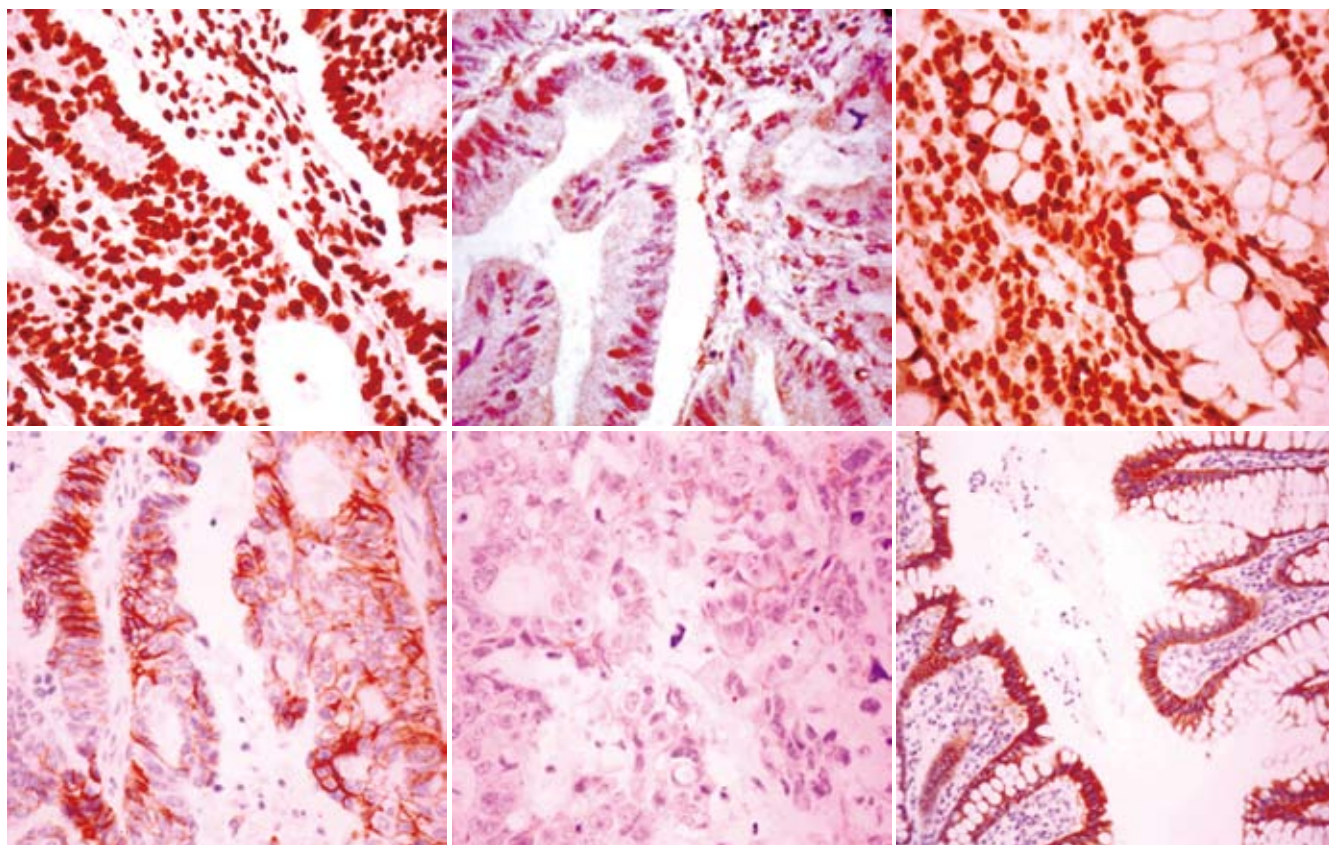


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009 年 12 月 28 日 第 17 卷 第 36 期 (Volume 17 Number 36)



36 / 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
杨思风教授
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
苒新明教授
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
刘海峰主任医师
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
周晓东副教授
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
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授

高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师

沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
李璠教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

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

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授

钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009 年 12 月 28 日 第 17 卷 第 36 期 (总第296期)

述 评

- 3671 Micro-RNAs在肝纤维化发生中的作用
张锦生

基 础 研 究

- 3675 芪术颗粒对大鼠肝纤维化形成过程中VEGF表达的影响
时磊, 刘绍能, 李敏, 吕鑫霞, 阙杰, 马继征, 陈兰羽
- 3679 己酮可可碱对大鼠溃疡性结肠炎TNF- α 及IL-1 β 表达的影响
钟江鹏, 李登欣, 李石, 李杰, 徐静
- 3684 幽门螺杆菌尿素通道蛋白基因*ureI*的检测、克隆及序列分析
邵长江, 张尤历, 王文兵, 孔梅, 陈鑫, 宋永站

临 床 研 究

- 3688 TFF3在胃癌、癌前病变及胃腺瘤中的表达及其与血管生成的关系
路艳艳, 田宇彬, 魏良洲, 孔心涓, 赵清喜, 李玉军, 孙显路

文 献 综 述

- 3693 嗜酸细胞食管炎研究进展
王驰, 王化虹
- 3699 辣椒素对胃酸分泌的影响及机制
谭婷婷, 张琴, 彭燕
- 3704 肝癌干细胞的研究进展
宋凯, 杨硕菲, 吴俊华, 江春平
- 3711 溃疡性结肠炎基因多态性的研究进展
赵琛, 张树辉, 吴焕淦, 崔云华, 周次利
- 3715 ICC与胃肠道炎症免疫
杨琰, 余跃

研 究 快 报

- 3720 HBV preS2反义锁核酸在HepG2.2.15细胞内的抗病毒效果
张梁, 邓益斌, 邓巧莹
- 3725 硫化氢对MDA及GSH在大鼠肝星状细胞氧应激中表达的影响
阳丹才让, 邓勇, 任利, 王聪, 樊海宁
- 3729 特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中的表达、纯化及生物学活性鉴定
别彩群, 杨冬华, 汤绍辉, 丁世华

临 床 经 验

- 3734 P53Arg72Pro多态性及*H. pylori*感染与胃癌高发区甘肃河西地区胃癌的关系
朱克祥, 李玉民, 李汛, 周文策, 单勇, 刘涛, 何雯婷
- 3740 慢性乙型重型肝炎与血清血小板活化因子的相关性
马科, 许东, 田德英
- 3745 益生菌对肝硬化患者肠黏膜通透性的影响
范妮, 田宇彬, 孔心涓, 赵清喜, 魏良洲
- 3749 性激素及其受体与肝硬化的相关性
张达利, 王健, 李毅平, 虞胜, 李勇
- 3752 P-gp、GST- π 和P53在胆囊癌中的表达及意义
智迎辉, 宋茂民, 龙锦, 郭仁宣
- 3756 转录辅抑制因子CtBP1与其靶基因E-cadherin在结肠腺癌中的表达

	肖胜军, 张小玲, 容明智, 方宇, 曾思恩 3760 嗜酸粒细胞性胃肠炎临床分析24例 李静, 王邦茂, 张洁, 姜葵, 方维丽, 程静, 沈阳, 苏帅
病例报告	3765 原发性降结肠恶性黑色素瘤1例 夏翠锋, 李云峰, 李强, 潘定国, 冯瑞
致 谢	3768 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	3678 《世界华人消化杂志》中文摘要要求 3683 《世界华人消化杂志》正文要求 3698 《世界华人消化杂志》投稿方式 3703 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 3710 《世界华人消化杂志》修回稿须知 3714 《世界华人消化杂志》栏目设置 3719 汤姆森-路透公布2008年 <i>WJG</i> 影响因子2.081 3724 《世界华人消化杂志》参考文献要求 3728 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》 3739 《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.547 3744 《世界华人消化杂志》计量单位标准 3748 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》 3759 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 3764 《世界华人消化杂志》数字用法标准 3767 《世界华人消化杂志》外文字符标准
封面故事	肖胜军, 张小玲, 容明智, 方宇, 曾思恩. 转录辅抑制因子CtBP1与其靶基因E-cadherin在结肠腺癌中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3756-3759 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3756.asp
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李瑞敏; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

 <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 2009-12-28 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 太原消化病防治中心</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</p> <p>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</p> <p>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年版版权归世界华人消化杂志所有</p>
中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R		邮发代号 82-262 国外代号 M 4481 国内定价 每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

December 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 36

EDITORIAL	3671 Role of micro-RNAs in the pathogenesis of hepatic fibrosis <i>Zhang JS</i>
BASIC RESEARCH	3675 Qizhu Granules downregulate the expression of vascular endothelial growth factor in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats <i>Shi L, Liu SN, Li M, Lv XX, Kan J, Ma JZ, Chen LY</i> 3679 Pentoxifylline suppresses the expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in ulcerative colitis in rats <i>Zhong JP, Li DX, Li S, Li J, Xu J</i> 3684 Detection, cloning and sequence analysis of the urea channel protein gene <i>urel</i> of <i>Helicobacter pylori</i> <i>Shao CJ, Zhang YL, Wang WB, Kong M, Chen X, Song YZ</i>
CLINICAL RESEARCH	3688 Correlation of trefoil factor 3 expression in gastric carcinoma, precancerous lesions, gastric adenoma with angiogenesis <i>Lu YY, Tian ZB, Wei LZ, Kong XJ, Zhao QX, Li YJ, Sun XL</i>
REVIEW	3693 Advances in research of eosinophilic esophagitis <i>Wang C, Wang HH</i> 3699 Effects of capsaicin on gastric acid secretion and mechanisms involved <i>Tan TT, Zhang Q, Peng Y</i> 3704 Advances in research on liver cancer stem cells <i>Song K, Yang SF, Wu JH, Jiang CP</i> 3711 Advances in research on gene polymorphisms in ulcerative colitis <i>Zhao C, Zhang SH, Wu HG, Cui YH, Zhou CL</i> 3715 Interstitial cells of Cajal and gastrointestinal inflammation and immunity <i>Yang Y, Yu Y</i>
RAPID COMMUNICATION	3720 Hepatitis B virus preS2 gene-specific locked nucleic acid antisense oligonucleotides significantly inhibit hepatitis B virus replication and expression in HepG2 2.2.15 cells <i>Zhang L, Deng YB, Deng QY</i> 3725 Effects of hydrogen sulfide on the expression of glutathione and malondialdehyde in culture supernatant of rat hepatic stellate cells during oxidative stress <i>Yangdan CR, Deng Y, Ren L, Wang C, Fan HN</i> 3729 Expression, purification and biological activity assay of humanized single-chain Fv dimers against hepatocellular carcinoma in <i>Pichia pastoris</i> <i>Bie CQ, Yang DH, Tang SH, Ding SH</i>
CLINICAL PRACTICE	3734 Association of P53 Arg72Pro polymorphism and <i>Helicobacter pylori</i> infection with risk of gastric cancer in a high incidence area in China <i>Zhu KX, Li YM, Li X, Zhou WC, Shan Y, Liu T, He WT</i> 3740 Prognostic significance of serum platelet-activating factor in chronic severe hepatitis B <i>Ma K, Xu D, Tian DY</i> 3745 Bifico improves intestinal macromolecular permeability in patients with liver cirrhosis <i>Fan N, Tian ZB, Kong XJ, Zhao QX, Wei LZ</i>

	<p>3749 Correlations of the expression of sex hormones and their receptors with the evolution of hepatic cirrhosis <i>Zhang DL, Wang J, Li YP, Yu S, Li Y</i></p> <p>3752 Prognostic significance of P-gp, GST-π and P53 expression in gallbladder carcinoma <i>Zhi YH, Song MM, Long J, Guo RX</i></p> <p>3756 Expression of transcriptional corepressor CtBP1 and its target gene E-cadherin in colon adenocarcinoma <i>Xiao SJ, Zhang XL, Rong MZ, Fang Y, Zeng SE</i></p> <p>3760 Eosinophilic gastroenteritis: a clinical study of 24 cases <i>Li J, Wang BM, Zhang J, Jiang K, Fang WL, Cheng J, Shen Y, Su S</i></p>
CASE REPORT	<p>3765 Diagnosis and treatment of primary malignant melanoma in the descending colon: a report of one case <i>Xia CF, Li YF, Li Q, Pan DG, Feng R</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>3768 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Xiao SJ, Zhang XL, Rong MZ, Fang Y, Zeng SE.</i> Expression of transcriptional corepressor CtBP1 and its target gene E-cadherin in colon adenocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(36): 3756-3759 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3756.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>Ji-Cai He</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 December 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*

Micro-RNAs在肝纤维化发生中的作用

张锦生

张锦生, 复旦大学上海医学院病理学系 上海市 200032
张锦生, 教授, 博士生导师, 主要从事肝病病理研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30570824
通讯作者: 张锦生, 教授, 200032, 上海市医学院路138号, 复旦大学上海医学院病理学系. jszhang44@shmu.edu.cn
电话: 021-54237049 传真: 021-54237596
收稿日期: 2009-10-23 修回日期: 2009-11-18
接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Role of micro-RNAs in the pathogenesis of hepatic fibrosis

Jin-Sheng Zhang

Jin-Sheng Zhang, Department of Pathology, Shanghai Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570824

Correspondence to: Professor Jin-Sheng Zhang, Department of Pathology, Shanghai Medical College of Fudan University, 138 Yixueyuan Road, Shanghai 200032, China. jszhang44@shmu.edu.cn

Received: 2009-10-23 Revised: 2009-11-18

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

In 1993, Lee *et al* found that 22-nt small-molecule RNAs encoded by the lin-4 gene inhibited the synthesis of LIN-14 protein in *Caenorhabditis elegans*, which, however, did not attract wide attention. Until 2000, Reinhart *et al* reported a similar finding in the let-7 gene. In less than a year later, hundreds of types of similar small-molecule RNA-like RNAs, called microRNAs (miRNAs), were discovered. In recent years, the number of studies on miRNAs is growing by leaps and bounds. The relationship of miRNAs with tumor development and progression and its potential diagnostic value have become a hot research topic. In non-cancer diseases, the research on miRNAs is attracting more attention. Here, we will review the role of micro-RNAs in the pathogenesis of liver fibrosis.

Key Words: Micro-RNAs; Hepatic stellate cells; Hepatic fibrosis

Zhang JS. Role of micro-RNAs in the pathogenesis of

hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3671-3674

摘要

1993年Lee *et al*在秀丽新小杆线虫中发现编码形成可抑制LIN-14蛋白合成, 大小为22 nt的小分子RNA基因lin-4, 当时并未引起注意. 直到2000年, Reinhart *et al*又在此线虫中发现第二种类似的基因let-7, 此后不到一年间又相继发现了数百种类似的小分子RNA, 被称为micro-RNAs(miRNAs). 近年来, miRNAs的研究突飞猛进. miRNAs与肿瘤发生发展的关系及其潜在的诊断价值是目前研究的热点之一, 且在非肿瘤性疾病中, miRNAs的研究方兴未艾. 现将与肝纤维化发生有关的miRNAs研究作一简介.

关键词: Micro-RNAs; 肝星状细胞; 肝纤维化

张锦生. Micro-RNAs在肝纤维化发生中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3671-3674

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3671.asp>

0 引言

miRNAs普遍存在于真核细胞中, 进化上高度保守, 是一类约22 nt的内源性单链RNA分子, 作用于靶mRNA导致其降解或抑制其翻译, 在动物和植物中均对基因表达起重要的负调控作用. miRNAs基因以单拷贝、多拷贝或基因簇等多种形式存在于基因组中, 绝大部分定位于已知基因的间隔区(intergenic), 另有很小一部分位于pre-mRNA的内含子区, 其表达受生理反应和发育信号的动态调控^[1]. 编码miRNAs的基因约占全部预测基因的1%-5%, 即在人类基因组中可能存在1000多种miRNAs基因. 据计算机分析软件预测, 每种miRNAs可调控多达200种靶基因, 意味着超过1/3的人类蛋白编码基因受到miRNAs调控^[2]. 在生物体的不同发育时期, 不同组织器官中, miRNAs的种类和数量均不同, 其表达具有时空特异性. 通过对线虫、果蝇、鱼类、小鼠和人类细胞的研究, 发现miRNAs可通过调节信号分子(如: 细胞因子、生长因子、

■背景资料

肝纤维化的发生是一个非常复杂的病理生物学过程, 其最基本的细胞事件不外乎细胞分化、增生和凋亡. 而这些正是miRNAs所调节的. 有研究表明, 分析miRNAs表达谱(miRNAs expression profile)有助于对肿瘤进行分类、诊断及判断预后. 相对于肿瘤的miRNAs, 对非肿瘤性疾病miRNAs的研究还不多, 尤其是对miRNAs在肝纤维化发生中的作用和意义的研究方兴未艾.

■同行评议者

姚希贤, 教授, 河北医科大学附属第二医院消化内科

■相关报道

Venugopal *et al* 分离胆管结扎大鼠肝纤维化模型肝中的肝星状细胞, 研究其miR的表达谱, 与从正常大鼠肝分离的肝星状细胞相比较, 表达上调的miR有2种, 下调的有5种. Guo *et al* 用miR芯片观察到大鼠肝星状细胞在体外培养自然激活后, 有12种miR表达上调, 9种miR表达下调.

转录因子和促凋亡、抗凋亡蛋白等)表达, 对多种生物学过程发挥重要调控作用, 包括: 个体发育、细胞分化、增殖、代谢、凋亡和应激等. 在人类约50%已知的miRNAs基因定位于与肿瘤相关的染色体区, 提示其在肿瘤发生中具有重要作用^[3]. 近年研究发现, 在很多人类恶性肿瘤, 包括慢性淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、淋巴瘤、胃癌、食管癌、结直肠癌、肝细胞癌、胆管细胞癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌和甲状腺癌等, miRNAs表达均发生显著变化, 与抑制或促进肿瘤的发生、发展有关. 另外, 分析miRNAs表达谱(miRNAs expression profile)有助于对肿瘤进行分类、诊断及判断预后^[4-7]. 相对于肿瘤的miRNAs, 对非肿瘤性疾病miRNAs的研究还不多, 尤其是对miRNAs在肝纤维化发生中的作用和意义的研究方兴未艾. 全面了解肝纤维化发生过程miRNAs变化的规律性, 必然有助于深入揭示肝纤维化发生机制, 并提供新的有效的治疗靶点.

1 miRNAs的合成加工及作用机制

细胞核内编码miRNAs的基因在RNA聚合酶II作用下转录生成含数百到数千个碱基对的原始miRNAs(primary microRNAs, pri-miRNAs), pri-miRNAs具有5'端7-甲基鸟苷酸帽子和3'端多聚腺苷酸尾巴^[8]. pri-miRNAs在由核酸内切酶RNaseIII家族成员Drosha及属于双链RNA结合蛋白(the double-stranded RNA binding protein, dsRBD)的DGCR8组成的微处理复合物(microprocessor complex)作用下, 在核内加工成大小约60-70 nt, 具有发夹结构的单链miRNAs前体(precursor microRNAs, pre-miRNAs). Drosha的剪切位点位于每个pri-miRNAs发夹结构的基底部, 常相互错开两个核苷酸, 故pre-miRNAs 3'端有2个核苷酸突出. 剪切位点上游20 nt至下游25 nt间的发夹柄区序列具有关键作用, 其突变会显著削弱Drosha的剪切效率. Drosha对RNA的特异性剪切决定了成熟miRNAs的序列^[9]. pre-miRNAs在Ran-GTP依赖的核质/胞质转运蛋白Exportin5的作用下, 从核内转移至胞质, 并被RNA诱导的基因沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)识别^[10]. RISC由RnaseIII家族成员Dicer、dsRBD-TRBP和核酸内切酶Argonaute2(Ago2)组成, RISC将pre-miRNAs加工为成熟miRNAs, 裂解靶mRNA, 全过程不需ATP. RISC装配、

pre-miRNAs加工、和靶mRNA断裂是偶联的^[11]. Dicer剪切pre-miRNAs形成22 nt双链miRNAs, 此时成熟miRNAs与其互补序列miRNAs*结合成miRNAs: miRNAs*双螺旋. 双螺旋中, 2条链的3'端均有2个突出的核苷酸, 但不完全配对, miRNAs链近5'端有一个不与miRNAs*链相应位置配对的小突起, 这个小突起显著削弱了miRNAs链5'端的稳定性. 成熟miRNAs的产生总是优先选择5'端较不稳定的1条链, 因此miRNAs链被选中的机会大于miRNAs*链约100倍. 双链解开后miRNAs与Ago2结合留在活化的RISC中, 而miRNAs*链则迅速被降解^[12]. miRNAs通过互补序列识别靶mRNA, 并与其3'端非翻译区(untranslated region, UTR)结合, 由Ago2剪切靶mRNA使其降解, 或抑制mRNA翻译, 诱导转录后基因沉默^[11,13].

2 miRNAs在肝星状细胞激活及凋亡中的作用

肝纤维化是各种原因(病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝、中毒性肝病、自身免疫性肝病等)导致肝脏损害后的一种修复过程, 其结局是形成肝硬化, 成为消化内科常见的难治疾病^[14-15]. 激活的肝星状细胞是产生以胶原蛋白为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要细胞, 肝星状细胞的激活是肝纤维化发生的早期关键事件. 影响该细胞激活的因素很多, 有细胞因子的旁分泌和自分泌作用、氧化应激、微环境ECM的改变等因素^[15-17]. 另外, 与肝星状细胞分化有关的基因在激活中也起重要作用, 维甲酸(RA)是促进细胞分化和抑制细胞增殖的重要调控分子, 可与两类核受体结合, 分别是RAR(retinoic acid receptors α , β , γ)和RXR(retinoid X receptors α , β , γ). 维甲酸核内受体RXR α 在核受体信号通路中具有核心作用, 既可形成同二聚体, 又是其他多种核受体发挥作用所必需形成的异二聚体中的配偶体. 过氧化物酶体增生因子激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)是核内固醇类激素受体PPARs家族的一个亚型, 可通过与RXR α 结合形成异二聚体与特殊的PPAR反应元件(PPAR response element, PPRE)结合调控多种促进细胞分化和脂质代谢基因转录. 国外研究及本课题组前期的工作已证实RXR α 和PPAR γ 基因表达下调及相伴的RA信号转导削弱是肝星状细胞激活的重要内在分子机制. 通过质粒转染上调RXR α 或PPAR γ 均可部分逆转激活肝

星状细胞的表型^[18]。我们从调控这两种分子表达的miRNAs着手,用Real-time RT-PCR观察了原代培养大鼠肝星状细胞在体外培养自然激活前后的与该两种分子相关的33种miRNAs表达变化,发现miR-27a, miR-27b在肝星状细胞激活后明显上调,除此上调的还有miR-30a, miR-30c, miR-30d。进一步用anti-miR-27a, anti-miR-27b抑制miR-27a, miR-27b的上调时,激活肝星状细胞细胞内已消失的脂滴又重新出现, RXR α 蛋白表达上调而细胞增殖却受到明显抑制。为了证明RXR α 是miR-27a, miR-27b作用的靶分子,我们把RXR α mRNA的3'UTR插于荧光素酶报告基因终止码下游,然后将该报告基因载体与miR-27a, miR-27b的表达载体分别共转染293T细胞,结果显示, miR-27a, miR-27b均可抑制荧光素酶的表达。说明RXR α 确是miR-27a, miR-27b作用的靶分子^[19]。这些结果证明miR-27a, miR-27b表达的上调参与肝星状细胞激活过程。Kwiecinski *et al*从数据库搜索到与胶原蛋白mRNA 3'UTR 互补的miR-29a, miR-29b,观察到激活的肝星状细胞或人和动物纤维化肝组织miR-29a, miR-29b表达下调,进一步将含miR-29a, miR-29b的载体转染肝星状细胞,胶原蛋白合成受到抑制。提示miR-29a, miR-29b表达下调也参与肝星状细胞激活^[20]。Venugopal *et al*分离胆管结扎大鼠肝纤维化模型肝中的肝星状细胞,研究其miR的表达谱,与从正常大鼠肝分离的肝星状细胞相比较,表达上调的miR有2种,下调的有5种,进一步将下调的miR-150和miR-194分别转染人肝星状细胞系LX2中,使两者过表达,结果LX2的增殖受到抑制,同时MMPs、TIMP-3、CD44、E-钙黏蛋白、整联蛋白等的表达均有改变。提示这些miR表达的改变参与了胆管结扎大鼠肝纤维化模型中肝星状细胞的激活^[21]。Guo *et al*用miR芯片观察到大鼠肝星状细胞在体外培养自然激活后,有12种miR表达上调,9种miR表达下调。进一步用QRT-PCR核实,上调的为miR-138, miR-140, miR-143,下调的是miR-15b, miR-16, miR-122。进一步研究发现,下调的miR-15b、miR-16作用的靶分子是Bcl-2的mRNA,实验结果也表明将miR-15b、miR-16表达载体转染激活的肝星状细胞可诱导凋亡。说明miR-15b、miR-16参与调控肝星状细胞激活过程中的凋亡机制^[22]。

3 miRNAs在肝纤维化发生中的作用

相对于肝星状细胞的体外研究,人或动物肝纤

维化发生过程中,对miRNAs的研究还很少,国外仅见零星的会议论文摘要。Hall *et al*利用30个BXD(C57BL/6J X DBA/2J)亲本遗传背景不同组合的嵌合体的小鼠近交系谱系作为研究对象,用CCl₄诱导肝纤维化6 wk后,观察肝纤维化和miR表达的变化,结果发现不同嵌合体的近交系小鼠对CCl₄的敏感性不同,肝组织纤维化分期从F0至F3不等,肝脏胶原蛋白含量也从每克肝组织181至506 μ g不等。同时miR-192和肝特异性miR-122表达的改变也随之不一。miR-192的改变从3.9至12.6倍不等,miR-122则从6.3至10.4倍不等。提示小鼠对环境致纤维化因子的敏感性和肝脏miR的表达受遗传控制^[23]。同时还表明肝特异性miR-122在肝纤维化发生过程中变化显著,值得深入研究其真正的作用。国内马兆龙 *et al*用芯片筛选正常人肝组织、乙型肝炎后肝硬化肝组织、乙型肝炎相关肝癌组织各1例的miR表达谱,结果显示肝硬化肝组织和肝癌组织miR上调2倍以上的有hsa-miR-602、hsa-miR-126-5p、hsa-miR-210、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-30b、hsa-miR-572,下调2倍以上的有hsa-miR-143、hsa-miR-199a-5p、hsa-miR-195、hsa-miR-27a、hsa-miR-99a、hsa-miR-519e、hsa-miR-130a、hsa-miR-597^[24]。表明从HBV肝炎到肝纤维化,直至肝癌发生都伴有miR表达的变化。

4 结论

肝纤维化的发生是一个非常复杂的病理生物学过程,涉及肝实质细胞损伤,肝小叶结构不同程度的破坏;ECM产生细胞激活、增生并产生分泌以胶原蛋白为主的ECM,当ECM产生超过其降解时,肝纤维化即发生。ECM产生细胞主要来自肝脏原驻的肝星状细胞,另外,也可能来自骨髓间充质干细胞或肝细胞通过EMT转化而来的间质细胞。肝纤维化发生最基本的细胞事件不外乎细胞分化、增生和凋亡。而这些正是miRNAs所调节的。因此研究肝纤维化发生时miRNAs的作用其前景不可估量。目前,肝纤维化过程中miRNAs的研究还很零碎、初步,文献也不多。因此,大力加强这方面的研究应该提到议事日程上了。今后的研究应从肝炎-肝硬化患者及肝纤维化动物模型两方面展开,患者材料除了研究肝组织miRNAs变化外,特别注意要用显微切割的方法,分别研究肝细胞和窦旁细胞miRNAs的变化;动物模型除了观察肝组织miRNAs综合变化外,还应在纤维化不同时期分

■应用要点

本文提示,全面了解肝纤维化发生过程miRNAs变化的规律性,必然有助于深入揭示肝纤维化发生机制,并提供新的、有效的治疗靶点。

同行评价

当前对Micro-RNAs在肝纤维化发生中的作用研究尚少, 本文有一定参考价值.

离肝细胞、肝星状细胞、库弗细胞、肝血窦内皮细胞分别进行研究. 只有这样, 才能搞清楚肝纤维化发生过程中肝脏miRNAs改变的网络, 找出起关键作用的miRNAs, 并进一步落实他们作用的靶分子, 并探索这些关键miRNAs改变的上游事件, 如miRNAs基因是否有扩增, 或其启动子是否有甲基化等等. 可以坚信, 一旦这些科学问题得到很好解决, 可为肝纤维化的防治提供新的线索, 从而推动肝纤维化、肝硬化的治疗和预防.

参考文献

- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-3004
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11755-11760
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-1801
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21: 4663-4670
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-98
- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123: 631-640
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115: 209-216
- Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 2003; 426: 465-469
- Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-S53
- Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
- Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 1995; 96: 2461-2468
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Arenson DM, Bissell DM. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix. *J Biol Chem* 1989; 264: 10756-10762
- 张锦生. 肝星状细胞激活的内在机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 831-834
- Ji J, Zhang J, Huang G, Qian J, Wang X, Mei S. Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation. *FEBS Lett* 2009; 583: 759-766
- Kwiecinski M, Strack I, Noetel A, Schievenbusch S, Scheffler M, Elfimova N, Dienes HP, Odenthal M. MicroRNA-29: A novel antifibrogenic mediator in liver fibrogenesis. *Hepatology* 2008; 48 (Suppl): S110
- Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, Torok N, Zern M. Differential expression of microRNAs in rat primary stellate cells during fibrosis and their role in the development of fibrosis. *Hepatology* 2008; 48 (Suppl): 406A
- Guo CJ, Pan Q, Li DG, Sun H, Liu BW. miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis. *J Hepatol* 2009; 50: 766-778
- Hall RA, Biondi IA, Hochrath K, Weber SN, Lammert F. Changes of liver-specific microRNA expression during CCL4 induced chronic liver injury in recombinant inbred mice. *Hepatology* 2008; 48 (Suppl): 913A
- 马兆龙, 杨炼, 陈立波, 黄金明, 王冬冬, 王国斌. miRNA在HBV从感染经由肝硬化到肝癌进程中表达谱的变化. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2112-2116

编辑 李军亮 电编 何基才

芪术颗粒对大鼠肝纤维化形成过程中VEGF表达的影响

时磊, 刘绍能, 李敏, 吕鑫霞, 阚杰, 马继征, 陈兰羽

时磊, 刘绍能, 李敏, 吕鑫霞, 阚杰, 马继征, 陈兰羽, 中国中医科学院广安门医院 北京市 100053

时磊, 硕士, 主要从事肝病中医药防治研究.

北京市自然科学基金资助项目, No. 7072068

作者贡献分布: 此课题由刘绍能与陈兰羽设计; 研究过程由时磊、李敏、吕鑫霞、阚杰及马继征操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李敏提供; 数据分析由时磊完成; 本论文写作由刘绍能、时磊及李敏完成.

通讯作者: 刘绍能, 主任医师, 100053, 北京市, 中国中医科学院广安门医院. liushaoneng886@yahoo.com.cn

电话: 010-88001136

收稿日期: 2009-10-31 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Qizhu Granules downregulate the expression of vascular endothelial growth factor in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats

Lei Shi, Shao-Neng Liu, Min Li, Xin-Xia Lv, Jie Kan, Ji-Zheng Ma, Lan-Yu Chen

Lei Shi, Shao-Neng Liu, Min Li, Xin-Xia Lv, Jie Kan, Ji-Zheng Ma, Lan-Yu Chen, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Supported by: the Beijing Municipal Natural Science Foundation, No. 7072068

Correspondence to: Shao-Neng Liu, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053, China. liushaoneng886@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-31 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To observe the effects of Qizhu Granules on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in rats.

METHODS: Rats were randomized into normal control group, model control group, Qizhu Granule treatment group and Compound Biejia Ruangan Tablet treatment group. After liver fibrosis was induced in rats by intraperitoneal injection of CCl₄, Qizhu Granules and Compound Biejia Ruangan Tablets were given. Liver tissue samples were taken on days 1, 2 and 3 and at weeks 1, 2, 4, 8 and 12 for real-time fluorescence quantitative PCR detection of the expression of

VEGF mRNA.

RESULTS: The expression levels of VEGF mRNA in Qizhu Granule treatment group on days 1, 2 and 3 and at weeks 1, 2 and 12 were significantly lower than those in the model control group (0.37 ± 0.33 vs 0.48 ± 0.26 , 0.24 ± 0.20 vs 0.50 ± 0.65 , 0.36 ± 0.24 vs 0.45 ± 0.29 , 0.25 ± 0.14 vs 0.48 ± 0.41 , 0.18 ± 0.60 vs 0.30 ± 0.30 and 0.40 ± 0.01 vs 0.51 ± 0.74 ; all $P < 0.05$ or 0.01).

CONCLUSION: Qizhu Granules can prevent the progression of liver angiogenesis and alleviate liver fibrosis possibly by downregulating the expression of VEGF mRNA in rats.

Key Words: Qizhu Granules; Vascular endothelial growth factor; Angiogenesis

Shi L, Liu SN, Li M, Lv XX, Kan J, Ma JZ, Chen LY. Qizhu Granules downregulate the expression of vascular endothelial growth factor in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3675-3678

摘要

目的: 动态观察芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠肝组织血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响.

方法: 应用CCl₄复制大鼠肝纤维化模型, 同时给予芪术颗粒灌胃预防, 并设立空白对照组、模型对照组、鳖甲软肝片对照组, 分别于造模1、2、3 d及1、2、4、8、12 wk各组取大鼠肝组织. 实时荧光定量PCR方法检测VEGF mRNA的表达.

结果: 芪术颗粒组VEGF mRNA表达量在1、2、3 d及1、2、12 wk时较模型组低, 有统计学差异(0.37 ± 0.33 vs 0.48 ± 0.26 , 0.24 ± 0.20 vs 0.50 ± 0.65 , 0.36 ± 0.24 vs 0.45 ± 0.29 , 0.25 ± 0.14 vs 0.48 ± 0.41 , 0.18 ± 0.60 vs 0.30 ± 0.30 , 0.40 ± 0.01 vs 0.51 ± 0.74 , $P < 0.05$ 或 0.01).

结论: 芪术颗粒可通过下调实验大鼠肝脏VEGF mRNA的表达来抑制肝纤维化的产生.

关键词: 芪术颗粒; 血管内皮生长因子; 血管新生

■背景资料

肝纤维化是慢性肝病发展至肝硬化的必经病理阶段, 如能对其进行积极有效的干预, 就有可能达到阻断甚至逆转多数慢性肝病向肝硬化发展. 我国传统医学在肝纤维化治疗领域有着显著的优势. 该课题组在前期研究的基础上, 通过运用RT-PCR法检测芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠VEGF表达的影响, 观察芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠肝脏血管新生的影响, 以进一步阐明芪术颗粒通络作用的机制.

■同行评议者

陆伦根, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化科

■相关报道

Ohmori *et al*认为肝纤维化过程中血管化程度明显加重,且Namisaki *et al*发现VEGF参与了肝纤维化的形成过程,并在肝纤维化向肝硬化的转化过程中起着一定的作用。

时磊,刘绍能,李敏,吕鑫霞,阚杰,马继征,陈兰羽. 芪术颗粒对大鼠肝纤维化形成过程中VEGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3675-3678

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3675.asp>

0 引言

芪术颗粒是我院治疗肝纤维化的有效药物,临床应用已有30余年. 既往的研究已经部分阐明了该药治疗肝纤维化的机制^[1-5],在此基础上,我们动态观察芪术颗粒对肝纤维化形成过程中大鼠肝组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的影响,以进一步阐明本药治疗肝纤维化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠, 320只, 清洁Ⅱ级, 体重150±20 g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供. 本院Ⅱ级动物房饲养, 饲以标准的大鼠合成饲料, 自由饮用大鼠专用无菌水, 环境温度20℃±2℃, 相对湿度36%. 芪术颗粒由本院制剂室提供, 批号: 20080121; 复方鳖甲软肝片, 内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司生产, 批号: 20081001; CCl₄: 分析纯, 由国药集团化学试剂有限公司提供, 批号: 20080522; 橄榄油: 分析纯, 北京化学试剂公司, 批号: 20080322. TRIzol(Invitrogen); RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas); SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems). PCR仪, 型号: GeneAmp 5700 TaqMAN, 美国Applied Biosystems公司生产; 凝胶图像分析仪, 型号: ImageMaster VDS, 美国Pharmacia Biotech公司生产; 高速冷冻离心机, 型号: Allagra.21R Centrifuge, 德国Backman公司生产; 紫外线分光光度计, 型号: DU640, 德国Backman公司生产; OYY-III-5型电泳仪, 北京六一仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 大鼠随机分为空白对照、模型对照、芪术颗粒及鳖甲软肝片组, 每组80只, 并作相应造模处理. 其中空白对照组大鼠同等条件下饲养, 不造模. 模型对照、芪术颗粒及鳖甲软肝片组大鼠均使用10% CCl₄橄榄油溶液按3 mL/kg剂量腹腔注射, 每周2次, 共12 wk, 复制肝纤维化进展期模型. 实验分3批进行。

1.2.2 干预: 造模同时各组按以下要求给药. 空白对照组: 同等条件下饲养, 不灌胃. 模型对照组: 予等量大鼠专用无菌水灌胃, 灌胃剂量1 mL/100 g, 每天灌胃1次. 芪术颗粒组: 予芪术颗粒灌胃,

给药量为2 g/(kg·d), 每天灌胃1次. 复方鳖甲软肝片对照组: 予复方鳖甲软肝片灌胃, 灌胃剂量为0.7 g/kg, 每天灌胃1次. 同时, 各组每周称体质量1次, 依体质量调整灌胃及造模药物剂量。

1.2.3 取材: 分别在实验1、2、3 d及1、2、4、8、12 wk, 分批处死各组大鼠, 取新鲜肝组织, 置于-80℃液氮中保存, 供实时荧光定量PCR检测用。

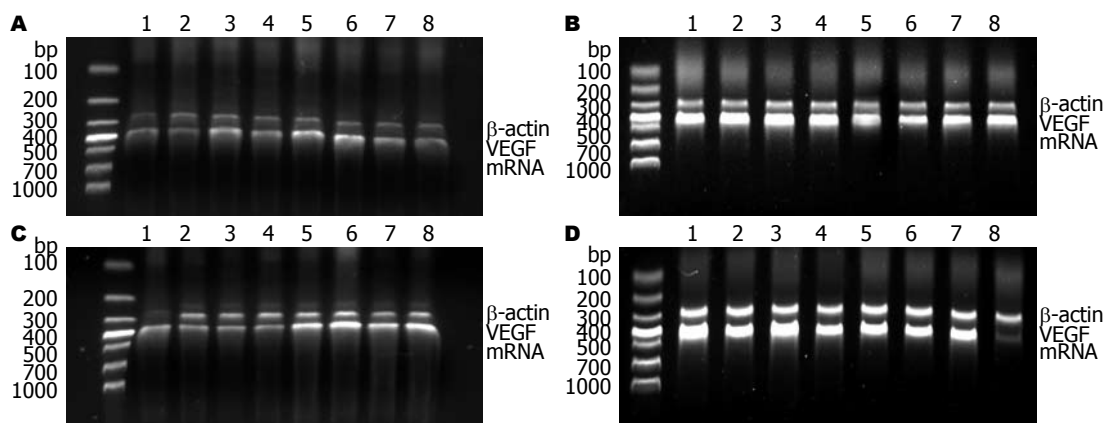
1.2.4 VEGF检测: 取50-100 mg的标本应用TRIzol Reagent试剂盒, 按说明书要求提取总RNA, 测A值以定量RNA浓度后, 置于-80℃冰箱保存待用. 20 μL反转录反应体系中经特异性下游引物反转录成cDNA后, 用EASY Dilution将cDNA液按1、1×10¹、1×10²、1×10³梯度稀释后, 各取2 μL稀释好的cDNA进行RT-PCR反应, 检测发现目的基因的扩增效率和管家基因的扩增效率一致, 可应用ΔΔCt方法进行相对定量. 取5.0 μg总RNA依照RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit说明书合成cDNA. 之后, 取2.0 μL cDNA依照SYBR Green PCR Master Mix说明书要求进行PCT检测, 引物采用Primer Premier 5.0设计, 由赛百盛公司合成. β-actin(263 bp): 上游: 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3', 下游: 5'-AAT GTC ACG CAC GAT TTC CC-3'. VEGF(388 bp): 上游: 5'-GGC TTT GTT CTA TCT TTC TTT G-3', 下游: 5'-ACT GGA CCC TGG CTT TAC T-3'. 反转录条件: 42℃温浴60 min, 70℃温浴10 min. PCR循环参数: 95.0℃, 10 min, 1个循环; 95.0℃, 25 s、55.0℃, 25 s、72.0℃, 50 s, 40个循环; 72.0℃, 5 min, 1个循环。

以上反应设定均在与PCR仪相连的计算机上进行, 每个循环电脑自动记录反应管中的荧光信号值, 并描绘曲线. 反应结束由PE 5700软件分析结果, 自动计算定量数值. 定量结果: $r < -0.980$, 否则定量结果无效. 以达到阈值的最低循环数(Ct值)计算样本中mRNA拷贝数相对量. 每个样本的Ct值由目的基因和管家基因决定, 即 $\Delta Ct(\text{目的基因}) = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{管家基因})$, $\Delta\Delta Ct(\text{目的基因}) = \Delta Ct(\text{目的基因}) - \Delta Ct(\text{标准值})$. 样品中目的基因的相对拷贝量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计处理, 结果用mean±SD表示, 多组均数比较采用单因素方差分析. 组间各指标mRNA表达量比较采用LSD检验, $P < 0.05$ 表示存在统计学意义。

2 结果

在造模后第1天, 造模大鼠肝脏组织VEGF



■应用要点

本研究证实, 芪术颗粒可通过下调实验大鼠肝脏 VEGF mRNA 的表达来抑制肝纤维化的产生, 进一步证明传统中医学在肝纤维化治疗领域占有不可缺少的一席之地。

图 1 各组大鼠 VEGF mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图。A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: 芪术颗粒组; D: 鳖甲软肝片组。1: 1 d 组; 2: 2 d 组; 3: 3 d 组; 4: 1 wk 组; 5: 2 wk 组; 6: 4 wk 组; 7: 8 wk 组; 8: 12 wk 组。

表 1 各组大鼠肝组织 VEGF mRNA 的表达 ($n = 10$, mean \pm SD)

时间	空白对照组	模型对照组	芪术颗粒组	鳖甲软肝片组
1 d	0.01 \pm 0.01	0.48 \pm 0.26 ^b	0.37 \pm 0.33 ^c	0.34 \pm 0.17 ^c
2 d	0.01 \pm 0.01	0.50 \pm 0.65 ^b	0.24 \pm 0.20 ^d	0.42 \pm 0.01
3 d	0.01 \pm 0.01	0.45 \pm 0.29 ^b	0.36 \pm 0.24 ^c	0.39 \pm 0.31
1 wk	0.01 \pm 0.02	0.48 \pm 0.41 ^b	0.25 \pm 0.14 ^c	0.25 \pm 0.16 ^c
2 wk	0.01 \pm 0.01	0.30 \pm 0.30 ^b	0.18 \pm 0.60 ^d	0.30 \pm 0.81
4 wk	0.01 \pm 0.01	0.32 \pm 0.02 ^b	0.25 \pm 0.06	0.32 \pm 0.77
8 wk	0.03 \pm 0.03	0.62 \pm 0.44 ^b	0.59 \pm 0.35	0.60 \pm 0.80
12 wk	0.02 \pm 0.01	0.51 \pm 0.74 ^b	0.40 \pm 0.01 ^c	0.44 \pm 0.41

^b $P < 0.01$ vs 空白对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型对照组。

mRNA 的表达量较空白组即有显著增加 ($P < 0.01$, 表 1, 图 1A-B)。且在第 4 周之前, 芪术颗粒组大鼠肝脏 VEGF mRNA 的表达量与模型组大鼠之间一直存在显著的差异 ($P < 0.01$ 或 0.05 , 表 1, 图 1A-C)。从第 4 周开始芪术颗粒及鳖甲软肝片组大鼠肝组织 VEGF mRNA 表达量与模型组大鼠间差异不再显著 (表 1, 图 1B-D)。芪术颗粒组和鳖甲软肝片组比较, 二者 VEGF mRNA 表达的变化相近, 无显著差异 (表 1, 图 1C-D)。

3 讨论

肝脏血管新生是肝损伤后肝纤维化发展过程中的一个重要病理改变。研究发现^[6]肝脏血管新生对肝脏的再生有着重要的影响, 而在血管新生亦导致了肝窦毛细血管化的发生。研究发现^[7]肝窦毛细血管化直接阻碍了肝细胞与血液之间氧和营养物质的交换, 引起肝窦塌陷和肝细胞萎缩、坏死, 从而加速肝纤维化的进程并促使其向肝硬化转变。目前已有文献报道, 肝纤维化过程中血管化程度明显加重^[7-8], 且通过使用血管

生成抑制剂, 可实现实验动物的肝纤维化逆转。因此, 对肝脏损伤后血管新生的调控及肝窦毛细血管化的干预逆转是关系到肝纤维化能否逆转的重大问题。

VEGF 是在 1989 年由 Ferrara *et al* 在牛垂体滤泡星状细胞培养液中得到的一种糖蛋白, 他能够通过增加血管通透性, 刺激血管内皮细胞增殖来促进血管形成, 无论是在胚胎发育等生理状况, 还是在炎症、创伤修复、肿瘤生长等病理情况下, VEGF 对血管的生成均有密切的关系^[8]。研究证实^[9], VEGF 能够通过促进血管的新生, 促进肝部分切除术后肝脏的再生。而在肝纤维化过程中, VEGF 参与了肝纤维化的形成过程, 并且在肝纤维化向肝硬化的转化过程中也起着一定的作用^[10-11]。本研究也发现, 随着造模时间的延长, 模型对照组大鼠肝脏 VEGF mRNA 的表达量呈现明显的逐步增加趋势, 这也进一步证实了 VEGF 参与了肝脏损伤后血管新生的过程, 同时也会对肝窦毛细血管化的发生发展产生相应的影响作用。本研究还观察到, 第 4 周后 VEGF

■同行评价

本文研究了芪术颗粒对大鼠肝纤维化形成过程中VEGF表达的影响,有较好的学术价值和参考意义。

mRNA表达量各组之间的差异不再显著,这可能与肝窦毛细血管化已经形成有关,确切的机制有待今后进一步研究。

芪术颗粒由黄芪、白术、丹参、莪术、柴胡等药物组成,具有益气活血、化瘀通络之功效,主要用于肝纤维化的治疗。从本研究结果来看,在2 wk内的各个时间点,芪术颗粒干预后的大鼠,肝组织VEGF mRNA的表达量均较模型组减少,由此我们可以推断,芪术颗粒调控VEGF mRNA的表达是其抗肝纤维化机制之一。

4 参考文献

- 1 刘绍能,姚乃礼,殷海波,王勒渝,解荣庆. 芪术颗粒对I、Ⅲ、Ⅳ型胶原影响的免疫组化研究. 中药药理与临床 2001; 17: 27-29
- 2 刘绍能,姚乃礼,殷海波,王勒渝,解荣庆. 芪术颗粒对大鼠肝纤维化模型的治疗作用. 中药新药与临床药理 2002; 13: 216-218
- 3 刘绍能,王勒渝,殷海波,常志遂,姚乃礼,殷海波,解荣庆,李向红. 芪术颗粒预防肝纤维化作用的实验研究. 中国中医药科技 2000; 7: 303-304
- 4 刘绍能,姚乃礼,殷海波,王勒渝,谢荣庆. 芪术颗粒对

大鼠白蛋白肝纤维化模型的预防作用. 中药药理与临床 2001; 17: 26-27

- 5 刘绍能,时磊,李敏,吕鑫霞,阚杰,马继征,陈兰羽. 芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠Ang-1、Ang-2/Tie-2的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2495-2498
- 6 Sato T, El-Assal ON, Ono T, Yamanoi A, Dhar DK, Nagasue N. Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver. *J Hepatol* 2001; 34: 690-698
- 7 李健,李澎涛,牛建昭. 酒精性肝病大鼠肝窦病理改变的形态学观察. 北京中医药大学学报 2006; 29: 679-681
- 8 张永,韩宁,尹长健. 柔肝抑纤饮抗DMN肝纤维化大鼠肝窦毛细血管化的实验研究. 中华中医药学刊 2009; 27: 97-99
- 9 Li JL, Harris AL. Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis: therapeutic implications. *Front Biosci* 2009; 14: 3094-3110
- 10 Namisaki T, Yoshiji H, Kojima H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Sakurai S, Yanase K, Kitade M, Yamazaki M, Asada K, Uemura M, Nakamura M, Fukui H. Salvage effect of the vascular endothelial growth factor on chemically induced acute severe liver injury in rats. *J Hepatol* 2006; 44: 568-575
- 11 郭艳萍,杨广英,王建君,姜黄,李军. 转化生长因子- β 1及VEGF在肝纤维化中的表达. 中华实用诊断与治疗杂志 2008; 22: 724-725

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》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 2009-12-28)

己酮可可碱对大鼠溃疡性结肠炎TNF- α 及IL-1 β 表达的影响

钟江鹏, 李登欣, 李石, 李杰, 徐静

钟江鹏, 李石, 李杰, 徐静, 潍坊医学院 山东省潍坊市 261042
李登欣, 潍坊市人民医院消化内科 山东省潍坊市 261042
钟江鹏, 潍坊医学院在读硕士, 主要从事炎症性肠病的研究。
山东省科技发展计划基金资助项目, No. 2005GG4402004
作者贡献分布: 此课题由李登欣设计; 研究过程由钟江鹏、李石及徐静操作完成; 数据分析由钟江鹏完成; 本论文写作由钟江鹏、李石、李杰及徐静完成。
通讯作者: 李登欣, 副主任医师, 261042, 山东省潍坊市奎文区广文街151号, 潍坊市人民医院消化内科, lidengxin0515@sina.com
收稿日期: 2009-10-06 修回日期: 2009-11-22
接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Pentoxifylline suppresses the expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in ulcerative colitis in rats

Jiang-Peng Zhong, Deng-Xin Li, Shi Li, Jie Li, Jing Xu

Jiang-Peng Zhong, Shi Li, Jie Li, Jing Xu, Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong Province, China
Deng-Xin Li, Department of Gastroenterology, Weifang People's Hospital, Weifang 261042, Shandong Province, China
Supported by: the Science and Technology Development Program of Shandong Province, No. 2005GG4402004
Correspondence to: Deng-Xin Li, Department of Gastroenterology, Weifang People's Hospital, 151 Guangwen Street, Kuiwen District, Weifang 261042, Shandong Province, China. lidengxin0515@sina.com
Received: 2009-10-06 Revised: 2009-11-22
Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of pentoxifylline (PTX) on the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced ulcerative colitis (UC) in rats.

METHODS: UC was induced in rats with TNBS and ethanol. The rats were randomly divided into three groups: normal group (C), TNBS group (T), and PTX group (D). Three days after UC was induced, the rats in the PTX group received a PTX injection every 12 hours for five consecutive days, while the remaining two groups received an injection of distilled water. The disease activity index (DAI) was evaluated daily. The expression of TNF- α and IL-1 β mRNAs was measured by reverse transcription-

polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Compared with the normal group and the PTX group, the expression of TNF- α and IL-1 β mRNAs and DAI in the TNBS group were markedly higher (6.85 ± 2.78 vs 0.45 ± 0.11 and 1.85 ± 2.01 ; 1.02 ± 0.16 vs 0.61 ± 0.08 and 0.74 ± 0.16 ; and 0.95 ± 0.17 vs 0.57 ± 0.07 and 0.64 ± 0.13 , respectively; all $P < 0.05$). No significant differences were noted in the expression levels of TNF- α and IL-1 β mRNAs and DAI between the normal group and the PTX group (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: The expression of proinflammatory factors TNF- α and IL-1 β mRNAs increases in rat ulcerative colitis. PTX exerts protective effects against UC possibly by downregulating the expression of TNF- α and IL-1 β mRNAs.

Key Words: Ulcerative colitis; Pentoxifylline; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-1 β

Zhong JP, Li DX, Li S, Li J, Xu J. Pentoxifylline suppresses the expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in ulcerative colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3679-3683

摘要

目的: 探讨己酮可可碱(PTX)对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠溃疡性结肠炎(UC)肠黏膜炎性细胞因子TNF- α 及IL-1 β 表达的影响。

方法: 应用三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇灌肠制备大鼠UC的模型。实验设正常对照组(C组)、TNBS损伤组(T组)、PTX治疗组(D组), 从造模后第3天开始给予D组大鼠PTX腹腔注射治疗, C组、T组则注入等量生理盐水, bid, 连用5 d。观察疾病活动指数(DAI)。处死大鼠, 应用RT-PCR(逆转录-聚合酶链反应)方法半定量检测技术, 对UC大鼠结肠黏膜中TNF- α 、IL-1 β mRNA表达进行测定。

结果: TNBS损伤组大鼠肠黏膜TNF- α 、IL-1 β mRNA的表达及DAI评分明显高于正常对照组和PTX治疗组(6.85 ± 2.78 vs 0.45 ± 0.11 ,

■背景资料

PTX(己酮可可碱)为甲基黄嘌呤衍生物, 能抑制细胞内环核苷酸磷酸二酯酶活性, 使细胞内CAMP浓度增加, 近来研究发现他还有抗肿瘤作用和免疫抑制作用。目前, 主要用于治疗改善血液流变学。但对PTX进行分子水平的研究, 探讨其治疗溃疡性结肠炎(UC)的作用及机制报道甚少。

■同行评议者

房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院上海市消化疾病研究所

■研究前沿

近年,越来越多的研究证明,免疫调节异常在UC发病机制中起着相当重要的作用,但到底是什么原因导致的免疫调节异常还不是很清楚,而细胞因子IL-1 β 和TNF- α 在分子免疫中有着重要作用,成为当前的研究热点之一。

1.85 \pm 2.01; 1.02 \pm 0.16 vs 0.61 \pm 0.08, 0.74 \pm 0.16; 0.95 \pm 0.17 vs 0.57 \pm 0.07, 0.64 \pm 0.13, 均 $P<0.05$),而PTX治疗组与对照组相比则无明显差异(均 $P>0.05$)。

结论: UC的发生过程中炎性细胞因子TNF- α 及IL-1 β 表达升高;己酮可可碱可能通过降低炎性细胞因子TNF- α 及IL-1 β 的表达而发挥其干预作用。

关键词: 溃疡性结肠炎; 己酮可可碱; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-1 β

钟江鹏, 李登欣, 李石, 李杰, 徐静. 己酮可可碱对大鼠溃疡性结肠炎TNF- α 及IL-1 β 表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3679-3683

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3679.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种比较常见的慢性非特异性肠道炎症疾病,且在我国发病率有增高的趋势^[1]. 该病病程长,易反复发作,其发病机制尚未完全阐明. 目前,UC的治疗仍然是临床上一大难题,传统的三类药物(水杨酸类、类固醇激素和免疫抑制剂)对UC的缓解率在80%左右,最佳的维持缓解方案也仅能使复发降低50%左右,约有1/3的病例最终需手术治疗,而且这三类药不良反应也较大,严重影响了其广泛运用. 因此,寻找新的治疗药物已是当今UC研究领域的一大热点. PTX(己酮可可碱)为甲基黄嘌呤衍生物,能抑制细胞内环核苷酸磷酸二酯酶活性,使细胞内cAMP浓度增加. 目前,主要用于改善血液流变学,近来研究发现他还有抗肿瘤和免疫抑制作用^[2-4],从而自上游或源头发挥抗TNF- α 等致炎性细胞因子作用. 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)诱导的结肠炎模型,在临床和免疫等方面与人类炎症性肠病极为相似^[5],因此,本研究将探讨PTX对TNBS诱导的UC鼠模型肠黏膜TNF- α 及IL-1 β 表达的影响,并探讨其机制,为寻找一种具有开发潜力的治疗UC的新药物提供重要的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠30只,体质量200 \pm 20 g,购于山东中医药大学动物中心. TNBS购自Sigma公司,PTX购自日本WAKO公司,TRIzol试剂盒,逆转录试剂盒及PCR试剂盒购自上海生物工程公司,其他试剂为国产分析纯. 美国

表 1 DAI评分标准

记分	体质量下降(%)	大便性状	便血
0	无	正常	阴
1	1-5	-	-
2	6-10	半稀便	隐血(+)
3	11-15	-	-
4	>15	稀便	肉眼血便

DAI = (体质量下降分数+大便性状分数+便血分数)/3.

伯乐公司的PCR仪(BIO-RAD MyCycler),美国HE33水平电泳槽,美国UVP凝胶成像分析系统(Biospectrum AC).

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 将30只 δ Wistar大鼠,随机分为对照组(C组)、TNBS损伤组(T组)、PTX治疗组(D组),每组10只. 给予标准饮食1 wk后开始制备模型. 用100 mL/L水合氯醛(300 mg/kg)腹腔轻度麻醉大鼠后,将直径2 mm长约12 cm的橡胶输液管(术前石蜡油润滑)由肛门轻缓插入,深约8 cm,再将400 mL/L的乙醇0.3 mL和50 mg/L TNBS(100 mg/kg)经细管注入. 造模后第3天,取D组大鼠,每只腹腔内注入200 μ L PTX溶液(生理盐水稀释),PTX按5 mg/kg给予, bid. C组、T组则注入等量生理盐水,连用5 d. 每日观察大鼠一般状况及粪便性状,记录评分,评分标准采用疾病活动指数(DAI)^[6],DAI与组织学治愈具有良好相关性^[7-8],DAI评分表见表1.

1.2.2 标本收集: 实验结束后,水合氯醛麻醉大鼠,将其仰卧固定于手术台,腹部正中切口,分离结肠组织(从肛门至盲肠约8 cm),沿肠系膜纵轴剪开,冰生理盐水冲洗干净,取50-100 mg肠黏膜迅速置于液氮中用于提取RNA^[9].

