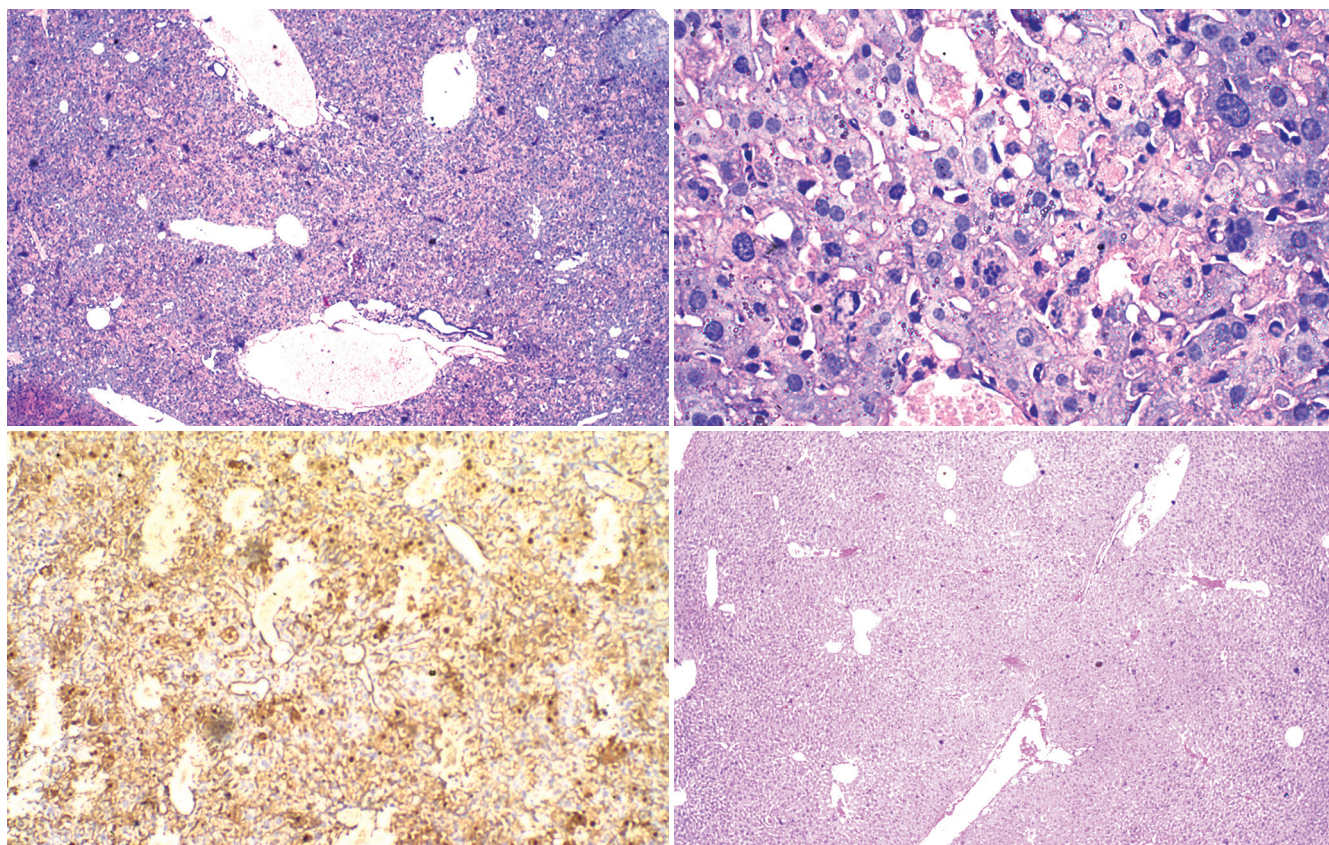


# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年6月8日 第16卷 第16期 (Volume 16 Number 16)



16 / 2008

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

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

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

### 常务编委

成军教授  
程英升主任医师  
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  
白文元教授  
苒新明教授  
陈洪副教授  
陈军贤主任医师  
陈尼维主任医师  
陈其奎教授  
陈卫昌教授

陈贻胜教授  
陈玉林教授  
程斌副教授  
迟宝荣教授  
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  
冯红主任医师  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关晓辉主任医师  
关玉盘教授  
郭晓钟教授  
郭新宁教授  
洪天配教授  
侯晓华教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄晓东副主任医师  
黄颖秋教授  
黄裕新教授  
霍丽娟主任医师  
季国忠副教授  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
金懋林教授  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李继强教授  
李淑德教授  
李晓宇主任医师  
李延青教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
李兆申教授  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰教授  
刘海林主任医师  
刘铁夫教授  
刘占举教授  
陆伦根教授  
吕志武教授

马金城教授  
马欣主任医师  
毛高平主任医师  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴熙绪主任医师  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
曲智威副主任医师  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵金玉教授  
沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋于刚教授  
孙富强副教授  
孙侃教授  
孙自勤教授  
唐采白副教授  
唐芙爱教授  
唐丽安教授  
田德安主任医师  
童强主任医师  
宛新建副教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党副教授  
王吉耀教授  
王莉瑛教授  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
吴萍主任医师  
夏时海副教授  
徐秀英副教授  
许春舫主任医师  
许乐主任医师  
许亚平副教授  
杨冬华教授  
杨建民教授  
杨希山教授  
杨幼林主任医师  
杨云生教授  
杨昭徐教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
于红刚副教授  
于晓峰主任医师  
袁伟建教授

展玉涛副主任医师  
张春清教授  
张方信主任医师  
张国梁主任医师  
张吉翔教授  
张集昌主任医师  
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  
赵晓晏教授  
郑鹏远教授  
智发朝教授  
周国雄主任医师  
朱春兰主任医师  
朱人敏教授  
邹晓平主任医师

#### 消化外科学

别平教授  
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  
陈建荣副教授  
陈克能主任医师  
陈力教授  
陈立波副教授  
陈凜教授  
陈强谱教授  
陈亚军主任医师  
陈知水教授  
陈祖林副教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
迟强教授  
仇毓东副教授  
崔彦教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
董明教授  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅廷亮教授  
傅志仁主任医师

高成新教授  
葛海燕教授  
龚建平教授  
巩鹏教授  
谷俊朝主任医师  
顾岩教授  
郭克建教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
何超教授  
何生教授  
何裕隆教授  
何振平教授  
黄志勇副教授  
季加孚教授  
姜波健教授  
蒋龙元副教授  
兰平教授  
黎乐群教授  
李国威教授  
李华山副主任医师  
李靖副教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李小荣教授  
李旭副教授  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
林胜璋副教授  
刘建教授  
刘颖斌副教授  
刘志苏教授  
刘作金副教授  
卢实春教授  
陆才德教授  
陆云飞教授  
吕明德教授  
吕云福教授  
梅铭惠教授  
彭波副教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
彭志海教授  
钱建民教授  
乔岐禄主任医师  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦仁义教授  
邱宝安主任医师  
邱双健副教授



# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

邱伟华副主任医师  
裘正军教授  
任建安教授  
荣大庆教授  
邵永孚教授  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
沈岩主任医师  
师英强教授  
施诚仁教授  
宋世兵主任医师  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙家邦教授  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
谭群友副教授  
汤恢煥教授  
汤展宏副教授  
唐文皓副主任医师  
田素礼教授  
田晓峰教授  
万德森教授  
汪波副主任医师  
汪根树副教授  
王春友教授  
王凤山副教授  
王广义教授  
王济明教授  
王健生副教授  
王烈主任医师  
王鲁副教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王效民教授  
王要军教授  
王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
卫洪波教授  
吴德全教授  
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  
席启主任医师  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师

徐智教授  
许戈良教授  
严律南教授  
严以群主任医师  
杨广顺教授  
杨维良教授  
杨尹默教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于恩达教授  
于健春教授  
于良副教授  
于则利教授  
郁宝铭教授  
郁正亚副教授  
曾勇教授  
张柏和教授  
张群华教授  
张水军教授  
张肇达教授  
张宗明教授  
赵增仁副主任医师  
郑民华教授  
钟德珩教授  
周丁华主任医师  
周伟平教授  
朱立元教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松副研究员  
陈建杰教授  
陈仕珠主任医师  
陈耀凯副教授  
党双锁副教授  
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  
郝春秋副教授  
何生松教授  
江家骥教授  
李智伟教授  
林菊生教授  
刘杞教授  
刘正稳教授  
孟庆华教授  
宁琴教授  
牛俊奇教授

钱林学主任医师  
秦波教授  
石统东副教授  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
唐霓副研究员  
唐世刚教授  
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  
谢青教授  
徐小元教授  
宣世英教授  
闫惠平研究员  
杨林副研究员  
姚鹏副教授  
张继明教授  
张明辉副主任医师  
张绪清副教授  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵桂珍教授  
赵连三教授  
周伯平教授  
周文兴教授  
周霞秋教授  
朱传武副主任医师  
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  
劳绍贤教授  
李军祥教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员  
刘平教授  
刘绍能主任医师  
龙致贤教授  
牛建昭教授  
沈洪教授  
唐旭东主任医师  
唐志鹏研究员  
王新月教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
张声生教授

### 消化肿瘤学

白玉贤教授  
曹秀峰主任医师  
曹志成院士  
陈公琰主任医师  
李瑗教授  
刘宝瑞教授  
刘彬彬副研究员  
刘云鹏教授  
马力文主任医师  
吴晴教授  
熊斌教授  
张凤春教授

### 消化影像学

陈克敏教授  
程红岩教授  
褚建国主任医师  
官泳松教授  
韩新巍教授  
胡红杰主任医师  
黄金华副教授  
匡安仁教授  
李健丁教授  
鲁华玉研究员  
施海彬教授  
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

### 消化内镜学

崔毅主任医师  
丁佑铭教授  
郝俊鸣副主任医师  
刘海峰主任医师  
潘林娜教授  
沈俊教授  
孙明军教授  
万军教授

### 消化介入治疗学

卢榜裕教授  
茅爱武主任医师  
倪才方教授  
吴硕东教授  
袁友红副教授  
郑加生主任医师

### 消化中西医结合学

崔乃强教授  
李方儒教授

刘鲁明教授  
唐文富副主任医师  
王学美研究员

### 消化基础研究

曹洁副教授  
樊红副教授  
高春芳研究员  
高峰教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
黄文林教授  
李东辉教授  
李杰副教授  
李永哲副研究员  
李增山副教授  
梅林教授  
彭曦副研究员  
钱睿哲教授  
任超世研究员  
孙秀发教授  
谭学瑞教授  
屠红副研究员  
汪思应教授  
吴晓东教授  
夏建川研究员  
徐存拴教授  
徐德忠教授  
徐宁志研究员  
徐迎新研究员  
许文燮教授  
姚登福教授  
阴赧宏研究员  
喻荣彬副教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周士胜教授  
周晓东研究员  
周晓武副主任医师  
左国营副主任药师

### 消化病理学

杜祥教授  
刘勇钢副主任医师  
吕宁主任医师  
马大烈教授  
潘兴华副主任医师  
阎晓初副教授  
易永芬教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵景民教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

## ● 目 次 ●

2008 年 6 月 8 日

第 16 卷

第 16 期

(总第240期)

### 述 评

- 1711 共聚焦内镜在消化系统疾病中的诊断价值  
黄颖秋

### 基 础 研 究

- 1716 siRNA阻断NF- $\kappa$ B信号通路联合5-FU对食管鳞癌细胞凋亡的促进作用  
田芳, 宋敏, 许培荣, 刘红涛, 薛乐勋
- 1722 携带肝细胞生长因子基因的减毒沙门氏菌在大鼠胃溃疡治疗中的组织分布  
蒋泽斌, 哈小琴, 高鹏
- 1728 肝脏脂肪酸在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪性肝病模型中的代谢  
陆金来, 陈金联, 陈明祥, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维
- 1734 鼠特异性Fas抗体对人鼠嵌合肝中人肝细胞增殖的促进作用  
蒋黎, 李俊刚, 兰林, 王宇明, 刘国栋
- 1741 5-杂氮-2'-脱氧胞苷诱导裸鼠HepG2种植瘤细胞T-cadherin的表达及其对种植瘤的抑制作用  
梁治坤, 黄志勇, 陈孝平, 刘聪, 吴在德
- 1746 酵母双杂交技术对人胰腺cDNA文库中HBcAg结合蛋白基因的筛选  
张维燕, 张锦前, 王琦, 李国力, 王晓春, 张晨宇, 杨涤, 成军
- 1751 主动外排泵外膜蛋白编码基因*hefA*在幽门螺杆菌多重耐药中的重要作用  
刘志强, 郑鹏远

### 临 床 研 究

- 1757 E-cadherin、 $\beta$ -catenin和CathepsinD在食管鳞状细胞癌中的表达及其意义  
马红, 陈晓, 马海梅, 尼加提·热合木, 蒲红伟
- 1763 胃泌素和生长激素在卵巢癌患者胃轻瘫发生中的作用  
夏志军, 吴波, 谷艳萍, 胡清, 陈少夫, 赵晓东

### 文 献 综 述

- 1768 NOX家族在肝纤维化中的作用  
罗俊, 杨丽
- 1774 手术为主的大肠癌综合治疗  
崔恒官, 曹秀峰
- 1781 细胞重要分子表型与肿瘤个体化治疗的研究进展  
何平, 赵晓航
- 1788 乙型肝炎病毒囊膜蛋白候选结合蛋白的研究进展  
周飞, 任建林, 董菁

### 研 究 快 报

- 1793 塞来昔布对人肝癌细胞株HepG2细胞核转录因子- $\kappa$ B活性及蛋白表达的抑制  
卢栋, 李永华, 纪龙, 李龙嫚, 杜玉开, 余红平
- 1797 VEGFR-3 siRNA体外对人结肠癌细胞生长的抑制作用  
贾如江, 侯丽艳, 张有成, 吕志诚

