38 徐峰, 戴朝六, 张旭, 贾昌俊, 崔凯, 许永庆, 黄勇, 王明辉. 大鼠肝脏缺血再灌注损伤中谷胱甘肽对HSP70表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2481-2483
- 39 许永庆, 戴朝六, 崔凯, 贾昌俊, 徐锋. 谷氨酰胺在肝脏缺血再灌注损伤中对肠道黏膜保护作用. 第三军医大学学报 2007; 29: 1050-1052
- 40 崔凯, 戴朝六, 许永庆, 彭松林, 黄勇, 赵阳. 术前术中持续输注谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响. 中国临床营养杂志 2005; 13: 250-253
- 41 Lai YN, Yeh SL, Lin MT, Shang HF, Yeh CL, Chen WJ. Glutamine supplementation enhances mucosal immunity in rats with Gut-Derived sepsis. *Nutrition* 2004; 20: 286-291
- 42 邓宇, 王钟兴, 邢帮荣, 叶志强, 孔庆磊, 陈郁鲜. 谷氨酰胺与重组人生长激素对肝硬化患者外周血淋巴细胞及白细胞的影响. 实用医学杂志 2006; 22: 2602-2603
- 43 程雷, 谭广, 王忠裕, 谭毓铨. 谷氨酰胺对阻塞性黄疸大鼠免疫功能的影响. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 71-73
- 44 杨艳萍, 许瑞龄. 谷氨酰胺对库普弗细胞吞噬功能的影响. 山西医药杂志 2005; 34: 827-828
- 45 宋怀宇, 姜春华, 杨建荣, 陈秋虹, 黄钧, 梁列新. 谷氨酰胺颗粒对重度慢性乙型病毒性肝炎患者肠道通透性、内毒素血症与肝功能的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1247-1252
- 46 王伟强, 任成山. 谷氨酰胺对急性肝损伤的保护作用及临床意义. 第三军医大学学报 2006; 28: 1184-1187
- 47 刘寿荣, 黄文豹. 谷氨酰胺对急性肝功能不全大鼠的防治作用. 中国现代应用药学 2005; 22: 508-510
- 48 王虹, 孙梅, 周卓. 谷氨酰胺和地塞米松对脓毒症幼年大鼠肝脏肿瘤坏死因子- α 与基质金属蛋白酶3的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2382-2386

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

细胞凋亡在肝移植免疫耐受中的研究进展

冯继峰, 刘 静

冯继峰, 刘静, 厦门大学附属东南医院(中国人民解放军第175医院)普外科 福建省漳州市 363000
福建省青年人才基金资助项目, No. 2006F3147
作者贡献分布: 冯继峰与刘静对此文所作贡献均等; 本综述由冯继峰撰写完成, 刘静审核。
通讯作者: 刘静, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 363000, 福建省漳州市华中路269号, 厦门大学附属东南医院(中国人民解放军第175医院)普外科. ljdoctor@hotmail.com
电话: 0596-2975769
收稿日期: 2009-07-08 修回日期: 2009-09-03
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-09-28

Recent advances in understanding the role of apoptosis in induction of immune tolerance in liver transplantation

Ji-Feng Feng, Jing Liu

Ji-Feng Feng, Jing Liu, Department of General Surgery, the 175th Hospital of Chinese PLA, Southeast Hospital, Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
Supported by: the Young Talent Foundation of Fujian Province, No. 2006F3147
Correspondence to: Professor Jing Liu, Department of General Surgery, the 175th Hospital of Chinese PLA, Southeast Hospital, Xiamen University, 269 Huazhong Road, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China. ljdoctor@hotmail.com
Received: 2009-07-08 Revised: 2009-09-03
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-09-28

Abstract

Apoptosis is a widespread physiological or pathological phenomenon that is of great significance to life process. It plays an important role not only in the development of autoimmune diseases, tumors, aging and degeneration, but also in many pathological processes central to organ transplantation. In recent years, numerous studies have shown that apoptosis may be an important cause of immune tolerance in liver transplantation. In this article, we will review the mechanisms underlying apoptosis-induced immune tolerance in liver transplantation and its clinical significance during the evolution of allogeneic tolerance.

Key Words: Apoptosis; Liver transplantation; Immune tolerance

Feng JF, Liu J. Recent advances in understanding the role of apoptosis in induction of immune tolerance in liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2803-2810

摘要

细胞凋亡是机体内普遍存在的一种生理和病理现象, 在生命过程中具有重要的意义. 他不仅在自身免疫性疾病、肿瘤、衰老及变性等过程中起着重要作用, 而且在器官移植领域, 尤其是与移植免疫耐受的诱导密切相关. 近年来, 大量的研究表明, 细胞凋亡可能是肝移植免疫耐受的重要原因. 本文就细胞凋亡的现象、类型、作用与诱导肝移植免疫耐受形成的发生机制以及临床意义作一综述, 以期对临床肝移植术后免疫耐受的成功产生提供帮助.

关键词: 细胞凋亡; 肝移植; 免疫耐受

冯继峰, 刘静. 细胞凋亡在肝移植免疫耐受中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(27): 2803-2810
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2803.asp>

0 引言

细胞凋亡(apoptosis)也称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 是机体内普遍存在的一种生理和病理现象, 在生命过程中具有重要的意义. 细胞凋亡不仅可以清除携带外来抗原的细胞, 也可以消除自身免疫活性细胞. 细胞凋亡在许多领域均有十分重要的作用, 尤其在器官移植领域, 尤其是肝移植中的作用研究正成为现代移植免疫学的热点之一.

1 T细胞凋亡

对于机体免疫系统而言, 凋亡或程序性死亡是调节T细胞成熟和免疫平衡的一种关键机制. 在机体的免疫反应中, 当宿主遭受的威胁降低后, 就通过凋亡来清除外周T细胞以维持有效的免疫反应; 而中止外周T细胞反应失败, 将导致自身免疫性疾病. 有研究表明^[1-3], 外周T细胞凋亡在诱导T细胞耐受和延长移植生物生存方面有重要作用. 因此, 对细胞凋亡诱导的调节, 尤其是

背景资料

目前, 肝移植被认为是治疗终末期肝病最有效的措施. 但是, 肝移植术后排斥反应是目前肝移植领域面临的重大难题. 细胞凋亡在许多领域均有十分重要的作用, 尤其在器官移植, 尤其是肝移植中的作用研究正成为现代移植免疫学的热点之一.

同行评议者
管世鹤, 副教授, 安徽医科大学第一附属医院检验科

研发前沿
目前肝移植面临的问题是如何诱导稳定而持久的免疫耐受, 以及如何确定已形成的免疫耐受, 从细胞凋亡入手将为临床肝移植开拓新的思路。

对于移植激活的T细胞逃避凋亡的机制的研究, 为通过耗竭经移植活化的T细胞来延长移植物的生存提供了潜在的策略。

1.1 T细胞凋亡的类型 T细胞凋亡广义上分为2种类型: 即活化诱导的细胞死亡(activation induced cell death, AICD)和被动性或忽略性细胞死亡(passive cell death, PCD). AICD是指活化的、被反复刺激的T细胞发生凋亡. 最先报道而且最重要的介导因子是Fas, 活化的T细胞被诱导表达Fas分子, 当与表达FasL的细胞接触后便发生细胞凋亡^[4]. 最新研究表明^[5-6], Fas介导的细胞凋亡在控制外周自体激活的T细胞方面起到非常重要的作用. 除此之外, T细胞也能通过肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族成员, 如死亡受体(death receptor, DR)3, 4, 5介导而发生凋亡^[7].

PCD指当细胞被抗原刺激进入细胞周期后, 撤去其依赖的细胞因子(如IL-2)而导致Bcl-2家族的抗细胞凋亡分子的快速下调而发生的凋亡. IL-2和大量相关的细胞因子, 无论在体内或体外, 均能促进T细胞的生存. 这一类细胞因子家族之所以能够促进T细胞的生存, 主要与他们各自受体中存在相同的 γ 链有关^[8]. 然而, 在某种意义上自相矛盾的是, IL-2也可能通过细胞周期S期细胞型Fas相关死亡域样IL-1 β 转换酶抑制蛋白(cellular FLICE-like inhibitor protein, c-FLIP)的下调引起T细胞对死亡受体介导的细胞死亡更敏感^[9]. 尽管IL-2原本是一种T细胞生长因子, 但有关IL-2或CD25(IL-2受体 α 链)的研究表明, IL-2在促进对凋亡的敏感性方面起到了某种作用, 进而提高了对自身免疫的易感性^[10-11].

1.2 T细胞凋亡的保护效应 尽管凋亡对于中止免疫反应和维持机体免疫平衡的重要性不言而喻, 但是T细胞保持持久的活力以便有效地行使功能也殊为重要. 细胞内大量特殊的生物学机制, 使T细胞得以避免上述2种细胞死亡的主要方式诱导的凋亡, 从而发挥保护效应.

最具特征性的活化T细胞生存信号很可能是通过大量的共刺激分子与他们在抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)表面上的同源配体相互作用而获得的. CD28是具有最广泛特征性的共刺激分子, CD28在与APC上的同源配体CD80(B7-1)和CD86(B7-2)结合后, 即启动细胞内信号通路, 这些信号与TCR介导的信号协同, 调节大量能促进T细胞生存的蛋白质的活性. 有

研究表明^[12], T细胞之所以暂时能逃避DR诱导的凋亡, 是因为与c-FLIP的高水平的表达有关, 而c-FLIP的表达受到CD28介导的共刺激的调节. 除了维持c-FLIP的表达水平, CD28共刺激尚能短暂地诱导抗凋亡的Bcl-2家族成员的表达, 导致NF- κ B介导的信号激活, 这两者都能促进T细胞的生存^[13].

此外, 对APC上的CD40的刺激, 通过增加APC表面上的CD80和CD86表达, 间接促进T细胞的活化. 对CD40的刺激亦可诱导黏附分子和炎性细胞因子的表达, 参与T细胞的活化, 并可能最终有助于T细胞的存活. 研究表明^[14-15], 几种其他的TNFR超家族成员能直接转导生存信号到活化T细胞, 主要是因为他们能够活化NF- κ B介导的信号, 以及可能诱导抗凋亡的Bcl-2家族成员的表达.

2 细胞凋亡在移植耐受中的作用

2.1 细胞凋亡能够诱导移植免疫耐受 如何能更好地诱导机体对移植产生免疫耐受, 一直是移植学界研究的热点. 虽然对于移植免疫耐受的机制提出了多种学说和理论, 但至今尚无一种理论体系能够系统地解释免疫耐受的所有现象. 近年来, 有关细胞凋亡诱导免疫耐受的研究给我们带来了新的观点和方法: 细胞凋亡可以主动调节免疫系统^[16-18].

为了证实细胞凋亡和移植免疫耐受之间的关系, 研究者们进行了大量的研究工作. Voll *et al*^[19]早在1997年就发现, 在细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激人外周血淋巴细胞反应体系中加入凋亡细胞, 可抑制IL-12, IL-1 β 和TNF- α 的分泌, 促进IL-10的产生, 从而认为细胞凋亡可以诱导耐受产生. Tamada *et al*^[20]报道, 地塞米松(dexamethasone, DEX)能够诱导细胞凋亡, 通过IL-4打破Th1/Th2之间的平衡诱导免疫耐受. Schwarz *et al*^[21]报道, 紫外线能够通过Fas/FasL途径促使细胞凋亡, 从而诱导免疫耐受的产生. Aubin *et al*^[22]进一步研究发现, 紫外线照射能够上调T细胞的表达, 促进抑制性细胞因子IL-4和IL-10的释放, 从而能够诱导移植物的免疫耐受.

2.2 细胞凋亡在移植耐受中的作用 Sayegh *et al*^[23]首先在啮齿目动物模型中发现有协同刺激途径能保护T细胞避免凋亡, 阻断这些途径后成功诱导T细胞耐受和延长移植存活时间, 由此推断T细胞凋亡在移植耐受方面的作用. Li

*et al*进一步研究发现自身依赖性T细胞对凋亡的易感性在外周免疫耐受方面的诱导起到轴心的作用, 对于共刺激信号的阻断能通过各种机制来抑制T细胞反应, 但更深入的研究表明, 同种异体移植时反应性T细胞对凋亡诱导是否敏感对于诱导外周性免疫耐受至关重要^[24-25]。在一个全淋巴照射诱导的肝移植免疫耐受模型中, 发现其免疫耐受的机制主要在于移植物浸润白细胞的凋亡以及在移植物和外周血中调节性T细胞Fox P3(+)CD4(+)CD25(+) Treg增加引起的免疫调节^[26]。最近有研究表明^[27], T细胞具有重要的免疫效应, 打破效应性T细胞和调节性T细胞之间的平衡, 选择性地针对特定的T细胞的共刺激途径, 对于诱导免疫耐受是及其重要的。

此外, 对IL-2缺陷小鼠移植模型的研究也提示, DR介导的凋亡对于诱导移植免疫耐受也起到了某种作用。有研究表明, IL-2缺陷小鼠对共刺激信号的阻断所诱导的免疫耐受能够产生抵抗, 这种抵抗与同种异体抗原介导的T细胞的凋亡机制受损有关^[28]。在IL-2或功能性IL-2受体缺陷型小鼠, T细胞耗竭机制有缺陷, 结果在外周堆积的活化T细胞越来越多, 于是就增加了这种小鼠对自体免疫性疾病的易感性^[29]。Zheng *et al*^[30]进一步研究表明, 源于IL-2基因敲除小鼠的T细胞在体外对Fas介导的细胞凋亡不敏感, 即IL-2除了在功能上作为T细胞的一种生长因子以外, 其在体内的主要作用是使活化T细胞对于Fas介导的凋亡变得更敏感。所有上述这些都说明了细胞凋亡在诱导免疫耐受中的重要作用。

3 细胞凋亡与肝移植免疫耐受

3.1 肝移植特异性免疫耐受现象 众所周知, 肝脏易于诱导免疫耐受。肝脏不仅可以诱导对外来抗原的免疫耐受, 大量研究表明, 肝脏在移植耐受方面也表现了特殊的作用。在一些同种异基因肝移植动物模型中, 受试者可不用任何免疫抑制剂, 而移植物长期存活, 因此肝脏被称为“免疫特惠器官”。然而, 体外试验表明, 肝细胞可以刺激脾细胞产生杀伤性T淋巴细胞。有人认为肝细胞虽可表达MHC-I类抗原, 但肝细胞与肝血窦之间有肝血窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cell, LSEC)和库普弗细胞(Kupffer cell, KC)所阻隔使其难以接触到淋巴细胞。但是无论从抗原提呈能力和细胞数量, 如果没有受到其他某种因素的控制, 这2种细胞本身足以诱发排斥反应^[31-32]。Knolle *et al*^[33]研究认为, 肝脏的

免疫特性与凋亡细胞有关。Shi *et al*^[34]研究发现, 中性粒细胞在体内代谢速度很快, 每天约有 1.4×10^{10} 的中性粒细胞凋亡, 从而需要及时清除, 而肝脏正是清除凋亡中性粒细胞的场所。

3.2 肝移植中存在细胞凋亡现象 研究表明, 肝移植免疫耐受特性与细胞凋亡有关。Krams *et al*^[35]于1995年首次报道大鼠同种肝移植中凋亡细胞数量随时间而增加, 发现细胞凋亡与排斥时的病理学改变, 单核细胞浸润和肝酶升高相一致, 且TGF- β 1表达增加可致细胞凋亡。Qian *et al*^[36]发现移植肝内的供体T细胞于移植后2-4 d即被受体T细胞所替代, 而且浸润至移植肝内的细胞具有强烈的抗供体细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)活性, 但移植后14 d CTL活性降低。Li *et al*^[37]用抗CD25 mAb对受体大鼠进行预处理后显示, 抗CD25 mAb抑制调节性T细胞对肝移植受体大鼠中T细胞的活化, 从而阻止肝移植免疫耐受的产生。认为是通过增加受体的免疫反应, 下调调节性T细胞的表达, 并且降低T细胞的凋亡实现的。

上述研究显示, 在同种肝移植急性或慢性排斥时均有细胞凋亡。Krams *et al*^[38]进一步用RT-PCR发现人正常肝细胞表达大量可溶性Fas, 这种Fas表达也存在于无排斥反应的移植肝细胞中; 但在排斥移植肝活检标本中仅50%表达, 其表达水平在同种异体肝移植患者中也有降低。Yamaguchi *et al*^[39]研究发现, 大鼠同种肝移植发生排斥时受体胸腺皮质的凋亡细胞增多, 受体血清中TNF- β 显著升高。

4 细胞凋亡诱导肝移植耐受的机制

4.1 抑制T细胞的活化 细胞凋亡能够诱导免疫耐受, 其主要机制是细胞凋亡后产生的凋亡细胞可以直接抑制T细胞活化, 从而可以使移植物逃避宿主的攻击。Sun *et al*^[40]以ConA刺激小鼠脾细胞增殖, 观察凋亡细胞预处理后对脾细胞CD69(一种早期T细胞活化标记)表达的影响。结果发现CD69的表达明显下调, 表明凋亡细胞可以主动抑制T细胞的活化, 抑制效果与凋亡细胞种类、凋亡诱导方式无关, 而与凋亡细胞数量密切相关。这种抑制作用缘于细胞凋亡所共有的特异性改变, 凋亡所产生的凋亡细胞快速被APC吞噬, 短时间递呈大量供者MHC抗原; 而凋亡细胞被吞噬后, 不能提供T细胞活化所需要的共刺激因子, 使APC共刺激信号表达被抑制, 抑制了APC的激活, 使相应的T细胞克隆灭能, 从

相关报道

Klugewitz *et al*研究表明Th2细胞能促使IL-4不断表达, 从而诱导免疫耐受的产生。Mariotti *et al*研究表明, 细胞凋亡能够促使Th2细胞分化, 表达IL-4, IL-10, 穿孔素, Fas配体等, 抑制了细胞性免疫应答, 防止急性排斥反应的发生而诱导免疫耐受产生。

创新盘点

本文就近年来细胞凋亡在肝移植免疫耐受中的研究进展进行综述,介绍了细胞凋亡的类型特点,并系统地阐述了细胞凋亡诱导肝移植免疫耐受的机制。

而诱发供体特异性的免疫耐受^[41]。

另一方面,细胞凋亡能促使Th1细胞向Th2细胞转化,而后者则能使相应T细胞无能,从而产生免疫耐受^[42-43]。Klugewitz *et al*^[44]研究CD4⁺ T细胞在免疫耐受中的作用,通过过继转移检测Th1和Th2是诱导免疫反应还是免疫耐受的研究,表明Th1细胞失去分泌细胞因子的能力,而Th2细胞能促使IL-4不断表达,从而诱导免疫耐受的产生。此外, Mariotti *et al*^[45]研究表明,细胞凋亡能够促使Th2细胞分化,表达IL-4, IL-10, 穿孔素, Fas配体等,抑制了细胞性免疫应答,防止急性排斥反应的发生而诱导免疫耐受产生。

4.2 肝脏抗原递呈细胞(liver antigen-presenting cell, LAPC)的作用 APC的功能状态是影响T细胞反应方向的决定性因素。APC在递呈抗原时,如有共刺激信号即发生免疫应答反应,若无共刺激信号或低表达共刺激信号则发生T细胞无能而产生免疫耐受。有研究表明^[46],在IL-10等细胞因子的作用下,APC共刺激信号弱表达并能诱导免疫耐受的产生。凋亡细胞能快速被APC吞噬,凋亡细胞上的MHC抗原将被浓集在APC内,因而能够短时提供大量供者MHC抗原,有效地被递呈;同时,凋亡细胞通过其主动的调节免疫反应的作用,使APC调节细胞因子由TH1型向TH2型转化,形成局部的高浓度,使相应T细胞无能,产生免疫耐受^[47]。此外, Wang *et al*^[43]报道,凋亡细胞造成局部的免疫抑制环境,使受体APC共刺激信号表达被抑制,抑制了APC的激活,使相应的T细胞克隆灭能,从而诱发供体特异性的免疫耐受。

因此, LAPC可以作为着重研究的对象。可以说,在与各种淋巴细胞的接触与协助的过程中, LAPC可能是肝脏内部免疫调节走向的“指挥员”。Kita *et al*^[48]报道,肝脏中占细胞总数70%-80%的肝细胞组成了肝实质,肝脏非实质细胞占20%-30%,组成分别为:淋巴细胞占25%, KC占接近20%, LSEC占50%, 其他还有少量的树突状细胞(dendritic cell, DC)、肝星形细胞、胆管细胞等。因此,了解LAPC有关作用机制,对移植免疫耐受能力具有重要的意义。

4.2.1 凋亡细胞的吞噬: 肝脏是处理凋亡细胞的主要场所,肝脏的微环境对其免疫调节作用至关重要。细胞凋亡在移植免疫耐受中的作用主要是凋亡细胞本身产生免疫抑制性细胞因子,或者通过被吞噬细胞吞噬,吞噬了凋亡细胞的吞噬细胞可以分泌免疫抑制性细胞因子,这些

吞噬细胞同时又是APC,其中LSEC和KC对凋亡细胞的吞噬及其对局部免疫调节作用有助于理解肝移植的免疫耐受现象。

LSEC是构成肝窦壁的主要细胞成分,他通过吞噬、呈递和分泌抑制性因子等方式,参与对肝脏内日常抗原免疫原性的处理。LSEC是肝脏独有的APC,表面有丰富的吞噬受体,如清道夫(scavenger)受体,甘露糖(mannose)受体, Toll样受体, Fcγ受体等,可以吞噬肝窦血液中的大分子、病原体,对凋亡细胞也有吞噬作用^[49]。LSEC还能够表达FasL,通过Fas和FasL结合在体外实验中表现出介导淋巴细胞凋亡的能力^[50]。Tokita *et al*^[51]通过对LSEC作用机制继续研究后发现, LSEC能够通过Fas/FasL的方式直接调节T细胞发生免疫耐受。该研究组在经门脉输入供体细胞模型中,又证明了LSEC能够通过对移植抗原的间接识别模式诱导抗原反应性T细胞产生免疫耐受。Ge *et al*^[52]研究对肝移植受体使用抗LSEC抗体,发现肝组织中TGF-β水平显著下降,此处理方法明显增强了免疫排斥反应。Ge *et al*^[32]进一步在肝移植大鼠体内研究LSEC的免疫效应,通过荧光素标记检测后发现,与排斥组相比,在移植耐受组有大量的CD8⁺ T细胞的减少,从而使其诱导免疫耐受的作用更甚于免疫排斥。

KC是肝脏特有的吞噬细胞之一,大约占全身常驻型巨噬细胞总数的80%-90%。有关KC在移植免疫反应中作用的相关研究认为^[53-54], KC通过表达Fas配体,诱导激活的T细胞发生凋亡,而参与肝脏移植耐受的实现。当肝脏本身既作为外来抗原,又作为有潜在免疫调节能力的器官进入机体时,首先面临受体免疫系统的打击,表现为各组成细胞群不同程度的功能受损以及局部强烈炎症症状;其后急性炎症逐渐消失,肝脏各组成细胞群和功能逐渐恢复;最终可能产生免疫调节作用造成免疫耐受,这其中是一个复杂多变的过程。正常水平情况下, KC可以通过吞噬凋亡细胞分泌免疫抑制活性因子,如IL-10, TGF-β, PGE2, PAF等,维持肝内的免疫平衡^[55]。氯化钆(GdCl3)是KC吞噬阻断剂,研究表明,用氯化钆特异性阻断KC的吞噬作用,则其诱导机体免疫耐受的能力丧失^[56-57]。

4.2.2 抑制DC的成熟: DC是控制免疫反应的决定性因素,作为目前普遍公认的一种专业APC,对凋亡细胞的提呈也具有重要的意义,因为DC是目前唯一确定能激活初始T淋巴细胞转化为

效应和调节性T淋巴细胞的APC, 其活化与成熟作为免疫应答发生的控制环节也受到周围环境的影响和控制^[16]. 当机体受到侵害, 细胞发生变性坏死, 释放“危险信号”, DC被激活分化成熟而发生一系列改变, 细胞膜表面MHC分子表达增多、半衰期延长以及“共刺激信号”表达增多并与相应的T细胞结合产生免疫反应^[58]. 细胞凋亡作为生物体内常见的生物现象, 没有危险信号的释放, DC吞噬凋亡细胞后保持非成熟的稳定安息状态, 即使这些凋亡细胞发生了继发性坏死也不发生活化反应^[59]. 关于DC对于吞噬凋亡细胞所起的作用不尽相同, 一些报道认为DC吞噬凋亡细胞能够诱导免疫耐受^[60], 另一些报道却认为引起免疫应答^[61-62]. Steinman *et al*^[63]则认为, DC提呈凋亡细胞的后果与DC的成熟度有关, 未成熟DC吞噬凋亡细胞后诱导免疫耐受, 成熟DC则诱导免疫应答反应.

未成熟DC含有磷脂酰丝氨酸受体, 非常适合摄取凋亡小体, 被报道在自身抗原转换和自身免疫调节的中起到了关键的作用^[64]. 最近有研究表明, 致耐受性的DC处于未成熟状态, 能增加吡啶胺2, 3-二氧化酶(indoleamine 2, 3-dioxygenase)的表达, 后者能诱导同种异体移植后反应性T细胞凋亡, 能增加CD4(+)CD25(+)CTLA4(+) Treg细胞的数量, 进而能够延长移植物生存时间^[65]. 因此, 由未成熟的DC摄取凋亡细胞所进行的抗原转换通过清除或调节特异性T细胞, 成为一种重要的维持自身免疫耐受的机制.

4.3 分泌抑制性细胞因子 TGF- β 是一种广泛存在、具有免疫抑制作用的淋巴因子, 是由3个异构体构成的家族, 包括TGF- β 1, TGF- β 2和TGF- β 3, 其中对于TGF- β 1的研究较清楚, 他可以从多方面抑制免疫反应, 诱导免疫耐受. Chen *et al*^[66]在体内注射凋亡细胞后, 炎症因子分泌减少炎症反应减轻, 从炎症部位分离的巨噬细胞可分泌TGF- β 1, 而注射活细胞则没有此作用. Huynh *et al*^[67]研究磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)依赖的凋亡细胞发现, 不表达PS的凋亡细胞不能诱导巨噬细胞TGF- β 1的产生, 而转染后则可以诱导TGF- β 1产生, 提示PS介导的吞噬作用对诱导巨噬细胞产生TGF- β 1至关重要. Jiang *et al*^[68]体外实验在凋亡细胞培养液发现TGF- β 1明显增多, 而且注射凋亡细胞能减少移植后炎症因子的表达, 从而增加了TGF- β 1的分泌. 最新研究表明^[69-71], 在体内吞噬凋亡细胞的巨噬细胞比那些吞噬坏死细胞或未处理细

胞能分泌更多的TGF- β 1, 其中主要是吞噬坏死细胞的巨噬细胞能利用短暂的CD40上调更有效提呈抗原给T细胞, 然而那些吞噬了凋亡细胞的巨噬细胞则因为所分泌的抑制性细胞因子的影响而成为“无能”的APC, 从而诱导免疫耐受的产生.

IL-10为目前研究较多的Th2细胞因子. IL-10最初被称为T辅助细胞的细胞因子合成抑制因子, 是巨噬细胞及T细胞来源细胞因子, 具有负向免疫调节作用. IL-10主要通过改变APC的功能而抑制IL-2、IFN- γ 等Th1细胞因子的产生, 还能抑制B7协同刺激分子的配体表达, 抑制MHC-II类抗原及细胞黏附分子的表达, 并抑制巨噬细胞的活性. Byrne *et al*^[72]和Tassioulas *et al*^[73]研究发现, 在LPS中加入凋亡细胞, 吞噬细胞在吞噬凋亡细胞过程中, 可抑制IL-12, IL-1 β 和TNF- α 的分泌, 促进IL-10的产生. 因此认为, IL-10在吞噬凋亡细胞过程中具有重要的作用, 从而诱导免疫耐受的产生. 总之, 一系列有力的证据显示^[74-75], 吞噬凋亡细胞的单核吞噬细胞释放抗炎因子, 包括IL-10和TGF- β 1, 从而诱导免疫耐受的产生.

5 细胞凋亡在肝移植的临床意义

细胞凋亡在诱导肝移植免疫耐受过程中具有十分重要的意义. 在肝移植免疫中, 细胞凋亡发挥双刃剑作用. 当宿主T细胞凋亡, 可诱导免疫耐受的产生; 另一方面, 免疫排斥反应发生时, 移植细胞发生凋亡. 所以可从2方面着手为移植排斥反应防治提供新的策略: (1)预防移植细胞凋亡, 减少移植损伤; (2)促进受体反应性T淋巴细胞凋亡, 诱导移植耐受. 因此, 越来越多的研究者们尝试在肝移植术前通过预输注供体的凋亡细胞来降低移植排斥反应的发生.

Dresske *et al*^[76]在大鼠肝移植模型中研究凋亡细胞对肝移植中的影响, 免疫组织化学显示在移植耐受组有大量的细胞增殖, 肝实质细胞的凋亡在排斥组和耐受组都有发生, 但是只有在耐受组才有大量的上调的FasL的表达, 从而表明凋亡细胞对肝移植免疫耐受的诱导具有重要的作用. Liu *et al*^[77]通过输注供者地塞米松诱导凋亡脾细胞观察对肝移植的影响. 研究表明, 肝移植预输注地塞米松体内诱导的凋亡脾细胞能够诱导受体大鼠对肝移植的免疫耐受; 同期输注凋亡脾细胞则促进受体对肝移植的排斥反应, 认为凋亡细胞未被及时吞噬是引起排斥反

应用要点
本文提示通过细胞凋亡诱导肝移植免疫耐受, 不但具有重要的理论意义, 而且具有重要的临床意义和巨大的社会价值.

同行评价
本文选题明确, 具有一定的创新性, 归纳总结了该领域的某些研究热点问题, 具有一定的借鉴参考价值。

应的重要原因. Nagasaki *et al*^[26]研究全身淋巴照射对大鼠肝移植免疫的影响, 在移植术后进行受体全身淋巴照射, 研究显示可明显延长受体大鼠的存活而没有其他的慢性疾病. 此外, 应用供体来源的单核细胞进行输注也明显延长受体生存, 可使超过70%的受体存活超过100 d而没有慢性排斥反应。

6 结论

细胞凋亡对机体具有重要的免疫调节作用, 其作用过程直接影响到机体对外来抗原的反应如何-发生免疫应答或是产生免疫耐受. 虽然, 对其作用机制的研究中还存在许多疑问, 这一方面体现了肝脏为适应其内部复杂的免疫学变化而进化形成的免疫活动多面性, 另一方面也向我们展示了众多有益的提示和理念, 甚至研究的新方向. 因此, 对细胞凋亡的研究不仅对于移植医学有重要意义, 对于免疫学研究的整体发展都会有重要价值. 随着人们对该领域的不断深入研究, 在器官移植, 尤其是肝移植排斥反应的防治、免疫耐受的诱导等方面前景广阔。

7 参考文献

- Woodside KJ, Hu M, Liu Y, Song W, Hunter GC, Daller JA. Apoptosis of allospecifically activated human helper T cells is blocked by calcineurin inhibition. *Transpl Immunol* 2006; 15: 229-234
- Yolcu ES, Ash S, Kaminitz A, Sagiv Y, Askenasy N, Yarkoni S. Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. *Immunol Cell Biol* 2008; 86: 650-658
- Agarwal A, Newell KA. The role of positive costimulatory molecules in transplantation and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 366-372
- Carroll HP, Ali S, Kirby JA. Accelerating the induction of Fas-mediated T cell apoptosis: a strategy for transplant tolerance? *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 589-597
- Klemke CD, Brenner D, Weiss EM, Schmidt M, Leverkus M, Gülow K, Krammer PH. Lack of T-cell receptor-induced signaling is crucial for CD95 ligand up-regulation and protects cutaneous T-cell lymphoma cells from activation-induced cell death. *Cancer Res* 2009; 69: 4175-4183
- Magerus-Chatinet A, Stolzenberg MC, Loffredo MS, Neven B, Schaffner C, Ducrot N, Arkwright PD, Bader-Meunier B, Barbot J, Blanche S, Casanova JL, Debré M, Ferster A, Fieschi C, Florkin B, Galambrun C, Hermine O, Lambotte O, Solary E, Thomas C, Le Deist F, Picard C, Fischer A, Rieux-Laucat F. FAS-L, IL-10, and double-negative CD4-CD8- TCR alpha/beta+ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood* 2009; 113: 3027-3030
- Byun HS, Park KA, Won M, Yang KJ, Shin S, Piao L, Kwak JY, Lee ZW, Park J, Seok JH, Liu ZG, Hur GM. Phorbol 12-myristate 13-acetate protects against tumor necrosis factor (TNF)-induced necrotic cell death by modulating the recruitment of TNF receptor 1-associated death domain and receptor-interacting protein into the TNF receptor 1 signaling complex: Implication for the regulatory role of protein kinase C. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1099-1108
- Crawley AM, Katz T, Parato K, Angel JB. IL-2 receptor gamma chain cytokines differentially regulate human CD8+CD127+ and CD8+CD127- T cell division and susceptibility to apoptosis. *Int Immunol* 2009; 21: 29-42
- Kirchhoff S, Müller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 2000; 165: 6293-6300
- Falk M, Ussat S, Reiling N, Wesch D, Kabelitz D, Adam-Klages S. Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J Immunol* 2004; 173: 5077-5085
- Inaba H, Geiger TL. Defective cell cycle induction by IL-2 in naive T-cells antigen stimulated in the presence of refractory T-lymphocytes. *Int Immunol* 2006; 18: 1043-1054
- Kirchhoff S, Müller WW, Li-Weber M, Krammer PH. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2765-2774
- Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsics M, Tschopp J. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* 2000; 10: 640-648
- Suna S, Sakata Y, Shimizu M, Nakatani D, Usami M, Matsumoto S, Mizuno H, Ozaki K, Takashima S, Takeda H, Tanaka T, Hori M, Sato H. Lymphotoxin-alpha3 mediates monocyte-endothelial interaction by TNFR I/NF-kappaB signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 379: 374-378
- Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, Nagano K, Oshima S, Nemoto Y, Yoshioka A, Totsuka T, Okamoto R, Nakamura T, Sakamoto N, Tsuchiya K, Aoki K, Ohya K, Yagita H, Watanabe M. Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G850-G859
- Li A, Ojogho O, Escher A. Saving death: apoptosis for intervention in transplantation and autoimmunity. *Clin Dev Immunol* 2006; 13: 273-282
- Karrar A, Broomé U, Uzunel M, Qureshi AR, Sumitran-Holgersson S. Human liver sinusoidal endothelial cells induce apoptosis in activated T cells: a role in tolerance induction. *Gut* 2007; 56: 243-252
- Yang XF. Factors regulating apoptosis and homeostasis of CD4+ CD25(high) FOXP3+ regulatory T cells are new therapeutic targets. *Front Biosci* 2008; 13: 1472-1499
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997; 390: 350-351
- Tamada K, Harada M, Abe K, Li T, Nomoto K.