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定炎性细胞因子的表达: 按TRIzol试剂盒说明提取总RNA,紫外分光光度计测定总RNA浓度,重复测定3次,取5 μ g总RNA按说明书进行逆转录反应合成cDNA,按PCR说明书将cDNA进行PCR扩增. 以 β -actin为内参照, β -actin引物序列如下: 上游: GAGAGGGAAATCGTGCCTGAC,下游CATCTGCTGGAAGGTGGACA. IL-1 β 上游引物为CCTGTGGCCTTGGGCCTCAA,下游引物为GGTGCTGATGTACCAGTTGGG,以95 $^{\circ}$ C预变性3 min,然后进行循环扩增,95 $^{\circ}$ C变性45 s,56 $^{\circ}$ C退火40 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min. TNF- α 上游引物为

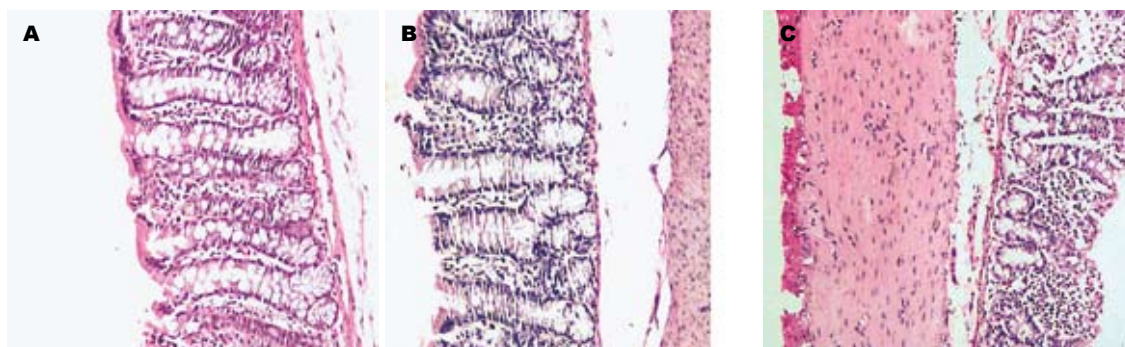


图1 各组大鼠肠黏膜病理表现. A: C组; B: D组; C: T组.

■ 相关报道

Hadziselimovic *et al*证实UC患者组织、肠腔和血清中TNF- α 水平与疾病活动相关,用抗TNF- α 抗体治疗,可使肠炎症很快消退.

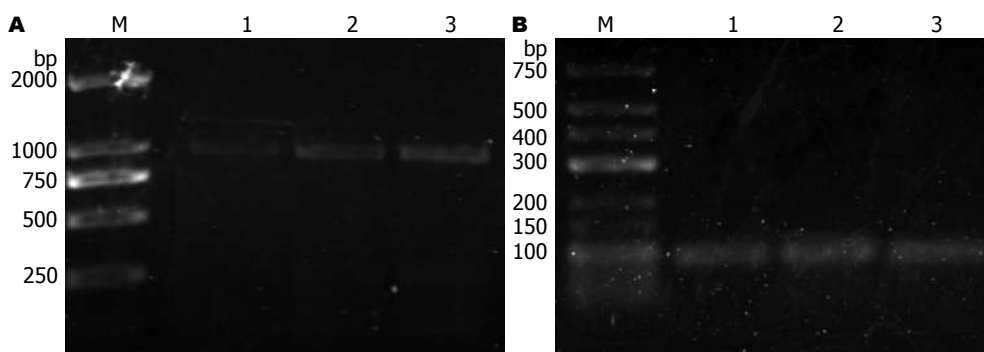


图2 各组大鼠肠黏膜RT-PCR检测TNF- α 、IL-1 β mRNA的表达. A: IL-1 β ; B: TNF- α ; M: Marker; 1: C组; 2: D组; 3: T组.

CCAGGAGAAAGTCAGCCTCCT, 下游引物为TCATACCAGGGCTTGAGCTCA, 以95℃预变性3 min, 然后进行循环扩增, 95℃变性45 s, 55℃退火40 s, 72℃延伸1 min, 共35个循环, 最后72℃延伸10 min. 扩增后以15 g/L琼脂糖凝胶(含0.5 mg/L的溴化乙啶)电泳, 用凝胶成像分析系统拍照并分析, 以目的基因条带和内参的灰度比值作为目的基因的相对表达量.

统计学处理 各组数据均以mean \pm SD表示, 两组间比较用单因素方差分析, 采用SPSS16.0统计软件进行分析.

2 结果

2.1 大鼠一般状况 造模后第2天即出现腹泻, T组大鼠实验过程中一直有腹泻, 部分出现肉眼血便, 所有大鼠均粪便隐血阳性. D组大鼠经PTX治疗后腹泻次数减少, 部分有隐血阳性, 一直未出现肉眼血便. C组大鼠无改变. DAI评分显示, T组明显高于D组和C组($P<0.05$), 而C组和D组之间的差异则无显著性($P>0.05$, 表2).

2.2 组织病理改变 T组镜下可见腺管排列紊乱, 黏膜及黏膜下层血管高度扩张充血, 大量炎细胞浸润, 以中性粒细胞、淋巴细胞为主. 而PTX治疗组镜下黏膜及黏膜浅层仅有少量中性粒细

表2 PTX对大鼠DAI、肠黏膜TNF- α 、IL-1 β mRNA表达的影响 (mean \pm SD)

分组	DAI	TNF- α	IL-1 β
C组	0.45 \pm 0.11 ^a	0.61 \pm 0.08 ^a	0.57 \pm 0.07 ^a
D组	1.85 \pm 2.01 ^a	0.74 \pm 0.16 ^a	0.64 \pm 0.13 ^a
T组	6.85 \pm 2.78	1.02 \pm 0.16	0.95 \pm 0.17

^a $P<0.05$ vs T组.

胞、淋巴细胞浸润, 组织损伤较轻(图1).

2.3 TNF- α 、IL-1 β mRNA表达 T组大鼠肠黏膜TNF- α 、IL-1 β mRNA表达明显高于C组和D组(均 $P<0.05$), 经PTX治疗后, 与T组相比两种因子的表达明显降低($P<0.05$), 与对照组相比则无明显差异($P>0.05$, 表2, 图2).

3 讨论

UC是一种以侵犯直肠和结肠黏膜与黏膜下层为主的慢性肠道炎症, 其发病机制可能与易感基因、免疫系统异常等的相互作用有关^[10-11]. 免疫反应异常是造成UC和组织损伤的重要因素, 而细胞因子又在异常的免疫反应中起着重要作用^[12-14].

在众多的细胞因子中, IL-1 β 和TNF- α 已成

■同行评价

本研究发现PTX对大鼠UC中TNF- α 及IL-1 β 表达的影响机制涉及一些炎性细胞因子,有一定新意和可读性。

为当前的研究热点之一。IL-1 β 能通过自分泌或旁分泌刺激其他细胞因子和炎症递质的产生,诱发抗原提呈及细胞表面免疫分子的表达,为T淋巴细胞活化提供第二信使,促进B细胞的增殖以及分化,从而介导免疫球蛋白的分泌,激活补体,增强细胞免疫和体液免疫介导的组织损伤过程。TNF- α 为促炎性蛋白^[15],主要由脂多糖(LPS)激活的单核巨噬细胞产生,具有广泛的生物活性,除抗肿瘤外,对免疫反应、机体代谢、炎症反应均有重要的调节介导作用^[16]。

Rachmilewitz *et al*^[17]的研究表明,在UC患者中,活动性UC病变部位的TNF- α 、IL-1 β 与正常部位相比明显增高,是正常的7倍和3倍左右。同时Hadziselimovic *et al*^[18]、Yamamoto *et al*^[19]和Raddatz *et al*^[20]的研究也得出了类似结果。与这些研究结果一致,从本实验中,我们也发现,UC鼠肠黏膜组织中TNF- α 、IL-1 β mRNA表达与对照组相比明显增强,进一步证实了这两种因子可能参与了UC的发生和发展过程,但目前还没有足够的特异性替代临床表现作为UC的标志^[21-22]。

一直以来,PTX作为血管活性药物用于血管功能不全性疾病的治疗^[23],可以减少白细胞与内皮细胞的黏附^[24]。近年来有研究发现其具有较强的抗炎和免疫调节作用。王祥和 *et al*的研究表明PTX抑制TNF mRNA的转录^[25-27],本研究也证实,大鼠应用PTX治疗后,显著改善了UC的症状,同时与UC组相比两种因子的表达也明显降低。其机制可能与PTX增加细胞内cAMP浓度,抑制TNF- α 和IL-1 β 基因的转录活性,降低了TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的表达,从而减轻了炎症反应有关。本研究也为该药抗炎及调节免疫反应的临床应用价值提供了一定的理论依据。

尽管细胞因子在UC发病中的作用基本得到公认,但调控这些因子释放的机制目前仍不十分清楚。近年来,随着对核因子(NF)- κ B结构与功能研究的深入,细胞因子与NF- κ B的关系已引起了人们高度的重视。有研究表明,NF- κ B在炎症性肠病发生过程起着重要作用,许多细胞因子包括TNF- α 刺激均能导致NF- κ B的活化^[28-29]。本研究中PTX使大鼠症状明显减轻,是否是PTX抑制了NF- κ B的激活,减少了TNF- α 、IL-1 β mRNA的表达,减轻炎性细胞浸润的原因,还有待考证,这也是我们进一步研究的方向。

4 参考文献

- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8:

- 158-161
- Samlaska CP, Winfield EA. Pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 603-621
- Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987; 34: 50-97
- 郝嘉, 郭红, 肖颖彬. 己酮可可碱的药理特性和临床新用途. *中国新药与临床杂志* 2002; 21: 183-186
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- 郑萍, 牛凤丽, 刘文忠, 施尧. 氧化苦参碱对葡聚糖硫酸钠诱导大鼠结肠炎的抗炎作用机制研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 207-210
- Murthy S, Cooper HS, Yoshitake H, Meyer C, Meyer CJ, Murthy NS. Combination therapy of pentoxifylline and TNF α monoclonal antibody in dextran sulphate-induced mouse colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 251-260
- Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69: 238-249
- 甘华田, 欧阳钦, 贾道全, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者核因子- κ B活化与细胞因子基因表达. *中华内科杂志* 2002; 41: 252-255
- Zhang SZ, Zhao XH, Zhang DC. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 35-40
- Papadakis KA, Targan SR. Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 283-296
- Schreiber S, Raedler A, Stenson WF, MacDermott RP. The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21: 451-502
- Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22: 382-389
- Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1999; 34: 66-74
- 张继平. 溃疡性结肠炎的免疫学研究进展. *中国误诊学杂志* 2002; 2: 57-59
- 陈英群, 马贵同. 细胞因子与溃疡性结肠炎相关性研究进展. *中国中西医结合消化杂志* 2003; 11: 57-59
- Rachmilewitz D, Karmeli F, Shteingart S, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Immunostimulatory oligonucleotides inhibit colonic proinflammatory cytokine production in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 339-345
- Hadziselimovic F, Emmons LR, Gallati H. Soluble tumour necrosis factor receptors p55 and p75 in the urine monitor disease activity and the efficacy of treatment of inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 37: 260-263
- Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T, Matsumoto K. Systemic and local cytokine production in quiescent ulcerative colitis and its relationship to future relapse: a prospective pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 589-596
- Raddatz D, Bockemühl M, Ramadori G. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 547-557
- Bitton A, Peppercorn MA, Antonioli DA, Niles JL, Shah S, Bousvaros A, Ransil B, Wild G, Cohen A,

- Edwardes MD, Stevens AC. Clinical, biological, and histologic parameters as predictors of relapse in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2001; 120: 13-20
- 22 Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NH. Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 359-367
- 23 Mandell GL. ARDS, neutrophils, and pentoxifylline. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1103-1105
- 24 王玲, 林毅, 周东, 陈槐卿. 己酮可可碱抗白细胞与内皮细胞粘附的研究. 华西医科大学学报 1996; 27: 163-166
- 25 王祥和, 徐建国. 己酮可可碱对内毒素肺损伤肺组织TNFmRNA表达的影响. 中华麻醉学杂志 1997; 17: 420-423
- 26 尹文, 梁继河, 虎晓岷, 张金山, 姚兵. 己酮可可碱对创伤性急性肺损伤兔肺组织肿瘤坏死因子 α 基因表达的影响及其意义. 中国危重病急救医学 1999; 11: 643-645
- 27 彭毅, 陶晓南, 杨业金, 付薇, 向敏, 张瑞祥. 己酮可可碱对呼吸道合胞病毒所致的TNF- α 基因表达水平的影响. 同济医科大学学报 2000; 29: 417-419
- 28 Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998; 43: 856-860
- 29 Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 3-9

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》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 ^a $P < 0.05$, ^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 2009-12-28)

幽门螺杆菌尿素通道蛋白基因 $ureI$ 的检测、克隆及序列分析

邵长江, 张尤历, 王文兵, 孔梅, 陈鑫, 宋永站

■背景资料

*H. pylori*是嗜中性、微需氧性革兰氏阴性杆菌, 世界范围内约有50%的人群感染, 为了能够在胃环境中存活, *H. pylori*进行了一系列的抗酸、耐酸机制的进化过程, 其最大特征是能产生大量高活性的尿素酶, 将尿素降解为氨和二氧化碳, 氨中和胃酸。

邵长江, 张尤历, 孔梅, 陈鑫, 宋永站, 江苏大学附属医院消化科 江苏省镇江市 212001

王文兵, 江苏大学生命科学研究院 江苏省镇江市 212013

邵长江, 在读硕士, 主要从事幽门螺杆菌与消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 邵长江与张尤历对此文所作贡献均等; 此课题由张尤历与王文兵共同设计; 研究过程由邵长江、孔梅、陈鑫及宋永站操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张尤历提供; 分析由邵长江完成, 本论文写作由邵长江完成。

通讯作者: 张尤历, 教授, 212001, 江苏省镇江市解放路438号, 江苏大学附属医院消化科. zjyouli@yahoo.com.cn

电话: 0511-85011787

收稿日期: 2009-11-09 修回日期: 2009-11-25

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-28

Detection, cloning and sequence analysis of the urea channel protein gene $ureI$ of *Helicobacter pylori*

Chang-Jiang Shao, You-Li Zhang, Wen-Bing Wang, Mei Kong, Xin Chen, Yong-Zhan Song

Chang-Jiang Shao, You-Li Zhang, Mei Kong, Xin Chen, Yong-Zhan Song, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Wen-Bing Wang, Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor You-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, 438 Jiefang Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zjyouli@yahoo.com.cn

Received: 2009-11-09 Revised: 2009-11-25

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To detect, clone and sequence the urea channel protein gene $ureI$ of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) strains isolated from Zhenjiang area.

METHODS: Sixty *H. pylori* strains were isolated from gastric mucosa of patients with chronic gastritis, peptic ulcer or gastric cancer, and cultured on solid agar medium. The gene encoding UreI protein was amplified from *H. pylori* genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR). The amplified $ureI$ genes from some strains derived from different patients were cloned into T vector, sequenced and analyzed using bioinformatic methods.

RESULTS: The $ureI$ gene was detected in 100% (60/60) of *H. pylori* strains. The $ureI$ genes of eight *H. pylori* strains derived from patients with chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer were cloned and sequenced. The nucleotide and amino acid sequence homology among the $ureI$ genes derived from different *H. pylori* strains is more than 95.6%.

CONCLUSION: The $ureI$ gene is conserved among *H. pylori* strains and can be used as a good molecular marker for identification of *H. pylori*.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Urea channel protein gene; Cloning; Sequence analysis; Molecular marker

Shao CJ, Zhang YL, Wang WB, Kong M, Chen X, Song YZ. Detection, cloning and sequence analysis of the urea channel protein gene $ureI$ of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3684-3687

摘要

目的: 检测镇江地区幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)尿素通道蛋白基因 $ureI$, 并进行克隆和序列分析。

方法: 从胃十二指肠疾病患者胃黏膜组织中分离培养获得 60例 $H. pylori$, PCR扩增检测 $ureI$ 基因, 部分菌株的 $ureI$ 基因克隆至pMD18-T载体上, 进行测序和序列分析。

结果: 60例 $H. pylori$ 菌株的 $ureI$ 检出率为100%, 成功克隆了8株来源于慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌的 $H. pylori$ 菌株 $ureI$ 并进行了序列分析。结果表明不同来源 $H. pylori$ 菌株之间 $ureI$ 核苷酸和氨基酸序列同源性均高达95.6%以上。

结论: $ureI$ 基因在 $H. pylori$ 中高度保守, 可以作为鉴定 $H. pylori$ 的分子诊断标志。

关键词: 幽门螺杆菌; 尿素通道蛋白基因; 克隆; 序列分析; 分子标记

邵长江, 张尤历, 王文兵, 孔梅, 陈鑫, 宋永站. 幽门螺杆菌尿素

■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

通道蛋白基因 $ureI$ 的检测、克隆及序列分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3684-3687
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3684.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种定植于人胃部的革兰氏阴性杆菌, 是慢性胃炎、消化性溃疡的主要病因, 并与胃癌和胃黏膜相关淋巴组织恶性淋巴瘤等疾病的发生密切相关^[1-2], 世界卫生组织已将其列为 I 级致癌因子^[3]. 幽门螺杆菌尿素通道蛋白(UreI)在*H. pylori*致病中起到了关键作用. UreI为pH依赖性尿素通道蛋白, 当外界环境中的pH值小于6.2时, 通道开放, 有选择性地使尿素通过, 进入胞质中的尿素被尿素酶水解成氨和二氧化碳, 迅速扩散至周质腔中和胃酸^[4]. 氨的生成是*H. pylori*对抗胃酸、耐受胃酸以及在胃内定植的基础, 因此UreI是*H. pylori*在胃内定植和持续感染的一个最关键环节^[5]. 本实验采用PCR技术检测了60例来源于胃炎、消化性溃疡和胃癌的*H. pylori*菌株的 $ureI$ 基因, 并对其中的8例进行克隆、序列测定和分析, 以了解不同疾病来源菌株的 $ureI$ 在致病过程中的变化情况并明确 $ureI$ 基因是否适合作为诊断*H. pylori*感染的分子标记, 为进一步研究打下基础.

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori*基础培养基、微需氧环境发生袋、选择性抗生素及厌氧培养罐购自德国Merck公司. 改良布氏肉汤培养基由上海腹泻疾病控制中心提供, 无菌羊全血为金坛欣迪公司产品. *Escherichia coli* DH5 α 为江苏大学生命科学研究院实验室保存. pMD18-T载体、Taq DNA聚合酶、质粒抽提试剂盒购自TaKaRa大连公司. 酵母提取物、蛋白胨为OXOID公司产品. 其他常规试剂为市售分析纯.

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori*菌株的来源: 分离的*H. pylori*来自60例2008-05/2008-12因消化系症状来江苏大学附属医院消化科胃镜室检查患者的胃窦黏膜(距幽门5 cm以内)活检组织, 每例取新鲜胃黏膜3块, 其中1块置于输送液中用于分离培养*H. pylori*, 1块用于快速尿素酶检测, 1块用于病理组织学检查. 60例中慢性胃炎22例, 消化性溃疡28例, 胃癌10例. 疾病的诊断依据胃镜和病理学检查.

1.2.2 *H. pylori*的培养: 自输送液中取出胃黏膜标本, 将活检新鲜组织用接种环均匀涂于固体琼

脂培养基, 在微需氧环境, 37℃下培养, 3-5 d后收集细菌. 经菌落形态、涂片染色显微镜下观察以及生化反应(尿素酶、化酶和触酶)证实.

1.2.3 *H. pylori*基因组DNA提取: 刮取培养的菌落, 悬于适量TE缓冲液, 以GES液(含异硫氰酸胍, EDTA, sarkosyl)-氯仿法提取DNA, 加适量TE液, 4℃过夜溶解. 于-20℃保存备用.

1.2.4 引物设计与合成: 参照GenBank中的*H. pylori* 26695标准株(GenBank登录号: NC_000915)的全序列设计PCR引物: 上游引物 P1: 5'-ATGCTAGGACTTGTATTGTTATATG-3'; 下游引物 P2: 5'-CACCCAGTGTTGGATAAAGAG-3'. 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2.5 PCR扩增 $ureI$ 片段: 以获得的*H. pylori*基因组DNA为模板, P1和P2为引物, 用Taq DNA聚合酶进行PCR扩增(在20 μ L反应体系中, 分别加入dNTP 2.0 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.0 μ L, DNA模板 1 μ L, P1和P2引物各0.5 μ L, Taq DNA聚合酶0.3 μ L, ddH₂O 13.7 μ L, 按照PCR条件扩增, 扩增条件为: 94℃预变性5 min后, 按94℃ 30 s, 54.5℃ 30 s, 72℃ 40 s, 38个循环, 最后72℃延伸10 min. PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.6 TA克隆: 胶回收试剂盒回收目的片段, 回收PCR产物与pMD18-T载体在16℃连接过夜. 连接产物转化DH5 α 感受态细胞, 转化后的细菌涂布于含100 mg/L氨苄青霉素的LB平板上, 37℃培养12 h. 挑取菌落转种于含氨苄青霉素100 mg/L的LB液体培养基, 37℃振荡培养12 h后收集细菌, 质粒抽提试剂盒抽提质粒.

1.2.7 重组质粒的酶切鉴定和序列测定: 获得重组质粒pMD18-T- $ureI$ 后用HindIII和EcoR I 双酶切, 酶切产物经1%的凝胶电泳鉴定. 为了进一步从序列的准确性上得到验证, 将阳性克隆菌株送到上海生物工程有限公司测序.

1.2.8 $ureI$ 序列比对: 用MEGA 4.0和DNASTar 7.0生物软件对菌株测序结果和公布*H. pylori*标准株26695的 $ureI$ 序列进行比对分析.

2 结果

2.1 目的基因 $ureI$ 的扩增 不同疾病来源的60例*H. pylori*菌株DNA经PCR扩增, 进行1%的琼脂糖凝胶电泳, 在约585 bp附近可见均1条带, 与预期大小相符, 见图1.

2.2 $ureI$ 基因的检出率 镇江地区 $ureI$ 基因检测结果显示, 60例不同胃十二指肠疾病来源的*H. py-*

■ 相关报道

Weeks及Sachs研究发现UreI有6个螺旋构成的2个环状结构(PL1和PL2), 其中PL1对中性环境中限制尿素转运重要, 而PL2对酸性环境激活尿素转运很重要.

■应用要点

本研究证实,不同疾病来源的 *H pylori ureI* 基因高度保守, *ureI* 基因的PCR扩增可以作为鉴定 *H pylori* 的一种新的较好的分子标记,以UreI为抗原的 *H pylori* 疫苗将具有广阔的应用前景。

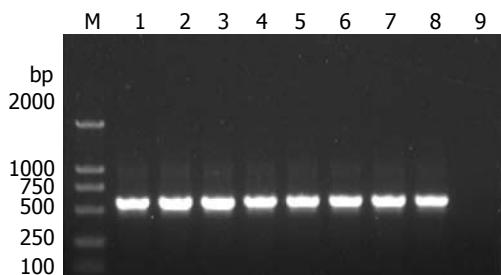


图1 *H pylori ureI* PCR产物电泳结果. M: DNA Marker (DL2000); 1-3: 胃炎株; 4-6: 消化性溃疡株; 7-8: 胃癌株; 9: 空白对照。

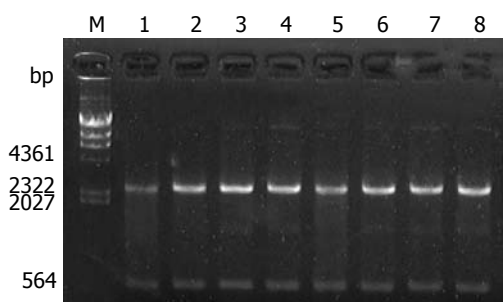


图2 pMD18-T-*ureI*的双酶切鉴定. M: DNA Marker(λ -HindIII); 1-3: 胃炎株; 4-6: 消化性溃疡株; 7-8: 胃癌株。

*lori*菌株中*ureI*总阳性率为100%(60/60)。

2.3 pMD18-T-*ureI*的克隆 将8例不同疾病来源 *H pylori*菌株的*ureI*克隆于pMD18-T载体后用 *Hind*III和*Eco*R I 双酶切鉴定,所获片段大小与预期相符,见图2。

2.4 序列分析 采用MEGA 4.0生物软件对菌株测序结果以及GenBank公布的*H pylori*标准株26695序列进行比对。结果发现镇江地区不同疾病来源的菌株与标准菌株26695的核苷酸序列同源性达95.6%-96.9%,而不同疾病来源菌株之间的核苷酸序列同源性高达97.4%-99.8%。镇江地区不同疾病来源的菌株与标准菌株26695的氨基酸序列的同源性96.9%-97.9%,不同疾病来源菌株之间的氨基酸序列高达97.9%-100%,虽然26695标准株的UreI蛋白第54位和第74位的组氨酸和丝氨酸在8例镇江地区不同疾病来源的 *H pylori*中均被天冬酰胺取代(图3-4),但是4个保守的组氨酸残基(H71、H123、H131和H193)以及胞内环保守区域均未发生变异。

3 讨论

*H pylori*的尿素酶基因是由7个基因组成的一基因簇,编码UreA和UreB两个结构亚单位和5个辅助蛋白(UreI、UreE、UreF、UreG和UreH)。 *ureI* 基因全长585 bp,编码相对分子质量21 600 Da

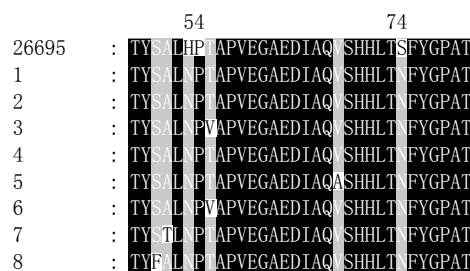


图3 *H pylori ureI*编码氨基酸序列的比对. 1-3: 胃炎株; 4-6: 消化性溃疡株; 7-8: 胃癌株。

		Percent Identity								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Divergence	1		100.0	99.0	99.5	99.5	99.0	99.0	99.0	97.9
	2	0.0		99.0	99.5	99.5	99.0	99.0	99.0	97.9
	3	1.0	1.0		98.5	98.5	99.0	97.9	97.9	96.9
	4	0.5	0.5	1.6		99.0	98.5	98.5	99.5	97.4
	5	0.5	0.5	1.6	1.0		98.5	98.5	98.5	97.4
	6	1.0	1.0	1.0	1.6	1.6		97.9	97.9	96.9
	7	1.0	1.0	2.1	1.6	1.6	2.1		97.7	96.9
	8	1.0	1.0	2.1	0.5	1.6	2.1	2.1		96.9
	9	2.1	2.1	3.1	2.6	2.6	3.1	3.1	3.1	

图4 UreI的同源性分析. 1-3: 胃炎株; 4-6: 消化性溃疡株; 7-8: 胃癌株; 9: 26695标准株。

的膜蛋白,有6个跨膜螺旋序列,无信号肽。早期的研究认为是 *H pylori* 表面的尿素酶对于他在胃内的酸性环境下定植起了关键作用,但是进一步的研究表明,当pH低于4.5时,细胞表面的尿素酶就失去了活性,因此推测细胞表面的尿素酶对于 *H pylori* 在胃内定居作用微弱,胞质内的尿素酶可能发挥主要作用^[6]。但是胃内尿素的浓度一般在1-3 mmol/L之间,尿素渗入脂质双层的速度不足以使细菌内部的尿素酶达到饱和状态。Weeks *et al*^[4]证明了UreI蛋白是一种pH依赖的尿素通道蛋白。尿素和氢离子通过外膜的孔隙扩散入周质,使UreI的构象发生变化,允许尿素快速进入胞质,被尿素酶迅速水解,产生二氧化碳和氨气,氨气快速扩散到周质,中和周质腔中的H⁺,当周质腔中的pH值升至6.2时,形成的UreI尿素通道再次关闭,阻止尿素转运,避免胞质过度碱化^[7-9]。Mollenhauer-Rektorschek *et al*^[10]证实 *ureI* 突变株 *H pylori* 在沙鼠胃内不能定植。虽然 *ureI* 基因是 *H pylori* 在胃内酸性环境下的生存和定植所必需的,但是UreI蛋白与尿素酶的活性却无必要关系^[11]。在酸性pH条件下, UreI蛋白4个保守的组氨酸残基(H71、H123、H131和H193)以及胞内环保守区域对氨的生成起到决定性的作用,如果发生上述基因点突变,则会导致UreI通道的失活^[12]。如果能采取有效的手段抑制UreI蛋白的活性,则有可能清除胃内的 *H pylori*,这一观

点为根除 $H. pylori$ 提供了一个新思路^[10].

目前 $H. pylori$ 感染的分子生物学诊断, 常用的检测基因有尿素酶基因($ureA$)、16s rRNA 基因、26-ku种属特异抗原基因(SSA)、磷酸葡萄糖氨基转移酶基因($glmM$)、细胞毒素相关基因($cagA$)等^[13-15]. Lu *et al*^[14]认为 $glmM$ 是诊断 $H. pylori$ 感染灵敏度和特异度较好的指标, 吴莺 *et al*检测了镇江地区不同胃十二指肠疾病患者 $H. pylori$ 中 $cagA$ 的阳性率为93.3%^[16], 但是尚未见到应用 $ureI$ 基因作为诊断 $H. pylori$ 感染的报道. $ureI$ 基因是 $H. pylori$ 所特有的. 本实验中, 我们应用PCR技术检测了镇江地区不同胃十二指肠疾病来源的60例 $H. pylori$ 菌株, $ureI$ 基因的检出率高达100%, 说明 $ureI$ 基因可作为诊断 $H. pylori$ 感染的良好的分子标记. PCR是检测 $H. pylori$ 最敏感的技术, 简便、快捷、特异性强^[17-18], 且对原材料的要求低, 除新鲜活检标本外, 还可检测唾液、胃液、牙菌斑、粪便、石蜡包埋和已做过快速尿素酶试验的标本.

$H. pylori$ 通过点突变、等位基因交换、基因重排及序列插入等使基因呈现出多样性, 导致 $H. pylori$ 不同基因组间的差异极大, $H. pylori$ 的尿素酶基因也呈现出同样的特点^[19]. 克隆测序不同胃十二指肠疾病来源 $H. pylori$ $ureI$ 基因核苷酸序列虽然与国际标准株26695不同, 但与之相比核苷酸序列同源性达到95.6%-96.9%, 推定氨基酸序列的同源性达到96.9%-97.9%, 并且4个保守的组氨酸残基(H71、H123、H131和H193)以及胞内环保守区域均未发生变异. UreI蛋白结构高度保守, 不同 $H. pylori$ 菌株之间同源性非常高. 这为UreI重组疫苗的制备提供了依据. 本研究表明不同疾病来源的幽门螺杆菌 $ureI$ 基因高度保守, $ureI$ 基因的PCR扩增可以作为鉴定 $H. pylori$ 的分子标记.

4 参考文献

- Arfaoui D, Elloumi H, Ben Abdelaziz A. [Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma] *Tunis Med* 2009; 87: 231-236
- Peter S, Beglinger C. Helicobacter pylori and gastric cancer: the causal relationship. *Digestion* 2007; 75: 25-35
- Herrera V, Parsonnet J. Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 971-976
- Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H+-gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization. *Science* 2000; 287: 482-485
- Bury-Moné S, Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H. [UreI: a Helicobacter pylori protein essential for resistance to acidity and for the early steps of murine gastric mucosa infection] *Gastroenterol Clin Biol* 2001; 25: 659-663
- Hong W, Sano K, Morimatsu S, Scott DR, Weeks DL, Sachs G, Goto T, Mohan S, Harada F, Nakajima N, Nakano T. Medium pH-dependent redistribution of the urease of Helicobacter pylori. *J Med Microbiol* 2003; 52: 211-216
- Stingl K, De Reuse H. Staying alive overdosed: how does Helicobacter pylori control urease activity? *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 307-315
- Sachs G, Weeks DL, Wen Y, Marcus EA, Scott DR, Melchers K. Acid acclimation by Helicobacter pylori. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 429-438
- Rektorschek M, Buhmann A, Weeks D, Schwan D, Bensch KW, Eskandari S, Scott D, Sachs G, Melchers K. Acid resistance of Helicobacter pylori depends on the UreI membrane protein and an inner membrane proton barrier. *Mol Microbiol* 2000; 36: 141-152
- Mollenhauer-Rektorschek M, Hanauer G, Sachs G, Melchers K. Expression of UreI is required for intragastric transit and colonization of gerbil gastric mucosa by Helicobacter pylori. *Res Microbiol* 2002; 153: 659-666
- Skouloubris S, Thiberge JM, Labigne A, De Reuse H. The Helicobacter pylori UreI protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infect Immun* 1998; 66: 4517-4521
- Weeks DL, Sachs G. Sites of pH regulation of the urea channel of Helicobacter pylori. *Mol Microbiol* 2001; 40: 1249-1259
- Zsikla V, Hailemariam S, Baumann M, Mund MT, Schaub N, Meier R, Cathomas G. Increased rate of Helicobacter pylori infection detected by PCR in biopsies with chronic gastritis. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 242-248
- Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SK, Lee CH. Comparison of five PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 772-774
- Smith SI, Oyediji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, Uwaifo AO, Otegbayo JA, Ola SO, Coker AO. Comparison of three PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1958-1960
- 吴莺, 张允历, 王文兵, 陈劲频, 沈琰. 不同地区幽门螺杆菌 $cagA$ 基因羧基端可变区及其蛋白序列差异分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 746-749
- Oyediji KS, Smith SI, Coker AO, Arigbabu AO. Antibiotic susceptibility patterns in Helicobacter pylori strains from patients with upper gastrointestinal pathology in western Nigeria. *Br J Biomed Sci* 2009; 66: 10-13
- Chisholm SA, Owen RJ. Application of polymerase chain reaction-based assays for rapid identification and antibiotic resistance screening of Helicobacter pylori in gastric biopsies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61: 67-71
- Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, Achtman M, Suerbaum S. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by Helicobacter pylori: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 15056-15061

■同行评价

本研究进行了 $H. pylori$ 尿素通道蛋白基因 $ureI$ 的检测、克隆及序列分析, 结论有一定的应用价值.

TFF3在胃癌、癌前病变及胃腺瘤中的表达及其与血管生成的关系

路艳艳, 田字彬, 魏良洲, 孔心涓, 赵清喜, 李玉军, 孙显路

■背景资料

胃癌的发生是一个多步骤、多因素进行性发展的过程, 目前尚且缺乏有效的早期诊断指标。TFF3是三叶肽家族一员, 其基因与TFF1、TFF2基因密集于染色体21q22.3上, 近年来研究表明TFF3在肿瘤发生发展中起重要作用。

路艳艳, 田字彬, 魏良洲, 孔心涓, 赵清喜, 青岛大学医学院附属医院消化科 山东省青岛市 266003

李玉军, 孙显路, 青岛大学医学院附属医院病理科 山东省青岛市 266003

路艳艳, 2007级青岛大学医学院消化科在读硕士, 主要从事胃癌方面的研究。

作者贡献分布: 路艳艳与田字彬对此文所作贡献均等; 此课题由路艳艳、田字彬及孔心涓设计; 研究过程由路艳艳操作完成; 病例选择由魏良洲与赵清喜完成; 研究所用试剂、器材及分析工具由田字彬、李玉军及孙显路提供; 数据分析及本论文写作由路艳艳与田字彬完成。

通讯作者: 田字彬, 主任医师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化科。tianzb@qdumh.qd.sd.cn 电话: 0532-82911302

收稿日期: 2009-11-05 修回日期: 2009-11-17

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Correlation of trefoil factor 3 expression in gastric carcinoma, precancerous lesions, gastric adenoma with angiogenesis

Yan-Yan Lu, Zi-Bin Tian, Liang-Zhou Wei, Xin-Juan Kong, Qing-Xi Zhao, Yu-Jun Li, Xian-Lu Sun

Yan-Yan Lu, Zi-Bin Tian, Liang-Zhou Wei, Xin-Juan Kong, Qing-Xi Zhao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Yu-Jun Li, Xian-Lu Sun, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdumh.qd.sd.cn

Received: 2009-11-05 Revised: 2009-11-17

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of trefoil factor 3 (TFF3) in gastric carcinoma, precancerous lesions, gastric adenoma and explore its correlation with microvessel density (MVD) in gastric carcinogenesis.

METHODS: The expression of TFF3 was detected by the immunohistochemical PV-6000 method in 120 gastric mucosal specimens, including 20 cases of normal gastric mucosa

(NGM), 20 cases of gastric adenoma (GA), 20 cases of chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia (IM), 20 cases of dysplasia (DYS), and 40 cases of gastric carcinoma (GC). MVD was examined by immunohistochemistry using anti-CD34 antibody.

RESULTS: The positive rates of TFF3 expression were significantly higher in GA, IM, DYS and GC than in NGM (50.0%, 65.0%, 70.0% and 57.5% vs 5.0%, respectively; all $P < 0.01$). MVD was significantly higher in GC than in NGM, GA, IM and DYS (30.65 ± 6.04 vs 14.87 ± 3.06 , 22.33 ± 3.78 , 23.16 ± 3.20 and 25.22 ± 4.66 , respectively; all $P < 0.01$). MVD was also significantly higher in GA, IM, DYS and GC than in NGM (all $P < 0.01$). TFF3 expression and MVD were correlated with lymph node metastasis and tumor stage in GC (all $P < 0.05$). MVD was also correlated with depth of invasion in GC ($P < 0.05$). MVD in specimens showing positive expression of TFF3 was higher than that in specimens showing negative expression (34.53 ± 4.45 vs 25.39 ± 3.25 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: TFF3 may be involved in an early event in gastric carcinogenesis and play an important role in gastric carcinogenesis. Detection of TFF3 expression may be of great significance for early diagnosis and prediction of metastasis in gastric carcinoma.

Key Words: Trefoil factor 3; Gastric carcinoma; Precancerous lesion; Gastric adenoma; Microvessel density; Immunohistochemistry

Lu YY, Tian ZB, Wei LZ, Kong XJ, Zhao QX, Li YJ, Sun XL. Correlation of trefoil factor 3 expression in gastric carcinoma, precancerous lesions, gastric adenoma with angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3688-3692

摘要

目的: 分析三叶因子3(TFF3)在不同胃黏膜病变中的表达及其与间质微血管密度(MVD)值的关系, 探讨其在胃癌、癌前病变及胃腺瘤发

■同行评议者

许乐, 主任医师, 北京医院消化科

生、发展中的作用。

方法:应用免疫组织化学PV6000法检测20例正常胃黏膜、20例胃腺瘤、20例萎缩性胃炎伴肠化生、20例不典型增生、40例胃癌组织中TFF3的表达,同时检测MVD值,以抗CD34标记。

结果:TFF3在胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生、不典型增生和胃癌各组表达均高于正常组(50.0%, 65.0%, 70.0%, 57.5% vs 5.0%, 均 $P<0.01$)。胃癌MVD值高于正常胃黏膜、胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生和不典型增生(30.65 ± 6.04 vs 14.87 ± 3.06 , 22.33 ± 3.78 , 23.16 ± 3.20 , 25.22 ± 4.66 , 均 $P<0.01$)。各组MVD值均高于正常胃黏膜组(均 $P<0.01$)。TFF3表达和MVD值与胃癌淋巴结转移和分期有关(均 $P<0.05$)。MVD值还与胃癌浸润深度有关($P<0.05$)。TFF3阳性表达组的MVD值明显高于TFF3阴性组(34.53 ± 4.45 vs 25.39 ± 3.25 , $P<0.01$)。

结论:TFF3可能是胃黏膜癌变过程中的早期分子事件,在胃黏膜癌变和癌变后的恶性演进过程中起作用,对胃癌早期诊断和预测胃癌发生转移可能具有重要的提示作用。

关键词:三叶因子3; 胃癌; 癌前病变; 胃腺瘤; 微血管密度; 免疫组织化学

路艳艳, 田宇彬, 魏良洲, 孔心涓, 赵清喜, 李玉军, 孙显路. TFF3在胃癌、癌前病变及胃腺瘤中的表达及其与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3688-3692
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3688.asp>

0 引言

胃癌是消化系最常见的恶性肿瘤之一,预后很差,5年生存率不足20%。早诊断、早治疗是目前提高胃癌存活率的唯一有效措施,因而提高早期胃癌的检出率非常重要。三叶因子3(trefoil factor 3, TFF3)是三叶肽家族成员之一,生理状况下TFF3主要分布于小肠及结肠的杯状细胞中,在胃肠道黏膜保护、溃疡修复过程有重要作用。近年来研究表明其在乳腺、胃、结肠肿瘤中异常表达,可能与肿瘤的发生发展有关。本试验通过免疫组织化学方法检测TFF3和微血管密度(micro-vessel density, MVD)在胃癌、癌前病变(萎缩性胃炎伴肠上皮化生、不典型增生)及胃腺瘤中的表达,旨在探讨TFF3在胃癌发生发展中的作用,为胃癌早期诊断和临床防治提供新的思路 and 前景。

1 材料和方法

1.1 材料 选取青岛大学医学院附属医院2006-03/2009-03存档的胃镜活检及胃癌根治术后标本蜡块120例,其中萎缩性胃炎伴肠化生、不典型增生、胃腺瘤组各20例,胃癌组40例。胃癌病例术前均未接受放疗、化疗,年龄32-82(平均 61.5 ± 11.7)岁。并取远端正常胃组织20例作对照。实验选用与HE染色一致的蜡块制成4 μm 切片行免疫组织化学染色。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学(PV6000)法:兔抗人TFF3多克隆抗体(工作浓度为1:250),CD34单克隆抗体(即用型),PV6000试剂盒,柠檬酸抗原修复缓冲液、DAB染色剂分别购自北京博奥森生物技术有限公司及北京中山金桥生物技术有限公司,切片染色前根据抗体要求行柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复,余具体操作过程按试剂盒说明书完成,并设立阳性对照(结肠组织)和阴性对照(以PBS缓冲液代替一抗)。

1.2.2 结果判定:TFF3的判断标准:以胞质内出现淡黄色至棕黄色染色视为阳性细胞,根据细胞染色强度和染色细胞所占面积之和来判断。染色强度积分为:无染色0分,弱染色1分,中等染色2分,强染色3分;染色面积积分为:阳性范围 $\leq 10\%$ 为0分,11-25%为1分,26-50%为2分,51-75%为3分, $>75\%$ 为4分。若两者积分之和 >2 分则为阳性, ≤ 2 分则为阴性。MVD计数:CD34表达位于血管内皮上,通常最密集的微血管染色区主要分布于肿瘤与周围组织交界区,按Weider推荐的方法,任何染成棕色的可与周围血管、肿瘤细胞和其他结缔组织区分开的血管内皮细胞或血管内皮细胞簇均作为一个血管计数。但肌层较厚及管腔面积大于8个红细胞直径的血管不计数。每例首先在低倍镜(100 \times)下选择MVD最高的肿瘤区域,然后在400倍光镜下随机计数5个视野内微血管数,求其平均值。

统计学处理 采用SPSS11.5软件进行统计学处理,TFF3在不同胃黏膜组织中的表达之间的关系、与胃癌的临床病理特征之间的关系用 χ^2 检验,MVD以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示,在不同胃黏膜中的表达用单因素方差分析,与TFF3的表达及胃癌临床病理特征之间的关系用 t 检验。取 $P<0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 TFF3和CD34在不同胃黏膜组织中的表达

■研究前沿

TFF3在肿瘤中异常表达,其在癌前状态是否也有表达,与肿瘤血管形成之间的关系,在肿瘤发生、浸润及转移中的作用机制是当前研究的热点问题。

■相关报道

Taupin *et al* 研究发现,从胃黏膜化生到不典型增生再到胃癌, TFF3 的表达逐步增高, 并认为 TFF3 的表达增高早于胃黏膜上皮的化生。

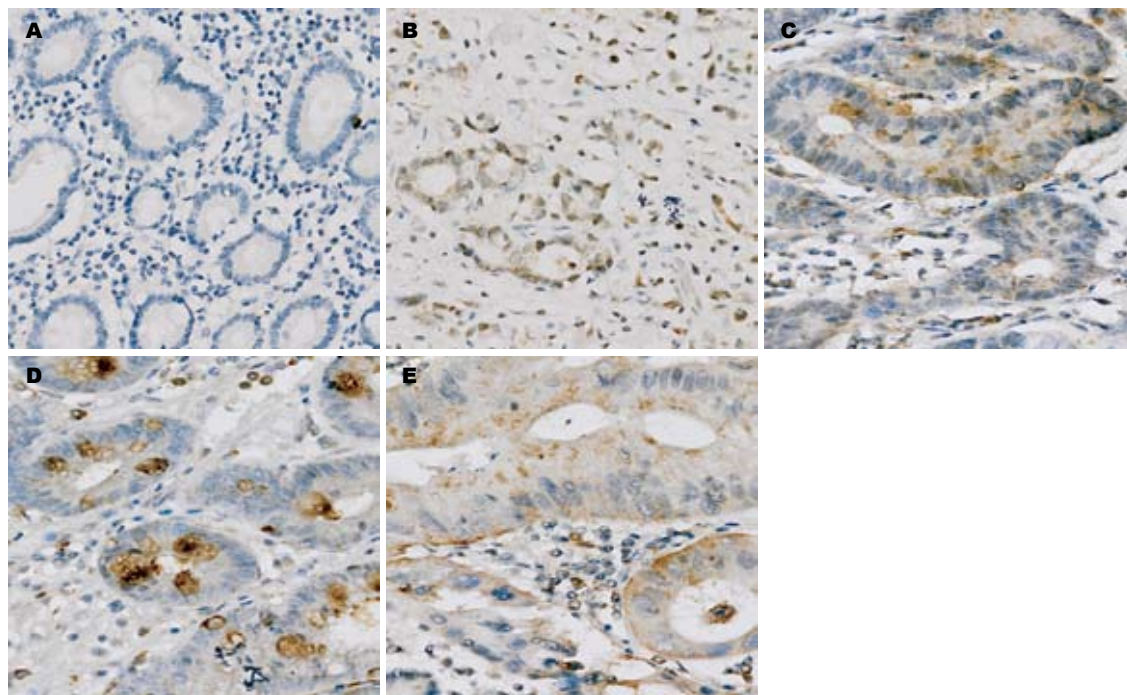


图 1 TFF3在不同胃黏膜组织中的表达(免疫组织化学 × 200). A: 正常胃黏膜; B: 胃癌; C: 胃腺瘤; D: 肠上皮化生; E: 不典型增生.

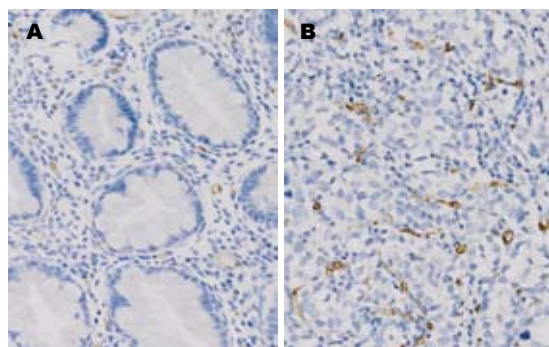


图 2 CD34的表达(免疫组织化学 × 200). A: 正常胃黏膜; B: 胃癌.

表 1 TFF3和CD34在不同胃黏膜病变中的表达

分组	n	TFF3阳性 表达n(%)	MVD值 (mean ± SD)
正常胃黏膜	20	1(5.0)	14.87 ± 3.06 ^b
胃腺瘤	20	10(50.0) ^d	22.33 ± 3.78 ^{bd}
萎缩性胃炎伴肠化	20	13(65.0) ^d	23.16 ± 3.20 ^{bd}
不典型增生	20	14(70.0) ^d	25.22 ± 4.66 ^{bd}
胃癌	40	23(57.5) ^d	30.65 ± 6.04 ^d

^b $P < 0.01$ vs 胃癌组; ^d $P < 0.01$ vs 正常胃黏膜组.

TFF3表达位于细胞质中(图1), CD34表达位于血管内皮细胞膜上(图2), 各组间TFF3表达及MVD值差异均有统计学意义(均 $P = 0.000$). TFF3、MVD值随着正常胃黏膜→胃腺瘤→萎缩性胃炎伴肠化生→不典型增生而逐渐升高, 但胃癌组TFF3表达低于萎缩性胃炎、不典型增生组, 与胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生、不典型增生组比较TFF3表达均无显著差异; 胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生、不典型增生、胃癌组TFF3表达均显著高于正常胃黏膜(50.0%, 65.0%, 70.0%, 57.5% vs 5.0%, 均 $P < 0.001$). 胃癌MVD依次高于正常胃黏膜、胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生和不典型增生(30.65 ± 6.04 vs 14.87 ± 3.06, 22.33 ± 3.78, 23.16 ± 3.20, 25.22 ± 4.66, 均 $P < 0.001$); 胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生、不典型增生、胃

癌组MVD均明显高于正常胃黏膜(均 $P < 0.001$), 胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生、不典型增生三者间差别无统计学意义(表1).

2.2 TFF3、MVD表达与胃癌临床病理特征的关系 TFF3表达和MVD值与胃癌淋巴结转移和分期有关(均 $P < 0.05$), TFF3的表达在淋巴结转移组高于无淋巴结转移组($\chi^2 = 7.821$, $P < 0.01$), 进展期胃癌组高于早期胃癌组($\chi^2 = 4.816$, $P < 0.05$), 而与患者的性别、年龄、肿瘤的浸润程度、肿瘤细胞的分化程度无关. MVD还与胃癌浸润深度有关($t = 2.331$, $P < 0.05$), 淋巴结转移组高于无淋巴结转移组($t = 3.226$, $P < 0.01$), 进展期胃癌高于早期胃癌组($t = 2.224$, $P < 0.05$, 表2).

2.3 胃癌TFF3表达与MVD值的关系 胃癌中TFF3阳性表达组的MVD值高于阴性表达组

表 2 TFF3、MVD表达与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	TFF3		CD34	
		阳性n(%)	P值	MVD(mean ± SD)	P值
性别			0.680		0.755
男	25	15(60.0)		30.88 ± 6.32	
女	15	8(53.3)		30.25 ± 5.73	
年龄(岁)			0.962		0.278
<60	19	11(57.9)		31.75 ± 6.47	
≥60	21	12(57.1)		29.65 ± 5.58	
分化程度			0.680		0.91
高中分化	15	8(53.3)		30.79 ± 5.89	
低分化	25	15(60.0)		30.56 ± 6.25	
浆膜浸润			0.151		0.025
无	16	7(43.8)		28.06 ± 3.83	
有	24	16(66.7)		32.37 ± 6.67	
淋巴结转移			0.005		0.003
无	18	6(33.3)		27.59 ± 3.82	
有	22	17(77.3)		33.15 ± 6.43	
分期			0.028		0.032
早期	6	1(16.7)		26.93 ± 4.41	
进展期	34	22(64.7)		32.25 ± 5.53	

(34.53 ± 4.45 vs 25.39 ± 3.25), 二者间差异有显著意义($t = 7.163$, $P < 0.01$).

3 讨论

TFF3也称肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是三叶肽家族一员, 1991年由Suemori *et al*^[1]首次在大鼠空肠发现, 其基因与TFF1、TFF2基因密集于染色体21q22.3上, 主要在小肠和结肠中表达, 是由杯状细胞分泌的特异分布于肠黏膜表面的小分子多肽物质, 在哺乳动物体内具有黏膜保护、修复作用^[2]. 近年来其在肿瘤中的作用日益受到重视, 通过抑制细胞黏附、促进细胞侵袭、抑制凋亡及促进新生血管形成等, 在肿瘤中发挥作用.

胃癌的发生是一个漫长过程, 一般认为胃癌是从正常胃黏膜上皮细胞经内外因素作用发生慢性胃炎到胃癌前病变, 包括腺瘤、肠化生和不典型增生, 经过一系列基因突变的积累最终导致胃癌的发生^[3-4].

Leung *et al*发现, TFF3在胃黏膜发生肠化、不典型增生到胃癌的发生过程中表达逐步增高^[5]. Taupin *et al*通过制造大鼠胃黏膜病变模型, 研究TFF1及TFF3在不同阶段的表达, 发现在从胃黏膜化生到不典型增生再到胃癌这一过程中, TFF3的表达逐步增高, 并认为TFF3的表达增高早于胃黏膜上皮的化生, 即在胃黏膜出现化生

之前已经有TFF3的表达增高^[6]. 本研究结果显示, TFF3表达随着正常胃黏膜→胃腺瘤→萎缩性胃炎伴肠化生→不典型增生而逐渐升高, 但胃癌TFF3表达低于萎缩性胃炎、不典型增生、胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生、不典型增生和胃癌间差异不显著, 4组均显著高于正常胃黏膜, 提示TFF3高表达参与了胃黏膜腺瘤形成、肠上皮化生、不典型增生和恶性转化的过程, 其可能是胃黏膜癌变过程中的早期分子事件.

文献报道胃癌TFF3的表达与性别、淋巴结转移及分期有关^[7-8]. 本研究结果显示, TFF3表达与胃癌淋巴结转移和分期有关, 有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组, 进展期胃癌高于早期胃癌, 但与年龄、性别、分化程度和浸润深度无关, 提示TFF3在胃黏膜癌变后的恶性演进过程中起重要作用. 其机制可能是TFF3抑制细胞黏附, 促进癌细胞侵袭, 阻断细胞凋亡. TFF3是胃肠道内源性具有抗凋亡特性的肽类物质, 能激活细胞内NF-κB, 阻止处于级联反应的caspase-8的活化. NF-κB的靶基因为凋亡抑制蛋白c-IAP1、c-IAP2等, 其协同作用能阻止下游caspases的活化以及细胞凋亡^[9]. TFF3降低肿瘤细胞之间粘连: 一是通过TFF3降低β-连环蛋白、E-钙黏蛋白的活性, 导致细胞间粘连的破坏, 使上皮细胞互相分离; 二是通过环氧合酶(COX)、血栓素A2受体(TXA2-R)、PLC/PKC及PI-3K依赖途径, 促进细胞间粘连的降低, 导致肿瘤的浸润、转移^[10].

血管生成(angiogenesis)是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而成新生血管的过程. 肿瘤组织的增殖依赖血液供应, 血管生成在肿瘤的生长、侵袭和转移中发挥重要作用. MVD是用CD34标记肿瘤血管, 是判定血管生成的一个良好指标. 有研究发现: 在肿瘤发生的早期即显示血管表型, 随着胃黏膜腺瘤形成、炎症和肠上皮化生、不典型增生的发生, 微血管生成也增加, 可有利于病变的修复, 但随着肿瘤的进展, MVD显著增加, MVD越高, 已癌变细胞进入血循环及淋巴循环的机会越多, 转移机率也越大, 其预后可能越差. 肿瘤在生长过程中确有异常血管形成, 这些异常血管的形成, 又为肿瘤的生长提供了适合的基础, 促进了肿瘤的生长^[11]. 本研究结果表明MVD在正常的胃黏膜、胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生、不典型增生、胃癌组织均表达依次增高, 胃腺瘤、萎缩性胃炎伴肠化生与不典型增生之间差异不显著, 正

■应用要点

本文研究发现, TFF3可能是胃黏膜癌变过程中的早期分子事件, 在胃黏膜癌变和癌变后的恶性演进过程中起作用, 随着分子生物学的不断发展可进一步了解TFF3与胃癌发生、发展的关系, 为胃癌的早期诊断和临床治疗提供新的思路 and 前景.