### 临 床 经 验

- 1802 A型肉毒毒素对大鼠胃排空及血浆胃动素、血清瘦素的影响  
刘文徽, 刘庆森, 韩辉, 吴本俨
- 1807 原发性胃淋巴瘤的CT表现及误诊原因  
任小军, 章士正, 董旦君, 王丽华, 金重午
- 1812 镍钛记忆合金加压吻合夹在胃肠吻合中的应用  
王剑平, 徐志峰, 王明元, 蔡绍环, 黄春开



	<div>1815 原发性肝细胞癌射频消融后快速广泛复发的因素 翟博, 徐爱民, 李晓燕, 刘晟, 陈夷, 吴孟超</div> <div>1820 促凋亡因子PDCD5与Fas在肝癌及其癌旁组织中的表达 余康康, 刘顺爱, 李文凡, 沈冰, 兰孟东, 郎振为, 成军</div> <div>1825 大承气汤辅助治疗反复发作性急性胰腺炎25例 赵宏智</div> <div>1828 趋化因子受体CCR7在结直肠癌中的异常表达 张义侠, 赵成海, 张海鹏</div>
致 谢	1832 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<div>1715 世界华人消化杂志网络版的发表前链接</div> <div>1727 世界华人消化杂志标点符号用法</div> <div>1740 世界华人消化杂志作者署名要求</div> <div>1745 世界华人消化杂作者贡献及同行评议公开策略</div> <div>1762 世界华人消化杂志修回稿须知</div> <div>1767 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知</div> <div>1773 中华医学会第八次全国消化系疾病学术会议征文通知</div> <div>1796 世界华人消化杂志被收录情况</div> <div>1806 第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知</div> <div>1811 世界华人消化杂志正文要求</div> <div>1819 世界华人消化杂志栏目设置</div> <div>1824 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</div> <div>1831 世界华人消化杂志投稿方式</div>
封面故事	蒋黎, 李俊刚, 兰林, 王宇明, 刘国栋. 鼠特异性Fas抗体对人鼠嵌合肝中人肝细胞增殖的促进作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1734-1740 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1734">http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1734</a>
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

<div><div>世界华人消化杂志</div><div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div><div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</div><div>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-06-08 原刊名 新消化病学杂志</div></div> <div><div>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</div><div>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</div></div>	<div><div>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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></div><div>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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></div><div>印刷 北京科信印刷厂</div><div>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)</div><div>订购 全国各地邮电局</div><div>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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></div></div>	<div>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.</div> <div>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<a href="http://wcjd.wjgnet.com">http://wcjd.wjgnet.com</a>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</div> <div>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.</div> <div>2008年版权归世界华人消化杂志所有</div>
---	---	--

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

## June 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 16

<b>EDITORIAL</b>	1711 Diagnostic value of confocal laser endoscopy in digestive system diseases <i>Huang YQ</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>1716 Effect of siRNA-mediated inhibition of nuclear factor-<math>\kappa</math>B in combination with 5-FU on apoptosis of squamous cell carcinoma cell lines <i>Tian F, Song M, Xu PR, Liu HT, Xue LX</i></p> <p>1722 Distribution of attenuated <i>salmonellae</i> carrying hepatocyte growth factor genes in murine gastric ulcers <i>Jiang ZB, Ha XQ, Gao P</i></p> <p>1728 Fatty acids metabolic profile in high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats <i>Lu JL, Chen JL, Chen MX, Hong J, Chen WX, Zhu JS, Chen NW</i></p> <p>1734 Repopulation of human fetal hepatocytes in nude mouse model with chimeric human liver using mouse-specific anti-Fas antibody <i>Jiang L, Li JG, Lan L, Wang YM, Liu GD</i></p> <p>1741 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced T-cadherin expression in HepG2-derived tumors and its inhibitory effects on tumor growth in nude mice <i>Liang ZK, Huang ZY, Chen XP, Liu C, Wu ZD</i></p> <p>1746 Screening of proteins binding to hepatitis B core antigen from human pancreas cDNA library by yeast two-hybrid system <i>Zhang WY, Zhang JQ, Wang Q, Li GL, Wang XC, Zhang CY, Yang D, Cheng J</i></p> <p>1751 Important role of efflux pump gene <i>hefA</i> in multidrug resistance of <i>Helicobacter pylori</i> <i>Liu ZQ, Zheng PY</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	<p>1757 Significance of E-cadherin, <math>\beta</math>-catenin and CathepsinD expression in esophageal squamous cell carcinoma <i>Ma H, Chen X, Ma HM, NiJT • RHM, Pu HW</i></p> <p>1763 Roles of gastrin and somatostatin in ovarian cancer with gastroparesis syndrome <i>Xia ZJ, Wu B, Gu YP, Hu Q, Chen SF, Zhao XD</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>1768 Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase family in liver fibrogenesis <i>Luo J, Yang L</i></p> <p>1774 Surgery-predominant combined treatment for colorectal cancer <i>Cui HG, Cao XF</i></p> <p>1781 Advances in tumor-related molecular phenotypes and personalized therapy <i>He P, Zhao XH</i></p> <p>1788 Advances of candidate binding protein to envelope protein of hepatitis B virus <i>Zhou F, Ren JL, Dong J</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>1793 Celecoxib inhibited activation of NF-<math>\kappa</math>B and expression of NF-<math>\kappa</math>B P65 protein in HepG2 cells <i>Lu D, Li YH, Ji L, Li LM, Du YK, Yu HP</i></p> <p>1797 <i>Ex vivo</i> inhibitory effects of VEGFR-3 siRNA on growth of human colon cancer cells <i>Jia RJ, Hou LY, Zhang YC, Lv ZC</i></p>

<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>1802 Effects of botulinum toxin-A on gastric emptying, plasma motilin and serum leptin in rats <i>Liu WH, Liu QS, Han H, Wu BY</i></p> <p>1807 CT presentations and cause analysis of misdiagnosis for primary gastric lymphoma <i>Ren XJ, Zhang SZ, Dong DJ, Wang LH, Jin CW</i></p> <p>1812 Application of compression anastomosis clip in gastroenterostomy <i>Wang JP, Xu ZF, Wang MY, Cai SH, Huang CK</i></p> <p>1815 Risk factors of rapid and extensive intrahepatic neoplastic progression after radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma <i>Zhai B, Xu AM, Li XY, Liu S, Chen Y, Wu MC</i></p> <p>1820 Elevated expression of PDCD5 and Fas in hepatocellular carcinoma and its adjacent tissues <i>Yu KK, Liu SA, Li WF, Shen B, Lan MD, Lang ZW, Cheng J</i></p> <p>1825 Curative effect of Dachengqi decoction as an adjuvant therapy on recurrent acute pancreatitis: an analysis of 25 cases <i>Zhao HZ</i></p> <p>1828 Aberrant expression of chemokine receptor 7 in colorectal cancer <i>Zhang YX, Zhao CH, Zhang HP</i></p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	1832 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<p><i>Jiang L, Li JG, Lan L, Wang YM, Liu GD.</i> Repopulation of human fetal hepatocytes in nude mouse model with chimeric human liver using mouse-specific anti-Fas antibody.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(16): 1734-1740</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1734.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1734.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i></p> <p>Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i></p> <p>Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</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** June 8, 2008