- IL-4-producing NK1.1+ T cells are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis: implications for the Th1/Th2 balance. *J Immunol* 1998; 161: 1239-1247
- 21 Schwarz A, Grabbe S, Grosse-Heitmeyer K, Roters B, Riemann H, Luger TA, Trinchieri G, Schwarz T. Ultraviolet light-induced immune tolerance is mediated via the Fas/Fas-ligand system. *J Immunol* 1998; 160: 4262-4270
 - 22 Aubin F, Mousson C. Ultraviolet light-induced regulatory (suppressor) T cells: an approach for promoting induction of operational allograft tolerance? *Transplantation* 2004; 77: S29-S31
 - 23 Sayegh MH, Turka LA. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1143-1150
 - 24 Li XC, Wells AD, Strom TB, Turka LA. The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 522-527
 - 25 Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity* 2001; 14: 407-416
 - 26 Nagasaki K, Obara H, Xiong A, Kambham N, Strober S, Esquivel CO, Millan MT. Liver allografts are toleragenic in rats conditioned with posttransplant total lymphoid irradiation. *Transplantation* 2007; 84: 619-628
 - 27 Li XC, Rothstein DM, Sayegh MH. Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments. *Immunol Rev* 2009; 229: 271-293
 - 28 Dai Z, Konieczny BT, Baddoura FK, Lakkis FG. Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1998; 161: 1659-1663
 - 29 Choi Y, Simon-Stoos K, Puck JM. Hypo-active variant of IL-2 and associated decreased T cell activation contribute to impaired apoptosis in autoimmune prone MRL mice. *Eur J Immunol* 2002; 32: 677-685
 - 30 Zheng L, Sharma R, Gaskin F, Fu SM, Ju ST. A novel role of IL-2 in organ-specific autoimmune inflammation beyond regulatory T cell checkpoint: both IL-2 knockout and Fas mutation prolong lifespan of Scurfy mice but by different mechanisms. *J Immunol* 2007; 179: 8035-8041
 - 31 Rentsch M, Puellmann K, Sirek S, Iesalnieks I, Kienle K, Mueller T, Bolder U, Geissler E, Jauch KW, Beham A. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transpl Int* 2005; 18: 1079-1089
 - 32 Ge X, Nowak G, Ericzon BG, Sumitran-Holgersson S. Liver sinusoidal endothelial cell function in rejected and spontaneously accepted rat liver allografts. *Transpl Int* 2008; 21: 49-56
 - 33 Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000; 174: 21-34
 - 34 Shi J, Gilbert GE, Kokubo Y, Ohashi T. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* 2001; 98: 1226-1230
 - 35 Krams SM, Egawa H, Quinn MB, Villanueva JC, Garcia-Kennedy R, Martinez OM. Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59: 621-625
 - 36 Qian S, Lu L, Fu F, Li Y, Li W, Starzl TE, Fung JJ, Thomson AW. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 1997; 158: 4654-4661
 - 37 Li W, Carper K, Liang Y, Zheng XX, Kuhr CS, Reyes JD, Perkins DL, Thomson AW, Perkins JD. Anti-CD25 mAb administration prevents spontaneous liver transplant tolerance. *Transplant Proc* 2006; 38: 3207-3208
 - 38 Krams SM, Fox CK, Beatty PR, Cao S, Villanueva JC, Esquivel CO, Martinez OM. Human hepatocytes produce an isoform of FAS that inhibits apoptosis. *Transplantation* 1998; 65: 713-721
 - 39 Yamaguchi Y, Okabe K, Miyanari N, Matsumura F, Ichiguchi O, Akizuki E, Matsuda T, Liang J, Ohshiro H, Miyayama Y, Yamada S, Mori K, Ogawa M. Tumor necrosis factor-beta is associated with thymic apoptosis during acute rejection. *Transplantation* 1998; 66: 894-902
 - 40 Sun E, Zhang L, Zeng Y, Ge Q, Zhao M, Gao W. Apoptotic cells actively inhibit the expression of CD69 on Con A activated T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2000; 51: 231-236
 - 41 Strauss G, Osen W, Knape I, Jacobsen EM, Müller SM, Debatin KM. Membrane-bound CD95 ligand expressed on human antigen-presenting cells prevents alloantigen-specific T cell response without impairment of viral and third-party T cell immunity. *Cell Death Differ* 2007; 14: 480-488
 - 42 Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Zahorchak AF, Logar AJ, Papworth GD, Wang Z, Watkins SC, Falo LD Jr, Thomson AW. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 2003; 101: 611-620
 - 43 Wang Y, Gao Y, Yuan X, Xia W, Luo Y, Sun E, Chen ZK. The liver mediates apoptotic cell-induced immune regulation. *Scand J Immunol* 2008; 68: 297-305
 - 44 Klugewitz K, Blumenthal-Barby F, Schrage A, Knolle PA, Hamann A, Crispe IN. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4+ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization. *J Immunol* 2002; 169: 2407-2413
 - 45 Mariotti J, Foley J, Jung U, Borenstein T, Kantardzic N, Han S, Hanson JT, Wong E, Buxhoeveden N, Trepel JB, Fojo AT, Telford W, Fowler DH. Ex vivo rapamycin generates apoptosis-resistant donor Th2 cells that persist in vivo and prevent hemopoietic stem cell graft rejection. *J Immunol* 2008; 180: 89-105
 - 46 André S, Tough DF, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol* 2009; 174: 1575-1587
 - 47 Umeshappa CS, Huang H, Xie Y, Wei Y, Mulligan SJ, Deng Y, Xiang J. CD4+ Th-APC with acquired peptide/MHC class I and II complexes stimulate type 1 helper CD4+ and central memory CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2009; 182: 193-206
 - 48 Kita H, Mackay IR, Van De Water J, Gershwin ME. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* 2001; 120: 1485-1501
 - 49 Dini L, Carla EC. Hepatic sinusoidal endothelium

- heterogeneity with respect to the recognition of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 1998; 240: 388-393
- 50 Müschen M, Warskulat U, Douillard P, Gilbert E, Häussinger D. Regulation of CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand expression by lipopolysaccharide and dexamethasone in parenchymal and nonparenchymal rat liver cells. *Hepatology* 1998; 27: 200-208
- 51 Tokita D, Ohdan H, Onoe T, Hara H, Tanaka Y, Asahara T. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int* 2005; 18: 237-245
- 52 Ge X, Karrar A, Ericzon BG, Broomé U, Sumitran-Holgersson S. Antibodies to liver sinusoidal endothelial cells modulate immune responses in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3335-3337
- 53 Sun Z, Wada T, Maemura K, Uchikura K, Hoshino S, Diehl AM, Klein AS. Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl* 2003; 9: 489-497
- 54 Sun Z, Wada T, Hoshino S, Uchikura K, Klein AS. Immunomodulatory Role of Kupffer Cell in Liver Allografts. *Comp Hepatol* 2004; 3 Suppl 1: S32
- 55 Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101: 890-898
- 56 von Frankenberg M, Golling M, Mehrabi A, Nentwich H, Klar E, Kraus TW. Donor pretreatment with gadolinium chloride improves early graft function and survival after porcine liver transplantation. *Transpl Int* 2003; 16: 806-813
- 57 Zhu H, Marco C, Gianfranco F. Early changes of graft function, cytokines and superoxide dismutase serum levels after donor liver denervation and Kupffer cell depletion in a rat-to-rat liver transplantation model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 152-156
- 58 Wu W, Zheng N, Wang Y, Fung JJ, Lu L, Qian S. Immune regulatory activity of liver-derived dendritic cells generated in vivo. *Microsurgery* 2006; 26: 17-20
- 59 Newton PJ, Weller IV, Katz DR, Chain BM. Autologous apoptotic T cells interact with dendritic cells, but do not affect their surface phenotype or their ability to induce recall immune responses. *Clin Exp Immunol* 2003; 133: 50-58
- 60 Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445-449
- 61 Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)* 2003; 51: 59-60
- 62 Münz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2005; 202: 203-207
- 63 Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711
- 64 Sun E. Cell death recognition model for the immune system. *Med Hypotheses* 2008; 70: 585-596
- 65 Li M, Zhang X, Zheng X, Lian D, Zhang ZX, Sun H, Suzuki M, Vladau C, Huang X, Xia X, Zhong R, Garcia B, Min WP. Tolerogenic dendritic cells transferring hyporesponsiveness and synergizing T regulatory cells in transplant tolerance. *Int Immunol* 2008; 20: 285-293
- 66 Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 2001; 14: 715-725
- 67 Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2002; 109: 41-50
- 68 Jiang H, Lu Z, Pan S, Sun B, Meng F, Tan H, Meng Q, Sun X. Opposite effects of donor apoptotic versus necrotic splenocytes on splenic allograft tolerance. *J Surg Res* 2006; 136: 247-254
- 69 Ablin J, Verbovetski I, Trahtemberg U, Metzger S, Mevorach D. Quinidine and procainamide inhibit murine macrophage uptake of apoptotic and necrotic cells: a novel contributing mechanism of drug-induced-lupus. *Apoptosis* 2005; 10: 1009-1018
- 70 Khera TK, Martin J, Riley SG, Steadman R, Phillips AO. Glucose modulates handling of apoptotic cells by mesangial cells: involvement of TGF-beta1. *Lab Invest* 2007; 87: 690-701
- 71 Wan YY, Flavell RA. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2008; 28: 647-659
- 72 Byrne A, Reen DJ. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 2002; 168: 1968-1977
- 73 Tassioulas I, Park-Min KH, Hu Y, Kellerman L, Mevorach D, Ivashkiv LB. Apoptotic cells inhibit LPS-induced cytokine and chemokine production and IFN responses in macrophages. *Hum Immunol* 2007; 68: 156-164
- 74 Chung EY, Kim SJ, Ma XJ. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res* 2006; 16: 154-161
- 75 Michlewska S, Dransfield I, Megson IL, Rossi AG. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *FASEB J* 2009; 23: 844-854
- 76 Dresske B, Lin X, Huang DS, Zhou X, Fändrich F. Spontaneous tolerance: experience with the rat liver transplant model. *Hum Immunol* 2002; 63: 853-861
- 77 Liu J, Gao Y, Wang S, Sun EW, Wang Y, Zhang Z, Shan YQ, Zhong SZ. Effect of operation-synchronizing transfusion of apoptotic spleen cells from donor rats on acute rejection of recipient rats after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1161-1166

编辑 李军亮 电编 何基才

原发性胆囊癌基因研究现状

汪 斌, 丁佑铭

汪斌, 丁佑铭, 武汉大学人民医院肝胆腔镜外科 湖北省武汉市 430060

作者贡献分布: 综述选题、文献收集及论文撰写由汪斌完成; 丁佑铭审核。

通讯作者: 丁佑铭, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 430060, 湖北省武汉市解放路238号, 武汉大学人民医院肝胆腔镜外科。

youmingding@yahoo.com

电话: 027-88041911-82212

收稿日期: 2009-08-04 修回日期: 2009-09-12

接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-09-28

Advances in research of primary gallbladder carcinoma at the genetic level

Bin Wang, You-Ming Ding

Bin Wang, You-Ming Ding, Department of Hepatobiliary & Laparoscopic Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor You-Ming Ding, the Department of Hepatobiliary & Laparoscopic Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuhan 430060, Hubei Province, China. youmingding@yahoo.com

Received: 2009-08-04 Revised: 2009-09-12

Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-09-28

Abstract

Primary gallbladder carcinoma (PGC) is a common malignant tumor of the digestive system. As PGC has a high degree of malignancy, it has long posed a serious threat to human health. Early diagnosis and treatment of PGC is important in improving the prognosis of the disease. At present, some achievements have been made in elucidating the pathogenesis of PGC and exploring its early diagnosis and treatment at the genetic level. In this article, we will summarize the recent advances in research on oncogenes and tumor suppressor genes, metastasis-, prognosis- and treatment-related genes, and tumor markers that are associated with PGC.

Key Words: Primary gallbladder carcinoma; Gene expression; Oncogene

Wang B, Ding YM. Advances in research of primary gallbladder carcinoma at the genetic level. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2811-2820

摘要

原发性胆囊癌是常见的消化系恶性肿瘤之一, 恶性程度较高, 长期以来一直严重威胁着人类的健康, 对原发性胆囊癌的早期诊断和治疗至今未取得突破性的进展, 是临床急需解决的重要问题. 从基因学出发研究原发性胆囊癌的发病机制、早期诊断及治疗, 已取得了一定的成绩, 也是目前肿瘤研究的热点. 本文就目前原发性胆囊癌发病过程中的癌基因、抑癌基因与胆囊癌转移、预后及治疗相关基因, 肿瘤标志物的研究状况作以综述.

关键词: 原发性胆囊癌; 基因表达; 癌基因

汪斌, 丁佑铭. 原发性胆囊癌基因研究现状. *世界华人消化杂志* 2009; 17(27): 2811-2820

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2811.asp>

0 引言

原发性胆囊癌(primary gallbladder carcinoma, PGC)是胆道系统常见的恶性肿瘤, 恶性程度高、死亡率高、预后差. 因其临床表现不典型, 常与胆囊炎、胆囊结石的症状相似, 早期诊断比较困难. 因此, 如何提高原发性胆囊癌的早期诊断水平, 为胆囊癌的早期治疗创造条件一直是人们所关注的问题. 现代医学研究表明肿瘤是基因水平异常所引起的行为, 其发生、发展、转移及预后均与癌基因和抑癌基因的突变相关. 胆囊癌的发生、发展、转移及预后同样涉及多种癌基因和抑癌基因的突变, 在基因学水平上研究胆囊癌的生物行为, 有助于提高胆囊癌的早期诊断和治疗水平. 本文就近年来国内外有关癌基因、抑癌基因及其表达产物在胆囊癌早期诊断、肿瘤转移、预后判断等方面的研究概述如下.

1 与胆囊癌发生、发展有关的基因

1.1 ras 基因是一个常见的癌基因家族, 包括 k-ras、n-ras 和 h-ras. 研究表明, ras 基因的异常表达是肿瘤发生的早期事件, k-ras 基因可能是激发癌变的关键, 其突变热点在第12密码子, 少数在

背景资料

原发性胆囊癌(PGC)是最常见的胆道系统恶性肿瘤, 发病率近年有逐渐上升趋势, 其恶性度高, 死亡率高, 早期诊断困难, 治疗效果差. 目前对PGC的发病机制、诊断及治疗的研究已取得了一定成绩, 尤其是近年来迅猛发展的基因和蛋白质研究技术, 大大促进了PGC相关的基因研究工作, 且取得了令人可喜的成果. 然而对PGC发病的高危因素、致癌机制、早期诊断及治疗的相关基因研究仍未获得突破性进展, 仍然需要广大科研工作者继续深入探索和研究.

同行评议者
陈力, 教授, 浙江大学医学院附属第二医院外科

研发前沿
从基因学水平研究PGC发生、发展、早期诊断及治疗是PGC研究的热点和难点,多基因联合检测提高诊断的准确率,基因靶向治疗PGC是研究的新方向。

第13密码子. k-ras编码P21蛋白,与细胞生长和分化密切相关,其阳性表达的肿瘤恶性度高,预后差^[1-2]. Yukawa *et al*^[3]应用免疫组织化学方法发现早期胆囊癌中ras基因产物p21阳性率高达95%,说明ras基因参与了肿瘤的癌变过程.

1.2 src c-src基因编码产物为60 ku的蛋白质,具有特异性酪氨酸激酶活性功能,能促进细胞的增生和恶变. Tatsumoto *et al*^[4]用质粒携带c-src基因,联合转染非致瘤人胆囊癌细胞,研究表明人胆囊癌细胞的致癌潜能与c-src基因相关的信号通路有密切关系.

1.3 bcl-2 bcl-2是重要的凋亡抑制基因,通过其编码的产物Bcl-2蛋白发挥生理功能. Mikami *et al*^[5]检测bcl-2基因在胆囊腺癌中的表达和细胞凋亡指数,发现细胞凋亡指数随着胆囊肿瘤分化程度的降低而减少,并与P53表达呈负相关. bcl-2表达与胆囊癌细胞分化呈正相关,在早期肿瘤的发生中起作用.

1.4 bax bax基因属bcl-2相关基因,具有对抗Bcl-2蛋白,抑制凋亡的作用. Saetta *et al*^[6]发现,胆囊癌中bax阳性率在低分化、未分化及有转移组明显高于高分化和未转移组.

1.5 myc基因家族 myc基因家族成员包括myc、C-myc、N-myc及L-myc、P-myc、R-myc、S-myc和B-myc,均定位于核内,为核转录调节因子^[7]. C-myc为原癌基因,定位于8号染色体,编码P62蛋白,参与细胞周期的调控、细胞增殖、凋亡及永生生化等过程,在许多肿瘤的发生中起着重要作用. 刘智敏 *et al*^[8]发现胆囊癌中C-myc的阳性率明显高于正常胆囊组织,说明胆囊癌的发生可能与C-myc基因的激活有关. Wang *et al*^[9]发现胆囊癌组织中P62蛋白高表达,可作为反映胆囊癌侵袭性的指标,为胆囊癌的早期诊断和治疗提供参考.

1.6 survivin 与细胞凋亡密切相关的3个基因家族包括bcl-2家族、caspase家族和凋亡抑制(inhibitor of apoptosis, IAP)家族. survivin是最近发现的IAP家族成员之一,具有肿瘤选择性特点,可对抗G₂/M期细胞凋亡的诱导,克服凋亡关卡,通过有丝分裂促进转化细胞的异常增殖^[10]. 研究发现survivin蛋白在胆囊癌中的表达显著高于胆囊肿瘤及慢性胆囊炎组织,且与胆囊癌患者的性别、年龄、肿瘤的大小、分化程度及是否转移无关,提示survivin可能通过抑制胆囊癌细胞凋亡,对胆囊癌的发生、发展起重要作用,但在胆囊癌的发展过程中,尚存在其他凋亡基因的

激活^[11].

1.7 caspase-3 caspase家族是一组蛋白酶,是细胞凋亡的 executor, caspase-3是凋亡传导途径最下游的蛋白酶,是细胞凋亡的最终执行者, caspase-3的活化对细胞凋亡的发生具有重要意义. 在胆囊肿瘤中, caspase-3表达在高、中分化组及Nevin分期I、II、III期组高于低分化组及Nevin分期IV、V期组,揭示caspase-3同胆囊肿瘤分化、分期有关^[11].

1.8 cyclin D与cyclin E 细胞周期控制系统由细胞周期素(cyclin)、细胞周期素依赖蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)和细胞周期依赖性蛋白激酶抑制物(CDK inhibitor, CDKI)三大类蛋白家族所组成,细胞周期素依赖蛋白激酶是细胞周期调控机制的核心. CDK4、CDK6与cyclin D1、D2、D3结合是G₁期运行的必要条件. 而cyclin E与CDK2结合,形成cyclin E-CDK2复合物,产生或激活许多细胞周期相关蛋白,启动并进入S期,是S期启动的必要条件^[12].

Hui *et al*^[13]发现41%的胆囊癌和67%的胆囊肿瘤发生cyclin D1过表达,而正常胆囊上皮和胆囊肿腺肌症中无cyclin D1表达,表明cyclin D1在胆囊癌中的过表达是胆囊癌发生过程中的一个早期事件,但与年龄、性别、组织学类型、淋巴转移、TNM分期等无关. cyclin E在原发性胆囊肿瘤中的阳性表达率亦显著高于胆囊肿良性病变,并且cyclin E在胆囊肿瘤的表达与胆囊肿瘤细胞PCNA指数相关,因此cyclin E的表达与胆囊肿瘤细胞增殖活性相一致, cyclin E的过表达通过加快细胞增殖周期,促进胆囊肿瘤细胞异常增殖,在胆囊肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用^[14].

1.9 TGF- β TGF- β 是一类具有多种生物学功能的多肽类生长因子,参与调节细胞的生长、分化、凋亡及免疫功能,能够抑制多种上皮源性肿瘤细胞的生长,研究表明TGF- β 在胆囊肿瘤中表达明显高于胆囊肿良性病变^[15].

1.10 DPC4 DPC4也称胰腺癌缺失基因,为抑癌基因,定位于染色体18q21.1,编码蛋白属Smad家族, DPC4也是TGF- β 细胞内信号传导的枢纽,参与调节细胞增殖分化. 研究表明胆囊肿瘤中DPC4产物表达显著低于良性胆囊肿组织^[16].

1.11 Fas Fas蛋白属TNF受体家族成员,与FasL结合后通过IL-1 β 转化酶基因介导细胞凋亡. 胆囊肿瘤中Fas阳性表达与胆囊肿瘤的分化程度及转移相关^[6].

1.12 p53 p53是典型的抑癌基因之一,定位于染

染色体17p13.17, 其基因突变率约63.3%, 是人类肿瘤中发生基因变异频率最高的基因, 与胆囊癌的发生关系密切^[17-19]. Wistuba *et al*^[20]研究发现胆囊癌中*p53*基因杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)达90%, 且较蛋白表达发生更早、更频繁, 提示*p53*基因LOH检测有助于胆囊癌早期诊断.

1.13 *p21 p21*也是抑癌基因之一, P21蛋白是G₁期的细胞周期蛋白依赖激酶抑制物, 可抑制多种cyclin-CDK复合物的活性, 以阻止细胞进入S期, 其C端又可结合细胞增殖核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)以阻断DNA复制. P21在胆囊癌中表达降低, 是胆囊癌发生的早期事件^[21], 且与胆囊癌的性别、年龄、分期、分级等临床病理参数密切相关^[22].

1.14 *p27 p27*是CDKI里的Cip/Kip家族成员之一, 主要功能是阻断细胞周期进程, 抑制细胞增生. Hui *et al*^[13]在实验中发现43%的胆囊癌病例中P27表达低, P27在的低表达是胆囊癌发生过程中的一个晚期事件, 与胆囊癌的分化、淋巴结转移、TNM分期密切相关.

1.15 *p16 p16*是比*p21*更强的肿瘤抑制基因, 也称为多肿瘤抑制基因(mTS1), 属于CDK4抑制(inhibitors of CDK4, INK4)基因家族, 在细胞周期调控中具有十分重要的作用. *p16*基因异常主要表现为基因缺失, 且多为纯合性缺失. 研究发现, 在胆囊癌前病变中, 通常存在*p16*基因的缺失^[23-24], 另外, *p16*基因突变在胆囊癌中发生率也很高, 检测*p16*基因及其蛋白表达对提高胆囊癌早期诊断率及估计患者生存时间有十分重要的意义^[25-26].

1.16 *p73 p73*基因是Kaghad *et al*^[27]1997年发现的*p53*基因家族的第一个新成员, 定位于1P36, *p73*基因在胆囊癌中高表达, 并与胆囊癌组织学类型有关, 低分化组织中阳性率高, 提示*p73*基因异常表达在胆囊癌发生发展中发挥重要作用^[28].

1.17 Rb Rb基因是第一个被克隆的抑癌基因, 定位于13q14, 其产物Rb蛋白参与细胞周期的调控, 各种原因导致Rb基因缺失或突变, 将导致细胞进入非正常增殖状态, 进而产生肿瘤. Rb蛋白在胆囊癌的阳性表达低, 与胆囊癌分化程度高低以及分期有关. Rb蛋白的低表达是促进胆囊癌细胞增殖的重要因素^[29], Rb基因的LOH是胆囊癌发生的晚期事件^[30].

1.18 MUC 黏蛋白(nucin, MUC)是一类含有寡糖链的糖蛋白, 主要存在于胃肠道、呼吸道、

泌尿生殖道表面细胞及其分泌的黏液中, 除保护和润滑功能外, 还参与细胞间黏附、通讯、作为细胞受体等多种功能. 胆囊上皮细胞也可分泌黏蛋白, 胆汁中含有丰富的黏蛋白成分. Wongkham *et al*^[31]报道黏蛋白MUC5AC在胆管癌组织中高表达, 胆管癌患者血浆MUC5AC升高. MUC4在胆囊癌中表达显著升高, 并与胆囊癌的组织学分级密切相关, 同时研究还显示MUC4与erbB2间存在一种直接的相互作用关系, 这种相互作用在胆囊癌的致癌作用中发挥着重要作用^[32].

1.19 LAPTM4 β 溶酶体关联跨膜蛋白4 β (lysosome-associated protein transmembrane, LAPTM4 β)定位于染色体8q22.1, 编码35 kDa、24 kDa 2种蛋白. LAPTM4 β -35在胆囊癌中过表达, 与胆囊癌的组织学类型、淋巴浸润、远处转移、肿瘤分期及分化程度、切除后的生存率密切相关, LAPTM4 β 作为一种新的基因/蛋白抑制靶点, 在胆囊癌的发生发展中起着十分关键的作用, 他可能通过其翻译产物LAPTM4 β -35蛋白而发挥致癌作用. 将LAPTM4 β -35与其他分子如cyclin D1联合检测, 对提高胆囊癌的预测将更有价值^[33].

1.20 hoGG1 8-羟基鸟嘌呤-葡萄糖基转移酶, 编码一种葡萄糖基转移酶蛋白, 参与来自氧化损伤DNA的8-羟基-脱氧鸟嘌呤的切割修复. hoGG1 ser326cys具有cys/cys纯合子基因型的个体容易发展为胆囊癌^[34].

1.21 CYP7A1 胆固醇7- α 羟化酶, 具有CYP7A1基因CC基因型和C等位基因是胆囊癌发展的一个危险因素, 且在等位基因是纯合子条件下, 这种危险会进一步增加^[35].

1.22 Heparanase 类肝素酶已经被证实与许多肿瘤的生长和侵袭有关, 他可以促进血管的发生和破坏基底膜, 促进肿瘤生长. 在体外模型研究中发现类肝素酶抑制剂可以抑制胆囊癌细胞系的潜在侵袭, Heparanase已经成为人类肿瘤治疗的一个具有广阔前景的靶点^[36].

1.23 B-raf Saetta *et al*^[37]检测胆囊癌标本发现存在B-raf基因变异, 且都定位于外显子15位点上的热点密码子599位点, 暗示B-raf可能与胆囊癌的发病机制密切相关.

1.24 b-FGF b-FGF基因位于人的第5对染色体上, 为单拷贝基因, 其表达产物b-FGF蛋白是重要的促有丝分裂因子, 也是形态发生和分化的诱导因子^[38]. 胆囊癌组织中b-FGF表达阳性率明显高

创新盘点

本文对迄今为止有关PGC发病的基因研究状况进行了综述, 并分别从PGC的发生发展、转移预后、早期诊断及治疗相关基因研究4方面进行了阐述, 展示了各方面最新的研究成果, 为PGC的进一步深入研究提供了参考和方向.

应用要点

本文阐述了目前PGC发生发展及治疗相关的基因研究成果,为进一步研究PGC的生物学行为,提高早期诊断率和治疗效果指明了方向。PGC发病中癌基因、抑癌基因突变的检测,与PGC有关的靶向治疗基因的研究将为PGC的研究带来光明。

于慢性胆囊炎组织,表明b-FGF对胆囊癌的辅助诊断有一定的作用^[9]。

1.25 c-fos与c-jun c-fos与c-jun属于即刻早期应答基因(immediate early response gene),两者编码的蛋白均为重要的核转录因子,两者通过形成亮氨酸拉链结构以c-fos/c-jun杂合二聚体,或c-jun同二聚体形式构成活化蛋白21(AP21),参与多个基因的转录调节,控制着细胞的增殖和凋亡,在许多肿瘤中c-fos、c-jun蛋白都有异常表达^[39-40]。胆囊癌组织中c-fos、c-jun蛋白的阳性表达率显著增高,提示c-fos、c-jun与胆囊癌的发生有关,c-fos、c-jun的协同表达表明两者关系密切,共同参与基因的转录调节^[41]。

1.26 PTTG 垂体瘤转化基因(pituitary tumor-transforming gene, PTTG)是从垂体肿瘤细胞中分离出来的一种原癌基因,定位于5号染色体5q33区。研究发现人类染色体5q区与肺癌等多种肿瘤复发有关。PTTG在增殖活跃的正常组织,如睾丸和胸腺组织中高表达,在肝癌、乳腺癌、结肠癌、甲状腺癌、卵巢肿瘤及血液系统肿瘤等肿瘤组织中过度表达。胆囊癌组织中PTTG的阳性表达同肿瘤病理分期有关,在Nevin IV、V期胆囊癌组织中表达阳性率明显高于I-III期胆囊癌组织。PTTG的表达还与胆囊癌的淋巴转移有关,表明PTTG的异常表达与胆囊癌的发生、发展及侵袭进程密切相关^[42-43]。

1.27 KAI1 KAI1基因属于TM4SF家族(transmembrane 4 superfamily or tetraspanin superfamily, TM4SF)成员,表达产物为CD82^[44-45],是新发现的一个肿瘤转移抑制基因。KAI1基因产物和其他TM4SF成员是互相结合在一起的^[46-47]。研究发现,随着胆囊癌病程的进展,KAI1基因的阳性表达逐渐下降,且KAI1基因蛋白阳性表达率与胆囊癌的TNM分期呈负相关,其蛋白的高表达预示着胆囊癌患者有较好的预后,因此认为KAI1基因蛋白对反映胆囊癌的预后有价值^[48-49]。KAI1基因在前列腺癌转移中的作用已经得到公认,因此推测,在原发性胆囊癌中,KAI1基因具有肿瘤转移抑制作用。

1.28 OPN 骨桥蛋白OPN是一种高度磷酸化和糖基化的分泌型蛋白,富含唾液酸,在很多恶性肿瘤中异常表达并且同恶性程度和转移相关,OPN的功能包括细胞黏附和迁移、免疫和感染反应、抗凋亡、抑制合成和骨骼钙化等。张宝华 *et al*研究证实,胆囊癌中的OPN表达水平高于癌旁胆囊组织,提示OPN在胆道肿瘤的

发生中发挥作用并且具有作为分子诊断标志物的潜力^[50]。

2 与胆囊癌转移、预后有关的基因

2.1 C-erbB2 C-erbB2是一种癌基因,又称Neu或HER-2,定位于人染色体17q21上,编码相对分子质量为185 kDa的跨膜糖蛋白,故又称P185,具有酪氨酸激酶活性,属表皮生长因子受体家族。C-erbB2的表达与胆囊癌分化、转移及预后有关,其表达阳性率随胆囊癌的分化程度降低而逐渐升高^[51]。Kiguchi *et al*^[52]在转基因鼠的实验中观察到erbB2过度表达导致100%的实验鼠在3月龄时发生胆管腺癌,并向胆管浸润和发展。

2.2 CD44 CD44家族属黏附分子,定位于11号染色体,作为主要的跨膜透明质酸受体,是癌细胞获得浸润转移能力的决定因素之一。CD44拼接变异体(CD44 splice variants, CD44v)表达,特别是v6的表达与多种肿瘤包括胃癌、肝癌及结肠癌等侵袭表型的形成有关。沈汉斌 *et al*^[53]研究发现CD44V6在胆囊癌中高表达,在胆囊癌细胞的增殖、分化和转移过程中发挥着重要作用,对预测胆囊癌癌前病变的转化及肿瘤的侵袭转移具有重要价值。

2.3 nm23 nm23为肿瘤转移抑制基因,具有控制细胞分化与细胞发育功能,与恶性肿瘤转移关系密切,其表达水平与多种肿瘤细胞的转移潜能呈负相关。nm23基因位于染色体17q21.3,分为nmH1-6 6个亚型,编码产物二磷酸核苷激酶(NDPK)与微管聚合、G蛋白介导的信号传递、细胞与周围组织附着力、完整的基底膜形成及转录调节有关。胆囊癌中nm23表达低于胆囊良性组织,且与胆囊癌的淋巴转移相关^[53]。通过对胆囊癌的nm23-H1基因D17S396位点的DNA微卫星不稳定性(MSI)和LOH检测,发现胆囊癌组织D17S396位点的遗传不稳定性与胆囊癌的发生、发展密切相关,D17S396位点MSI可作为判断胆囊癌有无发生淋巴转移和预后判断的重要指标,并认为MSI可作为分子诊断的早期标志。在实验中随着胆囊癌的恶化和进展,LOH的发生率增高,因此,LOH可作为胆囊癌恶性程度、淋巴转移和预后转归的重要判断指标。研究表明MSI和LOH可能通过不同的途径调控胆囊癌的发生和转移^[54-55]。

2.4 hMLH1与hMSH2 hMLH1和hMSH2为DNA错配修复基因(MMR)家族最重要的成员,hMLH1和hMSH2基因的突变及功能缺陷,使得

相应的编码蛋白表达水平降低或缺如, 导致肿瘤的发生. 随着胆囊癌恶性程度的增加、浸润和转移的发生, hMLH1和hMSH2蛋白表达出现下调或部分表达缺失, 其可能参与胆囊癌的发生发展^[55-57].

2.5 FHIT FHIT称脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)基因, 于1996年由Masataka *et al*^[58]成功分离并定位于染色体3P14.2, 为多种肿瘤的候选抑癌基因. 胆囊癌中FHIT表达明显下调或缺失, 且与胆囊癌的分级及淋巴结转移密切相关, 表明他可能是胆囊癌一个重要的候选抑癌基因, 有可能作为一种新的胆囊癌的预后监测指标^[59-60].

2.6 端粒酶 端粒酶是一种核糖核蛋白, 主要成分是RNA和蛋白质, 具有逆转录酶活性, 与细胞的分裂、增殖有着密切的关系, 在胆囊癌组织中端粒酶活性的检出率高达80%, 说明端粒酶在胆囊癌的发生、发展中起重要作用^[61].

2.7 MMP-2 基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)是相对分子质量为72 ku的IV型胶原酶和明胶酶, 可以降解细胞基质以及IV型胶原, 形成局部溶解区以构成肿瘤细胞移动的通道. MMP-2在癌的浸润和转移过程中起重要作用, MMP-2的高表达与胆囊癌细胞的分化程度、转移及预后相关^[61].

2.8 TIMP-2 MMP-2组织抑制因子(tissue inhibitors of metallo proteinase-2, TIMP-2), 与MMP-2一起影响细胞外基质和基底膜完整性, 参与肿瘤的浸润转移. MMP-2与TIMP-2之间的比例失衡, 以致TIMP-2不足以对抗MMP-2的活性可能是肿瘤浸润转移的基础. 研究表明TIMP-2更能准确反映胆囊癌的特性, 可能作为判断胆囊癌分期、转移的重要参考指标^[62].

2.9 COX-2 COX-2环氧合酶(cyclooxygenase, COX-2), 又称前列腺素过氧化物合成酶, 是花生四烯酸代谢合成前列腺素(PG)过程中关键的限速酶. 环氧合酶分为两型, COX-1为结构型环氧合酶, 表达于正常机体组织中, 被认为与调节正常细胞生理功能相关. 诱生型COX-2在大多数正常组织中未被检测到, 但可见于某些炎症和肿瘤组织. 胆囊癌组织中COX-2阳性表达率显著高于正常胆囊组织, 其阳性表达与肿瘤TNM分期、淋巴结转移相关^[63].

2.10 E-cadherin E-Cad是一种依赖Ca²⁺的同种亲和性细胞间黏附分子, 是维持正常上皮完整性和极性的跨膜糖蛋白, 与肿瘤的转移和浸润有

关. E-Cad的基因定位于染色体16q22.1, 长度为100 kb, 有16个外显子. E-Cad的下降和缺失, 细胞间的黏附力下降, 造成细胞容易分散而向外浸润性生长, E-Cad在胆囊癌中的阳性表达率显著低于胆囊腺瘤和胆囊炎组织, 且随胆囊癌的恶性程度和淋巴结转移的增加而降低^[64].

2.11 i-NOS 诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, i-NOS), 在肿瘤血管生成中起重要作用. i-NOS可诱导产生NO, NO高浓度时发挥细胞毒或诱导肿瘤细胞凋亡作用, 而低浓度时则作为肿瘤细胞信号转导途径的信使分子, 参与调节与细胞增殖相关的基因表达, 增加肿瘤血供, 促进血管生长, 从而促进肿瘤的生长、侵袭和转移. 胆囊癌淋巴转移和肝转移时, i-NOS表达增高, 提示胆囊癌细胞内NO处于低水平^[65].

2.12 Maspin Maspin为抑丝酶超家族成员, 属于转移抑制基因, Maspin表达缺失将导致肿瘤细胞表型更具有侵袭、转移及血管生成特性^[66]. Maspin在高转移胆囊癌细胞表达上调, 可能与: (1)Maspin在不同类型的细胞中有不同的功能, 依赖于在所在细胞中其他的与Maspin交互作用的蛋白谱. (2)Maspin的亚细胞定位对于其功能起决定性作用, 在细胞核定位的Maspin可能发挥不同的功能. Maspin是表达差异最大的基因, 在胆囊癌转移过程中有重要意义, 有望成为胆囊癌转移预测和干预的一个靶分子^[67].

2.13 VEGF 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是近年发现的具有多种亚型的多肽类细胞因子, 他可以直接刺激内皮细胞生成, 提高血管通透性, 与肿瘤生长及转移密切相关. VEGF在胆囊癌中的表达明显高于胆囊腺瘤、胆囊炎, 其表达与胆囊癌恶性行为有关, 而血管生成拟态VM(+)胆囊癌VEGF表达明显低于VM(-)胆囊癌, VM有助于肿瘤获得足量的血液供应, 提示VEGF可作为判断VM(+)胆囊癌早晚期病变的重要指标, 并可评价胆囊癌Nevin分期、浸润深度、有无淋巴结转移和肝脏转移、判断患者预后. 胆囊癌恶性度高, 预后差, 手术切除率低, 对胆囊癌血管生成拟态(VM)这一潜在新颖靶点的研究, 有可能为临床胆囊癌的治疗提供新的途径^[68].

2.14 PCNA 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达及合成与细胞增殖周期有密切关系. PCNA标记指数在胆囊癌组织明显高于良性病变组织, 研究表明PCNA高表达的胆囊癌预后不良, 可反应胆囊癌的生物学

同行评价
本文综述了胆囊癌
的基因研究现状. 文献丰富,
内容全面详细, 可读
性好.

特性^[69].

2.15 GluT1 葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GluT1)是细胞膜上的跨膜糖蛋白,介导细胞内外的葡萄糖以易化扩散的方式相互转运.实验发现抑制GluT1 mRNA可以抑制肿瘤细胞的生长^[70],GluT1在胆囊癌组织中高表达,与胆囊癌的演进有密切关系,可作为判断胆囊癌预后的一项指标^[71].