■同行评价

本研究通过免疫组织化学方法检测TFF3和微血管密度在胃癌、癌前病变及胃腺瘤中的表达,探讨TFF3在胃癌发生发展中的作用,为胃癌早期诊断提供了新的思路 and 前景,有一定的临床应用价值。

常胃黏膜、胃癌与其他3组间差别均有显著统计学意义,胃癌组MVD值明显高于正常胃黏膜。胃癌组织中MVD与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移及分期有关。

血管生成是肿瘤细胞适应局部缺氧环境而发生的,缺氧导致新生血管形成基因的表达,是肿瘤生长和扩散的必要条件。体内外研究发现TFF3可促进鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成,可诱导人脐静脉内皮细胞形成类微血管结构,提示其在血管生成中的作用^[12]。在本研究中,TFF3阳性的胃癌组MVD值明显高于TFF3阴性者,表明TFF3的表达与胃癌血管形成有关。在肿瘤的发展过程中,缺氧环境及癌基因的激活和抑癌基因的突变,HIF-1 α 基因被激活并过量生成,HIF-1 α 活性增加,并与不同目的基因如VEGF,iNOS等的缺氧反应元件中的序列5'-A/GCGTG-3'相连接,激活许多基因的转录^[13],促进肿瘤血管生成^[14-15]。在TFF3启动子中的缺氧反应元件中即存在着这一共有序列,提示在胃癌组织中可能通过缺氧依赖途径促进TFF3 mRNA及其蛋白的表达,进而影响胃癌血管生成,促进肿瘤的侵袭、转移,其机制还有待进一步的研究证实。

本研究结果表明TFF3作为胃肠黏膜中一个重要的细胞因子,其参与了胃黏膜腺瘤形成、肠上皮化生、不典型增生和恶性转化的过程,可能是胃黏膜癌变过程中的早期分子事件,并且可以影响胃癌血管生成,促进肿瘤的侵袭、转移,但TFF3的结合蛋白尚未明确,其细胞内作用机制、具体信号转导途径的相关研究尚处于起始阶段,随着分子生物学的不断发展可进一步了解TFF3与胃癌发生、发展的关系,从而有利于胃癌的早期诊断和治疗。

4 参考文献

- 1 Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 11017-11021
- 2 聂时南,李兆申,许国铭,屠振兴.三叶肽与胃黏膜保

护研究进展. *中华消化杂志* 2002; 22: 108-110

- 3 Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int Rev Cytol* 2001; 204: 49-95
- 4 唐忠辉,陈华生,邹宗楷,蔡韶滨,苏海燕,沈洪武,吴文乔,林莉,王元亨. TFF3和CD147在不同胃黏膜病变中的表达及其与血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3631-3636
- 5 Leung WK, Yu J, Chan FK, To KF, Chan MW, Ebert MP, Ng EK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol* 2002; 197: 582-588
- 6 Taupin D, Pedersen J, Familiari M, Cook G, Yeomans N, Giraud AS. Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of p52 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. *Lab Invest* 2001; 81: 397-408
- 7 Yamachika T, Werther JL, Bodian C, Babyatsky M, Tatematsu M, Yamamura Y, Chen A, Itzkowitz S. Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1092-1099
- 8 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
- 9 Chen YH, Lu Y, De Plaen IG, Wang LY, Tan XD. Transcription factor NF-kappaB signals antianoxic function of trefoil factor 3 on intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 576-582
- 10 Rodrigues S, Nguyen QD, Faivre S, Bruyneel E, Thim L, Westley B, May F, Flatau G, Mareel M, Gspach C, Emami S. Activation of cellular invasion by trefoil peptides and src is mediated by cyclooxygenase- and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways. *FASEB J* 2001; 15: 1517-1528
- 11 张秋宁,马力.三叶因子3在胃癌组织中的表达及与血管形成的关系. *现代肿瘤医学* 2005; 13: 42-44
- 12 Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Gspach C, Emami S. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J* 2003; 17: 7-16
- 13 Semenza GL. Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 551-578
- 14 张燕敏,邓长生,朱尤庆.胃腺癌中缺氧诱导因子-1 α mRNA表达和血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 633-637
- 15 陶文惠,邓长生,朱尤庆.胃癌组织中一氧化氮合酶的表达与血管形成的机制. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 33-35

编辑 李军亮 电编 何基才

嗜酸细胞食管炎研究进展

王 驰, 王化虹

王驰, 王化虹, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034
作者贡献分布: 王驰与王化虹对此文所作贡献均等; 本论文由王驰写作; 王化虹负责指导与修改工作.
通讯作者: 王化虹, 教授, 主任医师, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科. huaw73816@gmail.com
收稿日期: 2009-10-17 修回日期: 2009-11-16
接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Advances in research of eosinophilic esophagitis

Chi Wang, Hua-Hong Wang

Chi Wang, Hua-Hong Wang, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Correspondence to: Professor Hua-Hong Wang, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Street, Xicheng District, Beijing 100034, China. huaw73816@gmail.com

Received: 2009-10-17 Revised: 2009-11-16

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

Eosinophilic esophagitis (EE) is being recognized with increasing frequency. Numerous studies have investigated its pathogenesis, pathophysiologic manifestations, and effective diagnosis and treatment methods in recent years. In this article, we will review the recent advances in research on EE.

Key Words: Eosinophilic esophagitis; Eosinophil; Dysphagia; Food impaction; Reflux

Wang C, Wang HH. Advances in research of eosinophilic esophagitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3693-3698

摘要

由于嗜酸细胞食管炎(eosinophilic esophagitis, EE)的发病率逐年升高, 因此越来越引起国内外医师的重视. 近年来关于EE发病机制、病理生理表现、诊断及有效治疗方法的研究越来越多, 本文就以上诸多问题的研究进展作一综述.

关键词: 嗜酸细胞食管炎; 嗜酸细胞; 吞咽困难; 食物梗阻; 反流

王驰, 王化虹. 嗜酸细胞食管炎研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3693-3698

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3693.asp>

0 引言

嗜酸细胞食管炎(eosinophilic esophagitis, EE)由Landres *et al*^[1]在1978年首先报道, 此后陆续有“特发性EE”、“原发性EE”、“过敏性食管炎”等个案报道, 直到1993年Attwood *et al*^[2]才对其进行了全面评述. 20世纪80-90年代, 人们认为EE是一种少见疾病, 且主要在儿童和青少年中发病. 但近10年来关于EE的报道和研究迅速增多, 其中成年人EE患者也不少见. 这不仅仅是由于医学工作者对于该疾病认识的增加, 更是因为EE的发病率迅速上升^[3].

1 流行病学

儿童和成人均可发病, 男性居多. Dellon *et al*^[4]总结了424例成年EE患者和927例儿童EE患者, 结果发现在成人中男女发病比例为3.4:1, 在儿童中男女发病比例为2.3:1. Straumann *et al*^[5]研究显示, 瑞士成人EE患病率约1/4000, Ronkainen *et al*^[6]最近1项随机研究显示, 0.4%瑞典成人存在EE.

2 发病机制

EE的发病机制尚未明确, 有可能是多因素共同作用的结果. 有假说认为EE的发生与食物中的过敏源或可吸入过敏源有关, 这些过敏物质通过IgE介导的I型过敏反应和/或Th2淋巴细胞介导的IV型过敏反应导致了基因表达(趋化因子-3)和细胞因子产生(IL-4, IL-5和IL-13), 从而引起了大量嗜酸细胞的聚集^[7]. 关于这一发病机制, 大多数研究认为细胞免疫的高敏感性(特别是Th2淋巴细胞相关的免疫反应)是主要原因, 而体液免疫则相对不那么重要. 在这一疾病中, 致敏的Th2淋巴细胞引起了IL-5等细胞因子的释放, 而Th1淋巴细胞是否参与该反应还需进一步的研究. 肥大细胞也参与了EE的发病, 但他是否是

■背景资料

嗜酸细胞食管炎(EE), 自1978年由Landres *et al*发现以来发病率逐年上升, 但其发病机制尚未明确. 目前, 关于EE的发病机制、病理、临床表现、辅助检查、诊断以及治疗等各方面都引起了研究者和医务人员的关注.

■同行评议者

任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科; 蔡新明, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科

■相关报道

Pasha *et al*总结了42例成年EE患者的内镜表现,发现环状食管最多见,约占55%;其次分别为线样凹沟(33%)、食管狭窄(10%)、斑块样改变(5%)和息肉样病变(5%)。且Gonsalves *et al*的研究则表明,每1患者取5块活检标本扩大了诊断的敏感度,同时选取食管近侧端和远侧端明显增加检出率。

通过IgE介导的速发型过敏反应目前还不明确。IL-5和不同类型的趋化因子在嗜酸细胞向食管聚集的过程中也发挥了重要的激活作用^[8]。

此外,由于许多EE患者存在胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)的症状,并且有些患者应用抑酸剂有效;因此也有假说^[9]认为GERD参与了EE的发病。这些学者发现反流入食管的胃酸和胃蛋白酶可以损伤食管上皮间的紧密连接^[10-11],从而增加了细胞间的渗透性,引起了过敏源、抗原和炎症细胞的自由通过,也使胃酸进入食管组织深层,加重了组织的损伤,引起了炎症细胞特别是嗜酸细胞的聚集。同时这种炎症反应可以引起纤维化等形态学的改变,而纤维化则进一步影响下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)的功能以及食管本身的蠕动^[7]。并且嗜酸细胞可以分泌许多影响食管功能的物质,如血管活性肠肽和血小板活化因子可以引起LES的松弛。嗜酸细胞分泌的IL-6抑制了食管的收缩。Fox *et al*^[12]应用食管超声内镜发现EE患者的食管壁较正常人显著增厚。这种结构上的改变可以进一步影响食管的蠕动和LES的功能。因此是GERD引起了EE,还是EE引起了GERD,还是两者共存,目前尚无定论。

3 病理

EE的食管组织中可见黏膜层大量嗜酸细胞浸润(>15个/高倍镜视野HP),越接近黏膜表层嗜酸细胞的密度越高,甚至形成嗜酸细胞微小脓肿。在食管黏膜表层嗜酸细胞活化和脱颗粒的现象也是最明显的^[13]。Lucendo *et al*^[13]病理学家应用免疫组织化学和立体测量学的方法对EE患者的食管组织进行研究,结果发现EE患者食管组织中嗜酸细胞的密度是正常人的300倍,无论与正常人还是与GERD患者相比,只有EE中具有嗜酸细胞活化和脱颗粒的现象。除嗜酸细胞外EE中上皮内的T淋巴细胞(主要为CD8⁺ T淋巴细胞)、肥大细胞和产生IgE的浆细胞也明显增多,但与GERD相比B淋巴细胞无明显变化。在应用激素治疗后,嗜酸细胞、T淋巴细胞和肥大细胞的密度恢复到与GERD患者相当的水平,嗜酸细胞活化、脱颗粒的现象以及产生IgE的浆细胞也随之消失。最近,也有学者应用嗜酸细胞过氧化物酶的单克隆抗体对食管组织进行免疫组化染色,从而更好的显示嗜酸细胞脱颗粒现象。并且他们的研究也支持EE的患者食管组织中嗜酸细胞脱颗粒现象明显多于正常人和GERD患者^[14]。

此外,食管黏膜下的纤维化现象也是EE的特异性表现。Chehade *et al*^[15]发现与GERD和正常人相比食管黏膜下的纤维化现象是EE的特异性表现,并且纤维化的程度与嗜酸细胞活化脱颗粒的程度相关,而与嗜酸细胞个数和症状的持续时间无关。并且纤维化有可能是吞咽困难、食物梗阻等症状出现的病理基础。

4 临床表现

临床表现多种多样,主要有吞咽困难和哽咽感,反复的呕吐和上腹痛等。根据发病年龄的不同而有不同的侧重,成人症状以食物梗阻和固体食物的吞咽困难为主,而儿童则可表现为恶心、呕吐、腹痛^[7]。西班牙的1项研究表明^[16]有72%的成人EE患者具有吞咽困难的症状,并且食物梗阻的发生率也高达52%。以上症状多为急性出现或间断出现,较少表现为渐进性发展。并且许多患者同时具有遗传性过敏症、过敏性鼻炎或哮喘的病史。

5 辅助检查

食物过敏实验多抗原阳性;需要进行皮肤点刺实验(skin prick testing, SPT)和皮肤斑贴实验(skin patch testing, APT)来确定可食入和可吸入过敏源的诊断;其中SPT用来检测IgE介导的I型超敏反应,而APT用来检测Th2淋巴细胞介导的迟发性IV型超敏反应。

钡餐可见弥漫性的狭窄或上段食管狭窄。食管压力测定:食管运动不良,可有高幅的收缩波和无效的蠕动波;Lucendo *et al*^[17]发现在12例成人EE者中有10人存在食管运动的异常,其中6例表现为严重的非特异性的食管运动障碍,即食管体部下2/3段非推进性或低幅蠕动波;3例存在食管远段1/3的异常高幅蠕动波;1例食管远段2/3存在由2个原发性同步蠕动波和随后出现的继发性蠕动波组成的复合蠕动波。上食管括约肌无明显变化,LES的压力只有2例存在轻微的降低。而Hejazi *et al*^[18]对14名EE患者的研究表明,有50%的患者存在以食管平滑肌受累为主的动力学表现,其中包括贲门失弛缓样改变、胡桃夹食管样改变等。并且部分患者经过激素治疗后动力学指标可以完全恢复正常。食管超声可见食管壁增厚^[12]。内镜检查:只有少数EE患者没有明显的食管异常表现,大多数患者可表现为:食管环、食管管腔变窄、直线裂缝或线型(猫样食管)、红斑、水肿、白点样渗出(此处病理可见嗜酸细胞的微小脓肿)、颗粒样或结节样

改变^[19]; 也有食管多发纤维炎性息肉的个案报道^[20]. Pasha *et al*^[21]总结了42例成年EE患者的内镜表现, 发现环状食管最多见, 约占55%; 其次分别为线样凹沟(33%)、食管狭窄(10%)、斑块样改变(5%)和息肉样病变(5%). 而内镜阴性的EE只占7%. Müller *et al*^[22]认为即使内镜检查显示正常, 从食管黏膜多个部位取出活检组织的检查结果对诊断EE是不可缺少, 应该从食管远端、中段和近端取黏膜活检组织以提高检查准确率. 同时, 每例患者应该取多块活检标本, 有报道117例患者取750份标本, 发现嗜酸细胞聚集仅出现于36%的活检标本中. 而Gonsalves *et al*^[23]的研究则表明, 每1患者取5块活检标本扩大了诊断的敏感度, 同时选取食管近侧端和远侧端明显增加检出率.

6 诊断

多年来关于EE的诊断一直存在分歧, 有人认为2块食管黏膜标本中嗜酸细胞浸润大于15个/高倍镜(HP)或一块食管黏膜标本嗜酸细胞大于25个/HP方可诊断EE^[19]; 还有学者认为0-7个/HP的嗜酸细胞浸润代表GERD, 7-24个/HP的嗜酸细胞说明存在GERD合并过敏, 而只有25个/HP以上的嗜酸细胞浸润食管才能诊断EE^[24-25]. 美国胃肠病学会^[26]在2007年提出的EE诊治共识中指出EE的诊断标准为: (1)具有食管和/或上消化道症状; (2)食管一块或多块组织中存在>15个/HP的嗜酸细胞浸润; (3)24 h PH监测正常或大剂量PPI治疗无效, 从而排除了GERD的可能.

7 治疗

7.1 要素饮食或饮食控制 大量研究表明食物过敏参与了EE特别是儿童EE的发病, 常见的过敏源包括奶制品、鸡蛋、小麦、大豆、花生和鱼. 许多研究表明限制饮食或应用要素饮食可以缓解儿童EE的临床症状^[27-28], Markowitz *et al*^[29]应用要素饮食(成分为氨基酸、玉米糖浆和中链甘油三酯)治疗51例儿童EE患者, 平均症状缓解时间为8.5 d, 1 mo后复查内镜发现浸润的嗜酸细胞中位数由治疗前的33个/HP降至1个/HP. Liacouras *et al*^[30]应用氨基酸为主的要素饮食或根据过敏实验(SPT和APT)剔除过敏食物的饮食分别治疗172名和75名儿童EE患者, 两组在临床症状和组织学上都得到了显著的改善, 并且在组织学的改善中要素饮食组优于饮食控制组. 以上研究表明对于应用要素饮食或饮食控制治疗儿童

EE是确实有效的方法, 但由于成人的食谱很广, 以上治疗是否适用于成人仍需进一步研究.

7.2 口服激素 许多研究均表明^[31-32]口服激素能够缓解EE的临床症状和组织学改变, 但除了可以引起一系列不良反应外, 停药后还具有较高的复发率. Liacours *et al*^[31]研究发现停药后12 mo内的复发率高达45%, 而Schaefer *et al*^[32]的观察发现激素治疗后的平均复发时间为停药后的5.5 wk. 因此, 美国胃肠病学会发表的EE诊治共识^[26]中指出: 应尽量避免应用口服激素治疗, 他可以用于那些出现急性吞咽困难症状的、在接受扩张治疗时具有较高穿孔风险的、体质量严重下降的或对其他所有治疗都无效的EE患者; 并仅用于短期治疗.

7.3 吞咽吸入剂型的激素 1998年Faubion *et al*^[33]首次应用吞咽吸入剂型的激素来治疗儿童EE, 并证明有效. 其后许多研究均证明了这一方法的有效性^[34-35], 其主要的不良反应为霉菌性食管炎(发生率约为15%^[32]), 但可以减少口服激素所引起的全身不良反应. 在成人EE的治疗中, 吞咽吸入型激素也是有效的^[36-37], 但无论在儿童还是成人, 停药后的复发仍十分常见并且似乎是不可避免的^[38]. 由于以上研究所证明的均为吞咽激素的短期疗效, 而对于其长期作用尚未明确, 因此美国胃肠病学会提出的诊治共识中指出: 可以应用氟替卡松作为EE的短期治疗, 但并不推荐作为长期维持治疗方案. 初始剂量为儿童440-880 μg/d, 青少年和成人880-1760 μg/d, 分2-4次应用, 疗程6-8 wk^[26]. 具体方法为用嘴包严喷雾器, 将喷出的粉末咽下后30 min内禁止漱口、进食和饮水.

7.4 其他药物

7.4.1 IL-5的单克隆抗体-美泊珠单抗(Mepolizumab): IL-5是由Th-2淋巴细胞产生的细胞因子, 他可以将骨髓中的嗜酸细胞动员入外周血. IL-5在嗜酸细胞的成熟、活化和存活过程中起到了重要作用. Mishra *et al*发现应用IL-5可以制造EE的小鼠模型, 而去除IL-5则抑制了过敏源诱发的EE的产生^[39-41]. 因此IL-5的单克隆抗体-美泊珠单抗具有一定的临床应用价值. Stein *et al*^[42]应用美泊珠单抗(750 mg静脉滴注, 每月1次)治疗4名成人EE患者, 所有患者的症状均得到了不同程度的改善, 生活质量量表评分明显好转. 外周血和食管组织内的嗜酸细胞也较治疗前明显减少, 内镜下的改善表现在近段食管狭窄程度的减轻以及食管环的减少. 但由于该项研究的病例数

■创新盘点

本文从流行病学特征、发病机制、病理生理、临床表现、诊断治疗等方面对EE进行全面、深入的综述, 有助于医务人员清晰认识EE, 减少临床误诊和漏诊.

■同行评价

本文全面综述了EE的研究进展,内容新颖,具有较好的参考价值。

量太小,因此还需要大规模的研究来证实美泊珠单抗的临床应用前景。

7.4.2 顺尔宁(Montelukast):顺尔宁是选择性的白三烯受体拮抗剂,他主要抑制半胱氨酰白三烯受体。白三烯参与了哮喘的发病,他可以使气道水肿、平滑肌收缩并且改变了细胞的活性。Attwood *et al*^[43]应用顺尔宁100 mg/d(这一剂量是FDA批准用于治疗哮喘剂量的10倍)治疗了8例成人EE患者。治疗数周后有7例症状得到完全缓解,1例症状部分缓解。但食管组织中的嗜酸细胞并未明显减少,而且有4例出现了恶心、1例出现了肌痛的不良反应。在症状缓解后改为20-40 mg/d小剂量维持治疗14 mo, 8例中的6例在停药或减量后出现了症状的反复。由于顺尔宁并未能改变白三烯的水平和食管中嗜酸细胞的浸润,因此美国胃肠病学会没有将其列为治疗EE的药物^[26]。

7.4.3 色甘酸钠(cromolyn sodium):色甘酸钠可以抑制肥大细胞产生组胺、白三烯。并且可以通过抑制肥大细胞脱颗粒而减轻过敏源激发的过敏反应。因此FDA批准色甘酸钠作为治疗哮喘和过敏性鼻炎的药物。Liacouras *et al*^[30]应用色甘酸钠治疗14名EE患者,但并没有发现任何症状和组织学的改善。

7.5 食管扩张治疗 食管扩张可以改善EE患者的症状^[44-45],但并不能达到组织学的缓解,因此部分患者需要反复进行该项治疗。Straumann *et al*^[44]对11名EE患者进行食管扩张治疗,平均随访7.2年,其中4例需要进行反复的食管扩张治疗。Pasha *et al*^[45]的临床观察发现需要进行食管扩张的中位次数为2次。食管扩张的并发症包括较深的黏膜撕裂、穿孔和术后镇痛药物的应用。Cohen *et al*^[46]对36名成人EE患者进行扩张治疗后,并发症的发生率为31%,其中包括严重的黏膜撕裂、食管穿孔和1例因呕吐引起的食管破裂。并且发现那些长期具有严重吞咽困难症状、食管狭窄、高密度嗜酸细胞浸润的患者较易发生以上并发症。Bohm *et al*^[7]认为初始时应用直径8-10 mm的探条或球囊,分次反复扩张至15-16 mm的做法可以减少并发症的发生。

7.6 质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPI)有许多研究均发现EE和GERD共存的现象,Rodrigo *et al*^[47]对食管活检嗜酸细胞>20个/HP的40例患者进行分析发现其中15%为“EE”、5%同时具有EE和GERD、70%为GERD、5%为贲门失弛缓、5%为憩室。因此Rodrigo *et al*认为过敏

不是引起食管嗜酸细胞聚集的唯一原因,任何引起食管鳞状上皮损坏的情况都可以引起局部嗜酸细胞的增多。Ngo *et al*^[48]也报道了3例具有食物过敏、食管呈典型EE样内镜改变(同心圆样改变、纵行凹沟或白色渗出),食管近端和远端的嗜酸细胞均明显增多(>20个/HP)的患者经过2 mo的PPI治疗后症状和组织学完全缓解的病例,因此Ngo建议对于所有具有症状且食管嗜酸细胞增多的患者都应先进行至少2 mo的PPI治疗。Desai *et al*^[49]回顾性的研究了31例具有食物梗阻病史的患者,发现其中有17例食管组织中存在嗜酸细胞浸润(≥ 20 个/HP),应用PPI治疗4-8 wk后有50%的患者症状得到改善。最近,美国胃肠病学会提出的EE的诊治共识^[26]中指出:对于经大剂量PPI治疗无效的食管嗜酸细胞增多者方可诊为EE。但上述研究提示GERD可以引起EE,并且PPI在某些患者中的疗效与激素相当,因此PPI在EE中的应用还需要进一步大规模的安慰剂对照的临床试验来评价。

7.6 食管扩张联合PPI治疗:Morrow *et al*^[50]应用食管扩张联合PPI的方法治疗19例EE患者,并随访19 mo。结果发现绝大部分患者吞咽困难的症状得到显著缓解,并且只有1例症状反复需要再次进行食管扩张治疗。这表明在食管扩张后应用PPI是治疗EE的有效方法,特别是对EE合并环状食管的患者更有效。这有可能是由于食管扩张伸展了固有层内的纤维,缓解了环状食管,扩张了食管腔;而PPI抑制了胃酸促进了上皮细胞间紧密连接的愈合,防止了上皮渗透性的增加,抑制了炎症和免疫细胞的浸润,抑制了炎症和纤维化的形成。

8 结论

对于具有吞咽困难等临床表现并且合并食管嗜酸细胞增多的患者,首先应该进行进一步检查从而除外可以引起类似表现的GERD、贲门失弛缓和憩室等疾病,随后才能作出EE的诊断;第二,在诊断EE后应该同时应用SPT和APT的方法进行食物和可吸入过敏源的检查,并开始限制过敏食物的摄入;第三,如果饮食控制无效,则有两种治疗方法可以选择:(1)吞咽吸入剂型激素或口服激素治疗4-8 wk;(2)食管扩张联合PPI治疗。这两种方法各有利弊,应用激素治疗可以减少浸润的嗜酸细胞,但停药后复发率较高。而食管扩张治疗虽可较长时间缓解症状,但存在食管撕裂、穿孔的并发症,且并不能减少嗜酸

细胞的浸润. 因此关于EE的治疗还需要长期大量的进一步研究.

9 参考文献

- Landres RT, Kuster GG, Strum WB. Eosinophilic esophagitis in a patient with vigorous achalasia. *Gastroenterology* 1978; 74: 1298-1301
- Attwood SE, Smyrk TC, Demeester TR, Jones JB. Esophageal eosinophilia with dysphagia. A distinct clinicopathologic syndrome. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 109-116
- Liacouras CA. Eosinophilic esophagitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2008; 37: 989-998, xi
- Dellon ES, Aderoju A, Woosley JT, Sandler RS, Shaheen NJ. Variability in diagnostic criteria for eosinophilic esophagitis: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2300-2313
- Straumann A, Simon HU. Eosinophilic esophagitis: escalating epidemiology? *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 418-419
- Ronkainen J, Talley NJ, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E, Vieth M, Stolte M, Walker MM, Agréus L. Prevalence of oesophageal eosinophils and eosinophilic oesophagitis in adults: the population-based Kalixanda study. *Gut* 2007; 56: 615-620
- Bohm M, Richter JE. Treatment of eosinophilic esophagitis: overview, current limitations, and future direction. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2635-2644; quiz 2645
- Lucendo AJ. Immunopathological mechanisms of eosinophilic oesophagitis. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2008; 36: 215-227
- Spechler SJ, Genta RM, Souza RF. Thoughts on the complex relationship between gastroesophageal reflux disease and eosinophilic esophagitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1301-1306
- Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux--damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1996; 111: 1200-1205
- 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
- Fox VL, Nurko S, Teitelbaum JE, Badizadegan K, Furuta GT. High-resolution EUS in children with eosinophilic "allergic" esophagitis. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 30-36
- Lucendo AJ, Navarro M, Comas C, Pascual JM, Burgos E, Santamaría L, Larrauri J. Immunophenotypic characterization and quantification of the epithelial inflammatory infiltrate in eosinophilic esophagitis through stereology: an analysis of the cellular mechanisms of the disease and the immunologic capacity of the esophagus. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 598-606
- Protheroe C, Woodruff SA, de Petris G, Mukkada V, Ochkur SI, Janarthanan S, Lewis JC, Pasha S, Lunsford T, Harris L, Sharma VK, McGarry MP, Lee NA, Furuta GT, Lee JJ. A novel histologic scoring system to evaluate mucosal biopsies from patients with eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 749-755.e11
- Chehade M, Sampson HA, Morotti RA, Magid MS. Esophageal subepithelial fibrosis in children with eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45: 319-328
- Nantes Castillejo O, Zozaya JM, Jiménez-Pérez FJ, Martínez-Peñuela JM, Borda F. [Incidence and characteristics of eosinophilic esophagitis in adults] *An Sist Sanit Navar* 2009; 32: 227-234
- Lucendo AJ, Castillo P, Martín-Chávarri S, Carrión G, Pajares R, Pascual JM, Manceñido N, Erdozain JC. Manometric findings in adult eosinophilic oesophagitis: a study of 12 cases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 417-424
- Hejazi RA, Reddymasu SC, Sostarich S, McCallum RW. Disturbances of Esophageal Motility in Eosinophilic Esophagitis: A Case Series. *Dysphagia* 2009 Aug 26. [Epub ahead of print]
- Parfitt JR, Gregor JC, Suskin NG, Jawa HA, Driman DK. Eosinophilic esophagitis in adults: distinguishing features from gastroesophageal reflux disease: a study of 41 patients. *Mod Pathol* 2006; 19: 90-96
- Mulder DJ, Gander S, Hurlbut DJ, Soboleski DA, Smith RG, Justinich CJ. Multiple squamous hyperplastic-fibrous inflammatory polyps of the oesophagus: a new feature of eosinophilic oesophagitis? *J Clin Pathol* 2009; 62: 845-846
- Pasha SF, DiBaise JK, Kim HJ, De Petris G, Crowell MD, Fleischer DE, Sharma VK. Patient characteristics, clinical, endoscopic, and histologic findings in adult eosinophilic esophagitis: a case series and systematic review of the medical literature. *Dis Esophagus* 2007; 20: 311-319
- Müller S, Pühl S, Vieth M, Stolte M. Analysis of symptoms and endoscopic findings in 117 patients with histological diagnoses of eosinophilic esophagitis. *Endoscopy* 2007; 39: 339-344
- Gonsalves N, Policarpio-Nicolas M, Zhang Q, Rao MS, Hirano I. Histopathologic variability and endoscopic correlates in adults with eosinophilic esophagitis. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 313-319
- Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 11-28; quiz 29
- Rothenberg ME, Mishra A, Collins MH, Putnam PE. Pathogenesis and clinical features of eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 891-894
- Furuta GT, Liacouras CA, Collins MH, Gupta SK, Justinich C, Putnam PE, Bonis P, Hassall E, Straumann A, Rothenberg ME. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2007; 133: 1342-1363
- Kagalwalla AF, Sentongo TA, Ritz S, Hess T, Nelson SP, Emerick KM, Melin-Aldana H, Li BU. Effect of six-food elimination diet on clinical and histologic outcomes in eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1097-1102
- Kelly KJ, Lazenby AJ, Rowe PC, Yardley JH, Perman JA, Sampson HA. Eosinophilic esophagitis attributed to gastroesophageal reflux: improvement with an amino acid-based formula. *Gastroenterology* 1995; 109: 1503-1512
- Markowitz JE, Spergel JM, Ruchelli E, Liacouras CA. Elemental diet is an effective treatment for eosinophilic esophagitis in children and adolescents. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 777-782
- Liacouras CA, Spergel JM, Ruchelli E, Verma

- R, Mascarenhas M, Semeao E, Flick J, Kelly J, Brown-Whitehorn T, Mamula P, Markowitz JE. Eosinophilic esophagitis: a 10-year experience in 381 children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 1198-1206
- 31 Liacouras CA, Wenner WJ, Brown K, Ruchelli E. Primary eosinophilic esophagitis in children: successful treatment with oral corticosteroids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 26: 380-385
- 32 Schaefer ET, Fitzgerald JF, Molleston JP, Croffie JM, Pfefferkorn MD, Corkins MR, Lim JD, Steiner SJ, Gupta SK. Comparison of oral prednisone and topical fluticasone in the treatment of eosinophilic esophagitis: a randomized trial in children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 165-173
- 33 Faubion WA Jr, Perrault J, Burgart LJ, Zein NN, Clawson M, Freese DK. Treatment of eosinophilic esophagitis with inhaled corticosteroids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 27: 90-93
- 34 Langdon DE. Corrugated ringed esophagus. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1461
- 35 Teitelbaum JE, Fox VL, Twarog FJ, Nurko S, Antonioli D, Gleich G, Badizadegan K, Furuta GT. Eosinophilic esophagitis in children: immunopathological analysis and response to fluticasone propionate. *Gastroenterology* 2002; 122: 1216-1225
- 36 Remedios M, Campbell C, Jones DM, Kerlin P. Eosinophilic esophagitis in adults: clinical, endoscopic, histologic findings, and response to treatment with fluticasone propionate. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 3-12
- 37 Arora AS, Perrault J, Smyrk TC. Topical corticosteroid treatment of dysphagia due to eosinophilic esophagitis in adults. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 830-835
- 38 Helou EF, Simonson J, Arora AS. 3-yr-follow-up of topical corticosteroid treatment for eosinophilic esophagitis in adults. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2194-2199
- 39 Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME. An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis. *J Clin Invest* 2001; 107: 83-90
- 40 Mishra A, Hogan SP, Brandt EB, Rothenberg ME. IL-5 promotes eosinophil trafficking to the esophagus. *J Immunol* 2002; 168: 2464-2469
- 41 Mishra A, Rothenberg ME. Intratracheal IL-13 induces eosinophilic esophagitis by an IL-5, eotaxin-1, and STAT6-dependent mechanism. *Gastroenterology* 2003; 125: 1419-1427
- 42 Stein ML, Collins MH, Villanueva JM, Kushner JP, Putnam PE, Buckmeier BK, Filipovich AH, Assa'ad AH, Rothenberg ME. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy for eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1312-1319
- 43 Attwood SE, Lewis CJ, Bronder CS, Morris CD, Armstrong GR, Whittam J. Eosinophilic oesophagitis: a novel treatment using Montelukast. *Gut* 2003; 52: 181-185
- 44 Straumann A, Spichtin HP, Grize L, Bucher KA, Beglinger C, Simon HU. Natural history of primary eosinophilic esophagitis: a follow-up of 30 adult patients for up to 11.5 years. *Gastroenterology* 2003; 125: 1660-1669
- 45 Pasha SF, Sharma VK, Crowell MD. Current concepts and treatment options in eosinophilic esophagitis. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 992-996
- 46 Cohen MS, Kaufman AB, Palazzo JP, Nevin D, Dimarino AJ Jr, Cohen S. An audit of endoscopic complications in adult eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1149-1153
- 47 Rodrigo S, Abboud G, Oh D, DeMeester SR, Hagen J, Lipham J, DeMeester TR, Chandrasoma P. High intraepithelial eosinophil counts in esophageal squamous epithelium are not specific for eosinophilic esophagitis in adults. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 435-442
- 48 Ngo P, Furuta GT, Antonioli DA, Fox VL. Eosinophils in the esophagus--peptic or allergic eosinophilic esophagitis? Case series of three patients with esophageal eosinophilia. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1666-1670
- 49 Desai TK, Stecevic V, Chang CH, Goldstein NS, Badizadegan K, Furuta GT. Association of eosinophilic inflammation with esophageal food impaction in adults. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 795-801
- 50 Morrow JB, Vargo JJ, Goldblum JR, Richter JE. The ringed esophagus: histological features of GERD. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 984-989

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》投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/>在线提交未成功, 请通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d. 来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬). (科学编辑: 李军亮 2009-12-28)

辣椒素对胃酸分泌的影响及机制

谭婷婷, 张琴, 彭燕

谭婷婷, 张琴, 彭燕, 四川泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

作者贡献分布: 本文综述由谭婷婷与张琴完成, 彭燕审校。

通讯作者: 彭燕, 主任医师, 646000, 四川省泸州市, 四川泸州医学院附属医院消化内科. 745635068@qq.com

电话: 0830-3165331

收稿日期: 2009-10-04 修回日期: 2009-11-13

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Effects of capsaicin on gastric acid secretion and mechanisms involved

Ting-Ting Tan, Qin Zhang, Yan Peng

Ting-Ting Tan, Qin Zhang, Yan Peng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medicine College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Ting-Ting Tan, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medicine College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. 745635068@qq.com

Received: 2009-10-04 Revised: 2009-11-13

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

Although capsaicin has multiple pharmacological actions, its effects on gastric acid secretion attract the most attention. Most studies show that low-dose capsaicin can inhibit gastric acid secretion while high-dose may accelerate gastric acid secretion. However, some other studies show that capsaicin does not affect gastric acid secretion at all. The difference in the effects of capsaicin on gastric acid secretion may be related with the location of vanilloid receptor subtype 1, dose of capsaicin, route of administration, and the release of some substances such as calcitonin gene-related peptide, neurokinin A, vasoactive intestinal peptide and substance P. Capsaicin is a potentially promising drug used for modulation of gastric acid secretion.

Key Words: Capsaicin; Gastric acid secretion; Mechanism

Tan TT, Zhang Q, Peng Y. Effects of capsaicin on gastric acid secretion and mechanisms involved. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3699-3703

摘要

辣椒素(capsaicin, CAP)对胃酸分泌有一定影响, 多数研究显示小剂量抑制胃酸分泌, 大剂量则可能促进胃酸分泌, 甚至报道有些剂量的CAP对胃酸分泌没有影响. CAP对胃酸分泌影响的差异可能与其药理特性有关, 不同剂量、不同时期及给药的不同途径对胃酸分泌的影响不同. CAP可能通过直接刺激中枢、外周辣椒素-敏感感觉神经(capsaicin-sensitive sensory neurons, CSSN)及壁细胞等的辣椒素受体, 引起降钙素基因相关肽、P物质、神经激肽A、血管活性肠肽等神经递质的释放, 参与胃酸分泌的调节。

关键词: 辣椒素; 胃酸分泌; 机制

谭婷婷, 张琴, 彭燕. 辣椒素对胃酸分泌的影响及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17(36): 3699-3703

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3699.asp>

0 引言

辣椒素(capsaicin, CAP)为辣椒中极度辛辣的香草酰胺类生物碱^[1]. 大量研究显示CAP在镇痛研究方面占有重要地位, 同时具有防治心血管疾病、呼吸系统疾病的作用, 还能用于抗癌、减肥、治疗冻伤、秃顶等. 近年研究显示CAP对消化功能有一定影响, CAP对胃酸分泌影响及机制正引起重视, 本文对其进行综述.

1 CAP及其受体

CAP通过刺激初级传入神经元末梢和细胞膜上的特殊受体起作用, 此类传入神经称为辣椒素-敏感感觉神经(capsaicin-sensitive sensory neurons, CSSN), 此类受体称为辣椒素受体, 又称瞬时受体电位香草酸亚型1(transient receptor potential channel 1, TRPV1或者vanilloid receptor subtype 1, VR1)^[2]. VR1曾被认为是一种神经系统特异的受体^[3], 近年来研究发现一些非神经组织如胃肠道黏膜上皮^[4]、支气管肺泡上皮、膀胱上皮、唾液腺和泪腺, 及肥大细胞、角质细胞、巨噬细胞等也有VR1的分布^[5-6]. VR1参与了

■背景资料

辣椒素(CAP)为辣椒中极度辛辣的香草酰胺类生物碱. 近年研究表明其对胃酸分泌有影响, 但作用机制尚未阐明. CAP可能通过直接刺激中枢、外周CSSN及壁细胞等的VR1参与胃酸分泌的调节, 同时对胃黏膜血流、胃动力等有一定影响. 随着近年来在CAP对胃黏膜的生理、药理作用及其机制的研究逐渐深入, 证实适量的CAP可能对酸相关疾病的治疗具有潜在的应用价值.

■同行评议者

董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科

■研发前沿

CAP对胃酸对胃酸分泌的影响,尚无定论,不同剂量、不同时期及不同给药途径对胃酸分泌的影响不同,其量-效关系,时-效关系及给药途径的选择正是有待进一步解决的问题。

体内多项生理活动,可感受伤害性刺激,产生心肌保护、改善膀胱功能、介导细胞凋亡,参与胃肠道消化液分泌,促进胃肠蠕动^[7]。

2 CAP与酸相关性疾病

大量研究显示,CAP对酸相关性疾病可能有一定影响。有资料表明^[9],居住在新加坡的中国人比当地马来西亚和印度人患溃疡病的几率高3倍,认为这可能与当地中国人较少吃辣椒有关。蒋海清 *et al*^[10]报道胃溃疡患者口服红辣椒粉可促进溃疡愈合。

大量药理研究证实^[11-13],胃内给予CAP(160 μ g)可减轻无水乙醇诱导胃黏膜损伤;CAP(2 mg)皮下注射与胃内给药具有相同的胃黏膜保护作用;CAP短期胃内给药(单剂量,200 mg)和长期给药(每天200 mg,4 wk)对胃黏膜具均有保护作用;预先予CAP灌胃大鼠能延缓乙醇诱导大鼠胃溃疡的产生。Gyires^[18]指出,CAP可能通过抑制胃酸的分泌,减轻对胃黏膜的损害。Mózsik *et al*^[14]报道低浓度CAP(1-8 mg/L,100 mL)能以剂量依赖的方式减轻乙醇或消炎痛对胃黏膜的损伤;单次口服CAP 400 μ g,可减轻消炎痛诱导的人胃黏膜损伤及黏膜微循环障碍加重;而口服CAP(400 μ g,TID 2 wk),其对消炎痛诱导的人胃黏膜损伤及黏膜微循环障碍的影响,与对照组相比无统计学意义。Mózsik *et al*^[15]报道予CAP 50-100 mg/kg灌胃可加重胃溃疡大鼠模型的胃黏膜损伤。Bobryshev *et al*^[16]报道100 mg/kg的CAP,皮下注射,可使消炎痛诱导的大鼠胃黏膜损伤及黏膜微循环障碍加重。

3 CAP对胃酸分泌的影响

CAP对胃酸分泌可能有一定的影响,究竟是促进还是抑制,各家报道并不一致。CAP对胃酸分泌的影响目前尚不完全清楚,多数研究认为小剂量CAP抑制胃酸分泌,大剂量可能促进胃酸分泌,也有报道CAP对胃酸分泌无影响。其原因可能涉及研究方法的差异,并受以下因素的影响。

3.1 CAP的剂量 Mózsik *et al*^[14]报道低浓度范围的CAP(1-8 g/L,100 mL)能以剂量依赖的方式减少胃基础排酸量。Alfoldi *et al*^[17]观察到CAP抑制组胺刺激胃酸分泌效应。Abdel-Salam *et al*^[19]用120 μ g/L CAP灌胃大鼠后,其五肽胃泌素(25 μ g/kg, iv)诱导胃酸分泌量减少24%。Saperas *et al*^[20]用CAP(125 mg/kg)皮下注射于大鼠,其五肽胃泌素诱导的胃酸分泌量受到抑制。Mózsik *et al*^[21]报道对10例健康人予小剂量的CAP(100-800 mg)经胃

管注入,观察到其可以呈剂量依赖性抑制人基础胃酸的分泌。Bevan *et al*^[33]对行幽门结扎术后的大鼠,以小剂量(0.4-1.8 mg/kg)的CAP灌胃后,其胃酸分泌被抑制,且这种抑制效应在灌胃后的1 h最明显。Dömötör *et al*^[22]对84例健康人分别予100、200、400、800 μ g CAP溶于100 mL生理盐水中灌胃,观察到其基础胃酸分泌被抑制,并呈剂量依赖,并提出ED50为400 μ g。Mózsik *et al*^[23]报道CAP在nmol/kg-mmol/kg范围内,都可抑制基础胃酸及五肽胃泌素诱导的胃酸分泌。

Raybould *et al*^[24]发现,使用神经毒剂量的CAP可促进胃酸的分泌。Mózsik *et al*^[15]报道以高剂量(50-100 mg/kg)的CAP灌胃后,其胃酸分泌增加。Király *et al*^[25]的试验显示去神经剂量的CAP可刺激胃酸的分泌。Li *et al*^[26]报道,实验前2 wk以CAP(10 g/L)对大鼠迷走神经“去神经化”,可促发其胃酸分泌并可废除胰泌素对胃酸分泌的抑制效应。

3.2 用药时间 Raybould *et al*^[24]发现大剂量及去神经剂量的CAP单次给药可促进胃酸的分泌,该剂量CAP持续应用于大鼠双侧颈迷走神经7-14 d后,其促胃酸分泌增加的程度降低40%。

3.3 用药途径 多数研究为外周途径给药(胃内注入、皮下注射、局部应用)并显示在低浓度范围内可抑制胃酸的分泌^[14,19-22],大剂量及去神经剂量的CAP可促进胃酸的分泌^[15,28-31];而从中枢途径给药可促进胃酸分泌。Minowa *et al*^[27]观察到CAP可作用于大鼠中枢神经系统的VR1从而影响胃酸的分泌,以分别10-30 nmol CAP注射于大鼠侧脑室或第四脑室,均可以刺激胃酸的分泌,并且种刺激胃酸分泌的效应只能被VR1拮抗剂所阻断。Minowa *et al*^[28]将注射于侧脑室和第四脑室的辣椒素剂量拓展为30、50、100 mmol,其对胃酸分泌的影响仍然为刺激效应。

另有部分报道认为,CAP对胃酸分泌无影响。Dugani *et al*^[29]研究发现初次和产生“脱敏”剂量的CAP灌胃都不影响基础酸排量。Salam *et al*^[30]报道予“脱敏”剂量的CAP 3 g/L灌胃后,其基础胃酸和五肽胃泌素诱导的胃酸分泌均不受影响,而予大鼠静脉注射和皮下注射CAP 0.5 mg/kg,则对五肽胃泌素刺激胃酸分泌没有影响^[31]。

4 CAP对胃酸分泌的影响机制

CAP对胃酸分泌的影响机制目前尚不十分明确,可能与CAP的药理特性有关。CAP选择性作用于分布在支配胃的中枢、脊髓CSSN和胃壁细胞

上的VR1, 引起神经元及其纤维释放神经递质、肽类物质从而调节胃酸分泌、胃肠动力及胃黏膜血流等。

4.1 VR1的分布 VR1表达于中枢和周围神经系统内以及多种组织细胞中, CAP能从外周到中枢多个水平影响胃酸的分泌与VR1的分布密切相关。Ward *et al*^[32]研究发现在神经结构中被标记的VR1同时存在于胃壁细胞线粒体, 提示CSSN和壁细胞的VR1对胃酸的分泌可能有联合效应。外周途径给予CAP(灌胃, 静脉注射, 皮下注射)均可影响胃酸的分泌, 表明CAP可能通过分布在外周CSSN上的VR1从而参与胃酸分泌的调节; 有研究发现, VR1还存在于大脑的某些区域, 按含量大小依次是丘脑和小脑>皮质、纹状体和中脑>嗅球、脑桥、海马、和背侧丘脑^[36]。经脑室注射CAP可刺激胃酸的分泌, 且此效应可被VR1受体拮抗剂-钌红(ruthenium red, RR)及capsazepine(CZP)阻断^[27], 提示中枢的VR1可能也参与了对胃酸分泌的调节。

4.2 CAP的药理作用 CAP药理作用复杂, 不同剂量或药的不同时期对机体产生的作用效果是不同的。CAP初次施用于外周神经末梢, 可引起患者烧灼样的刺激感, 施用区产生疼痛, 局部血管扩张, 微循环量增加, 形成一个痛觉过敏区称为“刺激敏感”作用。继续使用辣椒素, 神经元变得迟钝。对CAP及其他伤害性致痛刺激无反应性, 即产生“脱敏”作用。大剂量使用CAP可引起传入神经中的C纤维变性、减少, 导致CSSN长期受到损害, 失去信息传入功能, 即CAP的化学“去神经”作用。

Abdel-Salam *et al*用120 $\mu\text{g/L}$ CAP灌胃大鼠后, 其五肽胃泌素(25 $\mu\text{g/kg}$, iv)诱导胃酸分泌量减少, 当继续使用CAP总量达3 mg时, 其对胃酸的抑制效应减弱^[19]。小剂量或初始剂量CAP作用于分布于胃黏膜上小直径的感觉神经元, 激活初级感觉神经元末梢的VR1, 引起钙离子内流, 胞质内的钙离子浓度增高到一定浓度, 可使神经纤维产生一时性的兴奋, 并促使其剂量相关性地释放多种神经肽^[33-34], 可能与胃酸分泌的抑制效应有关。当CAP持续作用于VR1时, 与一般细胞的电压门控离子通道相比, 细胞内钙离子浓度升高的幅度和速度相似(几分钟), 但胞内的钙离子恢复到静息水平却要慢很多(几十分钟)^[33], 这可解释持续使用CAP可使CSSN反应迟钝, 刺激兴奋作用减弱。而神经毒性剂量CAP使CSSN不可逆、长时程去神经支配, 丧失感觉传

入功能和释放感觉神经肽的能力^[35], 此为CAP的化学“去神经”作用。Yan *et al*^[36]研究表明, 若以神经毒性剂量CAP使之“去神经”后, 胃扩张引起的胃酸分泌减少。

4.3 CAP与胃酸分泌有关的神经递质 CAP作用于VR1可引起神经纤维末端释放大量神经肽类物质, 如(1)速激肽类(tachykinin, TK): 包括P物质(substance P, SP)、神经激肽A(neurokinin A, NKA)、神经激肽B(neurokinin B, NKB)、神经肽K(neuropeptide, NPK)等; (2)血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP); (3)降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)^[8]。CAP的生物学效应, 可能与上述神经递质之间相互作用有关, 其中与酸分泌有关的主要有SP、NKA、CGRP、VIP等^[33]。在大鼠胃黏膜组织内, CGRP主要分布于对CAP敏感的感觉神经c纤维和感觉神经 δ 细胞中, 可通过调节某些胃肠递质的释放来抑制胃酸分泌。Wang *et al*^[37]研究发现大鼠胃内分泌细胞通过刺激VR1而释放CGRP。Salomone *et al*^[38]观察到CGRP的释放可抑制基础胃酸分泌和由组胺引起的酸分泌。NKA可抑制胃酸分泌。Takaki *et al*^[39]研究显示刺激VR1可引起NKA的释放。王健平 *et al*^[40]于大鼠舌静脉和侧脑室内分别注射NKA, 可抑制其胃酸的分泌; 中枢注射神经激肽A的抑酸效应更强。Schepp *et al*^[41]研究结果则表明NKA能抑制壁细胞对组胺刺激, 他能在细胞内水平减弱组胺刺激所致的胃酸增加。Gyires^[18]指出VIP抑制胃酸和胃泌素分泌, VIP既能直接刺激胃酸分泌, 又能使生长抑素分泌增加, 呈双向调节胃酸分泌。

CAP刺激初级传入神经纤维末梢释放SP^[14,42]。Shepp *et al*^[41]的研究结果显示SP对大鼠壁细胞有直接影响, 他能在细胞水平减弱组胺刺激所致的胃酸增加。SP直接抑制胃酸分泌^[43], 还能抑制D细胞释放SS, 从而间接地调节胃酸分泌。

5 结论

CAP对胃酸对胃酸分泌的影响, 尚无定论, 不同剂量、不同时期及不同给药途径对胃酸分泌的影响不同, 其量-效关系, 时-效关系及给药途径的选择正是有待进一步解决的问题。CAP可能通过直接刺激中枢、外周CSSN及壁细胞等的VR1参与胃酸分泌的调节, 同时对胃黏膜血流、胃动力等有一定影响。随着近年来在CAP对胃黏膜的生理、药理作用及其机制的研究逐渐深入, 证实适量的CAP可能对酸相关疾病的治疗具有

■ 相关报道

Abdel-Salam *et al*用120 $\mu\text{g/L}$ CAP灌胃大鼠后, 其五肽胃泌素(25 $\mu\text{g/kg}$, iv)诱导胃酸分泌量减少, 当继续使用CAP总量达3 mg时, 其对胃酸的抑制效应减弱。Yan *et al*研究表明, 若以神经毒性剂量CAP使之“去神经”后, 胃扩张引起的胃酸分泌减少。

同行评价

本文全面综述了CAP对胃酸分泌的影响及机制,对医务人员认识CAP的药用功效有一定参考价值。

潜在的应用价值。

参考文献

- 狄云, 蒋健, 石正强. 辣椒素类物质的代谢生理研究现状. *中国蔬菜* 2000; (3): 48
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 2000; 88: 205-215
- Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3655-3660
- Kato S, Aihara E, Nakamura A, Xin H, Matsui H, Kohama K, Takeuchi K. Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1115-1121
- Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds JJ, Caterina MJ. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13396-13401
- Reilly CA, Taylor JL, Lanza DL, Carr BA, Crouch DJ, Yost GS. Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicol Sci* 2003; 73: 170-181
- Faussone-Pellegrini MS, Taddei A, Bizzoco E, Lazzeri M, Vannucchi MG, Bechi P. Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the human stomach. *Histochem Cell Biol* 2005; 124: 61-68
- Bari F, Jancsó G. Ruthenium red antagonism of capsaicin-induced vascular changes in the rat nasal mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994; 251: 287-292
- Satyanarayana MN. Capsaicin and gastric ulcers. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46: 275-328
- 蒋海清, 候奕, 黄晓焰, 廖作华, 孙庆伟. 辣椒治疗胃粘膜损伤及溃疡的实验与临床研究. *赣南医学院学报* 2003; 23: 369-371
- 李林, 王竹立, 叶美红, 赖晓嵘. 辣椒辣素敏感神经元介导干地黄胃粘膜保护效应. *中山医科大学学报* 2000; 21: 133-136
- Sobue M, Joh T, Oshima T, Suzuki H, Seno K, Kasugai K, Nomura T, Ohara H, Yokoyama Y, Itoh M. Contribution of capsaicin-sensitive afferent nerves to rapid recovery from ethanol-induced gastric epithelial damage in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1188-1195
- Takeuchi K, Niida H, Matsumoto J, Ueshima K, Okabe S. Gastric motility changes in capsaicin-induced cytoprotection in the rat stomach. *Jpn J Pharmacol* 1991; 55: 147-155
- Mózsik G, Szolcsányi J, Rácz I. Gastroprotection induced by capsaicin in healthy human subjects. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5180-5184
- Mózsik G, Vincze A, Szolcsányi J. Four response stages of capsaicin-sensitive primary afferent neurons to capsaicin and its analog: gastric acid secretion, gastric mucosal damage and protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1093-1097
- Bobryshev P, Podvigina T, Maltcev N, Filaretova L. Gastric microcirculation as target of gastroprotective action of glucocorticoid hormones in rats with desensitization of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Inflammopharmacology* 2006; 14: 236-242
- Alföldi P, Obál F Jr, Tóth E, Hideg J. Capsaicin pretreatment reduces the gastric acid secretion elicited by histamine but does not affect the responses to carbachol and pentagastrin. *Eur J Pharmacol* 1986; 123: 321-327
- Gyires K. Neuropeptides and gastric mucosal homeostasis. *Curr Top Med Chem* 2004; 4: 63-73
- Abdel-Salam OM, Debrececi A, Mózsik G, Szolcsányi J. Capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in modulating gastric mucosal defense against noxious agents. *J Physiol Paris* 1999; 93: 443-454
- Saperas E, Santos J, Malagelada JR. Role of vagal and splanchnic capsaicin-sensitive afferents in enterogastric inhibition of acid secretion in rats. *Am J Physiol* 1995; 268: G286-G291
- Mózsik G, Debrececi A, Abdel-Salam OM, Szabó I, Figler M, Ludány A, Juricskay I, Szolcsányi J. Small doses of capsaicin given intragastrically inhibit gastric basal acid secretion in healthy human subjects. *J Physiol Paris* 1999; 93: 433-436
- Dömötör A, Szolcsányi J, Mózsik G. Capsaicin and glucose absorption and utilization in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol* 2006; 534: 280-283
- Mózsik G, Dömötör A, Abdel-Salam OM. Molecular pharmacological approach to drug actions on the afferent and efferent fibres of the vagal nerve involved in gastric mucosal protection in rats. *Inflammopharmacology* 2006; 14: 243-249
- Raybould HE, Taché Y. Capsaicin-sensitive vagal afferent fibers and stimulation of gastric acid secretion in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 1989; 167: 237-243
- Király A, Sütő G, Guth PH, Taché Y. Mechanisms mediating gastric hyperemic and acid responses to central TRH analog at a cytoprotective dose. *Am J Physiol* 1997; 273: G31-G38
- Li P, Chang TM, Chey WY. Secretin inhibits gastric acid secretion via a vagal afferent pathway in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G22-G28
- Minowa S, Tsuchiya S, Someya A, Horie S, Murayama T. Role of neuropeptide receptor systems in vanilloid VR1 receptor-mediated gastric acid secretion in rat brain. *Eur J Pharmacol* 2004; 486: 317-324
- Minowa S, Ishihara S, Tsuchiya S, Horie S, Murayama T. Capsaicin- and anandamide-induced gastric acid secretion via vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in rat brain. *Brain Res* 2005; 1039: 75-83
- Dugani AM, Glavin GB. Capsaicin effects on stress pathology and gastric acid secretion in rats. *Life Sci* 1986; 39: 1531-1538
- Salam OM, Szolcsányi J, Mózsik G. Capsaicin and its analogue resiniferatoxin inhibit gastric acid secretion in pylorus-ligated rats. *Pharmacol Res* 1995; 31: 341-345
- Abdel-Salam OM, Debrececi A, Szolcsányi J, Mózsik G. Capsaicin inhibits the pentagastrin-stimulated gastric acid secretion in anesthetized rats with acute gastric fistula. *J Physiol Paris* 1999;

- 93: 461-466
- 32 Ward SM, Bayguinov J, Won KJ, Grundy D, Berthoud HR. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 2003; 465: 121-135
- 33 Bevan S, Szolcsányi J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 330-333
- 34 Urban L, Thompson SW, Dray A. Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends Neurosci* 1994; 17: 432-438
- 35 Holzer P, Michl T, Danzer M, Jovic M, Schicho R, Lippe IT. Surveillance of the gastrointestinal mucosa by sensory neurons. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52: 505-521
- 36 Yan CD, Gu L, Chen M, Tian SP, Li DS. [Capsaicin-sensitive afferent neurons and endogenous nitric oxide (NO) mediate the gastric acid secretion and hyperemic responses to intragastric peptone] *Shengli Xuebao* 1996; 48: 70-76
- 37 Wang L, Hu CP, Deng PY, Shen SS, Zhu HQ, Ding JS, Tan GS, Li YJ. The protective effects of rutaecarpine on gastric mucosa injury in rats. *Planta Med* 2005; 71: 416-419
- 38 Salomone S, Caruso A, Martinez G, Cutuli VM, Prato A, Bianchi A, Amico-Roxas M, Clementi G. Secretory and vascular effects of adrenomedullin in gastric ulcer: role of CGRP- and adrenomedullin-receptors. *Peptides* 2003; 24: 1175-1180
- 39 Takaki M, Jin JG, Nakayama S. Capsaicin-sensitive and hexamethonium-insensitive circular muscle responses to mesenteric nerve stimulation in the isolated guinea pig ileum. *Acta Med Okayama* 1990; 44: 135-139
- 40 王健平, 朱文玉, 洪昭雄, 汤健, 吴璵, 王泰龄. 大鼠消化道内的K物质. *生理学报* 1988; 40: 278-282
- 41 Schepp W, Schmidtler J, Tatge C, Schusdziarra V, Classen M. Effect of substance P and neurokinin A on rat parietal cell function. *Am J Physiol* 1990; 259: G646-G654
- 42 韩济生. 神经科学纲要. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 449-450
- 43 Holst B, Hastrup H, Raffetseder U, Martini L, Schwartz TW. Two active molecular phenotypes of the tachykinin NK1 receptor revealed by G-protein fusions and mutagenesis. *J Biol Chem* 2001; 276: 19793-19799

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 •

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 2009-12-28)

肝癌干细胞的研究进展

宋凯, 杨硕菲, 吴俊华, 江春平

■背景资料

肝癌是常见的恶性肿瘤之一, 我国肝癌死亡的人数占世界肝癌死亡人数的45%。目前, 关于肝癌的发病机制并不十分清楚, 但肿瘤干细胞学说的提出和发展, 提示了肝癌干细胞存在的可能性。据此, 研究人员对其表面标志物、信号通路等进行了大量的研究, 希望可以证实肝癌干细胞的存在, 并进一步将其分离培养, 从而为肝癌的预防和治疗开辟新的途径。

宋凯, 杨硕菲, 吴俊华, 南京大学医学院 江苏省南京市 210046

宋凯, 杨硕菲, 江春平, 南京大学肝胆研究所 江苏省南京市 210008

江春平, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

南京市卫生局重点基金资助项目, No. ZKX08025

作者贡献分布: 本文由宋凯与杨硕菲综述完成; 吴俊华与江春平审校。

通讯作者: 江春平, 教授, 210008, 江苏省南京市, 南京大学肝胆研究所, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科。

chunpingjiang@yahoo.com.cn

电话: 025-83304616-11902

收稿日期: 2009-11-13 修回日期: 2009-11-23

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-28

Advances in research on liver cancer stem cells

Kai Song, Shuo-Fei Yang, Jun-Hua Wu, Chun-Ping Jiang

Kai Song, Shuo-Fei Yang, Jun-Hua Wu, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Kai Song, Shuo-Fei Yang, Chun-Ping Jiang, Institute of Hepatobiliary Surgery, Nanjing University, Nanjing 210018, Jiangsu Province, China

Chun-Ping Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210018, Jiangsu Province, China
Supported by: the Major Program from Health Bureau of Nanjing City, No. ZKX08025

Correspondence to: Professor Chun-Ping Jiang, Institute of Hepatobiliary Surgery, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210018, Jiangsu Province, China. chunpingjiang@yahoo.com.cn

Received: 2009-11-13 Revised: 2009-11-23

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-28

Abstract

Cancer stem cells have been identified in various human tumors. However, it remains controversial as to whether or not liver cancer stem cells (LCSCs) exist until now. There are two hypotheses to explain the origin of liver cancer stem cells: the dedifferentiation of mature hepatocytes and the maturation arrest of liver stem cells. Now, the latter is generally acknowledged to be the better one. To obtain direct evidence for the existence of LCSCs, many researchers focus their studies on the surface markers on LCSCs to identify ideal markers for

isolation of LCSCs. Besides, the relationship between side population (SP) cells and LCSCs also attracts much attention. Therefore, the study of LCSCs is probably of great significance for the diagnosis and treatment of liver cancer.