### 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@wcjdnet.com](mailto:wjcd@wcjdnet.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@wcjdnet.com](mailto:wjcd@wcjdnet.com)  
<http://www.wcjdnet.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

© 2008 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

### SPECIAL STATEMENT

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2008 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*



# 共聚焦内镜在消化系疾病中的诊断价值

黄颖秋

黄颖秋, 中国医科大学第五临床学院; 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科 辽宁省本溪市 117000

黄颖秋, 主任医师, 教授, 研究生导师, 主要从事胃肠动力疾病、消化系统肿瘤及肝硬化的基础与临床研究。

通讯作者: 黄颖秋, 117000, 辽宁省本溪市平山区人民路29号, 中国医科大学第五临床学院; 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科. huangyingqiu\_bx@126.com

电话: 0414-2215137

收稿日期: 2008-04-06 修回日期: 2008-05-13

## Diagnostic value of confocal laser endoscopy in digestive system diseases

Ying-Qiu Huang

Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group) Co., Ltd.; the Fifth Clinical College of China Medical University, Benxi 117000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group) Co., Ltd.; the Fifth Clinical College of China Medical University, 29 Renmin Road, Pingshan District, Benxi 117000, Liaoning Province, China. huangyingqiu\_bx@126.com

Received: 2008-04-06 Revised: 2008-05-13

## Abstract

Confocal laser endoscopy is a novel technology which allows subsurface histological diagnosis at a cellular and subcellular level *in vivo* during ongoing endoscopy. Confocal laser endoscopy thereby provides instantaneous histopathology photographs during ongoing upper, lower gastrointestinal tract endoscopy and laparoscopy in high resolution by point scanning laser fluorescence analysis. The author undertook a systematic review that included novel technology advancement of confocal laser endoscopy, confocal laser laparoscopy, diagnostic values on the Barrett's esophagus, esophageal adenocarcinoma and gastric cancer, *H pylori* infection, collagenous colitis, ulcerative colitis, intraepithelial neoplasia, colorectal cancer and chronic hepatic lesions in diseases pertaining to digestive system. In addition, this article described molecular imaging of cancer, functional imaging of altered perfusion in malignant tumor and inflammatory diseases and

high resolution *in vivo* morphological diagnosis. These new advanced technologies indicate that confocal laser endoscopy is evolving as a novel technique for rapid diagnosis of gastrointestinal neoplastic diseases at the microscopic level and bears the potential for molecular imaging in humans in the near future.

Key Words: Confocal laser endoscopy; Diagnosis; Digestive system diseases; Advancement

Huang YQ. Diagnostic value of confocal laser endoscopy in digestive system diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1711-1715

## 摘要

共聚焦内镜是一种新的内镜成像技术, 他在内镜检查的同时, 可在体内进行表层下细胞及亚细胞水平的组织学诊断. 通过点扫描激光分析, 共聚焦上、下消化系内镜及共聚焦腹腔镜可连续不断地获得高清晰度的组织学图像. 本文系统阐述共聚焦内镜、共聚焦腹腔镜诊断技术的最新进展, 以及共聚焦内镜对Barrett食管、食管腺癌、胃癌、幽门螺杆菌(*H pylori*)感染、胶原性结肠炎、溃疡性结肠炎、上皮内瘤样变、结直肠癌和慢性肝病等消化系疾病的诊断价值. 此外, 本文还阐述共聚焦内镜检查时, 在体情况下恶性肿瘤与炎性病变的高清晰度分子学图像及异常血流灌注特征. 共聚焦内镜技术的进展有望在不久的将来使人类消化系肿瘤分子水平的快速诊断成为可能.

关键词: 共聚焦内镜; 诊断; 消化系统疾病; 进展

黄颖秋. 共聚焦内镜在消化系疾病中的诊断价值. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1711-1715

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1711.asp>

## 0 引言

共聚焦内镜是目前国际上最新的内镜成像技术, 是传统电子内窥镜和微型共聚焦激光扫描显微镜整合的产物<sup>[1]</sup>. 传统内窥镜所能达到的检查部位, 共聚焦内镜均能达到. 共聚焦内镜的问世, 使应用传统电子内镜检查的同时可进行消化系

## ■背景资料

目前, 虽然内镜下活检材料的病理组织学检查仍是消化系统疾病诊断的金标准, 但因钳取组织标本的偶然性使检测结果存在假阴性, 且不能对在体组织实时观测, 加之病理诊断结果耗时较长, 使内镜医生无法在内镜检查当时确定是否切除病灶, 导致重复内镜检查, 且治疗过度或治疗不足给患者造成不必要的风险. 共聚焦内镜可在内镜检查的同时进行活组织表面下成像, 并可指导靶向活检, 为体内组织学研究提供了快速、准确的诊断工具.

## ■同行评议者

张军, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

## ■相关报道

孙思予曾就共聚焦内镜在Barrett食管、幽门螺杆菌感染、早期胃癌和结肠癌等诊断中的应用进行了阐述, 提供了有价值的信息。

黏膜层的共聚焦显微成像, 进而观测组织的微观结构变化。不同的组织结构和疾病可即刻诊断<sup>[2]</sup>。由于其能提供放大1000倍的内镜图像, 并可以在内镜检查的同时观察黏膜层腺体、细胞结构以及微循环的变化。对体内组织超微结构的精准分析有助于靶向活检, 可显著提高早期肿瘤的发现率。而表层下成像可清晰显露微观疾病的特点, 使消化系黏膜炎症或细菌感染的诊断也十分容易, 以此技术诊断溃疡性结肠炎及*H pylori*感染便是一种新尝试<sup>[2]</sup>。应用特制共聚焦内镜及腹腔镜探针对于活体动物的食管、胃、小肠、大肠、肠系膜、肝、胰和胆囊等器官的微观组织结构观察发现, 其各自的共聚焦图像特征迥异, 这种新型探针显著拓宽了共聚焦内镜的应用领域, 也为共聚焦腹腔镜的临床应用提供了广阔空间<sup>[3]</sup>。此外, 随着该技术的不断进步, 共聚焦内镜下的分子成像诊断不久也有望应用于临床<sup>[4]</sup>, 这无疑对消化系疾病的诊断提供了新的思路, 尤其为消化系早期肿瘤以及癌前病变的快速诊断提供了更加有力的工具, 必将开启消化系内镜诊断的新纪元<sup>[4-5]</sup>。共聚焦内镜在消化系疾病诊断的全新理念应引起人们的广泛关注。