2.16 EGFR 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种特异性跨膜糖蛋白受体,他不仅能刺激正常上皮细胞增殖,而且对某些肿瘤细胞增殖也有较明显的促进作用,其表达特征与癌细胞生物学行为及临床病理特征有极密切的关系.PGC分化程度越低,浸润深度越深,EGFR越高,可作为PGC患者预后判断的独立指标^[61].

2.17 PTEN PTEN是具有磷酸脂酶活性的抑癌基因,位于10q23位点,基因全长200 kb,包括9个外显子和8个内含子.PTEN的磷酸酶活性是其抑制细胞生长的前提和条件,该编码区基因突变可能与肿瘤的发生密切相关.研究显示胆囊腺瘤癌变及胆囊癌中PTEN mRNA和PTEN蛋白的阳性率均明显低于胆囊腺瘤,检测PTEN蛋白有望成为判断胆囊腺瘤癌变的一项辅助指标^[72].PTEN抑癌基因蛋白表达低下或丢失可能是胆囊癌的一种信号.

2.18 PDGF 血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是首先从血小板中分离出的一类重要的促有丝分裂多肽生长因子,具有刺激特定细胞群分裂增殖的能力.PDGF-B是原癌基因c-sis的编码产物,通过PDGF-B mRNA而合成PDGF-B具有较强的有丝分裂原活性,参与细胞增殖.PDGF-B mRNA在胆囊腺瘤中的表达阳性率明显高于癌旁组织、腺瘤性息肉和慢性胆囊炎,低分化腺癌、淋巴结转移和胆囊外组织器官侵犯病例PDGF-B mRNA表达阳性率明显高于高分化腺癌、无淋巴结转移和无胆囊外组织器官侵犯病例,提示PDGF-B mRNA表达可能是反映胆囊腺瘤发生、进展、生物学行为及预后的重要生物学标志物^[73].

3 与胆囊癌治疗有关的基因

3.1 GCS 糖基化神经酰胺合成酶(glucoceramide synthase, GCS)是调控神经酰胺代谢的关键酶之一,其活性增高可能是引起肿瘤获得性多药耐药产生的原因之一.研究显示该酶在未经化疗

的胆囊癌组织中活性较高,该酶是否能作为反映胆囊癌先天多药耐药的一个生物学指标有待临床进一步验证^[74].

3.2 MDR 多药耐药基因(multidrug resistance, MDR),通过检测胆囊癌Mdr-1基因表达可以了解胆囊癌的耐药程度,预测化疗疗效,为逆转耐药提供帮助^[75].

3.3 P-gp P-gp是一种TAP依赖性转移泵,能通过主动转运的方式将化疗药从肿瘤细胞内或直接从质膜转运出细胞外,减少化疗药物在肿瘤细胞内聚集.P-gp由Mdr-1基因编码,研究表明,P-gp在胆囊癌中的表达明显高于胆囊炎,P-gp的过度表达改变了细胞膜的电势和pH环境,影响了化疗药物在细胞内的分布和滞留^[76].

3.4 GST- π 胎盘型谷胱甘肽S转移酶(glutathione-s-transferase π , GST- π)也是肿瘤耐药的原因之一.GST- π 对过氧化物和氧自由基较其他GST敏感,能通过酶蛋白自身的氧化(SH氧化为-S-S)来清除活性或氧自由基.在胆囊癌的对比研究中发现,GST- π 在胆囊癌中的表达明显高于结石性胆囊炎等良性疾病^[76].

3.5 TOP- II 拓扑异构酶(Topo)是DNA构象动态变化的关键性核酶,分为两型,即Topo- I 和Topo- II,Topo- II是真核细胞必不可少的核酶,为二聚体,是许多化疗药物插入的作用靶点,Topo- II的改变成为耐药的重要原因之一.许多研究表明,Topo- II数量和功能上的改变与耐药密切相关^[76].

3.6 PML 早幼粒细胞性白血病基因(promyelocytic leukemia, PML)不但在急性早幼粒细胞性白血病的发病过程中起重要作用,而且对前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌等具有明显的生长抑制作用.应用重组携带PML基因的腺病毒(Ad-PML)感染体外培养的人胆囊癌细胞GBC-SD,以检测PML在胆囊癌细胞中的表达及其对胆囊癌细胞体外生长的影响,结果发现Ad-PML在胆囊癌细胞中有较高的转导效率,移植瘤实验发现Ad-PML感染的GBC-SD细胞不能在裸鼠体内形成肿瘤,结果说明腺病毒介导的PML基因不仅能抑制胆囊癌细胞的体外生长,而且能有效地抑制胆囊癌细胞在裸鼠体内的致癌能力^[77].

3.7 G207 一种肿瘤细胞溶解酶. Nakano *et al*应用G207治疗胆囊癌的实验发现,G207可以杀灭胆囊癌细胞.在G207的抗肿瘤作用中,T淋巴细胞介导的免疫反应在局部和全身都发挥作用^[78].

3.8 AxdAdB-3 一种剔除了E1A、E1B 2种基因的腺病毒, 在裸鼠上进行的对比研究显示, AxdAdB-3 在胆囊癌中的复制及细胞毒性与野生型和AxElBdB相比, 具有同样的作用, AxdAdB-3可以有效抑制胆囊癌细胞的生长, 明显延长生存时间^[79]。

3.9 CS-706 一种选择性COX-2抑制剂. Kiguchi *et al*^[80]研究发现CS-706能延缓BK5. ErbB-2大鼠胆囊腺癌的进展, 并有明显的治疗作用, 提示单独针对COX-2或联合其他化疗药物为胆囊癌的治疗提供了一条新的有效的途径。

4 与胆囊癌有关的肿瘤标志物

4.1 Ki-67 Ki-67是继PCNA之后发现的又一种反映细胞增殖活性的标志抗原, 分布于除G₀期和G₁早期以外的细胞周期各个时相, 是一种稳定、可靠的组织细胞增殖活性的标志物. 研究结果显示, Ki-67在慢性胆囊炎、胆囊腺瘤和胆囊癌中的阳性表达率逐渐增加, 提示胆囊癌的发生与细胞增殖活性的增加密切相关, Ki-67表达与胆囊癌的高分级、淋巴结或远处转移明显相关, 因此, Ki-67可作为鉴别胆囊良恶性肿瘤的一个参考指标, 并可判断胆囊癌变的生长速度、分化程度和有无转移^[61]。

4.2 AFP 甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)与肝癌的相关性已为大家所公认, 但其与胆囊癌的关系却罕有报道, 有学者发现, AFP在血清中的水平与胆囊癌的转移和复发有一定关系^[81]。

4.3 E/ER 对雌激素(estrogen, E)及其受体(estrogen receptor, ER)与PGC危险因素的相关性研究表明, ER在胆囊癌组织中的表达与CEA在结肠癌及AFP在肝癌中的表达相似, 可以认为是在胆囊细胞癌变过程中胚胎基因的一种去阻抑现象^[82]。ER在胆囊肿瘤中的表达水平随肿瘤分化程度降低而降低, 测定胆囊癌组织及患者血清的E及ER水平, 有助于判断肿瘤的恶性程度及预后^[83], 在判断肿瘤的发生及预后时综合考虑雌激素、ER及受体相关蛋白有更好的预后意义。

4.4 CEA与CA50 CEA为一种糖蛋白, 在多数消化系肿瘤组织中呈高表达. CA50为目前新发现的一种分布于细胞膜的肿瘤相关抗原, 消化系恶性肿瘤中含量很高, 而正常组织中含量极少. 胆囊癌中CEA表达显著升高, 并含有丰富的CA50抗原, 提示CEA和CA50检测可作为胆囊腺瘤恶变和胆囊癌早期诊断的一项辅助指标^[61]。

4.5 CA19-9 CA19-9是一种低聚糖类肿瘤相关抗原, 也称胃肠癌的相关抗原. CA19-9为人类血型物质Lewis相关抗原, 是连接在蛋白质或脂类上的糖链所携带的岩藻糖残基末端结构, 血清学表现为Lewis a和Lewis b, 除存在于血清外, 还存在于胸水、腹水、胆汁、胰液和胃液等分泌液中. 胆汁CA19-9水平的测定对鉴别胆管良恶性疾病有较高的辅助诊断价值, 对胆囊癌联合检测CEA和CA19-9可提高诊断的敏感性, CA19-9不仅可作为胆囊癌的诊断指标, 也可作为胆囊癌的治疗、动态观察及预后评价的指标. 然而CA19-9并非胆囊癌特异性抗原, 对年龄在45岁以上, 有可疑症状的高危人群, 实施包括CA19-9在内的肿瘤标志物联合检测, 结合生化和影像学合理筛选检查, 则可以提高胆囊癌的早期诊断率^[84]。

4.6 CA125 CA125系一种糖蛋白, 正常组织中CA125含量极低, 目前关于CA125对胆囊癌的诊断价值并不肯定, 刘珣 *et al*^[85]报告胆囊癌CA125阳性表达率较胆囊炎、胆囊息肉及腺瘤组明显增高, 苏明 *et al*^[86]认为CA125, AFP在胆囊癌的诊断中无明显意义. Chaube *et al*^[87]研究认为CA125对胆囊癌有潜在的诊断价值, 并有助于与胆石症鉴别。

5 结论

胆囊癌的发生、发展是一个多基因联合作用的结果, 虽然对各种癌基因和抑癌基因在胆囊癌的发病机制、早期诊断、转移和预后判断、疗效监测等方面的研究已经取得了一定的进展, 但目前仍未找到一种理想的基因诊断或治疗胆囊癌的方法, 相信随着分子生物学技术和检验医学技术的发展, 特别是基因组学和蛋白质组学研究的深入以及更多的临床应用(例如基因芯片在肿瘤诊断的应用), 新的基因载体构建技术和靶向治疗技术的发展等, 都将为胆囊癌的早期诊断和治疗开辟有效的方法和手段。

6 参考文献

- 1 Hanada K, Tsuchida A, Kajiyama G. Cellular kinetics and gene mutations in gallbladder mucosa with an anomalous junction of pancreaticobiliary duct. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6: 223-228
- 2 Matsubara T, Sakurai Y, Sasayama Y, Hori H, Ochiai M, Funabiki T, Matsumoto K, Hirono I. K-ras point mutations in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *Cancer* 1996; 77: 1752-1757
- 3 Yukawa M, Fujimori T, Hirayama D, Idei Y, Ajiki T, Kawai K, Sugiura R, Maeda S, Nagasako K.

- Expression of oncogene products and growth factors in early gallbladder cancer, advanced gallbladder cancer, and chronic cholecystitis. *Hum Pathol* 1993; 24: 37-40
- 4 Tatsumoto T, Nakano S, Shimizu K, Ono M, Esaki T, Ohshima K, Niho Y. Direct tumorigenic conversion of human gallbladder carcinoma cells by v-src but not by activated c-H-ras oncogene. *Int J Cancer* 1995; 61: 206-213
 - 5 Mikami T, Yanagisawa N, Baba H, Koike M, Okayasu I. Association of Bcl-2 protein expression with gallbladder carcinoma differentiation and progression and its relation to apoptosis. *Cancer* 1999; 85: 318-325
 - 6 Saetta A, Lazaris AC, Michalopoulos NV, Davaris PS. Genetic alterations involved in the development of gallbladder carcinomas from Greek patients. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1284-1288
 - 7 索金友, 顾红光. 胆道肿瘤相关基因的研究进展. *消化外科* 2004; 3: 296-300
 - 8 刘智敏, 蒋莉莉. VEGF和c-myc在胆囊癌形成、发展和转移中的作用. *生物医学工程杂志* 2003; 20: 68-70
 - 9 Wang J, Dou KF, Zhao R. [Expression of P62 in gallbladder carcinoma tissues and its correlation with angiogenesis] *Xibao Yu Fenzi Mianyi Xue Zazhi* 2004; 20: 461-464
 - 10 Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584
 - 11 冯立民, 孙宪春, 李刚, 姜希宏, 寿南海. 凋亡相关基因 survivin, bcl-2及caspase-3在胆囊癌中的表达及意义. *临床消化病杂志* 2007; 19: 179-182
 - 12 Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60: 3689-3695
 - 13 Hui AM, Li X, Shi YZ, Takayama T, Torzilli G, Makuuchi M. Cyclin D1 overexpression is a critical event in gallbladder carcinogenesis and independently predicts decreased survival for patients with gallbladder carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4272-4277
 - 14 Eguchi N, Fujii K, Tsuchida A, Yamamoto S, Sasaki T, Kajiyama G. Cyclin E overexpression in human gallbladder carcinomas. *Oncol Rep* 1999; 6: 93-96
 - 15 朱亚青, 陈时周, 陈玉泉. 转化生长因子 β 1在胆囊癌中的表达及意义. *肝胆胰外科杂志* 2001; 13: 207-208
 - 16 徐立宁, 邹声泉. 胆囊癌分子生物学研究现状及前景. *实用肿瘤杂志* 2005; 20: 7-9
 - 17 Quan ZW, Wu K, Wang J, Shi W, Zhang Z, Merrell RC. Association of p53, p16, and vascular endothelial growth factor protein expressions with the prognosis and metastasis of gallbladder cancer. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 380-383
 - 18 Götte K, Riedel F, Neubauer J, Schäfer C, Coy JF, Hörmann K. The relationship between allelic imbalance on 17p, p53 mutation and p53 overexpression in head and neck cancer. *Int J Oncol* 2001; 19: 331-336
 - 19 国长军, 苏志慧, 郑泽霖. 转化生长因子TGF- α 和p53基因在胆囊癌中表达及临床意义. *山东医科大学学报* 2001; 39: 544-546
 - 20 Wistuba II, Albores-Saavedra J. Genetic abnormalities involved in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6: 237-244
 - 21 Li X, Hui AM, Shi YZ, Takayama T, Makuuchi M. Reduced p21(WAF1/CIP1) expression is an early event in gallbladder carcinogenesis and is of prognostic significance for patients with carcinomas of the gallbladder. *Hum Pathol* 2001; 32: 771-777
 - 22 Alsheyab FM, Ziadeh MT, Bani-Hani KE. Expression of p21 and p27 in gallbladder cancer. *Saudi Med J* 2007; 28: 683-687
 - 23 Matsuo K, Kuroki T, Kitaoka F, Tajima Y, Kanematsu T. Loss of heterozygosity of chromosome 16q in gallbladder carcinoma. *J Surg Res* 2002; 102: 133-136
 - 24 Wistuba II, Sugio K, Hung J, Kishimoto Y, Virmani AK, Roa I, Albores-Saavedra J, Gazdar AF. Allele-specific mutations involved in the pathogenesis of endemic gallbladder carcinoma in Chile. *Cancer Res* 1995; 55: 2511-2515
 - 25 Ueki T, Hsing AW, Gao YT, Wang BS, Shen MC, Cheng J, Deng J, Fraumeni JF Jr, Rashid A. Alterations of p16 and prognosis in biliary tract cancers from a population-based study in China. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1717-1725
 - 26 Roa JC, Vo Q, Araya JC, Villaseca M, Guzmán P, Ibacache GS, de Aretxabala X, Roa I. [Inactivation of CDKN2A gene (p16) in gallbladder carcinoma] *Rev Med Chil* 2004; 132: 1369-1376
 - 27 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90: 809-819
 - 28 蒋进发, 易继林, 沈文状, 孙华鹏, 陈晚平, 李兴睿, 刘谨文. P73蛋白在原发性胆囊癌中的表达及意义. *腹部外科* 2004; 17: 313-314
 - 29 马红兵, 王作仁, 石景森, 刘新莲. Rb基因产物与胆囊癌生物学特性的关系. *中国普外基础与临床杂志* 2000; 7: 87-88
 - 30 秦一雨, 全志伟, 李济宇. 影响细胞周期的相关分子在胆囊癌中研究进展. *广东医学* 2007; 28: 2046-2048
 - 31 Wongkham S, Sheehan JK, Boonla C, Patrakitkomjorn S, Howard M, Kirkham S, Sripan B, Wongkham C, Bhudhisawasdi V. Serum MUC5AC mucin as a potential marker for cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2003; 195: 93-99
 - 32 Miyahara N, Shoda J, Ishige K, Kawamoto T, Ueda T, Taki R, Ohkohchi N, Hyodo I, Thomas MB, Krishnamurthy S, Carraway KL, Irimura T. MUC4 interacts with ErbB2 in human gallbladder carcinoma: potential pathobiological implications. *Eur J Cancer* 2008; 44: 1048-1056
 - 33 Zhou L, He XD, Chen J, Cui QC, Qu Q, Rui JA, Zhao YP. Overexpression of LAPTM4B-35 closely correlated with clinicopathological features and post-resectional survival of gallbladder carcinoma. *Eur J Cancer* 2007; 43: 809-815
 - 34 Jiao X, Huang J, Wu S, Lv M, Hu Y, Jianfu, Su X, Luo C, Ce B. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and susceptibility to gallbladder cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2007; 121: 501-505
 - 35 Srivastava A, Pandey SN, Choudhuri G, Mittal B. Role of genetic variant A-204C of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in susceptibility to gallbladder cancer. *Mol Genet Metab* 2008; 94: 83-89
 - 36 Dutta U, Poornachandra KS. Heparanase and gallbladder cancer: new insights into understanding tumor growth and invasion. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 343-344
 - 37 Saetta AA, Papanastasiou P, Michalopoulos NV, Gigelou F, Korkolopoulou P, Bei T, Patsouris

- E. Mutational analysis of BRAF in gallbladder carcinomas in association with K-ras and p53 mutations and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2004; 445: 179-182
- 38 Doniach T. Basic FGF as an inducer of anteroposterior neural pattern. *Cell* 1995; 83: 1067-1070
- 39 Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 1988; 54: 541-552
- 40 Ryseck RP, Hirai SI, Yaniv M, Bravo R. Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature* 1988; 334: 535-537
- 41 周彦明, 李玉民, 薛左良, 朱有全, 曹农. 癌基因c-fos和c-jun产物在胆囊癌中的表达. *肿瘤* 2003; 23: 129-130
- 42 王江, 窦科峰. 胆囊癌组织hPTTG1与C-Myc的表达及意义. *第四军医大学学报* 2004; 25: 365-368
- 43 张耀明, 高焱明, 陈恩碧, 梁志鹏, 梅方雄. PTTG和血管生成与原发性胆囊癌的相关性研究. *中华普通外科杂志* 2004; 19: 473-474
- 44 Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 1995; 268: 884-886
- 45 Liu WM, Zhang XA. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett* 2006; 240: 183-194
- 46 Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997; 11: 428-442
- 47 Zöller M. Gastrointestinal tumors: metastasis and tetraspanins. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 573-586
- 48 姜文霞, 宋伯根, 汤如勇, 方建萍. 肿瘤转移抑制基因KAT1在原发性胆囊癌中的表达及其临床意义. *第二军医大学学报* 2006; 27: 1101-1104
- 49 Tsutsumi S, Shimura T, Morinaga N, Mochiki E, Asao T, Kuwano H. Loss of KAI1 expression in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 281-284
- 50 张宝华, 满小波, 唐亮, 邱秀华, 程庆保, 姜小清, 张柏和. 骨桥蛋白编码基因在肝内胆管细胞癌和胆囊癌中的表达. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 539-540
- 51 叶辉铭, 高晶晶, 张忠英. 胆囊癌基因诊断新进展. *医学综述* 2006; 12: 674-677
- 52 Kiguchi K, Carbajal S, Chan K, Beltrán L, Ruffino L, Shen J, Matsumoto T, Yoshimi N, DiGiovanni J. Constitutive expression of ErbB-2 in gallbladder epithelium results in development of adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6971-6976
- 53 沈汉斌, 郑启昌. 胆囊癌中survivin的表达及其与CD44V6和nm23基因表达的关系. *中国普通外科杂志* 2005; 14: 614-617
- 54 Yanagisawa N, Mikami T, Yamashita K, Okayasu I. Microsatellite instability in chronic cholecystitis is indicative of an early stage in gallbladder carcinogenesis. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 413-417
- 55 张国强, 张永奎, 卢海英, 李继承. 散发性胆囊癌nm23-H1基因遗传不稳定性与错配修复基因hMLH1和hMSH2蛋白表达的研究. *中国病理生理杂志* 2007; 23: 2179-2184
- 56 Chow NH, Liu HS, Chan SH. The role of nm23-H1 in the progression of transitional cell bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3595-3599
- 57 Chaves P, Cruz C, Lage P, Claro I, Cravo M, Leitão CN, Soares J. Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype. *J Pathol* 2000; 191: 355-360
- 58 Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 84: 587-597
- 59 Wistuba II, Ashfaq R, Maitra A, Alvarez H, Riquelme E, Gazdar AF. Fragile histidine triad gene abnormalities in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 2073-2079
- 60 刘会春, 吴斌全. 原发性胆囊癌组织中脆性组氨酸三联体基因和Ki-67的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3382-3385
- 61 全志伟. 胆囊癌相关基因及肿瘤标志物的研究进展. *中国实用医学杂志* 2003; 23: 638-640
- 62 范跃祖, 张景涛. 基质金属蛋白酶-2及其组织抑制因子在原发性胆囊癌的表达及意义. *中国肿瘤临床* 2004; 31: 675-678
- 63 Asano T, Shoda J, Ueda T, Kawamoto T, Todoroki T, Shimonishi M, Tanabe T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Mutoh M, Tanaka N, Miwa M. Expressions of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E-receptors in carcinoma of the gallbladder: crucial role of arachidonate metabolism in tumor growth and progression. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1157-1167
- 64 陈秋强, 冯文明, 鲍鹰. E钙粘蛋白、血管内皮生长因子表达与胆囊癌生物学特性的相关性研究. *中华实验外科杂志* 2002; 19: 83
- 65 牛新捷, 王作仁, 张云锋, 吴胜利, 王林, 耿智敏. 胆囊癌组织中iNOS的表达与肿瘤血管生成的关系. *第四军医大学学报* 2003; 24: 265-268
- 66 Shi HY, Zhang W, Liang R, Abraham S, Kittrell FS, Medina D, Zhang M. Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model. *Cancer Res* 2001; 61: 6945-6951
- 67 Reis-Filho JS, Milanezi F, Schmitt FC. Maspin is expressed in the nuclei of breast myoepithelial cells. *J Pathol* 2002; 197: 272-273; author reply 273-274
- 68 孙伟, 范跃祖, 张文忠, 葛春燕, 余翔耀, 奚豪. VEGF在胆囊癌血管生成拟态组织中表达及意义. *同济大学学报(医学版)* 2008; 28: 25-29
- 69 谭辉, 汤恢焕, 吕新生. Bcl22蛋白与增殖细胞核抗原在原发性胆囊癌的表达及意义. *中国普通外科杂志* 2002; 11: 116-118
- 70 Noguchi Y, Saito A, Miyagi Y, Yamanaka S, Marat D, Doi C, Yoshikawa T, Tsuburaya A, Ito T, Satoh S. Suppression of facilitative glucose transporter 1 mRNA can suppress tumor growth. *Cancer Lett* 2000; 154: 175-182
- 71 Kim YW, Park YK, Yoon TY, Lee SM. Expression of the GLUT1 glucose transporter in gallbladder carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 907-911
- 72 郑长黎, 文继舫, 黄英. 胆囊腺瘤癌变的病理观察及PTEN基因表达研究. *中国现代医学杂志* 2005; 15: 1637-1640
- 73 兰思根, 杨竹林, 刘洁琼, 杨乐平, 杨晓静, 田秉章, 苗雄鹰. PDGF-B mRNA在108例胆囊腺癌中的表达及其临床病理意义. *肿瘤学杂志* 2009; 15: 63-65
- 74 李江涛, 彭淑端, 刘颖斌, 王新保, 王海军, 王建伟, 许斌, 李海军, 冯雪冬, 钱浩然, 吴育连, 方河清. 糖基化神经酰胺合成酶及相关基因的表达与胆囊癌多药耐药. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 382-383
- 75 王百林, 翟淑萍, 陈孝平. 胆囊癌与mdr1基因的临床相关性研究. *中华实验外科杂志* 2002; 19: 407-408
- 76 刘成, 陈训如. 胆囊癌基因表达和治疗. *中国基层医*

- 药 2005; 12: 497-498
- 77 朱爱军, 石景森, 任予, 李磊, 贺大林. 腺病毒载体介导的PML生长抑制因子用于胆囊癌基因治疗的实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2005; 11: 485-488
- 78 Nakano K, Todo T, Chijiiwa K, Tanaka M. Therapeutic efficacy of G207, a conditionally replicating herpes simplex virus type 1 mutant, for gallbladder carcinoma in immunocompetent hamsters. *Mol Ther* 2001; 3: 431-437
- 79 Fukuda K, Abei M, Ugai H, Seo E, Wakayama M, Murata T, Todoroki T, Tanaka N, Hamada H, Yokoyama KK. E1A, E1B double-restricted adenovirus for oncolytic gene therapy of gallbladder cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 4434-4440
- 80 Kiguchi K, Ruffino L, Kawamoto T, Franco E, Kurakata S, Fujiwara K, Hanai M, Rumi M, DiGiovanni J. Therapeutic effect of CS-706, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, on gallbladder carcinoma in BK5.ErbB-2 mice. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1709-1717
- 81 St Laurent M, Esterl RM Jr, Halff GA, Speeg KV. Gallbladder carcinoma producing alpha-fetoprotein. *J Clin Gastroenterol* 1999; 28: 155-158
- 82 刘刚, 石景森, 于跃利. 胆囊癌组织ER和PR的表达及其与血清E2水平的相关研究. *中华肝胆外科杂志* 2001; 7: 90-93
- 83 童赛雄, 吴民浩. 雌、孕激素受体和CerbB-2在原发胆囊癌中的表达及意义. *复旦大学学报(医学版)* 2002; 29: 116-118
- 84 何浪, 杨耀琴. 肿瘤标志物在原发性胆囊癌诊断中的意义. *同济大学学报(医学版)* 2004; 25: 438-440
- 85 刘珣, 王海连. CEA、CA 19-9、CA50、CA-125监测在胆囊癌早期诊断和预后判断中的应用. *中国误诊学杂志* 2009; 9: 577-578
- 86 苏明, 赵欣. 肿瘤标志物CA19-9、CEA、AFP和CA-125在胆囊癌诊断中的应用价值. *武警医学* 2008; 19: 906-908
- 87 Chaube A, Tewari M, Singh U, Shukla HS. CA 125: a potential tumor marker for gallbladder cancer. *J Surg Oncol* 2006; 93: 665-669

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

去氨微乳的结肠定向除氨作用

王爱红, 段志军, 田 舸, 张文君, 贺高红

王爱红, 段志军, 大连医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省大连市 116011

王爱红, 唐山市工人医院分院 河北省唐山市 063000

田 舸, 大连医科大学药学院 辽宁省大连市 116041

张文君, 贺高红, 大连理工大学化工学院 辽宁省大连市 116012

国家自然科学基金资助项目, No. 30970886

大连市科技计划基金资助项目, No. 2008E13SF193

作者贡献分布: 此课题由段志军、贺高红及田舸设计; 实验由王爱红、张文君及田舸完成; 数据分析由王爱红完成; 论文写作由王爱红与段志军完成。

通讯作者: 段志军, 教授, 主任医师, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学附属第一医院消化内科。

cathydoctor@yahoo.com

电话: 0411-83635963-7132

收稿日期: 2009-06-23 修回日期: 2009-08-27

接受日期: 2009-08-31 在线出版日期: 2009-09-28

Targeted removal of ammonia from the colon using ammonia-removing microemulsion

Ai-Hong Wang, Zhi-Jun Duan, Ge Tian,
Wen-Jun Zhang, Gao-Hong He

Ai-Hong Wang, Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Ai-Hong Wang, Branch Hospital of Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Ge Tian, College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116041, Liaoning Province, China

Wen-Jun Zhang, Gao-Hong He, School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116012, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural and Science Foundation of China, No. 30970886; and the Science and Technology Project of Dalian, No. 2008E13SF193

Correspondence to: Professor Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. cathydoctor@yahoo.com

Received: 2009-06-23 Revised: 2009-08-27

Accepted: 2009-08-31 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate whether ammonia-removing microemulsion (ARM) can specifically remove ammonia from artificial colonic fluid and explore the potential role of ARM in the prevention and treatment of hepatic encephalopathy.

METHODS: ARM was mixed with artificial colonic fluid containing different concentrations of ammonia for ten hours. Meanwhile, ARM

was successively mixed with artificial gastric juice for 2 h, artificial small intestinal juice for 3 h and artificial colonic fluid for 10 h to mimic gastrointestinal transit and pH environment. Ammonia concentrations in the fluid were then measured using a standard technique, and the ammonia removal rate was calculated. The ammonia removal efficiency achieved using ARM was compared with that achieved using empty microemulsion, water and lactulose.

RESULTS: After mixing with ARM, the ammonia concentrations decreased to 0 g/L in the artificial colonic fluid initially containing 5 g/L or 10 g/L of ammonia, and to 0.521 ± 0.135 g/L in the fluid containing 20 g/L of ammonia. The ammonia removal rate achieved in artificial colonic fluid containing 10 or 20 g/L of ammonia was significantly higher than that in the artificial gastric juice and small intestinal juice containing enzymes ($100\% \pm 0.00\%$ vs $96.41\% \pm 0.84\%$, and $97.29\% \pm 2.67\%$ vs $86.42\% \pm 2.63\%$, respectively; both $P < 0.05$). ARM achieved a higher ammonia removal efficiency than empty microemulsion, water and lactulose.

CONCLUSION: ARM shows a very good ammonia-removing effect and thus provides a new approach for removal of colonic ammonia. However, the digestive fluids in the stomach and small intestine may weaken such ammonia-removing effect.

Key Words: Hepatic encephalopathy; Ammonia; Microemulsion

Wang AH, Duan ZJ, Tian G, Zhang WJ, He GH. Targeted removal of ammonia from the colon using ammonia-removing microemulsion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2821-2824

摘要

目的: 考察去氨微乳结肠定向除氨作用, 期望为肝性脑病的防治提供一种更直接有效的新方法。

方法: 将去氨微乳放入含不同氨浓度的人工结肠液中10 h, 体外模拟胃肠转运时间与pH环

背景资料

氨中毒学说在肝性脑病发病机制中处于中心地位, 对于常存在低蛋白血症的肝病患者, 既要预防肝性脑病又要保证蛋白营养, 其解决的最好办法是及时高效地清除肠道氨, 但目前口服清除肠道氨的方法无显著提高直接去氨能力, 清除率有待提高。

同行评议者

高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

研发前沿

本研究利用微乳的独特性,初步探讨了特制的去氨微乳对人工结肠液中氨的去除效果。期望为进一步优化去氨微乳建立实验依据,为肠道氨的清除提供一种新的可行的方法。

境的实验;参照国际检测氨的方法分别测氨浓度变化,计算氨清除率;在氨检测装置中比较去氨微乳、空白微乳、水及乳果糖对氨的清除作用。

结果:去氨微乳使含氨5 g/L与10 g/L的结肠液氨浓度均下降为0 g/L,使含氨20 g/L的结肠液氨浓度下降为 0.521 ± 0.135 g/L($P < 0.05$)。在含氨10 g/L与20 g/L的人工结肠液中对氨的清除率较在含酶的人工胃液与小肠液消化中显著提高($100\% \pm 0.00\%$ vs $96.41\% \pm 0.84\%$; $97.29\% \pm 2.67\%$ vs $86.42\% \pm 2.63\%$, 均 $P < 0.05$)。去氨微乳清除氨的效果明显优于空白微乳、水及乳果糖。

结论:去氨微乳本身具有很好的除氨作用,为清除肠道氨提供了新的方法,但其作用会受到胃与小肠消化的影响,需进一步优化其配方。

关键词:肝性脑病;氨;微乳

王爱红,段志军,田舸,张文君,贺高红.去氨微乳的结肠定向除氨作用.世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2821-2824
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2821.asp>

0 引言

氨中毒学说在肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)发病机制中处于中心地位^[1]。去氨一直是HE防治的主要措施^[2-3]。低蛋白或禁蛋白饮食也在HE防治中被采纳^[2]。然而对于常存在低蛋白血症的肝病患者,过分限制蛋白反而恶化了其营养状况,使其生存质量明显下降^[4-5]。因此,既要预防HE又要保证蛋白营养,其解决的最好办法是及时高效地清除肠道氨,但目前能够保证患者日常预防应用的口服清除肠道氨的方法尚少,其主要问题在于目前的方法无显著提高直接去氨能力,清除率不高。我们初步探讨了特制的去氨微乳对人工结肠液中氨的去除效果,期望为进一步优化去氨微乳建立实验依据,为肠道氨的清除提供一种新的可行的方法。

1 材料和方法

1.1 材料 W/O型去氨微乳、空白微乳由大连理工大学膜科学与技术中心制备。氨水为天津福晨化学试剂厂分析纯。盐酸为天津瑞金特化学有限公司分析纯。乳果糖口服液为丹东康复制药有限公司产品。胃蛋白酶(上海贝基生物科技有限公司);胰酶(合肥博美生物科技有限责任公司)。精密pH试纸(上海三爱思试剂有限公司);

电子天平(FA1104,上海精科天平有限公司);磁力加热搅拌器(79-1,国华电器有限公司);数显恒温水浴锅(HH-8,国华电器有限公司)。甲基红-次甲基蓝指示液配制(将1 g/L次甲基蓝乙醇溶液与1 g/L甲基红乙醇溶液1:2混合);pH指示剂配制(甲基红1.5 mg、溴麝香草酚蓝60 mg、酚酞64 mg溶于50%乙醇100 mL,用0.1 mol/L NaOH调至绿色),变色范围pH1-14。

1.2 方法

1.2.1 人工胃肠液的配制:按中国药典2005年版,人工胃液:取稀盐酸16.4 mL,加水800 mL与胃蛋白酶10 g,摇匀后,加水稀释至1000 mL即得;人工小肠液:pH6.8取磷酸二氢钾6.8 g,加水500 mL使溶解,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至6.8,取胰酶10 g,加水适量使溶解,将2液混合后,加水稀释至1000 mL即得;人工结肠液:pH7.8磷酸氢二钾5.59 g与磷酸二氢钾0.41 g,加水溶成1000 mL即得。含氨的人工结肠液的配制:分别称取5、10和20 g氨水加上述人工结肠液稀释至1000 mL,即得浓度分别为5、10和20 g/L的含氨结肠液备用。

1.2.2 去氨微乳对人工结肠液中氨清除作用:将去氨微乳放入含氨的人工结肠液,10 h后静置分层留取结肠液;模拟全胃肠道转运时间和pH环境:去氨微乳依次放入人工胃液2 h,静置分层,移入人工小肠液3 h,静置分层,移入含氨的人工结肠液10 h,静置分层留取结肠液(去氨微乳与人工液体体积1:1的比例)。将上述含氨的人工结肠液加2滴甲基红-次甲基蓝混合指示液,参照国际标准(ISO 6353/2-1983)规定的检测氨的方法:用盐酸标准滴定溶液[C(HCl) = 0.5 mol/L]滴定含氨结肠液至红色。利用公式计算氨的浓度g/L = 所用盐酸体积×标定后盐酸浓度×0.01703/含氨结肠液体积(分层后)。氨清除率 = (加入去氨微乳前氨浓度-加入去氨微乳后氨浓度)/加入去氨微乳前氨浓度。

1.2.3 去氨微乳和乳果糖去氨作用的比较:在锥形瓶中加入氯化铵及氢氧化钙固体,加热可产生氨。取玻璃管分别精密加入去氨微乳、空白微乳、水、乳果糖各3 mL及通用指示剂作为受试液,此管上开口处塞入湿润的广泛pH试纸。组装成氨检测装置,当湿润的试纸开始变蓝时,指示受试液氨饱和,通过记录管中受试液吸附的氨气数比较受试液的去氨作用。

统计学处理 用SPSS13.0软件,采用配对t检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

创新盘点

本研究以液膜去氨研究为基础,打破了以往人们对微乳在药物释放方面研究的传统观念。期待微乳在胃和小肠保持完整,到达结肠吸附氨并携氨排出体外,不增加代谢产物。

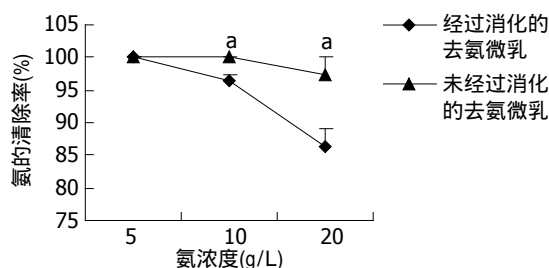


图1 经过人工胃液、小肠液消化后去氨微乳与消化前的去氨微乳($n=10$). $^*P<0.05$ vs 未经过消化的氨微乳.