Key Words: Liver cancer stem cells; Surface marker; Side population cells; Targeted therapy

Song K, Yang SF, Wu JH, Jiang CP. Advances in research on liver cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3704-3710

摘要

肿瘤干细胞已经被证实存在于一些肿瘤组织中, 而肝癌干细胞是否存在仍未得到确切的结果。通过实验, 研究人员对于肝癌干细胞的来源提出了两个假说: 成熟肝细胞的去分化与肝干细胞的“成熟受阻”。目前后者是较为公认的肝癌形成途径。同时, 为了得到肝癌干细胞存在的直接证据, 研究人员一直致力于其表面标志物的研究, 希望通过得到理想的标志物来鉴定分选出肝癌干细胞。SP细胞与肝癌干细胞的研究也是目前研究的热点。因此, 肝癌干细胞的研究将会对肝癌的诊断和治疗产生重大的意义。

关键词: 肝癌干细胞; 表面标志物; 侧群细胞; 靶向治疗

宋凯, 杨硕菲, 吴俊华, 江春平. 肝癌干细胞的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(36): 3704-3710

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3704.asp>

0 引言

肝癌是常见恶性肿瘤之一, 死亡率高, 仅次于胃癌、食管癌而居第3位。我国每年死于肝癌约11万人, 占全世界肝癌死亡人数的45%。目前, 关于肝癌发生的机制仍不清楚。随着越来越多的肿瘤中发现肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的存在, 有理由认为肝癌中也可能存在肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)。若这一推测得到证实, 不仅可以早期诊断出肝癌, 而且还能控

■同行评议者

徐泱, 副教授, 上海复旦大学附属中山医院肝肿瘤外科

制其生长、转移和复发, 从而为肝癌的治疗开辟了新的途径。

1 CSCs与肝癌

传统理论认为肿瘤是由于人体内某一部分细胞在多种因素影响下基因发生变异, 形成不受机体控制、无限增殖的肿瘤细胞, 其中具有转移能力的肿瘤称为恶性肿瘤。过去, 人们一直认为, 肿瘤的生长是所有肿瘤细胞共同作用的结果。现今发现, 肿瘤的生长和转移是由于其内部一部分具有干细胞特征的肿瘤细胞增殖和迁移所造成的结果。据此, *Reya et al*^[1]提出“肿瘤干细胞学说”, 即在肿瘤组织中存在一种数量较少的干细胞样癌细胞亚群, 其同时具有癌细胞和干细胞的特征, 是肿瘤形成的起始细胞, 在肿瘤形成、生长和转移中起决定性作用, 这种细胞称为CSCs。

虽然肿瘤干细胞学说很早就被提出, 但直到近些年才被人接受。*Bonnet et al*^[2]在急性粒细胞白血病首次找到CSCs。在其他实体瘤中也被证实存在CSCs。*Al Hajj et al*^[3]在乳腺癌组织中成功分离出干细胞样肿瘤细胞, 证实在乳腺癌中存在CSCs。大量的实验还证实了前列腺癌、肺癌、脑肿瘤和胰腺癌中存在CSCs^[4-7]。

肿瘤干细胞学说提示了LCSCs存在的可能性。*Robrechts et al*^[8]在入院9 d后即死于肝癌的患者肝脏肿瘤中发现了体积相对较小、同时具有肝细胞和胆管细胞双重特点的细胞, 推测这些细胞可能是未成熟的肝祖细胞且在生长过程中未发生分化, 这可能是该患者病情迅速发展的原因。*Parent et al*^[9]从肝细胞癌的肝脏中分离出具有分化潜能的肝干细胞系, 免疫组织化学结果显示这些祖细胞的数量在病变的肝脏中要比正常肝脏多50%, 这很可能是由于在病变的过程中祖细胞的增殖被激活所造成的。*Song et al*^[10]分析了63例肝癌组织切片, 发现在肝癌组织中频繁出现CD133阳性细胞, 并且随着病情不断加重, CD133的表达也随之加强, 从而提示了CD133阳性细胞可能是LCSCs的可能性。

2 LCSCs

“肿瘤干细胞学说”为肝癌的研究提供了崭新的思路, 目前, 关于LCSCs的来源有两种观点: 一是认为LCSCs起源于成熟肝细胞的去分化; 另一种认为其起源于肝干细胞的“成熟受阻”。

2.1 成熟肝细胞去分化来源 有作者通过多年的

化学致癌剂诱导癌变的实验, 研究癌变前位点, 提出LCSCs起源于成熟肝细胞的去分化的推测。*Gournay et al*^[11]使用逆转录病毒作为载体介导 β -半乳糖苷酶基因在2-AAF诱导小鼠癌变模型中进行标记, 得出结论: 癌前位变点起源于成熟肝细胞。*Bralet et al*^[12]在肝切除术1 d后, 向小鼠体内注射含有nls-LacZ基因的逆转录病毒载体。待肝再生完全后, 肝组织活检显示18.3%的肝细胞表达nls-LacZ基因。随后给小鼠喂养二乙基亚硝胺(DEN), 检查发现约有17.7%的癌细胞表达nls-LacZ基因, 这一数字与投药前所标记的干细胞比例(18.3%)几乎一致, 说明肝癌起源于成熟肝细胞的去分化。

2.2 肝干细胞“成熟受阻”来源

2.2.1 肝干细胞及其来源: 在人体肝组织中存在两类肝干细胞, 即小肝细胞和卵圆细胞。小肝细胞位于胆管上皮, 体积较小, 有高密度的核, 形态与正常肝细胞相似, 具有强大的增殖能力。而卵圆细胞是公认的肝干细胞的代表, 位于胆小管和Hering管部, 细胞体积较小, 呈圆形或椭圆形, 细胞质少, 核质比例大, 胞核呈卵圆形, 故其被称为卵圆细胞。

肝干细胞的来源有两种可能。一是肝内来源即在肝脏发育成熟后, 组织内仍保留少量处于休眠状态的干细胞。当这些干细胞受到某些因素的作用时, 可以被激活成为肝干细胞并继续分化成为肝细胞或胆管细胞。二是肝外来源即肝干细胞来源于其他组织, 例如骨髓等。*Petersen et al*^[13]将雄鼠的骨髓移植到雌鼠体内, 以Y染色体作为标记, 在雌鼠体内观察到来源于雄鼠骨髓的卵圆细胞, 并且进一步分化成为肝细胞。首次提出了肝干细胞可以来源于骨髓。*Theise et al*^[14]研究异性间的肝移植和骨髓移植, 也证实了上述结论。骨髓干细胞与肝干细胞的关系同样令人关注。*Bae et al*^[15]研究发现Thy1阳性的骨髓干细胞在体外培养中表达肝特异性基因, 并可在人体内形成肝细胞。施晓雷 *et al*^[16]采用均匀设计法筛选最佳诱导培养体系, 可以有效地促进骨髓基质干细胞体外定向转化为有功能的肝细胞。最近有研究提示S1P介导的骨髓间充质细胞归巢行为与肝脏纤维化有密切关系^[17]。

2.2.2 肝干细胞与肝癌: 近些年来, 随着对于肝干细胞在肝癌形成过程中重要性深入认识, 越来越多的实验证明LCSCs起源于肝干细胞的“成熟受阻”。*Dumble et al*^[18]诱导小鼠产生卵圆细胞, 并将卵圆细胞分离后移植到没有胸腺的小

■研究前沿

虽然越来越多的研究证实了肝癌干细胞的存在, 但至今仍未从肝癌组织中直接分离得到肝癌干细胞。因此, 研究人员将研究重点放在了其表面标志物上。目前已有相当数量的文献报道了多种表面标志物可以用来识别肝癌干细胞, 但至今未达成一致。而且, 对于肝癌干细胞的培养技术目前还存在一些缺陷。总而言之, 分离培养肝癌干细胞仍是亟待解决的问题。

■相关报道

Jabari *et al*研究在体内外不同肝癌细胞系表达不同的标志物组合,并据此将肝癌细胞分为4类:(1)Huh-7、Huh-7 p c D N A 3.1、Hep3B细胞系表达CK7/19、 β -catenin和CD34;(2)Huh-7、5-15细胞系表达CK19、波形蛋白和Ki-67;(3)在基质胶中培养的Hep3B表达CK19、 β -catenin和PTC;(4)HepG2表达CK18/19和 β -catenin.这表明还有很多分子可能成为LCSCs的表面标志物,目前发现的还是很少一部分.

鼠体内,能够产生与肝癌相似的肿瘤,说明卵圆细胞可能参与肝癌的形成. Grozdanov *et al*^[19]报道癌胚蛋白Gpc3可以作为肝祖细胞的标志物,并通过建立Solt-Farber肝脏致癌模型研究证实肝祖细胞/卵圆细胞与肝癌的发生有密切的关系. Polycomb组蛋白Bmi1和Wnt/ β -catenin与多种干细胞的自我更新能力有关, Chiba *et al*^[20]对其进行功能性研究发现表达Bmi1和Wnt/ β -catenin的突变体其自我更新能力得到提高,将其移植到免疫缺陷的小鼠体内即产生肝癌,提示肝干细胞自我更新的失控是肝癌变的起始事件. 最近研究在肝癌组织中的具有干细胞特征的EpCAM(+)细胞引导了肝癌细胞的生长和转移,进一步提示肝干细胞与肝癌的发生有着密切的联系^[21].

3 LCSCs的表面标志物

随着肿瘤干细胞学说的不断发展,对白血病,乳腺癌和人类中枢系统肿瘤等癌组织和癌旁组织中CSCs的表面标志物的明确和分离成功,直接针对CSCs的研究已经成为将来通过CSCs为靶点去攻克癌症的基础研究热点. CSCs与肿瘤细胞和干细胞具有双重相似性,利用某些肿瘤细胞特征与干细胞特征相结合的方法,是目前从癌组织中分离筛选CSCs的主要理论依据. 国内外专家学者对LCSCs表面标志物不断进行着探究,目前用来分选LCSCs的方法是荧光活化细胞分选法(FACS)和磁性激活细胞分选法(MACS),这两种方法都需要有明确LCSCs表面标志物.

3.1 类肝癌细胞特异性标志物

3.1.1 甲胎蛋白: 甲胎蛋白(AFP)是公认的检测肝癌的肿瘤标志. 在研究LCSCs的表面标志物时,研究人员常将AFP与其他标志物结合来鉴定LCSCs. Yamashita *et al*^[22]在提出EpCAM可作为肝癌前期生物标志后,又利用不同的EpCAM(+)细胞表达AFP的程度不同,将其进一步分成4个亚群,且每一个亚群特异的基因表达与肝癌发展的阶段有关,这对诊断肝癌和追溯其来源有重要意义. 但Ishikawa *et al*^[23]通过临床试验发现肿瘤形成细胞对AFP抗体反应剧烈,但同时也对CK7, CK14和CD133有阳性反应. 由于AFP特异性和敏感度并不理想,因此现在认为不能单独使用AFP作为LCSCs的表面标记物,而经典肿瘤理论认为AFP的高表达与肿瘤组织中细胞的去分化有关,也许在明确了其与LCSCs有怎样的联系之后,经典的肿瘤理论与肿瘤干细胞理论在

肝癌上会得到一定的统一,为我们更快攻克肝癌提供更多的思路.

3.2 类干细胞特异性标志物及相关基因 在通过类干细胞表面标志物寻求LCSCs表面标志物的过程中,有下面几个方向值得关注,这也是目前探索的热点.

3.2.1 表面抗原分化簇(cluster of differentiation CD): 用以单克隆抗体鉴定为主的方法,将来自不同实验室的单克隆抗体所识别的统一分化抗原,称之为CD. 有研究表明CD蛋白可作为LCSCs表面标志物. Yamashita *et al*^[22]通过对肝肿瘤标本分析,发现EpCAM(即CD326)(+)AFP(+)细胞亚群具有肝干细胞特征,通过FACS分离出的EpCAM(+)细胞不仅具有肝干细胞的自我更新和分化的特征,而且能够启动肝肿瘤细胞高度的攻击性. Yang *et al*^[24]通过观察不同组织来源的CSCs,发现肝癌组织中CD90(+)的细胞具有形成肿瘤的能力,而CD90(-)的细胞不具有这种能力. Ma *et al*^[25]观察分离CD133(+)的肝干细胞,具有自我更新和增殖分化的能力,并能在体内形成肿瘤. 但是最近有作者研究指出^[26]CD133(+)和CD133(-)均具有更新、增殖、分化和侵入的能力,因此CD133不能单独成为鉴定LCSCs的标志物. 因此,有关CD系蛋白是否可以成为LCSCs标志物仍存在较多争论,目前还只能等待更具说服力的实验出现才能最终下结论,但把CD视作一种可以缩小我们分离细胞范围的指向性蛋白已经完全可以.

3.2.2 角质蛋白: 又称细胞角质素(cytokeratin CK),有研究比较各个表面标志物阳性与阴性肿瘤细胞亚群移植裸鼠后成瘤能力的差异,发现Thy-1阳性细胞、CK7阴性细胞与AFP阳性细胞成瘤能力明显大于对应细胞亚群,具备初步的LCSCs特征. Zhang *et al*^[27]发现,肝癌可能来源于肝祖细胞,而这些祖细胞中CK7、CK19、c-kit、OV-6的表达较高. 但随着研究的深入,大多数学者认为CK19是胆管细胞而非肝祖细胞的特异性标识. 颜政 *et al*^[28]在分离、培养肝癌细胞时,按照卵圆细胞表面标记分选肿瘤细胞并分别异体移植裸鼠,检测体内成瘤能力差异,结果表明人肝细胞癌的肿瘤细胞中存在成瘤能力差异巨大的肿瘤细胞亚群,而这很可能就是LCSCs的群落. 最近王阁 *et al*^[29]报道发现:原发性肝癌不同病理组织类型均可表达CK7、CK19、AFP、c-kit和Thy-1多种肝干细胞标志,这可能与肝干细胞的多源性和分化程度有关. Durnez

et al^[30]通过对109例肝癌标本进行分析发现CK7或CK19阳性的细胞可能是LCSCs, 且存在CK19阳性肝癌的患者肝移植后复发率高, 预后较差的特点. CK系蛋白可以作为肝干细胞(卵圆细胞)的重要表面标记物, 肝干细胞(卵圆细胞)又很可能是LCSCs的来源, 所以CK系蛋白必定会备受关注.

3.3 自身特异性标志物 Jabari *et al*^[31]研究在体内体外不同肝癌细胞系表达不同的标志物组合, 并据此将肝癌细胞分为4类: (1)Huh-7、Huh-7 pcDNA3.1、Hep3B细胞系表达CK7/19、 β -catenin和CD34; (2)Huh-7、5-15细胞系表达CK19, 波形蛋白和Ki-67; (3)在基质胶中培养的Hep3B表达CK19, β -catenin和PTC; (4)HepG2表达CK18/19和 β -catenin. 这表明还有很多分子可能成为LCSCs的表面标志物, 目前发现的还是很少一部分.

4 侧群(side population, SP)细胞与LCSCs

到目前为止想通过寻求表面标志物的常规方法尚不能明确筛选出LCSCs, 而SP细胞在肿瘤干细胞学说中却越来越受到关注, 甚至有不少学者认为可以将SP细胞性质视作一种通用的CSCs分离标志. 鉴于SP细胞和CSCs存在密切的联系, 对SP细胞的研究必将对丰富和拓展肿瘤干细胞理论发挥巨大作用.

4.1 SP细胞 SP细胞是指一类能将进入细胞核的荧光染料Hoechst33342通过膜转运蛋白ABCG2排除细胞外的一类细胞. 1996年, Goodell *et al*^[32]在用检测细胞凋亡的方法Hoechst33342染色法研究骨髓细胞时, 发现有极少一部分细胞可以将进入细胞核的荧光染料排出细胞外, 在荧光显微镜下表现为不着色, 以后这类细胞即被命名为SP细胞, 这种性质也被命名为SP表型. SP表型与ABCG2/Bcrp1的ATP转运蛋白密切相关. SP细胞已经被证明广泛存在于人和动物的造血系统, 血液和许多重要组织器官中. SP细胞参与造血系统的重建, 组织的更新和再生以及成体干细胞的多器官可塑性等.

4.2 SP细胞与干细胞 SP细胞与干细胞具有很强的一致性, 有很强的自我更新和增殖分化的能力. Goodell *et al*^[32]发现仅占骨髓细胞0.1%的SP细胞, 能重建受致死剂量放射线照射的小鼠的髓系和淋巴系血细胞, 重建能力是普通骨髓细胞的1000倍. Hulspar *et al*^[33]通过原代分离小鼠胚胎神经球, 发现培养前后细胞群体中都有SP

细胞的存在, 如果将这些SP细胞单独培养, 细胞则会产生表型类似于新鲜分离的未培养的神经细胞. 但仍很多实验证实SP细胞与干细胞有不可忽视的差异性, Lichtenauer *et al*^[34]通过对肾上腺皮质的癌细胞系NCI-h295R的研究证实, 其SP细胞不具有干细胞特性. Burkert *et al*^[35]也指出, SP表型作为常用的干细胞标志并不适用于胃肠道癌细胞, Wu *et al*^[36]发现人和小鼠胶质瘤细胞系中表达CD133的细胞都具有干细胞特性, 然而这种成瘤能力很强的CD133阳性细胞似乎不具有SP表型.

SP细胞与CSCs关系密切. Setoguchi *et al*^[37]从c6神经胶质瘤细胞内分离得到SP细胞, 在体外一定的培养条件下, 能分化形成神经元和神经胶质细胞, 而在裸鼠体内, 则能在多种组织中形成肿瘤. 从肿瘤中分离出的SP细胞在体内可以再次形成肿瘤. 除了成瘤性之外, SP细胞还与CSCs具有相似的信号转导通路, Chiba *et al*^[38]对肝癌细胞中SP细胞进行基因分析后发现, SP细胞中Wnt通路相关基因(如FZD7、WNT5A、WNT6、CTNNB1和Jun基因)高表达. 因此推测SP细胞和CSCs具有一些共同的信号传导通路, 他们在肿瘤的发生和发展中起一定的作用.

4.3 SP细胞与肿瘤耐药性 肝癌的复发与转移是治疗中非常棘手的问题, 也是目前需要攻克的难点. 传统的放、化疗中, 有一部分细胞总是能成为肿瘤复发的新位点, 其本质可能是这部分细胞既具有干细胞的特性, 也具有抗药性, 与SP细胞有很大的联系. 其耐药机制可能与以下几个方面有关: (1)ABC转运蛋白的高表达. 该类蛋白在人体内大多承担着运输并外排的任务, 许多对肿瘤非干细胞具有抑制或杀伤作用的化疗药物对CSCs的杀伤作用被大大减弱了; (2)抗凋亡基因高表达: 除高水平表达Bcl-2外, CSCs耐药性也和其他抗凋亡基因的持续高表达有关; (3)具有自我更新能力: CSCs另一个重要的特性就是保持自我更新能力. 自我更新机制可能是促进肿瘤发展和转移的关键因素之一; (4)相对处于静止期时间较长: CSCs如果处于G₀期, 不分裂, 对作用于细胞周期或快速分化细胞的药物本身就有耐药性^[39]. 最近, 颜政 *et al*^[40]通过测定人肝细胞癌异质性亚群细胞在不同浓度、不同化疗药物作用下的抑制率, 计算检测耐药相关蛋白的表达率发现LCSCs-1和LCSCs-2亚群细胞对阿霉素(ADM)、顺铂(DDP)、鬼臼乙叉苷(VP-16)等药物都产生了耐药性, 得出结论

■创新盘点

本综述将肝癌干细胞的表面标志物进行了分类, 可以使读者对其进行系统性地研究. 除此之外, 本文还重点介绍了侧群细胞, 较为详细地综述了其与干细胞、肿瘤耐药性和肝癌干细胞的关系.

■应用要点

本综述重点介绍了肝癌干细胞的表面标志物和侧群细胞。表面标志物可以指导研究人员对肝癌干细胞进行识别和分离。而侧群细胞的性状可以作为识别肝癌干细胞的通用标准。这两方面的研究可以进一步证实肝癌干细胞的存在,从而实现对肝癌的靶向治疗。

MRP、LRP、GST、MDR1的高表达,可能是人肝癌细胞异质性亚群多耐药产生的部分分子基础。

4.4 SP细胞与LCSCs Shi *et al*^[41]使用流式细胞仪从不同的肝癌细胞系中分离出SP细胞,通过检测发现所有来源的SP细胞均出现一致的特征:自我更新、高度的集落生成、显著的耐药性和高度表达ABCG2,并且移植在免疫缺陷小鼠体内可产生肿瘤。因此得出结论来自肝癌组织的SP细胞具有LCSCs的特征。Chiba *et al*^[38]在肝癌细胞系Huh7和PLC/PRE/5中分选出SP细胞,分别占0.8%和0.25%,SP细胞具有高增殖潜能和抗凋亡特性。奚忠 *et al*^[42]研究发现SP细胞表面的转运蛋白ABCG2在肝细胞性肝癌的发生发展过程中可能起着非常重要的作用,有可能成为临床治疗肝细胞性肝癌的分子靶标。SP细胞与LCSCs的关系研究还在起步阶段,目前还是应该从主要的表面标志蛋白入手,先弄清二者的在分离纯化上是否有内在的联系,再进一步深入弄清将来在治疗策略上SP细胞到底会不会给我们以新的启发。

5 LCSCs靶向治疗策略

随着CSCs理论的不成熟,以LCSCs为靶标的靶向治疗策略将成为目前肝癌治疗的新方向,其具有治疗特异性强、效果显著、基本不损伤正常组织的优点。

LCSCs的靶向治疗要求精确和对周围组织的损伤最小。可构思出两个方向:一是研制能够抑制LCSCs特异性蛋白的药物,通过介入治疗的方法将药物准确送至LCSCs周围,作用于LCSCs,控制其继续分化和恶变,从而控制住肝癌的转移和复发,再结合放、化疗,有望能很好地控制肝癌组织的快速扩大,大大延长肝癌患者的寿命,甚至彻底治愈肝癌;二是在明确了LCSCs表面标志物之后,通过与表面分子的特异性结合,能够将一些抗癌、抑癌基因送入LCSCs中,改变其恶化状态,即在基因治疗层面对肝癌进行控制。在结合SP细胞与LCSCs的研究中发现其与肝癌的化疗和放疗都有关联。

目前一些研究提示抑制ABCG2/Bcrp1的表达能够增强肿瘤组织对化学毒物的敏感性,或者说可以降低肿瘤组织的耐药性。放射线是通过DNA和生物大分子的直接和间接损伤来杀灭肿瘤细胞的,这些损伤的过程中存在细胞中大量氧自由基的产生,SP细胞这种排出细胞毒

性物质的特点可能使其幸免损伤而产生放射性拮抗,其具有的干细胞特点是肿瘤残存和复发的原因。因此针对SP细胞的治疗可能提高肿瘤对放射治疗的敏感性。

6 结论

尽管各类可能成为LCSCs的表面标志物特异性蛋白类别的不断拓展以及与LCSCs关系的不断明确,越来越多的证据表明LCSCs存在的可能性,但要真正从人肝癌组织中分离纯化出LCSCs并对其进行针对性的研究,仍有不少现实问题亟待解决。如在体外如何培养大量高纯度的LCSCs以供研究,如何建立稳定的LCSCs培养系统,如何在培养过程中有效利用生长诱导因子等进行有效调控,LCSCs在体外分离脱离微环境之后是否会变性,LCSCs与其微环境的关系,LCSCs系相关的信号传递通路与介质,如何在肝癌中对LCSCs进行定向诱导等问题。

7 参考文献

- 1 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- 2 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 3 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
- 4 Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-10951
- 5 Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121: 823-835
- 6 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 5821-5828
- 7 Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1030-1037
- 8 Robrechts C, De Vos R, Van den Heuvel M, Van Cutsem E, Van Damme B, Desmet V, Roskams T. Primary liver tumour of intermediate (hepatocyte-bile duct cell) phenotype: a progenitor cell tumour? *Liver* 1998; 18: 288-293
- 9 Parent R, Marion MJ, Furio L, Trépo C, Petit MA. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 2004; 126: 1147-1156
- 10 Song W, Li H, Tao K, Li R, Song Z, Zhao Q, Zhang F, Dou K. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular

- carcinoma. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 1212-1218
- 11 Gournay J, Auvigne I, Pichard V, Ligeza C, Bralet MP, Ferry N. In vivo cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocytes. *Lab Invest* 2002; 82: 781-788
- 12 Bralet MP, Pichard V, Ferry N. Demonstration of direct lineage between hepatocytes and hepatocellular carcinoma in diethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2002; 36: 623-630
- 13 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 14 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 15 Bae SH, Choi JY, Yoon SK, Oh IH, Yoon KH, Park ST, Kim GD, Oh SH, Petersen BE. Thy1-positive bone marrow stem cells express liver-specific genes in vitro and can mature into hepatocytes in vivo. *Hepatol Int* 2008; 2: 63-71
- 16 施晓雷, 毛凉, 许碧云, 谢婷, 朱章华, 陈军浩, 李雷, 丁义涛. 小鼠骨髓基质干细胞体外转化为肝细胞最佳诱导体系的筛选及验证. *世界华人消化杂志* 2008; 23: 2217-2223
- 17 Li C, Kong Y, Wang H, Wang S, Yu H, Liu X, Yang L, Jiang X, Li L, Li L. Homing of bone marrow mesenchymal stem cells mediated by sphingosine 1-phosphate contributes to liver fibrosis. *J Hepatol* 2009; 50: 1174-1183
- 18 Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23: 435-445
- 19 Grozdanov PN, Yovchev MI, Dabeva MD. The oncofetal protein glypican-3 is a novel marker of hepatic progenitor/oval cells. *Lab Invest* 2006; 86: 1272-1284
- 20 Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 2007; 133: 937-950
- 21 Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009; 136: 1012-1024
- 22 Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, Budhu A, Zanetti KA, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 1451-1461
- 23 Ishikawa K, Sasaki A, Haraguchi N, Yoshikawa Y, Mori M. A case of an alpha-fetoprotein-producing intrahepatic cholangiocarcinoma suggests probable cancer stem cell origin. *Oncologist* 2007; 12: 320-324
- 24 Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 153-166
- 25 Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
- 26 Salnikov AV, Kusumawidjaja G, Rausch V, Bruns H, Gross W, Khamidjanov A, Ryschich E, Gebhard MM, Moldenhauer G, Büchler MW, Schemmer P, Herr I. Cancer stem cell marker expression in hepatocellular carcinoma and liver metastases is not sufficient as single prognostic parameter. *Cancer Lett* 2009; 275: 185-193
- 27 Zhang F, Chen XP, Zhang W, Dong HH, Xiang S, Zhang WG, Zhang BX. Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence. *Histopathology* 2008; 52: 224-232
- 28 颜政, 方驰华, 高鹏. 人原发肝细胞癌干细胞表面标志的初步研究. *南方医科大学学报* 2006; 26: 1304-1306
- 29 王阁, 索金友, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆, 李增鹏, 肖华亮, 王东. 原发性肝癌不同病理组织类型中肝干细胞的起源分析. *第三军医大学学报* 2006; 28: 114-116
- 30 Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, Lesaffre E, Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology* 2006; 49: 138-151
- 31 Jabari S, Meissnitzer M, Quint K, Gahr S, Wissniowski T, Hahn EG, Neureiter D, Ocker M. Cellular plasticity of trans- and dedifferentiation markers in human hepatoma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2009; 35: 69-80
- 32 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-1806
- 33 Hulspar R, Quesenberry PJ. Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry* 2000; 40: 245-250
- 34 Lichtenauer UD, Shapiro I, Geiger K, Quinkler M, Fassnacht M, Nitschke R, Rückauer KD, Beuschlein F. Side population does not define stem cell-like cancer cells in the adrenocortical carcinoma cell line NCI h295R. *Endocrinology* 2008; 149: 1314-1322
- 35 Burkert J, Otto WR, Wright NA. Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells. *J Pathol* 2008; 214: 564-573
- 36 Wu A, Oh S, Wiesner SM, Ericson K, Chen L, Hall WA, Champoux PE, Low WC, Ohlfest JR. Persistence of CD133+ cells in human and mouse glioma cell lines: detailed characterization of GL261 glioma cells with cancer stem cell-like properties. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 173-184
- 37 Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle* 2004; 3: 414-415
- 38 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 39 欧扬, 郭秀丽. 肿瘤干细胞及其耐药机制. *生理科学进展* 2007; 38: 115-119
- 40 颜政, 方驰华. 人肝细胞癌细胞亚群的克隆分离及异

■同行评价

本文综述了肝癌干细胞研究进展, 内容较为新颖, 有一定可读性。

- 质性机制的初步研究. 世界华人消化杂志 2006; 14: 481-485
- 41 Shi GM, Xu Y, Fan J, Zhou J, Yang XR, Qiu SJ, Liao Y, Wu WZ, Ji Y, Ke AW, Ding ZB, He YZ, Wu B, Yang GH, Qin WZ, Zhang W, Zhu J, Min ZH, Wu ZQ. Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 1155-1163
- 42 奚忠, 江春平, 丁义涛. ABCG2在肝细胞性肝癌组织和肝癌细胞株中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 247-252

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》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 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 2009-12-28)

溃疡性结肠炎基因多态性的研究进展

赵琛, 张树辉, 吴焕淦, 崔云华, 周次利

赵琛, 张树辉, 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 上海市 200437
吴焕淦, 崔云华, 周次利, 上海市针灸经络研究所 上海市 200030
国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目, No. 2009CB522900
上海市自然科学基金资助项目, No. 08ZR1418200
作者贡献分布: 本文综述由赵琛、张树辉、吴焕淦、崔云华及周次利完成。
通讯作者: 赵琛, 副主任医师, 200437, 上海市, 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院. chris_0127@hotmail.com
收稿日期: 2009-08-18 修回日期: 2009-09-23
接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-12-28

Advances in research on gene polymorphisms in ulcerative colitis

Chen Zhao, Shu-Hui Zhang, Huan-Gan Wu, Yun-Hua Cui, Ci-Li Zhou

Chen Zhao, Shu-Hui Zhang, Yueyang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China
Huan-Gan Wu, Yun-Hua Cui, Ci-Li Zhou, Shanghai Institute of Acupuncture Moxibustion and Meridian, Shanghai 200030, China
Supported by: the National Basic Research Program of China (973 Program), No. 2009CB522900; and the Natural Science Foundation of Shanghai, No. 08ZR1418200
Correspondence to: Chen Zhao, Yueyang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China. chris_0127@hotmail.com
Received: 2009-08-18 Revised: 2009-09-23
Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-12-28

Abstract

The morbidity of ulcerative colitis is associated with gene polymorphisms. Genome-wide association studies have identified many ulcerative colitis-predisposing genes. In this article, we will review the recent advances in research on gene polymorphisms in ulcerative colitis by providing an overview of high-frequency predisposing genes and new predisposing genes for ulcerative colitis.

Key Words: Ulcerative colitis; Gene polymorphism; Review

Zhao C, Zhang SH, Wu HG, Cui YH, Zhou CL. Advances

in research on gene polymorphisms in ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(36): 3711-3714

摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的发病是多基因参与、作用于免疫系统和靶器官的疾病。对UC全基因组多态性的研究发现其存在许多易感基因, 本文从UC高频易感基因及新发现易感基因等方面总结UC基因多态性研究进展。

关键词: 溃疡性结肠炎; 基因多态性; 综述

赵琛, 张树辉, 吴焕淦, 崔云华, 周次利. 溃疡性结肠炎基因多态性的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3711-3714
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3711.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)是炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)的两种主要亚型, 指原因不明的直肠和结肠慢性非特异性炎症性疾病^[1]。二者发病均涉及环境、感染、免疫及遗传等因素之间的相互作用, 是多基因参与、作用于免疫系统和靶器官的疾病, 但其病原学、病理学和分子机制方面存在明显差异。近年来, 大量研究显示遗传因素与UC密切相关^[2-3], IBD家族史是UC发病的危险因素之一^[3]。随着分子生物学技术的发展, 对UC全基因组多态性的研究发现其存在许多易感基因, 包括先天免疫、自吞途径和T细胞免疫反应等, 其中一些也存在于CD, 同时也发现了一些UC特异基因^[4-8], 现就这方面的研究进展作一综述。

1 UC易感基因及其多态性

1.1 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)基因 研究表明, TNF- α 是一种重要的促炎性细胞因子, TNF- α 的产生受多种因素影响, 包括免疫细胞及其活化水平, TNF- α 启动子区域的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)在UC的发生、病程和严重

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)发病与遗传、免疫等因素相关已得到国际医学界的认可, 是多基因参与、作用于免疫系统和靶器官的疾病。随着分子生物学技术的发展, 对UC全基因组多态性的研究发现其存在许多易感基因。

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

■ 研发前沿

UC发病与遗传因素的关系已成为研究热点,如能明确UC与遗传因素的关系,将为UC的诊断与治疗开辟新途径,而UC基因组多态性研究为此提供了平台。

程度等具有重要作用。Ahma *et al*^[9]发现, TNF- α 多态性(-1031T, -863C, -857C, -80G, -308G和-238G)与UC易感性有关,并可能使局限性UC不易发展为广泛性结肠炎。Sashio *et al*^[10]研究也发现, TNF- α (-308A, -238G)在UC患者中频率高于正常人群。曹倩 *et al*^[11]检测了浙江地区汉族UC患者野生型TNF- α 基因及TNF基因的6个多态性(TNF-1031T/C, -863C/A, -857C/T, -380G/A, -308G/A, -238G/A),结果显示TNF-308A可能与汉族UC患者遗传易感相关。Queiroz *et al*^[12]应用PCR, PCR-CTPP或PCR-RFLP技术对巴西人群UC基因多态性的研究显示, TNF- α -307和IL-1RN VNTR多态等位基因与UC密切相关。在不同地区和种族, UC的基因多态性也存在一定的差异, Lu *et al*^[13]对英语文献中UC患者TNF- α -308基因启动子多态性研究进行了多元分析,结果显示G→A替代与亚洲东部人群发生UC的风险显著相关,但在欧洲人群则不明显。

1.2 巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)基因 MIF在免疫和炎症反应中具有重要作用,是重要的促炎症细胞因子。有研究显示在UC和CD的血清MIF水平显著升高, MIF基因多态性在一些自身免疫性疾病中具有重要作用。Fei *et al*^[14]对中国汉族人IBD患者MIF-173的SNP研究显示, UC患者MIF-173 CC基因型频率显著高于健康对照组,而CD患者这种关系不明显,表明MIF-173 CC基因型可能是UC的易感基因。

1.3 细胞间黏附因子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)基因 ICAM-1属于细胞黏附分子免疫球蛋白超家族成员,参与调节炎症的反应,组织细胞的发育和分化,免疫应答反应,介导白细胞与内皮细胞以及细胞外基质间黏附作用,参与淋巴细胞归巢和再循环等。ICAM-1基因在UC患者肠黏膜中过度表达,其多态性与UC易感性有关, Low *et al*^[15]在大样本研究中发现, ICAM-1 G/G241纯合子等位基因与UC病变局限有关。但另一研究显示ICAM-1基因多态性与土耳其人UC无相关性^[16]。

1.4 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, CTLA-4)基因 人类CTLA-4基因位于2q23,属于免疫球蛋白超家族成员,有3个多态性位点。周峰 *et al*^[17]研究发现UC患者CTLA4基因启动子区-1661位点等位基因与中国汉族UC存在显著相关性, A/G+G/G基因型频率、G等位基因频率高于正常对照组。

CTLA-4基因微卫星长片段(AT)_n重复序列(≥ 118 bp)等位基因多态性与UC显著相关^[18]。但Hui *et al*^[19]的研究显示CTLA-4C-318T和A+49T基因多态性与UC无显著相关性。

1.5 Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs) 他是表达于细胞膜上与免疫系统识别微生物有关的一类受体家族,能够识别特定类型微生物的保守分子成分,从而激活信号转导途径、诱导炎症反应、促进抗原提呈细胞的活化。近年来许多研究均表明TLRs参与了IBD过程。正常情况下肠上皮细胞持续表达TLR3和TLR5, TLR2和TLR4几乎无法测到,而UC患者的结肠和回肠末端上皮细胞基底侧高表达TLR4。Franchimont *et al*^[20]的研究发现TLR4 Asp299Gly等位基因出现频率在UC患者中显著升高。而我国学者的研究也显示UC患者与健康对照组之间TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu、Arg677Trp多态性, TLR2-196至-174 del/del和del/ins携带频率无明显差异^[21-22]。

1.6 ECM1基因 Fisher *et al*^[4]应用高达10 886个非同义SNP位点对1841例UC和1935例对照受试者的研究显示, ECM1基因座与UC易感性的相关性最为显著,似乎是UC的特异性位点,这在以往的研究中未见报道。该基因座位于染色体1q21.2,编码细胞外基质蛋白-1,主要在肠道基底膜表达的一种糖蛋白,可抑制基质金属蛋白酶-9、活化NF- κ B信号,在一些恶性上皮肿瘤ECM1显著高表达且与转移潜能密切相关。根据上皮-间质相互作用理论,提示ECM1可能是UC真正的候选基因。

2 UC易感基因多态性的临床意义

2.1 有利于UC诊断 Nam *et al*^[23]用限制性片段长度多态性分析对UC患者HSP70-2基因多态性研究显示, AA基因型多态性与重症UC密切相关,而BB基因型多态性与重症CD密切相关,表明HSP70-2基因多态性可用来诊断UC和CD。但国内学者对汉族UC患者的研究结果提示HSP70-2 A/G的多态性可能不是UC患者的主要影响因素^[24]。Ho *et al*^[25]研究显示多药耐药基因(multidrug resistance gene, *mdr-1*)中3435T-T和T-等位基因型在UC患者中的频率均高于正常人群,在弥漫型UC患者中尤为明显,而在正常人群和CD患者之间没有区别。Karban *et al*^[26]测定了NF- κ B1启动子和外显子,确定了6个核苷酸变异,其中启动子中的-94ins/delATTG与UC具有相关性。Franke *et al*^[5]用以往

CD全基因组相关研究获得的50个易感基因座对1组德国CD和UC大样本分析显示, 3p21.31, NKX2-3和CCNY变异是CD和UC的易感基因, 而PTPN2, HERC2和STAT3变异仅与UC密切相关。可见, UC基因多态性的研究, 尤其是UC特异基因的研究, 有利于UC诊断。

2.2 有利于预测UC预后 Bagnoli *et al*^[27]在研究中发现UC患者与正常人之间的hMLH1 655A/G几乎没有区别, 而复发性UC患者hMLH1 655G基因型出现的频率却明显高于正常人群, 显示对UC基因多态性的研究有利于客观预测UC患者的预后。

越来越多的证据表明, 部分UC患者可发展为结直肠癌(大肠癌), 寻找有效的基因标记对于预测癌变风险有重要意义。Garrity-Park *et al*^[28]用PCR和测序技术对TNF- α 启动子多态性(-238[G->A], -308[G->A], -857[C->T], -863[C->A]和-1031[T->C])研究显示, -308(G->A) SNP在等位基因和基因表型都与UC相关结直肠癌病例显著相关。Vietri *et al*^[29]对UC患者p53基因第72编码子多态性的研究显示, p53 Pro/Pro多态性与UC的病程和持续时间显著相关, 24例Pro纯合子的UC中有19例持续时间>7年, 而87/123例Arg/Arg、66/96例Arg/Pro的UC持续时间 \leq 7年; 243例UC患者有34例有结直肠癌家族史, 在这些患者中Pro/Pro多态性与结直肠癌家族史显著相关。Lewander *et al*^[30]应用限制性片段长度多态性PCR技术对瑞典和中国人结直肠癌的研究显示, NF- κ B1缺失多态性与瑞典人群结直肠癌风险增加之间密切相关, 但与家族性或中国人结直肠癌之间无相关性。

3 结论

大量研究结果表明, UC连锁基因及易感基因的多态性与其发病密切相关, 但其机制尚未完全明了。尽管对UC的常见的遗传学易感性的研究取得了很大的进展, 但对大样本、全基因组的比较性研究仍有必要, 这有助于明确其他类型的遗传基因变异, 包括DNA拷贝数改变和多种罕见变异; 其次, 通过对疾病相关区域变异进行精确基因定位和测序以明确等位基因谱系, 遗传学变异如何干扰基因功能, 同时也需要足够的样本来解释环境因素和遗传学危险因子间的相互作用。基因多态性研究除了证实疾病易感性之外, 也将可能用来了解疾病对药物治疗的反应, 制定个体化治疗方案和降低药物不良反应等。

4 参考文献

- 1 Dubois PC, van Heel DA. New susceptibility genes for ulcerative colitis. *Nat Genet* 2008; 40: 686-688
- 2 Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Ruiz-Morales JA, Higuera L, Cutiño T, Rodríguez-Pérez JM, Villarreal-Garza C, Granados J. Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2003; 64: 119-123
- 3 Jiang L, Xia B, Li J, Ye M, Deng C, Ding Y, Luo H, Ren H, Hou X, Liu H, Xu H, Cheng H, Yang H. Risk factors for ulcerative colitis in a Chinese population: an age-matched and sex-matched case-control study. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 280-284
- 4 Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott NJ, Nimmo ER, Massey D, Berzuini C, Johnson C, Barrett JC, Cummings FR, Drummond H, Lees CW, Onnie CM, Hanson CE, Blaszczyk K, Inouye M, Ewels P, Ravindrarajah R, Keniry A, Hunt S, Carter M, Watkins N, Ouwehand W, Lewis CM, Cardon L, Lobo A, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Mansfield JC, Deloukas P, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet* 2008; 40: 710-712
- 5 Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Hedderich J, May S, Lu T, Schuldt D, Nikolaus S, Rosenstiel P, Krawczak M, Schreiber S. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet* 2008; 40: 713-715
- 6 Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 445-456
- 7 von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47: 63-73
- 8 Uthoff SM, Eichenberger MR, Lewis RK, Fox MP, Hamilton CJ, McAuliffe TL, Grimes HL, Galandiuk S. Identification of candidate genes in ulcerative colitis and Crohn's disease using cDNA array technology. *Int J Oncol* 2001; 19: 803-810
- 9 Ahmad T, Armuzzi A, Neville M, Bunce M, Ling KL, Welsh KI, Marshall SE, Jewell DP. The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotype in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2003; 62: 527-535
- 10 Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Fukuda Y, Tamura K, Satomi M, Shimoyama T, Furuyama J. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics* 2002; 53: 1020-1027
- 11 曹倩, 高敏, 周刚, 朱琴, 吴敏良, 胡伟玲, 刘健敏. 肿瘤坏死因子基因多态性与溃疡性结肠炎相关性研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 460-463
- 12 Queiroz DM, Oliveira AG, Saraiva IE, Rocha GA, Rocha AM, das Graças Pimenta Sanna M, Guerra JB, Dani R, Ferrari Mde L, Castro LP. Immune response and gene polymorphism profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel*

■创新盘点

本文对UC基因组多态性的最新研究进展进行了综述, 为揭开UC的致病机制奠定了基础。

■同行评价

本文对UC基因多态性的研究进展进行了综述,有一定科学意义和可读性。

- Dis 2009; 15: 353-358
- 13 Lu Z, Chen L, Li H, Zhao Y, Lin L. Effect of the polymorphism of tumor necrosis factor- α -308 G/A gene promoter on the susceptibility to ulcerative colitis: a meta-analysis. *Digestion* 2008; 78: 44-51
- 14 Fei BY, Lv HX, Yang JM, Ye ZY. Association of MIF-173 gene polymorphism with inflammatory bowel disease in Chinese Han population. *Cytokine* 2008; 41: 44-47
- 15 Low JH, Williams FA, Yang X, Cullen S, Colley J, Ling KL, Armuzzi A, Ahmad T, Neville MJ, Dechairo BM, Walton R, Lench NJ, Jewell DP. Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 173-181
- 16 Ozen SC, Dagli U, Kiliç MY, Törüner M, Celik Y, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2006; 41: 304-310
- 17 周峰, 夏冰, 郭秋莎, 王琪, 李岚, 姜黎, 程虹. 细胞毒T淋巴细胞相关抗原4基因多态性与溃疡性结肠炎. *中华内科杂志* 2006; 45: 478-481
- 18 Jiang Y, Xia B, Jiang L, Lv M, Guo Q, Chen M, Li J, Xia HH, Wong BC. Association of CTLA-4 gene microsatellite polymorphism with ulcerative colitis in Chinese patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 369-373
- 19 Hui CK, Sun J, Au WY, Lie AK, Yueng YH, Zhang HY, Lee NP, Hou JL, Liang R, Lau GK. Occult hepatitis B virus infection in hematopoietic stem cell donors in a hepatitis B virus endemic area. *J Hepatol* 2005; 42: 813-819
- 20 Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Devière J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 987-992
- 21 熊利芬, 夏冰, 姜黎, 郭秋莎, 孙泽群. TLR4基因 Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu、Arg677Trp多态性与中国湖北汉族炎症性肠病无相关性. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 212-216
- 22 Wang F, Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Nakamura M, Fujita H, Iwata M, Kamiya Y, Nagasaka M, Takahama K, Watanabe M, Hirata I, Nakano H. Genetic polymorphisms of CD14 and Toll-like receptor-2 (TLR2) in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 925-929
- 23 Nam SY, Kim N, Kim JS, Lim SH, Jung HC, Song IS. Heat shock protein gene 70-2 polymorphism is differentially associated with the clinical phenotypes of ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1032-1038
- 24 李文清, 林经安, 王承党, 陈玉丽, 吴婷, 陆崇, 庄则豪, 陈瑞庆. 热休克蛋白基因多态性与溃疡性结肠炎相关性研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 635-636
- 25 Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, Arnott ID, Satsangi J. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005; 128: 288-296
- 26 Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CL, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, Silverberg MS, Duerr RH, Cho JH, Gregersen PK, Wu Y, Achkar JP, Dassopoulos T, Mezey E, Bayless TM, Novet FJ, Brant SR. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 35-45
- 27 Bagnoli S, Putignano AL, Melean G, Baglioni S, Sestini R, Milla M, d'Albasio G, Genuardi M, Pacini F, Trallori G, Papi L. Susceptibility to refractory ulcerative colitis is associated with polymorphism in the hMLH1 mismatch repair gene. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 705-708
- 28 Garrity-Park MM, Loftus EV Jr, Bryant SC, Sandborn WJ, Smyrk TC. Tumor necrosis factor- α polymorphisms in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 407-415
- 29 Vietri MT, Riegler G, Ursillo A, Caserta L, Cioffi M, Molinari AM. p53 codon 72 polymorphism in patients affected with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2007; 42: 456-460
- 30 Lewander A, Butchi AK, Gao J, He LJ, Lindblom A, Arbmán G, Carstensen J, Zhang ZY, Sun XF. Polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer in Swedish but not in Chinese populations. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1332-1338

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》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 2009-12-28)

ICC与胃肠道炎症免疫

杨琰, 余跃

杨琰, 余跃, 安徽医科大学附属医院消化内科 安徽省合肥市 230001

安徽省自然科学基金资助项目, No. 070413142

作者贡献分布: 本文由杨琰综述, 余跃审校。

通讯作者: 余跃, 主任医师, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属医院消化内科. yuyuemd@yahoo.com.cn

电话: 0551-2283380

收稿日期: 2009-10-23 修回日期: 2009-11-23

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-28

Interstitial cells of Cajal and gastrointestinal inflammation and immunity

Yan Yang, Yue Yu

Yan Yang, Yue Yu, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial People's Hospital, Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 070413142

Correspondence to: Yue Yu, Department of Gastroenterology, Anhui Provincial People's Hospital, Affiliated to Anhui Medical University, 17 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. yuyuemd@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-23 Revised: 2009-11-23

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-28

Abstract

Interstitial cells of Cajal (ICC) in gastrointestinal tract are closely linked to gastrointestinal inflammation and dysmotility from various causes. During gastrointestinal inflammation, ICC show varying degrees of changes in their structure, number and functions. In addition, the immune mechanisms involved in the pathogenesis of gastrointestinal inflammation have also attracted wide attention. In this article, we will review the changes in ICC in gastrointestinal inflammation and immunity.

Key Words: Interstitial cells of Cajal; Gastrointestinal inflammation; Immunity

Yang Y, Yu Y. Interstitial cells of Cajal and gastrointestinal inflammation and immunity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3715-3719

摘要

胃肠道Cajal间质细胞(ICC)与各种原因所致的

胃肠道炎症, 胃肠动力紊乱密切相关. ICC在胃肠道发生炎症时, 他的结构, 数量, 功能均有不同程度的改变. 同时胃肠道炎性病变的免疫机制也越来越受到人们的重视. 本文就胃肠道炎症的免疫过程中ICC发生的变化作一综述.

关键词: Cajal间质细胞; 胃肠道炎症; 免疫

杨琰, 余跃. ICC与胃肠道炎症免疫. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3715-3719

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3715.asp>

0 引言

早在1893年, 西班牙神经解剖学家Cajal发现在哺乳动物的胃肠组织中存在一种非神经但与神经有关的特殊类型的间质细胞, 称为Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC). 20世纪80年代, 众多研究表明ICC广泛分布于胃肠道系统中, 是胃肠道慢波的起搏细胞, 在维持胃肠道正常的生理功能中发挥重要作用. 近年来, 胃肠道炎症导致ICC损伤日益受到重视, 胃肠道黏膜免疫机制紊乱是胃肠道炎性病变的重要原因. 本文简要综述了ICC在胃肠道炎症及免疫过程中的变化.

1 ICC

1.1 ICC的分类 根据形态和功能的不同, ICC被分为4种基本类型: 肌间ICC(myenteric ICC, ICC-MY), 位于环行肌和纵行肌之间, 是起搏细胞, 产生慢波电位; 肌内ICC(intramuscular ICC, ICC-IM), 位于环行肌和纵行肌束内, 参与神经信号传递, 胃底、胃体、胃窦环行肌层内和胃底、胃体纵行肌层内的ICC-IM与肠神经末梢形成紧密的联系, 并在这些器官的胆碱能兴奋性和硝基能抑制性神经支配中发挥作用, 胃窦ICC-IM还能促进肠道慢波产生^[1], 肠道括约肌ICC-IM的丢失导致该区域肠运动神经传递衰减^[2]; 深肌丛ICC(deep muscular plexus ICC, ICC-DMP), 位于小肠环肌的深部丛内, 与深肌神经丛连接; 黏膜下ICC(submucosal ICC, ICC-SM), 位于黏膜下,

■背景资料

ICC是胃肠运动的起搏器(pacemakers). ICC网及其直接相连的肠神经系统构成的运动起搏系统, 在维持胃肠的正常生理功能中发挥重要作用. 近年来胃肠炎症性疾病的发病率明显增加, 由此引发的炎症免疫与ICC的关系日益受到人们的关注.