## 1 共聚焦内镜的结构和功能

共聚焦内镜是指将一微型共聚焦激光扫描显微镜整合于传统电子内窥镜镜头端的结合体<sup>[1]</sup>。其成像原理为发自激光器的激光束经过扩束透镜、物镜会聚于物镜的焦点上, 由激光束激发的被检组织中所含荧光物质即产生不同方向的荧光, 其中一部分荧光经物镜、聚焦透镜会聚于聚焦物镜的焦点处, 在此处通过针孔被监测器所接收。只有在物镜的焦平面上发出的荧光能到达监测器, 其他部位发出的荧光不能通过针孔。因物镜和聚焦透镜的焦点位于同一光轴, 故称其为共聚焦成像。激光束对机体组织以光栅模式逐点扫描的同时, 位于焦点处针孔后的光电倍增管同步获得对应点的共聚焦图像光谱, 再经计算机数字化处理后, 最终在屏幕上显现出清晰的共聚焦图像。在成像过程中针孔的作用至关重要, 孔径的大小决定图像的对比度和分辨率。此技术可从表层至深层逐一观测组织器官, 并根据荧光对比剂的分布对组织器官的功能进行评估, 对黏膜层进行体内模拟组织学诊断, 直接观察细胞及亚细胞结构, 甚至进行分子成像, 指导靶向活检。共聚焦内镜技术作为一种全新的诊断工具, 因可逐层获

得组织光学横断面的共聚焦图像, 常被称为“光活检”或“光学切片”<sup>[4-6]</sup>。

## 2 共聚焦内镜检查时荧光对比剂的应用

共聚焦内镜检查时, 为使成像对比更清晰, 需使用荧光对比剂。目前应用于共聚焦内镜诊断技术的对比剂有荧光素钠、盐酸吲哚黄、四环素、甲酚紫、白蛋白和光叶卟啉等。其中较常应用的对比剂为10%的荧光素钠和0.05%的盐酸吲哚黄<sup>[7]</sup>。前者为静脉应用, 价格低廉、无致突变活性, iv后少数受检者可出现恶心、呕吐等一过性不良反应。后者为局部用药, 可能有轻微的致突变作用, 故存在一定临床风险<sup>[5-7]</sup>。研究显示, 荧光素钠iv后20 s内即可成像。因iv后荧光素钠不能穿过消化系黏膜上皮细胞的类脂膜与细胞核的酸性物质结合, 上皮细胞核和杯状细胞不染色, 故不能清楚显示细胞核。而上皮细胞、血管及固有膜结缔组织基质的分辨率较高, 使结缔组织和微循环系统产生强烈对比, 这一特性有助于共聚焦内镜辨认柱状上皮细胞、杯状细胞和隐窝结构<sup>[7]</sup>。此外, 共聚焦图像可清晰区别小肠上皮细胞间隙与杯状细胞, 根据上皮细胞是否中断而评估小肠的黏膜屏障功能<sup>[8]</sup>。相反, 盐酸吲哚黄可以穿过上皮细胞的类脂膜与细胞核的酸性物质结合, 使细胞核和细胞浆染色, 局部应用后数秒即可吸收, 因仅局限于黏膜表层, 更适合标记表层上皮细胞, 对高度不典型增生及早期肿瘤组织病灶的检测极为适宜<sup>[9]</sup>。

## 3 共聚焦内镜在消化系疾病的诊断价值

3.1 Barrett食管及早期食管腺癌 Barrett食管是食管腺癌的癌前状态, 是食管下段的复层鳞状上皮被含有杯状细胞的单层柱状上皮替代的一种病理现象<sup>[10]</sup>。前已述及, 共聚焦内镜能识别上消化系黏膜的不同上皮结构。因杯状细胞在共聚焦图像中有其特异的形状, 共聚焦内镜对Barrett食管的诊断优势非常显著, 其敏感性和准确性都很高<sup>[11-13]</sup>。Barrett食管作为食管腺癌的癌前病变, 已引起国内外学者的普遍关注。为降低其病死率, 食管腺癌的早期诊断显得尤为重要。共聚焦内镜检查时, 高度不典型增生与非不典型增生的Barrett食管上皮的组织超微结构完全不同, 而由Barrett食管衍生的早期食管腺癌组织的共聚焦图像更有其独特性<sup>[12]</sup>, 食管腺癌组织中含有异型细胞的不规则上皮及原有的正常基底膜缺失这一高特异性<sup>[14]</sup>, 使得共聚焦内镜对食管腺

癌诊断的敏感性和准确性都高达90%以上<sup>[15]</sup>。因此,共聚焦内镜对Barrett食管及食管腺癌的早期诊断具有重要价值。

**3.2 *H pylori*感染** *H pylori*感染可引发慢性胃炎、淋巴瘤、消化性溃疡及胃癌等严重疾病。尽管对*H pylori*的检测手段很多,但共聚焦内镜对*H pylori*检测的超敏感性和准确性仍应引起人们的高度重视<sup>[2]</sup>。研究显示,共聚焦内镜可用于活体*H pylori*的检测,经导管在胃黏膜表面局部涂抹盐酸吡啶黄可观测*H pylori*的滋生情况。因盐酸吡啶黄可被局部胃黏膜吸收,并可将位于胃黏膜表面及其深层的*H pylori*染色,经共聚焦内镜成像后可清晰观测*H pylori*菌体及鞭毛的活动情况。同时与胃黏膜活检组织所进行的尿素酶试验、组织学检查及细菌培养对比研究发现,共聚焦内镜对*H pylori*诊断的准确率高达100%<sup>[16]</sup>。此种技术也可准确诊断*H pylori*相关性胃炎<sup>[16]</sup>。

**3.3 癌前病变及早期胃癌** 共聚焦内镜可用于癌前病变及早期胃癌的诊断<sup>[11]</sup>。众所周知,癌前病变的病理组织学特征是胃黏膜的不典型增生及含有杯状细胞的肠化生上皮。而早期胃癌的病理学特点是细胞结构异常、染色质凝聚和核浆比例增大<sup>[17]</sup>。二者的共聚焦图像完全不同。此外,共聚焦内镜也能准确区别正常消化系黏膜和肿瘤组织的微血管结构<sup>[18]</sup>。共聚焦图像可清晰显示胃癌组织中特征性的不规则细胞结构和血管异常分布,正常胃黏膜的微血管结构呈蜂窝状或螺管形,规则分布于胃小凹周围。而胃癌病灶中则显示出过多口径不一,形状各异或呈短树枝样的微血管结构<sup>[19]</sup>。应用共聚焦内镜对离体胃癌组织研究发现,癌细胞的核区面积均数显著大于正常细胞,而在体研究表明,共聚焦图像可清晰显示胃癌病灶中不规则细胞结构和血管异常分布的特征性改变<sup>[20]</sup>。业已证实,共聚焦内镜对癌前病变和早期胃癌诊断的特异性及敏感性都非常高<sup>[18]</sup>。因此,共聚焦内镜可作为高危人群早期胃癌筛选的一种新手段,共聚焦内镜的靶向活检技术对胃癌的防治具有重要意义。