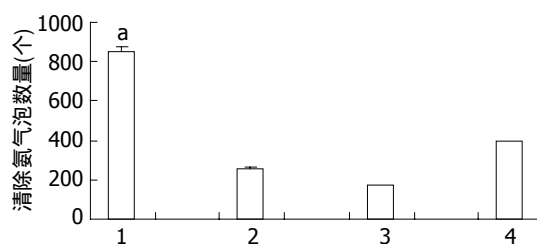


图2 去氨微乳与空白微乳、水和乳果糖体外去氨效果比较($n=10$). 1: 去氨微乳; 2: 空白微乳; 3: 水; 4: 乳果糖口服液. $^*P<0.05$ vs 其他各组.

应用要点
本研究提供的载药体系和作用模式有望为清除胃肠道毒素的研究和应用提供新方法和新思路; 还可能为口服药物治疗的研究和应用开辟了新途径.

2 结果

2.1 去氨微乳对人工结肠液中氨的清除作用 含氨5 g/L及10 g/L的结肠液中氨浓度均降为0 g/L, 含氨20 g/L的结肠液中氨浓度变为 0.521 ± 0.135 g/L, 差异有统计学意义($P<0.01$).

2.2 消化前后去氨微乳清除人工结肠液中氨的作用 在含氨10 g/L及20 g/L的人工结肠液中对氨的清除率分别为 $100\% \pm 0.00\%$ 和 $97.29\% \pm 2.67\%$; 在经过含酶的人工胃液和小肠液消化后, 清除率分别为 $96.41\% \pm 0.84\%$ 和 $86.42\% \pm 2.63\%$, 与未经消化的去氨微乳比较去氨效果有所下降($P<0.05$, 图1).

2.3 体外比较去氨微乳与乳果糖去氨作用 去氨微乳清除氨效果明显优于空白微乳、水和乳果糖(图2).

3 讨论

HE是由严重肝病引起的、代谢紊乱、中枢神经系统功能失调的综合征, 表现为性格改变、行为异常、智能障碍, 重者昏迷, 严重影响生活质量并可危及生命. 发病机制是复杂, 涉及多种物质代谢异常. 其中氨中毒学说已被广泛接受, 有学者^[6]认为严重肝病患者的血氨水平往往发生更多的肝性脑病等并发症. 而胃肠道是氨产生的主要来源, 其主要产生部位在结肠. 我们用醋酸作为氨的捕集剂, 不被胃肠道吸收的二甲基硅油作为外油相制备了W/O去氨微乳, 用来清除结肠中的氨. 去氨微乳利用酸碱中和的原理, 将人工结肠液中的氨迅速直接通过外油相被内相中和清除. 目前临床上口服清除肠道氨的措施主要有口服不吸收的双糖类如乳果糖、乳梨醇、益生菌以及一些抗菌药物. 乳果糖等双糖类在结肠被乳酸菌属和粪链球菌分解为乳酸和醋酸以酸化肠道, 并可改变肠道菌群来减少氨的生成和吸收^[7]; 益生菌通过调整肠道菌群, 降低肠道pH值, 减少氨的生成^[8]; 口服新霉素、卡

那霉素、替硝唑等可减少细菌对蛋白质的分解, 从而减少氨和内毒素的产生^[9-11]. 由作用机制可见这些措施发挥清除肠道氨的作用受到肠道菌群和pH环境的影响, 且不吸收糖类有腹泻的不良反应, 抗生素对肝肾功等的影响也使其长期应用受到了限制^[12-13]. 我们配制的人工结肠液未加入结肠菌, 可见去氨微乳同这些措施相比, 发挥除氨作用不需要结肠菌群的作用, 能直接除氨, 可能为结肠中氨的清除提供了一种新的有效的方法.

胃肠转运时间和胃肠道的pH是影响口服药物释药速度和释药位置的主要因素. 我们进一步采取了胃肠转运时间和pH相结合的方法考察去氨微乳的除氨作用, 去氨微乳经过含酶的人工胃液和小肠液消化后, 除氨效率有所下降, 但在含氨20 g/L的人工结肠液中除氨效率仍在85%以上. 且本实验简易的氨检测装置中去氨微乳直接除氨作用明显优于现有药物乳果糖. 去氨微乳对于结肠中氨的清除不失为一种有效的方法. 早在1973年, Li *et al*和Cahn *et al*就提出采用液膜法可直接除去水溶液中的弱酸盐和弱碱盐. 对于碱性药物或毒物, 如氨可以通过内包酸性捕集剂加以去除^[14]. Asher *et al*^[15]制成以酒石酸作为氨的捕集剂的液膜体系证实可捕集肠道中的氨. 本校和中国科学院大连化学物理研究所也曾合作制备了一种内相封装盐酸的稳定的W/O型乳液液膜-甲1号治疗氨中毒效果明显. 然而, 对于乳液液膜来说, 最大问题是其不稳定, 保存期短, 而同属于液膜技术分支的微乳则完全可以克服这一缺点. 微乳除了具有乳液的一般特征外, 还具有粒径小、透明、稳定和靶向释药等特点. 他由水、油、表面活性剂和助表面活性剂4部分组成, 各部分按适当比例混合, 自发形成, 呈各向同性、透明、热力学稳定的分散体系, 易于制备和保存. 将药物制备成微乳制剂, 可达到较高的稳定性, 具有使药物免受降解, 缓

同行评价

本研究初步探讨了特制的去氨微乳对人工结肠液中氨的去除效果, 实验严谨, 方法可行, 为临床治疗急性肝性脑病提供了新的思路。

慢释放药物, 从而作用于病变部位, 减小药物毒性, 提高生物利用度等优点。20世纪80年代后作为药物载体受到医药界的重视。Actis *et al*^[16]对口服环孢菌素微乳的长效生物利用度方面做了详细的研究, 表明环孢菌素的微乳制剂可以对药物起到缓释作用, 并在一定程度上增加了药物的生物利用度。国内王建磊 *et al*^[17]制备的包封胰岛素的W/O型载药微乳液具有良好的耐热、耐酸、耐盐稳定性, 缓释效果显著。赵健 *et al*^[18]将胰岛素微乳用于大鼠结肠给药模型取得较好的降糖效果。

我们制备的口服去除肠道氨的W/O型的去氨微乳, 期望实现通过胃肠道维持完整不破乳, 在结肠中吸附并包裹氨排出体外-提出了一种不同于以往微乳的药物作用模式。但微乳的应用中仍存在一些问题: 高浓度的表面活性剂和助表面活性剂是否对人体有不良反应; 口服后可被大量的胃液稀释, 如何保持其稳定性。因此, 我们还需进一步优化微乳配方, 寻找对人体没有副作用的表面活性剂和助活剂, 减少表面活性剂和助表面活性剂用量, 提高其胃肠道稳定性, 并应用于动物实验进一步考察改进。

4 参考文献

- 1 Shawcross DL, Olde Damink SW, Butterworth RF, Jalan R. Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same. *Metab Brain Dis* 2005; 20: 169-179
- 2 陆再英, 钟南山. 内科学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 463-468
- 3 Av SP. Hepatic encephalopathy: pathophysiology and advances in therapy. *Trop Gastroenterol* 2007; 28: 4-10
- 4 Tözün N. Influence of the metabolic complications of liver cirrhosis on dietary intake. *Med Sci Monit* 2000; 6: 1223-1226
- 5 Mullen KD, Dasarthy S. Protein restriction in hepatic encephalopathy: necessary evil or illogical dogma? *J Hepatol* 2004; 41: 147-148
- 6 Bhatia V, Singh R, Acharya SK. Predictive value of arterial ammonia for complications and outcome in acute liver failure. *Gut* 2006; 55: 98-104
- 7 Shuliat'ev IS, Il'chenko LIu, Vinnitskaia EV, Petrakov AV, Sil'vestrova SIu. [Lactulose in treatment of hepatic encephalopathy in patient with liver cirrhosis] *Eksp Klin Gastroenterol* 2002; 38-41, 127
- 8 Bongaerts G, Severijnen R, Timmerman H. Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses* 2005; 64: 64-68
- 9 Williams R, Bass N. Rifaximin, a nonabsorbed oral antibiotic, in the treatment of hepatic encephalopathy: antimicrobial activity, efficacy, and safety. *Rev Gastroenterol Disord* 2005; 5 Suppl 1: S10-S18
- 10 Zeneroli ML, Avallone R, Corsi L, Venturini I, Baraldi C, Baraldi M. Management of hepatic encephalopathy: role of rifaximin. *Chemotherapy* 2005; 51 Suppl 1: 90-95
- 11 Gasztonyi B, Hunyady B. [Clinical and pharmacological aspects of rifaximin, local antibiotic therapy in intestinal disorders] *Orv Hetil* 2004; 145: 2177-2181
- 12 Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C. Nonabsorbable disaccharides for hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD003044
- 13 Maddrey WC. Role of antibiotics in the management of hepatic encephalopathy. *Rev Gastroenterol Disord* 2005; 5 Suppl 1: S3-S9
- 14 张瑞华. 液膜在生物化学和医学上的应用. 江西师范大学学报(自然科学版) 1989; 13: 91-96
- 15 Asher WJ, Vogler TC, Bovée KC, Holtzapple PG, Hamilton RW. Projections and measurements of in vivo performance of liquid membrane capsules. *Kidney Int Suppl* 1976; : S254-S258
- 16 Actis GC, Lagget M, Rizzetto M, Fadda M, Palmo A, Pinna-Pintor M, Morino F. Long-term efficacy of oral microemulsion cyclosporin for refractory ulcerative colitis. *Minerva Med* 2004; 95: 65-70
- 17 王建磊, 王正武, 俞惠新, 顾明艳, 丰隽莉, 郭宝民. 胰岛素W/O型微乳液的制备及体外释药性能. 精细化工 2006; 23: 867-872
- 18 赵健, 张钧寿, 张瑛, 卢琴. 胰岛素微乳大鼠结肠给药的药效学研究. 中国药科大学学报 2004; 35: 491-494

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布《世界华人消化杂志》 2007年影响因子 0.568

本刊讯 2007年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位。2007年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位。即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54。(科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

大承气汤动物含药血清对Cajal间质细胞三磷酸肌醇受体表达的影响

张栋梁, 齐清会, 李毅, 周丽

张栋梁, 镇江市中医院普通外科 江苏省镇江市 212000
齐清会, 大连医科大学第一附属医院普通外科 辽宁省大连市 116011
李毅, 周丽, 大连医科大学 辽宁省大连市 116011
国家自然科学基金资助项目, No. 30572449
作者贡献分布: 张栋梁、齐清会、李毅及周丽对此文贡献均等;
此课题由齐清会设计; 实验过程由张栋梁、李毅及周丽共同完成;
数据分析由李毅完成; 本文撰写由张栋梁完成。
通讯作者: 齐清会, 教授, 116011, 辽宁省大连市中山路222号,
大连医科大学第一附属医院普通外科. qiqh@medmail.com.cn
电话: 0411-83635963-3282
收稿日期: 2009-07-04 修回日期: 2009-09-18
接受日期: 2009-09-21 在线出版日期: 2009-09-28

Serum from rats medicated with Dachengqitang significantly enhances the expression of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor mRNA in interstitial cells of Cajal in rat jejunum

Dong-Liang Zhang, Qing-Hui Qi, Yi Li, Li Zhou

Dong-Liang Zhang, Department of General Surgery, Zhenjiang Hospital of Chinese Medicine, Zhenjiang 212000, Jiangsu Province, China

Qing-Hui Qi, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Yi Li, Li Zhou, Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572449

Correspondence to: Professor Qing-Hui Qi, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 222 Zhongshan Road, Dalian 116011, Liaoning Province, China. qiqh@medmail.com.cn

Received: 2009-07-04 Revised: 2009-09-18

Accepted: 2009-09-21 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of serum from rats medicated with Dachengqitang on the expression of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (IP₃R) mRNA in interstitial cells of Cajal (ICC) in rat jejunum.

METHODS: After rats were intragastrically administered Dachengqitang, they were killed to

prepare medicated rat serum. The ICCs in rat jejunum were then isolated and treated with Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12; normal control group), 100% medicated rat serum in DMEM-F12 (high-dose treatment group), and 20% medicated rat serum in DMEM-F12 (low-dose treatment group), respectively. The mRNA expression of IP₃R subtypes in ICCs were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: All subtypes of IP₃R were expressed in ICCs in rat jejunum. The mRNA expression levels of IP₃R subtypes were significantly higher in the two serum treatment groups than in the normal control group (all $P < 0.05$). Significant differences were also noted in the mRNA expression levels of IP₃R subtypes between the high-dose and low-dose treatment groups (IP₃R1/ β -actin: 1.012 ± 0.129 vs 0.625 ± 0.075 ; IP₃R2/ β -actin: 0.813 ± 0.098 vs 0.476 ± 0.031 ; IP₃R3/ β -actin: 0.924 ± 0.113 vs 0.583 ± 0.046 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Serum from rats medicated with Dachengqitang can significantly increase the expression of IP₃R mRNA in ICCs in rat jejunum in a dose-dependent manner.

Key Words: Dachengqitang; Interstitial cells of Cajal; Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor

Zhang DL, Qi QH, Li Y, Zhou L. Serum from rats medicated with Dachengqitang significantly enhances the expression of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor mRNA in interstitial cells of Cajal in rat jejunum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2825-2829

摘要

目的: 探讨大承气汤含药动物血清对大鼠胃肠Cajal间质细胞(ICC)三磷酸肌醇受体(IP₃R)表达的影响。

方法: 制备大承气汤含药动物血清, 作用于Wistar大鼠空肠ICC细胞, 然后RT-PCR检测空

背景资料
胃肠动力学是近年来迅速发展起来的新兴学科。研究表明多种内外科疾病和胃肠运动功能障碍密切相关。ICC是胃肠运动的起搏细胞, 在胃肠运动的产生和调节中发挥重要作用, 对ICC的深入认识是胃肠动力学研究的重要进展。

同行评议者
陈建杰, 主任医师, 上海中医药大学附属曙光医院(东)肝病科; 叶红军, 主任医师, 广东省北京大学深圳医院消化内科

相关报道
齐清会 *et al* 前期研究表明大承气汤可通过改善ICC功能来增强胃肠蠕动, 有效治疗MODS胃肠运动障碍; 童卫东 *et al* 证实大黄素可通过增加细胞内 $[Ca^{2+}]$ 的浓度, 促进信号传导, 加强胃肠运动。

白培养液组、含药血清高浓度组(100%含药血清DMEM-F12培养液)及低浓度组(20%含药血清DMEM-F12培养液)IP₃R受体表达变化。

结果: 大鼠空肠ICC细胞3型IP₃R均有表达, 含药动物血清组较正常血清组明显增加(均 $P<0.05$), 高浓度组较低浓度组有显著差异(IP₃R1/ β -actin: 1.012 ± 0.129 vs 0.625 ± 0.075 ; IP₃R2/ β -actin: 0.813 ± 0.098 vs 0.476 ± 0.031 ; IP₃R3/ β -actin: 0.924 ± 0.113 vs 0.583 ± 0.046 , 均 $P<0.05$)。

结论: 大承气汤动物含药血清可显著增强大鼠小肠ICC IP₃R表达, 并存在量效依赖关系。

关键词: 大承气汤; Cajal间质细胞; 三磷酸肌醇受体

张栋梁, 齐清会, 李毅, 周丽. 大承气汤动物含药血清对Cajal间质细胞三磷酸肌醇受体表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2825-2829

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2825.asp>

0 引言

Cajal间质细胞(interstitial cell of Cajal, ICC)是胃肠运动的起搏细胞, 在胃肠运动的产生和调节中发挥重要作用, 同胃肠运动障碍密切相关。ICC内质网钙库细胞器膜上存在Ryanodine受体(ryanodine receptor, RyR)与三磷酸肌醇受体(inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, IP₃R), 两大主要受体依赖型 Ca^{2+} 释放通道。IP₃R、RyR介导的周期性 Ca^{2+} 释放, 决定 Ca^{2+} 振荡节律, 与ICC自发节律密切相关。既往研究表明大黄素可显著增强体外培养ICC内钙离子振荡功能^[1]。本实验旨在研究大承气汤对胃肠ICC IP₃R表达的影响, 探讨大承气汤对细胞内钙库动员和促进胃肠运动的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠75只, 雌雄不限, 体质量 300 ± 25 g, 购自大连医科大学实验动物中心(SCXK(辽)2004-0017)。大黄素、厚朴酚标准品(中国药品生物制品检定所); 大承气汤颗粒(天津市南开医院); TRIzol试剂(Invitrogen, USA); DMEM-F12培养基(hyclone), SMGM培养基(cambrex), SCF(cytolab), II型胶原酶、胰酶(Sigma), 兔抗大鼠c-kit蛋白多克隆抗体(c-19, Santa Cruz, USA), FITC结合山羊抗兔IgG抗体(invitrogen, USA), TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver3.0, 50 bp DNA Ladder Marker(大连

TaKaRa公司提供)。美国Waters公司BREE2E1525高效液相色谱系统。

1.2 方法

1.2.1 大鼠小肠ICC的分离、培养: 参照刘勇、齐清会的方法制备小肠ICC^[2]。2-3 wk Wistar大鼠, 禁食12 h, 脱颈处死, 无菌条件下分离小肠, 解剖显微镜下锐性分离平滑肌层。将肌条剪碎至 $1-2$ mm³, 加消化液消化结束后经200目细胞筛网过滤, 收集滤液。1000 r/min离心, 弃上清; DMEM-F12重悬细胞于等体积Ficoll400梯度密度液上1500 r/10 min, 取液面交界细胞层; 加含20% FBS DMEM-F12重悬细胞调整浓度至 $1 \times 10^9/L$, 置培养瓶入37℃、5% CO₂孵箱贴壁24 h后换液, 去除未贴壁细胞, 继续培养。观察细胞呈现特异性形态后, 兔抗大鼠c-Kit蛋白多克隆抗体及次级抗体FITC结合山羊抗兔IgG抗体荧光染色后激光扫描共聚焦显微镜下观察、采集图像。

1.2.2 含药血清冻干粉的制备: Wistar大鼠(300±25 g)40只, 分为8组, 每组5只。大承气颗粒冲剂配置为100%的等效生药液(1 kg/L), 按1 mL/100 g剂量灌服药液, 每日2次, 连续给药3 d。各组动物分别于末次给药后15、30、45、60、75、90、105、120 min经股动脉穿刺取血, 分离血清; 取血浆0.5 mL, 加0.5 mL乙醚涡旋振荡混匀, 超声振荡萃取1 min, 12000 r/min离心10 min, 取有机层, 连续萃取3次, 合并有机相, 40℃水浴挥干; 60 μ L乙腈超声振荡溶解残渣, 12000 r/min离心10 min, 取上清20 μ L进样。以RP-HPLC检测血清中大承气汤有效成分大黄素、厚朴酚浓度, 绘制血药浓度曲线, 确定血药浓度峰值时间为血清样本采集时间。将采集血清样品等量分装于洁净无菌的EP管; -20℃预冻30 min后, -80℃快速冻固; 启动冷冻干燥机于-50℃下制备冻干粉; 于-20℃密闭干燥保存。同法, 正常大鼠对照组同法灌服等剂量生理盐水, 与大承气汤灌药组末次后同一时间采集血清样品, 制备正常大鼠血清冻干粉。

1.2.3 RT-PCR检测含药血清冻干粉对ICC IP₃R表达影响: 取生长状态良好, 处于对数生长期的2-3代的Wistar大鼠小肠ICC细胞, 等量接种于培养瓶, 分为空白培养液组, 含药血清高浓度组(100%含药血清DMEM-F12培养液)及低浓度组(20%含药血清DMEM-F12培养液), 待生长至80%, 以5%胎牛血清DMEM/F-12全成分培养液培养24 h, 使细胞同步化。取含药血清冻干粉

表 1 IP₃R 1、2及3型PCR扩增的寡核苷酸引物

基因类型	引物顺序	引物序列	基因位置	PCR产物大小(bp)
Type 1	S	5-GAGAGAAAGCGCACGCCGAGAGGAG-3	92-116	423
	A	5-GGACATAGCTTAAAGAGGCAGTCTC-3	490-514	
Type 2	S	5-CGGGAATTCGGAGCTTCCAACTCAAAG-3	1251-1270	390
	A	5-CACAAGCTTAGCTTCTTACC GTGGTGG-3	1604-1622	
Type 3	S	5-GGCCGGAATTCAGAGAAGATCGCCGA-3	377-391	560
	A	5-GGACGAAGCTTCTTGCCCCGGTACTC-3	900-914	
β -actin	S	5-CTACAGATCATGTTTGAGACC-3	2152-2172	441
	A	5-GAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3	2572-2592	

创新盘点

本研究应用大承气汤含药血清冻干粉作用于体外培养细胞, 排除相关因素干扰, 提高了体外中药药理实验与药物动物体内实际药物作用机制的一致性, 提高了实验可信度。

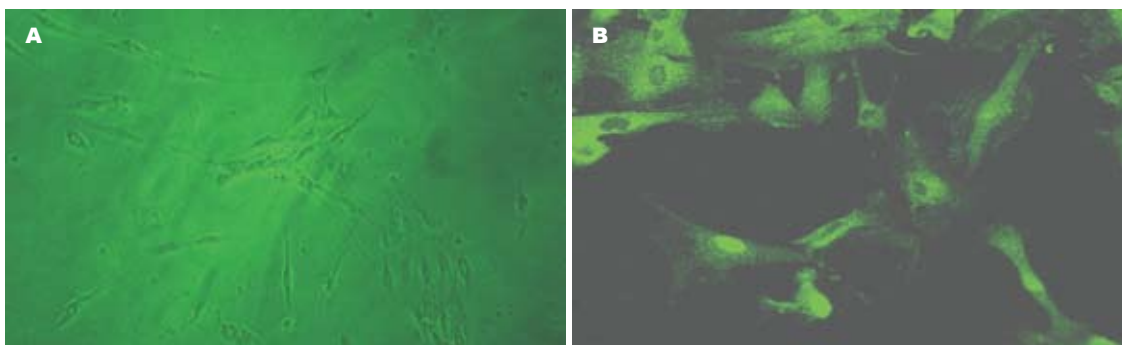


图 1 体外培养ICC图像. A: 倒置显微镜各型ICC; B: 共聚焦显微镜镜下ICC c-kit免疫荧光染色.

配制成20%及100%含药血清DMEM-F12培养液. 分别加入相应细胞培养瓶, 培养30 min. 以TRIzol试剂抽提总RNA, 紫外分光光度计测定总RNA纯度(A_{260}/A_{280})在1.8-2.0之间. 参考文献[3]报道cDNA序列(表1), 采用TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0试剂盒以总RNA为模版, Oligo(dT)为引物, 合成cDNA后进行PCR反应. PCR参数为: 94℃ 1 min, 57℃ 30 s, 72℃ 2 min, 37个循环, 72℃延伸10 min结束. PCR产物经1%琼脂糖凝胶(溴化乙啶染色)电泳, 50 bp DNA Ladder Marker, 凝胶成像系统扫描, UVP-800图像分析仪测定吸光度值, 进行半定量分析.

统计学处理 实验数据采用mean±SD表示, 组间差异显著性检验采用配对 t 检验, 由SPSS10统计学软件计算, $P<0.05$ 提示差别存在显著性.

2 结果

2.1 体外培养ICC观察 体外培养ICC形态清晰可见, 胞体呈三角形或星形, 胞核大, 胞质少, 有多个突起, 并有次级分支, ICC以突触连接形成网络; 免疫荧光染色后, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察(图1), ICC表面c-kit免疫荧光染色呈阳性, 胞体和突起均明显着色, 发出长突起与邻近ICC突起连接形成网络.

2.2 血药浓度曲线及血清样本采集时间 血药浓度曲线提示: 大黄素各时间点血药浓度有显著差别($P<0.01$), 末次给药后45 min血药浓度最高; 厚朴酚血药浓度30 min及45 min组与其他各时间点血药浓度相比有显著差别($P<0.01$); 30 min与45 min组无显著差别($P>0.05$), 血药采集时间可在末次给药后30-45 min. 综合上述结果, 血清采集时间确定于末次给药后45 min(图2).

2.3 含药动物血清对IP₃R表达影响 大鼠ICC细胞3型IP₃R均有表达(图3). 含药动物血清组较正常大鼠血清组、高浓度组较低浓度组均有显著差异($P<0.05$, 表2).

3 讨论

ICC是胃肠运动的起搏细胞, 以突起形成网络, 介导神经-平滑肌信号传导, 可产生自发节律, 沿胃肠道传递形成慢波, 驱动和调节胃肠道平滑肌舒缩活动, 并参与神经递质的调节^[4], 在胃肠运动的产生和调节中发挥重要作用, 同胃肠运动障碍密切相关^[5-6]. 对ICC的深入认识是胃肠动力学研究的重要进展.

胃肠动力学及其疾病的研究是近年来迅速发展起来的新兴学科, 研究表明多种内外科疾

应用要点

本实验结果表明,大承气汤动物含药血清可显著增强大鼠ICC内IP₃R表达,并存在量效依赖关系。从细胞内钙库动员的分子机制的角度对通里攻下方剂在胃肠动力学中的作用研究作出了探索。

表 2 IP₃R mRNA相对量表达 (n = 5)

分组	IP ₃ R1/β-actin	IP ₃ R2/β-actin	IP ₃ R3/β-actin
正常大鼠血清对照组	0.389 ± 0.034	0.335 ± 0.021	0.378 ± 0.037
低浓度含药动物血清组	0.625 ± 0.075 ^a	0.476 ± 0.031 ^a	0.583 ± 0.046 ^a
高浓度含药动物血清组	1.012 ± 0.129 ^{ac}	0.813 ± 0.098 ^{ac}	0.924 ± 0.113 ^{ac}

^aP<0.05 vs 正常大鼠血清对照组; ^cP<0.05 vs 低浓度含药动物血清组。

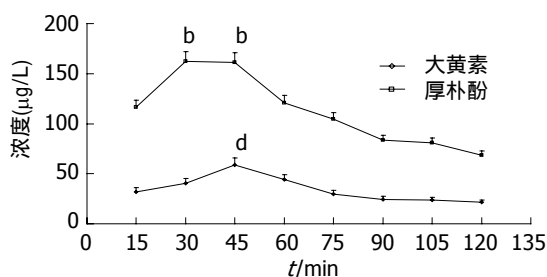


图 2 血药浓度曲线。 ^bP<0.01 vs 其他各组; ^dP<0.01 vs 其他各组。

病和胃肠运动功能障碍密切相关^[7]。近年来多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的防治研究热点已经转移至消化系,胃肠道被认为是促发和(或)加重严重创伤、休克、感染后全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和MODS的重要靶位之一^[8]。

通里攻下法属于中医八大治则之下法,大承气汤为通里攻下法中寒下法的代表方剂。现代医学主要应用于梗阻性疾病、腹膜炎和血运障碍性腹部疾病。临床证实,其对腹膜炎和腹部术后胃肠运动功能恢复具有良好的效果^[9-10]。

既往研究表明MODS可引起胃肠运动障碍,损伤ICC功能^[11-12]。大承气汤可通过改善ICC功能来增强胃肠蠕动,有效治疗MODS胃肠运动障碍^[13]。电镜观察病理切片发现MODS可引起ICC的超微结构显著改变,大承气汤可通过保护和维持ICC的正常形态结构,改善胃肠功能。进一步用Fluo-3作为Ca²⁺标记的荧光探针共聚焦显微镜观察大承气汤之君药大黄的有效成分-大黄素对ICC胞内Ca²⁺的影响,发现大黄素可通过增加细胞内Ca²⁺的浓度,促进信号传导,加强胃肠运动^[14]。

中药的血清药理学用含药血清进行体外实验,通过研究含药动物血清的生物学活性来揭示药物作用机制,是目前中药体外药理学实验的较好方法之一^[15]。不仅反映药物中可吸收部分的直接作用,且能反映药物成分在机体作用下

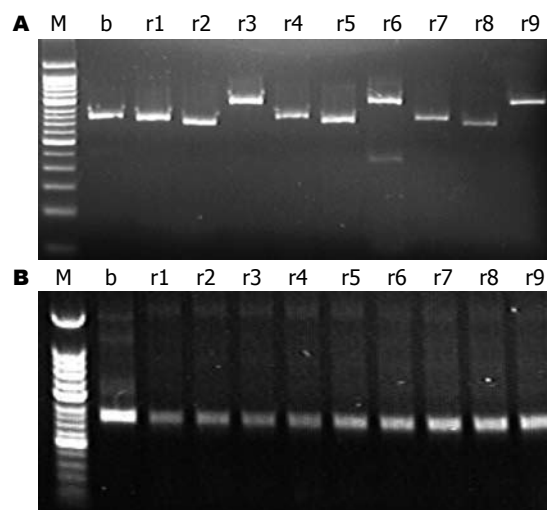


图 3 大鼠ICC细胞3型IP₃R表达。A: r1-r2: 高浓度组1-3型IP₃R; r4-r6: 低浓度组1-3型、r7-r9: 正常血清组1-3型IP₃R; B: r1-r9: 各组对应β-actin。M: Marker; b: β-actin空白对照组。

形成的代谢产物和药物诱生的机体内源性活性物质的间接效应,有利于发现中药复方中真正有效成分和有效部位,为药物的进一步开发提供依据。能正确反映药物在体内的生物转化过程及产生的药理效应。

我们大承气汤含药血清冻干粉的制备,选用广泛运用的Wistar大鼠,有易获得、饲养容易、取血方便、与人类生物学特性近似的优点。以含药血清代替含药血清,更接近中药有效成分在体内的真实过程。避免凝血过程造成的药物有效成分的损失,内源生物活性物质(特别是蛋白质与肽类)的降解而降低或丧失药效;同时也避免凝血过程伴生相关反应及物质对实验结果的干扰。采用冷冻干燥技术制备含药血清冻干粉,排除温度、空气氧化、自身代谢分解等因素的影响,可最大限度保存含药血清内药物有效成分及激活机体产生的内源性生物活性物质;提高了体外中药药理实验与体内实际药物作用机制的一致性实验可信度,实现体外中药药理实验的稳定化、连续化。

ICC起搏电位的产生与细胞膜钙活化氯通道、电压依赖性钙通道和细胞内钙离子浓度密切相关^[16-17]。细胞内钙库对细胞内钙离子浓度的调节起着重要的作用, 细胞内钙离子释放激活细胞膜上钙离子活化离子通道而形成动作电位。ICC内质网钙库细胞器膜上存在IP₃R和RyR两大主要受体依赖型Ca²⁺释放通道。IP₃R、RyR介导周期性Ca²⁺释放决定Ca²⁺振荡节律, 与ICC自发节律密切相关^[5]。

总之, 本实验结果表明, ICC内3型IP₃R均有表达, 大承气汤动物含药血清可显著增强大鼠ICC IP₃R表达, 并呈量效依赖关系。结合既往研究, 大承气汤可能通过增强ICC内质网钙库细胞器膜上IP₃R mRNA表达, 可能为大承气汤增强内质网钙库细胞器膜上IP₃R受体依赖型Ca²⁺释放通道对细胞内钙库的动员能力的机制之一。

4 参考文献

- 1 李春穴, 董卫东, 刘宝华. 大黄素对体外培养Cajal间质细胞钙离子振荡功能的影响. 结直肠肛门外科 2006; 1: 2-4
- 2 刘勇, 齐清会. 大鼠胃间质细胞的分离和培养. 世界华人消化杂志 2005; 13: 495-498
- 3 Lee B, Bradford PG, Laychock SG. Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform mRNA expression and regulation in rat pancreatic islets, RINm5F cells and betaHC9 cells. *J Mol Endocrinol* 1998; 21: 31-39
- 4 Camborová P, Hubka P, Sulková I, Hulín I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiol Res* 2003; 52: 275-284
- 5 Jain D, Moussa K, Tandon M, Culpepper-Morgan J, Proctor DD. Role of interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 618-624
- 6 龙庆林, 房殿春. 胃肠道Cajal细胞的功能及其相关疾病. 世界华人消化杂志 2002; 10: 352-355
- 7 Hirst GD, Edwards FR. Role of interstitial cells of Cajal in the control of gastric motility. *J Pharmacol Sci* 2004; 96: 1-10
- 8 Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15: 1-10
- 9 齐清会, 王简, 回建峰, 江力, 吴咸中. 大承气汤和针刺治疗胃肠运动功能障碍疾病的研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 129-132
- 10 刘勇, 齐清会. MODS肠运动障碍机制和大承气冲剂的治疗作用. 中国中西医结合外科杂志 2004; 10: 430-433
- 11 李宇航, 王庆国, 陈萌, 杨美娟, 赵丽云, 李丽娜, 张冬梅, 王丹. 大鼠胃电节律失常模型胃间Cajal间质细胞含量的变化. 世界华人消化杂志 2004; 12: 639-641
- 12 刘勇, 齐清会. 多器官功能障碍综合征时胃肠Cajal间质细胞形态学的变化. 中华急诊医学杂志 2007; 16: 241-243
- 13 刘勇, 齐清会. 大承气冲剂治疗对多器官功能不全综合征胃肠Cajal间质细胞形态学影响. 中国中西医结合外科杂志 2007; 13: 51-54
- 14 马涛, 齐清会, 简序, 费乃昕. 大黄素对大鼠结肠环行平滑肌细胞[Ca²⁺]_i的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1699-1702
- 15 王筠, 张军平. 中药血清药理学实验方法研究概况. 天津中医药 2005; 22: 86-88
- 16 Kito Y, Suzuki H. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J Smooth Muscle Res* 2003; 39: 163-173
- 17 Aoyama M, Yamada A, Wang J, Ohya S, Furuzono S, Goto T, Hotta S, Ito Y, Matsubara T, Shimokata K, Chen SR, Imaizumi Y, Nakayama S. Requirement of ryanodine receptors for pacemaker Ca²⁺ activity in ICC and HEK293 cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 2813-2825

同行评价

本文立意新颖, 技术路线较先进. 研究结果图像清晰, 论据较充分, 为中药对胃肠动力疾病作用的研究提供了基础理论支持。

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 *et al*”的右上角注角码; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括《世界华人消化杂志》(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和*World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

贵州省幽门螺杆菌临床菌株的分离培养

胡林, 刘苓, 谭庆华, 周力, 陈峥宏, 刘娅琳

背景资料
*H. pylori*是感染率最高的细菌之一。我国*H. pylori*感染约50%, 贵州省作为欠发达的多民族聚集地,*H. pylori*感染率高达60%; 同时,*H. pylori*耐药越来越严重, 根除难度越来越大,*H. pylori*的研究急迫且重要。*H. pylori*的分离培养为深入研究奠定了重要基础。

胡林, 刘苓, 谭庆华, 周力, 刘娅琳, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550004
陈峥宏, 贵阳医学院基础医学院 贵州省贵阳市 550004
贵州省优秀科技教育人才省长专项资金资助项目, No. 2008-94
作者贡献分布: 胡林与刘苓对此文所作贡献均等; 此课题由刘苓设计; 研究过程由谭庆华、胡林及刘娅琳操作完成; 研究所用仪器及分析工具等由陈峥宏与胡林提供; 数据分析由刘苓与胡林完成; 本论文写作由胡林完成与刘苓审核修改; 课题设计与论文完成由周力指导。
通讯作者: 刘苓, 副教授, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院消化内科。lingzipurple@163.com
电话: 0851-6774245
收稿日期: 2009-07-18 修回日期: 2009-08-30
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-09-28

Isolation and culture of clinical strains of *Helicobacter pylori* from patients in Guizhou Province

Lin Hu, Ling Liu, Qing-Hua Tan, Li Zhou, Zheng-Hong Chen, Ya-Lin Liu

Lin Hu, Ling Liu, Qing-Hua Tan, Li Zhou, Ya-Lin Liu, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Zheng-Hong Chen, School of Basic Medical Sciences, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Special Fund of the Governor of Guizhou Province for Excellent Scientific, Technological and Educational Talents, No. 2008-94

Correspondence to: Professor Ling Liu, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. lingzipurple@163.com

Received: 2009-07-18 Revised: 2009-08-30

Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To isolate and culture the clinical strains of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) from patients in Guizhou Province, and to determine the clinical features of patients from whom *H. pylori* strains were isolated and cultured successfully.

METHODS: Ninety-eight patients suffering from upper gastrointestinal symptoms underwent antral biopsy for isolation and culture of *H. pylori* strains. The ethnic group, disease, age, gender, and family history of gastritis or *H. pylori* were compared among patients who were positive for *H. pylori*.