■同行评议者

崔立红, 副教授, 中国人民解放军海军总医院消化内科

■ 研发前沿

目前国内外已经展开了ICC的形态学及电生理学的研究,若要明确ICC与胃肠炎症免疫的关系,还需要长期不断的研究探索。

膜与肌层之间。ICC-MY和ICC-SM具有胃电起搏作用,而ICC-IM和ICC-DMP则起介导神经信号作用。

1.2 ICC的结构和数量 近年来, c-kit免疫组织化学染色的使用大大加深了人们对ICC的认识^[3]。光镜下可见ICC呈现特殊的网状连接,单个ICC,有2-5个长的突起,呈纺锤型或星状。电镜下可见胞质和突起内含有丰富的线粒体,滑面内质网显著且较多,粗面内质网相对较少,有发育良好的高尔基体,有较多中间丝,无粗肌丝,很接近三极神经束,有胞膜小凹,基底膜不完整;外周ICC则易于聚焦,表现出胞体呈三角形,核大、胞质少、胞体多突起、细胞之间相互连接形成网络,与平滑肌细胞伴行。ICC相互之间, ICC与平滑肌细胞之间可见缝隙连接。

1.3 ICC的功能

1.3.1 ICC与胃肠运动: 近年来研究认为, ICC作为胃肠道电活动的起搏点产生慢波,协调慢波传递,从而主导胃肠道平滑肌收缩。在纵行肌和环行肌交界处的电慢波幅值最大,并且从交界向两肌层传播电节律。若将两肌层交界处的ICC去掉,则慢波电位就不能发生,表明含ICC的交界细胞是产生慢波的首要条件,并在纵行肌和环行肌两层肌肉间起“桥梁”作用,同时ICC释放的一氧化碳(carbon monoxide, CO)在平滑肌产生电位梯度的机制中起到重要作用^[4]。如果外界给予带有ICC的游离小肠肌条的适当的电刺激,则可产生电慢波,其频率比正常增加,证明ICC可以接受电传导。ICC的慢波电位主要由上升支和平台期两部分波形组成。其上升支电位产生与电压依赖性的Ca²⁺通道开放有关;平台期电位的产生和IP₃受体启动依赖Ca²⁺激活的Cl通道开放有关。由胞内的内质网和线粒体所控制的钙离子浓度是ICC产生瞬时起搏电流的必要条件。ICC上的电压依赖性的L型Ca²⁺通道被激活,产生内向电流,促使ICC除极达阈值后触发慢波电位,通过缝隙连接传递至平滑肌,激活平滑肌上的L型Ca²⁺通道,使平滑肌去极化并达阈值,产生动作电位,使平滑肌收缩^[5]。缝隙连接存在于肌间神经丛、深肌神经丛及结肠黏膜下神经丛的ICC网之间^[6]。胃肠ICC网络通过众多缝隙连接给邻近平滑肌细胞提供电流及起搏活动。当ICC发出慢波,通过缝隙连接传播至平滑肌细胞,激活平滑肌细胞,产生动作电位,引起平滑肌收缩。

1.3.2 ICC与肠神经的联系: ICC周围常伴有肠神经纤维环绕,为神经信号传递提供了解剖基础。

ICC的一个重要功能是接收肠神经系统神经元的信号传递,神经冲动可通过ICC传至平滑肌,并引起平滑肌细胞收缩。ICC是肠神经作用的首要靶细胞,他担当了接受与传递兴奋和抑制性神经递质的作用。肠神经释放的递质是通过ICC来调节胃肠运动, ICC在肠神经向平滑肌的信号传导中起重要的中介作用。研究表明神经的传导不是通过神经肌肉间松散的突触结构而是通过神经末端和ICC-IM之间的突触样连接。胃肠内神经-ICC-平滑肌网络间存在紧密的效应连接结构。小肠ICC-DMP与肠神经末梢联系紧密,肠神经末梢和ICC-DMP之间存在突触样连接^[7]。对犬结肠的研究发现ICC的Ca²⁺内流引发NO产物释放,扩大了肠的抑制性神经的效应。实验研究提示,小鼠回肠内的ICC-MY在诱导NO调节的纵行肌松弛中起重要作用,并且发现消除起搏区的ICC可阻断慢波的发生与传播^[8]。近年来,普遍认为肠神经和ICC以及平滑肌细胞间形成网络状连接。最近的研究认为^[9],肌内迷走神经的膨体穿过一级隔壁与ICC-IM没有关联,而与神经突和神经胶质细胞相关联;肌内迷走神经的膨体在次级隔壁与ICC-IM相关联,而ICC-IM与肌细胞并无必然的密切联系。此外,肌束中的迷走神经的膨体与ICC-IM有密切联系,而在缝隙连接中ICC-IM与肌细胞密切联系。肌内迷走神经形成的膨体主要包含无颗粒分泌小泡,还包含大的颗粒囊泡,这些都与ICC-IM并列排布,从而证实了ICC-IM和肌内迷走神经的膨体之间是以突触样联系传递信号的。

2 胃肠道炎症与ICC

2.1 炎症期ICC数量、形态、功能的变化 胃肠道炎症所致动力障碍与肠道ICC数量、形态、功能改变密切相关。近年来研究表明,胃肠道感染动物模型中胃肠道炎症区域ICC的数量减少、网络中断、超微结构损害以及电慢波产生、传播和神经传递障碍^[10]。近年来研究发现^[11],小肠肌层出现炎症时, ICC的网络密度减低, ICC数量减少,小肠ICC-MY几乎完全消失, ICC-IM和ICC-DMP也显著下降, ICC与神经之间的直接连接或紧密对合极少,与神经结构相关联的网络被破坏。ICC的结构异常主要表现在细胞突起中,包括胞质空泡形成,胞膜泡状化,在ICC突起之间的连接带上形成多个膜状物。炎症反应可导致平滑肌细胞及周围组织结构损伤, ICC的突起最受影响,少数ICC突起显示不可逆损害,与平

平滑肌细胞失去正常联系。

Wang *et al*^[12]在旋毛虫感染诱导的小鼠空肠炎症模型中发现, 感染后1-3 d, ICC突起部位发生斑片状破坏。超微结构显示中间丝网络丢失和部分细肌丝缺失、存在小溶酶体, 膜断裂后形成多个膜结构, 许多突起末端断裂。ICC与平滑肌和神经元细胞之间的联系中断, 功能上表现为ICC电活动异常、神经传递障碍导致肠道异常蠕动。炎症可导致ICC的超微结构出现异常变化, 并失去电活性的同步性, 出现异位起搏点, 造成电失耦联的发生和局部慢波频率的增加。有研究发现^[13]小鼠感染后小肠肌间丛c-kit阳性的ICC呈网络状分布, 其数量较对照组明显减少, 并出现异常慢波去同步化活动, 包括频率减慢, 波幅降低, 波形杂乱不规则。UC时的肠黏膜炎症及组织损伤可能是导致ICC缺失的重要原因, ICC缺失或减少可导致结肠运动异常。研究表明^[14]UC小鼠远段结肠组织ICC超微结构发生改变, 包括ICC与平滑肌细胞、神经元之间的连接结构受损、数量减少, ICC的线粒体数量减少, 肿胀、溶解、形成空泡, 说明其能量供应减少, 对神经细胞兴奋的传导功能降低, 导致肠道神经系统调节减弱及运动障碍。还有研究表明^[15], 结肠炎大鼠模型组ICC的结构模糊, 与其他细胞间连接破坏, 线粒体肿胀, 空泡变性, 内质网扩张、脱粒, 细胞器减少, 胞质内空泡形成, 核周间隙增宽, 可能是胃肠运动功能障碍的原因。Matsuura *et al*^[11]发现, 大鼠小肠移植后, ICC网络自发收缩活动的恢复晚于形态的修复, 可能与肠肌层炎症反应相关。以上研究证实, ICC的病理性变化直接导致胃肠功能紊乱。

2.2 炎症恢复期ICC的修复 ICC的生存和修复与来源于肥大细胞(mast cell, MC)、肠神经元、平滑肌的SCF(stem cell factor)密切相关。SCF是MC和ICC最重要的细胞功能调节因子, MC本身能合成、贮存和释放SCF。神经元也可贮存SCF, 可能对ICC的修复和再生发挥作用。通过对克罗恩病(Crohn's disease, CD)的研究^[16]表明, MC与受损ICC形成频繁的选择性膜-膜接触并逐渐向ICC脱颗粒, 提示MC可能促进ICC的再生和维持。研究显示^[17], MC能分泌IL-9和SCF, 而适当浓度IL-9, 可以维持ICC的网络结构, 增强其生长和节律收缩。IL-9也能在SCF的刺激下, 促进MC因子产生。研究^[18]发现胰岛素和胰岛素样生长因子(IGF-I)可促进ICC再生和SCF表达的恢复。Wouters *et al*^[19]的研究显示五羟色胺(5-hydroxy

tryptamine, 5-HT)受体介导了5-HT通路对原代培养ICC的促增殖作用。亦有研究^[13]发现神经元损伤与ICC数量减少直接相关, 其恢复亦伴随ICC增殖。

2.3 ICC与炎症细胞 研究^[20]认为在三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的结肠炎中, 平滑肌区域的免疫反应依赖于时间, 且伴随动力障碍, 组织学分析和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性显示, 在炎症的最初2 d内炎症细胞侵入肌层, 随后逐渐降低; 促炎细胞因子mRNA表达亦先升高后降低, 14 d恢复; 炎症期ICC网络的免疫反应性、自发收缩节律破坏, 随后恢复; 而14 d肌源性收缩活动仍被抑制。炎症细胞浸润使神经元和平滑肌细胞受损, 使得能够促进ICC生长分化的SCF减少, 也可导致ICC发育受阻功能异常, 最终抑制了平滑肌的收缩, 导致肠道运动障碍。

3 胃肠道免疫与ICC

胃肠道炎症的免疫机制, 尤其是MC和巨噬细胞的作用, 越来越受到人们的关注。

3.1 MC和ICC 肠道炎症时, MC活化脱颗粒释放组织胺、5-HT、缓激肽等生物活性物质, 进一步激活神经-免疫网络, 影响肠道平滑肌运动而引起肠动力异常。其中的组织胺可加强小肠的肌电活动, 刺激小肠的推进性蠕动, 使得肠运动增快; 5-HT在多种受体共同参与下, 主要通过兴奋肠肌神经丛的胆碱能神经实现对肠的促动力作用。MC还可以合成多种细胞因子, 其中的白介素、干扰素、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)可使MC与白细胞发生串联作用, 从而引起局部炎性细胞浸润。MC能释放SCF, SCF与c-kit受体结合通过多种途径使ICC增殖和分化维持ICC网络并发挥其功能^[21]。

3.2 巨噬细胞和ICC 近年研究^[22]发现, 在TNBS诱导的大鼠结肠炎模型中, ICC和肠神经损伤可能与肌层的巨噬细胞有关, 提示巨噬细胞在诱导肠动力紊乱中起重要作用。炎症反应可以引起巨噬细胞浸润, 平滑肌细胞受损, ICC的突起与平滑肌细胞失去正常联系, 而此时巨噬细胞和ICC形成特异性的紧密连接, 释放的细胞因子和生长因子诱发粗面内质网明显增加, 胃肠道ICC网络结构的完整性显著改变, 提示ICC网络是炎症初期最早破坏的靶部位。感染后, 许多免疫细胞(巨噬细胞和淋巴细胞)浸润到肌间神经丛, ICC结构也立即出现变化。ED2(+)巨噬细胞是肠

■ 相关报道

Ye *et al*研究发现MC能分泌IL-9和SCF, 而适当浓度IL-9, 可以维持ICC的网络结构。Kinoshita *et al*在TNBS诱导的大鼠结肠炎模型中发现巨噬细胞在诱导肠动力紊乱中起重要作用。

■创新盘点

本文对ICC及胃肠炎症免疫的最新研究进展做了综述,为进一步明确其关系奠定了基础。

道肌层固有巨噬细胞,分布于浆膜下、肌间及深肌丛。组织学检测显示,患有炎症的大鼠肠肌层中固有ED2(+)巨噬细胞明显增加伴有ICC明显减少和结构改变,CD14(为LPS受体,表达于免疫细胞膜表面)表达增多;逆转录一聚合酶链反应结果显示,IL-6和TNF- α 的mRNA的表达增加。巨噬细胞数量和活性的增加损伤ICC,使ICC数量减少、结构改变,最终导致肠动力异常^[23]。有研究表明^[16],炎症时光镜下ICC-AP的c-kit表达显著降低,肌层巨噬细胞的数量显著增加;电镜下可见ICC线粒体增大,密度降低,胞质变空。在炎症的慢性损伤过程中ICC有一定的再生能力。肌层内有一种巨噬细胞能渐脱颗粒,这与ICC有关,对ICC损伤后的修复起到一定作用。

3.3 细胞因子、免疫分子与ICC 一些细菌和内毒素可以激活巨噬细胞释放炎症因子IL-6、TNF- α 、NO等,其中的NO是一种新型免疫分子和炎症递质,有较强生物活性,可阻断线粒体功能和阻碍DNA合成,导致肠黏膜细胞损伤。NO还可降低一些抗氧化物质清除氧自由基的能力,导致肠黏膜通透性增加。感染后内毒素和细胞因子可刺激诱导型NOS(iNOS)催化生成NO,在IL-1及内皮素的诱导下,肠道巨噬细胞中iNOS合成并被激活,可产生大量NO,通过其靶细胞ICC来抑制平滑肌收缩,使得胃肠运动减慢。有研究表明UC患者合并细菌感染时,产生大量内毒素,使结肠固有肌层中存在的iNOS活性增强,可导致肠道反应性增高,从而加重胃肠道的炎症^[24]。

4 结论

ICC超微结构及功能的改变可能是众多胃肠动力障碍疾病的病理生理学基础^[25]。胃肠道炎症的免疫过程与ICC密切相关,在多种消化系炎症疾病中都发现存在ICC的异常变化,为解决炎症相关的胃肠运动障碍性疾病提供了新的研究思路和治疗方向。

5 参考文献

- Lammers WJ, Stephen B. Origin and propagation of individual slow waves along the intact feline small intestine. *Exp Physiol* 2008; 93: 334-346
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307: 731-734
- Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal

smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 112-117

- Sha L, Farrugia G, Harmsen WS, Szurszewski JH. Membrane potential gradient is carbon monoxide-dependent in mouse and human small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G438-G445
- Nakajima Y, Mochida S, Okawa K, Nakanishi S. Ca²⁺-dependent release of Munc18-1 from presynaptic mGluRs in short-term facilitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 18385-18389
- Iino S, Horiguchi K, Nojyo Y. W(sh)/W(sh) c-Kit mutant mice possess interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus layer of the small intestine. *Neurosci Lett* 2009; 459: 123-126
- Chen H, Ordög T, Chen J, Young DL, Bardsley MR, Redelman D, Ward SM, Sanders KM. Differential gene expression in functional classes of interstitial cells of Cajal in murine small intestine. *Physiol Genomics* 2007; 31: 492-509
- Takeuchi T, Fujinami K, Fujita A, Okishio Y, Takewaki T, Hata F. Essential role of the interstitial cells of Cajal in nitric oxide-mediated relaxation of longitudinal muscle of the mouse ileum. *J Pharmacol Sci* 2004; 95: 71-80
- Powley TL, Wang XY, Fox EA, Phillips RJ, Liu LW, Huizinga JD. Ultrastructural evidence for communication between intramuscular vagal mechanoreceptors and interstitial cells of Cajal in the rat fundus. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 69-79
- Won KJ, Suzuki T, Hori M, Ozaki H. Motility disorder in experimentally obstructed intestine: relationship between muscularis inflammation and disruption of the ICC network. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 53-61
- Matsuura T, Masumoto K, Ieiri S, Nakatsuji T, Akiyoshi J, Nishimoto Y, Takahashi Y, Hayashida M, Taguchi T. Morphological and physiological changes of interstitial cells of Cajal after small bowel transplantation in rats. *Transpl Int* 2007; 20: 616-624
- Wang XY, Vannucchi MG, Nieuwmeier F, Ye J, Faussone-Pellegrini MS, Huizinga JD. Changes in interstitial cells of Cajal at the deep muscular plexus are associated with loss of distention-induced burst-type muscle activity in mice infected by *Trichinella spiralis*. *Am J Pathol* 2005; 167: 437-453
- 王广勇, 李兆申, 高峻, 邹多武. Cajal间质细胞和肠神经元在急性坏死性胰腺炎豚鼠小肠组织中的改变. *胰腺病学* 2007; 7: 394-397
- 孙金山, 江逊, 仝海霞, 张薇, 兰莉, 王宝西. BALB/c小鼠溃疡性结肠炎远段结肠Cajal间质细胞超微结构变化. *实用儿科临床杂志* 2008; 23: 519-521
- 王臻楠, 戴彦成, 唐志鹏. 参青方对TNBS诱导的大鼠结肠炎模型结肠Cajal间质细胞的影响. *胃肠病学* 2008; 13: 670-674
- Wang XY, Zarate N, Soderholm JD, Bourgeois JM, Liu LW, Huizinga JD. Ultrastructural injury to interstitial cells of Cajal and communication with mast cells in Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 349-364
- Ye J, Zhu Y, Khan WI, Van Snick J, Huizinga JD. IL-9 enhances growth of ICC, maintains network structure and strengthens rhythmicity of contraction in culture. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 687-694
- Horváth VJ, Vittal H, Ordög T. Reduced insulin

- and IGF-I signaling, not hyperglycemia, underlies the diabetes-associated depletion of interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *Diabetes* 2005; 54: 1528-1533
- 19 Wouters MM, Gibbons SJ, Roeder JL, Distad M, Ou Y, Strega PR, Szurszewski JH, Farrugia G. Exogenous serotonin regulates proliferation of interstitial cells of Cajal in mouse jejunum through 5-HT_{2B} receptors. *Gastroenterology* 2007; 133: 897-906
 - 20 Kiyosue M, Fujisawa M, Kinoshita K, Hori M, Ozaki H. Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 1019-1030
 - 21 罗云, 林琳, 张红杰, 李学良, 吴高珏, 王美峰. 糖尿病慢传输运动结肠Cajal间质细胞和干细胞因子的变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 458-463
 - 22 Kinoshita K, Horiguchi K, Fujisawa M, Kobirumaki F, Yamato S, Hori M, Ozaki H. Possible involvement of muscularis resident macrophages in impairment of interstitial cells of Cajal and myenteric nerve systems in rat models of TNBS-induced colitis. *Histochem Cell Biol* 2007; 127: 41-53
 - 23 Suzuki T, Won KJ, Horiguchi K, Kinoshita K, Hori M, Torihashi S, Momotani E, Itoh K, Hirayama K, Ward SM, Sanders KM, Ozaki H. Muscularis inflammation and the loss of interstitial cells of Cajal in the endothelin ETB receptor null rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G638-G646
 - 24 刘建生, 田怡, 冯丽, 张晓红, 刘进, 袁耀宗. 溃疡性结肠炎与一氧化氮和氧自由基及Cajal间质细胞关系研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 785-786
 - 25 Ward SM, Sanders KM. Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2006; 576: 675-682

■同行评价

本文介绍了ICC的功能与分类,指出胃肠道运动是由平滑肌产生,而平滑肌的运动则是由ICC网及与其直接连系的肠神经系统构成的运动起搏系统所控制的,必将对胃肠运动生理与病理生理学的发展产生深刻的影响。

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 •

汤姆森-路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-12-28)

HBV preS2反义锁核酸在HepG2.2.15细胞内的抗病毒效果

张 梁, 邓益斌, 邓巧莹

■背景资料

近年来, 锁核酸(LNA)是新发现的一种在2'-O与4'-C发生缩水作用而形成带环状结构的核苷酸衍生物, 具有稳定性好、分子杂交能力强、抗核酸酶降解能力强、脂溶性好和低细胞毒性等特点, 因而具有广阔的研究与应用前景。

张梁, 邓益斌, 邓巧莹, 广西右江民族医学院附属医院医学检验中心 广西壮族自治区百色市 533000

作者贡献分布: 该实验由张梁与邓益斌设计; 实验过程由张梁、邓益斌及邓巧莹共同完成; 实验研究所需试剂及分析工具由邓益斌提供; 数据分析由张梁完成; 论文写作由张梁完成, 邓益斌审核。

通讯作者: 邓益斌, 533000, 广西壮族自治区百色市右江区中山二路18号, 广西右江民族医学院附属医院医学检验中心。

enbin0776@sina.com

电话: 0776-2840703

收稿日期: 2009-10-30 修回日期: 2009-12-03

接受日期: 2009-12-07 在线出版日期: 2009-12-28

Hepatitis B virus preS2 gene-specific locked nucleic acid antisense oligonucleotides significantly inhibit hepatitis B virus replication and expression in HepG2 2.2.15 cells

Liang Zhang, Yi-Bin Deng, Qiao-Ying Deng

Liang Zhang, Yi-Bin Deng, Qiao-Ying Deng, Center for Medical Laboratory Science, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Yi-Bin Deng, Center for Medical Laboratory Science, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, 18 Zhongshan Second Road, Youjiang District, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. enbin0776@sina.com

Received: 2009-10-30 Revised: 2009-12-03

Accepted: 2009-12-07 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of hepatitis B virus (HBV) preS2 gene-specific locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides on HBV replication and expression in HepG2 2.2.15 cells.

METHODS: Three LNA antisense oligonucleotides of different lengths that are complementary to the translation initiation region of the HBV preS2 gene were designed, synthesized and introduced into HepG2 2.2.15 cells by cationic liposome-mediated transfection. Hepatitis B surface antigen (HbsAg) and HBV DNA levels in cell supernatant were tested by time-resolved immunofluorescence assay (TRFIA) and fluo-

rescent quantitative-polymerase chain reaction (FQ-PCR). The inhibitory effects of different antisense oligonucleotides on HBV DNA replication and expression were compared. The cell toxicity of LNA antisense oligonucleotides was evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

RESULTS: On day 1 after transfection with LNA antisense oligonucleotides, the expression of HBsAg and the replication of HBV DNA were inhibited. On day 7, the reduced rates of HBsAg and HBV DNA levels were 45.79%, 52.92% and 67.21% as well as 35.15%, 40.69% and 52.16% in the non-modified antisense oligonucleotide group, all-phosphorothioate-modified antisense oligonucleotide group and LNA antisense oligonucleotide group, respectively. LNA antisense oligonucleotides showed the strongest inhibitory effects on viral activity and had no impact on cell metabolism. Compared with the control group, the reduced rates of HBsAg and HBV DNA levels achieved in each of the above groups were significantly higher (all $P < 0.01$). Moreover, the reduced rates of HBsAg and HBV DNA levels in the LNA antisense oligonucleotide group were significantly higher than those in other antisense oligonucleotide groups (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: LNA antisense oligonucleotides targeting the preS2 gene can effectively inhibit the replication and expression of HBV *in vitro*. The preS2 gene can be used as an effective target for gene therapy of HBV infection.

Key Words: Hepatitis B virus; Locked nucleic acid; Hepatitis B virus preS2 gene; HepG2 2.2.15 cells; Gene therapy

Zhang L, Deng YB, Deng QY. Hepatitis B virus preS2 gene-specific locked nucleic acid antisense oligonucleotides significantly inhibit hepatitis B virus replication and expression in HepG2 2.2.15 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3720-3724

摘要

目的: 探讨针对HBV preS2基因mRNA翻译起始区的反义锁核酸(LNA)片段在2.2.15细胞内

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

抗HBV复制和表达的作用。

方法: 分别合成三段互补于HBV preS2基因mRNA翻译起始区同一靶位的反义锁核酸、全硫代反义寡核苷酸、未修饰寡核苷酸及无关对照序列, 以阳离子脂质体作为载药体系, 作用于HepG22.2.15细胞, 采用时间分辨免疫荧光技术(TRFIA)和荧光定量聚合酶链技术(FQ-PCR)动态检测细胞上清液中HBsAg和HBV DNA的含量, 并比较其抑制HBV DNA复制与表达的作用; 以四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测LNA对细胞的毒性。

结果: 加入LNA后第1天, 即出现对HBsAg表达和HBV DNA复制的抑制作用, 第7天, 未修饰反义寡核苷酸组、全硫代修饰反义寡核苷酸组、反义锁核酸组对HBsAg表达的抑制率分别达45.79%、52.92%和67.21%; 对HBV DNA复制的抑制率分别达35.15%、40.69%和52.16%。其中LNA抑制病毒活性最强且对细胞代谢无影响。各组与对照组比较均有显著性差异(均 $P<0.01$), 且反义LNA组与其他ASODN组比较也有显著性差异(均 $P<0.05$)。

结论: 针对preS2基因的反义锁核酸体外能有效抑制HBV的复制与表达, 故preS2基因可作为乙型肝炎基因治疗的有效靶位。

关键词: 乙型肝炎病毒; 锁核酸; 前S2基因; 2.2.15细胞; 基因治疗

张梁, 邓益斌, 邓巧莹. HBV preS2反义锁核酸在HepG22.2.15细胞内的抗病毒效果. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3720-3724
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3720.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种严重危害人类健康的重要病原体, 其感染人体后可引起急、慢性乙型肝炎, 并与肝硬化、肝细胞癌密切相关, 已成为全球性健康问题^[1-5]。目前尚无特效药^[6-12]。因此, 探索专一性强、不良反应小的新型抗HBV药物具有重要意义。已经证实由preS1、preS2和S 3个基因所共同编码的蛋白质, 在HBV附着、侵入肝细胞的过程中发挥着重要作用, 他不仅参与HBV的复制、转录、装配和分泌过程, 还参与调节HBV引起的细胞及体液免疫应答反应, 故针对preS2基因设计合成反义寡聚脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN), 可能会抑制

preS2蛋白的合成, 从而影响HBV的复制与表达。但由于传统反义寡核苷酸的稳定性差, 分子杂交能力不强, 抗核酸酶降解能力弱等原因, 故一直未取得满意效果。锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是新近发现的一种带环状结构形似锁状或桥状的核苷酸衍生物, 具有稳定性好、分子杂交能力高、抗核酸酶降解能力强和低毒性等优势^[13-21], 而成为基因诊断和治疗研究领域的热点。我们前期研究结果表明, 针对S基因的反义锁核酸能有效抑制HBV的复制与表达^[22-24]。为了进一步探索针对HBV的有效治疗基因靶位, 我们在前期研究的基础上, 设计针对preS2基因的反义LNA, 以HepG22.2.15细胞为实验对象, 阳离子脂质体为载药体系, 通过检测细胞培养上清液中HBsAg及HBV DNA含量变化, 探讨其抑制效果。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG22.2.15细胞由中国人民解放军广州军区空军医院刘光泽博士惠赠, 该细胞株为HBV DNA全基因转染肝癌细胞系HepG2, 能稳定分泌HBsAg, 本室常规培养于含G418(380 IU/ml)、100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中, 37℃、50 mL/L CO₂条件下5-6 d传代1次; DMEM培养基、G418为Gibco产品; 胎牛血清购自杭州四季清公司; Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司; HBsAg定量检测试剂盒为苏州新波生物技术有限公司产品; HBV DNA定量检测试剂盒为深圳匹基生物有限公司产品; 时间分辨免疫荧光技术仪为苏州新波生物技术有限公司产品; 荧光定量PCR仪为美国ABI公司产品。

1.2 方法

1.2.1 反义LNA片段合成与修饰: 针对HBV (ayw亚型)preS2 mRNA翻译起始区同一位点(3201-3214 nt)分别设计合成以下几段14聚脱氧核苷酸: (1)未修饰反义寡核苷酸, 其序列为: 5'-tccactgcatggcc-3'; (2)全硫代反义寡核苷酸, 碱基序列同前, 全硫代修饰; (3)反义锁核酸, 碱基序列为: 5'-TccAcTgcATggCc-3', 其中, 6个大写字母代表LNA, 8个小写字母代表DNA; (4)无关对照序列, 即5'-ataagcattacat-3'。以上序列经BLAST排除与人同源后由美国Genelink公司合成修饰并纯化。

1.2.2 脂质体包裹反义LNA的制备: 脂质体与反义LNA按1:10比例充分混匀(1 μg反义LNA+10 μL脂质体), 室温下静置1 h后, 即形成稳定的脂

■研究前沿

反义核酸技术作为分子生物学的新型抗基因技术, 目前不仅广泛应用于生理学、病理学、药理学等学科的基础研究, 而且已成为药物发展的新兴策略。在反义核酸技术基础上发展起来的反基因技术, 即三螺旋构象寡核苷酸技术(TFO)是目前研究的热点。目前亟待解决的问题一是找到一种满意的肝靶向性核酸药物载体, 另外就是开发特异性抗HBV药物。

■创新盘点

本实验在前期研究基础上, 针对preS2基因设计合成反义LNA, 并将其应用于抗HBV感染的研究。

表 1 各组ASODN对HepG22.2.15细胞HBsAg表达的影响 ($n = 6$, mean \pm SD, $\mu\text{g/L}$)

分组	用药前	用药后			
		第1天	第3天	第5天	第7天
空白对照	106.97 \pm 8.02	107.23 \pm 7.31	107.45 \pm 7.83	106.15 \pm 7.58	108.72 \pm 7.94
无关序列对照	106.32 \pm 7.22	108.15 \pm 7.52	107.38 \pm 6.91	107.47 \pm 7.16	108.10 \pm 7.03
未修饰ASODN	107.30 \pm 7.11 ^b	96.81 \pm 6.76 ^b	75.92 \pm 5.83 ^b	69.12 \pm 6.10 ^b	58.17 \pm 6.98 ^b
全硫代修饰ASODN	106.91 \pm 7.53 ^b	86.42 \pm 6.94 ^b	73.42 \pm 6.22 ^b	61.83 \pm 6.85 ^b	50.33 \pm 6.58 ^b
反义LNA	107.40 \pm 7.07 ^{bc}	78.19 \pm 6.48 ^{bc}	61.53 \pm 6.18 ^{bc}	42.95 \pm 6.05 ^{bc}	35.22 \pm 5.97 ^{bc}

^b $P < 0.01$ vs 同时点对照组; ^c $P < 0.05$ vs ASODN组。

质体-LNA混合物。

1.2.3 HepG22.2.15细胞培养与转染: 将HepG22.2.15细胞按 $1 \times 10^8/\text{L}$ 接种于96孔培养板, 每孔100 μL , 设定5个组(即未修饰ASODN组、全硫代ASODN组、反义LNA组、无关对照序列和不加药的空白对照组), 每组各设6个复孔, 待细胞贴壁后吸取培养上清液(-20°C 保存), 分别在各组每孔中一次性加入含LNA量为10 $\mu\text{mol/L}$ 的LNA-Lipo-DMEM混合液1 mL, 分别于1、3、5、7 d收集各孔培养上清液保存于 -20°C 待测。

1.2.4 培养上清液HBsAg含量测定: 采用时间分辨免疫荧光技术(TRFIA), 每个样品重复3次, 取均值, 严格按说明书操作。

1.2.5 培养上清液HBV DNA含量测定: 采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)法检测。取培养上清液50 μL , 加等量体积DNA提取液, 充分混匀, 100°C 恒温处理10 min, 1200 r/min离心5 min, 取2 μL 上清于PCR反应管中并加入反应液, 总体积共25 μL , 各反应管放入荧光定量PCR仪, 扩增条件: 37°C 保温2 min, 94°C 预变性3 min, 94°C 5 s, 60°C 40 s, 共35个循环。由计算机软件自动分析所收集的荧光信号并计算出定量结果, 采用计算对数平均值的方法计算HBV DNA平均拷贝数。

1.2.6 LNA对细胞的毒性检测: 采用MTT比色法检测LNA对细胞代谢活性的影响。

统计学处理 所有数用mean \pm SD表示, 应用SPSS13.0统计软件处理, 组间比较采用Two-way ANOVA方差分析的LSD检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。抑制率(%) = (用药前N-用药后N)/用药前N \times 100%。

2 结果

2.1 LNA对HepG22.2.15细胞HBsAg表达的影响 加入LNA后第1天, 即出现对HBsAg表达的抑制

作用, 第3、5和7天时, 各组对HBsAg的抑制率分别为: 未修饰ASODN组29.25%、35.58%和45.79%; 全硫代修饰ASODN组31.32%、42.17%和52.92%; 反义LNA组42.71%、60.01%和67.21%。各组与对照组比较均有显著性差异(均 $P < 0.01$), 且反义LNA组与其他ASODN组比较也有显著性差异(均 $P < 0.05$, 表1)。

2.2 LNA对HepG22.2.15细胞HBV DNA复制的影响 加入LNA后第3天, 即出现对HBV DNA复制的抑制作用, 第5、7天时, 各组对HBV DNA的抑制率分别为: 未修饰ASODN组28.26%、35.15%; 全硫代修饰ASODN组32.67%、40.69%; 反义LNA组47.47%、52.16%。各组与对照组比较均有显著性差异(均 $P < 0.01$), 且反义LNA组与其他ASODN组比较也有显著性差异(均 $P < 0.05$, 表2)。

2.3 LNA-Lipo混合物对HepG22.2.15细胞活性的影响 用药7 d后, 采用MTT比色法测定各组A值, 无关序列、未修饰ASODN、全硫代修饰ASODN和反义LNA组的A值分别为 1.18 ± 0.05 、 1.16 ± 0.04 、 1.15 ± 0.04 和 1.14 ± 0.04 , 与空白对照组(A值为 1.23 ± 0.04)比较均无差异性, 表明LNA对细胞基本无毒性。

3 讨论

HBV DNA至少有4个开放读码框^[25-26]: S、C、P、X, 其中, S区是HBV DNA的一个重要开放读码框, 包括preS1、preS2和S 3个基因, 共同编码由389个氨基酸残基组成的一种蛋白质, 是S区编码产物中分子量最大的一种, 称为大蛋白。大蛋白是HBsAg的主要组成部分, 不仅参与HBV颗粒的装配与成熟, 还与HBV在肝细胞间的弥漫性感染密切相关。

本研究针对preS2基因设计合成反义LNA, 由阳离子脂质体介导, 以HepG22.2.15细胞为研究对象, 通过检测细胞培养上清液中的HBsAg

表 2 各组ASODN对HepG2.2.15细胞HBV DNA复制的影响 ($n = 6$, mean \pm SD, 拷贝数log10数值)

分组	用药前	用药后			
		第1天	第3天	第5天	第7天
空白对照	5.49 \pm 0.17	5.39 \pm 0.16	5.40 \pm 0.17	5.48 \pm 0.19	5.55 \pm 0.16
无关序列对照	5.47 \pm 0.17	5.38 \pm 0.14	5.42 \pm 0.13	5.61 \pm 0.17	5.58 \pm 0.18
未修饰ASODN	5.52 \pm 0.15 ^b	4.90 \pm 0.17 ^b	4.39 \pm 0.15 ^b	3.96 \pm 0.17 ^b	3.58 \pm 0.14 ^b
全硫代修饰ASODN	5.48 \pm 0.19 ^b	4.81 \pm 0.16 ^b	4.10 \pm 0.15 ^b	3.69 \pm 0.18 ^b	3.25 \pm 0.15 ^b
反义LNA	5.54 \pm 0.15 ^{bc}	4.50 \pm 0.18 ^{bc}	3.42 \pm 0.13 ^{bc}	2.91 \pm 0.19 ^{bc}	2.65 \pm 0.14 ^{bc}

^b $P < 0.01$ vs 同时时间点对照组; ^c $P < 0.05$ vs ASODN组.

和HBV DNA水平来判断他的疗效. 结果显示, 针对preS2基因的反义LNA, 体外能有效抑制HBsAg的表达, 其抑制率最高可达67.21%, 且随作用时间延长呈增高趋势, 这将为反义LNA用于抗HBV的基因治疗研究提供了参考价值. 但其抑制率是否持续性增高, 还有待于进一步的研究. 研究结果还表明, 反义LNA对HBV DNA的复制也有抑制作用, 抑制率最高为52.16%, 原因可能是LNA的高亲和力、强抗核酸酶降解能力和良好的脂溶性, 促使部分LNA通过核孔进入细胞核内, 结合到与基因组cccDNA的编码链上, 形成三链杂交分子, 从复制和转录水平发挥抗病毒效果, 其作用机制还有待于进一步的研究. 由于HBV DNA聚合酶缺乏校对作用, 在复制过程中易产生变异株而导致对药物治疗敏感降低或耐药现象, 因此, 尚需要研究多基因位点的抗HBV药物或疗法^[27].

此外, 通过MTT比色、细胞计数、活细胞比率、细胞形态观察, 证实LNA对细胞的代谢活性无明显毒性作用.

总之, 针对preS2基因的反义LNA体外能有效抑制HBV的复制与表达, 故preS2基因可作为乙型肝炎基因治疗的有效靶位.

4 参考文献

- 1 Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S64-S69
- 2 Fleming J. Current treatments for hepatitis. *J Infus Nurs* 2002; 25: 379-382
- 3 elSaadany S, Tepper M, Mao Y, Semenciw R, Giulivi A. An epidemiologic study of hepatocellular carcinoma in Canada. *Can J Public Health* 2002; 93: 443-446
- 4 Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36: 1206-1213
- 5 Kannangai R, Molmenti E, Arrazola L, Klein A, Choti M, Thomas DL, Torbenson M. Occult

hepatitis B viral DNA in liver carcinomas from a region with a low prevalence of chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 297-301

- 6 Hino O, Kajino K, Umeda T, Arakawa Y. Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002; 37: 883-887
- 7 Buti M, Esteban R. Drugs in development for hepatitis B. *Drugs* 2005; 65: 1451-1460
- 8 Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002; 36: 1425-1430
- 9 Manns MP. Current state of interferon therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2002; 22 Suppl 1: 7-13
- 10 Liaw YF. Therapy of chronic hepatitis B: current challenges and opportunities. *J Viral Hepat* 2002; 9: 393-399
- 11 Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, de Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine, lamivudine-famciclovir or lamivudine-ganciclovir. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 1007-1011
- 12 Song JW, Zhang G, Lin JG, Tang WX, Lin JS. [Clinical study of lamivudine and interferon combinate administration to inhibit hepatitis B virus replication] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004; 12: 593-596
- 13 Inohara H, Obika S, Imanishi T. 2',4'-BNA derivatives bearing an unnatural nucleobase: synthesis and application to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004; 63-64
- 14 Rapozzi V, Cogoi S, Xodo LE. Antisense locked nucleic acids efficiently suppress BCR/ABL and induce cell growth decline and apoptosis in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1683-1692
- 15 Swayze EE, Siwkowski AM, Wanczewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, Monia BP, Bennett CF. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 687-700
- 16 Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Ørum H, Koch T, Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 439-447
- 17 Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Noerholm M,

■应用要点

本研究表明, 针对preS2基因的反义锁核酸体外能有效抑制HBV的复制与表达, preS2基因可作为乙型肝炎基因治疗的有效靶位, 为今后反义核酸药物研发提供了理论与实验参考.

■同行评价

本文对HBV preS2反义锁核酸在HepG2.2.15细胞内的抗病毒效果进行了研究,方法先进,结果对乙型肝炎的基因治疗提供理论依据,有一定临床参考价值。

- Kulozik AE, Hentze MW, Muckenthaler MU. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 2006; 12: 913-920
- 18 Vester B, Hansen LH, Lundberg LB, Babu BR, Sørensen MD, Wengel J, Douthwaite S. Locked nucleoside analogues expand the potential of DNazymes to cleave structured RNA targets. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 19
- 19 Wengel J, Petersen M, Frieden M, Koch T. Chemistry of locked nucleic acids (LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties. *Lett Pept Sci* 2003; 10: 237-253
- 20 Braasch DA, Liu Y, Corey DR. Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 5160-5167
- 21 Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001; 8: 1-7
- 22 唐盈, 王燕菲. 针对HBVS基因的反义锁核酸抗乙肝病毒表达的初探. *江西医药* 2006; 41: 205-208
- 23 邓益斌, 王燕菲. 阳离子脂质体介导双靶区反义锁核酸抗病毒疗效研究. *国际流行病学传染病学杂志* 2008; 35: 149-153
- 24 邓益斌, 农乐根, 王燕菲. HBV S基因的反义锁核酸对乙型肝炎转基因小鼠HBV复制和表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2338-2345
- 25 Funk A, Mhamdi M, Will H, Sirma H. Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 91-103
- 26 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol* 2001; 75: 3851-3858
- 27 张政, 席宏丽, 公维波, 李文刚, 于敏, 曾争, 徐小元. 逆转录病毒介导双靶区反义RNA在转基因小鼠肝细胞中的表达及对HBV DNA复制的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2551-2555

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》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,用与正文同角的数字并排,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 2009-12-28)

硫化氢对MDA及GSH在大鼠肝星状细胞氧应激中表达的影响

阳丹才让, 邓勇, 任利, 王聪, 樊海宁

阳丹才让, 邓勇, 任利, 王聪, 樊海宁, 青海大学附属医院肝胆胰外科 青海省西宁市 810001

国家自然科学基金资助项目, No. 30960374

作者贡献分布: 此课题由阳丹才让、邓勇及樊海宁设计; 研究过程由阳丹才让、王聪及任利操作完成; 研究获取研究经费、所用试剂及分析工具由樊海宁提供; 数据分析和论文写作由阳丹才让完成。

通讯作者: 樊海宁, 副教授, 硕士生导师, 810001, 青海省西宁市城西区同仁路29号, 青海大学附属医院肝胆胰外科。

fanhaining@medmail.com.cn

收稿日期: 2009-01-07 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Effects of hydrogen sulfide on the expression of glutathione and malondialdehyde in culture supernatant of rat hepatic stellate cells during oxidative stress

Cai-Rang Yangdan, Yong Deng, Li Ren, Cong Wang, Hai-Ning Fan

Cai-Rang Yangdan, Yong Deng, Li Ren, Cong Wang, Hai-Ning Fan, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, the Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 30960374

Correspondence to: Professor Hai-Ning Fan, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, the Affiliated Hospital of Qinghai University, 29 Tongren Road, Chengxi District, Xining 810001, Qinghai Province, China. fanhaining@medmail.com.cn

Received: 2009-01-07 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of hydrogen sulfide (H_2S) on the contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in culture supernatant of rat hepatic stellate cell (HSC) during oxidative stress.

METHODS: HSC-T6 cells were divided into four groups: normal control group (untreated cells), ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) treatment group (treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ of Fe-NTA), sodium hydrosulphide (NaHS) treatment group (treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ of Fe-NTA and NaHS

at a concentration of 20, 100 or 200 $\mu\text{mol/L}$), and glibenclamide (GLBN) treatment group (treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ of Fe-NTA and GLBN at a concentration of 20, 200 or 700 $\mu\text{mol/L}$). The contents of MDA and GSH in culture supernatant of HSC-T6 cells were detected using the MDA kit and GSH kit, respectively.

RESULTS: After HSC-T6 cells were incubated with Fe-NTA for 24 h, the content of MDA in culture supernatant increased significantly ($P < 0.05$), while the content of GSH in culture supernatant was reduced significantly in cells incubated with Fe-NTA (both $P < 0.05$). Compared with Fe-NTA-treated cells, the contents of MDA in culture supernatant of cells treated with both Fe-NTA and NaHS for 24 h were reduced significantly (100 $\mu\text{mol/L}$: 4.48 ± 0.07 nmol/mg prot vs 5.05 ± 0.07 nmol/mg prot; 200 $\mu\text{mol/L}$: 3.58 ± 0.02 nmol/mg prot vs 5.05 ± 0.07 nmol/mg prot; both $P < 0.05$), and the contents of GSH in supernatant of cells treated with both Fe-NTA and NaHS for 12 and 24 h increased significantly (100 $\mu\text{mol/L}$: 35.57 ± 2.02 mg/g prot vs 33.64 ± 2.95 mg/g prot; 36.49 ± 2.08 mg/g prot vs 31.06 ± 3.08 mg/g prot; 200 $\mu\text{mol/L}$: 36.92 ± 2.30 mg/g prot vs 33.64 ± 2.95 mg/g prot; 37.59 ± 2.03 mg/g prot vs 31.06 ± 3.08 mg/g prot; all $P < 0.05$). In contrast, GLBN treatment induced opposite effects on the contents of MDA and GSH in Fe-NTA-treated cells when compared with NaHS (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: H_2S may be an antioxidant that can exert protective effects on the liver by inhibiting the development and progression of hepatic fibrosis.

Key Words: Hepatic stellate cell; Hydrogen sulfide; Sodium hydrosulfide; Glutathione

Yangdan CR, Deng Y, Ren L, Wang C, Fan HN. Effects of hydrogen sulfide on the expression of glutathione and malondialdehyde in culture supernatant of rat hepatic stellate cells during oxidative stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3725-3728

摘要

目的: 探讨硫化氢对MDA与GSH在大鼠肝星

■背景资料

肝纤维化是继发于各种慢性肝损伤之后组织修复过程中的代偿反应, 是慢性肝病发展为肝硬化必经的病理过程, 肝纤维化的中心环节-肝星状细胞(HSC)活化一直是慢性肝病的研究热点之一。因此抑制他的活化以及降低活化后减轻对机体的损伤也是肝纤维化治疗中的重点。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■创新盘点

本研究通过铁超载的方法复制出肝纤维化模型,给予升高和降低H₂S两种处理方式,并通过测定上清液中MDA与GSH含量来探讨H₂S对HSC的影响。

状细胞氧应激中表达的影响。

方法: 将HSC-T6分为8组:空白组(B组, HSC-T6)、对照组(C组, B组+500 μmol/L Fe-NTA)、NaHS组(N1: C组+20 μmol/L NaHS; N2: C组+100 μmol/L NaHS; N3: C组+200 μmol/L NaHS)、格列苯脲组(G1: C组+20 μmol/L GLBN; G2: C组+200 μmol/L GLBN; G3: C组+700 μmol/L GLBN)。用MDA试剂盒测试血清MDA含量;用GSH试剂盒测定上清中GSH含量。

结果: 24 h后MDA含量对照组和空白组有明显差异($P<0.05$),而GSH含量12与24 h均有明显差异(均 $P<0.05$)。给予NaHS后,MDA含量24 h N2和N3组与对照组均有明显差异(4.48 ± 0.07 nmol/mg prot, 3.58 ± 0.02 nmol/mg prot vs 5.05 ± 0.07 nmol/mg prot, 均 $P<0.05$),12与24 h GSH含量N2和N3组与对照组有明显差异(35.57 ± 2.02 mg/g prot, 36.92 ± 2.30 mg/g prot vs 33.64 ± 2.95 mg/g prot; 36.49 ± 2.08 mg/g prot, 37.59 ± 2.03 mg/g prot vs 31.06 ± 3.08 mg/g prot, 均 $P<0.05$)。给予GLBN处理后,各项指标结果与给予NaHS处理后结果相对应,各组与相对应组比较均有明显差异(均 $P<0.05$)。

结论: 氧应激下硫化氢对HSC细胞具有保护作用,可抑制肝纤维化的发生发展。

关键词: 肝星状细胞; 硫化氢; 硫氢化钠; 谷胱甘肽

阳丹才让, 邓勇, 任利, 王聪, 樊海宁. 硫化氢对MDA及GSH在大鼠肝星状细胞氧应激中表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3725-3728
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3725.asp>

0 引言

肝纤维化源于肝脏纤维组织过度沉积,是肝脏纤维组织增生和分解失衡的结果。肝纤维化的机制非常复杂。肝细胞的炎症、坏死、免疫反应、肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化,脂质过氧化物的大量外溢, TGF- β , PDGF等多种细胞因子,均参与了这一过程^[1-2]。HSC的增生激活是肝纤维化发生的中心环节^[3],各种致纤维化因素最终都会以HSC为靶标,通过激活HSC使细胞外基质大量形成并沉积导致肝纤维化的发生^[4]。

氧应激尤其是脂质过氧化产物例如丙二醛(MDA)等在HSC激活早期具有重要意义^[5],MDA可促进I型胶原mRNA的表达,提示氧应激与肝

纤维化之间存在可能的联系^[6-7],氧化应激和脂质过氧化与肝纤维化形成的关系密切,氧化和抗氧化损伤的失衡可以促进HSC的增殖,导致胶原合成增加。MDA是脂质过氧化的重要中间产物,能够反应氧化损伤程度,MDA的累积可以通过多种途径激活HSC。还原型谷胱甘肽(GSH)是一种广泛存在于正常细胞中的生理性活性物质,含有巯基,可通过巯基与体内的自由基相结合,是体内最重要的抗氧化物之一^[8]。

为了研究硫化氢(H₂S)在肝纤维化发生中的地位和作用^[9],我们运用铁超载的方法激活HSC^[10-11],在细胞水平复制氧应激肝纤维化模型,给予外源性H₂S供体NaHS和H₂S作用的K_{ATP}阻滞药物格列苯脲,通过测定上清中MDA与GSH含量,探讨H₂S对HSC的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)购自湖南湘雅细胞基因库;胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品;DMEM(高糖)为美国Gibco产品;MDA试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;次氨基乙酸二钠(Na₂NAC)、二甲基亚砜(DMSO)均购自美国Sigma公司;GSH试剂盒购自碧云天生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 体外细胞培养: 肝星状细胞株(HSC-T6),用含15%灭活的胎牛血清、100 mg/L青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM培养液,培养置于37℃、50 mL/L CO₂培养箱内培养,每2-3 d传代1次;取对数生长期的HSC,2.5 g/L胰酶消化后,用含150 mL/L胎牛血清的DMEM配成细胞悬液,接种于96孔或24孔培养板,密度为 5×10^7 /L,每一组设3个复孔,每孔加入DMEM培养液100 μL,至于37℃,50 mL/L CO₂培养箱中培养过夜。24 h后细胞贴壁良好,换用2 mL/L胎牛血清的DMEM培养,使其生长同步化,再培养24 h后加入Fe-NTA产生氧应激。

1.2.2 实验分组: 将HSC-T6分为8组:空白组(B组, HSC-T6);对照组(C组, B组+500 μmol/L Fe-NTA);NaHS组(N1: C组+20 μmol/L NaHS; N2: C组+100 μmol/L NaHS; N3: C组+200 μmol/L NaHS);格列苯脲组(G1: C组+20 μmol/L GLBN; G2: C组+200 μmol/L GLBN; G3: C组+700 μmol/L GLBN)。

1.2.3 测定MDA及GSH含量: 设置6, 12, 24 h 3个时间点,用MDA试剂盒测试上清液MDA含量,

表 1 上清液中MDA含量 (nmol/mg prot, $n = 3$, mean \pm SD)

分组	6 h	12 h	24 h
空白组	1.96 \pm 0.11	2.25 \pm 0.13	2.36 \pm 0.08
对照组	2.14 \pm 0.05	2.78 \pm 0.04	5.05 \pm 0.07 ^a
N1	2.12 \pm 0.01	2.74 \pm 0.03	4.85 \pm 0.16
N2	2.09 \pm 0.03	2.61 \pm 0.03	4.48 \pm 0.07 ^c
N3	2.04 \pm 0.08	2.53 \pm 0.21	3.58 \pm 0.02 ^c
G1	2.39 \pm 0.28 ^e	3.09 \pm 0.11 ^e	5.24 \pm 0.29 ^e
G2	2.55 \pm 0.12 ^{ce}	3.39 \pm 0.07 ^e	5.45 \pm 0.07 ^{ce}
G3	2.69 \pm 0.07 ^{ce}	4.93 \pm 1.45 ^{ce}	6.01 \pm 0.15 ^{ce}

^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组; ^e $P < 0.05$ vs NaHS对应各组。

表 2 上清液中GSH含量 (mg/g prot, $n = 3$, mean \pm SD)

分组	6 h	12 h	24 h
空白组	34.95 \pm 2.60	37.76 \pm 3.81	39.21 \pm 2.07
对照组	34.73 \pm 2.56	33.64 \pm 2.95 ^a	31.06 \pm 3.08 ^a
N1	34.20 \pm 2.45	34.66 \pm 1.97	34.85 \pm 2.16
N2	34.23 \pm 2.36	35.57 \pm 2.02 ^c	36.49 \pm 2.08 ^c
N3	34.22 \pm 1.98	36.92 \pm 2.30 ^c	37.59 \pm 2.03 ^c
G1	32.38 \pm 0.29 ^{ce}	31.31 \pm 2.87 ^e	30.75 \pm 2.28 ^e
G2	32.56 \pm 0.13 ^{ce}	29.10 \pm 3.10 ^e	25.46 \pm 2.08 ^{ce}
G3	32.68 \pm 0.08 ^{ce}	27.10 \pm 3.20 ^{ce}	26.03 \pm 2.16 ^{ce}

^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组; ^e $P < 0.05$ vs NaHS对应各组。

应用要点

本研究提示, H₂S能够在一定范围内减少氧化损伤, 提高抗氧化能力, 对肝纤维化具有一定的保护作用, 也为GSH在临床上用于脂肪肝和肝纤维化的治疗提供了理论和实验依据, 为继续研究其抗纤维化作用打下了理论基础。

GSH试剂盒检测上清中GSH含量。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示, 用SPSS11.5软件进行统计分析。组间差异用单因素方差分析(One-way ANOVA), 有显著差异者用Student-Newman-Keuls q 检验进行两两比较。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 上清液中MDA含量 给予Fe-NTA后, 6 h和12 h, 对照组和空白组差异不明显, 24 h后对照组和空白组有明显差异($P < 0.05$)。给予NaHS后6 h和12 h处理组与对照组均无明显差异, 24 h N2和N3组与对照组均有明显差异(均 $P < 0.05$)。给予GLBN治疗后6 h和24 h的G2, G3组, 12 h的G3组与对照组均有明显差异(均 $P < 0.05$)。各处理组随着时间的延长除G1组在6 h, 12 h差异不明显外, 其余各时间组均有差异(均 $P < 0.05$, 表1)。

2.2 上清液中GSH含量 给予Fe-NTA后, 6 h对照组和空白组差异不明显, 12 h与24 h对照组和空白组有明显差异(均 $P < 0.05$)。给予NaHS后6 h处理组与对照组无明显差异, 12 h与24 h的N2和N3组与对照组均有明显差异(均 $P < 0.05$)。给予GLBN治疗后6 h和24 h的G2, G3组, 12 h的G3组与对照组均有明显差异(均 $P < 0.05$)。各处理组随着时间的延长除N1与G1组差异不明显外, 其余各时间组均有差异(均 $P < 0.05$, 表2)。

3 讨论

HSC的活化是肝纤维化发生的中心环节^[12], 无论是那一种病因引起的肝纤维化最终都会激活HSC, 通过效应的自我放大导致肝纤维化的发生发展。因此抑制他的活化以及降低活化后减轻对机体的损伤也是肝纤维化治疗中的重点。

铁沉积既可以直接激活HSC, 又可以通过脂质过氧化反应导致HSC的间接激活。刘梅 *et al* 应用不同浓度的次氨基三乙酸铁(Fe-NTA)培养大鼠HSC证实铁剂可以引起鼠HSC的增殖, 导致氧化抗氧化失衡^[6]。本实验通过给予Fe-NTA处理HSC-T6也发现了类似的现象, 提示运用铁超载来促进HSC增殖是一种可靠的肝纤维化造模方法。

氧化应激与肝纤维化形成关系密切, 各种因素造成的肝损伤产生了大量的脂质过氧化物, 超出了机体的清除能力, 使其发生脂质过氧化, MDA水平提高, MDA是脂质过氧化的重要终产物之一, 反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度, 铁超载可产生大量的自由基和脂质过氧化物, 导致机体抗氧化损伤的防御机制受损, 不能清除过多的自由基和MDA等脂质过氧化物^[10]。而HSC内MDA累积, 通过不同途径激活HSC, 促进其增殖和合成胶原, 导致肝纤维化的发生, 于洪波 *et al*用高脂饮食喂饲大鼠也得出了类似结果^[13]。GSH含有巯基, 是体内重要的抗氧化物之一, 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的一种三肽。他在酶的催化下能与过氧化物和自由基相结合, 对抗氧化物的破坏作用^[14]。

动物实验证实H₂S能够缓解门脉高压的形成^[15-16], 对肝硬化大鼠具有一定的保护作用。本研究通过铁超载的方法复制出肝纤维化模型, 给予升高和降低H₂S两种处理方式, 结果提示H₂S能够在一定范围内减少氧化损伤, 提高抗氧化能力, 对肝纤维化具有一定的保护作用, 也为GSH在临床上用于脂肪肝和肝纤维化的治疗提供了理论和实验依据, 为继续研究其抗纤维化作用打下了理论基础。

4 参考文献

- 1 Liu SQ, Yu JP, He L, Yu HG, Luo HS. [Effects of

■同行评价

本文对硫化氢对MDA及GSH在大鼠肝星状细胞氧应激中表达的影响进行了研究,内容新颖,结论有一定参考意义。

- nuclear factor kappaB and transforming growth factor beta1 in the anti-liver fibrosis process using Ginkgo biloba extract] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 903-907
- 2 Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol* 2007; 6: 1
- 3 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
- 4 Senoo H, Kojima N, Sato M. Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam Horm* 2007; 75: 131-159
- 5 Thiele GM, Freeman TL, Klassen LW. Immunologic mechanisms of alcoholic liver injury. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 273-287
- 6 刘梅, 陆伦根, 陈尉华, 窦爱霞, 房静远, 曾明德, 郑瑞丹. 氧应激对大鼠肝星状细胞增殖的影响及还原型谷胱甘肽的抗氧化作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2596-2600
- 7 Varela-Rey M, Fontán-Gabás L, Blanco P, López-Zabalza MJ, Iriburu MJ. Glutathione depletion is involved in the inhibition of procollagen alpha1(I) mRNA levels caused by TNF-alpha on hepatic stellate cells. *Cytokine* 2007; 37: 212-217
- 8 Zheng S, Yumei F, Chen A. De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 444-453
- 9 陈晓波, 杜军保, 耿彬, 蒋宏峰, 唐朝枢. 感染性和内毒素性休克大鼠动脉组织中硫化氢的变化. *基础医学与临床* 2003; 23: 384-387
- 10 MacDonald RJ, Swift GH, Quinto C, Swain W, Pictet RL, Nikovits W, Rutter WJ. Primary structure of two distinct rat pancreatic preproelastases determined by sequence analysis of the complete cloned messenger ribonucleic acid sequences. *Biochemistry* 1982; 21: 1453-1463
- 11 Liu EH, Chen MF, Yeh TS, Ho YP, Wu RC, Chen TC, Jan YY, Pan TL. A useful model to audit liver resolution from cirrhosis in rats using functional proteomics. *J Surg Res* 2007; 138: 214-223
- 12 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-d826
- 13 于洪波, 戴林, 彭海英, 牟新春, 左中. 复方中药对大鼠高脂饮食所致脂肪性肝炎肝组织氧化和抗氧化系统的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2842-2847
- 14 Cubero FJ, Nieto N. Ethanol and arachidonic acid synergize to activate Kupffer cells and modulate the fibrogenic response via tumor necrosis factor alpha, reduced glutathione, and transforming growth factor beta-dependent mechanisms. *Hepatology* 2008; 48: 2027-2039
- 15 Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, Rizzo G, Distrutti E, Shah V, Morelli A. The third gas: H2S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 42: 539-548
- 16 黄新莉, 周晓红, 韦鹏, 张晓静, 孟祥艳, 姜晓辉. 内源性硫化氢在脂多糖引起的肺动脉高压中的作用. *生理学报* 2007; 59: 357-362

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》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (科学编辑: 李军亮 2009-12-28)

特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中的表达、纯化及生物学活性鉴定

别彩群, 杨冬华, 汤绍辉, 丁世华

别彩群, 广州医学院附属深圳沙井医院消化科 广东省深圳市 518104

杨冬华, 汤绍辉, 暨南大学附属第一医院消化科 广东省广州市 510630

丁世华, 深圳市第二人民医院消化科 广东省深圳市 518000
广东省科技计划基金资助项目, No. 2006B19901014

作者贡献分布: 别彩群、杨冬华、汤绍辉及丁世华对此文所作贡献均等; 此课题由杨冬华与汤绍辉设计; 研究过程由别彩群与丁世华操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由杨冬华提供; 数据分析由别彩群与汤绍辉完成; 本论文写作由别彩群、杨冬华、汤绍辉及丁世华共同完成。

通讯作者: 别彩群, 主治医师, 518104, 广东省深圳市, 广州医学院附属深圳沙井医院消化科. looshy@yahoo.cn
电话: 0755-27722241-3819

收稿日期: 2009-10-15 修回日期: 2009-11-16

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Expression, purification and biological activity assay of humanized single-chain Fv dimers against hepatocellular carcinoma in *Pichia pastoris*

Cai-Qun Bie, Dong-Hua Yang, Shao-Hui Tang, Shi-Hua Ding

Cai-Qun Bie, Department of Gastroenterology, Shenzhen Shajing Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Shenzhen 518104, Guangdong Province, China

Dong-Hua Yang, Shao-Hui Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Shi-Hua Ding, Department of Gastroenterology, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Guangdong Province, No. 2006B19901014

Correspondence to: Cai-Qun Bie, Department of Gastroenterology, Shenzhen Shajing Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Shenzhen 518104, Guangdong Province, China. looshy@yahoo.cn

Received: 2009-10-15 Revised: 2009-11-16

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To express the humanized single-chain Fv dimers against hepatocellular carcinoma (BDM diabody) in *Pichia pastoris* and assay their biological activity and function.

METHODS: The yeast expression plasmid pGAPZαA-BDM was constructed and trans-

formed into *Escherichia coli* (*E.coli*) strain DH5α. The recombinant vector plasmid was then amplified, sequenced and transformed into *Pichia pastoris* strain GS115 to express BDM diabody in yeast. The expression product was identified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Western blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry.

RESULTS: SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the BDM diabody was successfully expressed in *Pichia pastoris*. The yield of BDM was 30 mg/L, approximately 300 times as high as that in *E.coli*. The expression product showed significantly stronger binding to hepatocellular carcinoma cells than single-chain variable fragment (scFv) antibody. The purified diabody could specially bind to tumor antigens of hepatocellular carcinoma.

CONCLUSION: Biologically active humanized diabody against hepatocellular carcinoma is successfully prepared and can be used for targeted diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma.