**3.4 胶原性结肠炎** 胶原性结肠炎是一种不明原因的非特异性炎症性肠病,临床以慢性水样泻、腹痛为其特点,但血液学、细菌学检验、下消化系X线造影及结肠镜检查等均无异常发现,病理学特征为结肠贴邻基底膜的上皮下胶原层弥漫性增厚,可超过正常基底膜厚度的2-20倍。此外,还可见肠黏膜上皮细胞变平,杯状细

胞明显减少等异常变化,但隐窝结构几乎不受影响<sup>[21]</sup>,因此临床诊断十分困难。荧光素钠iv后的共聚焦图像可清晰显示上皮下胶原带增厚<sup>[22]</sup>。此外,共聚焦内镜还能清楚分辨正常结肠黏膜与受侵袭结肠黏膜的超微组织结构,共聚焦内镜的上述特性无疑为胶原性结肠炎的诊断提供了一种新思路,也有助于提高靶向病理活检的阳性率。

**3.5 溃疡性结肠炎** 共聚焦内镜可用于溃疡性结肠炎的诊断<sup>[2]</sup>。共聚焦图像显示正常的结肠黏膜的隐窝开口规则,呈圆形,隐窝被均匀的上皮细胞所覆盖,杯状细胞分布正常,而溃疡性结肠炎的肠黏膜隐窝开口呈星形,或隐窝局部聚集,杯状细胞减少<sup>[7]</sup>。经结肠镜亚甲蓝全结肠染色确定病灶部位后再行共聚焦内镜检查后发现,共聚焦图像可准确显示结肠的炎性改变及上皮内瘤样变,敏感性和特异性分别为94.7%和98.3%,准确性高达97.8%<sup>[23]</sup>。研究证实,共聚焦内镜下行靶向活检可显著提高慢性溃疡性结肠炎上皮内瘤样变及高度不典型增生病变的确诊率<sup>[23-24]</sup>,应用共聚焦内镜对溃疡性结肠炎的随访观察有助于结肠癌的早期诊断,共聚焦内镜靶向活检技术可作为溃疡性结肠炎发生上皮内瘤样变的诊断金标准<sup>[24]</sup>。

**3.6 结肠上皮内瘤样变和结直肠癌 iv荧光素钠对比剂** 共聚焦图像可清晰显示结肠黏膜的细胞结构、血管、血细胞及固有膜的结缔组织。因荧光素钠静脉给药后并不富集于肠上皮细胞核,共聚焦图像不易观察到细胞核,这有助于共聚焦内镜辨认肠黏膜的柱状上皮细胞、杯状细胞和隐窝结构<sup>[25]</sup>。共聚焦内镜检查发现,正常结肠隐窝分布规律,呈圆形,杯状细胞数量正常,隐窝开口呈圆形或椭圆形。经结肠镜亚甲蓝染色确诊的结肠黏膜局限性病变再行共聚焦内镜检查后发现,上皮内瘤样变和结肠癌的隐窝呈管状、绒毛状,隐窝结构不规则,杯状细胞减少或缺失<sup>[26]</sup>。此外,结肠癌灶的细胞间隙清晰,血管结构不规则,而良性病灶则无此表现。共聚焦图像对上皮内瘤样变和结肠癌诊断的敏感性和特异性分别为97.4%和99.4%,准确性也为99.2%<sup>[7]</sup>。可见,共聚焦内镜对结肠癌的普查具有重要意义<sup>[24]</sup>,此技术的应用开启了早期结肠癌内镜诊断的新纪元<sup>[27]</sup>。

**3.7 腹腔疾病** 肝组织活检的病理诊断对大多数肝脏疾病的确诊十分重要,也是肝脏疾病确定诊断的金标准。然而,肝组织活检仍存在诸多缺

#### ■创新盘点

本文就共聚焦内镜技术的最新进展、以及共聚焦内镜对Barrett食管、食管腺癌、胃癌、*H pylori*感染、胶原性结肠炎、溃疡性结肠炎、上皮内瘤样变、结直肠癌和慢性肝病等消化系统疾病的诊断价值进行了详尽阐述,尤其对共聚焦腹腔镜最新进展的阐述,为人们从微观角度快速准确诊断腹腔内器官病变提供了新的思路。



## ■名词解释

共聚焦内镜:是传统电子内窥镜和微型共聚焦激光扫描显微镜整合的产物。激光器发出的激光束经过扩束透镜、物镜会聚于物镜的焦点上,由监视器接收被检组织中被激光激发的荧光物质向不同方向的荧光,经计算机数字化处理形成共聚焦图像,因其能辨别不同组织结构的微细差异而达到诊断目的。由于此成像方式为共聚焦成像,因此称其为共聚焦内镜。

陷。检查的有创性无疑使诊断风险增高,标本取材的错误常致一定的假阴性结果,而且肝活检不能动态观察肝脏组织结构变化。共聚焦腹腔镜技术的应用可完全避免上述缺点。研究表明,共聚焦扫描图像能高清晰度地显示肝脏的炎性细胞浸润、脂肪变性、胆管扩张、肝细胞周围纤维化以及血流灌注异常等特性<sup>[28]</sup>。此外,还可清晰显示肿瘤血管、肝转移灶和胰岛细胞等微观变化<sup>[29]</sup>。共聚焦图像快速高清晰度地辨认正常和病变组织的细胞、亚细胞及分子结构的特性有望在不久的将来实施分子诊断<sup>[29]</sup>。一种带有特制共聚焦探针的新型腹腔镜可实时表层下成像,清晰显示活体正常肝组织和病理肝组织的特征性共聚焦图像。此技术无疑对各种肝脏疾病的快速、精确诊断提供了可能,也有助于动态观测肝组织的超微结构变化<sup>[28]</sup>,随着研究的进一步深入,共聚焦腹腔镜完全可用于腹腔内其他器官病变的快速诊断。

## 4 结论

共聚焦内镜检查是一项新技术,能在电子内窥镜检查的同时对消化系黏膜活体细胞表面成像。共聚焦激光显微镜整合于传统电子内窥镜上可以清晰显示黏膜组织的显微结构,为消化系组织学研究提供了快速可靠的诊断工具。我们有理由相信,共聚焦内镜所具有的独特优势必将对消化系疾病的诊断,尤其是对消化系肿瘤的早期诊断产生划时代的意义。共聚焦内镜技术的问世标志着内镜检查已从表浅到深层,从宏观到微观,从形态学到组织学的质的飞跃。共聚焦内镜所特有的“光活检”优势,将有望部分取代传统的病理活检。而进行靶向活检可有效降低活检次数,快速高效地实施消化系肿瘤的早期诊断。随着该技术研究的不断深入,共聚焦腹腔镜及共聚焦内镜下的分子成像有望不久应用于临床。尽管共聚焦内镜的发展前景十分乐观,但由于该技术尚处于研究探索阶段,仍有很多不足需要解决。目前使用的荧光对比剂、氩激光束的穿透性及共聚焦扫描显微镜的分辨率等仍有诸多缺陷,但相信随着荧光对比剂逐渐成熟以及内镜技术、激光扫描技术和计算机图像处理系统的日臻完善,共聚焦内镜的应用前景将十分广阔。