RESULTS: The total positive rate of *H. pylori* was 38% (37/98). No significant difference was noted in the positive rate of *H. pylori* between Han ethnic patients 36% (29/80) and other minority ethnic patients (36% vs 44%, $P > 0.05$). However, the positive rate of *H. pylori* in Miao ethnic patients was significantly higher than that in Han ethnic patients ($P < 0.05$). The positive rates of *H. pylori* in patients with erosive gastritis (39%, 11/28) and peptic ulcer (46%, 24/52) were significantly higher than that in patients suffering from gastritis or gastric cancer (both $P < 0.05$). The positive rate of *H. pylori* was significantly higher in patients aged 30-60 years than in patients aged 60-80 years (45% vs 21%, $P < 0.05$). The positive rate of *H. pylori* was significantly higher in male patients than in female ones (48% vs 24%, $P < 0.05$). No significant difference was noted in the positive rate of *H. pylori* between patients with and without a family history of gastritis.

CONCLUSION: This study represents the first successful isolation and culture of clinical strains of *H. pylori* from patients in Guizhou province, which provides a basis for future basic and clinical research of *H. pylori* infection in this area.

Key Words: Guizhou province; *Helicobacter pylori*; Isolation and culture

Hu L, Liu L, Tan QH, Zhou L, Chen ZH, Liu YL. Isolation and culture of clinical strains of *Helicobacter pylori* from patients in Guizhou Province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2830-2834

摘要

目的: 分离培养贵州省幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)的临床菌株, 并探讨临床菌株成功分离培养患者的一般资料。

方法: 收集因上消化道症状就诊于我院行胃镜检查的患者98例, 取胃窦黏膜经转运、接种、培养、鉴定、传代、增菌及分离培养*H. pylori*. 分析比较*H. pylori*培养阳性患者在不同民族、取材部位、病种、性别及有无胃炎家族史等差异。

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

结果: 98例患者37例分离出*H pylori*临床菌株, 阳性率38%。汉族标本培养阳性率为36%, 少数民族标本为44%, 2组无显著差异。其中苗族组培养阳性率为100%(4/4), 与汉族组比较显著升高($P<0.05$)。慢性胃炎伴糜烂及消化性溃疡患者培养阳性率分别为39%(11/28)、46%(24/52), 较单纯胃炎及胃癌患者显著增高(均 $P<0.05$)。30-60岁年龄段培养阳性率较60-80岁显著升高(45% vs 21%, $P<0.05$)。男性患者培养阳性率较女性显著提高(48% vs 24%, $P<0.05$)。有胃炎家族史患者培养阳性率与无胃炎家族史患者比较无显著差异。

结论: 本研究系我省首次成功分离出*H pylori*临床菌株, 为贵州省*H pylori*基础及临床的研究奠定了基础。

关键词: 贵州省; 幽门螺杆菌; 分离培养

胡林, 刘苓, 谭庆华, 周力, 陈峰宏, 刘娅琳. 贵州省幽门螺杆菌临床菌株的分离培养. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2830-2834
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2830.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是定植于胃黏膜中的一种革兰氏阴性微需氧菌, 其感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤密切相关^[1-4]。近年来的研究表明, *H pylori*与许多胃肠外疾病如心血管疾病、肝胆疾病、血液系统疾病、皮肤疾病、口腔疾病、免疫与代谢性疾病等20余种疾病的发病亦相关^[5-7]。*H pylori*感染呈世界性分布, 与国民经济水平密切相关, 发展中国家高于发达国家。我国是发展中国家, 贵州省相对经济落后, 流行病学研究提示我国约50%、我地区约60%^[8-9]的人群*H pylori*感染阳性。故*H pylori*的研究在我省具有迫切性及必要性, *H pylori*的基础及临床致病性研究依赖于临床菌株的成功分离培养。本研究在我省首次分离培养*H pylori*临床菌株, 并探讨临床菌株成功分离培养患者的一般资料, 以期为我省*H pylori*相关性疾病的研究开辟出新的天地。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-2009年因上消化系症状就诊于我院行胃镜检查的患者98例, 其中男56例, 女42例, 年龄为20-78(平均50.02)岁。微需氧培养罐(Mitsubishi, Japan)、恒温培养箱、超净化工作

台、微需氧产气袋(850 mL/L N₂, 100 mL/L CO₂, 50 mL/L O₂)(Mitsubishi, Japan)、哥伦比亚琼脂(Sigma, USA)、布氏肉汤基础、*H pylori*培养添加剂(Sigma, USA)、尿素酶试纸(天和微生物试剂有限公司, 杭州)、脱纤维绵羊血(友康生物科技有限公司, 北京)、绵羊血(采自本院绵羊)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与转运: 胃镜下于胃窦部用无菌活检钳(用750 mL/L乙醇火烧灭菌, 冷却处理)钳取黏膜组织, 将组织取下置于装0.2 mL *H pylori*转送液(布氏肉汤)EP管中, 常温2 h内送往我院微生物学教研室进行分离。

1.2.2 接种: 在试验室内将转送来的组织用高压灭菌组织剪在离心管中剪碎, 然后用吸管吸取1-2滴匀浆液滴于固体培养基(4.2 g哥伦比亚琼脂粉加入100 mL去离子水, 配成100 mL哥伦比亚琼脂, 经高压灭菌后加入2.5 mL *H pylori*添加剂及7-10 mL脱纤维绵羊血, 倒入平板, 冷却后制成固体培养基)上, 用L型玻棒或接种环涂开。

1.2.3 培养并鉴定: 将培养平板置于37℃微需氧环境(装有产气袋的微需氧培养罐)中进行培养, 接种3 d后观察分离效果。并对细菌进行鉴定: (1)观察细菌形态: 划线接种的*H pylori*菌落呈透明针尖样(直径1-2 mm)透明菌落^[10], 菌落数可能较少(甚至每块板只有1个), 需仔细对光观察以免遗漏; L棒接种菌量大时, 菌落在培养板表面融合成1层半透明的菌苔。(2)制作湿涂片: 滴1滴生理盐水于干净载玻片上, 用接种环刮取少许固体培养菌苔在生理盐水中涂开。湿涂片烘干后进行常规Gram染色, 普通显微镜下观察。典型的*H pylori*涂片染色镜检呈Gram阴性海鸥状、S状弯曲菌或短杆菌, 除可见到以上典型形态外还可见到球形体、长丝体等*H pylori*形态变异体, 均为Gram阴性染色。动力好的细菌可观察到典型的钻探样运动。(3)生化鉴定: 尿素酶: 刮取一环细菌置入尿素酶试纸条上, 37℃, 阳性者约1 min后, 试剂应变成红色或紫红色。

1.2.4 传代与增菌: 如培养平板中含有杂菌, 采用分区划线分离单个菌落, 再选取传代培养后的纯化*H pylori*菌落或分纯后的单个菌落, 采用密集划线法接种, 进行增菌培养。

1.2.5 保存: 用接种环挑取经革兰染色及生化鉴定已证实的*H pylori*良好菌落, 用脱纤维绵羊血低温液态保存, 将固体培养基中细菌用接种环刮取放置在2 mL菌种管(5 mL脱纤维绵羊血)中, 每管置入2-3环细菌。因*H pylori*菌落保存后复苏

研发前沿
*H pylori*临床菌株的分离培养作为*H pylori*感染诊断和治疗的基础研究, 受到国内外研究人员广泛关注, 成为根治*H pylori*的热点之一。

相关报道
陆华 *et al*采用细菌培养法及快速尿素酶法从消化系统疾病患者胃黏膜活检标本成功检测出*H pylori*, 同时采用哥伦比亚血琼脂培养基培养标本, *H pylori*阳性率达50%。杂菌生长率较低。王桂月 *et al*认为尿素酶试验简便实用, 快速灵敏; 细菌培养法分离培养技术条件较高, 需要一定的培养时间, 但是能直接证明*H pylori*的存在, 且无假阳性出现, 同时可作为药敏试验, 对不同菌株作遗传因子研究。

创新盘点

本研究采用可靠、简易的划线接种法和细菌培养法,在贵州省首次成功分离出 *H. pylori* 临床菌株,为贵州省 *H. pylori* 的基础及临床研究奠定了基础。

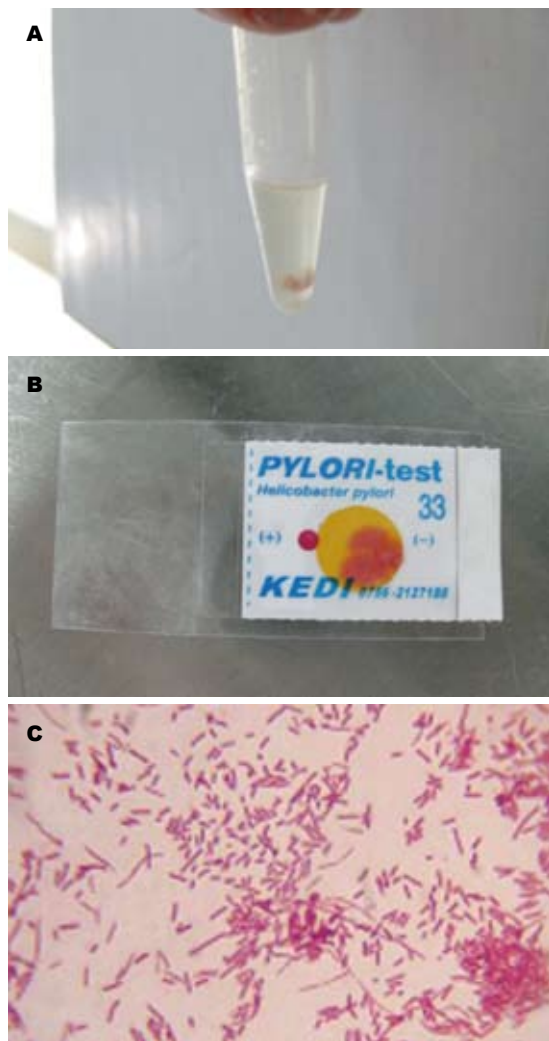


图1 *H. pylori* 转运及鉴定。A: 转运; B: 尿素酶试验; C: *H. pylori* 染色。

成功率极低,为提高复苏率,故1株菌至少保存3管,迅速将菌落放置到-80℃冰箱中保存^[11]。

统计学处理 数据使用SPSS16.0统计软件 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为具有显著性差别。

2 结果

2.1 *H. pylori* 阳性率 本次研究共采集98例临床标本,其中37例分离培养结果为阳性,阳性率为38%。转运及鉴定过程如图1。

2.2 不同民族 *H. pylori* 培养阳性率 汉族组标本培养80例,阳性29例,阳性率36%;少数民族组标本培养18例,阳性8例,阳性率为44%。少数民族组与汉族组,2者无显著差异。其中苗族组培养阳性率与汉族组比较显著升高($P<0.05$,表1)。

2.3 不同病种 *H. pylori* 培养阳性率 患慢性胃炎伴糜烂及消化性溃疡患者培养阳性率较单纯胃炎、胃癌患者显著升高(均 $P<0.05$),慢性胃炎伴糜烂及消化性溃疡患者2者间无明显差异(表2)。

表1 不同民族 *H. pylori* 培养阳性率 (%)

分组	<i>H. pylori</i> (+)	<i>H. pylori</i> (-)
汉族	36	64
苗族	100	0
布依族	33	67
土家族	33	67
白族	33	67
侗族	0	100
少数民族	44	56

表2 不同病种 *H. pylori* 培养阳性率 (%)

分组	<i>H. pylori</i> (+)	<i>H. pylori</i> (-)
慢性胃炎	0	100
十二指肠炎	33	67
慢性胃炎伴糜烂	39	61
消化性溃疡	46	54
胃癌	0	100

表3 不同年龄组 *H. pylori* 培养阳性率 (%)

不同年龄组(岁)	<i>H. pylori</i> (+)	<i>H. pylori</i> (-)
20-30	36	64
31-40	42	58
41-50	57	43
51-60	37	63
61-70	13	87
71-80	33	67

2.4 不同年龄组 *H. pylori* 培养阳性率 30-60年龄段较60-80岁培养阳性率显著增高,培养阳性率分别为45%、21%($P<0.05$),2者与20-30年龄段相比较均无差异性(表3)。

2.5 不同性别 *H. pylori* 培养阳性率 男性病例培养56例,阳性27例,阳性率为48%;女性病例培养42例,阳性10例,阳性率为24%。男性病例培养阳性率较高($P<0.05$)。

2.6 有无胃炎家族史 *H. pylori* 培养阳性率 有胃炎家族史标本培养25例,阳性9例,阳性率为36%;无胃炎家族史标本培养73例,阳性28例,阳性率为38%,两者无显著差异。

3 讨论

H. pylori 临床菌株的分离培养是诊断 *H. pylori* 感染的“金标准”^[12-13],亦是 *H. pylori* 基础及临床研究的一项基本技术。成功分离培养的临床菌

应用要点

H. pylori 的分离培养作为 *H. pylori* 感染研究的基础,在基础研究中可以进一步研究不同临床菌株的特性及基因型;在临床上可用于探讨耐药问题及指导临床治疗。

株可用于细菌分型、致病机制研究、构建动物模型、开发免疫疫苗及确定致病因子等基础研究; 亦可用于*H pylori*的常规诊断、评价新的诊断方法、体外药敏实验等^[14]。本研究对我省98例上消化系疾病患者的胃黏膜进行*H pylori*培养, 取材部位为胃窦, 成功分离38例*H pylori*临床菌株, 阳性率为38%。在我省首次成功分离出*H pylori*临床菌株, 对我省*H pylori*相关性疾病的基础及临床研究具有重要意义。

为了提高*H pylori*的培养阳性率, 我们前期的预实验显示*H pylori*培养过程中需注意以下环节: (1)抑制杂菌的生长: 取材过程中, 需要保证取材工具如一次性活检钳、镊子、转送液的无菌; 胃中过路的或寄生的杂菌较多, 在转送液或培养基中需加入选择性的抑菌剂; (2)转送过程中, 常温下标本由内镜室转送到实验室过程不能超过3-4 h, 时间太长或温度过高可能导致细菌死亡; (3)接种标本时, 剪材用的剪刀在火烧灭菌时应冷却后再剪碎标本, 如果温度太高亦会影响培养阳性率; (4)商品化的产气袋与普通的抽气换气法相比较, 可以明显提高培养阳性率, 且方便操作; (5)培养基: 我们加入*H pylori*培养添加剂的固体培养基^[15-16], 经济实惠; (6)培养时间: 本研究认为*H pylori*的最佳培养时限是3 d, 这时菌落的肉眼形态与镜下菌体形态均很典型, 细菌处于对数生长期, 可以进行传代、保存或药物敏感性试验等研究。约5 d后细菌开始有球形变, 延长培养至7 d时, 由于培养基老化、营养成分缺失等原因, *H pylori*形态呈球形变, 且低温保存后难以复苏成功。

在方法学成功培养*H pylori*的基础上, 我们进一步探讨了成功分离培养*H pylori*临床菌株与入选患者病种、年龄、性别、取材部位、家族史的相关性, 以期后期工作中通过病例选择进一步提高*H pylori*临床菌株的分离培养阳性率, 并探讨*H pylori*感染与上述因素的相关性。

*H pylori*感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤密切相关^[17-18]。本研究亦证实慢性胃炎伴糜烂及消化性溃疡患者培养阳性率较单纯胃炎、胃癌患者显著升高($P<0.05$), 胃炎伴糜烂及消化性溃疡患者2者间无差异。提示*H pylori*培养阳性率随胃炎严重程度而升高。

大量研究发现, *H pylori*感染存在地区、种族、社会经济差异^[19-21]。本研究结果提示苗族组培养阳性率与汉族组比较显著升高($P<0.05$)。贵

州地区是少数民族聚居区, 其中以苗族为主要代表, 4名苗族患者*H pylori*感染全部呈阳性, 这说明我地区*H pylori*感染除受到环境因素影响外, 亦可能与苗族遗传素质或基因型有关, 尚需进一步增加样本例数观察。

*H pylori*与性别、年龄的关系, 全世界报告各不相同^[22-24]。我地区以往缺乏*H pylori*感染与患者性别相关性的研究。本研究提示男性*H pylori*的阳性率远高于女性的阳性率, 这可能与我地区男性患者的某些生活习惯或遗传素质有关, 尚需进一步研究。我们的研究亦显示, 30-60岁年龄段*H pylori*阳性率较60-80岁者显著升高, 培养阳性率分别为45%、21%($P<0.05$), 这可能与老年人免疫功能减退有关。值得注意的是40岁左右的*H pylori*感染较其他年龄段明显升高, 因此*H pylori*感染临床菌株监测、疫苗预防或治疗干预可重点在男性40岁左右的患者。

目前认为, *H pylori*感染往往有家族聚集性^[25-26], 其原因一方面是由于致病性*H pylori*可通过粪口或口口途径在家庭内传播^[27-29]; 另一方面是宿主或菌种某些基因型有利于*H pylori*的定植^[30]。我们的研究提示有无胃炎家族史*H pylori*培养阳性率无明显差别, 提示我地区*H pylori*感染的主要途径除家庭内传播外, 地区、种族、社会经济差异在我省*H pylori*感染中占有重要的地位。

总之, 本研究在我省首次成功分离出*H pylori*临床菌株, 苗族、慢性胃炎伴糜烂及消化性溃疡患者、青壮年、男性患者培养阳性率显著提高。

4 参考文献

- Asenjo LM, Gisbert JP. [Prevalence of Helicobacter pylori infection in gastric MALT lymphoma: a systematic review] *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 398-404
- Egi Y, Ito M, Tanaka S, Imagawa S, Takata S, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Role of Helicobacter pylori infection and chronic inflammation in gastric cancer in the cardia. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 365-369
- Araújo-Filho I, Brandão-Neto J, Pinheiro LA, Azevedo IM, Freire FH, Medeiros AC. Prevalence of Helicobacter pylori infection in advanced gastric carcinoma. *Arq Gastroenterol* 2006; 43: 288-292
- Gisbert JP. [Helicobacter pylori-related diseases: dyspepsia, ulcer and gastric cancer] *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31 Suppl 4: 18-28
- Izzotti A, Durando P, Ansaldi F, Gianiorio F, Pulliero A. Interaction between Helicobacter pylori, diet, and genetic polymorphisms as related to non-cancer diseases. *Mutat Res* 2009; 667: 142-157
- Isomoto H, Kawazoe K, Inoue K, Kohno S. Usefulness of the immunological rapid urease test for detection of Helicobacter pylori in patients who

名词解释
划线接种法: 为最常用的分离培养细菌的方法, 通过平板划线后, 可使细菌分散生长, 形成单个菌落, 有利于从含有多种细菌的标本中分离出目的菌。他包含分区划线法和连续划线法。

同行评价

本文研究是贵州省首次成功分离出*H pylori*临床菌株,为贵州及其他地方关于*H pylori*基础及临床研究提供了重要信息和技术参考。

- are reluctant to undergo endoscopic biopsies. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2302-2305
- 7 Yang CS, Cao SY, He XJ, Wang YX, Zhang YL. [Study of correlation between helicobacter pylori infection and hyperammonemia and hepatic encephalopathy in cirrhotic patients] *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 2007; 19: 422-424
- 8 Tarkhashvili N, Beriashvili R, Chakvetadze N, Moistsrapishvili M, Chokheli M, Sikharulidze M, Malania L, Abazashvili N, Jhorjholiani E, Chubinidze M, Ninashvili N, Zardiashvili T, Gabunia U, Kordzaia D, Imnadze P, Sobel J, Guarnier J. Helicobacter pylori infection in patients undergoing upper endoscopy, Republic of Georgia. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 504-505
- 9 卢平, 周力, 张永宏. 贵阳市老年人幽门螺杆菌感染及影响因素分析. *中国公共卫生* 2007; 3: 268-269
- 10 Ohno H, Murano A. Serum-free culture of *H pylori* intensifies cytotoxicity. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 532-537
- 11 Graham DY, Kudo M, Reddy R, Opekun AR. Practical rapid, minimally invasive, reliable nonendoscopic method to obtain Helicobacter pylori for culture. *Helicobacter* 2005; 10: 1-3
- 12 Yin Y, He LH, Zhang JZ. Successful isolation of Helicobacter pylori after prolonged incubation from a patient with failed eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1528-1529
- 13 Koido S, Odahara S, Mitsunaga M, Aizawa M, Itoh S, Uchiyama K, Komita H, Satoh K, Kuniyasu Y, Yamane T, Ohkusa T. [Diagnosis of Helicobacter pylori infection: comparison with gold standard] *Rinsho Byori* 2008; 56: 1007-1013
- 14 Schreiber S, Bucker R, Groll C, Azevedo-Vethacke M, Garten D, Scheid P, Friedrich S, Gattermann S, Josenhans C, Suerbaum S. Rapid loss of motility of Helicobacter pylori in the gastric lumen in vivo. *Infect Immun* 2005; 73: 1584-1589
- 15 Vega AE, Cortiñas TI, Mattana CM, Silva HJ, Puig De Centorbi O. Growth of Helicobacter pylori in medium supplemented with cyanobacterial extract. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5384-5388
- 16 Walsh EJ, Moran AP. Influence of medium composition on the growth and antigen expression of Helicobacter pylori. *J Appl Microbiol* 1997; 83: 67-75
- 17 Backert S, Schwarz T, Miehlke S, Kirsch C, Sommer C, Kwok T, Gerhard M, Goebel UB, Lehn N, Koenig W, Meyer TF. Functional analysis of the cag pathogenicity island in Helicobacter pylori isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun* 2004; 72: 1043-1056
- 18 Machado AM, Figueiredo C, Touati E, Máximo V, Sousa S, Michel V, Carneiro F, Nielsen FC, Seruca R, Rasmussen LJ. Helicobacter pylori infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2995-3002
- 19 Goh KL, Parasakthi N. The racial cohort phenomenon: seroepidemiology of Helicobacter pylori infection in a multiracial South-East Asian country. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 177-183
- 20 Song MJ, Park DI, Hwang SJ, Kim ER, Kim YH, Jang BI, Lee SH, Ji JS, Shin SJ. [The prevalence of Helicobacter pylori infection in Korean patients with inflammatory bowel disease, a multicenter study] *Korean J Gastroenterol* 2009; 53: 341-347
- 21 Seyda T, Derya C, Fusun A, Meliha K. The relationship of Helicobacter pylori positivity with age, sex, and ABO/Rhesus blood groups in patients with gastrointestinal complaints in Turkey. *Helicobacter* 2007; 12: 244-250
- 22 Yücel O, Sayan A, Yildiz M. The factors associated with asymptomatic carriage of Helicobacter pylori in children and their mothers living in three socio-economic settings. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 120-124
- 23 Kanbay M, Gür G, Arslan H, Yilmaz U, Boyacioglu S. The relationship of ABO blood group, age, gender, smoking, and Helicobacter pylori infection. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1214-1217
- 24 马东礼, 孙丽芳. 幽门螺杆菌感染与性别和年龄关系的试验探讨. *检验医学与临床* 2007; 12: 1177-1178
- 25 Goodman KJ, Correa P. Transmission of Helicobacter pylori among siblings. *Lancet* 2000; 355: 358-362
- 26 Wan Y, Xu YY, Xue FB, Fan DM. [Meta-analysis on Helicobacter pylori infection between sex and in family assembles] *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2003; 24: 54-57
- 27 Weyermann M, Rothenbacher D, Brenner H. Acquisition of Helicobacter pylori infection in early childhood: independent contributions of infected mothers, fathers, and siblings. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 182-189
- 28 Kurtaran H, Uyar ME, Kasapoglu B, Turkay C, Yilmaz T, Akcay A, Kanbay M. Role of Helicobacter pylori in pathogenesis of upper respiratory system diseases. *J Natl Med Assoc* 2008; 100: 1224-1230
- 29 Salih BA. Helicobacter pylori infection in developing countries: the burden for how long? *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15: 201-207
- 30 Qiao W, Hu JL, Xiao B, Wu KC, Peng DR, Atherton JC, Xue H. cagA and vacA genotype of Helicobacter pylori associated with gastric diseases in Xi'an area. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1762-1766

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

胃食管反流病患者食管上皮Occludin的表达及细胞间隙的改变

徐兆军, 张振玉, 黄文斌, 王劲松, 姜宗丹, 罗新华

徐兆军, 张振玉, 黄文斌, 王劲松, 姜宗丹, 罗新华, 南京医科大学附属南京第一医院消化科 江苏省南京市 210006
作者贡献分布: 徐兆军与张振玉对此文贡献均等; 此课题由张振玉与徐兆军设计完成, 研究过程由徐兆军、黄文斌、王劲松、姜宗丹及罗新华完成; 研究经费由张振玉提供; 数据分析由徐兆军与张振玉完成; 论文写作由徐兆军与张振玉完成。
通讯作者: 张振玉, 主任医师, 210006, 江苏省南京市长乐路68号, 南京医科大学附属南京第一医院消化科。
ahwangzhibing776@163.com
电话: 025-52271260
收稿日期: 2009-05-02 修回日期: 2009-09-10
接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-09-28

Expression of tight junction protein occludin and changes in intercellular space in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease

Zhao-Jun Xu, Zhen-Yu Zhang, Wen-Bin Huang, Jin-Song Wang, Zong-Dan Jiang, Xin-Hua Luo

Zhao-Jun Xu, Zhen-Yu Zhang, Wen-Bin Huang, Jin-Song Wang, Zong-Dan Jiang, Xin-Hua Luo, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Zhen-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 450014, Jiangsu Province, China. ahwangzhibing776@163.com
Received: 2009-05-02 Revised: 2009-09-10
Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate the distribution and expression of tight junction protein occludin and observe changes in intercellular space in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD).

METHODS: Sixty-two GERD patients (30 cases of reflux esophagitis (RE) and 32 cases of non-erosive reflux disease (NERD) and 10 non-GERD patients were included in the study. Immunohistochemistry was used to examine the distribution and expression of occludin in the esophageal epithelium in these patients. The stained

sections were observed and photographed under light microscopy. The intercellular space in the esophageal epithelium was measured by computer-assisted morphometry. One hundred measurements were performed in each case to calculate the mean intercellular space diameter.

RESULTS: Occludin was distributed continuously in the cell membrane in normal esophageal epithelium. Of 32 NERD patients, 4 showed normal occludin expression, and 28 showed varying degrees of aberrant occludin expression (e.g., incomplete membrane expression, cytoplasmic expression and expression loss). In contrast, all RE patients showed aberrant occludin expression. The rates of aberrant occludin expression in NERD and RE patients were significantly higher than that in non-GERD patients (both $P < 0.01$). No significant difference was observed in the rate of aberrant occludin expression between RE and NERD patients ($P > 0.05$). The mean intercellular space diameters in NERD and RE patients were significantly higher than that in non-GERD patients ($1.38 \pm 0.26 \mu\text{m}$ and $1.51 \pm 0.31 \mu\text{m}$ vs $0.77 \pm 0.12 \mu\text{m}$, respectively; both $P < 0.01$). No significant difference was noted in the mean intercellular space diameter between RE and NERD patients ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Occludin shows diminished expression and altered distribution in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease. Aberrant expression of occludin may result in dilated intercellular space and impair the integrity of mucosal epithelial barrier, which may partly explain the pathogenesis of GERD.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Tight junction protein; Dilated intercellular space; Immunohistochemistry; Light microscopy

Xu ZJ, Zhang ZY, Huang WB, Wang JS, Jiang ZD, Luo XH. Expression of tight junction protein occludin and changes in intercellular space in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2835-2839

背景资料
胃食管反流病是消化系常见病之一, 目前所知临床发病机制主要是下食管括约肌一过性松弛, 进一步的机制并不是很确切。临床上分为反流性食管炎(RE)、非糜烂性胃食管反流病(NERD)及Barrett's食管。

同行评议者
潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

相关报道

Calabrese的研究显示,伴有病理性酸反流NERD患者,经质子泵抑制剂(PPI)治疗后随着症状的消失其DIS亦恢复正常。谷仲平 *et al* 研究发现,GERD患者食管黏膜上皮细胞间隙明显增大,而内镜下黏膜正常与黏膜异常的GERD患者细胞间隙无明显差异。

摘要

目的: 研究胃食管反流病(GERD)患者食管上皮细胞紧密连接蛋白Occludin表达的变化及食管上皮细胞间隙的改变。

方法: 采用免疫组织化学法检测62例GERD患者[其中反流性食管炎(RE组)患者30例,非糜烂性反流病(NERD组)患者32例]及10例正常对照食管下段上皮的紧密连接蛋白Occludin表达,并在光镜下观察切片并采集图像,采用图像分析系统对每例切片测量100个细胞间隙,进行统计学分析。

结果: 10例正常对照组Occludin呈正常连续的细胞膜表达,NERD组4例正常表达,28例不同程度异常表达,为细胞膜不完整表达、细胞质表达及表达缺失,30例RE均表达异常;RE组和NERD组Occludin阳性率与正常对照组比较,差异均有显著性($P<0.01$),而RE组与NERD组间比较,无显著差异。RE组和NERD组平均细胞间隙与正常对照组比较,均有显著性差异($1.51\pm 0.31\ \mu\text{m}$, $1.38\pm 0.26\ \mu\text{m}$ vs $0.77\pm 0.12\ \mu\text{m}$, 均 $P<0.01$),而RE组和NERD组间无显著差异。

结论: 胃食管反流病患者食管上皮Occludin数量减少、分布异常,导致细胞间隙增宽,影响黏膜上皮屏障的完整性,可能是胃食管反流病的发病机制之一。

关键词: 胃食管反流病; 紧密连接蛋白; 细胞间隙增宽; 免疫组织化学; 光镜测量

徐兆军, 张振玉, 黄文斌, 王劲松, 姜宗丹, 罗新华. 胃食管反流病患者食管上皮Occludin的表达及细胞间隙的改变. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2835-2839
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2835.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)系指胃内容物反流入食管,引起不适症状和(或)并发症的一种疾病^[1]。诊断标准主要结合: (1)临床典型的烧心、反流症状; (2)胃镜; (3)PPI试验; (4)食管24 h pH及胆汁监测。临床上分为反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)、非糜烂性胃食管反流病(nonerosive reflux disease, NERD)及Barrett's食管,其发生与抗反流屏障功能失调有关,包括下食管括约肌松弛、食管内反流物清除障碍、食管黏膜防御能力下降等。食管黏膜防御主要为上皮屏障,结构上由细胞

膜和紧密连接蛋白(tight junction, TJ)组成, TJ由跨膜蛋白(Occludin、Claudin)、胞质附着蛋白(ZO-1)、细胞骨架蛋白相连组成。近年研究表明, H^+ 进入和破坏食管上皮的主要途径是经由损坏的细胞间连接弥散到细胞间隙,使酸浸润到上皮下层而产生症状或黏膜破损,而紧密连接的破坏,继发细胞间隙的增宽。国外动物实验^[1]显示食管炎大鼠Claudin-1表达增强, Claudin-3表达减低,而Claudin-4和Occludin由细胞膜表达转换为胞质表达。其在人GERD中的表达尚未见类似报道。本文对紧密连接蛋白的一种-Occludin在GERD患者食管上皮中的表达及细胞间隙变化进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2007-01/2008-12我院门诊有反流症状患者62例,其中男34例,女28例,年龄26-78(平均 50.02 ± 13.65)岁,根据最新中国GERD共识意见的GERD诊断标准^[1],行电子胃镜检查及食管24 h pH监测,确诊为GERD患者,并区分RE及NERD,分别为30例及32例,其中RE男18例,女12例,NERD男16例,女16例。RE患者在距离食管下端3-5 cm处选择糜烂处取活检,NERD在相同水平位置取活检,再选择无反流症状非GERD的患者(食管上中段病变手术者切缘为下段食管达到相同水平位置)10例做比较,其中男6例,女4例,年龄43-72(平均 54.7 ± 9.74)岁,均送病理检查。

1.2 方法

1.2.1 组织学和免疫组织化学染色: 采用SABC法,光镜下观察Occludin表达。组织用10%甲醛固定24 h后,取材,经脱水透明浸蜡包埋制成蜡块,蜡块切片后进行脱蜡,梯度酒精至水,用PBS(pH7.4)冲洗3次,每次3 min,对切片用胃酶消化处理37℃ 20-30 min, PBS冲洗3次,每次3 min,除去PBS液,每张切片加1滴Occludin抗体(美国Zymed公司),冰箱4℃过夜, PBS冲洗3次,每次3 min,除去PBS液,每张切片加1滴DAKO抗兔二抗,温箱37℃孵育40 min, PBS冲洗3次,每次3 min,除去PBS液,每张切片加2滴新鲜配制的DAB溶液,显微镜下观察1-3 min。自来水冲洗,苏木素复染1 min,自来水冲洗返蓝。则切片经过梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。采用显微镜下观察其表达部位及类型。结果判断: Occludin正常表达于上皮细胞,呈完整的胞膜表达;当细胞膜表达不完整、胞质表达或不表达时均视为Occludin表达异常。

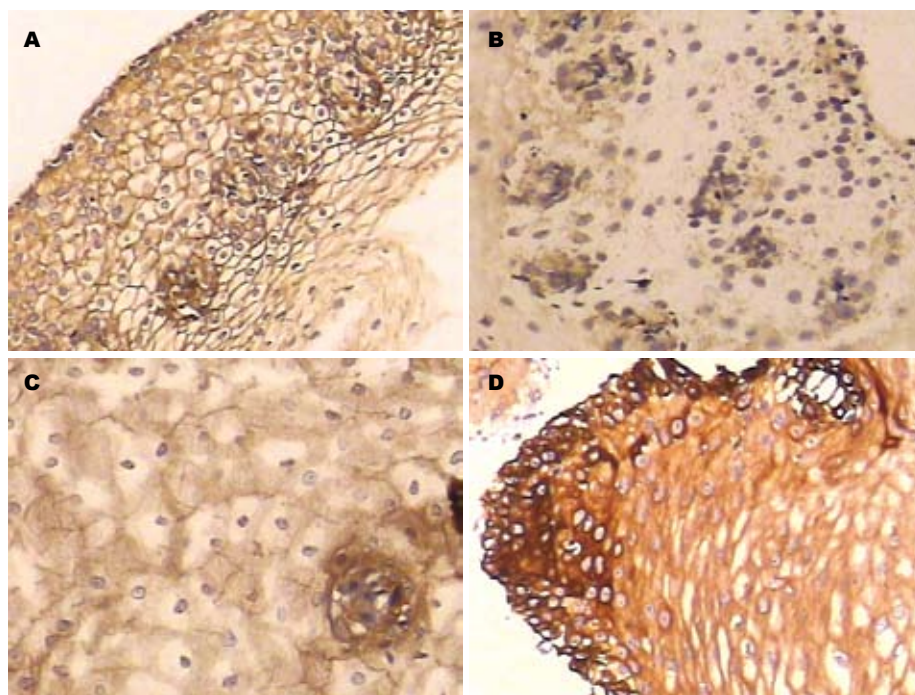


图1 不同组别Occludin表达的光镜下图谱. A: 正常对照组正常表达($\times 20$); B: RE组失表达($\times 20$); C: NERD组细胞膜表达不完整($\times 40$); D: RE组细胞质表达($\times 20$).

应用要点
本研究提示, GERD患者由于食管上皮层紧密连接结构和功能异常, 细胞间隙增宽, 黏膜通透性升高, H^+ 、胃蛋白酶、胆汁酸等透过上皮层, 作用于黏膜下的神经末梢, 引起烧心、反酸、胸痛等临床症状. 而NERD与RE的Occludin表达无明显差异亦可解释两者的临床症状差别不大, 具体机制有待进一步实验研究证实.

1.2.2 HE染色标本制作及光镜下细胞间隙测量: 另取切片后行HE染色. 光镜($\times 400$)观察并采集图像, 采用RAS9000病理图像分析系统(无锡朗伽公司)测量细胞间隙宽度. 光镜测量时, 选取基底上层或棘层的细胞核居中、核仁明显的细胞, 采用盲法对每例切片随机选择10个不同位置取10张照片, 每张测量10个细胞间隙, 计算测量得到的100个细胞间隙平均值, 然后计算平均值.