Key Words: Diabody against hepatocellular carcinoma; *Pichia pastoris*; Binding activity; Specificity

Bie CQ, Yang DH, Tang SH, Ding SH. Expression, purification and biological activity assay of humanized single-chain Fv dimers against hepatocellular carcinoma in *Pichia pastoris*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3729-3733

摘要

目的: 实现特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中高效表达、纯化并鉴定其生物学活性。

方法: 构建酵母表达载体pGAPZαA-BDM, 转化感受态大肠杆菌DH5α, 选择测序正确的阳性克隆进行扩增后, 电转化酵母细胞, 表达抗体二聚体, 对表达抗体进行纯化、浓度检测, 并鉴定其对肝癌细胞的结合活性, 免疫组织化学检测二聚体对肝癌组织抗原的特异性。

■背景资料

肝癌是全球第5常见的癌症, 占有癌症的5.6%, 全球每年的新病例约为564 000例。他亦是我国癌症中的第二号杀手, 全球50%以上的肝癌发生在我国。但仅10%-30%肝癌患者能接受根治性切除手术, 整体预后差, 肝癌传统治疗手段包括手术治疗、肿瘤局部治疗、放化疗, 可是疗效并不理想, 因此, 探索更有效的诊断和治疗方法是目前肝癌研究亟待解决的问题之一。

■同行评议者

高英堂, 研究员, 天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

■研发前沿

抗体技术的发展主要经历了3个阶段,多克隆抗体、单克隆抗体、基因工程抗体。目前在临床诊断和治疗中,基因工程抗体的应用广泛,如何制备亲和力高、稳定性好、具有很好生物活性且产量高的基因工程抗体一直是抗体研究领域需要解决的关键问题。

结果:测序显示成功构建酵母表达载体pGAPZ α A-BDM,表达96 h抗体收获量最大,二聚体表达量为30 mg/L菌液,为大肠杆菌的300倍。抗肝癌单链抗体二聚体BDM与三种肝癌细胞结合,而与正常肝细胞不结合,结合效价为1:128。免疫组织化学显示二聚体与肝癌组织结合的阳性率比肝硬化、胃癌、正常肝组织高,差异有统计学意义。

结论:成功制备了高表达量、高特异性、较好的活性及稳定性的抗肝癌单链抗体二聚体BDM,为制备免疫纳米颗粒及开展肝癌的放射免疫诊断和靶向治疗奠定了基础。

关键词:肝癌抗体二聚体;毕赤酵母;结合活性;特异性

别彩群,杨冬华,汤绍辉,丁世华.特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中的表达、纯化及生物学活性鉴定.世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3729-3733

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3729.asp>

0 引言

肝癌的分子靶向治疗是以肝癌细胞过度表达的某些标志性分子为靶点,选择针对性的阻断剂,有效地干预受该标志性分子调控和密切相关的信号传导通路,从而达到抑制肿瘤生长、进展及转移的效果。其中新型肝癌基因工程抗体作为载体的导向治疗是未来肝癌免疫治疗的研究热点^[1]。2001年我们构建抗肝癌噬菌体单链抗体库^[2],筛选出一株抗肝癌特异性单链抗体,并对抗体进行亲和力成熟、人源化改造及二聚体构建,得到亲和力高、免疫原性低,具有很好生物活性的抗肝癌的人源化二聚体抗体BDM^[3-5]。但由于大肠杆菌对抗体的分泌表达量低,不能满足研究及临床需要。毕赤酵母表达系统是20世纪80年代初期发展起来的一种新型的外源蛋白表达系统。他既具有原核表达系统操作简易、易于培养、生长速度快、表达量高、成本低等优点,还具有原核生物表达系统所不具有的对外源蛋白的翻译后修饰等特点,如糖基化、蛋白磷酸化等,该表达系统成为目前最优秀、应用最为广泛的外源基因表达系统之一。本研究重点为实现抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中的高效表达、纯化、二聚体分离以及抗体的生物功能的检测。

1 材料和方法

1.1 材料 含有抗肝癌单链抗体基因的pCANTAB 5E-BDM重组质粒由本实验室构建;毕赤酵母

GS115、大肠埃希菌-酵母穿梭质粒pGAPZ α A为Invitrogen公司产品;大肠杆菌DH5 α 由本室保存;Superdex 200 HR10/30色谱柱为Amershan公司产品;Primerstar DNA聚合酶、限制性内切酶、T4连接酶、蛋白质分子质量标准(低)及DNA MARK DL2000、标准蛋白为TaKaRa公司产品;Yeast DNA Kit试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、DNA纯化试剂盒为Omega公司产品;超滤管为Milipore公司产品;人肝癌细胞系(HepG2、Bel-7402、SMMC7721)、正常人胎肝细胞系(L-02)均为本实验室保存。组织标本为暨南大学附属第一医院病理科提供;其余常用试剂为国产或进口分析纯试剂。PCR引物由上海英俊公司合成。

1.2 方法

1.2.1 重组酵母表达质粒pGAPZ α A-BDM的构建:以人源化单链抗体pCANTAB5E-BDM重组质粒为模板,使用Premier Primer 5.0软件上游引物:5'-ATAGAATTTCATGGCCCAGGTGAAGCTGCA-3',下游引物:5'-ATACTAGACCCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGT-3',于引物5'端或3'端分别设计限制性内切酶EcoR I和Xba I的酶切位点,扩增出BDM基因片段。PCR条件:95℃预变性5 min,94℃变性30 s,64℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环,最后延伸10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,DNA凝胶回收试剂盒回收,其长度大约为750 bp。二聚体基因回收后分别与pGAPZ α A载体经EcoR I和Xba I内切酶双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收,T4连接酶连接,构建pGAPZ α A-BDM质粒,转化大肠杆菌DH5 α ,用LLBZ(含25 mg/L Zeocin)平板筛选阳性克隆,经酶切鉴定后送上海英俊和生工测序。

1.2.2 电转化试验:将重组成功的质粒pGAPZ α A-BDM大量扩增,予限制性内切酶A ν r II酶切消化,使之线性化;常规培养毕赤酵母GS115至A₆₀₀达到1.3-1.5,以冰预冷的1 mol/L山梨醇处理菌体,制备感受态细胞。将10 μ L线性化DNA(pGAPZ α A-BDM)与80 μ L新鲜感受态细胞混匀,在电压300 V,脉冲时间15 ms,1个脉冲,进行电击转化,同时以转染质粒pGAPZ α A为阴性对照。30℃温育1-2 h,将菌体悬液涂布于含100 mg/L Zeocin的YPDS平板上,30℃培养至单个菌落出现。

1.2.3 重组转化酵母的PCR鉴定:在YPD培养基中培养酵母工程菌种大约至A₆₀₀ = 6,提取毕赤酵母基因组DNA,以酵母基因组DNA为模板,以前面特异性引物进行PCR鉴定分析。

1.2.4 二聚体抗体的大量表达和纯化:挑选一株

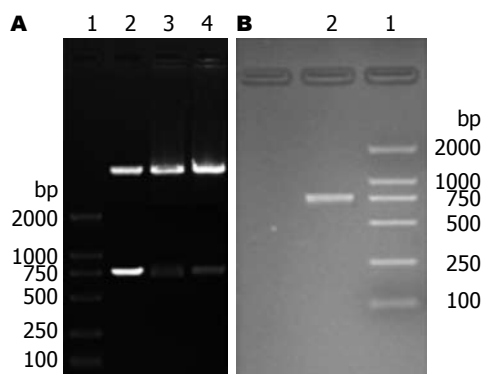


图1 重组质粒双酶切凝胶及PCR电泳图。

阳性克隆接种于YPD培养基中, 28℃-30℃、250-300 r/min连续培养2-4 d, 取1 L重组酵母菌培养物, 8000 r/min离心20 min, 除去沉淀, 上清用Millipore超滤管进行20倍浓缩。浓缩液予镍琼脂糖凝胶FF柱纯化, 分别用100、200、300、500 mmol/L咪唑的缓冲液进行阶段洗脱, 收集各阶段洗脱峰。

1.2.5 表达产物的SDS-PAGE、Western blot及浓度的检测: 按文献[6]的方法进行SDS-PAGE和Western blot检测, 按BCA蛋白测定试剂盒说明书测定所表达抗体的浓度。

1.2.6 二聚体抗体的生物活性检测: 将抗体进行生物活性检测, 一抗为纯化获得的BDM抗体, 二抗为HRP标记的抗-His单克隆抗体。结果判断: 比值 = (实验组 A_{490} 值-空白对照 A_{490} 值)/(阴性对照 A_{490} 值-空白对照 A_{490} 值); 该比值 ≥ 2 即为阳性, 以测定仍为阳性的最高倍数作为BDM的效价。

1.2.7 二聚体抗体的免疫组织化学检测: 将抗体进行免疫组织化学检测, 一抗为纯化后获得的BDM抗体, 二抗为HRP标记的抗-His。结果判断: 根据组织切片中阳性细胞所占的比例, 将免疫组织化学结果分为4个等级, 即分为阴性(-): 阳性细胞小于1%; 阳性(+): 阳性细胞占1-29%; 阳性(++): 阳性细胞占30-49%; 阳性(+++): 阳性细胞占50%以上。计算各组的阳性率, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组酵母表达质粒的构建和鉴定 提取筛选到的pGAPZ α A2-BDM质粒DNA, 分别进行EcoRI + XbaI双酶切及PCR扩增, 阳性重组质粒双酶切后可产生3100及750 bp两条带, 大小与目的DNA和载体片段长度相符, PCR扩增可获得与预期相符、大小约750 bp的单一一条带, 见下图1A; 测序结果进一步证明正确构建了酵母表达

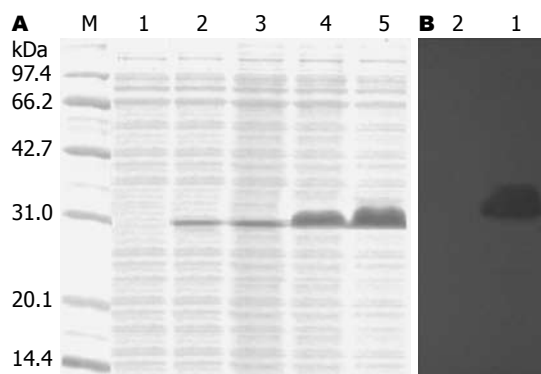


图2 酵母工程菌24、48、72、96 h各个时间点表达抗体的聚丙烯酰胺电泳和免疫印迹分析。

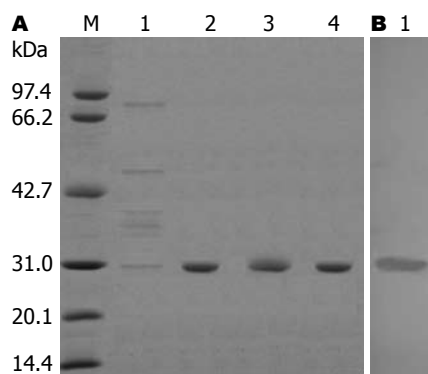


图3 抗体BDM的柱纯化及免疫印迹检测。

载体pGAPZ α A-BDM。

2.2 重组酵母表达载体的转化、筛选与鉴定结果 重组酵母载体pGAPZ α A-BDM和空白载体pGAPZ α A在被导入宿主菌后, 经YPD+Zeocin平板筛选阳性转化子, 初步判定这些转化子为重组转化子。提取酵母基因组DNA, 以酵母转化子基因组DNA为模板, 用扩增目的基因BDM的特异性引物按原条件进行PCR反应扩增, 产物为750 bp的特异性条带, 见图1B, 与预期结果一致。

2.3 二聚体抗体表达及鉴定 分别收取24、48、72、96 h各个时间点酵母悬浮液, 离心后取相同量样品进行SDS-PAGE分析, 在31 kDa处有各有一清晰蛋白条带, 大小与BDM变性条件下理论分子量相近, 其中72、96 h时间点条带较前两个时间点浓, 而pAGPZ α A空载体对照则无条带可见(图2A); 阳性重组转化子表达上清液经Western blot分析(图2B), 在31 kDa处都有一显色条带, 而作为阴性对照菌株无显色条带, 说明阳性重组转化子能够分泌表达目的蛋白。

2.4 抗体的纯化及浓度检测 将大量表达96 h的菌液离心, 收集的上清液超滤至20 mL, 0.22 μ m滤膜过滤后, 使用Ni-柱亲和层析纯化, 使用不同的咪唑浓度洗脱, 洗脱液取样进行SDS-PAGE检测。

■创新盘点

本研究首次将该课题组构建的具有较好的抗肿瘤潜力的特异性抗肝癌二聚体抗体在毕赤酵母中表达, 并进行抗体生物学活性检测, 成功获得高产量具有良好生物学活性的二聚体抗体, 为抗肝癌抗体在后续研究及临床应用奠定了基础。

■同行评价

本文对特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中的表达、纯化及生物学活性鉴定进行研究,具有一定的学术价值和可读性.

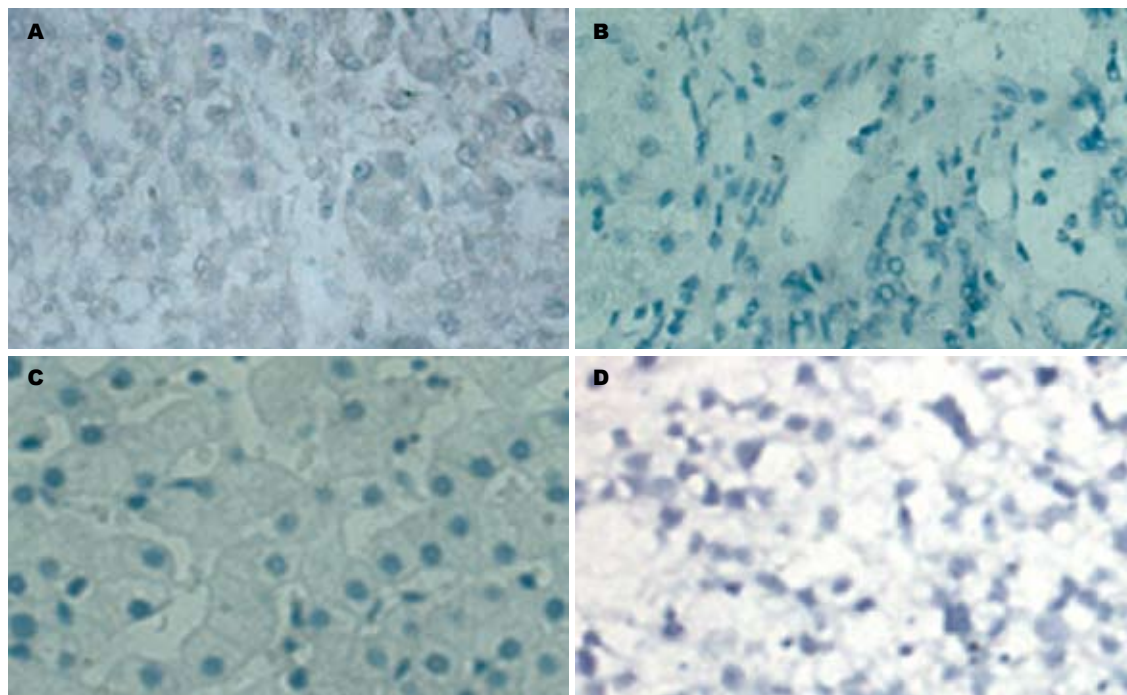


图4 二聚体抗体BDM分别与肝癌、肝硬化、正常肝组织、胃癌等组织免疫组织化学反应. A: 抗体与肝癌组织反应; B: 抗体与肝硬化反应; C: 抗体与正常肝组织反应; D: 抗体与胃癌组织反应.

表1 抗肝癌单链抗体二聚体BDM效价的测定 (A_{490})

克隆	空白	阴性	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
HDM	0.006	0.113	0.718	0.653	0.556	0.407	0.325	0.272	0.227	0.161	0.105
BDM	0.013	0.121	0.892	0.823	0.729	0.625	0.582	0.482	0.318	0.251	0.158

表2 免疫组织化学检测抗肝癌单链抗体二聚体BDM组织反应的阳性率

疾病	<i>n</i>	阳性(<i>n</i>)	阴性(<i>n</i>)	阳性率(%)	χ^2 值 ¹	<i>P</i> 值
肝癌	30	12	18	40.0		
肝硬化	18	2	16	11.1	4.81	<0.05
胃癌	15	1	14	6.7	6.22	<0.01
正常肝组织	10	0	10	0.0	10.11	<0.001

¹: 肝癌组织分别与其他组织比较的 χ^2 .

结果表明: 在100 mmol/L咪唑浓度下洗去主要杂蛋白, 而目的蛋白主要在200-500 mmol/L咪唑浓度下被洗脱(图3A). Western blot检测确证了纯化的蛋白为带有6 His Tag的目的蛋白, 结果如图3B. BCA法测得抗体浓度为30 mg/L菌液, 为大肠杆菌表达量的300倍.

2.5 表达产物的生物活性及组织特异性 为了测定二聚体抗体与肝癌细胞结合的活性, 分别以不同稀释度的BDM与肝癌细胞(三株肝癌细胞HepG2、Bel-7402、SMMC7721按1:1:1比例混匀)进行ELISA检测, 结果表明二聚体抗体

BDM在稀释度为1:128时的 A_{490} 值仍为阴性对照 A_{490} 值的2倍以上, 具有与肝癌细胞结合的活性(表1). 而亲本单链抗体HDM与肝癌细胞的结合活性为1:64. 抗肝癌单链抗体二聚体BDM与肝癌、肝硬化、胃癌、正常肝组织反应的阳性率分别为40.0%(12/30)、11.0%(2/18)、6.7%(1/15)、0(0/10). 肝癌组织的阳性率比正常肝、肝硬化、胃癌组织的阳性率高, 差异均有统计学意义(表2). 提示: 抗肝癌特异性单链抗体二聚体BDM对人肝癌组织的特异性高于其他组织, 即对肝癌组织有特异性. 组织切片见图4.

3 讨论

人类运用抗体进行疾病的诊治大致经历了多克隆抗体、单克隆抗体、基因工程抗体3个阶段,其中以单克隆抗体和基因工程抗体的应用为主.如何制备出亲和力高、稳定性好、产量大的人源化基因工程抗体是抗体工程需要解决的关键问题.国外研究显示,抗体分子量大小与肿瘤穿透力、肿瘤靶向性及药物代谢动力学关系密切,分子量太小容易在肾脏被迅速清除,分子量过大,组织穿透性差,都会影响抗肿瘤效应的发挥,而单链抗体二聚体,即二价抗体显示出良好的组织穿透力、肿瘤靶向和血清清除率,极可能成为肿瘤免疫治疗最具潜力的载体^[7].

大肠杆菌虽具有遗传背景清楚、生产成本低、对某些蛋白表达产量高、表达周期短等优点,但其为原核表达,所表达的抗体无法糖基化及进行正确的分子装配,并且分泌表达量很低.哺乳动物细胞、昆虫细胞虽具有表达重轻链基因、糖基化、正确的分子装配以及分泌抗体的能力,但操作复杂,表达水平低,产业化生产造价昂贵,目前难以普遍推广使用.毕赤酵母是一个新兴的重组蛋白表达系统,兼具原核细胞和真核细胞表达系统的优点,具有高效分泌表达、高密度发酵(菌体湿质量大于500 g/L)及一定的糖基化能力等优势,现已广泛应用于多种重组蛋白的表达. Freyre *et al*^[8]用毕赤酵母分泌表达抗癌胚抗原单链抗体,表达量高达1.2 g/L,采用IMAC纯化,获得到0.44 g scFv蛋白,纯度约为93%. ELISA检测到的专一性比来自细菌周质腔的同种scFv的专一性高3倍.

我室已成功构建人源化抗肝癌单链抗体二聚体,与其亲本抗体相比亲和力高及稳定性好,具有很好的抗肿瘤潜力^[5].但由于大肠杆菌对抗体的分泌表达量低,无法满足后续临床需要.本研究将二聚体抗体基因克隆至酵母表达载体,成功构建了pGAPZ α A-BDM酵母表达载体,载体pGAPZ α A是组成型表达载体,在AOX1 5'端启动子序列下游,有供外源基因插入的多克隆位点,多克隆位点下游AOX1 3'端终止序列,以毕赤酵母中磷酸甘油酸脱氢酶(GAP)基因启动子作为外源基因的启动子,可组成性表达外源基因而不需要甲醇诱导、更换碳源,工艺简单,表达量较诱导型载体高,更适合药品和食品的生产.酵母分泌表达的最大特点就是表达产物直接分泌到培养基中,不需复杂的破菌过程,且自身分泌内源性蛋白很少,加之培养基中无蛋白成分,故分泌到胞外的蛋白很容易纯化^[9].本研究

中毕赤酵母在96 h时间点最大量表达抗体,表达产物经纯化后获得高纯度二聚体抗体,其浓度为30 mg/L,为大肠杆菌表达量的300倍,表达量完全能满足后续研究需要.纯化后的抗体活性检测结果为:抗肝癌单链抗体二聚体BDM与3种肝癌细胞结合,结合效价为1:128,而与正常肝细胞不结合.而抗体单体与3种肝癌细胞的结合效价为1:64,远低于二聚体活性.纯化的抗肝癌单链抗体二聚体BDM与肝癌组织反应阳性率为40.0%;高于与正常肝组织、肝硬化、胃癌组织的阳性率,差异均有统计学意义.该结果证实毕赤酵母表达系统能高效表达单链抗体二聚体,所表达抗体具有较好的生物活性,他可成为表达基因工程抗体的适宜宿主.

抗体研究的目的是最终使其能够在生物学或医学领域中广泛应用,本研究成功实现了亲和力高和特异性好的人源化抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中高效表达,为后续制备免疫纳米颗粒及开展肝癌的放射免疫诊断和靶向治疗奠定了基础.

4 参考文献

- 1 Yang DH. [Current status and progress of immunotherapy for hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003; 11: 757
- 2 毕向军, 杨冬华, 崔俊, 李鹏, 宁晓燕, 范子荣, 覃汉荣. 抗肝癌单链抗体的构建及其结合特性. *上海免疫学杂志* 2001; 21: 289-292
- 3 Lu XH, Yang DH, Zhou M, Tang SH. [Affinity maturation of a single-chain antibody against hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 192-195
- 4 叶刚, 杨冬华, 汤绍辉, 黄卫, 丁世华, 罗静兰. 抗体库优化策略对特异性抗肝癌单链抗体的人源化. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1144-1150
- 5 Bie CQ, Yang DH, Liu L. [Construction, expression and characterization of humanized single-chain Fv dimers for hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2009; 17: 466-467
- 6 J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔. 分子克隆. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 96-98, 1713-1720
- 7 Adams GP, Tai MS, McCartney JE, Marks JD, Stafford WF 3rd, Houston LL, Huston JS, Weiner LM. Avidity-mediated enhancement of in vivo tumor targeting by single-chain Fv dimers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1599-1605
- 8 Freyre FM, Vázquez JE, Ayala M, Canaán-Haden L, Bell H, Rodríguez I, González A, Cintado A, Gaviñondo JV. Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 2000; 76: 157-163
- 9 Weiss HM, Haase W, Michel H, Reiländer H. Expression of functional mouse 5-HT_{5A} serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. *FEBS Lett* 1995; 377: 451-456

P53Arg72Pro多态性及*H pylori*感染与胃癌高发区甘肃河西地区胃癌的关系

朱克祥, 李玉民, 李 汛, 周文策, 单 勇, 刘 涛, 何雯婷

■背景资料

我国胃癌的发病率和死亡率高居恶性肿瘤发病的第3位, 但胃癌发病的确切机制尚不清楚。目前多倾向于胃癌是由菌株-环境-宿主共同作用的多基因疾病。因此, 从宿主因素方面研究胃癌发病的易感性具有重要意义。

朱克祥, 李汛, 周文策, 刘涛, 何雯婷, 兰州大学第一医院普外二科 甘肃省兰州市 730000

李玉民, 兰州大学第二医院普外科 甘肃省兰州市 730000

单勇, 甘肃省金川公司医院普外科 甘肃省金昌市 737000

刘涛, 何雯婷, 兰州大学第一医院肿瘤防治中心 甘肃省兰州市 730000

国家自然科学基金资助项目, No. 30870364

作者贡献分布: 此课题由朱克祥、李玉民、李汛及周文策设计; 研究过程由朱克祥与单勇完成; 标本收集由朱克祥、刘涛及何雯婷完成; 论文的撰写由朱克祥完成; 李玉民设计、资助本研究并对论文校正。

通讯作者: 李玉民, 教授, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院普外科。lmy19621225@hotmail.com

收稿日期: 2009-10-06 修回日期: 2009-12-02

接受日期: 2009-12-07 在线出版日期: 2009-12-28

Association of P53 Arg72Pro polymorphism and *Helicobacter pylori* infection with risk of gastric cancer in a high incidence area in China

Ke-Xiang Zhu, Yu-Min Li, Xun Li, Wen-Ce Zhou, Yong Shan, Tao Liu, Wen-Ting He

Ke-Xiang Zhu, Xun Li, Wen-Ce Zhou, Tao Liu, Wen-Ting He, the Second Department of General Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province in, China

Yu-Min Li, the Department of General Surgery, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Yong Shan, Department of General Surgery, the Hospital of Jinchuan Group Ltd., Jinchang 737000, Gansu Province, China

Tao Liu, Wen-Ting He, Cancer Center, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 30870364

Correspondence to: Professor Yu-Min Li, the Department of General Surgery, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. lmy19621225@hotmail.com

Received: 2009-10-06 Revised: 2009-12-02

Accepted: 2009-12-07 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To evaluate the association of P53 Arg72Pro polymorphism and *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection with risk of gastric cancer in high-incidence Hexi area of Gansu province in

China.

METHODS: Blood samples were collected from 140 patients with gastric carcinoma and 125 normal individuals in Hexi area in Gansu Province. Genomic DNA was extracted by proteinase K digestion followed by the saturated hydroxybenzene/chloroform procedure. The polymorphism of P53 Arg72Pro was genotyped by real-time PCR (TaqMan). For detection of *H pylori* infection, Warthin-Starry staining was performed.

RESULTS: The rates of *H pylori* infection were 68.6% in gastric carcinoma patients and 50.4% in healthy controls, with a significant difference between the two groups of patients ($OR = 2.147$, 95% CI: 1.302-3.541). Three genotypes of P53 Arg72Pro were identified: Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro. The frequencies of these three genotypes were 15.7%, 60.0% and 24.3% in gastric cancer patients, and 25.6%, 54.4% and 20.0% in normal controls, respectively. Compared with the Arg/Arg genotype, the frequency of Arg/Pro or Pro/Pro genotype showed no significant difference between cancer patients and normal controls. However, the frequency of P53 Arg72Pro Pro carrier genotype (Arg/Pro and Pro/Pro) in gastric cancer patients was significantly higher than that in normal controls ($OR = 1.846$, 95% CI: 1.006-3.387). Stratification analysis indicated that the P53 Arg72Pro Pro carrier genotype with *H pylori* infection or with smoking increased the risk of gastric cancer.

CONCLUSION: P53 Arg72Pro polymorphism is associated with the risk of gastric cancer in high-incidence Hexi area of Gansu province in China. P53 Arg72Pro Pro carrier genotype with *H pylori* infection or with cigarette smoking increases the risk of gastric cancer.

Key Words: P53; Polymorphism; *Helicobacter pylori*; Gastric cancer

Zhu KX, Li YM, Li X, Zhou WC, Shan Y, Liu T, He WT. Association of P53 Arg72Pro polymorphism and *Helicobacter pylori* infection with risk of gastric cancer in

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

a high incidence area in China. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(36): 3734-3739

摘要

目的: 检测*H pylori*在甘肃河西地区健康人群与胃癌患者中的感染, 并探讨P53Arg72Pro基因多态性以及*H pylori*感染与胃癌高发区甘肃河西地区胃癌发生的关系。

方法: 采用PCR-TaqMan探针法检测甘肃河西地区健康人群和胃癌患者P53Arg72Pro的基因多态性, 用Warhin-starry染色法检测本研究对象*H pylori*感染率。

结果: *H pylori*感染率在胃癌组和对照组分别为68.6%, 50.4%, *H pylori*感染率在两组间具有显著差异($OR = 2.147$, 95%CI: 1.302-3.541); P53Arg72Pro分为Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro 3种基因型, 其频率在胃癌患者中分别为15.7%, 60.0%, 24.3%; 在健康人群中分别为25.6%, 54.4%, 20.0%。与Arg/Arg基因型相比, Arg/Pro或Pro/Pro单独频率在2组间差异无统计学意义, 但P53Pro等位基因(Arg/Pro+Pro/Pro)携带者在胃癌者和对照组间差异有统计学意义($OR = 1.846$; 95%CI: 1.006-3.387)。分层分析提示*H pylori*阳性感染者或吸烟人群, 若其同时携带有P53Pro等位基因, 他们患胃癌的风险明显增加。

结论: P53Arg72Pro位点基因多态性与我国胃癌高发区甘肃河西地区胃癌发病的风险相关, P53Pro等位基因与*H pylori*感染或吸烟因素有一定的协同作用。

关键词: P53; 基因多态性; 幽门螺杆菌; 胃癌

朱克祥, 李玉民, 李汛, 周文策, 单勇, 刘涛, 何雯婷. P53Arg72Pro多态性及*H pylori*感染与胃癌高发区甘肃河西地区胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3734-3739
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3734.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。2005年我国约有40万的胃癌新发病例和30万死亡病例, 发病率和死亡率高居全部恶性肿瘤的第3位^[1]。20世纪80年代以来, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)与胃癌的关系受到广泛关注, 被认为是胃癌发生的独立危险因素。然而, 在*H pylori*感染人群中仅有少数个体发展为胃癌, 说明胃癌发生是多因素综合的结果, 其中遗传特性所决定的个体易感性扮演着不可忽视的角

色。在抑癌基因中, P53基因与肿瘤的关系较早受到人们的重视。近年来, 随着分子生物学及其研究方法的迅速发展, P53基因在恶性肿瘤中的研究日趋深入, 发现P53基因中至少可以检测到8个多态性位点, 其中以第4外显子Arg72Pro多态性较为常见^[2]。但对改位点多态性与胃癌危险性关系的研究中, 因研究对象在地域、种族的不同而结论不一。本研究探讨P53Arg72Pro多态性以及*H pylori*感染与高发区甘肃河西地区胃癌易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 140例胃癌病例为2007-07/2007-11在甘肃省张掖市医院, 甘肃省武威市医院, 甘肃省酒泉市医院胃镜室进行胃镜检查, 胃镜和活检病理诊断均为胃癌的患者, 125例对照人群为同时期在本地区进行胃镜体检的健康人群。研究对象均为汉族并使每一位研究的对象完全知情, 获得研究对象的同意。吸烟者定义为既往或目前每天吸烟1支以上, 并持续1年或1年以上者。胃癌家族史定义为家族中有1名以上一级亲属或2名以上二级亲属患有胃癌者。每位研究对象胃镜检查时活检胃黏膜3-5块用4%甲醛溶液固定。同时所有研究对象在胃镜检查后采集外周静脉血2 mL(外周静脉穿刺置入EDTA抗凝管)先放入液氮罐冷冻, 后转入-80℃冰柜保存。

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*感染检测: 用Warhin-Starry法检测幽门螺杆菌。在Warthin-Starry染色中, *H pylori*呈棕褐色微弯曲短杆状, 常位于胃黏膜表面或/和胃小凹及肿瘤性腺腔内, 呈散在、密集或成堆分布。无*H pylori*检出者为阴性。

1.2.2 基因多态性位点分型: 采用常规蛋白酶K、酚/氯仿法抽提外周血基因组DNA。PCR-TaqMan探针对P53基因Arg72Pro位点基因分型。P53Arg72Pro基因位点的TaqMan探针及其引物由上海基康生物有限公司设计合成。其引物和探针的序列如下: Primer: FP 5'-CCCAAGCAATGGATGATTTGA-3', RP 5'-GGGCCGCCGGTGTAG-3'; 等位基因G(Arg)特异性TaqMan探针probe: 5'-FAM-CTCCCCgCGTGGCCCC-TAMRA-3'; 5'-TET-CTCCCCcCGTGGCCCCCT-TAMRA-3'。扩增片段长度144 bp。PCR反应体系为10 μL, 其中含2 × TaqMan Master Mix(购自ABI)5.0 μL, Forward primer 0.45 μL(10 pmol/μL), Reverse primer 0.45

■ 研发前沿

P53基因是迄今发现的与人类恶性肿瘤相关性最密切的基因, 是重要的细胞周期调节、凋亡基因。既往对P53基因的丢失、突变、P53蛋白的表达做了大量的研究。近年来, 国外不同种族和人群中对P53基因多态性与多种肿瘤易感性的研究均有大量报道, 而国内有关报道较少。

■相关报道

Shepherd *et al* 对美国人胃癌患者P53基因外显子4的突变状态做了检测, 认为白种人Arg/Arg基因型频率增高, 而黑种人Pro等位基因频率增高, 可能是白种人易患贲门癌和黑种人易患胃癌的原因。

表 1 胃癌患者和健康对照组的一般特征 *n*(%)

特征	健康对照组(<i>n</i> = 125)	胃癌组(<i>n</i> = 140)	<i>P</i> 值	OR值(95%CI)
中位年龄(岁)	58(24-81)	59(25-84)	0.539	
<65	70(56.0)	80(57.1)		
≥65	55(44.0)	60(42.9)		
性别			0.278	1.359(0.797-2.318)
男	85(68.0)	104(74.3)		
女	40(32.0)	36(25.7)		
吸烟状况			0.326	1.295(0.797-2.100)
吸烟	58(46.4)	74(52.9)		
不吸烟	67(53.6)	66(47.4)		
胃癌家族史			0.042	1.959(1.030-3.728)
有	17(13.6)	33(23.6)		
无	108(86.4)	107(76.4)		
<i>H pylori</i> 感染			0.004	2.147(1.302-3.541)
阳性	63(50.4)	96(68.6)		
阴性	62(49.6)	44(31.4)		

μL(10 pmol/μL), TaqMan FAM probe 0.25 μL(10 pmol/μL), TaqMan TET probe 0.25 μL(10 pmol/μL), Template DNA 2.0 μL(10 ng/μL), ddH₂O 1.6 μL. 在Rotor Gene3000型荧光定量PCR仪进行扩增反应, 扩增参数: 开始先50℃预热2 min, 95℃预变性10 min, 然后95℃变性5 s, 60℃复性30 s, 共40个循环. Rotor-Gene 6.1.81软件判读基因型. 实验中设阴性对照和阳性对照, 并采用单纯随机抽样法对其中50例样本进行重复基因型检测分别获得一致结果。

统计学处理 用 χ^2 检验比较分类变量和基因型在胃癌组和健康对照组中的分布差异. 以非条件Logistic回归模型计算相对风险度的比值比(odds ratio, OR)及其95%可信区间(confidence interval, CI), 评价各基因型与胃癌发病风险的关系, 并以年龄、性别、吸烟史、*H pylori*感染和胃癌家族史对等位基因频率进行分层分析. 数统统计学分析采用SPSS13.0软件包。

2 结果

2.1 研究对象的一般特征 胃癌患者组年龄25-84(中位年龄59)岁; 健康对照组年龄24-81(中位年龄58)岁. 2组间的年龄, 性别和吸烟人数构成差异均无统计学意义($P>0.05$), 而胃癌阳性家族史在胃癌组中的比例明显高于健康对照组(23.6% *vs* 13.6%; $OR = 1.959$, 95%CI: 1.030-3.728). 在胃癌组中, *H pylori*阳性者分布频率高于对照组(68.6% *vs* 50.4%; $OR = 2.147$, 95%CI: 1.302-3.541, 表1)。

表 2 P53codon Arg72Pro基因型在胃癌和对照中的分布 *n*(%)

基因型	健康对照组	胃癌组	OR值	95%CI
Arg/Arg	64(25.6)	44(15.7)	1.000	reference
Arg/Pro	136(54.4)	168(60.0)	1.797	0.967-3.374
Pro/Pro	50(20.0)	68(24.3)	1.978	0.935-4.184
Arg+Pro	186(74.4)	236(84.3)	1.846	1.006-3.387
Arg allele	132(52.8)	128(45.7)	1.000	reference
Pro allele	118(47.2)	152(54.3)	1.324	0.759-2.308

2.2 P53Arg72Pro基因多态性在胃癌及健康对照组中频率分布 P53Arg72Pro多态性位点有Arg/Arg、Arg/Pro和Pro/Pro 3种基因型(图1), 他们的分布频率及其与胃癌风险度的关系归纳于表2. 基因型Arg/Arg、Arg/Pro和Pro/Pro其频率在胃癌组中分别为15.7%, 60.0%和24.3%, 在对照组中分别为25.6%, 54.4%和20.0%. 经检验对照组基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡规律($P>0.05$). 与P5372Arg/Arg纯合子基因型相比, 单独携带Arg/Pro杂合子或携带Pro/Pro纯合子基因型的个体在胃癌组和对照组之间均无统计学差异(Arg/Pro型: $OR = 1.797$, 95%CI: 0.967-3.374, $P = 0.067$; Pro/Pro型: $OR = 1.978$, 95%CI: 0.935-4.184). 但将携带Arg/Pro和携带Pro/Pro型者合并后与携带Arg/Arg型相比较, 带有P53Pro等位基因型的个体在胃癌组显著增高, OR 值为1.846(95%CI: 1.006-3.387)。

2.3 P53Arg72Pro基因多态性与胃癌关系的相关性 按年龄、性别、吸烟史、*H pylori*感染和胃癌家族史对P53Arg72Pro等位基因频率在病例和对

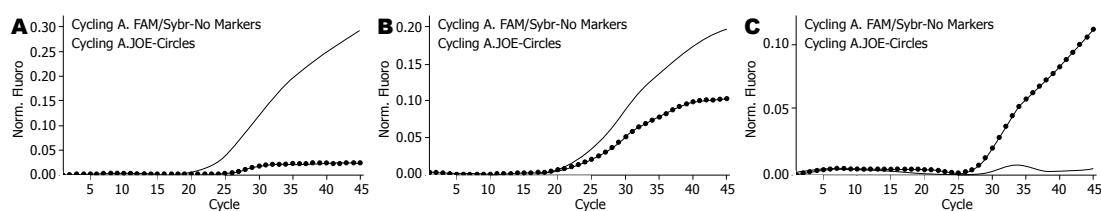


图1 P53Arg72Pro多态性位点PCR-TaqMan图. A: 仅Fam(Arg)探针扩增(Arg/Arg型); B: Fam(Arg)和Tet(Pro)都扩增(Arg/Pro型); C: 仅Tet(Pro)探针扩增(Pro/Pro型).

■创新盘点

本研究从基因水平研究胃癌发病的易感性, 表明P53的Pro等位基因可能与胃癌危险度有关, 同时检测P53Arg72Pro多态性和H pylori感染, 为胃癌早期诊断和预警标记提供了线索.

表3 P53codon Arg72Pro基因型与胃癌发病风险相关性(n)

分层类别	健康对照组		胃癌组		OR值	95%CI
	Arg/Arg	Any Pro	Arg/Arg	Any Pro		
年龄(岁)						
<65	18	52	11	69	2.171	0.945-4.989
≥65	14	41	11	49	1.521	0.623-3.711
性别						
男	17	68	13	91	1.750	0.796-3.846
女	17	23	9	27	2.217	0.831-5.913
吸烟状况						
吸烟	21	37	13	61	2.663	1.193-5.946
不吸烟	11	56	9	57	1.244	0.479-3.233
胃癌家族史						
有	6	11	5	28	3.055	0.771-12.100
无	26	82	17	90	1.679	0.850-3.315
H pylori感染						
阳性	15	48	11	85	2.415	1.027-5.676
阴性	17	45	11	33	0.446	0.168-1.187

照组中进行分层分析(表3), 并将Arg/Pro和Pro/Pro两种基因型合并后与纯合型Arg/Arg作比较. 结果显示: 在年龄、性别、家族史的分层分析中未观察到基因型胃癌和对照2组间的分布差异. 但在H pylori感染分层中, H pylori感染阳性同时携带P53Pro等位基因的个体相对于P53Arg/Arg携带者患胃癌的OR值为2.415(95%CI: 1.027-5.676); 在吸烟人群中, 携带P53Pro等位基因个体患胃癌的风险是携带P53Arg/Arg基因型的2.663倍(OR = 2.663, 95%CI: 1.193-5.946).

3 讨论

胃癌是由生物因素、环境因素和宿主因素共同作用, 多阶段, 多步骤的衍进而成的恶性疾病. 经典流行病学调查结果认为, 胃癌主要与重盐、喜食腌渍、熏烤等含亚硝酸盐食品及慢性胃疾病史等因素关系密切, 多食新鲜蔬菜水果则具有降低胃癌危险性的作用^[3]. 然而, 近年来我国居民饮食结构发生了较大变化, 总体趋于合理, 但胃癌死亡率的下降趋势并不明显, 有些

地区甚至仍呈上升趋势. 因此, 人们把胃癌发生的研究重点逐渐转移到生物和遗传因素上. H pylori感染是胃癌发生的主要的生物因素^[4]. 本研究显示甘肃河西地区胃癌组H pylori感染阳性率为68.6%, 高于对照组的50.4%. H pylori感染阳性者患胃癌的风险是H pylori感染阴性者患胃癌的2倍. 这与几项^[5-7]关于H pylori与胃癌关系的Meta分析结果显示的H pylori与胃癌关系OR值一般在2-4之间的结论相一致, 表明H pylori感染在河西地区胃癌的发生过程中起着重要的作用.

随着分子生物学及其研究方法的飞速发展, P53基因作为抑癌基因在恶性肿瘤中的研究日趋深入. P53基因位于17号染色体1区3带, 全长20 kb, 由11个外显子, 10个内含子组成. 研究表明P53基因是迄今发现的与人类恶性肿瘤相关性最密切的基因, 是重要的细胞周期调节、凋亡基因. 野生型P53基因主要表现为对靶基因的调控, 使发生DNA损伤的细胞阻滞于G₁期, 从而维持细胞正常生长, 诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制细胞恶性增殖, 从而发挥抑癌作用^[8]. 突变型P53

■同行评价

本文初步探讨了P53Arg72Pro位点基因多态性与胃癌发病的相关风险,选题新颖,为胃癌发病机制的研究提供了新的思路,学术价值较好。

基因不但使遗传损伤的细胞可能逃脱上述机制,而且失去了对肿瘤的抑制作用,促进细胞的恶性转化^[9]。

1987年,国外学者发现,在一般人群中P53基因第4外显子第72位密码子存在多态性,表达产生两种P53蛋白:含精氨酸残基的P53蛋白(ArgP53, CGC)或含脯氨酸残基的P53蛋白(ProP53, CCC),由此使得一般人群中携带的基因型为Arg/Arg纯合型、Pro/Pro纯合型、Arg/Pro杂合型三者之一^[10-11]。这种多态性在正常人群中普遍存在。但是,目前国内外在对P53Arg72Pro基因多态性与多种胃癌的相关性的研究中,因研究对象的不同而得出了不同的结论。Chung *et al*^[12]报道,Pro/Pro基因型可增加韩国人群胃癌的发病风险;Pérez-Pérez *et al*^[13]Arg/Arg基因型可增加墨西哥人群患远端胃癌的发病风险。曹延延 *et al*^[14]报道,与Arg/Arg基因型相比,Pro/Pro基因型可降低中国河北高发区人群贲门腺癌的发病风险。我们研究的结果表明:P53Pro等位基因与甘肃河西地区胃癌危险度有关,Pro等位基因可增加*H pylori*感染后胃癌发病的危险。这与穆丽娜 *et al*^[15]报道P53的Pro等位基因与江苏省泰兴市胃癌危险度有关,并与其他环境危险因素存在交互作用相类似。

P53基因N端区域还包含了一个富含脯氨酸区,P53的这个区域与SH3结合蛋白有显著的相似性,是P53基因调控细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长所必需的区域^[16]。P53基因72密码子上的脯氨酸区包括5个SH3结合的PXXP模体的区域,可能和一些信号转导途径中的因子有物理作用。当P53基因第72密码子的Arg代替Pro后就会去除一个PXXP模体,使SH3结合模体PXXP减少一个。因此,虽然Arg和Pro两种蛋白均为野生型,其空间构象与P53抗体的结合表位均无明显差异,在大多数细胞中二者的稳定性相同^[17],但其分子生物学行为和功能则不完全相同,在SDS-PAGE电泳时泳动的速率不一致,P53Pro比P53Arg移动速度慢;另外,P53Pro型蛋白与部分转录因子的结合性较强,似乎更能有效的转录激活,从而使许多下游基因表达上调,P53Arg型蛋白抑制转化细胞生长、诱导细胞凋亡和对细胞损伤的修复功能较强^[11]。P53codon 72 Arg基因还可能增强某些突变P53与P73的结合,降低P73的DNA结合力进而影响其转录调控和诱导凋亡的功能^[18]。因此,P53codon 72Arg基因和codon72Pro基因在生物学行为和功能方面的差异可能在胃癌的发

生中具有一定的不同基因效应。

Ierardi *et al*^[19]发现在*H pylori*感染的肠化生和异型增生患者中常伴有P53基因的突变。高歌 *et al*^[20]报道*H pylori*感染在胃癌中可促使P53基因突变。我们认为与P53Arg/Arg基因型相比,携带Pro等位基因可能更易被*H pylori*诱导突变,吸烟可能使其基因功能弱化,从而使胃黏膜上皮细胞的生长行为恶性化并逃逸宿主的免疫监控,有利于胃癌事件的发生。然而,P53Pro等位基因与*H pylori*感染增加胃癌易感性的确切机制有待进一步阐明。

在世界范围内,我国属于胃癌高发的国家之一,而甘肃河西地区又是我国胃癌的一个高发区,该地区胃癌检出率为7.79%^[21]。本研究选择胃癌高发区甘肃河西地区胃癌患者作为研究对象,并取相同地理条、年龄性别相近的健康人作对照,具有明显的区域性和现实意义。本研究只能视为初步研究,有关结论有必要进一步扩大样本验证。

4 参考文献

- 1 Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 17-20
- 2 Shepherd T, Tolbert D, Benedetti J, Macdonald J, Stemmermann G, Wiest J, DeVoe G, Miller MA, Wang J, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C. Alterations in exon 4 of the p53 gene in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000; 118: 1039-1044
- 3 Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 28-37
- 4 Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 51-65
- 5 Azuma T, Ohtani M, Yamazaki Y, Higashi H, Hatakeyama M. Meta-analysis of the relationship between CagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2004; 126: 1926-1927; author reply 1927-1928
- 6 Poddar U, Yachha SK. Helicobacter pylori in children: an Indian perspective. *Indian Pediatr* 2007; 44: 761-770
- 7 Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2003; 125: 1636-1644
- 8 Segal F, Kaspary AP, Prolla JC, Leistner S. p53 protein overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's esophagus. *Cancer Lett* 2004; 210: 213-218
- 9 Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003; 302: 1036-1038
- 10 Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism

- at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 961-963
- 11 Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1092-1100
- 12 Chung WC, Lee KM, Lee BI, Chun JS, Lee SY, Chang UI, Park SH, Yang JM, Choi KY, Chung IS. P53 genetic polymorphism of gastric cancer in Korea. *Korean J Intern Med* 2006; 21: 28-32
- 13 Pérez-Pérez GL, Bosques-Padilla FJ, Crosatti ML, Tijerina-Menchaca R, Garza-González E. Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 56-60
- 14 曹延延, 葛晖, 陈龙奇, 陈志峰, 温登瑰, 李琰, 张健慧. 53BP1和p53基因多态性与食管鳞癌、贲门腺癌遗传易感性的关系. *癌症* 2007; 26: 1052-1057
- 15 穆丽娜, 周学富, 丁保国, 王如鸿, 张作风, 姜庆五, 俞顺章. p53 codon72基因多态性与胃癌危险度关系—病例对照研究. *中国癌症杂志* 2003; 13: 1-4
- 16 Mahaffey D, Yoo Y, Rechsteiner M. Ubiquitin metabolism in cycling *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem* 1993; 268: 21205-21211
- 17 Zhang W, Hu G, Deisseroth A. Polymorphism at codon 72 of the p53 gene in human acute myelogenous leukemia. *Gene* 1992; 117: 271-275
- 18 Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG Jr. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* 2000; 25: 47-54
- 19 Ierardi E, Francavilla R, Panella C. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on intestinal metaplasia and gastric epithelium proliferation. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997; 29: 470-475
- 20 高歌, 周长玉, 林种玉. 胃癌与Hp感染及c-myc, p53基因表达的关系. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 941-943
- 21 李玉民, 石斌, 柴琛, 李汛, 周文策, 刘虎, 米登海, 段国学, 王芳, 徐创贵, 张勇, 邓瑞, 郭进华, 张正坤, 傅汉中, 施耀仁, 梁聚民, 孙文勤, 薛群基, 刘维民. 甘肃省河西地区胃癌发病状况的调查. *中华普通外科杂志* 2004; 19: 183-184

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 •

《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布 《世界华人消化杂志》2008年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2480, 位居1868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位. 2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位. 大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价. 《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1868种中国科技期刊排名第341位. (科学编辑: 李军亮 2009-12-28)

慢性乙型重型肝炎与血清血小板活化因子的相关性

马科, 许东, 田德英

■背景资料

血小板活化因子(PAF)是一种特殊类型的细胞因子, 目前PAF在急性肝损害、肝纤维化和肝硬化的致病机制中的作用越来越受到重视, 他在众多参与肝脏疾病发病的炎症细胞因子中起着“中心放大”作用, 并且通过诸多环节加重肝脏的损害。

马科, 许东, 田德英, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科 湖北省武汉市 430030

作者贡献分布: 此课题由田德英及马科设计; 研究过程由马科与许东完成; 实验部分由马科完成; 数据分析由马科与许东完成; 本论文写作由马科、许东及田德英完成。

通讯作者: 田德英, 教授, 主任医师, 博士生导师, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科3病区. tiandeying@tjmu.edu.cn

电话: 027-83663605

收稿日期: 2009-10-11 修回日期: 2009-11-18

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Prognostic significance of serum platelet-activating factor in chronic severe hepatitis B

Ke Ma, Dong Xu, De-Ying Tian

Ke Ma, Dong Xu, De-Ying Tian, Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor De-Ying Tian, the Third Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tiandeying@tjmu.edu.cn

Received: 2009-10-11 Revised: 2009-11-18

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To evaluate the prognostic significance of serum platelet-activating factor (PAF) in chronic severe hepatitis B.

METHODS: Forty-nine patients with chronic severe hepatitis B were divided into two groups: improvement group ($n = 26$) and death group ($n = 23$). A control group was made up of 20 healthy individuals. All patients underwent combined therapy. The levels of PAF and endotoxin in the serum were detected before and after therapy. The case fatality of patients with chronic severe hepatitis B was calculated.

RESULTS: The incidence rate of endotoxemia in 49 patients with chronic severe hepatitis B was 85.71% (42/49). The serum endotoxin and PAF levels in the death group and improvement group were significantly higher than that in the

control group (all $P < 0.01$). The serum endotoxin and PAF levels were significantly lower in the improvement group after therapy than before therapy (both $P < 0.01$). The serum PAF level in patients with endotoxemia was significantly higher than that in patients without endotoxemia ($P < 0.05$). Logistic regression analysis showed that total bilirubin, serum endotoxin and PAF levels were positively correlated with the prognosis of patient with chronic severe hepatitis B (all $P < 0.01$ or 0.05 ; $OR = 0.799, 0.040$ and 2.007 , respectively), and prothrombin activity was negatively correlated with the prognosis of patient with chronic severe hepatitis B ($P < 0.05$, $OR = 0.015$). PAF is the best parameter to evaluate the prognosis of patient with chronic severe hepatitis B.

CONCLUSION: A decrease in serum PAF level is closely associated with the improvement of hepatic function. Serum PAF level can be used as a prognostic factor in chronic severe hepatitis B.

Key Words: Chronic severe hepatitis B; Platelet-activating factor; Endotoxemia; Prognosis

Ma K, Xu D, Tian DY. Prognostic significance of serum platelet-activating factor in chronic severe hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3740-3744

摘要

目的: 探讨血小板活化因子变化在慢性乙型重型肝炎预后评估中的临床价值。

方法: 将49例慢性乙型重型肝炎患者分为好转组($n = 26$)和死亡组($n = 23$), 另选择20例健康体检者作为对照组。重型肝炎患者均采用综合治疗。分别检测治疗前和治疗后血清内毒素和人血小板活化因子值, 统计慢性乙型重型肝炎患者死亡率。

结果: 49例慢性乙型重型肝炎患者内毒素血症发生率为85.71%(42/49), 死亡组和好转组血清内毒素浓度均高于正常对照组(均 $P < 0.01$); 好转组治疗后血清ET浓度明显低于治疗前($P < 0.01$); 死亡组和好转组的血清PAF

■同行评议者

谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

含量均高于正常对照组(均 $P<0.01$); 好转组治疗后血清PAF浓度明显低于治疗前($P<0.01$); 发生内毒素血症的患者PAF浓度明显高于未发生内毒素血症的患者($P<0.05$); 经Logistic回归分析, TBIL、ET、PAF与慢性乙型重型肝炎患者预后成正相关($P<0.05$ 或 0.01 , $OR = 0.799$ 、 0.040 、 2.007), PTA与慢性乙型重型肝炎患者预后成负相关($P<0.05$, $OR = 0.015$), 其中以PAF与预后的关系最为密切。

结论: 血小板活化因子下降与肝功能改善、临床表现好转有密切关系, 慢性乙型重型肝炎患者血小板活化因子含量可作为评价重型肝炎预后的指标之一。

关键词: 慢性乙型重型肝炎; 血小板活化因子; 内毒素血症; 预后

马科, 许东, 田德英. 慢性乙型重型肝炎与血清血小板活化因子的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3740-3744
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3740.asp>

0 引言

慢性重型肝炎的病死率高达60%-80%, 判断病情的严重程度及其预后十分重要, 但是影响慢性重型肝炎预后的因素众多, 各因素之间相互影响, 多种因素共同作用影响了病情的发展和临床结局, 单因素分析不能完全反应各因素的作用。为探讨评判慢性乙型重型肝炎(chronic severe hepatitis B, CSHB)预后的试验指标, 我们联合检测CSHB患者血清人血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)含量, 血清内毒素(endotoxin, ET)值及肝功能指标, 分析其与CSHB预后的关系, 以期对临床诊治和预后判断有指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料 49例CSHB患者均选自自我科2006-06/2007-06住院患者, 其中男38例, 女11例, 年龄17-65(平均 38.51 ± 8.61)岁。诊断均符合病毒性肝炎防治方案^[1]; 按照转归分为死亡组和好转组, 死亡组23例, 其中男20例, 女3例, 年龄 39.04 ± 9.60 岁; 治疗前总胆红素(TBIL) 385.02 ± 45.29 $\mu\text{mol/L}$, 凝血酶原活动度(PTA) $31.04\% \pm 4.50\%$ 。好转组26例, 其中男18例, 女8例, 年龄 38.04 ± 7.80 岁; 治疗前TBIL 383.11 ± 41.34 $\mu\text{mol/L}$, PTA $30.12\% \pm 5.36\%$ 。治疗前两组患者的性别、年龄及肝功能无显著差异($P>0.05$), 具有可比性。所有患者HBsAg阳性。同时排除

甲、丙、戊型肝炎病毒及EB病毒、巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)重叠感染和自身免疫性肝炎等其他可引起重型肝炎的疾病。同时选择门诊健康体检者20人作为对照。所有患者均于入院后次日和出院前或死亡前1 wk内空腹抽取不抗凝静脉血3 mL, 待血块回缩后以4000 r/min离心5 min取血清, 所有血清标本-70℃保存待测。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 两组均采用综合治疗, 包括护肝、降黄、促肝细胞再生、对症支持及人工肝治疗。主要包括甘草制剂、退黄药物、利尿剂、维生素、抗生素、促肝细胞生长素、胸腺肽、白蛋白及血浆等。每周检测肝功能及凝血功能变化。

1.2.2 预后判断: 好转标准: 治疗6-8 wk后, 乏力、纳差、腹胀、黄疸、腹水及并发症等明显好转; TBIL较入院时化验结果下降50%以上; PTA>40%。符合以上全部3项标准者为好转, 否则为无好转。

1.2.3 检测: ET检测应用采用鲎试验三肽基质显色基质法, 试剂盒购自上海伊华临床医学科技公司; PAF检测采用双抗夹心ELISA法, 试剂盒购自上海亚培生物科技有限公司; ELISA法检测甲、乙、丙、戊型肝炎病毒标志物; 甲、丙、戊型肝炎病毒检测试剂盒购自厦门新创科技有限公司; 乙型肝炎病毒检测试剂盒购自上海科华生物技术有限公司; 血生化检测由Beckman L-20型全自动生化分析仪完成; 凝血功能检测由Biochem全自动血栓与止血分析仪完成。

统计学处理 应用SPSS11.5软件, 数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 计量指标采用方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验。采用配对计量资料的 t 检验及Logistic回归分析方法。 $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 CSHB患者治疗前后血清ET变化 治疗前死亡组和好转组CSHB患者血清ET浓度均高于正常对照组, 差异有统计学意义(死亡组 $F = 22.1$, $P<0.01$; 好转组 $F = 27.5$, $P<0.01$); 治疗后死亡组血清ET浓度高于治疗前水平, 但无明显差异($P>0.05$); 治疗后死亡组血清ET浓度显著高于治疗后好转组, 差异有统计学意义($F = 3.91$, $P<0.01$); 治疗后好转组血清ET浓度明显低于治疗前, 差异有统计学意义($F = 18.27$, $P<0.01$, 表1)。

2.2 CSHB患者治疗前后血清PAF变化 治疗前死亡组和好转组的CSHB患者血清PAF含量均高于正常对照组, 差异有统计学意义(死亡组 F

■ 研发前沿

从循证医学的角度看, 病情轻重的判断指标, 不但要可靠而且应该量化, 这样才能对患者提供合理的检测和治疗, 并有可能预测并发症、死亡的发生。探讨评判重型肝炎预后的试验指标一直是研究的热点。

■创新盘点

本文联合检测重型肝炎患者血清PAF含量,血清内毒素值及肝功能指标,分析其与重型肝炎预后的关系,对重型肝炎患者的临床诊治和预后判断有一定的指导意义。

表 1 CSHB患者治疗前后血清ET及PAF (mean ± SD)

分组	n	ET(EU/mL)		PAF(μg/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
死亡组	23	0.91 ± 0.33 ^b	0.99 ± 0.35 ^d	5.31 ± 0.75 ^b	6.37 ± 1.19 ^d
好转组	26	0.78 ± 0.31 ^b	0.48 ± 0.18 ^f	5.12 ± 0.73 ^b	2.65 ± 0.52 ^f
正常对照组	20	0.26 ± 0.04		1.35 ± 0.21	

^bP<0.01 vs 正常对照组; ^dP<0.01 vs 治疗后好转组; ^fP<0.01 vs 治疗前好转组。

= 21.77, $P<0.01$; 好转组 $F = 15.78$, $P<0.01$); 治疗后死亡组血清PAF浓度高于治疗前水平, 但无明显差异($P>0.05$); 治疗后死亡组血清PAF浓度显著高于治疗后好转组, 差异有统计学意义($F = 9.12$, $P<0.01$); 好转组治疗后血清PAF浓度明显低于治疗前, 差异有统计学意义($F = 199.02$, $P<0.01$, 表1)。

2.3 CSHB患者ET血症发生率及与PAF含量的关系 根据测定的治疗前血清ET水平, 将患者分为ET阳性组和阴性组, ET阳性的标准为健康人(正常对照组)ET水平95%可信区间(0.24-0.28 EU/mL)的上限值0.28 EU/mL, 大于此值的为ET阳性组, 小于等于的为ET阴性组。49例CSHB患者ET阳性42例(85.71%)。49例CSHB患者PAF值均高于正常对照组, 差异有统计学意义(ET阳性组 $F = 15.95$, $P<0.01$; ET阴性组 $F = 68.69$, $P<0.01$); 发生ET血症的患者PAF浓度明显高于未发生ET血症的患者, 两者有显著性差异($F = 8.02$, $P<0.05$, 表2)。

2.4 CSHB患者血清PAF含量与ET及肝功能与预后的多因素Logistic回归分析 与CSHB患者的预后进行多因素Logistic回归分析的相关指标有年龄、ET、PAF、ALT、AST、TBIL、DBIL、TP、ALB、PLT, 其中PTA相关系数为-0.017, 与CSHB患者预后成负相关; ET、TBIL和PAF的相关系数为正值, 与CSHB患者预后成正相关(表3)。

3 讨论

本研究显示49例CSHB患者内毒素血症发生率为85.71%, 与文献[2-4]报道相似, 表明重型肝炎患者极易发生内毒素血症, 治疗后死亡组血ET水平明显高于好转组, 提示内毒素血症有明显进一步加重肝功能衰竭的作用, 其导致肝损害加重的可能机制有: (1)ET激活Kupffer细胞释放各种肝损伤因子和细胞因子, 其中肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)进一步激活细胞因子级联反应, 诱发IL-1、IL-6、IL-8、PAF、前列腺素和白三烯等的分泌, 由此发生了

表 2 CSHB患者ET血症发生率及与PAF含量的关系

分组	n	死亡(n)	PAF(μg/L)
正常对照组	20	0	1.35 ± 0.21
ET阳性组	42	20	5.26 ± 0.66 ^{ad}
ET阴性组	7	3	4.93 ± 1.12 ^d

^aP<0.05 vs ET阴性组; ^dP<0.01 vs 正常对照组。

炎症连锁反应, 引起肝脏炎症及肝微循环障碍从而造成肝损伤^[5-7]。(2)内毒素被肝细胞摄取后, 其毒性部分类脂质A被转运至线粒体内膜, 与特异受体结合, 抑制ATP合成酶及还原烟酰胺嘌呤二核苷酸NADH脱氢酶, 使能量生成受阻, 引起线粒体损伤^[8]。

本研究显示CSHB患者中, 好转组血清ET的水平较治疗前明显下降, 死亡组ET水平明显高于好转组, 同样Logistic回归分析提示患者预后与ET水平的变化显著相关, 表明血清ET是判断重型肝炎预后的重要指标。同时我们发现CSHB时血清PAF含量明显升高, 且发生ET血症时PAF含量也明显高于未发生ET血症的患者。提示PAF与重型肝炎病情程度及肝细胞受损的严重程度是一致的。

有研究通过动物实验发现血液中PAF与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)之间存在着相关性^[9-10]。静脉注射外源性PAF可致肠黏膜通透性显著升高, 血清LPS水平明显升高, 且有剂量依赖关系^[11]。PAF拮抗剂治疗能显著降低肠黏膜通透性和血清ET水平^[11]。ET是PAF强有力的激动剂, 可刺激单核-吞噬细胞释放PAF。反之, PAF也可破坏肠黏膜机械性屏障, 降低肠黏膜局部免疫功能, 使肠黏膜通透性增加, 引起肠源性感染, 继发ETM^[12], 提示PAF与ET互为因果, 他们的产生和释放过程既可以相互激发又具有协同作用, 共同参与肝细胞损害。

研究表明, 肝病患者血清PAF水平与ET呈

表 3 CSHB患者各项检查指标与预后的多因素Logistic回归分析

检查指标	回归系数	标准误	Wald值	P值	OR值(95%CI)
ET	0.042	0.020	4.591	0.032	0.040(0.922-0.996)
PAF	0.594	0.136	19.159	0.000	2.007(0.423-0.720)
TBIL	0.036	0.013	7.500	0.006	0.799(1.010-1.063)
PTA	-0.017	0.007	6.387	0.011	0.015(0.944-0.977)

正相关,尤其是在ET血症时,PAF升高更为明显.肝脏是PAF作用的主要靶器官,PAF与肝细胞、组织中的PAF受体(platelet activating factor receptor, PAFR)结合后,通过胞内信使二酰甘油和IP3完成信息传递,产生大量的花生四烯酸及其代谢产物,扩大炎症反应,引起毛细血管通透性增加,使血清大量渗出,血液黏滞度增加,血流速度减慢.同时中性粒细胞黏附聚集,促使血小板黏附聚集,最终造成肝脏微循环障碍,从而导致肝脏缺血缺氧.另外,PAF可促使其他细胞因子及炎性递质的产生.这样PAF与其他促炎细胞因子、炎性递质和血管活性物质形成恶性循环,产生一系列连锁反应和放大效应,即产生“瀑布效应”,扩大炎症反应.肝硬化时肠源性ET增加,而PAF升高更加显著.二者各自或联合刺激Kupffer细胞产生和释放更多的PAF.在ET刺激下产生PAF使疾病进一步恶化,病情变得更加复杂.PAFR拮抗剂可明显减轻ET造成的肝损伤^[13-16].同时,PAF通过增加黏附分子和诱导多形核嗜中性白细胞(PMN)聚集、活化、呼吸爆发、产生多种致炎因子增加PMN的黏附,导致粒细胞过度活化,活化后的粒细胞对肝细胞发挥致损伤作用^[17].