## 5 参考文献

1 Inoue H, Kudo SE, Shiokawa A. Technology

insight: Laser-scanning confocal microscopy and endocytoscopy for cellular observation of the gastrointestinal tract. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 31-37

2 Hoffman A, Goetz M, Vieth M, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. Confocal laser endomicroscopy: technical status and current indications. *Endoscopy* 2006; 38: 1275-1283

3 Goetz M, Memadathil B, Biesterfeld S, Schneider C, Gregor S, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo subsurface morphological and functional cellular and subcellular imaging of the gastrointestinal tract with confocal mini-microscopy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2160-2165

4 Goetz M, Kiesslich R. Confocal endomicroscopy: in vivo diagnosis of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. *Anticancer Res* 2008; 28: 353-360

5 Polglase AL, McLaren WJ, Delaney PM. Pentax confocal endomicroscope: a novel imaging device for in vivo histology of the upper and lower gastrointestinal tract. *Expert Rev Med Devices* 2006; 3: 549-556

6 DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Fluorescence and spectral imaging. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 2046-2071

7 Kiesslich R, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W, Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004; 127: 706-713

8 Kiesslich R, Goetz M, Angus EM, Hu Q, Guan Y, Potten C, Allen T, Neurath MF, Shroyer NE, Montrose MH, Watson AJ. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. *Gastroenterology* 2007; 133: 1769-1778

9 Polglase AL, McLaren WJ, Skinner SA, Kiesslich R, Neurath MF, Delaney PM. A fluorescence confocal endomicroscope for in vivo microscopy of the upper- and the lower-GI tract. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 686-695

10 黄颖秋. Barrett's食管的研究现状. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2567-2571

11 Goetz M, Hoffman A, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. Confocal laser endoscopy: new approach to the early diagnosis of tumors of the esophagus and stomach. *Future Oncol* 2006; 2: 469-476

12 Kara MA, DaCosta RS, Streutker CJ, Marcon NE, Bergman JJ, Wilson BC. Characterization of tissue autofluorescence in Barrett's esophagus by confocal fluorescence microscopy. *Dis Esophagus* 2007; 20: 141-150

13 DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Spectroscopy and fluorescence in esophageal diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 41-57

14 Kiesslich R, Neurath MF. Endoscopic confocal imaging. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: S58-S60

15 Kiesslich R, Gossner L, Goetz M, Dahlmann A, Vieth M, Stolte M, Hoffman A, Jung M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 979-987

16 Kiesslich R, Goetz M, Burg J, Stolte M, Siegel

- E, Maeurer MJ, Thomas S, Strand D, Galle PR, Neurath MF. Diagnosing *Helicobacter pylori* in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology* 2005; 128: 2119-2123
- 17 Kiesslich R, Neurath MF. Endoscopic detection of early lower gastrointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 941-961
- 18 Deinert K, Kiesslich R, Vieth M, Neurath MF, Neuhaus H. In-vivo microvascular imaging of early squamous-cell cancer of the esophagus by confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* 2007; 39: 366-368
- 19 Liu H, Li YQ, Yu T, Zhao YA, Zhang JP, Zhang JN, Guo YT, Xie XJ, Zhang TG, Desmond PV. Confocal endomicroscopy for in vivo detection of microvascular architecture in normal and malignant lesions of upper gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 56-61
- 20 Kakeji Y, Yamaguchi S, Yoshida D, Tanoue K, Ueda M, Masunari A, Utsunomiya T, Imamura M, Honda H, Maehara Y, Hashizume M. Development and assessment of morphologic criteria for diagnosing gastric cancer using confocal endomicroscopy: an ex vivo and in vivo study. *Endoscopy* 2006; 38: 886-890
- 21 Smith RR, Ragput A. Mucosal tears on endoscopic insufflation resulting in perforation: an interesting presentation of collagenous colitis. *J Am Coll Surg* 2007; 205: 725
- 22 Kiesslich R, Hoffman A, Goetz M, Biesterfeld S, Vieth M, Galle PR, Neurath MF. In vivo diagnosis of collagenous colitis by confocal endomicroscopy. *Gut* 2006; 55: 591-592
- 23 Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, Schneider C, Burg J, Stolte M, Vieth M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 874-882
- 24 Hurlstone DP, Kiesslich R, Thomson M, Atkinson R, Cross SS. Confocal chromoscopic endomicroscopy is superior to chromoscopy alone for the detection and characterisation of intraepithelial neoplasia in chronic ulcerative colitis. *Gut* 2008; 57: 196-204
- 25 DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Optical techniques for the endoscopic detection of dysplastic colonic lesions. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 70-79
- 26 Giacosa A, Frascio F, Munizzi F. Epidemiology of colorectal polyps. *Tech Coloproctol* 2004; 8 Suppl 2: s243-s247
- 27 Kiesslich R, Goetz M, Vieth M, Galle PR, Neurath MF. Technology insight: confocal laser endoscopy for in vivo diagnosis of colorectal cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 480-490
- 28 Goetz M, Vieth M, Kanzler S, Galle PR, Delaney P, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo confocal laser laparoscopy allows real time subsurface microscopy in animal models of liver disease. *J Hepatol* 2008; 48: 91-97
- 29 Goetz M, Fottner C, Schirmacher E, Delaney P, Gregor S, Schneider C, Strand D, Kanzler S, Memadathil B, Weyand E, Holtmann M, Schirmacher R, Weber MM, Anlauf M, Klöppel G, Vieth M, Galle PR, Bartenstein P, Neurath MF, Kiesslich R. In-vivo confocal real-time mini-microscopy in animal models of human inflammatory and neoplastic diseases. *Endoscopy* 2007; 39: 350-356

#### ■同行评价

本文为消化系统肿瘤的早期诊断提供了有价值的信息, 对临床工作有指导意义, 学术价值较好。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志网络版的发表前链接

**本刊讯** 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (常务副总编辑: 张海宁 2008-06-08)

# siRNA阻断NF- $\kappa$ B信号通路联合5-FU对食管鳞癌细胞凋亡的促进作用

田芳, 宋敏, 许培荣, 刘红涛, 薛乐勋

## ■背景资料

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 尤其在中国河南省林县, 食管癌的发生率和死亡率均较高。目前, 中国食管癌的主要类型仍是鳞癌。

田芳, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室 河南省郑州市 450052

田芳, 许培荣, 刘红涛, 薛乐勋, 郑州大学细胞生物学研究室 河南省郑州市 450052

宋敏, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052

田芳, 2006年郑州大学基础医学院博士, 讲师, 主要从事细胞信号转导的研究。

教育部“十五”211工程重点建设资助项目, No. 2002-2

作者贡献分布: 田芳与宋敏对此文所作贡献均等; 此课题由田芳, 宋敏, 许培荣, 刘红涛及薛乐勋设计; 研究过程由田芳, 宋敏, 许培荣及刘红涛操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由许培荣提供; 数据分析由田芳, 宋敏及刘红涛完成; 本论文写作由田芳, 宋敏及薛乐勋完成。