统计学处理 使用SPSS15.0软件进行分析, 正态分布的计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 免疫组织化学法测定Occludin的表达 Occludin主要分布在细胞膜和细胞质中, 经DAB显色后, Occludin免疫反应沉淀物在细胞膜、细胞质呈棕色或黄色颗粒, 正常食管黏膜处Occludin主要在黏膜层下方均匀的连续分布, 似一道屏障, 而RE及NERD患者黏膜层Occludin数量减少, 且分布间断、不均匀, 密度和数量上均低于正常食管黏膜上皮, 细胞膜上Occludin明显减少, 部分细胞出现胞质内Occludin的表达. 正常对照组食管组织中Occludin的表达: 10例正常食管组织中Occludin在食管基底旁细胞和棘细胞层呈连续的细胞膜阳性, 染色强度为淡黄色, 基底细胞Occludin的表达为连续的深棕黄色的胞膜阳性, 上皮间质未见Occludin表达; NERD组中Oc-

cludin的表达: 32例NERD患者, Occludin有4例正常表达, 另外28例均有不同程度的表达异常者, 表达异常主要位于棘细胞和基底旁细胞层, 而基底细胞表达模式与正常食管黏膜相似, 28例Occludin表达异常者中, 细胞膜表达不完整者5例, 细胞质表达者11例, 失表达者12例; RE组中Occludin的表达: 30例RE患者中, Occludin均有不同程度的表达异常, 表达异常部位主要位于棘细胞层和基底旁细胞层, 而基底细胞表达模式与正常食管黏膜相似, 30例RE患者中, 细胞膜表达不完整者7例, 细胞质表达者15例, 表达阴性者8例(图1, 表1).

2.2 细胞间隙 各组细胞间隙见图2, 表2.

3 讨论

TJ是细胞间连接的一个重要形式, 他是构成黏膜机械屏障最重要的结构, 由Claudin蛋白、Occludin蛋白、JAM、ZOs等结构蛋白及各类连接蛋白分子共同组成^[3-5], Occludin是最先分离出来的TJ跨膜蛋白^[6], 相对分子质量为65 kDa, 形成2个细胞外环和1个短的细胞内环. 免疫电镜显示Occludin定位在TJ上^[7-9], Occludin蛋白是TJ中最重要的结构蛋白, 他不仅能通过外环以拉链式结合进而产生严密的细胞旁封闭, 还能与不同的分子结合, 参与TJ形成的信号调节^[10-11], Occludin与ZO-1形成紧密连接蛋白的基本结构, Occludin功能广泛, 涉及细胞间黏附、移动、调节细胞通透性及细胞表型的改变^[12]. 在低氧、炎

同行评价

本文立意依据充分, 设计合理, 病例诊断明确, 有一定的技术难度, 结果可靠, 为胃食管反流病的发病机制提供理论依据, 对临床诊治有参考意义。

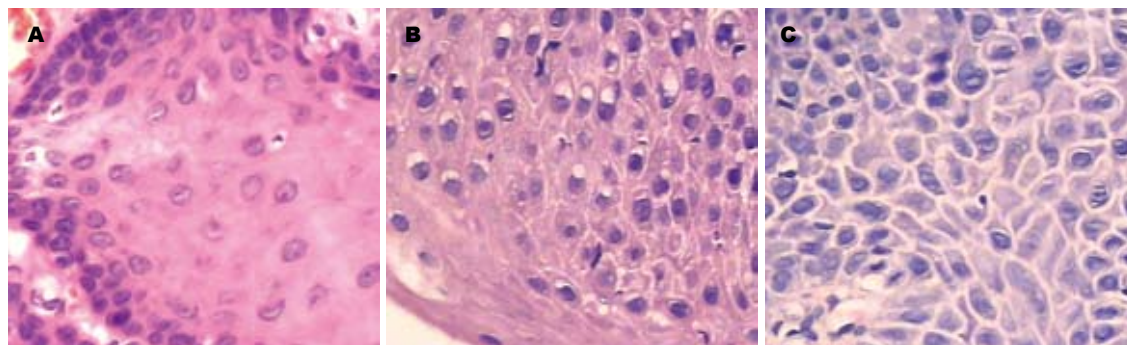


图 2 光镜下各组细胞间隙(HE × 400). A: 正常对照组; B: NERD组; C: RE组.

表 1 Occludin在NERD、RE和正常对照食管组织中的表达

分组	n	正常表达	异常表达			异常表达阳性率(%)
			细胞膜表达不完整	细胞质表达	失表达	
正常对照组	10	10	0	0	0	0
NERD组	32	4	5	11	12	87.5 ^b
RE组	30	0	7	15	8	100.0 ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组.

表 2 NERD、RE和正常对照食管上皮平均细胞间隙

分组	n	平均细胞间隙(μm)
正常对照组	10	0.77 ± 0.12
NERD组	32	1.38 ± 0.26 ^b
RE组	30	1.51 ± 0.31 ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组.

性因子刺激等病理情况下可引起Occludin等分布异常、表达减少甚至融解, 导致TJ结构和功能的异常, 细胞间隙增宽, 进而使内皮层通透性升高^[12-13]. 国内外研究显示, 在RE和内镜阴性的NERD组中, 食管黏膜细胞间隙皆存在增宽^[14-15], 其通透性增大^[16]. 有研究显示上皮细胞间隙增宽是NERD的客观结构指标^[17]. Calabrese的研究显示, 伴有病理性酸反流NERD患者, 经质子泵抑制剂(PPI)治疗后随着症状的消失, 其上皮细胞间隙亦恢复正常^[18]. 国内谷仲平 *et al* 研究发现, GERD患者食管黏膜上皮细胞间隙明显增大, 而内镜下黏膜正常与黏膜异常的GERD患者细胞间隙无明显差异^[19]. 本文主要研究了GERD患者中食管上皮中Occludin表达变化及细胞间隙的改变. 研究发现, 在GERD患者中, NERD及RE病例Occludin表达均有异常, 为蛋白量下降、或转为胞质表达、或失表达, 这与国外动物实验报

道结果相符, NERD组与正常对照组比较、RE与正常对照组比较, 均有明显表达异常, 差异有显著性(均 $P < 0.01$); 而RE组与NERD组比较, 差异无显著性, 而细胞间隙比较GERD患者与对照组有显著差异, RE组与NERD组无明显差异. 这从某种意义上可以考虑GERD患者发病机制分子学基础可能与TJ的表达异常, 特别是Occludin的表达异常有关. 从本研究来看, GERD患者由于食管上皮层紧密连接结构和功能异常, 细胞间隙增宽, 黏膜通透性升高, H^+ 、胃蛋白酶、胆汁酸等透过上皮层, 作用于黏膜下的神经末梢, 引起烧心、反酸、胸痛等临床症状. 而NERD与RE的Occludin表达无明显差异亦可解释两者的临床症状差别不大, 具体有待进一步实验研究证实.

GERD是消化系统常见病之一, 目前所知临床发病机制主要是下食管括约肌一过性松弛, 进一步的机制并不是很确切, 从本研究来看, 可能与紧密连接蛋白, 特别是Occludin的表达异常, 导致细胞间隙增大有关.

4 参考文献

- 林三仁, 许国铭, 胡品津, 周丽雅, 陈旻湖, 柯美云, 袁耀宗, 房殿春, 萧树东. 中国胃食管反流病共识意见. 中华内科杂志 2007; 46: 170
- Asaoka D, Miwa H, Hirai S, Ohkawa A, Kurosawa A, Kawabe M, Hojo M, Nagahara A, Minoo T,

- Ohkura R, Ohkusa T, Sato N. Altered localization and expression of tight-junction proteins in a rat model with chronic acid reflux esophagitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 781-790
- 3 宋红丽, 吕飒, 马力, 李颖, 刘沛. TNF- α 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1303-1306
 - 4 Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-1550
 - 5 Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142: 117-127
 - 6 Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-1788
 - 7 Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 14): 1603-1613
 - 8 Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, Tsukita S. Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol* 1997; 73: 222-231
 - 9 Fujimoto K. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 11): 3443-3449
 - 10 Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeanson B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1227-1237
 - 11 Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C, Mrsny RJ. The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* 2000; 275: 29816-29822
 - 12 刘理. 紧密连接的分子基础及其调控. *国外医学·生理病理科学与临床分册* 1999; 19: 75-78
 - 13 Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003; 52: 439-451
 - 14 Calabrese C, Fabbri A, Bortolotti M, Cenacchi G, Areni A, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 525-532
 - 15 薛艳, 周丽雅, 林三仁, 黄永辉. 胃食管反流病患者食管下段鳞状上皮细胞间隙的改变. *中华消化杂志* 2006; 26: 797-800
 - 16 Tobey NA, Hosseini SS, Argote CM, Dobrucali AM, Awayda MS, Orlando RC. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 13-22
 - 17 Kahrilas PJ. Dilated intercellular spaces: extending the reach of the endoscope. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 549-550
 - 18 Calabrese C, Bortolotti M, Fabbri A, Areni A, Cenacchi G, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Reversibility of GERD ultrastructural alterations and relief of symptoms after omeprazole treatment. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 537-542
 - 19 谷仲平, 刘锴, 王云杰, 罗金燕, 程庆书, 张军. 人食管上皮酸反流损伤的早期超微结构改变. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 256-258

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》标点符号用法

本刊讯 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. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

乙型肝炎病毒大S蛋白基因纵向研究方法及应用

余南, 崔进, 周国宝, 张云娇, 陈晶砾

背景资料
HBV S基因的变异研究, 尤其体内抗病毒药物持续存在的选择压力下HBV的分子演化具有重要意义. HBV准种的特征使序列分析与临床关系的研究更为复杂. 由于HBV在体内以准种形式存在, HBV的一些相关研究的结果分析可能会受到影响, 因此应予以考虑.

余南, 崔进, 周国宝, 张云娇, 陈晶砾, 广州开发区医院生物中心实验室 广州开发区医院传染科 广东省广州市 510730
广州市医药卫生科技基金资助项目, No. 2006-YB-196
作者贡献分布: 此课题由余南设计; 研究过程由余南、崔进、周国宝、张云娇及陈晶砾完成; 研究所用试剂及分析工具由余南提供; 数据分析由余南与崔进完成; 论文写作由余南完成.
通讯作者: 余南, 博士, 510730, 广东省广州市广州经济技术开发区友谊路196号, 广州开发区医院生物中心实验室.
yunan86@126.com
收稿日期: 2009-07-20 修回日期: 2009-09-05
接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-09-28

Variations in the large surface protein gene of hepatitis B virus *in vivo*: a longitudinal study and application

Nan Yu, Jin Cui, Guo-Bao Zhou, Yun-Jiao Zhang, Jing-Li Chen

Nan Yu, Jin Cui, Guo-Bao Zhou, Yun-Jiao Zhang, Jing-Li Chen, Central Biological Laboratory, Department of Infectious diseases, Guangzhou Development District Hospital, Guangzhou 510730, Guangdong Province, China

Supported by: the Medical Science and Technology Project of Guangzhou, No. 2006-YB-196

Correspondence to: Nan Yu, Central Biological Laboratory, Guangzhou Development District Hospital, 196 Youyi Road Guangzhou Development District, Guangzhou 510730, Guangdong Province, China. yunan86@126.com

Received: 2009-07-20 Revised: 2009-09-05

Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To develop a method for longitudinal study of variations in the large surface protein gene of hepatitis B virus (HBV) *in vivo* and apply it to the investigation of the dynamics of HBV quasispecies.

METHODS: Two HBV carriers were included in the study. Patient 1 was a 38-year-old male who received no anti-virus therapy before and during the longitudinal study, while patient 2 was a 22-year-old female who received continuous adefovir dipivoxil (ADV) therapy during the one-year longitudinal study. Serum samples were collected from the two patients over the longitudinal period. Nucleic acids were extracted from the serum samples and used as templates

to amplify the HBV large surface protein gene. The resulting PCR products were cloned into the pMD18-T vector and sequenced. Variation analysis was performed using sequence alignment tools to characterize and evaluate the dynamic changes of HBV quasispecies.

RESULTS: Of 24 large surface protein gene sequences (10 from patient 1 and 14 from patient 2) analyzed, two from patient 2 contained a 30-nt deletion in PreS2 coding region. Online HBV genotype analysis showed that all the 24 sequences belonged to genotype C. The divergence values (D_A , D_B and D_C) of HBV large surface protein gene from patient 1 were 0.29, 0.16 and 0.23, respectively, while those from patient 2 were 0.80, 2.30 and 1.82, respectively. The 'a' determinant region was perfectly identical among the 10 sequences from patient 1. In patient 2, G145R mutation was found in two sequences (29%) at the beginning and in six sequences (86%) at the end of the study. Four point mutations also were noted in the 'a' determinant region of one sequence from patient 2 at the end of the study.

CONCLUSION: Our results support the quasispecies distribution of HBV inside human hosts. It is feasible to use divergence values D_A , D_B and D_C to characterize and evaluate the dynamic changes of HBV quasispecies. ADV therapy may increase the diversity of HBV quasispecies and thereby raise the risk of developing drug resistance.

Key Words: Hepatitis B virus; Large surface protein; Variation; 'a' determinant; Quasispecies

Yu N, Cui J, Zhou GB, Zhang YJ, Chen JL. Variations in the large surface protein gene of hepatitis B virus *in vivo*: a longitudinal study and application. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2840-2845

摘要

目的: 建立乙型肝炎病毒(HBV)大S蛋白基因纵向研究方法, 并将其应用于疾病进程中HBV的准种动态研究.

方法: 以2例HBV感染者(对象A, 男, 38岁; 对

同行评议者
刘勇钢, 副主任医师, 天津市传染病医院病理科

象B, 女, 22岁. 对象A研究期间未经任何抗病毒治疗, B则1年持续接受ADV抗病毒药物治疗)体内不同时期的血清样本核酸提取物为模板, 通过特异性扩增获取病毒大S蛋白基因序列并克隆测序, 依据生物信息学方法对发生于序列结构不同区域的变异进行分析, 利用比对数据对不同样本HBV准种予以描述与评价.

结果: 所得24条HBV大S蛋白基因序列中2条源于对象B样本的基因序列PreS2编码区存在30 nt的缺失, 其余22条序列大小均为1203 bp; 24条序列的HBV基因型均为C型. 对象A大S蛋白基因序列分散值 D_A 、 D_B 、 D_C 分别为: 0.29、0.16、0.23, 对象B则为0.80、2.30、1.82. 来自对象A的全部10条HBV大S蛋白基因序列内部的“a”决定簇与参考基因完全一致; 对象B的14条序列期初有2条(29%)期终有6条(86%)存在G145R突变, 期终序列中有1条序列“a”决定簇内发现4个位点的突变.

结论: 人体内感染HBV以准种形式存在且可以用分散值 D_A 、 D_B 、 D_C 对其进行描述, 并应用于HBV准种动态的纵向研究. 而抗病毒药物ADV的1年期治疗可使本例HBV准种分散性增高, 可能增加本例耐药性突变出现的风险, 同时增加本例“a”决定簇的变异出现.

关键词: 乙型肝炎病毒; 大S蛋白; 变异; “a”决定簇; 准种

余南, 崔进, 周国宝, 张云娇, 陈晶砾. 乙型肝炎病毒大S蛋白基因纵向研究方法及应用. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2840-2845
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2840.asp>

0 引言

乙型肝炎是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染导致的传染病, 我国属高流行区. 因HBV长期感染可发展为肝硬化和肝癌, 故其严重威胁患者健康. HBV基因组全长约3215 bp, 部分双链, 由4个开放读码框(open reading frame, ORF)即S、C、P、X组成^[1]. 其中大S蛋白基因由PreS1, PreS2和表面抗原主蛋白S编码区组成, 编码的HBsAg是病毒感染的重要标志物, 也是诱导机体产生保护性抗体的重要抗原, 在临床检测和疫苗设计中应用广泛. HBV的一些序列变异已经被发现与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)相关联^[2], 其中S基因的变异研究对于乙型肝炎的诊断、预防和治疗均具有重要意义. 本研究以慢性乙型肝炎患者疾病进程

不同时期的血清样本核酸提取物为模板, 通过特异性扩增获取大S蛋白基因序列并克隆测序, 进行比较与分析, 以建立HBV大S蛋白基因变异追踪方法, 应用于疾病进程中HBV的变异动态研究.

1 材料和方法

1.1 材料 本院传染科长期治疗/检查的HBV感染者2例. 对象A, 男, 38岁; 对象B, 女, 22岁. 分别于期初与期终采集空腹血3 mL分离血清. 所有血清标本室温放置不超过4 h, 4℃保存不超过10 d; 需长期保存的期初血清标本置-70℃保存. HBV核酸扩增荧光定量检测试剂盒为中山大学达安基因股份有限公司产品(Cat: DA-BL051). HBV血清学标志物检测采用ELISA法, 试剂为北京万泰公司产品(京). 丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒及天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒为上海科华产品(沪食药监械准字2007第2400378号和沪食药监械准字2007第2400380号). TAQ酶、pMD18-T载体为TaKaRa公司产品. DNA胶纯化试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)为QIAGEN公司产品. 大肠埃希菌JM109为本实验室保存, 感受态自行制备. 荧光定量PCR仪瑞士罗氏公司产品LightCycler, 运行计算机软件Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software (Version 3.5.3). 普通热循环仪ABI2700(美国). 全自动酶标仪为哈密顿STAR 8 ch加样系统和FAME 24/20分析系统(瑞士). 全自动生化仪为日立7060(日本).

1.2 方法

1.2.1 乙肝五项检测: 采取ELISA法.

1.2.2 肝功能检测: ALT和AST在全自动生化仪上完成, 分别采用紫外-乳酸脱氢酶法和紫外-苹果酸脱氢酶法.

1.2.3 HBV DNA定量检测: 采用荧光定量法^[3]按标准操作程序进行. 主要包括: (1)血清标本制备核酸模板: 取100 μ L血清标本浓缩后12 000 r/min离心10 min; 沉淀加DNA提取液于100℃处理10 min, 12 000 r/min离心5 min, 上清用作模板. (2)扩增: 扩增反应条件为93℃预变性3 min; 进行40个循环(93℃ 5 s, 57℃ 45 s); 回到37℃. 采用样点拟合法进行定量分析.

1.2.4 大S蛋白基因的扩增: 通过GenBank数据库所获得HBV的序列进行分析和引物设计. 上游引物bs1: 5'-TAGGTACCATGGGAGGTTGGTCTTC-3', 下游引物bs2: 5'-TCGGAGCTCTTAAATG

研发前沿
HBV感染发生后一些患者未能清除机体病毒而形成长期感染, 伴随此过程中机体免疫和药物治疗等的影响, 病毒的变化、准种的变迁如何追踪具有重要意义. 准种优势株的研究是解决日益严峻HBV耐药、疫苗免疫失败等问题的关键.

相关报道

Zhu *et al* 2007研究了一种通过克隆血清HBV准种进行体外药敏分析的方法,使用该方法发现含rtA181V的病毒准种可使ADV的EC₅₀上升2.9倍。Moriconi *et al* 2007的研究显示LAM治疗可促进ADV应答率受影响的HBV准种形成,减低对其他核苷类似物的敏感性。

TATACCCAAAG-3'。扩增反应条件: 95℃预变性10 min, 95℃ 45 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共32个循环; 72℃延伸5 min。以上述1.3.3所获得模板溶液12 000 r/min离心5 min后, 小心取1 μL上清进行扩增, 扩增产物10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 将符合设计产物相对分子质量大小的电泳条带小心切割后, 按QIAquick Gel Extraction Kit说明书的要求纯化。

1.2.5 克隆测序: 根据pMD18-T产品说明书的要求连接目的DNA片段与T载体(16℃ 30 min)。连接产物转化到大肠埃希菌JM109感受态细胞中(42℃热激), 加890 μL 37℃预热的SOC培养基, 37℃ 150 r/min培养60 min, 涂布于含有20 mg/L氨苄青霉素的LB平板上, 37℃培养过夜。次日挑取阳性菌落进行PCR鉴定, 取阳性菌测序。

1.2.6 序列分析: 采用DNASTar及BLAST等在线工具软件进行序列分析。基因分型采用在线工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)进行。血清型推断通过参考基因比对进行^[4]。变异参数计算公式: $D_A = (\sum D_{(a)}) / C_n^2$, 其中 $a = N(1, C_n^2)$, n = 期初样本克隆数; $D_B = (\sum D_{(b)}) / C_m^2$, 其中 $b = N(1, C_m^2)$, m = 期终样本克隆数; $D_C = (\sum D_{(a,b)}) / (n \times m)$ 。 $D_{(a)}$ 为期初样本 n 个条序列间的分散值(divergence, D)(%), $D_{(b)}$ 为期终样本 m 个条序列间的分散值(%), $D_{(a,b)}$ 为期初样本 n 个条序列与期终样本 m 个条序列之间的分散值(%)。

2 结果

对象A在本研究前及期间1年内均未接受任何抗病毒化学药物治疗, 仅在肝功能异常时接受1-2 mo “甘草酸”或“五酯”类药物护肝; 期初与期终肝功能均正常, HBV DNA分别为4.26E+7拷贝/mL和1.61E+9拷贝/mL, 乙肝五项期初与期终均为1、3阳性。对象B初诊血清HBV DNA高于10⁷拷贝/mL伴肝功异常, 临床给予“五酯”类药物护肝治疗, 本研究期初起用核苷类抗病毒化学药物阿德福韦酯(adeфовир, ADV)10 mg/d治疗至本研究期终, 持续1年, 期间治疗依从性好; 期初与期终肝功能均正常, HBV DNA分别为3.27E+9拷贝/mL和3.58E+7拷贝/mL, 乙肝五项期初与期终均为1、3、5阳性。

2.1 大S蛋白基因测序与基因型确定 4个样品通过特异性扩增均得到大小约1200 nt的目的序列, 克隆到T载体培养过夜后挑取阳性菌落送测序。对象A的期初及期终血清样品中得到共10条大



图1 对象A及对象B的大S蛋白基因结构。对象B期初样本有1条序列及期终样本有1条序列于PreS2编码区出现30 nt缺失。

S蛋白基因序列, 大小均为1203 nt。对象B的期初及期终血清样品中得到大小为1203 nt的大S蛋白基因序列12条, 大小为1173 nt的大S蛋白基因序列2条, 该2序列在PreS2编码区缺失30 nt, 相应的编码蛋白发生10aa的缺失(图1)。将测序所得大S蛋白基因序列进行基因型分析的结果, 24条序列均为C型, C型为中国最常见的2种HBV基因型之一。

2.2 大S蛋白基因序列的纵向比对 对象A之2个样本共10个克隆的大S蛋白编码基因序列在13位点存在变异, 包括位于PreS1编码区的6个位点、PreS2编码区的1个位点及小S蛋白编码区的6个位点; 氨基酸序列7个位点存在变异, PreS1、PreS2及小S蛋白编码区的位点数分别为3、2、1。对象B之14个克隆的大S蛋白编码基因序列除2序列于PreS2编码区的30 nt缺失外, 还在59位点存在变异, 包括位于PreS1编码区的22个位点、PreS2编码区的12个位点及小S蛋白编码区的25个位点; 氨基酸残基34个位点存在变异, PreS1、PreS2及小S蛋白编码区的位点数分别为11、9、14。序列碱基比基础上得到对象A及对象B的 $D_{(a)}$ 、 $D_{(b)}$ 及 $D_{(a,b)}$ 值见图2。经计算对象A分散值 D_A 、 D_B 、 D_C 分别为0.29、0.16、0.23, 对象B则为0.80、2.30、1.82(图3)。

2.3 “a”决定簇编码区 24条大S蛋白基因序列的“a”决定簇编码区序列与adr血清型HBV参考基因(D00630)的相应区域高度同源, adr型是我国大多数C型HBV的血清型。对象A的大S蛋白基因序列中“a”决定簇编码区内仅2个位点出现碱基置换, 均为同义突变。对象B的大S蛋白基因序列中“a”决定簇编码区内发生7个位点碱基置换, 4处可使编码氨基酸残基改变。对象A样本10个克隆(100%)及对象B样本4个克隆(29%)所得序列“a”决定簇编码区编码的氨基酸残基序列与参考基因完全一致。对象B的期初样本2个克隆(29%)及期终样本6个克隆(86%)所得8条序列均发生了G145R, 对象B期终样本的1条序列同时发生了T131A、S132F、F134S及

A														
期初1	0.0													
期初2	0.2	0.0												
期初3	0.4	0.5	0.0											
期初4	0.2	0.3	0.5	0.0										
期初5	0.1	0.2	0.3	0.2	0.0									
期终1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.0	0.0								
期终2	0.2	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.0							
期终3	0.2	0.3	0.4	0.3	0.1	0.1	0.3	0.0						
期终4	0.2	0.3	0.4	0.3	0.1	0.1	0.3	0.2	0.0					
期终5	0.1	0.2	0.3	0.2	0.0	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0				
	期初1	期初2	期初3	期初4	期初5	期终1	期终2	期终3	期终4	期终5				
B														
期初1	0.0													
期初2	0.8	0.0												
期初3	1.2	0.9	0.0											
期初4	0.8	0.1	1.0	0.0										
期初5	1.0	0.3	1.2	0.3	0.0									
期初6	1.0	0.6	1.2	0.7	0.9	0.0								
期初7	0.6	0.6	1.1	0.7	0.8	0.9	0.0							
期终1	3.2	2.8	2.8	2.9	3.1	3.1	3.1	0.0						
期终2	0.8	0.8	1.2	0.8	1.0	1.0	0.8	3.1	0.0					
期终3	2.9	2.6	2.5	2.7	2.9	2.7	2.8	1.0	2.7	0.0				
期终4	3.7	3.2	3.2	3.3	3.5	3.5	3.5	0.4	3.5	1.4	0.0			
期终5	1.0	0.2	1.2	0.3	0.5	0.9	0.8	3.1	1.0	2.9	3.5	0.0		
期终6	0.8	0.9	1.3	1.0	1.2	1.2	0.8	3.4	1.0	3.1	3.9	1.2	0.0	
期终7	1.0	0.8	1.2	0.9	1.0	1.0	0.9	3.2	1.0	2.9	3.7	1.0	1.2	0.0
	期初1	期初2	期初3	期初4	期初5	期初6	期初7	期终1	期终2	期终3	期终4	期终5	期终6	期终7

创新盘点

本研究对HBV感染者不同时期HBV大S蛋白基因进行动态追踪,以1年为期,获取患者期初与期终的HBV相应序列,在多重比对得到序列分散值的基础上,通过各期样本分散值参数 D_A 和 D_B 表征研究对象该时点的HBV准种数值特征;采用不同时间分散值参数 D_C 表征研究对象不同时间点的HBV准种动态变化,并通过量化的数值对患者体内HBV准种予以评价为临床研究提供了理论依据。

图 2 24条序列的D值. A: 来自对象A样本的序列; B: 来自对象B样本的序列.

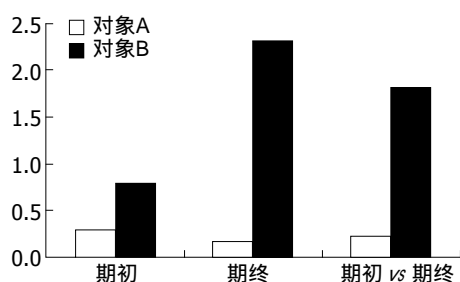


图 3 对象A与对象B的 D_A , D_B 及 D_C 值(%)比较.

G145R突变(表1).

3 讨论

《慢性乙型肝炎防治指南》^[1]明确建议抗病毒治疗是慢性乙型肝炎的根本治疗方法. 目前抗病毒治疗以核苷类似物和干扰素为主, 临床抗病毒用药中主要的核苷类似物有LAM和ADV等. LAM由于耐药问题越来越严重, ADV在临床的应用相对增多. 了解体内抗病毒药物持续存在的选择压力下HBV的分子演化发生哪些变化及变化意义如何, 对于乙型肝炎的诊断、预防、治疗都有十分重要的意义. 国内2003年已经有报道1例慢性乙型肝炎患者LAM治疗前及病情急性恶化后HBV结构基因组的对比分析^[4]由于没有将HBV准种特征予以考虑, 其比较的意义可能受限. 准种最初发现于RNA病毒, 近年发现HBV也存在此现象. 在一些HBV研究报道中出

现序列分析与临床关系相互不一致的结果^[5], 可能可以通过准种的特征加以解释. 迄今为止, 国内外HBV变异纵向研究的报道^[4,6-9]仍然十分少, 其原因一定程度上可能与时间跨度长、对患者及样本管理难度大、数据处理复杂程度高有关. 本研究建立HBV大S蛋白基因变异纵向研究方法, 在探讨更为系统地进行HBV纵向研究模式的尝试中, 报道其中2例的研究结果.

本研究以1年为期, 分别获取2例HBV携带者在期初与期终的HBV核酸样本, 通过克隆测序技术对HBV准种特征进行研究. 在多重比对数据分散D值的基础上进行计算分析. 通过样本内 D_A 和 D_B 表征研究对象期初与期终的HBV准种数值特征, 通过样本间D值参数 D_C 表征研究对象期初与期终之间HBV准种动态变化, 使HBV准种除了描述性分析外, 还可通过量化的数值予以评价. 本研究结果显示, 对象A(未接受抗病毒治疗)的大S蛋白基因变异率在期初和期终均较低(0.29和0.16), 而对象B(持续ADV抗病毒治疗)期初值0.80, ADV治疗1年后上升至近3倍(2.30), D_C 达1.82(对象A仅为0.23). 这提示, 本例抗病毒药物ADV的持续作用可能使体内HBV变异更为频繁, 准种的分散性升高. 已经有实验^[10]证实病毒准种分散性与病毒致病力正相关. HBV准种分散性上升的结果也可能导致耐药性突变出现的风险更大. 事实上, 体外耐药的研究^[6]也已经

应用要点

本研究对患者疾病进程中HBV的大S蛋白基因序列进行纵向追踪。通过建立HBV准种特征的量化描述方法,观察HBV的准种变迁,为探讨其临床意义打下基础。

表 1 “a” 决定簇氨基酸残基序列

参考序列	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
对象A																										
期初1	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期初2	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期初3	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期初4	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期初5	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期末1	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期末2	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期末3	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期末4	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期末5	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
对象B																										
期初1	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期初2	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期初3	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	R	N
期初4	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期初5	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期初6	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期初7	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	R	N
期末1	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	R	N
期末2	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	L	D	R	N
期末3	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	R	N
期末4	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	V	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	G	N
期末5	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	R	N
期末6	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	A	F	M	S	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	R	N
期末7	C	K	T	C	T	I	P	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	T	K	P	S	D	R	N

参考序列来自GenBank序列D00630。阴影处为发生变异位置。

提示抗病毒药物ADV长期治疗会伴随药物EC₅₀上升、药物敏感性下降的现象。长期抗病毒药物压力导致的HBV准种分散性提高的机制是什么,该现象普遍性如何,其他人工选择压力如疫苗和抗体治疗等是否也可引发同样的现象,尚需进一步的研究方可阐明。

“a” 决定簇编码区对药物选择压力敏感,该区域变异可使HBV不能被中和抗体识别,免疫球蛋白和乙肝疫苗难以阻断该突变株的传播而引起宫内感染^[11],也可致HBV血清学检测中无法检出HBsAg,在HBV变异研究^[12]中受到重视。其中G145R变异常见于发生免疫逃避的HBV突变株^[12-13],与免疫逃避密切相关。本研究中,接受抗病毒治疗的HBV携带者体内HBV的“a” 决定簇出现变异,其中期初的2个克隆和期末的6个克隆中出现了G145R变异,而无抗病毒治疗对象却未发现变异。提示这些变异的出现可能与药物压力有关。

由于HBV在人体中以准种(quasispecies)的形式存在^[1,14],尽管对象B多条序列的“a” 决定簇编码区发生变异,可表达正常HBsAg的HBV野生株数量仍具一定优势,因而血清学检测显示期初与期末的样本HBsAg均为阳性。对象B在期初样本中PreS2区缺失株和无缺失株并存,与免疫逃避密切相关的“a” 决定簇G145R变异株与野生株并存也都说明了HBV在宿主体内以准种形式存在的特点。准种优势株的动态研究十分重要,是解决日益严峻的HBV耐药、疫苗免疫失败等问题过程中无法回避的环节。下一步,本研究建立HBV大S蛋白基因纵向追踪的方法将应用于不同分组的患者和更长期更细致的动态追踪,以期获得更丰富的HBV基因纵向研究结果。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
- 2 Yang HJ, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL,

- Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1134-1143
- 3 余南, 甘明, 詹希美, 陈小坚. 乙型肝炎病毒核酸定量检测中不确定度的分析. *热带医学杂志* 2007; 7: 310-314
- 4 张继明, 刘芳, 尹有宽, 张清波, 郭祥惠, 翁心华. 拉米夫定治疗前后HBV全基因序列检测对比. *中华传染病杂志* 2003; 21: 27-31
- 5 王翠敏, 韩国荣, 王根菊. 乙型肝炎病毒S基因变异、基因型与宫内感染免疫失败的关系. *中华传染病杂志* 2009; 27: 114-117
- 6 Zhu Y, Curtis M, Snow-Lampart A, Yang H, Delaney W, Miller MD, Borroto-Esoda K. In vitro drug susceptibility analysis of hepatitis B virus clinical quasispecies populations. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3335-3341
- 7 Moriconi F, Colombatto P, Coco B, Ciccorossi P, Oliveri F, Flichman D, Maina AM, Sacco R, Bonino F, Brunetto MR. Emergence of hepatitis B virus quasispecies with lower susceptibility to nucleos(t)ide analogues during lamivudine treatment. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 341-349
- 8 Wang F, Wang H, Shen H, Meng C, Weng X, Zhang W. Evolution of hepatitis B virus polymerase mutations in a patient with HBeAg-positive chronic hepatitis B virus treated with sequential monotherapy and add-on nucleoside/nucleotide analogues. *Clin Ther* 2009; 31: 360-366
- 9 Baldick CJ, Eggers BJ, Fang J, Levine SM, Pokornowski KA, Rose RE, Yu CF, Tenney DJ, Colonno RJ. Hepatitis B virus quasispecies susceptibility to entecavir confirms the relationship between genotypic resistance and patient virologic response. *J Hepatol* 2008; 48: 895-902
- 10 Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 2006; 439: 344-348
- 11 Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, Kumarasamy T, Thyagarajan SP. Transmission of "a" determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61: 73-76
- 12 Alexopoulou A, Baltayiannis G, Jammeh S, Waters J, Dourakis SP, Karayiannis P. Hepatitis B surface antigen variant with multiple mutations in the a determinant in an agammaglobulinemic patient. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2861-2865
- 13 Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P, Poovorawan Y. Variants within the "a" determinant of HBs gene in children and adolescents with and without hepatitis B vaccination as part of Thailand's Expanded Program on Immunization (EPI). *Tohoku J Exp Med* 2001; 193: 197-205
- 14 陈恩强, 雷秉钧, 唐红. 乙型肝炎病毒准种的临床应用及其研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1086-1091

同行评价
本文选题好, 研究
内容较为重要, 有
一定的新颖性.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 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. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

恩替卡韦对核苷初治HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者的疗效

张 权, 程明亮, 刘 琴, 穆 茂, 张影影, 刘碧芸

背景资料
目前已上市和用于临床研究的用于治疗慢性乙型肝炎的核苷(酸)类似物有十多种。其中, 恩替卡韦由于有强大的抗病毒效果和较高的耐药屏障而备受关注。但其对HBeAg的转换效力和不良反应的研究还需加强。

张权, 程明亮, 刘琴, 穆茂, 张影影, 刘碧芸, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004
贵州省科学技术基金资助项目, No. 2007-2094
作者贡献分布: 此课题由张权、程明亮、刘琴、穆茂及张影影共同设计; 研究中程明亮进行指导, 张权、刘琴、穆茂、张影影及刘碧芸具体实施; 统计学处理由张权与刘碧芸完成; 论文撰写由张权与程明亮完成。
通讯作者: 张权, 副教授, 550004, 贵州省贵阳市北京路9号, 贵阳医学院附属医院感染科. france.zhang@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-05-13 修回日期: 2009-06-18
接受日期: 2009-06-30 在线出版日期: 2009-09-28

Efficacy of entecavir in nucleoside-naïve patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B

Quan Zhang, Ming-Liang Cheng, Qin Liu, Mao Mu, Ying-Ying Zhang, Bi-Yun Liu

Quan Zhang, Ming-Liang Cheng, Qin Liu, Mao Mu, Ying-Ying Zhang, Bi-Yun Liu, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Supported by: the Foundation of Science and Technology of Guizhou Province, No. 2007-2094

Correspondence to: Professor Quan Zhang, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, 9 Beijing Road, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. france.zhang@yahoo.com.cn

Received: 2009-05-13 Revised: 2009-06-18

Accepted: 2009-06-30 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To investigate the efficacy and safety of entecavir in nucleoside-naïve patients with hepatitis B e antigen (HBeAg)-positive chronic hepatitis B.