PAF与免疫性肝损伤.PAF可以通过免疫反应造成肝脏损伤.PAF在B淋巴细胞介导的肝细胞损伤过程中起着催化剂的作用,可活化早期B细胞,刺激B细胞产生的免疫球蛋白与抗原结合形成免疫复合物,激活补体,沉积于肝窦内皮细胞(EC)上,形成微血栓,造成微循环障碍,导致肝损伤.PAF在细胞毒性T细胞(Tc)的杀伤作用中可能起一定的介导作用.PAF可提高NK细胞的细胞毒性,加重肝细胞损伤.PAF还可提高单核巨噬细胞的吞噬能力和免疫球蛋白Fc片段表达,提高单核巨噬细胞产生和分泌TNF- α ,而后者又刺激单核巨噬细胞产生PAF,他们相互诱生,与其他炎症介质一起参与肝脏损伤过程^[18-19].

CSHB时肠源性ET血症发生率高(85.71%),发生内毒素血症是重型肝炎的危险因素;而且

血PAF水平高低是判断重型肝炎预后的重要因子,PAF较低者预后较好.

4 参考文献

- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会.病毒性肝炎防治方案.中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 韩德五.肠源性内毒素血症是肝炎、肝病的危险因素.山西医科大学学报 2006; 37: 1-4
- 夏晨梅,张顺财.内毒素血症致肝脏损伤.肝脏 2008; 13: 162-163
- Marshall JC. The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 479-484
- Wheeler MD. Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 300-306
- Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G256-G265
- Croner RS, Hoerer E, Kulu Y, Hackert T, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. *Crit Care* 2006; 10: R15
- Zhang HY, Han DW, Wang XG, Zhao YC, Zhou X, Zhao HZ. Experimental study on the role of endotoxin in the development of hepatopulmonary syndrome. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 567-572
- Howard KM, Olson MS. The expression and localization of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in endotoxemic rats. *J Biol Chem* 2000; 275: 19891-19896
- 余佩武,肖光夏,府伟灵,袁建成,秦孝健,周立新.血小板活化因子在烧伤大鼠早期肠源性内毒素血症发病中的作用.中华医学杂志 1999; 79: 136-138
- Slomiany BL, Slomiany A. Differential role of platelet-activating factor in gastric mucosal ulcer healing. *Inflammopharmacology* 2003; 11: 237-248
- Braquet P, Touqui L, Shen TY, Vargaftig BB. Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol Rev* 1987; 39: 97-145
- Yang Y, Harvey SA, Gandhi CR. Kupffer cells are a major source of increased platelet activating factor in the CCl4-induced cirrhotic rat liver. *J Hepatol* 2003; 39: 200-207
- Wu X, Zimmerman GA, Prescott SM, Stafforini DM. The p38 MAPK pathway mediates transcriptional activation of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2004; 279: 36158-36165
- Venkatesha RT, Ahamed J, Nuesch C, Zaidi AK, Ali H. Platelet-activating factor-induced chemokine gene expression requires NF-kappaB activation and

■同行评价

本文有一定的新颖性,特别是得出了与重型肝炎预后有关的相关因素,有较好的参考价值.

- Ca²⁺/calcineurin signaling pathways. Inhibition by receptor phosphorylation and beta-arrestin recruitment. *J Biol Chem* 2004; 279: 44606-44612
- 16 Wanten G, Kusters A, van Emst-de Vries SE, Tool A, Roos D, Naber T, Willems P. Lipid effects on neutrophil calcium signaling induced by opsonized particles: platelet activating factor is only part of the story. *Clin Nutr* 2004; 23: 623-630
- 17 王建宾, 何云. 血小板活化因子与肝损伤. 实用肝脏病杂志 2006; 9: 119-121
- 18 Sumita C, Maeda M, Fujio Y, Kim J, Fujitsu J, Kasayama S, Yamamoto I, Azuma J. Pioglitazone induces plasma platelet activating factor-acetylhydrolase and inhibits platelet activating factor-mediated cytoskeletal reorganization in macrophage. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1673: 115-121
- 19 Seo KH, Ko HM, Choi JH, Jung HH, Chun YH, Choi IW, Lee HK, Im SY. Essential role for platelet-activating factor-induced NF-kappaB activation in macrophage-derived angiogenesis. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2129-2137

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、CO₂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字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \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% CO₂, 50 mL/L CO₂; 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 2009-12-28)

益生菌对肝硬化患者肠黏膜通透性的影响

范妮, 田字彬, 孔心涓, 赵清喜, 魏良洲

范妮, 田字彬, 孔心涓, 赵清喜, 魏良洲, 青岛大学医学院附属医院消化科 山东省青岛市 266003

作者贡献分布: 此课题由田字彬与范妮设计; 临床病例选择由孔心涓、赵清喜及魏良洲协助完成; 研究过程及数据分析论文写作由田字彬指导, 范妮操作完成。

通讯作者: 田字彬, 教授, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化科. tianzb@qdmh.qd.sd.cn
电话: 0532-82911302

收稿日期: 2009-10-29 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-28

Bifico improves intestinal macromolecular permeability in patients with liver cirrhosis

Ni Fan, Zi-Bin Tian, Xin-Juan Kong, Qing-Xi Zhao, Liang-Zhou Wei

Ni Fan, Zi-Bin Tian, Xin-Juan Kong, Qing-Xi Zhao, Liang-Zhou Wei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Professor Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdmh.qd.sd.cn

Received: 2009-10-29 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To evaluate the effects of Bifico (live *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Enterococcus*, oral capsules) on the intestinal mucosal barrier in patients with liver cirrhosis.

METHODS: Thirty-four patients with portal hypertension and liver cirrhosis (Child-Pugh grade B) were randomly divided into two groups: patients receiving only routine symptomatic treatment (routine treatment group) and those receiving both routine symptomatic treatment and oral Bifico capsules 420 mg, three times daily for 2 weeks (Bifico treatment group). A normal control group was composed of 12 healthy individuals. Plasma diamine oxidase (DAO) and endotoxin (ETX) were detected before and after the therapy.

RESULTS: Plasma DAO and ETX levels were significantly higher (0.2502 ± 0.0969 kU/L and 0.2263 ± 0.1145 kU/L vs 0.1145 ± 0.0680 kU/L;

and 0.3801 ± 0.1929 EU/mL and 0.3283 ± 0.1251 EU/mL vs 0.2338 ± 0.0843 EU/mL, respectively; all $P < 0.05$ or 0.01) in patients with liver cirrhosis (the two treatment groups) than in healthy individuals (the normal control group). A linear correlation was noted in plasma ETX level and plasma DAO level ($r = 0.800$, $P < 0.01$). Compared with pre-treated patients, both plasma DAO and ETX levels significantly decreased in Bifico-treated patients (0.1635 ± 0.0592 kU/L vs 0.2502 ± 0.0969 kU/L, 0.2445 ± 0.1219 EU/mL vs 0.3801 ± 0.1929 EU/mL, $P < 0.05$). No significant differences were noted in plasma DAO and ETX levels in the routine treatment group between before and after therapy.

CONCLUSION: Plasma DAO and ETX are sensitive markers for measuring intestinal barrier function in patients with liver cirrhosis. Bifico can improve intestinal barrier function in patients with portal hypertension and liver cirrhosis.

Key Words: Liver cirrhosis; Intestinal mucosal barrier; Bifico; Diamine oxidase; Endotoxin

Fan N, Tian ZB, Kong XJ, Zhao QX, Wei LZ. Bifico improves intestinal macromolecular permeability in patients with liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3745-3748

摘要

目的: 探讨肝硬化门脉高压患者肠黏膜屏障功能及双歧杆菌等三联活菌胶囊(培菲康)对肝硬化患者肠黏膜通透性的影响。

方法: 选择我院肝硬化门脉高压、肝功能Child-pugh分级为B级的患者34例, 随机分为对照组和双歧杆菌等三联活菌胶囊(培菲康)治疗组, 两组均给予常规对症治疗, 治疗组加用培菲康, 每次420 mg, 每日3次, 口服2 wk. 所有患者均于治疗前后测定血清二胺氧化酶(DAO)及内毒素(ETX)含量. 另选12例健康体检者作为正常对照组。

结果: 肝硬化患者治疗组及对照组血清DAO及ETX含量均高于正常对照组, 差异有统计

■背景资料

近年来人们对于肠黏膜屏障功能的认识有了很大提高, 对其屏障监测与维护等方面的研究不断深入. 人们不断研究更为有效的措施来修护和预防肠黏膜屏障功能受损, 以减少细菌移位等发生几率, 对疾病的发生发展及预后等方面均有重要意义。

■同行评议者

范小玲, 主任医师, 北京地坛医院综合科

■ 研发前沿

目前有多种方法用于肠黏膜屏障功能的监测如分子探针(如乳糖甘露醇排泄率比值)、二胺氧化酶、内毒素、D-乳酸、黏膜组织学观察等。如何更有效监测肠黏膜屏障功能从而协助临床诊治等一直是研究的热点。

学意义(0.2502 ± 0.0969 kU/L, 0.2263 ± 0.1145 kU/L vs 0.1145 ± 0.0680 kU/L, $P < 0.01$; 0.3801 ± 0.1929 EU/mL, 0.3283 ± 0.1251 EU/mL vs 0.2338 ± 0.0843 EU/mL, 均 $P < 0.05$); 血清DAO及ETX两指标呈线性相关($r = 0.800$, $P < 0.01$); 培菲康组治疗后血清DAO及ETX水平较治疗前下降, 差异均有统计学意义(0.1635 ± 0.0592 kU/L vs 0.2502 ± 0.0969 kU/L, 0.2445 ± 0.1219 EU/mL vs 0.3801 ± 0.1929 EU/mL, $P < 0.05$); 对照组治疗后血清DAO及ETX水平较治疗前下降, 但差异无统计学意义。

结论: 血清DAO及ETX水平可作为肝硬化Child-pugh分级B级患者肠黏膜屏障功能的监测指标; 补充肠道益生菌可帮助改善肠黏膜屏障功能。

关键词: 肝硬化; 肠黏膜屏障; 培菲康; 二胺氧化酶; 内毒素

范妮, 田宇彬, 孔心涓, 赵清喜, 魏良洲. 益生菌对肝硬化患者肠黏膜通透性的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3745-3748

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3745.asp>

0 引言

近年来人们逐渐认识到, 肠道不仅是消化和吸收营养物质的功能器官, 也是阻止肠腔内细菌、毒素等有害物质侵入体内的重要屏障。目前对于肠屏障功能的认识及维护等研究不断深入, 以掌握更为有效的措施来监测和维护肠黏膜屏障功能。肝硬化患者免疫功能下降, 机体抵抗力不足, 一旦肠黏膜屏障受损、肠道细菌移位, 易并发严重感染, 而感染又会加大肝脏负荷加重病情, 甚至引起其他一系列严重后果, 故临床上应加强对肝硬化患者肠屏障功能障碍的早期关注。因此本研究旨在探讨肝硬化门脉高压患者肠黏膜屏障功能及双歧杆菌等三联活菌胶囊(培菲康)对肝硬化患者肠黏膜通透性的研究。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2009-03/07青岛大学医学院附属医院消化科住院的肝功能Child-pugh分级为B级的肝硬化患者34例, 年龄34-77(平均53.65)岁, 男23例, 女11例。入选标准: 均经临床表现、各种生化指标及腹部B超或CT等检查确诊, 符合内科学(第7版)诊断标准^[1]; 无合并肝外疾病所致的慢性腹泻、吸收不良性疾病; 既往无胃肠道或腹腔外科手术史; 近2 wk未使用抗生素、微生

态制剂等; 无其他部位的感染(除自发性腹膜炎外)。排除标准: 合并严重并发症, 如上消化道大出血、肝性脑病、原发性肝癌、严重感染等的患者除外; 近2 wk服用抗生素或微生态制剂等影响肠黏膜通透性的药物者除外。

1.2 方法

1.2.1 分组及治疗: 入选者随机分为2组, 对照组给予常规保肝利尿等对症治疗, 治疗组给予培菲康(双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、肠球菌三联活菌胶囊, 上海信谊制药总厂生产, 每粒210 mg), 每次420 g, 每日3次, 服用2 wk, 其他保肝对症治疗同对照组。所有患者均于入院第2天空腹抽血测血清二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)及内毒素(endotoxin, ETX)含量, 2 wk后复测血清DAO及ETX含量, 期间避免使用抗生素、乳果糖等影响肠黏膜通透性的药物。选择12例健康体检者作为正常对照组, 其性别和年龄与实验组比较差别无统计学意义。

1.2.2 血清DAO及ETX含量检测: 活性比色法定量检测血清DAO含量, 试剂盒由上海杰美基因医药科技有限公司提供, 使用深圳市雷杜电子有限公司RT-2100C酶标仪450 nm测定; 显色基质鲎实验法测定血清ETX含量, 鲎试剂盒由厦门市鲎试剂实验厂有限公司提供, 用上海精密科学仪器有限公司723分光光度计545 nm进行比色。

统计学处理 实验数据均以mean \pm SD表示。统计学方法为 t 检验、方差分析及直线相关分析。应用SPSS11.5进行统计分析。

2 结果

2.1 肝硬化患者与正常对照组之间血清DAO、血清ETX含量比较 肝硬化患者治疗组血清DAO水平(0.2502 ± 0.0969 kU/L)、肝硬化患者对照组血清DAO水平(0.2263 ± 0.1145 kU/L)均高于正常对照组(0.1145 ± 0.0680 kU/L), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。肝硬化患者治疗组血清ETX水平(0.3801 ± 0.1929 EU/mL)、肝硬化患者对照组血清ETX水平(0.3283 ± 0.1251 EU/mL)亦高于正常对照组(0.2338 ± 0.0843 EU/mL), 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.2 肝硬化患者血清DAO及ETX水平的相关性分析 Pearson相关分析提示血清DAO水平与ETX水平之间呈线性相关($r = 0.800$, $P < 0.01$)。

2.3 治疗前后血清DAO及ETX水平的比较 培菲康组治疗后血清DAO水平(0.1635 ± 0.0592 kU/L)较治疗前(0.2502 ± 0.0969 kU/L)下降, 差

异有统计学意义($P<0.01$). 培菲康组治疗后血清ETX水平(0.2445 ± 0.1219 EU/mL)较治疗前(0.3801 ± 0.1929 EU/mL)下降, 差异有统计学意义($P<0.01$); 对照组治疗后血清DAO及ETX水平较治疗前也有所下降, 但差异经统计学检验结果无统计学意义(表1).

3 讨论

肠黏膜屏障主要包括机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障. 由完整的肠黏膜上皮及其细胞间的紧密连接组成机械屏障, 可有效阻止细菌等深入机体内部. 胃肠道所分泌的大量消化液及胆汁等构成一道化学屏障. 肠道的免疫屏障是与机体全身性免疫不同的局部免疫系统, 其中由黏膜固有层的浆细胞合成分泌的分泌性IgA(sIgA)扮演重要角色^[2]. 至于肠道的生物屏障则由其内相互拮抗又互相依存的各菌群所维持的动态平衡来保障. 目前临床上多采用间接方法监测肠黏膜的屏障功能, 常用方法有分子探针、DAO、D-乳酸、ETX测定、组织培养或通过PCR扩增鉴定细菌移位、活检、sIgA的检测及肠上皮内淋巴细胞计数等^[3-8].

我们的研究中选择血清DAO和ETX两指标来监测肠黏膜屏障功能, DAO大部分存在于小肠黏膜绒毛, 其活性与绒毛高度和黏膜细胞内的核酸和蛋白质合成密切相关, 是反映小肠黏膜结构与功能的理想指标. ETX是G-菌细胞壁外层结构, 其主要成分是脂多糖. 在创伤、感染等情况下, 肠道缺血缺氧, 细菌大量增殖, 释放ETX通过受损的肠黏膜屏障入血. 目前常应用改良鲎实验法测定. 我们的结果显示两指标呈线性相关, 可反映患者的肠黏膜屏障功能状态.

研究中肝硬化门脉高压患者血清DAO及ETX水平均显著高于正常对照组, 从而推断患者的肠黏膜通透性增加, 肠黏膜屏障功能受损. 可能与以下几个方面有关: (1)肝硬化患者进入失代偿期后, 机体出现一系列病理生理变化, 肝功能下降, 长期门脉压力过高, 黏膜下血管扩张淤血, 肠黏膜相对缺血缺氧, 引起肠上皮细胞内线粒体功能受损, 导致细胞内酸中毒, 肠道绒毛的微循环结构损害, 易发生充血水肿糜烂等, 肠黏膜上皮通透性增高, 细菌移位等可能性增加; (2)缺血后再灌注, 过量氧自由基损伤肠黏膜细胞, 影响黏膜修复; (3)肠腔内细菌过度繁殖, 产生大量代谢产物和毒素, 细菌ETX的直接作用及炎症介质和细胞因子的介导, 致肠黏膜水肿, 上皮

表 1 各组血清DAO和ETX水平 (mean \pm SD)

分组	n	DAO(kU/L)	ETX(EU/mL)
治疗组			
治疗前	20	0.2502 \pm 0.0969 ^b	0.3801 \pm 0.1929 ^a
治疗后	20	0.1635 \pm 0.0592 ^{ad}	0.2445 \pm 0.1219 ^d
对照组			
治疗前	14	0.2263 \pm 0.1145 ^b	0.3283 \pm 0.1251 ^a
治疗后	14	0.2220 \pm 0.0893 ^b	0.3209 \pm 0.1015 ^a
正常对照组	12	0.1145 \pm 0.0680	0.2338 \pm 0.0843

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 正常对照组; ^d $P<0.01$ vs 本组治疗前.

细胞增殖受抑制, 细胞凋亡加速, 细胞坏死增多, 肠屏障功能进一步下降^[9-10].

有临床研究显示肝硬化患者存在不同程度的菌群失调^[11]. 作为肠黏膜屏障重要成员的肠道菌群一旦失调, 由外籍菌占据优势地位, 势必危害机体健康. 补充含有足够数量的非致病性的特定活菌制剂-益生菌使原籍菌重新成为优势菌群, 可保护和稳定黏膜屏障, 提高黏膜对致病菌的免疫应答, 刺激肠道免疫细胞而诱导机体特异性免疫和非特异性免疫, 增强机体免疫功能^[12], 阻止致病菌或条件致病菌与肠黏膜上皮细胞的再黏附, 这样肠道微生态环境恢复正常, 菌群失调纠正、肠黏膜屏障作用得以重建^[13]. 临床常用的有乳酸菌、双歧杆菌、肠球菌和芽孢杆菌等. 益生菌直接参与机体的生物屏障结构, 发挥生物拮抗作用, 其部分代谢产物如乙酸、乳酸、过氧化氢、细菌素^[14]等参与构成肠道内的化学屏障, 其本身所特有的某些酶类可补充宿主在消化酶上的不足, 促进某些人体必需的维生素、氨基酸、微量元素及无机盐类的吸收和利用^[15]. 双歧杆菌的代谢过程中产生酸性物质, 降低肠道pH值, 直接影响G-菌定植存活和繁殖, 使ETX生成和吸收减少, 血中ETX下降, 从而减轻对肝脏的损害.

在我们的研究中肝硬化患者保肝利尿等对症治疗基础上加以口服益生菌治疗, 患者DAO及ETX水平较对照组下降更为显著, 提示补充肠道益生菌, 可改善菌群失调, 进而促进生物屏障功能恢复、维护肠黏膜屏障及减少ETX生成和吸收, 使肝脏负担得以减轻, 可用于肝硬化患者的辅助治疗.

肝硬化存在许多促进肠道细菌移位发生的因素, 同时细菌移位又与肝硬化多种并发症密切相关, 目前多数临床医师对早期关注肠屏障

■应用要点

本研究证实, 血清DAO及ETX水平可作为肝硬化Child-pugh分级B级患者肠黏膜屏障功能的监测指标; 补充肠道益生菌可帮助改善肠黏膜屏障功能.

■同行评价

本文研究了益生菌对肝硬化患者肠黏膜通透性的影响,紧扣肝硬化临床研究热点,对临床应用有一定的指导意义。

功能仍未引起足够重视,往往是在出现肠屏障功能障碍后再实施保护措施,存在一定的滞后性,临床上对患者如能进行肠黏膜通透性监测,将对减少肠源性感染的发生并及早采取防治对策、降低病死率有十分重要的作用。

4 参考文献

- 1 陆再英,钟南山. 内科学. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 452-453
- 2 尉秀清,姚集鲁,文卓夫. 肠道粘膜屏障功能及其临床检测. 国外医学·内科学分册 2004; 31: 415-418
- 3 覃慧敏,吴春明,李洪涛,李国军,宋建新. 高效液相色谱用于肝硬化大鼠肠道通透性的测定. 中华医学杂志 2008; 32: 113-115
- 4 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
- 5 Lostia AM, Lionetto L, Principessa L, Evangelisti M, Gamba A, Villa MP, Simmaco M. A liquid chromatography/mass spectrometry method for the evaluation of intestinal permeability. *Clin Biochem* 2008; 41: 887-892
- 6 郝波,胡森. 创伤和感染后肠功能检测方法的研究进展. 感染、炎症、修复 2005; 6: 242-244
- 7 黎君友,于燕,郝军,晋桦,许惠君. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性. 氨基酸和生物资源

1996; 18: 28-30

- 8 Campillo B, Pernet P, Bories PN, Richardet JP, Devanlay M, Aussel C. Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 755-759
- 9 郑盛, 刘海. 肠道屏障功能障碍与自发性细菌性腹膜炎. 实用肝脏病杂志 2007; 10: 422-423
- 10 袁春,叶进. 肝硬化和肠道细菌移位. 临床消化病杂志 2008; 20: 121-123
- 11 张东绅,黄志华,陈如. 肝硬化患者口服培菲康和妈咪爱对肠道菌群影响的研究. 中国微生态学杂志 2004; 16: 109
- 12 Donnet-Hughes A, Rochat F, Serrant P, Aeschlimann JM, Schiffrin EJ. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci* 1999; 82: 863-869
- 13 王曦钟,吕益中,梁水权,李耀峰. 微生态制剂与胃肠粘膜屏障. 中国基层医药 2005; 12: 217-218
- 14 Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 403-412
- 15 Kamao M, Tsugawa N, Nakagawa K, Kawamoto Y, Fukui K, Takamatsu K, Kuwata G, Imai M, Okano T. Absorption of calcium, magnesium, phosphorus, iron and zinc in growing male rats fed diets containing either phytate-free soybean protein or soybean protein isolate or casein. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2000; 46: 34-41

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》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(科学编辑:李军亮 2009-12-28)

性激素及其受体与肝硬化的相关性

张达利, 王健, 李毅平, 虞胜, 李勇

张达利, 王健, 李毅平, 虞胜, 李勇, 上海中医药大学附属上海市中医医院消化科 上海市 200071
上海市卫生局基金资助项目, No. 054030
上海市教委创新基金资助项目, No. 09YZ134
上海市自然科学基金项目, No. 09ZR1429700
作者贡献分布: 张达利与李勇对此文所作贡献均等; 此课题由李勇与张达利设计; 研究过程由张达利与李勇操作完成; 王健、李毅平及虞胜参与部分实验操作; 研究所用新试剂及分析工具由李勇提供; 数据分析由张达利完成; 本论文写作由张达利与李勇完成。
通讯作者: 李勇, 副主任医师, 200071, 上海市, 上海中医药大学附属上海市中医医院消化科. liyong8256@sohu.com
电话: 021-56639828-2303
收稿日期: 2009-09-27 修回日期: 2009-11-20
接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-28

Correlations of the expression of sex hormones and their receptors with the evolution of hepatic cirrhosis

Da-Li Zhang, Jian Wang, Yi-Ping Li, Sheng Yu, Yong Li

Da-Li Zhang, Jian Wang, Yi-Ping Li, Sheng Yu, Yong Li, Department of Gastroenterology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

Supported by: the Science Foundation of Shanghai Municipal Public Health Bureau, No. 054030; and the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission, No. 09YZ134; and the Natural Science Foundation of Shanghai, No. 09ZR1429700

Correspondence to: Yong Li, Department of Gastroenterology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China. liyong8256@sohu.com

Received: 2009-09-27 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the correlations of the expression of sex hormones and their receptors with the evolution of hepatic cirrhosis and search more sensitive and specific diagnostic markers for hepatic cirrhosis.

METHODS: A total of 49 male patients treated at Shanghai Hospital of Traditional Chinese Medicine from January 2008 to April 2009 were included in the study, of which 9 had chronic hepatitis B (CHB), 9 had compensated cirrhosis,

and 31 had decompensated cirrhosis. A control group was composed of 25 healthy individuals. The levels of estradiol (E2) and testosterone (T) in serum were examined by radioimmunoassay. The expression of estrogen receptor (ER) and androgen receptor (AR) mRNAs in peripheral leukocytes was examined by real-time PCR. The correlations of the above parameters with the evolution of hepatic cirrhosis were then analyzed.

RESULTS: Compared with healthy controls, serum E2 level and the expression of sex hormone receptors in peripheral leukocytes significantly increased, and serum T level decreased in patients with chronic liver disease, particularly cirrhosis. The liver function score in patient with chronic liver disease had a positive correlation with serum E2 level ($r = 0.914, P < 0.01$), but a negative correlation with serum T level ($r = -0.833, P < 0.01$). Both the expression of ER ($r = 0.896, P < 0.01$) and AR ($r = 0.905, P < 0.01$) had a positive correlation with the liver function score in patients with chronic liver disease.

CONCLUSION: The expression levels of sex hormones and their receptors vary greatly among patients with CHB, compensated cirrhosis and decompensated cirrhosis, and exhibit regular changes with the worsening of disease and liver function.

Key Words: Sex hormone; Cirrhosis; Sex hormone receptor

Zhang DL, Wang J, Li YP, Yu S, Li Y. Correlations of the expression of sex hormones and their receptors with the evolution of hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3749-3751

摘要

目的: 探讨性激素及其受体与肝硬化进展的相关性, 为肝硬化临床无创性诊断筛选出较敏感、特异的诊断标志物。

方法: 2008-01/2009-04上海市中医医院消化内科门诊及住院男性乙型肝炎、肝硬化患者49

■背景资料

临床上, 筛查肝硬化及反应肝病病情进展的实验室指标较少, 且特异性、敏感性均不高, 给肝病普查及早期诊断早期治疗带来困难。研究表明, 性激素及其受体与肝病进展密切相关, 本试验旨在通过研究外周血性激素水平与慢性肝病进展相关性, 发现反应肝病进展的实验室指标。

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

■研发前沿

临床上,筛查肝硬化及反映肝病病情进展的实验室指标较少,且特异性、敏感性均不高,给肝病普查及早期诊断和治疗带来困难。因此,近年来,筛选敏感性、特异性、无创性、易于操作的实验室指标,研究无创性评估系统,成为目前肝病研究热点。

例,其中乙型肝炎肝组9例,肝硬化代偿期9例,肝硬化失代偿期组31例;正常对照组为健康体检者25例。通过放射免疫法检测E2、T水平;Real-time PCR检测慢性肝病患者外周血白细胞ER、AR mRNA表达水平,观察以上各检测指标与肝硬化进展的相关性。

结果:慢性肝病,特别是肝硬化患者E2水平,ER、AR表达水平较正常对照组均有升高,T水平较正常对照组明显降低。慢性肝病患者肝功能评分与患者E2水平均存在正相关($r = 0.914, P < 0.01$),与T水平存在负相关($r = -0.833, P < 0.01$),与ER表达水平存在正相关($r = 0.896, P < 0.01$),与AR表达水平存在正相关($r = 0.905, P < 0.01$)。

结论:慢性乙型肝炎、肝硬化代偿期、肝硬化失代偿期患者性激素及其受体水平存在显著差异,随着病情发展,肝功能损伤越严重,这些指标呈规律性变化。

关键词:性激素;肝硬化;性激素受体

张达利,王健,李毅平,虞胜,李勇.性激素及其受体与肝硬化的相关性.世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3749-3751
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3749.asp>

0 引言

肝硬化是常见病和多发病,尤其是由乙型病毒性肝炎所引起的肝硬化最为常见,但是其进展过程却呈现长期、隐匿的特点。目前肝活检仍是慢性肝病的诊断及病情估计的金标准,但其是一种创伤性检查,给患者带来巨大痛苦和经济负担,临床推广受到严重限制。临床筛查肝硬化及反映肝病病情进展的实验室指标较少,且特异性、敏感性均不高,给肝病普查及早期诊断治疗带来困难。现代研究发现,性激素及其受体水平与乙型肝炎、肝硬化、肝癌关系密切,那么他们与慢性肝病的发生发展及预后有这样的关系,其能否作为评估慢性肝病病情进展的实验室指标呢?为此我们观察了49例慢性肝病患者外周血性激素及其受体水平的差异,现将结果报告如下。

■应用要点

本研究为筛查反应肝病进展的无创性实验室指标提供有用信息,为进一步研究外周血性激素水平与肝脏病理改变,对纤维化、肝硬化程度有一定指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-01/2009-04上海市中医医院消化内科门诊及住院男性乙型肝炎、肝硬化患者49例,患者分为:乙型肝炎肝组9例,年龄19-68(平均42.67)岁;肝硬化代偿期组9例,年龄37-54(平均47.7)岁;肝硬化失代偿期组31例,年

龄30-77(平均53.0)岁。正常对照组为健康体检者25例,年龄32-64(平均53.2)岁,无肝病史、内分泌病及输血史,HBV标志物检查阴性,肝功能检查正常。慢性肝病组及对照组患者BMI<24,以消除肥胖引起的脂质代谢紊乱。

1.2 方法 受试者清晨空腹静脉采血,睾酮(T)、雌二醇(E2)的测定采用放射免疫法,以上均由本院检验科测定;雌激素受体(ER)、雄激素受体(AR)的测定采用Real-Time PCR法,Real-Time PCR试剂盒购自TaKaRa公司,红细胞裂解液购自Becton Dickinson, TRIzol购自Ambion公司,引物由上海英骏公司设计,方法按说明书要求操作。

统计学处理 所有数据均采用SPSS17.0软件处理。计量资料用mean±SD表示,多组间均数比较采用方差分析;有无相关性采用直线相关, $P < 0.05$ 为有统计意义。

2 结果

2.1 慢性肝病各组间E2、T水平及其受体的比较 慢性肝病,特别是肝硬化患者E2水平,ER、AR表达水平较正常对照组均有升高,T水平较正常对照组明显降低,各组间差异见表1。

2.2 慢性肝病肝功能分级组间性激素及其受体表达水平差异性分析 慢性肝病Child A、B、C各组患者E2、T、ER、AR表达水平均存在明显差异(表2)。

2.3 相关性分析 慢性肝病患者肝功能评分与患者E2水平均存在正相关(pearson correlation r : 0.914, $P < 0.01$),与T水平存在负相关(pearson correlation r : -0.833, $P < 0.01$),与ER表达水平存在正相关(pearson correlation r : 0.896, $P < 0.01$),与AR表达水平存在正相关(pearson correlation r : 0.905, $P < 0.01$)。

3 讨论

慢性肝病是常见病多发病,其发病隐匿,预后不佳,对人民健康造成极大危害。临床上,筛查肝硬化及反映肝病病情进展的实验室指标较少,且特异性、敏感性均不高,给肝病普查及早期诊断和治疗带来困难。因此,近年来,筛选敏感性、特异性、无创性、易于操作的实验室指标,研究无创性评估系统,成为目前肝病研究热点^[1]。肝脏是激素转化、降解的重要器官。但激素并不是简单、被动的在肝内被代谢降解,其本身或代谢产物均参与肝脏疾病的发生、发展过程^[2]。早在1982年在意大利Serono召开的内分泌与肝脏专题研讨会提出了“下丘脑-垂体-肝轴”的新

表 1 慢性肝病组患者E2、T水平、ER、AR的表达 (mean ± SD)

分组	n	E2(ng/L)	T(μg/L)	ER	AR
正常对照组	25	31.92 ± 3.33	7.17 ± 1.31	1.05 ± 0.27	0.99 ± 0.48
慢性乙型肝炎	9	38.80 ± 4.92 ^a	6.14 ± 1.74	0.64 ± 0.24 ^a	1.35 ± 0.04
肝硬化代偿期	9	37.25 ± 3.95 ^a	5.15 ± 1.58 ^a	6.06 ± 2.26 ^a	2.12 ± 0.16 ^a
肝硬化失代偿期	31	55.52 ± 5.12 ^a	3.51 ± 1.41 ^a	18.71 ± 3.16 ^a	19.08 ± 3.90 ^a

^aP<0.05 vs 正常对照组.

表 2 慢性肝病患者Child分级各组E2、T、ER、AR的表达 (mean ± SD)

分组	n	E2(ng/L)	T(μg/L)	ER	AR
正常对照组	25	31.92 ± 3.33	7.17 ± 1.31	1.05 ± 0.27	0.99 ± 0.48
Child A组	24	41.66 ± 7.72 ^a	5.67 ± 1.44 ^a	6.72 ± 5.92 ^a	5.53 ± 6.07 ^a
Child B组	16	53.64 ± 4.40 ^a	3.37 ± 0.82 ^a	18.00 ± 4.51 ^a	18.15 ± 4.87 ^a
Child C组	9	60.84 ± 2.35 ^a	2.25 ± 0.87 ^a	22.50 ± 4.73 ^a	22.90 ± 2.97 ^a

^aP<0.05 vs 正常对照组.

概念, 肝脏被认为是综合激素、介质等调节因子为一个统一体的重要部位. 现代研究发现^[3], 性激素及其受体水平与乙型肝炎、肝硬化、肝癌关系密切, 研究结果显示, 高分化肝癌组织中AR、ER表达明显高于低分化癌组织, 两者间差别显著($P<0.05$), 提示AR、ER是在肝癌发生的早期阶段起主要作用, 当肿瘤发展到晚期, 肿瘤细胞分化不成熟, AR、ER的含量也逐渐减少; 低分化癌细胞由于分化不成熟, 合成AR、ER的能力减弱, 因而表达水平降低. 因此国内、外多数研究认为, ER、AR可能是肝细胞分化的一种标志^[4], 可以作为疾病预后的观察指标. 那么慢性肝病患者性激素及其受体水平能否作为评估慢性肝病病情进展的实验室指标呢?

我们研究结果表明慢性乙型肝炎、肝硬化代偿期、肝硬化失代偿期患者存在不同程度的性激素代谢紊乱现象, 随着慢性乙型肝炎向肝硬化代偿期、肝硬化失代偿期进展, 肝功能损伤由Child A级向Child C级演变, E2、ER、AR水平越高、T水平越低, 呈规律性变化. 我们考虑为HBV感染后, 肝功能损害, 肝脏内17-β氢化酶活性减低, 减少雄烯二酮向T转化, 性激素结合球蛋白(sex hormone binding globulin, SHBG)增多, E2的反馈调节等^[5]使游离T减少活性降低; 肝功能损害对E2灭活降低, 侧枝循环的开放使E2逃逸肝脏代谢^[6]等均使得E2水平升高. 我们研究结果表明外周血ER、AR表达水平与文献报道的肝脏组织中ER、AR表达水平一致, 均与慢

性肝病预后密切相关.

总之, 对慢性肝病患者进行外周血细胞T、E2、ER、AR水平检测, 在一定程度上反映了肝脏损害的程度, 随着乙型肝炎向肝硬化代偿期、肝硬化失代偿期的进展中, 性激素及受体水平出现显著差异, 有统计学意义, 外周血性激素受体水平能基本反映慢性肝病细胞的性激素受体水平. 且外周血可反复抽取, 取材方便. 本研究提示性激素及受体水平可能是反映慢性肝炎、肝硬化、肝癌等疾病进程及预后的有用指标, 其大样本、远期的临床研究有待今后进一步完善.

4 参考文献

- 1 姚希贤, 南月敏, 王莹, 李凤林, 郭瑞军. 高脂高糖、饮酒建立家兔脂肪肝模型及超声量化诊断. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1481-1486
- 2 石胜利, 聂玉强. 脂联素与非酒精性脂肪肝病. 世界华人消化杂志 2007; 15: 272-275
- 3 Eagon PK, Francavilla A, DiLeo A, Elm MS, Gennari L, Mazzaferro V, Colella G, Van Thiel DH, Strazl TE. Quantitation of estrogen and androgen receptors in hepatocellular carcinoma and adjacent normal human liver. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1303-1308
- 4 Robins DM. Androgen receptor and molecular mechanisms of male-specific gene expression. *Novartis Found Symp* 2005; 268: 42-52; discussion 53-56, 96-99
- 5 Zifroni A, Schiavi RC, Schaffner F. Sexual function and testosterone levels in men with nonalcoholic liver disease. *Hepatology* 1991; 14: 479-482
- 6 Walvoord E. Sex steroid replacement for induction of puberty in multiple pituitary hormone deficiency. *Pediatr Endocrinol Rev* 2009; 6 Suppl 2: 298-305

■同行评价

本文对性激素及其受体与肝硬化的相关性进行研究, 结论明确、科学, 有一定的参考价值.

P-gp、GST- π 和P53在胆囊癌中的表达及意义

智迎辉, 宋茂民, 龙 锦, 郭仁宣

■背景资料

P-gp可由ATP功能发生能量依赖性变构,通过疏水区形成的通道主动将抗肿瘤药物泵至细胞外,使细胞内药物蓄积下降。GST- π 参与机体解毒作用,通过加强亲电物质与GST及亲脂性细胞毒药物结合增加其水溶性,降低化疗药物的细胞毒性。P-gp和GST- π 参与恶性肿瘤的发生发展过程,并诱导肿瘤治疗过程中多药耐药的产生。P53基因产物与多药耐药相关蛋白相互作用,参与肿瘤细胞耐药性的调节。

智迎辉, 宋茂民, 首都医科大学附属北京天坛医院普外科 北京市 100050
龙锦, 郭仁宣, 中国医科大学附属第一医院普外二科 辽宁省沈阳市 110001
首都医科大学附属北京天坛医院青年科研基金资助项目, No. 2005-012
作者贡献分布: 此课题由智迎辉、宋茂民及郭仁宣共同设计; 智迎辉负责标本收集; 实验过程由智迎辉完成; 实验结果判定由龙锦与智迎辉完成; 临床资料收集和数据分析由智迎辉与龙锦完成; 本论文写作由智迎辉完成。
通讯作者: 智迎辉, 主治医师, 100050, 北京市崇文区天坛西里六号, 首都医科大学附属北京天坛医院普外科。
yinghuihui@gmail.com
电话: 010-67096589
收稿日期: 2009-10-23 修回日期: 2009-11-23
接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-28

Prognostic significance of P-gp, GST- π and P53 expression in gallbladder carcinoma

Ying-Hui Zhi, Mao-Min Song, Jin Long, Ren-Xuan Guo

Ying-Hui Zhi, Mao-Min Song, Department of General Surgery, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China
Jin Long, Ren-Xuan Guo, the Second Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: the Youth Science Fund of Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, No. 2005-012
Correspondence to: Ying-Hui Zhi, Department of General Surgery, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, 6 Tiantanxili, Chongwen District, Beijing 100050, China. yinghuihui@gmail.com
Received: 2009-10-23 Revised: 2009-11-23
Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the correlations of the expression of P-glycoprotein (P-gp), Glutathione-S-transferase- π (GST- π) and P53 with the clinicopathological features and prognosis of gallbladder carcinoma.

METHODS: Forty-nine patients with gallbladder carcinoma who did not undergo chemotherapy before surgery were included in the study. The expression of P-gp, GST- π and P53 in gallbladder carcinoma was detected by immunohistochemistry. The correlations of P-gp, GST- π and P53 expression with the clinicopathological

features and prognosis of gallbladder carcinoma were analyzed.

RESULTS: The positive rates of P-gp, GST- π and P53 expression in gallbladder carcinoma were 75.5% (37/49), 65.3% (32/49), and 69.4% (34/49), respectively. There were positive correlations between P-gp and P53 expression and lymph node metastasis (both $P < 0.05$). The positive rate of GST- π expression in moderately or poorly differentiated carcinoma was higher than that in well-differentiated carcinoma ($P < 0.05$). The positive rate of P53 expression was significantly higher in carcinoma at Nevin stage S₄-S₅ (80.0%) than in that at Nevin stage S-S₃ (80.0% vs 52.6%, $P < 0.05$). A significant correlation was also noted between the expression of P53 and P-gp in gallbladder carcinoma ($r = 0.343$, $P < 0.05$). Patients with positive P-gp and GST- π expression had much lower survival rate than those with negative expression.

CONCLUSION: Detection of P-gp, GST- π and P53 expression is of great significance for analyzing clinicopathological features and predicting prognosis of gallbladder carcinoma.

Key Words: Gallbladder neoplasm; P-glycoprotein; Glutathione-S-transferase; P53

Zhi YH, Song MM, Long J, Guo RX. Prognostic significance of P-gp, GST- π and P53 expression in gallbladder carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3752-3755

摘要

目的: 探讨P-gp、GST- π 和P53的表达与胆囊癌临床病理因素及预后的相关性。

方法: 应用免疫组织化学SP法对术前未经化疗的49例胆囊癌术后标本P-gp、GST- π 和P53的表达进行检测,分析P-gp、GST- π 和P53的表达与胆囊癌临床病理因素及预后的相关性。

结果: P-gp、GST- π 和P53在胆囊癌组织中的阳性表达率分别为75.5%(37/49)、65.3%(32/49)和69.4%(34/49)。P-gp、P53的表

■同行评议者

刘云鹏, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科

达与淋巴结转移情况呈正相关($P<0.05$). 临床分期 S_4 、 S_5 期和有淋巴结转移的胆囊癌P53表达率显著高于 S_1 - S_3 期和淋巴结未转移者(80.0% vs 52.6%, $P<0.05$). 中低分化胆囊癌的GST- π 表达率显著高于高分化及乳头状腺癌(均 $P<0.05$). P-gp和P53的表达之间具有正相关性($r = 0.343$, $P<0.05$). P-gp和GST- π 表达阳性者累积生存率显著低于阴性者.

结论: P-gp, GST- π 和P53是反映胆囊癌生物学行为的重要指标. 联合检测P-gp和GST- π 的表达对胆囊癌预后的判定具有重要的参考价值.

关键词: 胆囊肿瘤; P-糖蛋白; 谷胱甘肽-S-转移酶; P53

智迎辉, 宋茂民, 龙锦, 郭仁宣. P-gp、GST- π 和P53在胆囊癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3752-3755
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3752.asp>

0 引言

胆囊癌的发生和发展是个体基因表达质变和量变的多基因变化过程, 其确切的机制尚不清楚^[1]. P-糖蛋白(P-glycoproteins, P-gp)是多药耐药基因(multidrug resistance-1, MDR-1)过表达产生的一种膜相关糖蛋白, 它能够利用ATP形成疏水通道将抗肿瘤药物泵至细胞外. 胎盘型谷胱甘肽-S-转移酶- π (glutathione-S-transferase- π , GST- π)参与机体解毒作用, 提高肿瘤细胞对化疗药物的抗毒性. 基因水平的研究发现, 突变型P53通过抑制凋亡、促进MDR-1扩增等作用使肿瘤细胞耐药^[2]. 胆囊癌恶性程度较高, 化疗效果不佳. 国内外关于胆囊癌中多药耐药相关蛋白变化及多药耐药形成机制方面的研究尚少. 本研究探讨P-gp、GST- π 和P53的表达与胆囊癌临床病理因素及预后的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 收集原发性胆囊癌石蜡固定标本49例, 男24例, 女25例, 年龄34-78岁, 男性平均年龄 62.0 ± 9.8 岁, 女性平均年龄 54.5 ± 9.3 岁. 病理组织学类型均为腺癌: 高分化16例(32.7%), 中分化17例(34.7%), 低分化10例(20.4%), 另外乳头状腺癌6例, 占12.2%; 依据Nevin分期标准, 临床分期: S_1 、 S_2 、 S_3 期共19例(38.8%), S_4 、 S_5 期共30例(61.2%), 有淋巴结转移者27例(55.1%), 无淋巴结转移者22例(44.9%). 所有病例术前均未经放化疗及免疫治疗. 完整随访40例, 随访率为

82%(40/49), 随访时间为6-49 mo. 鼠抗人P-gp、GST- π 和P53单克隆抗体, SP免疫组织化学试剂盒、DAB显色试剂盒均为福州迈新生物技术开发公司(Maxim Biotechnology, Inc.)产品.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学SP法: 切片脱蜡, 0.3% H_2O_2 甲醇液作用10 min, 抗原热修复, 10%羊血清作用20 min, 滴加一抗过夜, 滴加二抗, 加入辣根标记链霉卵白素液, DAB染色, 苏木精复染, 二甲苯透明, 封片. 以PBS置换一抗作为阴性对照, 以已知阳性切片作为阳性对照.

1.2.2 结果判定: 采用双盲法. 光镜下观察GST- π 免疫组织化学染色以肿瘤细胞胞质中出现棕黄色颗粒为阳性细胞, P-gp以肿瘤细胞胞质中或胞膜上出现棕黄色颗粒为阳性细胞, P53为细胞核阳性. 每张切片在400倍光镜下至少观察10个高倍视野, 每个视野记数100个细胞, 按阳性细胞占肿瘤细胞的百分率分级. P-gp和GST- π 结果判定分为4个等级: $<5\%$ 为阴性, $5\%-30\%$ 为+, $30\%-75\%$ 为++, $>75\%$ 为+++. P53结果判定以 $<10\%$ 为阴性, $10\%-25\%$ 为+, $26\%-50\%$ 为++, $>50\%$ 为+++.

统计学处理 应用SPSS10.0软件进行统计分析, 采用 χ^2 检验, 相关性分析采用Spearman等级相关检验. 术后累积生存率分析采用Kaplan-Meier法, 两组生存期比较采用Logrank检验.

2 结果

2.1 P-gp、GST- π 和P53的表达 GST- π 行免疫组织化学染色后, 阳性产物主要定位于肿瘤细胞胞质中, 呈棕黄色颗粒, 一些内皮细胞也有着色, 其分布呈异质性(图1A). P-gp以肿瘤细胞胞质中或胞膜上出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 其分布也呈异质性(图1B). P53为细胞核阳性, 细胞核呈现较为清晰的褐色或棕黄色者为阳性(图1C). 49例胆囊癌组织中P-gp、GST- π 和P53阳性表达率分别为75.5%、65.3%和69.4%.

2.2 P-gp、GST- π 和P53的表达与胆囊癌临床病理因素之间的关系 有淋巴结转移组P-gp表达率显著高于无淋巴结转移组($P<0.05$, $P = 0.016$), P-gp的表达与临床分期、组织分化程度无关($P>0.05$). 中低分化胆囊癌的GST- π 表达率显著高于高分化及乳头状腺癌($P<0.05$, $P = 0.042$), GST- π 的表达与临床分期及淋巴结转移情况无关($P>0.05$). 临床分期 S_4 、 S_5 期和有淋巴结转移的胆囊癌的P53表达率显著高于 S_1 - S_3 期和淋巴结未转移者($P<0.05$, $P = 0.043$, 0.008). P53表达与组织

■ 相关报道

2007年Oliver *et al*报道突变型P53通过上调MDR-1基因表达介导大量P-gp产生, 使肿瘤细胞对化疗制剂产生选择性抗性.

■应用要点

本研究提示,联合检测P-gp和GST- π 的表达对于胆囊癌患者的预后判断具有积极的指导作用。针对P53的基因治疗可能会成为预防肿瘤多药耐药的重要治疗方法。

表1 P-gp、GST- π 和P53的表达与胆囊癌临床病理因素的相关性

临床指标	<i>n</i>	P-gp阳性率(%)	<i>P</i> 值	GST- π 阳性率(%)	<i>P</i> 值	P53阳性率(%)	<i>P</i> 值
性别			>0.05		>0.05		>0.05
男	24	70.8		70.8		75.0	
女	25	80.0		60.0		64.0	
年龄(岁)			>0.05		>0.05		>0.05
<60	25	72.0		68.0		68.0	
>60	24	79.2		62.5		70.8	
病理分级			>0.05		<0.05		>0.05
高分化及 乳头状腺癌	22	68.2		50.0		63.6	
中低分化	27	81.5		77.8		74.1	
Nevin分期			>0.05		>0.05		<0.05
S ₁ -S ₃	19	68.4		57.9		52.6	
S ₄ -S ₅	30	80.0		70.0		80.0	
淋巴结转移			<0.05		>0.05		<0.01
有	27	88.9		66.7		85.2	
无	22	59.1		63.6		50.0	

分化程度无关($P>0.05$)。P-gp、GST- π 和P53的表达与患者的性别、年龄均无关($P>0.05$, 表1)。

2.3 P-gp、GST- π 和P53表达的相关性 P53表达阳性组中, P-gp表达率为85.3%(29/34), P53阴性组中P-gp表达率为53.3%(8/15), 两者差异具有统计学意义, 相关性分析表明二者呈正相关($r = 0.343$, $\chi^2 = 5.749$, $P = 0.016$)。P53与GST- π 的表达之间无明显相关性($P>0.05$, $P = 0.604$)。

2.4 P-gp和GST- π 的表达与胆囊癌患者预后的关系 完整随访40例患者, 中位生存期为33 mo, 16例P-gp和GST- π 共同表达, 12例P-gp和GST- π 均未表达。Kaplan-Meier生存曲线显示P-gp和GST- π 表达阳性者累积生存率显著低于阴性者, 经Logrank法比较, 差异具有统计学意义($P<0.05$, $P = 0.007$, 图2)。

3 讨论

P-gp是MDR-1基因编码的跨膜糖蛋白, P-gp的表达水平与细胞的膜通透性、细胞内药物的浓度以及细胞的耐药程度有关^[3]。肿瘤患者P-gp表达高, 预后较差, 提示P-gp不仅介导耐药, 亦与生物学恶性表型有关。有学者分别应用免疫组织化学方法和RT-PCR方法检测胆囊癌中P-gp、MDR-1 mRNA的表达率分别为77%和52%, 且与胆囊癌的临床分期有关^[4]。本组研究中P-gp表达率为75.5%, 均为原发性耐药, 其表达与淋巴结转移密切相关, 提示P-gp高表达的胆囊癌易发生淋巴结转移。GST- π 在人体许多癌前病变、癌组织及癌细胞系中高表达并参与MDR的形

成^[5]。GST- π 高度表达与细胞癌变过程中的适应性有关, 使癌细胞免受化学毒素及细胞毒类药物的侵袭, 保护癌细胞生长^[6]。本组研究中GST- π 表达率为65.3%, 其表达与组织分化程度密切相关, 反映出胆囊癌GST- π 的表达和组织学分化的一般规律。但由于肿瘤的异质性, 临床仅依据分化程度难以判定胆囊癌患者的预后。通过术后随访, 本组研究发现P-gp和GST- π 表达均为阳性的患者术后的累积生存率显著低于阴性患者。由此可见, 联合检测P-gp和GST- π 表达可作为判定胆囊癌恶性程度和预后的客观指标。

P53基因是与化疗敏感性关联最密切的抑癌基因, 他分为野生型和突变型两种^[7]。野生型P53蛋白是一种生长抑制性蛋白, 在损伤细胞的修复中发挥重要作用, 由于野生型P53蛋白的半衰期极短, 因而组织含量低, 利用免疫组织化学只能检测到突变型P53蛋白的表达^[8]。P53突变会导致凋亡受抑, DNA修复能力减弱, 不能保证细胞染色体正常数目的维持, 失去了对肿瘤细胞发生的抑制作用^[9]。本组P53表达率为69.4%, P53的表达与临床分期及淋巴结转移密切相关, 这与Kim *et al*^[10]研究结果相一致, 提示突变型P53的过度表达对胆囊癌的发生有重要作用, P53突变会使胆囊癌细胞增殖的抑制作用减弱, 更易发生肿瘤浸润和淋巴结转移。2007年Oliver *et al*^[11]学者报道突变型P53通过上调MDR-1基因表达介导大量P-gp产生, 使肿瘤细胞对化疗制剂产生选择性抗性。本组研究显示, P53与P-gp

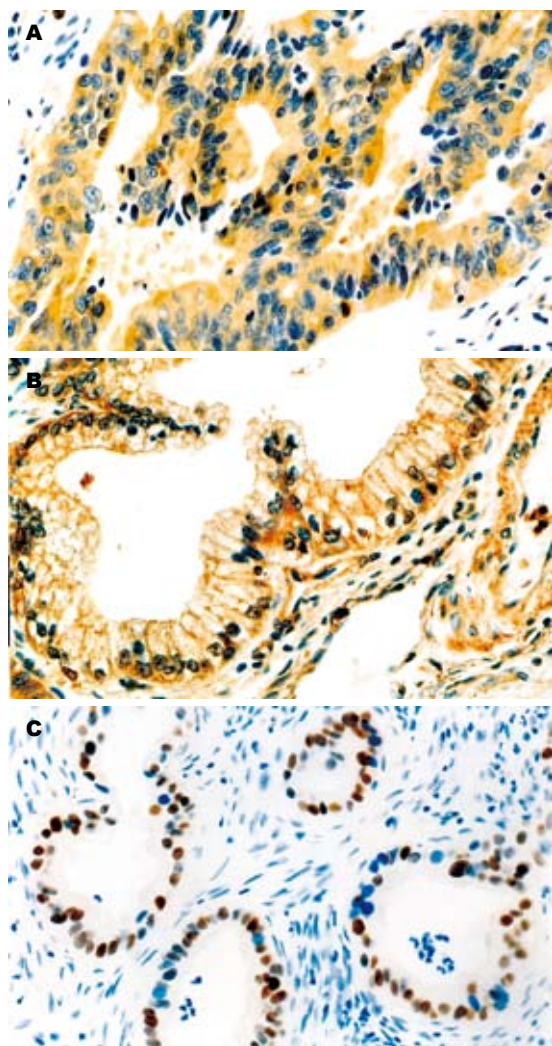


图 1 GST- π 、P-gp和P53在胆囊癌中的阳性表达(SP \times 400). A: GST- π ; B: P-gp; C: P53.

的表达呈正相关, 由此推测P53与P-gp表达具有协同作用, 共同促进肿瘤细胞增殖和发展. 关于GST- π 和P53的关系目前研究尚少, 在乳腺癌的研究中Silverstrini *et al*^[12]报道二者无关, 本研究的结果亦表明在胆囊癌中P53与GST- π 的表达之间无明显相关性.

总之, 联合检测P-gp和GST- π 的表达对于胆囊癌患者的预后判断具有积极的指导作用. 针对P53的基因治疗可能会成为预防肿瘤多药耐药的重要治疗方法.

4 参考文献

- 1 Xue C, Haber M, Flemming C, Marshall GM, Lock RB, MacKenzie KL, Gurova KV, Norris MD, Gudkov AV. p53 determines multidrug sensitivity of childhood neuroblastoma. *Cancer Res* 2007; 67: 10351-10360
- 2 Goldin RD, Roa JC. Gallbladder cancer: a morphological and molecular update. *Histopathology* 2009; 55: 218-229
- 3 Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE,

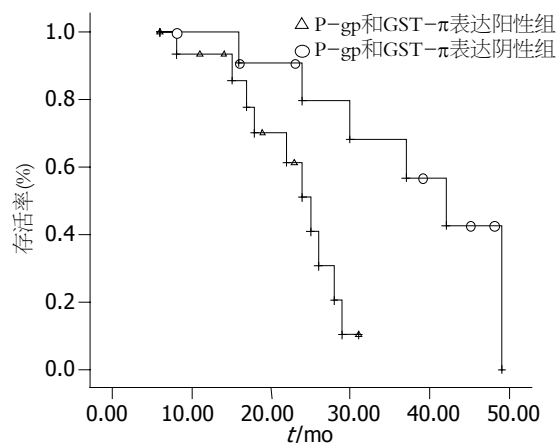


图 2 P-gp和GST- π 表达阳性组与阴性组的Kaplan-Meier生存曲线.

同行评价

本文旨在探讨P-gp和P53的表达与原发性胆囊癌发生、发展及预后的关系, 具有一定创新性和参考意义.

Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22: 7468-7485

- 4 Cao L, Duchrow M, Windhövel U, Kujath P, Bruch HP, Broll R. Expression of MDR1 mRNA and encoding P-glycoprotein in archival formalin-fixed paraffin-embedded gall bladder cancer tissues. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1612-1617
- 5 Huang JX, Li FY, Xiao W, Song ZX, Qian RY, Chen P, Salminen E. Expression of thymidylate synthase and glutathione-S-transferase pi in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4316-4321
- 6 Townsend D, Tew K. Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family. *Am J Pharmacogenomics* 2003; 3: 157-172
- 7 Lunghi P, Costanzo A, Mazzera L, Rizzoli V, Levrero M, Bonati A. The p53 family protein p73 provides new insights into cancer chemosensitivity and targeting. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6495-6502
- 8 Jakob C, Liersch T, Meyer W, Becker H, Baretton GB, Aust DE. Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1060-1066
- 9 Zhao Y, Hamza MS, Leong HS, Lim CB, Pan YF, Cheung E, Soo KC, Iyer NG. Kruppel-like factor 5 modulates p53-independent apoptosis through Pim1 survival kinase in cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 1-8
- 10 Kim YW, Huh SH, Park YK, Yoon TY, Lee SM, Hong SH. Expression of the c-erb-B2 and p53 protein in gallbladder carcinomas. *Oncol Rep* 2001; 8: 1127-1132
- 11 Oliver I, Lacueva J, Barberá V, Caldés T, Teruel A, Costa D, Medrano J, Pérez-Vázquez T, Quesada P, Ferragut J, Calpena R. p53 genetic abnormalities and P-glycoprotein expression in stump and primary gastric carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 377-381
- 12 Silverstrini R, Veneroni S, Benini E, Daidone MG, Luisi A, Leutner M, Maucione A, Kenda R, Zucali R, Veronesi U. Expression of p53, glutathione S-transferase-pi, and Bcl-2 proteins and benefit from adjuvant radiotherapy in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 639-645

转录辅抑制因子CtBP1与其靶基因E-cadherin在结肠腺癌中的表达

肖胜军, 张小玲, 容明智, 方宇, 曾思恩

■背景资料

羧基末端结合蛋白(CtBPs)是进化上保守的转录辅抑制因子, 其参与对多个肿瘤抑制基因的抑制。而E-cadherin是一类介导细胞之间相互黏附的钙依赖性跨膜蛋白, 参与形成和维护正常细胞间的连接, 其表达缺失是多种上皮性肿瘤EMT的特征性分子事件, CtBP介导的E-cadherin抑制显示其在促进肿瘤EMT中的重要作用。

肖胜军, 桂林医学院病理学教研室 广西壮族自治区桂林市 541001

张小玲, 容明智, 桂林医学院病理生理学教研室 广西壮族自治区桂林市 541001

方宇, 曾思恩, 桂林医学院附属医院病理科 广西壮族自治区桂林市 541001

作者贡献分布: 本文由肖胜军设计; 研究过程由张小玲、方宇及容明智完成; 数据分析由肖胜军与容明智完成; 论文写作由肖胜军与张小玲完成; 曾思恩本研究指导并参与研究全程。

通讯作者: 曾思恩, 教授, 541001, 广西壮族自治区桂林市乐群路20号, 桂林医学院附属医院病理科。zse@glmc.edu.cn

电话: 0773-2854160 传真: 0773-2854160

收稿日期: 2009-10-23 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-28

Expression of transcriptional corepressor CtBP1 and its target gene E-cadherin in colon adenocarcinoma

Sheng-Jun Xiao, Xiao-Ling Zhang, Ming-Zhi Rong, Yu Fang, Si-En Zeng

Sheng-Jun Xiao, Department of Pathology, Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Xiao-Ling Zhang, Ming-Zhi Rong, Department of Pathophysiology, Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yu Fang, Si-En Zeng, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Professor Si-En Zeng, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, 20 Lequn Road, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. zse@glmc.edu.cn

Received: 2009-10-23 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of transcriptional corepressor C-terminal-binding protein 1 (CtBP1) and its target gene E-cadherin in colon adenocarcinoma.

METHODS: The expression of CtBP1 and E-cadherin proteins in colon adenocarcinoma and paired non-neoplastic tissue was assessed by immunohistochemistry.

RESULTS: The positive rates of CtBP1 expres-

sion in colon adenocarcinoma and paired non-neoplastic tissue were 96.25% (77/80) and 100% (80/80), respectively. The positive rates of E-cadherin expression in colon adenocarcinoma and paired non-neoplastic tissue were 32.50% (26/80) and 100% (80/80), respectively. The expression of E-cadherin was associated with tumor invasion depth in colon adenocarcinoma. The expression of CtBP1 was not associated with E-cadherin expression in colon adenocarcinoma.

CONCLUSION: The transcriptional repression function of CtBP1 does not mediate the dysregulated expression of E-cadherin in colon adenocarcinoma.

Key Words: C-terminal-binding protein 1; E-cadherin; Adenocarcinoma

Xiao SJ, Zhang XL, Rong MZ, Fang Y, Zeng SE. Expression of transcriptional corepressor CtBP1 and its target gene E-cadherin in colon adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3756-3759

摘要

目的: 探讨转录辅抑制因子CtBP1在结肠腺癌中的表达状况及其靶基因E-cadherin表达的影响。

方法: 采用免疫组织化学染色方法检测结肠癌及癌旁组织中CtBP1及E-cadherin的表达。

结果: CtBP1在结肠癌组织及癌旁组织中表达阳性率分别为96.25%(77/80)和100%(80/80); E-cadherin在结肠癌组织及癌旁组织中表达率分别为32.50%(26/80)和100%(80/80), 且与肿瘤浸润深度相关; CtBP1在结肠癌中表达与E-cadherin不相关。

结论: CtBP1对其靶基因E-cadherin表达的抑制并不是由CtBP1的异常表达介导的。

关键词: 羧基末端结合蛋白1; 上皮型钙黏蛋白; 结肠腺癌

■同行评议者

梅林, 教授, 北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

肖胜军, 张小玲, 容明智, 方宇, 曾思恩. 转录辅抑制因子CtBP1与其靶基因E-cadherin在结肠腺癌中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3756-3759
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3756.asp>

0 引言

羧基末端结合蛋白(C-terminal-binding proteins, CtBPs)是进化上保守的转录辅抑制因子. 有研究表明CtBPs与肿瘤发生和进展相关^[1], CtBPs能促进上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)并作为凋亡拮抗剂, 参与对多个肿瘤抑制基因的抑制^[1]. 上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)表达缺失是多种上皮性肿瘤EMT的特征性分子事件, CtBP介导的E-cadherin抑制显示其在促进肿瘤EMT中的重要作用. EMT是导致肿瘤细胞恶性特征的一个步骤: 失去肿瘤的细胞黏附分子、获得迁移和侵蚀表型、凋亡抗性等. 在模式细胞研究中发现, 人结肠癌中高水平的Zeb1和CtBP1表达与低水平的E-cadherin相关, 并认为他是结肠癌治疗的潜在靶点^[2]. 本研究旨在调查CtBP1在结肠癌组织中原位表达状况及其对E-cadherin表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-2009桂林医学院附属医院手术切除结肠癌标本80例, 其中男49例, 女31例, 伴淋巴结转移者33例, 淋巴结无转移者47例. 患者年龄25-88(平均60.8)岁. 病理诊断均为腺癌. 其中高分化腺癌24例, 中分化腺癌42例, 低分化腺癌14例. 患者术前均未作过放化疗. 鼠抗人CtBP1单克隆抗体(浓缩型, 1:100稀释, Santa Cruz公司, sc-17805); E-cadherin(浓缩型, 1:50稀释, Santa Cruz公司, sc-52328); 二抗(小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司, PV-9005).

1.2 方法

1.2.1 组织芯片制备: 根据HE切片在供体组织蜡块上选取肿瘤组织区域和癌旁正常组织区域并标记; 其中每个肿瘤组织标本重复取2个点, 癌旁正常组织取1个点, 每个孔芯的直径1.5 mm, 将相应组织由供体蜡块转移至受体蜡块的阵列孔中, 制作芯片蜡块2个, 每个蜡块含有121个点(1个为标志点).

1.2.2 免疫组织化学染色及结果评价: 组织芯片蜡块4 μm 连续切片, 60℃烤片1 h, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱后水化, 高压热修复(柠檬酸pH6.0, 3 min), 其他步骤按试剂说明书进行, DAB显色镜

下控制, 苏木素复染. 以PBS代替一抗作阴性对照. CtBP1: 大于75%细胞核棕黄色为阳性, 细胞核阳性小于75%和/或不着色为阴性. E-cadherin: 大于25%的细胞细胞膜完整着色为阳性. 经3位临床病理医生阅片后计分.

统计学处理 采用SPSS11.5对相关数据进行处理, 组间各指标比较采用Pearson卡方检验, $P<0.05$ 表示存在统计学意义.

2 结果

2.1 CtBP1、E-cadherin在结肠腺癌和癌旁组织中的表达 CtBP1在细胞核中表达, 结肠腺癌组织及癌旁组织中表达率分别为96.25%(77/80)和100%(80/80); E-cadherin在细胞膜和细胞质中表达, 癌组织及癌旁组织中表达率分别为32.50%(26/80)和100%(80/80). CtBP1、E-cadherin在癌组织和癌旁组织中的表达见图1.

2.2 E-cadherin表达与结肠癌临床病理特征的关系 结肠癌组织中E-cadherin表达与年龄、性别、肿瘤分级、淋巴结转移没有相关性, 而与浸润深度相关, E-cadherin表达阴性浸润深度较深($P=0.033$, 表1).

2.3 癌组织中CtBP1与E-cadherin表达的关系 癌组织CtBP1表达阳性的病例中32.47%(25/77)E-cadherin表达阳性; CtBP1表达阴性的病例中33.33%(1/3)E-cadherin表达阳性. 癌组织中CtBP1与E-cadherin表达没有相关性($P=0.698$, 表2).

3 讨论

E-cadherin是一类介导细胞之间相互黏附的钙依赖性跨膜蛋白, 参与形成和维护正常细胞间的连接. 由于E-cadherin是上皮细胞中的黏附分子, 故对维持正常上皮细胞形态和结构完整性起着重要作用, 阳性表达有抑制肿瘤转移的功能^[3], 当E-cadherin表达下降或缺失, 细胞间的相互黏附力下降, 造成上皮细胞获得间质细胞的表型: 容易分散而向外周浸润性生长, 一旦获得转移的必要条件, 就可脱离原发灶而发生侵袭和转移^[4]. E-cadherin还能抑制肿瘤细胞和宿主细胞产生基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs), 阻止肿瘤细胞周围基质和基底膜中的各种蛋白成分的降解, 从而抑制肿瘤细胞突破基质和基底膜屏障^[5]. 近年来通过在乳腺癌、甲状腺乳头状癌、食管癌、前列腺癌、大肠癌及鼻咽癌等肿瘤的研究中证实, E-cad表达降低与癌的分化、侵袭和转移有显著的相关性^[6-8].

■ 相关报道

近年来通过在乳腺癌、甲状腺乳头状癌、食管癌、前列腺癌、大肠癌及鼻咽癌等肿瘤的研究中证实, E-cad表达降低与癌的分化、侵袭和转移有显著的相关性.

■应用要点

本研究显示, E-cadherin表达缺失能增加肿瘤的侵袭能力, 转录抑制因子CtBP1并不是结肠腺癌中E-cadherin表达缺失的主要因素, 为结肠腺癌的基因治疗提供参考。

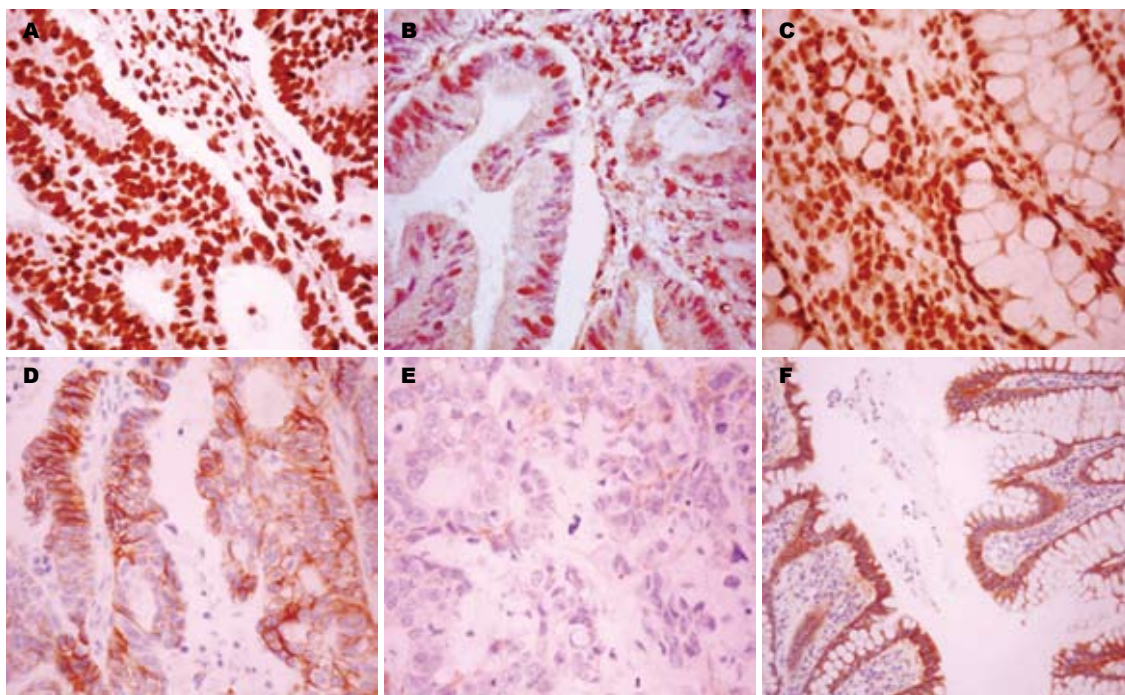


图1 CtBP1、E-cadherin在结肠癌组织中的表达。A-C: CtBP1的表达; D-F: E-cadherin的表达; A、D: 结肠癌组织中阳性表达; B、E: 结肠癌组织中阴性表达; C、F: 癌旁组织中阳性表达。

表1 E-cadherin表达与结肠癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	E-cadherin表达(n)		χ^2 值	P值
		阳性	阴性		
年龄(岁)					
<60	37	14	23	0.894	0.240
≥60	43	12	31		
性别					
男	49	19	30	2.270	0.103
女	31	7	24		
分级					
高中分化	66	21	45	0.080	0.503
低分化	14	5	9		
淋巴结转移					
有转移	47	15	32	1.675	0.151
无转移	33	11	22		
浸润深度					
肌层及以上	39	17	22	4.266	0.033
浆膜及浆膜外	41	9	32		

我们的结果显示, E-cadherin在结肠癌中表达缺失, 增加了上皮-间质转化, 使得肿瘤细胞增强了浸润深部组织的能力, 因而与肿瘤的浸润深度相关。E-cadherin阳性和阴性的肿瘤淋巴结转移有一定差异, 但不具有显著意义($P = 0.151$); 可能由于肿瘤的淋巴结转移过程除了包括细胞黏附能力下降外, 还有一系列的其他分子事件, 黏附能力的下降只是肿瘤淋巴结转移的首要环

表2 CtBP1表达与E-cadherin表达的关系

CtBP1表达	n	E-cadherin表达(n)		χ^2 值	P值
		阳性	阴性		
阳性	77	25	52	0.001	0.698
阴性	3	1	2		

节, 因此统计学上并没有意义。

CtBP1s与肿瘤发生和进展相关: CtBP1s能促进EMT, 并作为凋亡拮抗剂; 参与对多个肿瘤抑制基因的抑制, 并认为CtBP1s是肿瘤治疗的一个潜在靶点^[1]。有研究发现, 转录抑制因子CtBP1能与多种转录因子如Zeb1、Zeb2结合形成转录抑制复合体, Snail等转录因子通过与Zeb1结合后再结合于CtBP1从而抑制肿瘤E-cadherin的表达。在模式细胞研究中, 通过RT-PCR和Western blot检测发现, 人结肠癌细胞中高水平的Zeb1和CtBP1表达与低水平的E-cadherin相关^[2]。我们通过免疫组织化学原位检测发现, 结肠癌组织中CtBP1表达异常率较低3.75%(3/88), 且与E-cadherin表达不相关; 该结果显示, 在结肠癌组织中, CtBP1参与的转录抑制复合体并不是E-cadherin表达缺失的主要异常因素, 而可能是抑制复合体中的其他成分。

总之, 我们的结果显示, E-cadherin表达缺失能增加肿瘤的侵袭能力, 转录抑制因子

CtBP1并不是结肠腺癌中E-cadherin表达缺失的主要因素.

4 参考文献

- 1 Chinnadurai G. The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors. *Cancer Res* 2009; 69: 731-734
- 2 Grootclaes ML, Frisch SM. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* 2000; 19: 3823-3828
- 3 张建新, 毛正发, 王旭青, 王崇高, 吴建农. 胃癌中 Ezrin, E-cadherin及CD44的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 776-779
- 4 Gloushankova NA. Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. *Biochemistry (Mosc)* 2008; 73: 742-750
- 5 谢涛, 袁响林, 于世英, 杨彬, 董兰兰. RNA干扰HIF-1 α 降低宫颈癌细胞基质金属蛋白酶-2的表达. *癌症* 2008; 27: 600-605
- 6 Yap AS, Crompton MS, Hardin J. Making and breaking contacts: the cellular biology of cadherin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 508-514
- 7 王红建, 史成章, 秦先锋, 黄秋实. Ezrin、FAK及 E-cadherin在大肠癌组织中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 591-595
- 8 马红, 陈晓, 马海梅, 尼加提·热合木, 蒲红伟. E-cadherin、 β -catenin和CathepsinD在食管鳞状细胞癌中的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1757-1762

■同行评价

本研究内容有一定重要性、科学性和可读性,但新颖性稍显欠缺.

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》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位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 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人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (科学编辑: 李军亮 2009-12-28)

嗜酸粒细胞性胃肠炎临床分析24例

李静, 王邦茂, 张洁, 姜葵, 方维丽, 程静, 沈阳, 苏帅

■背景资料

嗜酸粒细胞性胃肠炎(EG)是以胃肠道组织中嗜酸粒细胞异常浸润为特征的少见的胃肠道疾病。分为黏膜型、浆膜型和肌型,其病因及发病机制尚不明确。由于缺乏临床特异表现,误诊率高。故探讨该病的临床特征、诊断依据及治疗方法具有重要的临床意义。

李静, 王邦茂, 张洁, 姜葵, 方维丽, 程静, 沈阳, 苏帅, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

作者贡献分布: 本论文写作由李静完成; 王邦茂设计及审校; 病例由张洁、姜葵及方维丽提供; 李静、程静、沈阳及苏帅完成数据分析。

通讯作者: 王邦茂, 教授, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院消化科。gi.tmuh@sohu.com

电话: 022-60362810

收稿日期: 2009-11-07 修回日期: 2009-11-26

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-28

Eosinophilic gastroenteritis: a clinical study of 24 cases

Jing Li, Bang-Mao Wang, Jie Zhang, Kui Jiang, Wei-Li Fang, Jing Cheng, Yang Shen, Shuai Su

Jing Li, Bang-Mao Wang, Jie Zhang, Kui Jiang, Wei-Li Fang, Jing Cheng, Yang Shen, Shuai Su, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Professor Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China. gi.tmuh@sohu.com

Received: 2009-11-07 Revised: 2009-11-26

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical characteristics, diagnosis, therapy and prognosis of eosinophilic gastroenteritis (EG).

METHODS: A total of 24 patients diagnosed as EG were studied. The data concerning the medical history, clinical manifestations, laboratory tests, endoscopic test, pathological examination, therapy and follow-up in these patients were analyzed.

RESULTS: About 37.5% of EG patients had a history of allergic diseases, and the development of EG was associated with allergy in 25% of patients. The most common clinical presentation in EG patients was abdominal pain (87.5%). Increased peripheral eosinophil count $[(4.59 \pm 3.69) \times 10^9/L]$ was noted in 83.3% of EG patients. Endoscopic examination revealed duodenal edema and erosion. Eosinophilic infiltration in the mucosa was confirmed by biopsy. Ascitic fluid was an exudate with eosinophils. Steroid therapy could relieve symptoms and eosinophilia in a

week. EG recurrence might occur, but prognosis was good.

CONCLUSION: Increased peripheral eosinophil count and allergy history provide a cue to the diagnosis of EG. Increased eosinophil counts in the gastrointestinal mucosa and ascites are key to the diagnosis of EG. Steroid therapy is better than diet therapy for the disease. EG has a good prognosis.

Key Words: Eosinophilic gastroenteritis; Eosinophil; Clinical manifestation; Diagnosis; Therapy

Li J, Wang BM, Zhang J, Jiang K, Fang WL, Cheng J, Shen Y, Su S. Eosinophilic gastroenteritis: a clinical study of 24 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3760-3764

摘要

目的: 分析嗜酸粒细胞性胃肠炎的临床特点、诊断要点、治疗及预后。

方法: 对本院确诊的24例嗜酸粒细胞性胃肠炎患者的病史、临床表现、实验室检查、内镜检查、病理检查、治疗及随访情况进行系统分析。

结果: 本组资料显示, 有过敏史者占37.5%, 过敏诱因者占25%。腹痛(87.5%)为最常见的临床表现。83.3%患者外周血嗜酸粒细胞计数升高, 为 $(4.59 \pm 3.69) \times 10^9/L$ 。内镜下主要表现为黏膜充血水肿、糜烂, 以十二指肠最为明显, 活检可证实大量嗜酸粒细胞浸润。腹水为渗出液, 可见嗜酸粒细胞。激素治疗可在1 wk内迅速缓解症状, 并使嗜酸粒细胞恢复正常。病情可有反复, 但预后良好。

结论: 外周血嗜酸粒细胞计数、过敏史对诊断嗜酸粒细胞性胃肠炎有提示作用, 内镜下黏膜活检和腹水嗜酸粒细胞增多是诊断的关键。糖皮质激素治疗优于饮食治疗, 预后良好。

关键词: 嗜酸粒细胞性胃肠炎; 嗜酸粒细胞; 临床表现; 诊断; 治疗

李静, 王邦茂, 张洁, 姜葵, 方维丽, 程静, 沈阳, 苏帅。嗜酸粒细

■同行评议者

江米足, 教授, 浙江大学医学院附属儿童医院儿科

胞性胃肠炎临床分析24例. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3760-3764

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3760.asp>

0 引言

嗜酸粒细胞性胃肠炎(eosinophilic gastroenteritis, EG)是以胃肠道组织中嗜酸粒细胞异常浸润为特征的少见的胃肠道疾病。1937年Kajiser首次报道,国内报道较少,且报道的病例特点不一,具有临床多样性,容易造成误诊。本研究收集2000-07/2009-06天津医科大学总医院收治的24例EG患者,分析其临床特点、诊断要点、治疗及预后。

1 材料和方法

1.1 材料 24例EG患者,男17例,女7例,男女比例2.43:1,年龄15-61(平均 36.95 ± 15.39)岁,病程2 d-10年。EG的诊断符合Talley标准:存在胃肠道症状;活检病理显示从食管到结肠的胃肠道有1个或1个以上部位的嗜酸粒细胞浸润,或有放射学结肠异常伴周围嗜酸粒细胞增多;除外寄生虫感染和胃肠道外以嗜酸粒细胞增多的疾病,如结缔组织病、嗜酸粒细胞增多症、Crohn's病、淋巴瘤、原发性淀粉样变性、Menetrier病等^[1]。24例患者均行寄生虫卵、肿瘤标志物、自身抗体等检查,除外相关性疾病。

1.2 方法

1.2.1 诊断分型: EG分为3型: (1)黏膜型: 最常见,嗜酸粒细胞仅局限于黏膜层和黏膜下层; (2)肌型: 嗜酸粒细胞浸润至肌层,可导致完全或不完全性梗阻; (3)浆膜型: 病变累及浆膜层,可出现腹水,腹水中可见大量嗜酸细胞浸润。24例患者中,15例(62.5%)患者内镜下黏膜活检示大量嗜酸粒细胞浸润,诊断为黏膜型;8例(33.3%)患者内镜下黏膜活检及腹水检查示大量嗜酸粒细胞,诊断为黏膜、浆膜混合型;1例(4.2%)患者内镜下黏膜活检示大量嗜酸粒细胞浸润,并合并肠梗阻,诊断为黏膜、肌层混合型。

1.2.2 患者检查及治疗: 对所有患者的临床资料进行分析,包括年龄、性别、诱发因素和过敏史、临床表现、实验室检查、内镜和病理、影像学检查、治疗效果及其预后等。

统计学处理 计量资料数据以mean±SD表示,两组比较采用配对t检验。计数资料采用确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 EG患者临床症状与体征

症状与体征	n	百分比(%)
腹痛	21	87.5
腹泻	15	62.5
体质量减轻	8	33.3
恶心、呕吐	6	25.0
皮疹	5	22.7
水肿	5	20.8
血便	3	12.5
发热	3	12.5

2 结果

2.1 诱发因素和过敏史 有既往过敏史者9例,占37.5%,其中食物过敏2例,抗生素过敏5例,过敏性鼻炎、支气管哮喘1例、荨麻疹1例。本次发病有明显的过敏诱因者6例,占25%,其中进食海鲜及蛋奶、饮酒、服用抗生素者各2例。行食物过敏原检测者2例,主要对虾、牛羊肉、蛋奶、豆类等敏感。

2.2 临床表现 本组23例患者病程为2 d-2 mo,临床表现多为腹痛、腹泻进行性加重。1例肌型患者病程长,以腹泻进行性加重10年,腹痛、腹胀、便秘3 d入院。16例患者入院前曾被误诊为急性胃肠炎、消化性溃疡、溃疡性结肠炎、胰腺炎及结核性腹膜炎。本组EG患者的临床表现见表1。腹痛为最常见的临床症状,腹痛部位为上腹痛11例、脐周痛4例、全腹痛3例、下腹痛3例;腹痛性质为绞痛12例、隐痛6例、胀痛3例。腹痛与进食和排便无明显关系。腹泻次数为每日3-10次,多为稀水样变。8例浆膜型患者合并腹水,其中2例合并自发性腹膜炎。1例累及十二指肠乳头者合并有胰腺炎。

2.3 实验室检查

2.3.1 外周血和骨髓检查: 24例EG患者,血红蛋白和血小板均正常,白细胞($5.48-18.70$) $\times 10^9/L$,平均为(10.89 ± 3.75) $\times 10^9/L$,嗜酸粒细胞计数($0.02-11.70$) $\times 10^9/L$,平均为(3.85 ± 3.75) $\times 10^9/L$ 。其中20例外周血嗜酸粒细胞计数高于正常,占83.3%,平均为(4.59 ± 3.69) $\times 10^9/L$,4例嗜酸粒细胞计数正常,占16.7%。嗜酸粒细胞增高的患者中,14例接受激素治疗,1 wk后嗜酸粒细胞计数均下降为正常水平($< 0.5 \times 10^9/L$),治疗前与治疗后嗜酸粒细胞计数分别为(4.32 ± 3.84) $\times 10^9/L$ 和(0.21 ± 0.12) $\times 10^9/L$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。6例未接受激素治疗,仅予饮食对症治疗,嗜酸粒细胞计数随症状缓解逐渐下降,但

■ 相关报道

Papadopoulos *et al* 认为,某些EG患者随幽门螺杆菌的清除症状得以治愈,是否提示EG与幽门螺杆菌的感染有关,尚待进一步证实。

■应用要点

本文提示, 外周血嗜酸粒细胞计数、过敏史对诊断嗜酸粒细胞性胃肠炎有提示作用, 内镜下黏膜活检和腹水嗜酸粒细胞增多是诊断的关键。糖皮质激素治疗优于饮食治疗, 预后良好。可广泛应用于临床EG的治疗。

表 2 24例EG患者内镜表现 (%)

部位	充血水肿	红斑	糜烂	溃疡	出血	隆起	肿物	狭窄
胃窦	1	0	1	0	1	1	0	0
十二指肠球部	1	1	1	0	0	0	0	0
十二指肠降部	4	2	2	2	1	0	0	0
空肠	1	0	0	0	1	0	0	0
回肠	0	0	0	0	0	1	0	1
回盲部	3	2	1	0	0	1	0	0
结肠	1	1	0	0	0	0	0	0
直肠	0	0	0	0	0	0	1	0
总计	11	6	5	2	3	3	1	1

下降缓慢, 2 wk后仍未下降到正常水平, 症状缓解前后嗜酸粒细胞计数分别为 $(5.20 \pm 3.57) \times 10^9/L$ 和 $(1.76 \pm 1.57) \times 10^9/L$, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。患者行骨髓细胞学检查者3例(12.5%), 示骨髓嗜酸粒细胞数增多, 以成熟细胞为主。

2.3.2 血清学指标: 24例患者中肿瘤标志物, 自身抗体(抗核抗体、抗线粒体抗体、抗平滑肌抗体、抗壁细胞抗体)全部阴性。白蛋白降低($\leq 20 g/L$)者6例, 占25%, 1例患者行SPECT检查考虑肠道蛋白丢失。8例腹水患者行结核菌素试验, 阳性者2例, 占25%。12例接受免疫球蛋白检测的患者中, IgE升高者3例, 占25%。1例合并胰腺炎患者, 血尿淀粉酶为正常值的4倍, 症状好转后恢复正常。

2.3.3 腹水检查: 8例合并腹水患者, 2例为中量血性腹水, 1例为乳糜样腹水, 腹水常规及生化均为渗出液, 可见大量嗜酸粒细胞, 抗酸染色及脱落细胞学检查为阴性。经激素治疗2 wk后复查B超腹水均消失。

2.3.4 便常规与便培养检查: 24例患者中, 大便隐血者13例, 占54.2%。大便培养, 14例腹泻患者菌群失调, 未见致病菌。

2.4 内镜检查 EG内镜表现没有特异性, 本组行胃镜、结肠镜、小肠镜检查者分别为23例、18例、3例, 内镜表现见表2, 主要表现为黏膜的充血水肿、红斑、糜烂。1例肌型患者回肠末端狭窄。1例胰腺炎患者十二指肠乳头水肿。3例确诊EG内镜表现无明显异常, 占12.5%。

2.5 病理检查 24例患者行内镜下黏膜活检, 均证明有大量嗜酸粒细胞浸润, 其中单一部位受累者15例, 占62.5%, 其中十二指肠7例, 结肠3例, 胃窦2例, 回盲部1例, 回肠1例, 空肠1例。累及多个部位者9例, 占37.5%。十二指肠+回盲部2例, 胃窦+十二指肠1例, 十二指肠+回肠1例, 十二指

肠+结肠1例, 胃窦+十二指肠+回盲部1例, 结肠+直肠1例, 胃窦+结肠+十二指肠1例, 十二指肠+回盲部+结肠1例。各部位受累情况: 十二指肠15例(62.5%), 结肠7例(29.2%), 胃窦5例(20.8%), 回盲部5例(20.8%), 回肠2例(8.3%), 空肠1例(4.2%)。行快速尿素酶试验和 ^{14}C 尿素呼气试验, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)阳性者8例, 占33.3%。

2.6 影像学检查 24例患者均行腹CT或B超检查, 表现为胃壁或肠壁增厚6例(25%), 腹腔淋巴结肿大2例(8.3%), 腹水8例(29.2%)。1例行核磁共振检查示急性胰腺炎。1例肌型患者立位腹平片可见多个气液平。

2.7 治疗及随访 有明显过敏诱因的6例患者, 给予饮食对症治疗, 出院时症状缓解。随访2-24 mo, 2例出院后再次复发, 给予相同治疗后症状缓解。其余18例患者仅予饮食对症治疗症状未能缓解, 症状轻微者给予口服强的松20-40 mg/d, 3-7 d症状均见明显好转, 激素逐渐减量(每7-10 d减量10 mg), 最后以10 mg/d维持1-2 mo后停药。1例肠梗阻患者给予甲基强的松龙40 mg/d静脉点滴, 3 d后症状好转, 改为口服强的松40 mg/d, 激素逐渐减量(每7 d减量10 mg), 20 d后复查小肠镜示回肠狭窄消失。当激素减为10 mg/d时, 再次出现腹痛、腹泻症状, 延长激素减量时间(每20 d减量10 mg)后症状未再反复, 以10 mg/d维持2 mo后停药。8例浆膜型患者给予激素治疗7-14 d后腹水消失。随访6-96 mo, 2例复发, 再次予激素治疗后好转。两者复发情况差异无统计学意义($P = 0.251$)。

3 讨论

EG是一种少见病, 其病因及发病机制尚未阐明, 多数研究认为该病是一种对内源性或外源性过

敏原的变态反应性疾病^[2]。本组25%患者IgE升高,支持本病与变态反应有关。据报道50%有过敏史^[3],本组37.5%有过敏史,25%有明显的过敏诱因,提示本病与过敏因素有关,故对EG患者应仔细追问过敏史及可能的诱因并行过敏原试验,从而剔除过敏原以利于治疗。EG可发生于各年龄阶段,据报道发病高峰为30-50岁^[4]。本组资料显示,年龄15-61岁均可发病,男女比例2.43:1。

EG临床表现具有多样性、非特异性的特点,与分型有关。黏膜型以消化不良为主要表现,常有腹痛、腹泻、恶心、呕吐、胃肠道蛋白丢失、胃肠道出血等。本病伴胃肠道蛋白丢失的较为少见^[5],本组25%患者白蛋白降低,治疗后明显升高并接近正常。诊断为伴有失蛋白性EG。肌型少见,主要表现为完全性或不完全性肠梗阻,本组1例虽未能行肌层活检,但依据相关文献报道^[6],其临床表现及检查确诊为肠梗阻,故诊断为黏膜、肌层混合型。浆膜型可表现为腹腔积液、腹膜炎。此外EG合并胰腺炎者报道罕见,本组1例患者合并胰腺炎,予对症治疗后,随嗜酸粒细胞计数下降,胰腺炎好转,血尿淀粉酶降至正常,故考虑其原因可能为嗜酸粒细胞浸润十二指肠乳头区,引起胰胆管梗阻,从而引发胰腺炎^[7]。

本组病例83.3%均有嗜酸粒细胞计数增高,随症状缓解而逐渐下降。16.7%未见嗜酸粒细胞增高,与相关报道的20% EG患者嗜酸粒细胞未发现异常^[1]相符。故外周血嗜酸粒细胞升高是诊断EG的重要依据,但不是必备依据。行骨髓检查及腹水检查嗜酸粒细胞增高的阳性率均为100%,故这两项检查为诊断EG的关键。25%患者结核菌素试验阳性,考虑可能缘故为EG属于一种变态反应性疾病,机体处于高度敏感状态,国内有相关报道^[8],需与结核病进行鉴别诊断。54.2%患者大便隐血阳性,可能与嗜酸粒细胞浸润造成组织损伤有关。多次大便培养未发现致病菌,有别于感染性肠炎。2例腹水为血性腹水,考虑可能与肠壁浆膜层致敏后毛细血管通透性增强、红细胞渗出有关。

EG内镜下表现缺乏特异性,可为黏膜弥漫充血肿胀、出血点、颗粒样红斑、疣状糜烂、溃疡^[9]等。在可疑病变做多点活组织检查,至少应取6块^[6],每高倍视野嗜酸粒细胞计数大于25个有助于诊断EG^[10]。本组患者行内镜下活检,均证实有大量嗜酸粒细胞浸润,故内镜下活检证明有大量嗜酸粒细胞浸润是黏膜型病变诊断的

关键。12.5%患者内镜下无异常表现,常规多点活检仍发现大量嗜酸粒细胞浸润,故对怀疑EG患者,即使内镜下无异常表现也应常规多点活检。EG可累及从食管到直肠全胃肠道壁各层,但最常累及部位为胃窦、十二指肠、回盲部及回肠末段。本组病例以十二指肠受累最多(62.5%)。小肠受累3例(12.5%),但由于本组行小肠镜检查较少,易造成漏诊,小肠受累可能更高,故应多开展小肠镜以提高确诊率。黏膜活检对肌型及浆膜型病变诊断价值不大,但段丽萍 *et al*^[6]认为,EC多先累及胃肠道黏膜层,随着疾病进展,可累及胃肠道肌层甚至浆膜层。因此,肌层和浆膜层型经常伴有黏膜和黏膜下层病变,考虑EG诊断时均应行内镜下多点活检甚至黏膜下活检。本组8例浆膜型及1例肌型均合并黏膜型,符合上述规律。本组33.3%患者 *H pylori* 阳性,据报道^[11]通过根除 *H pylori*, EG得以治愈。是否 *H pylori* 感染是EG的病因需要进一步研究。

EG的诊断尚无金标准,目前通常采用Talley标准和Leinbach标准。本研究显示胃肠组织活检和腹水检查证明有大量嗜酸粒细胞浸润是诊断的关键。外周血嗜酸粒细胞升高多支持EG的诊断,但不作为本病的诊断标准,过敏史及诱因对本病的确诊具有参考价值。此外,确诊本病还应除外其他引起胃肠嗜酸粒细胞增多的疾病,骨髓检查、自身抗体、肿瘤标志物、寄生虫卵等有助于鉴别诊断。本病的误诊率高,尤其是基层医院,考虑误诊的主要原因为:(1)EG临床表现非特异性,临床医生对本病的认识不足;(2)活检点数及深度不够;(3)腹腔镜未普及,对内镜活检阴性的浆膜型病例易漏诊。

目前饮食对症治疗和激素治疗是EG主要的治疗方法。EG有一定的自限性,部分患者可在饮食对症治疗后症状缓解^[12],对确实或可疑的过敏食物或药物应立即停止使用。无食物和药物过敏史者,可采取序贯法排除可能引起过敏的食物。本组6例行饮食对症治疗后症状逐渐缓解,但嗜酸粒细胞未能降至正常水平。激素为治疗EG的有效药物。一般开始剂量为强的松15-40 mg/d口服,对一般情况差及不能口服药物的患者可给予甲基强的松龙40 mg/d静滴,待临床症状和体征改善后逐渐减量,对激素减量后反复的患者可以延长激素用药时间及延缓减量速度。部分患者停药后可能复发,但应用激素治疗仍然有效。本组18例给予激素治疗,症状明显缓解,嗜酸粒细胞均降至正常水平。目前激素治

■同行评价

本文回顾性分析了EG的临床特点,资料完整,对临床有一定的指导意义。

疗疗程尚不确定^[13], 本组疗程为2-5 mo. 比较饮食与激素治疗的疗效, 对饮食治疗不能缓解症状的18例患者给予激素治疗后症状明显缓解, 且嗜酸粒细胞计数下降明显, 可见激素治疗优于饮食治疗, 故建议给予EG患者常规激素治疗, 并剔除可疑食物, 预防复发. 比较两组复发情况无统计学意义, 考虑可能本组例数过少缘故. 本组1例肠梗阻患者激素治疗有效, 故对于肠梗阻患者应先采取保守治疗, 无效者可行外科手术. EG患者整个病程良好, 可反复发作, 长期随访, 尚未有恶变的有关报道.

4 参考文献

- 1 Talley NJ, Shorter RG, Phillips SF, Zinsmeister AR. Eosinophilic gastroenteritis: a clinicopathological study of patients with disease of the mucosa, muscle layer, and subserosal tissues. *Gut* 1990; 31: 54-58
- 2 唐海英, 姜虹, 王英德, 赵钢, 孟华. 嗜酸粒细胞性胃肠炎1例. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2042
- 3 Fenoglio LM, Benedetti V, Rossi C, Anania A, Wulhfard K, Trapani M, Scalabrino E, Alberto G, Novero D, Cavalloperin P. Eosinophilic gastroenteritis with ascites: a case report and review of the literature. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1013-1020
- 4 von Wattenwyl F, Zimmermann A, Netzer P. Synchronous first manifestation of an idiopathic eosinophilic gastroenteritis and bronchial asthma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 721-725
- 5 张洁, 王邦茂, 吕宗舜, 黄乃侠, 吴琳. 嗜酸细胞性胃肠炎伴乳糜样腹水一例并文献复习. *天津医药* 2002; 30: 753-754
- 6 段丽萍, 吕愈敏, 胡传松, 王爱英, 叶嗣懋, 林三仁. 嗜酸细胞性胃肠炎的临床多样性. *中华消化杂志* 2001; 21: 32-34
- 7 Lyngbaek S, Adamsen S, Aru A, Bergenfeldt M. Recurrent acute pancreatitis due to eosinophilic gastroenteritis. Case report and literature review. *JOP* 2006; 7: 211-217
- 8 张雪梅. 嗜酸性胃肠炎误诊6例分析. *中国误诊学杂志* 2006; 6: 700
- 9 蒋海根, 李伟平, 蔡旭, 张军. 嗜酸粒细胞性胃肠炎的临床及内镜表现. *中华消化杂志* 2006; 26: 413-414
- 10 Stone KD, Prussin C. Immunomodulatory therapy of eosinophil-associated gastrointestinal diseases. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1858-1865
- 11 Papadopoulos AA, Tzathas C, Polymeros D, Ladas SD. Symptomatic eosinophilic gastritis cured with *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* 2005; 54: 1822
- 12 Chen MJ, Chu CH, Lin SC, Shih SC, Wang TE. Eosinophilic gastroenteritis: clinical experience with 15 patients. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2813-2816
- 13 Baig MA, Qadir A, Rasheed J. A review of eosinophilic gastroenteritis. *J Natl Med Assoc* 2006; 98: 1616-1619

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》数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行! (科学编辑: 李军亮 2009-12-28)

原发性降结肠恶性黑色素瘤1例

夏翠锋, 李云峰, 李强, 潘定国, 冯瑞

夏翠锋, 李云峰, 李强, 潘定国, 冯瑞, 云南省肿瘤医院大肠癌临床研究中心 云南省昆明市 650118

作者贡献分布: 夏翠锋与李云峰组织论文撰写; 李强、潘定国及冯瑞负责材料的收集与整理。

通讯作者: 夏翠锋, 主治医师, 650118, 云南省昆明市昆州路519号, 云南省肿瘤医院大肠癌临床研究中心. yykxj598@yahoo.cn
电话: 0871-8185656-2132

收稿日期: 2009-10-02 修回日期: 2009-11-18

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Diagnosis and treatment of primary malignant melanoma in the descending colon: a report of one case

Cui-Feng Xia, Yun-Feng Li, Qiang Li, Ding-Guo Pan, Rui Feng

Cui-Feng Xia, Yun-Feng Li, Qiang Li, Ding-Guo Pan, Rui Feng, Colorectal Cancer Research Center, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming 650118, Yunnan Province, China

Correspondence to: Cui-Feng Xia, Colorectal Cancer Research Center, Tumor Hospital of Yunnan Province, 519 Kunzhou Road, Kunming 650118, Yunnan Province, China. yykxj598@yahoo.cn

Received: 2009-10-02 Revised: 2009-11-18

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

Malignant melanoma arises from melanocytes. As blood or lymph node metastasis occurs in the early stage of malignant melanoma, the disease has a poor prognosis. The anorectum, behind the skin and eyes, is the third most frequent site of malignant melanoma. Primary malignant melanoma of the colon is a rare clinical condition. Here, we report a case of primary malignant melanoma in the colon in a 66-year-old female. She was definitely diagnosed as primary malignant melanoma in the descending colon after radical resection and lymph node dissection. Postoperative systemic chemotherapy and immunotherapy achieved good effects. The patient is still alive five years postoperatively.

Key Words: Primary malignant melanoma; Descending colon; Diagnosis; Treatment

Xia CF, Li YF, Li Q, Pan DG, Feng R. Diagnosis and treatment of primary malignant melanoma in the

descending colon: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3765-3767

摘要

恶性黑色素瘤是一种来源于皮肤移行区交界痣黑色素细胞的高度恶性肿瘤, 早期即发生血液或淋巴结转移, 预后差。肛管直肠是仅次于皮肤及眼睛的第三好发部位, 结肠原发性恶性黑色素瘤临床上罕见。本例患者在行根治性切除及淋巴结清扫手术后确诊结肠原发性恶性黑色素瘤, 术后行全身化疗及生物免疫治疗效果佳, 随访5年患者生存。

关键词: 恶性黑色素瘤; 降结肠; 诊断; 治疗

夏翠锋, 李云峰, 李强, 潘定国, 冯瑞. 原发性降结肠恶性黑色素瘤1例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(36): 3765-3767

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3765.asp>

0 引言

恶性黑色素瘤是一种来源于皮肤移行区交界痣黑色素细胞的恶性肿瘤, 恶性黑色素瘤好发于皮肤, 特别是足底, 肛管直肠是恶性黑色素瘤的第三好发部位, 仅次于皮肤及眼睛^[1]。结肠恶性黑色素瘤的发病率极低, 甚为少见。本例患者行根治性切除及淋巴结清扫术后行全身化疗及生物免疫治疗效果佳。现报道如下。

1 病例报告

女, 66岁, 因“反复左上腹疼痛不适2年, 大便带血6 mo入院”, 入院后检查: 心肺检查无特殊, 左侧腹部可触及约5 cm×6 cm大小的肿块, 活动欠佳。CT: 横结肠近脾曲处见肠壁增厚, 肠腔狭窄, 结肠浆膜面毛糙(图1)。B超: 左上腹占位性病变, 性质待查。纤维结肠镜: 结肠脾曲肿瘤, 取材后病理示结肠恶性肿瘤、性质待免疫组织化学鉴别。化验: 肿瘤标志物CEA: 20 μg/L, CA199: 89.2 μg/L、其余肿瘤标志物正常, 完善相关检查后行根治性左半结肠切除术, 术中剖开标本, 可见肿瘤本身及转移性淋巴结呈黑色(图2), 术后病理及免疫组织化学: 结肠恶性黑色素瘤

■背景资料

恶性黑色素瘤是一种来源于皮肤移行区交界痣黑色素细胞的恶性肿瘤, 多数肿瘤可产生黑色素, 但有少数可以不产生, 且癌细胞仍呈多巴胺阳性反应。他好发于皮肤, 特别是足底, 肛管直肠是恶性黑色素瘤的第三好发部位, 仅次于皮肤及眼睛。

■同行评议者

张凤春, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心

■应用要点

本研究提示,在实际的临床工作中对结肠恶性黑色素瘤的诊断及治疗应提高警惕,其低发部位仍有发生该病的可能,特别是对不产生黑色素的结肠恶性黑色素瘤,只有通过术后病理免疫组织化学来鉴别,极易出现误诊,同时还应重视除病灶外是否还存在高发部位的病灶,以免遗漏。在其治疗方面行肿瘤根治性切除联合淋巴结清扫术辅以及时的生物治疗为佳,可供医务工作者及研究人员参考。

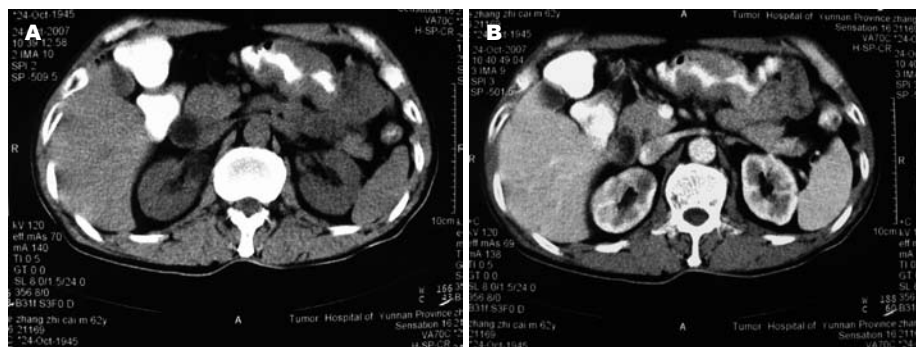


图1 原发性降结肠恶性黑色素瘤CT影像. A: 平扫; B: 增强.

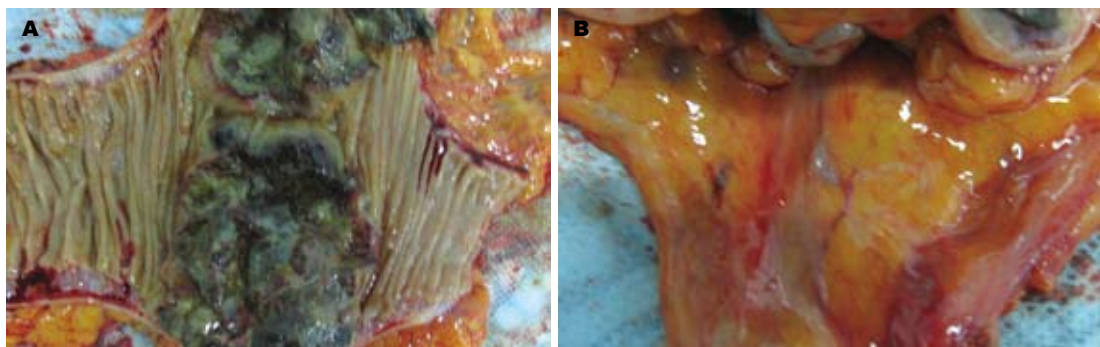


图2 原发性降结肠恶性黑色素瘤手术标本. A: 切除标本(已剖开); B: 系膜转移淋巴结.

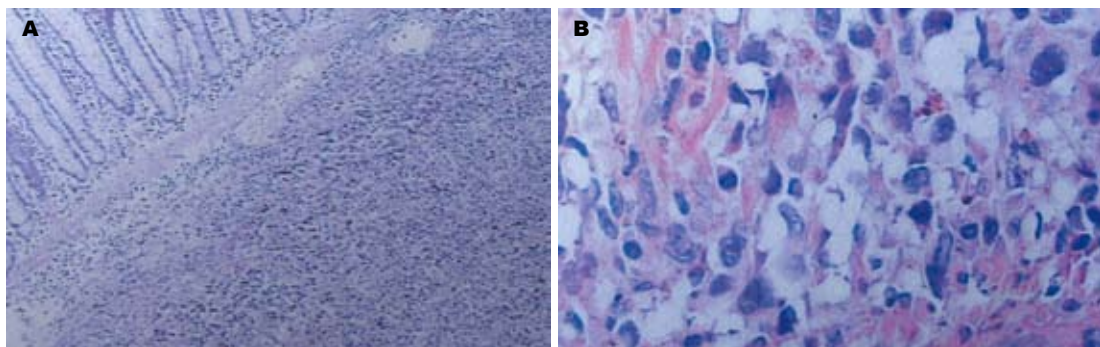


图3 原发性降结肠恶性黑色素瘤病理影像. A: 低倍镜($\times 20$); B: 高倍镜($\times 40$).

LN(4/15)见转移,免疫组织化学: Vim(+), CK(-), S-100(+), Melan-A(-), HMB45(+)(图3),术后恢复好,术后给予全身化疗(卡培他滨联合奥沙利铂六周期)及免疫治疗,好转后出院,随诊5年无异常。

2 讨论

恶性黑色素瘤是一种来源于皮肤移行区交界痣黑色素细胞的恶性肿瘤,多数肿瘤可产生黑色素,但有少数可以不产生,且癌细胞仍呈多巴胺阳性反应^[2]。恶性黑色素瘤好发于皮肤,特别是足底,肛管直肠是恶性黑色素瘤的第三好发部位,仅次于皮肤及眼睛^[1]。自1857年Moore首次报道本病至1981年100多年间,世界文献中约有450余例报道,我国的原发性直肠恶性黑色素瘤

(primary rectal malignant melanoma, PRMM)发病率偏低,国内文献仅有101例报道^[3]。而结肠恶性黑色素瘤的发病率极低,甚为少见,约占结肠肿瘤的0.5%^[1],女性多于男性,该病恶性程度及转移率高,很早就发生淋巴结及血性转移,预后极差。

从目前国内外文献来看,对结直肠恶性黑色素瘤的组织来源尚未有一个统一的认识。吴咸中,黄耀权 *et al* 多数学者认为是来源于神经嵴黑色素细胞的恶变。同时对PPMM是原发性还是继发性尚有分歧。喻德洪 *et al* 部分学者认为PPMM是肛管部黑色素瘤恶变向上扩展的结果,视为转移^[3]。同时国内外对本病的治疗方法观点不一,特别是对局部切除和根治性治疗的利弊仍存在争论。而本例患者发病于降结肠,查阅历年文献,发生于食管及肛管直肠部位的恶性黑

色素瘤较为多见, 而发生于结肠的病例甚为少见. 因此, 在实际的临床工作中对结肠恶性黑色素瘤的诊断及治疗应提高警惕, 其低发部位仍有发生该病的可能, 特别是对不产生黑色素的结肠恶性黑色素瘤, 只有通过术后病理免疫组织化学来鉴别, 极易出现误诊, 同时还应重视除病灶外是否还存在高发部位的病灶, 以免遗漏. 在其治疗方面作者认为行肿瘤根治性切除联合淋巴

结清扫术辅以及时的生物治疗为佳.

3 参考文献

- 1 郝希山, 王殿昌. 腹部肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2003; 1: 529
- 2 申龙河, 金日, 申涛. 肛管直肠恶性黑色素瘤的研究概况. 中国慢性病预防与控制 2008; 16: 326-328
- 3 蔡三军. 结直肠肛管癌. 第1版. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 422-425
- 4 刘旭升, 张殿文, 宋爱利. 24例直肠恶性黑色素瘤的诊断和治疗. 中国肿瘤临床 2002; 29: 600-602

■同行评价

结肠恶性黑色素瘤是一种少见病例, 本文有一定临床参考意义.

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}¹, V_{max}不能写成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*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylethanilide(*N*-甲基乙酰胺), *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 2009-12-28)

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!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

仇毓东 副教授

南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科

崔立红 副教授

中国人民解放军海军总医院消化内科

董蕾 教授

西安交通大学第二附属医院消化内科

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

范小玲 主任医师

北京地坛医院综合科

房静远 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院 上海市消化疾病研究所

傅春彬 主任医师

吉化集团公司总医院消化内科

高英堂 研究员

天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

金瑞 教授

首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李定国 教授

上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

刘绍能 主任医师

中国中医科学院广安门医院消化科

刘云鹏 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤内科

陆伦根 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科

倪润洲 教授

南通大学附属医院消化内科

潘林娜 教授

哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腔镜室

潘秀珍 教授

福建省立医院消化内科

任建林 教授

厦门大学附属中山医院消化内科

谭德明 教授

中南大学湘雅医院感染病科

吴志勇 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院普外科

许乐 主任医师

北京医院消化科

杨家和 教授

中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院综合三科

杨建民 教授

浙江省人民医院消化内科

姚希贤 教授

河北医科大学附属第二医院消化内科

张锦生 教授

复旦大学上海医学院病理学系

周伟平 教授

中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外三科

邹小明 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科