METHODS: One hundred and one nucleoside-naïve patients with chronic hepatitis B were randomly divided into two groups. The entecavir (ENT) treatment group was given 0.5 mg of ENT once daily, while the adefovir dipivoxil (AD) treatment group was given 10 mg of AD once daily. The primary outcome measures assessed included serum hepatitis B virus (HBV) DNA level, HBeAg seroconversion or normalization of alanine aminotransferase (ALT) level.

RESULTS: At week 48 after the treatment, serum HBV DNA levels decreased in both the

ENT and AD treatment groups. The percentage of patients showing a reduction greater than 10^3 copies/mL in HBV DNA titer was significantly higher in the ENT treatment group than in the AD treatment group (95.83% vs 60.38%, $P < 0.001$). The percentage of patients achieving normalization of ALT level was also significantly higher in the ENT treatment group than in the AD treatment group (52.08% vs 28.30%, $P = 0.015$). No significant difference was observed in the incidence rate of adverse events (77.08% vs 71.69%, $P = 0.536$) between the two groups. No HBeAg seroconversion was noted in both groups.

CONCLUSION: In nucleoside-naïve patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B, entecavir is superior to adefovir dipivoxil in the suppression of serum HBV DNA level. Both two drugs have poor effects on HBeAg seroconversion.

Key Words: Hepatitis B e antigen; Hepatitis B; Treatment

Zhang Q, Cheng ML, Liu Q, Mu M, Zhang YY, Liu BY. Efficacy of entecavir in nucleoside-naïve patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2846-2849

摘要

目的: 探讨恩替卡韦对核苷初治HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者的疗效。

方法: 101例慢性乙型肝炎患者被随机分配到恩替卡韦(ETV)组和阿德福韦酯(ADV)组, 分别给予0.5 mg/d恩替卡韦和10 mg/d阿德福韦酯治疗。疗效的主要观测指标有: 血清HBV DNA水平, HBeAg转阴或丙氨酸氨基转移酶(ALT)复常。

结果: 48 wk时, ETV组与ADV组HBV DNA均下降, 且 $>10^3$ copies/mL的比率有统计学差异(95.83% vs 60.38%, $P < 0.001$); ALT复常率2组亦有显著差别(52.08% vs 28.30%, $P = 0.015$); 2组均无HBeAg转阴; 不良事件发生率分别为77.08%与71.69%($P = 0.536$), 两组差异没有统计学意义。

同行评议者
范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

结论: 在核苷初治HBeAg阳性慢性乙型肝炎的治疗中, 恩替卡韦比阿德福韦酯有更强的病毒学与生物化学应答率, 但HBeAg转阴率不高, 还需进一步观测。

关键词: 乙型肝炎e抗原; 乙型肝炎; 治疗

张权, 程明亮, 刘琴, 穆茂, 张影影, 刘碧芸. 恩替卡韦对核苷初治HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者的疗效. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2846-2849
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2846.asp

0 引言

全球约有3.5亿慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者, 慢性HBV感染可导致肝功能衰竭、肝硬化和肝癌等严重后果, 每年约有60万人死于HBV感染所致疾病^[1]. 我国曾是全球HBV携带率最高的地区之一, 统计资料表明经过免疫控制后全国仍然有乙型肝炎表面抗原(hepatitis B s antigen, HBsAg)携带者约9300万人^[2]. 因此HBV感染仍然是威胁我国乃至全球人民健康的一个重要问题. 国际上许多研究均证实, 抗病毒治疗可改善患者生存质量, 延长其生存期. 我国及国外的有关乙型肝炎防治指南均明确指出, 慢性乙型肝炎的治疗目标是持续抑制HBV复制, 延缓疾病进展为肝癌或失代偿性肝病^[3-5]. 恩替卡韦是一种强效HBV DNA多聚酶抑制剂. 在其3期的临床随机、双盲对照试验中, 恩替卡韦比拉米夫定有更高的组织学、病毒学和生化学应答率^[6]. 并且两者的安全性相似. 本研究中比较了恩替卡韦和阿德福韦酯对于核苷初治HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者的疗效和安全性。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-11/2008-06贵阳医学院附属医院就诊的核苷初治慢性乙型肝炎患者101例, 诊断标准符合2005年《慢性乙肝防治指南》, 其中男81例, 女20例, 年龄16-70岁. 所有患者同时符合下列条件: (1)HBV DNA滴度 $\geq 1 \times 10^7$ copies/L; (2)入组前连续或累计服用核苷类逆转录酶抑制剂 < 3 mo; (3)血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)值在正常值的0.5-10倍正常上限之间; (4)总胆红素(TB)低于 $34.2 \mu\text{mol/L}$; (5)排除HAV、HCV、HDV、HEV、HIV感染、肝脏失代偿表现和(或)失代偿性肝硬化者、药物性肝炎、合并肾病、高血压和口服核苷类药物达到3 mo以上者. 饮酒史判断标准^[7]: 饮酒超过5年, 折合酒精量男性 ≥ 40 g/d, 女性 ≥ 20 g/d; 或2 wk内有大量饮酒史, 折合

表 1 2组患者性别、HBV感染阳性家族史(n)

	性别		家族史		饮酒史	
	男	女	有	无	有	无
ADV组	42	11	13	40	8	45
ETV组	39	9	17	31	6	42

酒精量 > 80 g/d. 本研究经贵阳医学院附属医院伦理委员会批准, 并获得所有患者自愿签署的知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 分组及治疗: 101例慢性乙型肝炎患者被1:1随机分配到恩替卡韦组(Entecavir, Bristol-Myers Squibb, ETV组)和阿德福韦酯(Adefovir, GlaxoSmithKline, ADV组)组, 分别接受每天0.5 mg恩替卡韦和10 mg阿德福韦酯治疗. 疗效的主要观测指标有: 血清HBV DNA水平减少, HBeAg转阴或和ALT复常. 病毒学反弹^[4]是指继续治疗时HBV DNA比治疗最低值时上升 $\geq 1 \log$.

1.2.2 检测: 血清HBV DNA定量检测采用深圳匹基公司的HBV DNA定量检测法, 核酸扩增仪为PE5700(Applied Biosystems, 美国), 以HBV DNA $> 10^6$ copies/L为阳性. 全自动生化仪(Hitachi 7170, 日本)检测肝功能中ALT、天冬氨酸转移酶(AST)、总TB. 酶联免疫吸附法(上海科华生物公司试剂)测定HBV血清免疫标志物(HBsAg、抗HBs、HBeAg、抗HBe、抗HBc). 以上检测, 在治疗前、治疗24 wk和治疗48 wk各进行1次。

统计学处理 研究结果采用符合方案数据分析. 所有计量数据均以mean \pm SD表示, 应用SPSS11.5软件行t检验. 计数资料采用 χ^2 检验. 所有的统计检验均采用双侧检验. 列表描述所发生的不良事件, 秩和检验评估安全性指标。

2 结果

2.1 患者的基本情况 2组患者性别、年龄、HBV感染阳性家族史、饮酒史、体质量、生化指标及基线HBV DNA对数值比较无统计学差异($P>0.05$, 表1-2)。

2.2 HBV DNA的应答 治疗48 wk, ADV组HBV DNA转阴率为24.52%(13/53), ETV组转阴率为39.58%(19/48), 2组差异无统计学意义($P=0.075$); 但2组HBV DNA减少超过 10^3 copies/mL的比率分别为60.38%(32/53)和95.83%(46/48),

相关报道

刘浏 *et al* 在“恩替卡韦治疗中国人慢性乙型肝炎疗效的系统评价”一文中用荟萃分析方法分析了国内2005-2008年公开发表恩替卡韦治疗成人慢性乙型肝炎的随机对照试验, 认为恩替卡韦可强效、安全抑制HBV复制、改善肝功能, 治疗国人慢性乙肝的疗效优于拉米夫定或阿德福韦酯。

应用要点

本研究对HBeAg阳性核苷初治患者选用抗病毒药物,特别是核苷(酸)类似物治疗有一定参考价值。

表 2 2组患者年龄、体质量、生化指标及基线HBV DNA对数 (mean ± SD)

	年龄(岁)	体质量(kg)	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBL(μmol/L)	HBV DNA (log10拷贝/mL)
ADV组	26.52 ± 6.99	57.91 ± 8.37	103.83 ± 77.11	64.01 ± 28.98	17.72 ± 7.41	8.52 ± 1.06
ETV组	29.23 ± 8.61	59.34 ± 9.12	97.44 ± 47.77	54.86 ± 25.56	14.73 ± 7.58	8.16 ± 1.52

表 3 治疗48 wk时患者HBV DNA (n)

	转阴	<3 log10	<2 log10	<1 log10
ADV组	13	19	16	5
ETV组	19	27	2	0

差异有显著意义($P < 0.001$, 表3)。

2.3 HBeAg的应答 2组均无HBeAg的转阴或血清学转换。

2.4 生化应答 ALT复常率, ETV组为52.08% (25/48), ADV组为28.30% (15/53), 差异有统计学意义($P = 0.015$)。

2.5 病毒学反弹 2组患者在治疗过程中均未出现过病毒学反弹。但ADV组有5例患者在治疗48 wk时, HBV DNA减少<1 log10。

2.6 安全性分析 2组患者总的不良事件发生率分别为77.08% (37/48)和71.69% (38/53), 差异无统计学意义($P = 0.536$)。2组不良事件相同, 主要是轻度到中度的上呼吸道感染、发热、全身乏力、头痛、恶心、皮疹、肌肉酸痛, 各种不良事件的发生率在2组间差异无统计学意义。

3 讨论

阿德福韦酯是一种核苷类似物, 已被广泛应用于临床治疗慢性乙肝。阿德福韦酯每日10 mg单药治疗5年时^[8], 58%的患者出现HBeAg消失, 48%的患者出现HBeAg血清学转换, 67%的患者肝脏组织学炎症得到改善, HBV DNA平均减少4.05 log10。恩替卡韦是目前降低血清HBV DNA效果最强大的口服药。Chang *et al*^[6]报道, 每天服用恩替卡韦0.5 mg, 治疗52 wk HBV DNA下降6.9 log10; 国内李金金 *et al*^[9]报道, 应用恩替卡韦治疗还能同时减轻肝纤维化; 而郑俊福 *et al*^[10]应用其与乙肝免疫蛋白预防肝移植术后乙肝再感染也取得很好的效果; 目前国内专家^[11]建议把恩替卡韦作为核苷初治慢性乙肝患者的一线抗病毒药物之一。

本试验中, 我们共纳入101例患者, 按1:1的比例随机进入恩替卡韦和阿德福韦酯治疗

组, 2组患者在基线时的一般情况、生物化学指标、病毒学指标均衡。恩替卡韦对HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者有较强抑制病毒效应。其中治疗到48 wk时, 95.83%的患者HBV DNA对数值减少大于3 log10。同时, 恩替卡韦治疗也获得了很高的生化学应答率, 52.08%患者ALT复常。阿德福韦酯治疗组中, 相应的HBV DNA减少率为60.38%, 生化学应答率为28.30%。说明恩替卡韦比阿德福韦酯有较强、较快的抑制HBV能力。但2组均无HBeAg转阴或血清学转换, 与Marcellin *et al*^[12]和Chang *et al*^[6]报道不符合。这可能与不同人种对HBV免疫反应不同有关, 需扩大样本观测, 并从多种机制进行分析。

现认为阿德福韦酯安全性较高, 10 mg剂量治疗时其安全性与安慰剂相似。王艳斌 *et al*^[13]报道, 阿德福韦治疗48 wk, 病毒学应答率为78.38%, 并且无明显不良反应。本研究中, ETV组 and ADV组的不良事件发生率和种类相似, 分别为77.08%和71.69%。主要是轻度到中度的上呼吸道感染、发热、全身乏力等非特异表现, 没有出现严重不良事件, 但恩替卡韦的临床应用时间较短仍需要对其安全性做长期观测。

5年的试验研究^[14]表明, 恩替卡韦对于核苷初治患者没有明显耐药。本试验中, ETV组也没有病毒学反弹等耐药的表現。文献报道阿德福韦酯耐药率较低, 治疗2年的耐药率仅3%。本试验中, 阿德福韦酯没有病毒学反弹, 但有5例为原发性治疗失败^[15]。

总之, 本试验中恩替卡韦比阿德福韦酯表现出了较强的抑制HBV DNA能力, 并有更高的生化学应答率, 但2组均没有出现HBeAg转阴, 需要进一步扩大样本量和长期观测。

4 参考文献

- 1 WHO. Hepatitis B. World Health Organization online. 2008-08, cited: 2009-05. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>
- 2 灵霄. 国人乙肝表面抗原携带率显著下降. 中国医学论坛报 2008; 27: A04
- 3 中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会.

- 慢性乙型肝炎防治指南. 中国医学论坛报 2005; 24: 16
- 4 Keefe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, Wright TL. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 936-962
- 5 Liaw YF, Leung N, Guan R, Lau GK, Merican I, McCaughan G, Kane E, Kao JH, Omata M; Asian-Pacific consensus update working party on chronic hepatitis B. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver Int* 2005; 25: 472-489
- 6 Chang TT, Gish RG, de Man R, Gadano A, Sollano J, Chao YC, Lok AS, Han KH, Goodman Z, Zhu J, Cross A, DeHertogh D, Wilber R, Colonna R, Apelian D. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1001-1010
- 7 [Guidelines for diagnosis and treatment of alcoholic liver diseases] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 164-166
- 8 Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Sievert W, Tong M, Arterburn S, Borroto-Esoda K, Frederick D, Rousseau F. Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2008; 48: 750-758
- 9 李金金, 耿长新, 吕志国. 恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎 30例. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 425-428
- 10 郑俊福, 韩大康, 李丽, 罗晓岚, 肖默, 卢实春, 阎军. 恩替卡韦联合乙肝免疫球蛋白预防肝移植术后乙肝再感染. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 716-719
- 11 杨松. 2009年恩替卡韦临床应用专家共识. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)* 2009; 3: 42-45
- 12 Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 808-816
- 13 王艳斌, 谢雯, 欧蔚妮, 闫杰, 成军. 阿德福韦酯对 HBeAg(+)慢性乙型肝炎的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2666-2668
- 14 Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, Wichroski MJ, Xu D, Yang J, Wilber RB, Colonna RJ. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* 2009; 49: 1503-1514
- 15 乙型肝炎病毒耐药专家委员会. 乙型肝炎病毒耐药专家共识. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)* 2008; 2: 90-98

同行评价
本文对ETV治疗慢性乙肝的1年效果进行了临床观察, 该结果对临床上的抗HBV治疗有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊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+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 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 \times 6 cm \times 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_2 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 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , 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值的文句中, 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 \cdot 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酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 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 = 45×10^{-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. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

肝硬化患者骨密度的改变

付 蕾, 周 力, 陈晓琴

背景资料
慢性肝病可引起骨质疏松, 最终可导致骨折的发生率升高。肝病骨质疏松是全身性的, 但测定部位的敏感度及骨密度与肝功能的相关性仍不清楚。

付蕾, 周力, 陈晓琴, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵阳市 550004
作者贡献分布: 本研究资料收集整理、数据分析及本文写作由付蕾完成; 周力与陈晓琴对文章的知识性内容批判性审阅和指导。
通讯作者: 付蕾, 住院医师, 550000, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院消化内科。fulei790318@tom.com
电话: 0851-6672077
收稿日期: 2009-05-15 修回日期: 2009-09-14
接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-09-28

Changes in bone mineral density in patients with liver cirrhosis

Lei Fu, Li Zhou, Xiao-Qin Chen

Lei Fu, Li Zhou, Xiao-Qin Chen, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Correspondence to: Lei Fu, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. fulei790318@tom.com
Received: 2009-05-15 Revised: 2009-09-14
Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To observe changes in bone mineral density (BMD) of the femur and lumbar spine in patients with liver cirrhosis and analyze factors potentially correlated with such changes.

METHODS: Sixty liver cirrhosis patients, of which 22 had Child-Pugh A liver function, 18 had Child-Pugh B, and 20 had Child-Pugh C, and 42 healthy volunteers were included in the study. The BMD of the femur and lumbar spine as well as serum calcium (Ca^{2+}), inorganic phosphate (P^{3+}) and cholinesterase (CHE) were simultaneously measured in both groups. Other parameters such as age, body mass index (BMI) and liver function were also recorded.

RESULTS: The BMD of the femur and lumbar spine was significantly lower in liver cirrhosis patients than in normal controls ($P < 0.05$ and 0.01 , respectively). The BMD of the lumbar spine was significantly lower in patients with Child-Pugh A liver function than in normal controls

and patients with Child-Pugh C liver function (0.851 ± 0.207 vs 1.070 ± 0.222 and 1.036 ± 0.192 , respectively; both $P < 0.05$). A linear correlation was noted between the BMD of the femur and lumbar spine and BMI ($r = 2.3$ and 2.418 , respectively; both $P < 0.05$) as well as between lumbar BMD and CHE ($r = 2.734$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The change in the BMD of the lumbar spine was more significant than that in the BMD of the femur in patients with liver cirrhosis. CHE may predict, to some extent, the change in lumbar BMD.

Key Words: Liver cirrhosis; Bone mineral density; Serum calcium; Cholinesterase

Fu L, Zhou L, Chen XQ. Changes in bone mineral density in patients with liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2850-2853

摘要

目的: 探讨肝硬化患者腰椎、股骨骨密度的改变以及肝功能、血钙、血磷、体质量指数(BMI)等相关因素的关系。

方法: 102名受试者分为两大组: 肝硬化组60例, 其中Child-Pugh A级22例, B级18例, C级20例; 正常对照组42例, 两组均同步检测其腰椎、股骨骨密度 Ca^{2+} 、 P^{3+} 及胆碱酯酶。另外收集肝硬化患者的年龄、BMI以及肝功能等指标。

结果: 肝硬化组腰椎、股骨骨密度均较对照组明显降低($P < 0.05$ 或 0.01)。Child C腰椎骨密度较对照组、Child A级差异明显, 统计学有显著性差异(0.851 ± 0.207 vs 1.070 ± 0.222 , 1.036 ± 0.192 , 均 $P < 0.05$)。肝硬化患者的腰椎、股骨骨密度均与BMI有直线相关性($r = 2.3$, 2.418 , 均 $P < 0.05$), 同时腰椎骨密度还与胆碱酯酶有直线相关性($r = 2.734$, $P < 0.05$)。

结论: 慢性肝硬化患者腰椎骨密度的改变比股骨明显; 胆碱酯酶反应了肝脏的储备能力与肝脏损害的程度, 一定程度上可预测肝硬化腰椎骨密度是否改变。

同行评议者
黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

关键词: 肝硬化; 骨密度; 血钙; 胆碱酯酶

付蕾, 周力, 陈晓琴. 肝硬化患者骨密度的改变. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2850-2853
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2850.asp>

0 引言

慢性肝病所引起的骨代谢异常被称为肝性骨病. 肝硬化可导致骨密度减少及骨质疏松, 骨密度(bone mineral density, BMD)检查是判断骨质疏松的主要诊断依据. 目前许多文献都探讨了肝硬化时尺骨、桡骨BMD的改变, 而对腰椎及股骨BMD改变的相关文献非常少. 因此本文主要探讨肝硬化时, 腰椎及股骨BMD的改变.

1 材料和方法

1.1 材料 选自2006-2008年在我院住院的男性肝硬化患者60例, 年龄45-66(平均年龄54.7)岁, 体质量指数(body mass index, BMI)17.26-26.06 kg/cm². 其中肝炎后肝硬化28例, 酒精性肝硬化18例, 原发性胆汁性肝硬化1例, 混合性肝硬化12例, 隐源性肝硬化1例. 60例患者Child-Pugh分级分别为: A级22例, B级18例, C级20例. 根据实用消化病学肝硬化诊断要点^[1], 进行综合判断. 骨质疏松诊断采用1994年世界卫生组织定义骨质疏松(osteoporosis, OP)为BMD较成年人骨量峰值减低2.5个标准差以上^[2]. 对照组: 42例, 均为男性, 年龄47-65(平均年龄55.2)岁, BMI 18.13-28.25 kg/cm². 除外肝、肾、血液及内分泌系统疾病等患者, 均为健康体检者. 其中, 长期饮酒的健康体检者也被排除. 对照组年龄、BMI与肝硬化组无统计学差异.

1.2 方法 肝硬化组每位患者均行肝功能检查. 肝硬化组与对照组均同步检测腰椎、股骨BMD、血Ca²⁺、P³⁺、胆碱酯酶测定. 采用通用电气公司lunar双能量X线吸收BMD测量仪检测受试者腰椎、股骨BMD. 生化指标测定采用贝克曼CX-7全自动生化分析仪.

统计学处理 试验数据以mean±SD表示. 计量资料采用t检验; 两因素分析采用直线相关分析法. 统计学处理应用SPSS11.5统计软件分析. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 BMD、血钙、胆碱酯酶的变化 肝硬化组腰椎BMD、股骨BMD均较对照组明显降低. Child C腰椎BMD较对照组、Child A级差异明显, 统

计学有显著性差异(0.851 ± 0.207 vs 1.070 ± 0.022 , 1.036 ± 0.192 , 均 $P<0.05$). 肝硬化组Child C级与Child B级、Child A级股骨BMD与对照组相比虽然有明显下降, 但差异无显著统计学意义($P>0.05$). 肝硬化患者的血钙浓度较对照组均有明显下降, 其中Child C级较对照组; Child B级与对照组比较差异明显, 有统计学意义(1.933 ± 0.183 , 2.078 ± 0.131 vs 2.18 ± 0.173 , 均 $P<0.05$). Child A级、Child B级、Child C级肝硬化患者的胆碱酯酶逐渐下降. Child A级、Child B级、Child C级较对照组有明显降低, 统计学有显著性差异(3506.957 ± 943.429 , 2093.687 ± 959.802 , 1594.033 ± 873.392 vs 5481.820 ± 488.223 均 $P<0.001$, 表1).

2.2 各项指标与腰椎BMD的相关性 肝硬化患者的腰椎BMD与患者年龄、BMI、血Ca²⁺、血P³⁺、肝功能各项指标进行直线相关分析. 结果只有BMI及胆碱酯酶与腰椎BMD呈直线相关($r=2.3, 2.734$, 均 $P<0.05$, 表2).

2.3 各项指标与股骨BMD的相关性 肝硬化患者的股骨BMD与患者年龄、BMI、血Ca²⁺、血P³⁺、肝功能各项指标进行直线相关分析. 结果只有BMI与股骨BMD呈直线相关($r=2.418$, $P<0.05$, 表3).

3 讨论

本研究显示, 肝硬化患者有低血钙状态, 并且与肝功能Child-Pugh级别逐渐增加而降低明显, 表明肝脏病变程度越重, 血钙浓度越低. 可能与下列因素有关: (1)低蛋白血症: 肝硬化时由于肝脏合成蛋白能力下降, 而导致低蛋白血症. 血清钙在体内以离子钙、蛋白结合钙及少量弥散钙3种形式存在, 以蛋白结合钙为主. 一般在体内70%-85%蛋白结合钙与血清白蛋白相结合. 肝硬化时血清白蛋白减少, 蛋白结合钙与蛋白结合减少^[3], 再加上由于肝硬化导致的钙的吸收减少, 故而血清总钙浓度下降. (2)正常情况下, 维生素D₃首先经肝脏在25位上羟化形成25-OHD₃, 随后经肾脏在1位上羟化形成1, 25-(OH)₂D₃. 由于肝硬化是弥漫性肝实质性的损害, 维生素D在肝脏进行的25位上的羟化作用受损. 25-OHD₃合成减少, 导致肾脏合成具有活性1, 25-(OH)₂D₃减少, 肠道黏膜对钙的吸收减少, 最后导致低钙血症. (3)肝硬化门脉高压与低钙血症关系: 肝硬化门脉高压时, 胃肠道淤血, 钙吸收减少. (4)胆汁分泌减少: 肝硬化时, 由于肝细胞受损, 分泌胆

研发前沿
尽管慢性肝病会引起骨质疏松已得到广泛认可, 但腰椎与股骨骨密度变化最敏感的部位仍不清楚. 是目前该领域研究难点.

应用要点
本研究结果提示在临床工作中,对于胆碱酯酶过低的患者,要注意预防骨折的发生。

表 1 对照组和肝硬化组BMI、BMD、Ca²⁺、P³⁺及CHE指标的检测结果

分组	n	BMD(g/cm ²)		Ca ²⁺ (mmol/L)	P ³⁺ (mmol/L)	CHE(IU/L)
		腰椎	股骨			
肝硬化组						
Child A级	22	1.036 ± 0.192	0.939 ± 0.183	2.123 ± 0.381	1.011 ± 0.173	3506.957 ± 943.429 ^b
Child B级	18	0.997 ± 0.224	0.921 ± 0.178	2.078 ± 0.131 ^a	1.153 ± 0.262	2093.687 ± 959.802 ^b
Child C级	20	0.851 ± 0.207 ^{ac}	0.854 ± 0.211	1.933 ± 0.183 ^a	1.010 ± 0.397	1594.033 ± 873.392 ^b
对照组	42	1.070 ± 0.220	0.932 ± 0.174	2.180 ± 0.173	1.181 ± 0.080	5481.820 ± 498.223

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs Child A级。

表 2 各项指标与腰椎BMD的相关性

分组	相关系数	P值
年龄	-0.047	>0.05
BMI	2.300	<0.05
Ca ²⁺	1.305	>0.05
P	1.075	>0.05
ALT	0.346	>0.05
AST	0.488	>0.05
ALT/AST	0.415	>0.05
TBIL	-0.470	>0.05
DBIL	-0.410	>0.05
IBIL	-0.632	>0.05
白蛋白	0.651	>0.05
球蛋白	0.208	>0.05
A/G	0.529	>0.05
碱性磷酸酶	0.641	>0.05
γ-谷氨酰转肽酶	0.134	>0.05
胆碱酯酶	2.734	<0.05

表 3 各项指标与股骨BMD的相关性

分组	相关系数	P值
年龄	-1.838	>0.05
BMI	2.418	<0.05
Ca ²⁺	0.585	>0.05
P	0.586	>0.05
ALT	0.102	>0.05
AST	0.114	>0.05
ALT/AST	0.404	>0.05
TBIL	0.241	>0.05
DBIL	0.190	>0.05
IBIL	0.366	>0.05
白蛋白	-0.705	>0.05
球蛋白	-0.046	>0.05
A/G	0.196	>0.05
碱性磷酸酶	0.565	>0.05
γ-谷氨酰转肽酶	0.032	>0.05
胆碱酯酶	0.536	>0.05

汁减少,肠道内胆盐也随之减少,影响了维生素D的吸收。

本组资料显示,肝硬化患者胆碱酯酶活性下降与患者BMD呈直线相关。胆碱酯酶是由肝脏合成的,肝细胞损害后,此酶合成减少。胆碱酯酶是肝硬化发展过程中,反映肝脏储备功能较敏感的指标,与肝病的严重程度平行,可判别肝脏损害的程度。本组资料显示肝硬化组腰椎BMD与胆碱酯酶呈直线相关,且腰椎BMD与肝功能分级有关,随Child-Pugh分级逐渐降低。因此胆碱酯酶可预测肝硬化损害程度,还可以预测肝硬化患者腰椎BMD是否改变。

在其他OP的相关文献中,资料表明BMD与BMI呈正相关^[4-7]。本研究中,我们发现肝硬化患者的BMD异常与BMI直线相关。随着BMI减少,BMD呈下降趋势。与任芸芸 *et al*认为当BMI<30 kg/cm²时,随着BMI增加,BMD呈上升趋势,当超

过30 kg/cm²后反而下降^[6]相一致。由于腹水对体质量改变的影响,此次研究没有能验证肝硬化患者的BMD在排除掉腹水对体质量的影响后,与患者的实际BMI呈正相关。所以BMI虽然可预测肝硬化BMD的情况,但前提需排出腹水对BMI的影响。

本研究显示肝硬化患者的腰椎和股骨BMD相比较,腰椎更容易发生OP。我们认为这可能与腰椎含有大量松质骨,代谢快有关。这与OP的机制中,慢性钙缺乏主要侵犯椎体一致。这个结果与陈琳 *et al*研究有所不同。在她们的研究中指出乙型肝炎后肝硬化患者股骨颈、Ward三角最为明显,OP的好发部位依次为股骨近端、腰椎、前臂^[8]。他们并没有在文中提出所收集的肝硬化患者的Child-Pugh分级、胆碱酯酶等肝功能的具体情况,因而,我们考虑可能是由于我们与他们研究的患者肝硬化病因及肝损程度不同而导

致结果不一样. 我们研究的患者除乙型肝炎后肝硬化外, 还有酒精性肝硬化、原发性胆汁性肝硬化、隐源性肝硬化、混合性肝硬化. 而陈琳 *et al* 的研究对象都为乙型肝炎后肝硬化. 在我们的研究中发现, 虽然不同病因的肝病对血钙及BMD的影响是有区别的, 但是影响结果并无明显的统计学差异, 这可能与我们的例数较少有关. 关于不同病因的肝病BMD的研究, 我们计划在后续的研究中, 通过增加例数来进行进一步研究. 同时, 因为陈琳 *et al* 没有在文献中提到他们研究的患者具体的肝功能分级及胆碱酯酶等肝功能情况, 所以, 这可能也是导致我们研究结果不一致的原因. 另外, 我们的研究发现肝功能Child C级比Child B级、Child A级的BMD改变更明显, 更容易发生OP及骨量减少. 提示肝硬化的病变参与了OP的发生. 动态观察BMD可提示肝硬化损害所致骨病的程度, 也可预测肝硬化的病情进展.

OP是肝硬化的常见并发症. 肝硬化中腰椎的OP比股骨更加明显. 胆碱酯酶、 Ca^{2+} 、BMI对肝硬化患者的BMD改变呈正相关. 胆碱酯酶反应了肝脏的储备能力, 反应了肝脏损害的程度, 在一定程度上可预测肝硬化腰椎BMD是否改变. BMI虽然也可预测肝硬化BMD的情况, 但前提需排除腹水对BMI的影响. 动态观察BMD可提示肝硬化损害所致骨病的程度, 也可预测肝硬化的病情进展.

4 参考文献

- 1 于皆平, 沈志详, 罗和生. 实用消化病学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2007: 751
- 2 Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994; 843: 1-129
- 3 安纪红, 王勇. 肝硬化患者血清钙、磷、甲状旁腺素及骨密度指标的变化与Child-Pugh分级的关系. *传染病信息* 2007; 20: 107-128
- 4 李兰, 周侗, 邵康. 体重质量指数与557例绝经后妇女骨密度变化的关系研究. *中国骨质疏松杂志* 2004; 10: 493-494
- 5 Wang MC, Bachrach LK, Van Loan M, Hudes M, Flegal KM, Crawford PB. The relative contributions of lean tissue mass and fat mass to bone density in young women. *Bone* 2005; 37: 474-481
- 6 任芸芸, 张玉华, 常才. 绝经后骨丢失的初步探讨及体重指数对骨密度的影响. *中国医学影像技* 1999; 15: 723-724
- 7 Barrea G, Bunout D, Gattas V, de la Maza MP, Leiva L, Hirsch S. A high body mass index protects against femoral neck osteoporosis in healthy elderly subjects. *Nutrition* 2004; 20: 769-771
- 8 陈琳, 陈友华, 黄云花. 肝硬化患者骨密度测定的临床意义. *江苏医药杂志* 2002; 28: 474
- 9 余小虎. 肝硬化性骨质疏松研究进展. *国外医学·消化疾病分册* 2003; 23: 111-113
- 10 王义国, 刘倩, 王文奇, 陈自平, 闫明先. 乙型肝炎肝硬化骨代谢异常的临床研究. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 33-36
- 11 赵军, 伍庆. 阻塞性黄疸患者骨密度的改变. *四川省卫生管理干部学院学报* 1999; 18: 62
- 12 吴冀川, 李蓬秋, 张学军. 酗酒与骨质疏松18例分析. *中国实用内科杂志* 2001; 21: 552
- 13 Szalay F, Folhoffer A, Horvath A, Csak T, Speer G, Nagy Z, Lakatos P, Horvath C, Habior A, Tornai I, Lakatos PL. Serum leptin, soluble leptin receptor, free leptin index and bone mineral density in patients with primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 923-928
- 14 陈自平, 刘倩, 王文奇, 闫明先. 乙肝后肝硬化患者血清IL-1 β 、TNF- α 变化和骨质改变的关系. *临床肝胆病杂志* 2000; 16: 216-218
- 15 张小晋, 宋丽清. 慢性肝病骨代谢的临床研究初步探讨. *中华消化杂志* 1996; 16: 55-56
- 16 陈晓琴, 周力, 姜琼, 吕锐. 测定血清胆碱酯酶活力在肝硬化疗效及预后观察中的意义. *贵州医药* 2001; 25: 102-103

同行评价

本文研究内容较重要, 为肝硬化病情预测提供了充足的有意义的信息, 有一定的意义.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学实验数据库对结直肠癌血清标志物的鉴定

蔡建, 高春芳, 范乃军, 盛新华, 赵光, 王秀丽

背景资料
SELDI-TOF-MS是近几年发展起来的一种蛋白质组学技术, 目前制约该技术应用发展的瓶颈是其最终结果仅为质荷比(m/z), 发现差异蛋白后仍需通过复杂的技术手段完成蛋白质的鉴定。匹兹堡大学生物医学信息学系建立了将质荷比(m/z)与先前所鉴定的蛋白质相关联的检索工具, 即蛋白质组学实验数据库(EPO-KB), 使学者们可直接根据 m/z 完成对差异蛋白质的检索。

蔡建, 范乃军, 盛新华, 中国人民解放军第二军医大学 上海市 200433

蔡建, 高春芳, 赵光, 王秀丽, 中国人民解放军第150中心医院全军肛肠外科研究所 河南省洛阳市 471031

作者贡献分布: 蔡建与高春芳对此文所作贡献均等; 此课题由蔡建与高春芳设计; 研究过程由蔡建、高春芳、范乃军、盛新华、赵光及王秀丽操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由高春芳提供; 数据分析由蔡建、赵光及王秀丽完成; 本论文写作由蔡建与范乃军完成。

通讯作者: 高春芳, 教授, 博士生导师, 471031, 河南省洛阳市, 中国人民解放军第150中心医院全军肛肠外科研究所。

gaochunfang150@163.com

电话: 0379-64169323

收稿日期: 2009-04-23 修回日期: 2009-08-27

接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-09-28

Combined use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and empirical proteomic ontology knowledge base for identification of serum biomarkers for colorectal cancer

Jian Cai, Chun-Fang Gao, Nai-Jun Fan, Xin-Hua Sheng, Guang Zhao, Xiu-Li Wang

Jian Cai, Nai-Jun Fan, Xin-Hua Sheng, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jian Cai, Chun-Fang Gao, Guang Zhao, Xiu-Li Wang, Institute of Anal-colorectal Surgery, the 150th Central Hospital of Chinese PLA, Luoyang, Henan Province, China, 471031

Correspondence to: Professor Chun-Fang Gao, Institute of Anal-colorectal Surgery, the 150th Central Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China. gaochunfang150@163.com

Received: 2009-04-23 Revised: 2009-08-27

Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-09-28

Abstract

AIM: To determine the feasibility of combined use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) and empirical proteomic ontology knowledge base (EPO-KB) for identification of serum biomarkers for colorectal cancer.

METHODS: Serum samples from 169 colorectal cancer patients and 83 age- and gender-matched

healthy individuals were analyzed by SELDI-TOF-MS using immobilized metal affinity capture 30 (IMAC30) proteinchip arrays. The resulting SELDI-TOF-MS spectral data were analyzed using the Biomarker Wizard™ and Biomarker Patterns™ software to find differential proteins and develop a classification tree for colorectal cancer. The differential proteins were identified by searching the EPO-KB and verified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: A total of 34 mass peaks were identified. Four peaks at mass:charge ratios (m/z) of 2873, 3163, 6121 and 7778 were used to construct the classification tree. The classification tree could effectively distinguish colorectal cancer samples from control samples, achieving a sensitivity and specificity of 91.57% and 90.53% in training mode, and 82.25% and 80.72% in test mode, respectively. Database search revealed that the peak at a m/z of 7778 corresponded to platelet factor 4 (PF4). ELISA detection of PF4 showed that serum PF4 level was significantly higher in colorectal cancer patients than in healthy controls ($P < 0.01$), with a sensitivity and specificity of 61.1% and 76.9%, respectively.

CONCLUSION: Combined use of SELDI-TOF-MS and EPO-KB is feasible for identification of serum biomarkers for colorectal cancer. PF4 (m/z at 7778) is significantly upregulated in colorectal cancer patients, providing a new biomarker for colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Platelet factor 4; Biological markers; SELDI-TOF-MS; EPO-KB

Cai J, Gao CF, Fan NJ, Sheng XH, Zhao G, Wang XL. Combined use of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and empirical proteomic ontology knowledge base for identification of serum biomarkers for colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2854-2858

摘要

目的: 探讨表面增强激光解析离子化飞行时

同行评议者
陈立波, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

间质谱仪(SELDI-TOF-MS)联合蛋白质组学实验数据库方法研究结直肠癌患者血清标志物的可行性。

方法:应用SELDI-TOF-MS对169例结直肠癌患者与83例正常人血清进行了蛋白质谱检测,通过Biomarker Wizard™与Biomarker Patterns™软件分析发现差异蛋白,建立结直肠癌诊断模型;用蛋白质组学实验数据库检索鉴定出有意义的差异蛋白,并用ELISA法对结直肠癌患者及正常人血清样本中差异蛋白表达进行验证。

结果:发现34种差异蛋白,以质荷比(m/z)为2873, 3163, 6121, 7778的4种差异蛋白组成的分类树诊断模型,在学习模式下其诊断结直肠癌的灵敏度为91.57%,特异度为90.53%;在测试模式下分别为82.25%, 80.72%。其中 m/z 为7778的蛋白峰强度在结直肠癌患者血清中明显高于正常人($P<0.01$),数据库检索结果提示该蛋白为血小板因子4(PF4)。ELISA法测定结直肠癌患者血清PF4水平显著高于正常人($P<0.01$),其灵敏度及特异度分别为61.1%, 76.9%。

结论:SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学实验数据库的方法简便可行,可为蛋白芯片研究提供新思路;PF4($m/z = 7778$)在结直肠癌患者血清中明显升高,是结直肠癌患者新的血清学标志物。

关键词:结直肠癌;血小板因子4;生物标志物;表面增强激光解析离子化飞行时间质谱;蛋白质组学实验数据库

蔡建, 高春芳, 范乃军, 盛新华, 赵光, 王秀丽. SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学实验数据库对结直肠癌血清标志物的鉴定. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2854-2858
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2854.asp>

0 引言

结直肠癌居我国肿瘤发病率的第3位,约1/3的患者治疗时已属晚期。现有临床指标因敏感性和特异性低,难以达到早发现、早诊断的要求。表面增强激光解析离子化飞行时间质谱仪(SELDI-TOF-MS)是近几年发展起来的一种蛋白质组学技术,具有快速、灵敏、高通量、可对复杂的生物学样本直接检测等特点,已广泛用于肿瘤血清标志物的筛查^[1-4]。目前制约该技术应用发展的瓶颈是其最终结果仅为质荷比(m/z),发现差异蛋白后仍需通过色谱分离纯化、二维电泳、光谱、

质谱定量定性等技术进一步完成对蛋白质的鉴定,然后才能推广应用于临床检验或进一步的研究。但这些手段技术条件要求高、仪器昂贵、步骤繁琐、耗时长,不适于大规模对生物标志物的筛查。匹兹堡大学生物医学信息学系根据目前已经发表的120篇文献,建立了将质荷比(m/z)与先前所鉴定的蛋白质相关联的检索工具,即蛋白质组学实验数据库(EPO-KB),使我们可直接根据 m/z 完成对差异蛋白质的检索^[8]。目前该数据库建立不到2年,其意义及作用有待进一步为广大研究者所接受。本研究的目的在于通过SELDI-TOF-MS联合EPO-KB对结直肠癌血清标志物进行研究,发现潜在的血清标志物,并初步探索这一研究方法的可行性及存在的问题。

1 材料和方法

1.1 材料 结直肠癌患者169例,男90例,女79例,年龄22-82(中位年龄56岁)血清标本来自解放军第150中心医院2006-10/2008-03住院患者;健康志愿者83例,男50例,女33例,年龄25-65(中位年龄45岁)。血清标本来自2007年在解放军第150中心医院健康体检者。取样人群有相似的暴露史,汉族。结直肠癌患者均经术后病理检查,根据AJCC的TNM分期2004诊断为结直肠癌,无家族史。正常人除外肿瘤及炎症性、代谢性等影响血清蛋白表达的相关疾病。告知所有受试者本人或其家属该研究的目的、方法及意义,经同意后签署知情同意书。尿素、乙腈、三氟乙酸、SPA(sinapinic)、CHAPS、Tris-HCL等均购自Sigma公司,ProteinChip Biology System(PBS II+)及其配套的固相金属螯合(immobilized metal affinity capture, IMAC30-Cu²⁺)蛋白芯片,SELDI-TOF-MS购自美国CiphaGen Biosystem公司。血小板因子4(platelet factor 4, PF4)酶联免疫检测试剂盒购自(美国RnD公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集:各采集全血4-5 mL,立即放入4℃冰箱静置2 h,4℃ 700 g 离心30 min,吸取血清,按每管分装100 μ L,置-70℃冰箱保存。

1.2.2 标本准备:用Cibacron Blue除去血清白蛋白后,取20 μ L分别加40 μ L U9缓冲液(含9 mol/L尿素,2% CHAPS,50 mmol/L Tris-HCl pH9.0),4℃振荡30 min使蛋白质变性。将120 μ L结合/洗脱缓冲液(含100 mmol/L磷酸钠,500 mmol/L氯化钠,pH7.0,即IMAC缓冲液)加入1.5 mL离心管,每管加入10 μ L变性后的血清样品,4℃振荡30 min。

研发前沿
应用SELDI-TOFMS技术进行比较蛋白质组学研究已成为疾病蛋白质组学研究的热点。基于对患者的体液或组织中差异蛋白的分析,目前已经建立了大量的疾病的诊断模型。但受到该技术本身限制,在发现差异蛋白峰及建立诊断模型后,如何进一步完成对蛋白质的鉴定是目前研究的重点和难点,也是限制该技术广泛应用的关键。

创新盘点

本文在SELDI蛋白质组学研究中应用了蛋白质组学实验数据库(EPO-KB),并初步论证了这一不同于经典的蛋白质鉴定的研究路线的方法的可行性.发现并验证了PF4在结直肠癌患者与正常人血清中具差异表达,有潜在的临床应用价值.

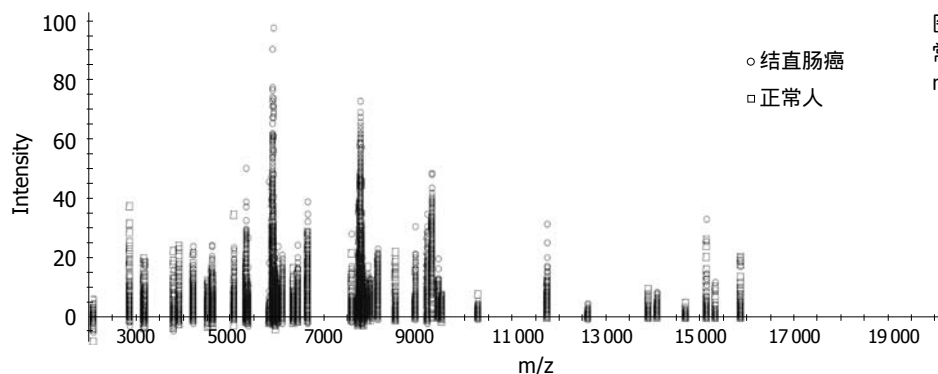


图1 结直肠癌和正常人34种差异蛋白在m/z横坐标上的分布.

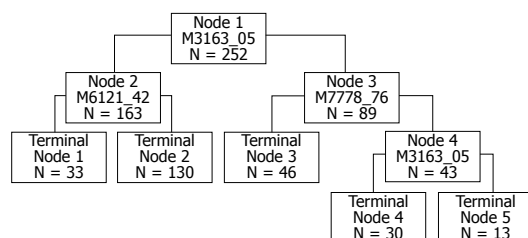


图2 分类树模型示意图.

1.2.3 芯片的预处理: 芯片每孔加100 mmol/L硫酸铜50 μ L, 室温下振荡5 min, 弃硫酸铜, 用去离子水冲洗5次后甩干, 每孔中加入100 mmol/L醋酸钠50 μ L(pH4.10)室温下振荡5 min, 弃除未结合的铜离子. 芯片每孔加入150 μ L IMAC缓冲液后, 置振荡器上室温孵育5 min后弃缓冲液, 重复1次. 每孔加入50 μ L稀释标本, 置振荡器上4 $^{\circ}$ C孵育60 min后弃缓冲液. 用150 μ L IMAC缓冲液冲洗3次, 每次振荡5 min, 最后1次用1 mmol/L HEPES pH7.0快速冲洗, 取出芯片, 在每孔周围用疏水笔圈样品孔并风干. 在2 mg EAM(SPA)中加75 μ L乙氰和1% TFA 75 μ L, 充分振荡5 min, 确保SPA全部溶解, 离心1 min; 每孔分2次加SPA(0.5 μ L/次), 2次之间允许各孔风干.

1.2.4 芯片检测: 用加有All-in-one标准蛋白质的NP20芯片校正质谱仪, 设定仪器参数, 在CiphergenProteinChip 软件中设定读片程序, 以读取芯片数据. 计算机以每秒1 G Hz的速度从所获得的原始数据快速精确的绘制出蛋白质质谱图. (1)蛋白质m/z: 结合EAM后的蛋白质在激光的轰击下电离, 带有电荷的蛋白质在加速电场的作用下, 不同质荷比的蛋白质在长度一定的真空管中飞行所需的时间不同, 蛋白质的m/z与离子飞行时间的平方成正比. 公式为: $E = UZ = 1/2 mv^2$; $t = L/V$ 推出 $m/z = Kt^2 = (2U/L^2)t^2$. 其中Z为离子所带电荷数, U为电压, V为飞行速度, L为加速飞行电场电压, K为常数. (2)蛋白质相对含量: 带有正电荷的蛋白质离子束在到达检测

器的一瞬间, 电子倍增器将产生瞬时电流($I_t = Q/t$), 其中Q为t时, 检测到的电荷数可转换成蛋白质的相对含量.

1.2.5 差异蛋白的数据库检索: 应用匹兹堡大学的EPO-KB对差异蛋白峰的m/z进行检索, 检索界面网址<http://www.dbmi.pitt.edu/EPO-KB/Query.jsp>. 检索条件为: SELDI平台, IMAC30芯片, 血清标本, m/z误差范围<0.5%.

1.2.6 差异蛋白的验证: 随机从试验样本中选取80例血清样本(其中结直肠癌54例, 正常人26例), 按试剂盒说明书操作并记录结果, 统计分析绘制ROC曲线, 评价其诊断效力.

统计学处理 将获得的SELDI-TOF-MS蛋白质质谱图进行标准化处理后, 采用Biomarker Wizard和Biomarker Pattern软件进行差异蛋白的筛选和分类树的建立. 以SPSS软件(13.0版本, SPSS INC, Chicago, IL, USA)进行病例资料及ELISA实验结果的分析, 其中对ELISA实验结果的分析使用非参数检验(Mann-Whitney U test), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著. 用ROC曲线来选择能够将结直肠癌和正常对照组分开的合适值(包括蛋白峰强度和A值).

2 结果

2.1 芯片检测及分类树诊断模型的建立 用Biomarker Wizard软件对169例结直肠癌与83例正常人血清蛋白质质谱图比较, 结果共捕获34种差异蛋白质. 其中6种蛋白在结直肠癌患者血清中的相对含量偏低, 28种相对含量偏高, 他们在质荷比横坐标上的分布如图1. 采用Biomarker Pattern软件对模板组差异蛋白进行分析, 以m/z分别为2873, 3163, 6121, 7778等4种差异蛋白组成了分类树诊断模型(图2). 在学习模式下其诊断灵敏度91.57%, 特异度90.53%, 在测试模式下其诊断灵敏度82.25%, 特异度80.72%.

2.2 数据库检索结果 对分类树模型中m/z分别

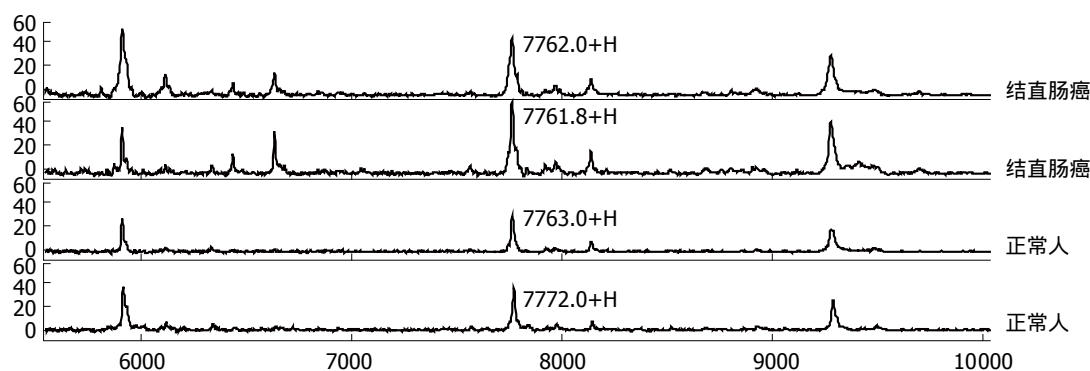


图 3 m/z 为7778差异蛋白的质谱图。

名词解释

SELDI-TOF-MS: 即表面增强激光解析离子化飞行时间质谱, 由美国Ciphergen Biosystems公司发明, 是蛋白质芯片和质谱技术的结合, 主要由蛋白质芯片、芯片阅读器和生物信息学三大部分组成, 其表面可结合蛋白质的固体点, 具有高通量、高灵敏度等技术优势。

为2873, 3163, 6121, 7778的4种差异蛋白在EPO-KB中进行检索, 结果发现 m/z 为7778的蛋白质为PF4, 其余均未检索到。结直肠癌患者 m/z 为7778的蛋白质平均峰强度为 33.67 ± 17.48 , 正常人为 17.49 ± 12.8 ($P < 0.01$, 图3)。其ROC曲线下面积为0.772。以蛋白峰强度24.098 11040为诊断界值, $>24.098 11040$ 诊断为结直肠癌, $<24.098 11040$ 诊断为正常人, 则其诊断灵敏度为69.2%, 特异度为77.1%。

2.3 ELISA检验结果 应用非参数检验(Mann-Whitney U test), 两组差异极显著($P < 0.01$)。其ROC曲线下面积为0.709。以A值0.78800为诊断界值, >0.78800 诊断为结直肠癌, <0.78800 诊断为正常人, 其诊断灵敏度为61.1%, 特异度为76.9%。

3 讨论

目前, 结直肠癌血清学诊断方法仍仅限于CEA、CA19-9等少数几个肿瘤标志物, 不能满足临床诊断的需要。SELDI-TOF-MS是一项非常具有潜力的适于差异蛋白质组学研究的新技术, 已成功筛选出卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌等肿瘤蛋白标志物^[1-4]。我们已应用SELDI-TOF-MS技术建立了结直肠癌的诊断、分期等多个分类树模型^[5-9]。SELDI-TOF-MS的结果是 m/z , 而不是相对分子质量, 更不是具体的蛋白质。然而, 从头开始的鉴定蛋白质的工作恰恰是最繁杂的, 最困难的, 而且对不同质荷比的蛋白质进行鉴定的实验方法及流程也不相同。这严重限制了SELDI技术的应用。有没有一种方法能让我们简单的突破蛋白质鉴定这一瓶颈呢? 这也正是Jonathan *et al*^[10]建立EPO-KB的初衷。其实, 很多蛋白质组学的研究者已经完成了大量的基于质谱技术的蛋白质鉴定的工作^[11-13], 然而他们并不完全清楚其鉴定出的蛋白质在不同疾病中的意义。这些前人的研究成果正是EPO-KB的

资料来源。该数据库建立较晚, 第一篇介绍他的文章刊登在2008年生物信息学杂志上, 目前尚未有将其应用于研究的报道。由于基于SELDI-TOF-MS平台, 应用相同芯片进行的实验本身有很好的可重复性, 本研究尝试将其应用于结直肠癌血清标志物的研究。我们得到的 m/z 为7778的蛋白质峰值与应用PF4 ELISA试剂盒对结直肠癌进行诊断得到的预测值基本一致, 验证了我们通过数据库检索得到的结果, 也进一步证明了SELDI-TOF-MS联合EPO-KB的可行性。在SELDI的基础上联合EPO-KB将使我们有可能绕过复杂的蛋白质鉴定过程, 在海量的蛋白质峰中快速得到我们所需要的蛋白质, 大大缩短研究进程。

PF4是一种血小板衍生因子, 具有抑制肿瘤血管形成的作用。Dymicka-Piekarska *et al*^[14]研究发现, PF4在结直肠癌患者血清中高表达。Cervi *et al*^[15]研究发现, PF4在多种肿瘤早期高表达。我们曾报道过 m/z 为7768的蛋白质峰在结直肠癌中明显上调^[6], 与7778两者 m/z 差异 $<0.5\%$, 通过数据库检索两者得到的结果相同。虽然通过ELISA法检测PF4诊断结直肠癌灵敏度和特异度尚不十分理想, 但其作为结直肠癌的候选标志物仍有进一步研究及临床应用的价值。我们在建立4个不同质荷比的蛋白峰的诊断模型后, 只有 m/z 为7778的蛋白质经检索为PF4。而7778并不是其中诊断效力最好的蛋白峰, 分析原因如下: 目前该数据库建立时间较短, 未涵盖所有的蛋白质, 本次实验着重探索这一方法的可行性, 我们在检索条件下限制为我们实验室使用的IMAC30芯片, 而该数据库中涵盖了目前研究使用的各种不同类型、型号的芯片, 如果能进一步证明在不同型号、类型芯片之间SELDI数据的可重复性, 将明显扩大检索范围。诊断模型的

同行评价

本文通过SELDI-TOF-MS联合蛋白质组学数据库验证了PF4在结肠癌中具有较高敏感性和特异性,认为该方法可以提高诊断效能。

建立明显优于依靠单一蛋白质的诊断,他进一步明确了模型中的蛋白质及其诊断的界值。通过免疫学的方法建立诊断模型将为今后临床应用提供一条新的思路。

4 参考文献

- 1 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 2 Grizzle WE, Semmes OJ, Basler J, Izbicka E, Feng Z, Kagan J, Adam BL, Troyer D, Srivastava S, Thornquist M, Zhang Z, Thompson IM. The early detection research network surface-enhanced laser desorption and ionization prostate cancer detection study: A study in biomarker validation in genitourinary oncology. *Urol Oncol* 2004; 22: 337-343
- 3 Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, Schubert J, Melle C, Junker K. ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol* 2005; 47: 885-893; discussion 893-894
- 4 Pan YZ, Xiao XY, Zhao D, Zhang L, Ji GY, Li Y, Yang BX, He DC, Zhao XJ. Application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight-based serum proteomic array technique for the early diagnosis of prostate cancer. *Asian J Androl* 2006; 8: 45-51
- 5 赵光, 高春芳, 宋国英, 李冬晖, 王秀丽. 血清中蛋白质组构型对结肠癌的诊断意义. *癌症* 2004; 23: 614-618
- 6 高春芳, 赵光, 宋国英, 李冬晖, 王秀丽, 许洋, 马龙华. 用飞行质谱技术筛选结肠癌患者中特异性生物标志物的临床意义. *中华检验医学杂志* 2003; 26: 658-661
- 7 高春芳, 赵光, 郑国宝, 李冬晖, 王秀丽. 利用血清中蛋白质组构型鉴定Dukes A期结肠癌. *解放军医学杂志* 2005; 30: 460-462
- 8 张剑锋, 高春芳, 王秀丽, 郑国宝, 李冬晖, 沈东海. 结肠癌分类树模型建立的初步探讨. *中华消化杂志* 2007; 27: 487-488
- 9 张剑锋, 高春芳, 王秀丽, 郑国宝, 李冬晖. 结肠癌肿瘤标记物的筛选及其表达变化. *中华外科杂志* 2007; 45: 459-461
- 10 Lustgarten JL, Kimmel C, Ryberg H, Hogan W. EPO-KB: a searchable knowledge base of biomarker to protein links. *Bioinformatics* 2008; 24: 1418-1419
- 11 Timms JF, Arslan-Low E, Gentry-Maharaj A, Luo Z, T'Jampens D, Podust VN, Ford J, Fung ET, Gammerman A, Jacobs I, Menon U. Preanalytic influence of sample handling on SELDI-TOF serum protein profiles. *Clin Chem* 2007; 53: 645-656
- 12 Vermeulen R, Lan Q, Zhang L, Gunn L, McCarthy D, Woodbury RL, McGuire M, Podust VN, Li G, Chatterjee N, Mu R, Yin S, Rothman N, Smith MT. Decreased levels of CXC-chemokines in serum of benzene-exposed workers identified by array-based proteomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17041-17046
- 13 Meuwis MA, Fillet M, Geurts P, de Seny D, Lutteri L, Chapelle JP, Bours V, Wehenkel L, Belaiche J, Malaise M, Louis E, Merville MP. Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1422-1433
- 14 Dymicka-Piekarska V, Butkiewicz A, Kemona H, Gryko M, Mantur M. [Does colorectal cancer clinical advancement and surgical treatment affect platelet factor 4 concentration] *Pol Merkur Lekarski* 2004; 17: 575-578
- 15 Cervi D, Yip TT, Bhattacharya N, Podust VN, Peterson J, Abou-Slaybi A, Naumov GN, Bender E, Almog N, Italiano JE Jr, Folkman J, Klement GL. Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. *Blood* 2008; 111: 1201-1207

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 2009-09-28)

重症急性胰腺炎合并G6PD缺乏症1例

胡杨, 陈敏, 杨锦林

胡杨, 陈敏, 杨锦林, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041

作者贡献分布: 此课题由杨锦林设计; 病例收集由胡杨完成; 论文写作由胡杨与陈敏完成; 杨锦林进行论文修改。

通讯作者: 杨锦林, 副教授, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院消化内科. mouse-577@163.com

电话: 028-80818920

收稿日期: 2009-04-16 修回日期: 2009-05-22

接受日期: 2009-05-25 在线出版日期: 2009-09-28

Treatment of severe acute pancreatitis with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a report of one case

Yang Hu, Min Chen, Jin-Lin Yang

Yang Hu, Min Chen, Jin-Lin Yang, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Jin-Lin Yang, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, 37 Guoxue Alley, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. mouse-577@163.com

Received: 2009-04-16 Revised: 2009-05-22

Accepted: 2009-05-25 Published online: 2009-09-28

Abstract

A 17-year-old male patient presented to our hospital with a 1-year history of repeated abdominal pain and distention and an exacerbation for one day. He was initially diagnosed as severe acute pancreatitis. During therapy, hemolytic anemia occurred. Thus, he was definitely diagnosed as severe acute pancreatitis with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. After undergoing antibacterial treatment, he gradually recovered and was discharged from hospital. During eight months of follow-up, his condition remained stable.

Key Words: Severe acute pancreatitis; G6PD deficiency; Infection; Hemolytic anemia

Hu Y, Chen M, Yang JL. Treatment of severe acute pancreatitis with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(27): 2859-2861

摘要

患者, 男性, 17岁, 因反复腹痛、腹胀1年, 后复发1 d入院, 诊断为重症急性胰腺炎。病程中患者出现溶血性贫血表现, 确诊为“G6PD缺乏症”, 经抗菌治疗后病情好转出院, 随访8 mo病情稳定。

关键词: 重症急性胰腺炎; G6PD缺乏症; 感染; 溶血性贫血

胡杨, 陈敏, 杨锦林. 重症急性胰腺炎合并G6PD缺乏症1例. 世界华人消化杂志 2009; 17(27): 2859-2861

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2859.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)并发贫血较少见, 合并溶血性贫血、确诊红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)缺乏症尚未见有文献报道。我院收治SAP合并G6PD缺乏症患者1例, 现报道如下。

1 病例报告

男, 17岁, 因“反复腹痛、腹胀1年, 复发1 d”于2008-07-29入院。2007-09患者进食较多油腻食物后突发中上腹剧烈绞痛, 当地医院诊断为“急性胰腺炎”, 治疗1 wk后好转出院。2008-07-27再次进食油腻食物后中上腹痛复发, 收入我院。患者入院时腹痛、腹胀、高热, 入院查体: 神志谵妄; 体温波动于37.8℃-40℃; 双肺呼吸音清, 未闻及干湿性啰音; 心率每分120-160次, 窦性心律, 律齐, 无病理性杂音; 全腹压痛, 上腹为甚, 无反跳痛, 移动性浊音阴性; 双下肢无水肿; 余检查未见异常。入院时血红蛋白188 g/L, 红细胞压积0.56 L/L, 白细胞 $26.38 \times 10^9/L$, 大小便常规无异常, 间接胆红素19.4 mmol/L, 血淀粉酶1029 IU/L, 脂肪酶2295 IU/L, CRP 334 mg/L, 血糖22.19 mmol/L, 血钙1.84 mmol/L, 上腹增强CT: (1)胰腺内外均有低密度区, 范围不等, 渗出液明显, 累及腹腔及腹膜后间隙, 坏死

背景资料

G6PD缺乏症, 俗称蚕豆症, 是一种常见的先天遗传性疾病。某些药物和化学物如蚕豆、樟脑、臭丸、龙胆紫(紫药水)都会令患者出现急性溶血反应。重症急性胰腺炎是急性胰腺炎中极危重的类型, 其合并G6PD缺乏症的报道在中文CNKI数据库中尚未出现, 而两者与感染密切的关系提示在临床工作中, 对于重症急性胰腺炎合并原因不明的贫血的早期诊断、指导治疗有帮助。

同行评议者

樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科

名词解释

葡萄糖六磷酸脱氢酶缺乏症(G6PD deficiency): 俗称蚕豆症, 是一种常见的先天遗传性疾病。患者由于遗传基因的先天缺陷, 无法正常地分解葡萄糖。除此以外, 部分药物和化学物如蚕豆、樟脑、臭丸、龙胆紫(紫药水)、都会令患者出现急性溶血反应。症状包括黄疸、精神不佳, 严重时会出现呼吸急速、心脏衰竭, 甚至会出现休克而有生命危险。

范围广泛, 为SAP改变; (2)双侧胸腔少量积液伴双下肺压迫性膨胀不全; (3)胆囊结石。诊断为: “AP(胆源性, 重症); 胆囊结石”。入院后即予禁食, 导泻, 大量补液, 强力抗感染(亚胺培南0.5 g静滴, 每6 h 1次; 奥硝唑0.5 g静滴, 每12 h 1次), 抑制分泌(奥美拉唑40 mg静滴, 每天1次; 生长抑素3 mg泵入, 0.25 mg/h), 控制血糖等治疗。入院3 d后患者腹部症状体征明显缓解, 但出现进行性的红系血细胞减低, 血红蛋白最低降至36 g/L, 胆红素升高, 直接、间接胆红素均升高同时白细胞及中性粒细胞比例显著升高; 小便常规隐血阳性, 红细胞阴性, 尿蛋白(++). 遂于入院后第10天行骨髓检查, 显示: 有核细胞增生明显活跃, 粒红比例为2.1:1, 红细胞系统占65.0%, 以中晚幼红细胞为主, 胞质较少, 可见多核、分叶核晚幼红细胞, 成熟红细胞大小不均, 中心淡染区可见扩大。粒系、淋巴、巨核细胞未见异常, 骨髓呈增生性贫血, 红系增生明显。COOMBs试验、Ham试验、蛇毒因子溶血试验均阴性, 结合珠蛋白0.58 g/L。入院第15天网织红细胞计数 $0.6022 \times 10^{12}/L$, MCV 111.2 fL, 第18天复查 $0.2923 \times 10^{12}/L$, MCV 109.6 fL。予以诊断“溶血性贫血”, 继续予胃肠减压、抗感染、抑制分泌、保肝、控制血糖、补液支持, 输入红细胞悬液4 U纠正贫血。入院后第17天, 患者病情明显好转, 复查实验室指标示: 血常规仅见轻度贫血, 肝功无异常, 淀粉酶118 IU/L, 脂肪酶74 IU/L, CRP: 26.7 mg/L, 复查腹部CT示: (1)胰腺大部分坏死, 胰周假性囊肿形成(16.3 cm×9.0 cm)。 (2)胆囊结石。继续巩固治疗, 患者未感不适, 生命体征平稳, 血尿常规、肝功能无异常, 顺利出院。2009-01查血G6PD: 0.7 U/g HB(正常范围3.7-13.35 U/g HB)。2009-02返院复查血常规、肝功均在正常范围, 腹部CT示: (1)急性胰腺炎改变, 体尾部液化坏死, 胰周渗出明显, 并向腹腔及腹膜后扩散, 胰尾部及脾门区可见局限积液; (2)胆囊结石胆囊炎, 肝内外胆管稍扩张。遂行胆囊切除术治疗出院。纵观疾病全程, 该患者明确诊断“SAP合并G6PD缺乏症”。

2 讨论

SAP突出的特点是出现多个严重并发症, 包括局部并发症如胰腺坏死、假性囊肿、胰腺脓肿、胃肠道出血等, 全身并发症如呼吸、循环、肾脏系统的功能不全、感染及休克等^[1]。其中近50%的SAP继发感染, 其原因为肠道循环障碍、

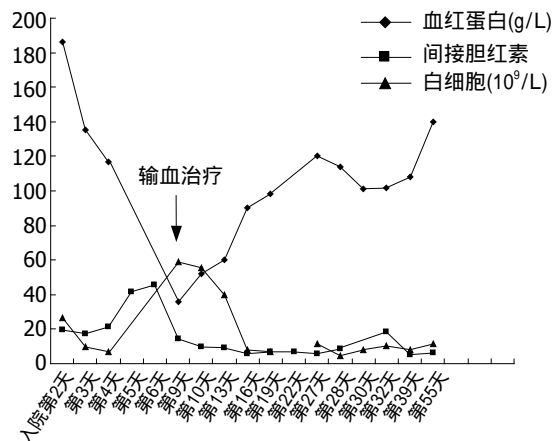


图1 血红蛋白等变化趋势。

微生态环境破坏造成细菌移位以及腹腔内胰腺坏死与胰周腔隙积液为感染提供了良好的培养基^[2], 1.2%-14.5%的SAP发生贫血, 多由血管受脓肿、胰酶侵蚀因素造成的胃肠道、腹腔内出血所致^[3]。该患者SAP诊断明确, 发病初期血红蛋白与红细胞压积均有明显升高, 系AP早期的血液浓缩表现^[4]。但经积极治疗后仍出现进行性加重的贫血, 多次复查其大便、胃肠减压管抽吸物隐血阴性, 无消化系或腹腔内出血表现, 同时间接胆红素、LDH均升高, 结合珠蛋白在正常范围, 提示有溶血性贫血(hemolytic anemia, HA)发生。由此做进一步的HA疾病鉴别检查, 血MCV在正常范围, COOMBs试验阴性, 骨髓病理示代偿性造血亢进, 明确其为非自身免疫性的HA。本例患者的急性溶血发生在胰腺炎继发的感染期内, 治疗1 wk后明显好转, 提示了其溶血与感染之间的关系, 在无特异性感染(疟疾、巴贝虫属、产气荚膜杆菌败血症)发生的前提下, 患者Ham试验、蛇毒因子溶血试验均阴性, 排除阵发性睡眠性血红蛋白尿, 应考虑G6PD缺乏症的存在^[5], 因此进行G6PD活性测定, 低于正常范围可最终明确诊断。

G6PD缺乏症是沿海地区较为常见的遗传性溶血性疾病, 因红细胞缺失G6PD造成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)合成减少, 进而抗氧化损伤物质缺乏导致细胞膜通透性增加、变形性降低和抗原性改变, 当患者体内氧化剂作用增强时, 红细胞不能形成足够的还原物质即破坏而出现溶血。根据其临床表现主要分为5型^[6]: (1)由某些具氧化作用的药物或化学物质诱发, 如抗疟疾及抗蠕虫药物、磺胺、呋喃唑酮、水溶性维生素K、苯环类物质等; (2)由进食蚕豆

引起的HA, 溶血自限为本病的特点, 在发病季节、食蚕豆后15 d内出现急性溶血并有G6PD缺乏的实验室依据, 即可诊断蚕豆病; (3)感染导致溶血^[7]: 在感染和贫血并存的黑人患者中, 67%患有G6PD缺乏症. 非病毒感染时其机制推断为: 吞噬细胞如中性粒细胞等被感染激活后, 先是红细胞被免疫复合物桥接聚集, 与此相关的红细胞表面受体主要有激活补体C3b和C4b的受体; 血红蛋白被氧化成高铁血红蛋白, 其后H₂O₂与高铁血红蛋白相互作用导致了溶血, 此过程中蛋白水解机制也参与红细胞的破坏; (4)遗传性非球形细胞性HA I型, 发生于具有稀有变异的G6PD酶的患者, 其多以无诱因缓慢发病的HA如巨脾、黄疸为特征; (5)新生儿黄疸, 其黄疸并非溶血性贫血造成的结果, 而是由于患儿相关肝酶缺乏, 若进一步发展为核黄疸可威胁生命.

G6PD缺乏症的贫血慢性发作时为血管外溶血, 表现为贫血、黄疸、肝、脾大, 血清间接胆红素增高明显多于结合胆红素; 急性溶血时可在短期内大量血管内溶血, 出现腰腹痛、发热、黄疸症状, 尿常规示蛋白阳性、而红细胞阴性为表现的血蛋白尿以及含铁血黄素尿, 以及血清结合珠蛋白降低; 在溶血发生后, 骨髓红系造血代偿性增生, 外周血可以出现大量的网织红细胞. 因此, 本例患者考虑在血管外溶血基础上亦有急性的血管内溶血发生, 故兼具间接胆红素增高与血红蛋白尿表现.

治疗上, G6PD缺乏症目前尚无特殊治疗取得明确疗效的报道, 各型的治疗虽有所不同, 但也集中于去除诱因、纠正贫血等原则上. 有效的抗感染对于SAP与因感染导致的HA都是至关重要的治疗措施. 对SAP患者而言, 抗生素应首选以抗革兰阴性菌与厌氧菌为主、脂溶性强、在胰腺组织中能达到有效浓度的种类^[2], 该患者经亚胺培南联合奥硝唑治疗19 d后感染得到控制, 降为头孢米诺联合奥硝唑治疗直至症状完全缓解停药. 随访中患者未再复发胰腺炎, 血红蛋白稳定在正常范围.

3 参考文献

- 1 Steinberg W, Tenner S. Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 1994; 330: 1198-1210
- 2 邓力珏, 夏庆. 胰腺抗生素浓度在防治重症急性胰腺炎继发感染中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3077-3082
- 3 Flati G, Andrén-Sandberg A, La Pinta M, Porowska B, Carboni M. Potentially fatal bleeding in acute pancreatitis: pathophysiology, prevention, and treatment. *Pancreas* 2003; 26: 8-14
- 4 Lankisch PG, Mahlke R, Blum T, Bruns A, Bruns D, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Hemoconcentration: an early marker of severe and/or necrotizing pancreatitis? A critical appraisal. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2081-2085
- 5 Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM Jr. Hemolytic anemia. *Am Fam Physician* 2004; 69: 2599-2606
- 6 Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 84: 3613-3636
- 7 Berkowitz FE. Hemolysis and infection: categories and mechanisms of their interrelationship. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 1151-1162

编辑 李军亮 电编 何基才

同行评价
本文报道了重症急性胰腺炎合并G6PD缺陷1例, 复习文献未见相关报道.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350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). (科学编辑: 李军亮 2009-09-28)

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈建杰 主任医师

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

陈力 教授

浙江大学医学院附属第二医院外科

陈立波 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

陈其奎 教授

中山大学附属第二医院消化内科

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

范建高 教授

上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

范学工 教授

中南大学湘雅医院感染病科

高泽立 副教授

上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

葛海燕 教授

同济大学附属第十人民医院普外科

谷俊朝 主任医师

首都医科大学附属北京友谊医院普外科

关玉盘 教授

首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

管世鹤 副教授

安徽医科大学第一附属医院检验科

黄晓东 副主任医师

武汉市中心医院消化内科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

姜慧卿 教授

河北医科大学第二医院消化科

金瑞 教授

首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李勇 副教授

上海中医药大学附属市中医医院消化科

刘勇钢 副主任医师

天津市传染病医院病理科

吕宾 教授

浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化内科

谭德明 教授

中南大学湘雅医院感染病科

唐文富 副教授

四川大学华西医院中西医结合科

田晓峰 教授

大连医科大学附属第二医院普通外科

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

肖恩华 教授

中南大学湘雅二医院放射教研室

许玲 副教授

中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

姚希贤 教授

河北医科大学附属第二医院消化内科

叶红军 主任医师

广东省北京大学深圳医院消化内科

张锦生 教授

复旦大学上海医学院病理学系

张小晋 主任医师

北京积水潭医院消化内科