通讯作者: 薛乐勋, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 郑州大学细胞生物学研究室. xuelx@371.net

电话: 0371-66658332 传真: 0371-66997182

收稿日期: 2007-12-22 修回日期: 2008-04-07

## Effect of siRNA-mediated inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B in combination with 5-FU on apoptosis of squamous cell carcinoma cell lines

Fang Tian, Min Song, Pei-Rong Xu, Hong-Tao Liu, Le-Xun Xue

Fang Tian, Department of Pathophysiology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Fang Tian, Pei-Rong Xu, Hong-Tao Liu, Le-Xun Xue, Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Min Song, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Tenth Five-Year Key Program from Education Ministry of China (211 Project), No. 2002-2

Correspondence to: Le-Xun Xue, Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, 40 Daxue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. xuelx@371.net

Received: 2007-12-22 Revised: 2008-04-07

## Abstract

**AIM:** To evaluate the inhibitory effects of nuclear factor-kappa B p65 (NF- $\kappa$ B p65) on expression of p65 and to determine its combinatory effects with 5-FU on proliferation and apoptosis in EC9706 and Eca109 esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

**METHODS:** EC9706 and Eca109 cells were trans-

fected with 50 nmol/L p65 siRNA. The expression level of p65 mRNA was measured using PT-PCR at 0, 24, 48 and 72 h. P65 and Bcl-2 protein levels were determined using Western blotting. The cells were also stained with FITC-annexin V and PI, and cancer cell apoptosis was detected by flow cytometry using CellQuest acquisition and analysis programs. Morphological changes of ESCC cells were observed microscopically following p65 siRNA transfection with or without 5-FU.

**RESULTS:** For EC9706 and Eca109 transfected with p65 siRNA, the expression level of the p65 mRNA in ESCC cells was down-regulated with time. Peak inhibitory effect occurred at 72 h and a significant difference was detected, compared with 0 h ( $0.12 \pm 0.01$  vs  $0.28 \pm 0.05$ ,  $0.1 \pm 0.01$  vs  $0.38 \pm 0.04$ , both  $P < 0.05$ ). The protein levels of p65 and Bcl-2 decreased after transfection with p65 siRNA at 72 h. There was a significant increase in apoptosis level at 72 h following p65 siRNA transfection ( $6.65\% \pm 0.27\%$  vs  $2.03\% \pm 0.08\%$ ,  $8.03\% \pm 0.06\%$  vs  $2.66\% \pm 0.25\%$ , both  $P < 0.05$ ). The proliferation of EC9706 and Eca109 was slow after transfection with p65 siRNA at 72 h, while p65 siRNA in combination with 5-FU significantly inhibited cell proliferation.

**CONCLUSION:** p65 siRNA can block NF- $\kappa$ B signaling pathway, down-regulates expression of Bcl-2, which makes activated NF- $\kappa$ B pathway a potential key target in gene therapy for ESCC.

**Key Words:** Esophageal squamous cell carcinoma; Nuclear factor-kappa B; RNA interference; 5-FU; Bcl-2

Tian F, Song M, Xu PR, Liu HT, Xue LX. Effect of siRNA-mediated inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B in combination with 5-FU on apoptosis of squamous cell carcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1716-1721

## 摘要

**目的:** 利用RNAi技术特异性的抑制NF- $\kappa$ B亚单位p65的表达, 观察其对p65表达的抑制作用及联合5-FU对食管鳞癌细胞Eca109和EC9706的影响。

## ■同行评议者

周晓东, 研究员, 中山大学附属二院医学研究中心; 施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科



**方法:** 将终浓度为50 nmol/L的p65 siRNA转染到食管鳞癌细胞EC9706和Eca109中, 通过RT-PCR检测0、24、48和72 h时段p65 mRNA的表达水平. Western blotting法检测p65和Bcl-2蛋白表达, Annexin V/PI复染结合流式细胞仪检测细胞凋亡, 显微镜下观察p65 siRNA与5-FU单独或联合应用对食管鳞癌细胞形态学特性的影响.

**结果:** EC9706和Eca109细胞转染p65 siRNA 24、48和72 h后, p65 mRNA的表达水平随着时间的延长逐渐下调, 在72 h的阻断效率最为明显, 与0 h相比, 差异有显著性( $0.12 \pm 0.01$  vs  $0.28 \pm 0.05$ ,  $0.1 \pm 0.01$  vs  $0.38 \pm 0.04$ , 均  $P < 0.05$ ), 转染72 h后, p65和Bcl-2蛋白表达水平下调. EC9706和Eca109转染p65 siRNA后, 细胞凋亡指数明显升高( $6.65\% \pm 0.27\%$  vs  $2.03\% \pm 0.08\%$ ,  $8.03\% \pm 0.06\%$  vs  $2.66\% \pm 0.25\%$ , 均  $P < 0.05$ ); p65 siRNA转染72 h后, EC9706和Eca109细胞增殖较慢; 当p65 siRNA与5-FU联合作用, 细胞增殖明显受到抑制.

**结论:** p65 siRNA可阻断NF- $\kappa$ B信号通路, 下调NF- $\kappa$ B下游基因中抗凋亡蛋白Bcl-2的表达, 表明活化的NF- $\kappa$ B信号通路可成为食管鳞癌基因治疗中一个重要的分子靶点.

**关键词:** 食管鳞癌; 核因子- $\kappa$ B; RNA干扰; 5-FU; Bcl-2

田芳, 宋敏, 许培荣, 刘红涛, 薛乐勋. siRNA阻断NF- $\kappa$ B信号通路联合5-FU对食管鳞癌细胞凋亡的促进作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1716-1721  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1716.asp>

## 0 引言

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率为整个肿瘤死亡的第六位<sup>[1]</sup>. 化疗药5-FU是食管癌治疗中最常用的药物之一, 但是逐渐出现的耐药却成为治疗中的一个难题. 核因子 $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)是近年来发现的转录调控因子, 最常见的形式是由p50和p65组成的异源二聚体, 活化的NF- $\kappa$ B信号通路可增强肿瘤细胞对放化疗药物的敏感性. 有研究表明, 在许多人类肿瘤如肝癌、肠癌、宫颈癌中NF- $\kappa$ B信号通路的激活在肿瘤的发生发展中起着重要的作用<sup>[2-7]</sup>. RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)引发的转录后基因静默机制, 在很多生物中都发现了这种现象, 包括果蝇、线虫、原

生动物、脊椎动物以及高等植物<sup>[8-10]</sup>. RNAi是双链RNA介导的特异性基因沉默现象, 是目前研究基因功能强有力的工具之一<sup>[11-13]</sup>. 本研究拟应用RNA干扰技术, 使用针对NF- $\kappa$ B信号通路中p65的特异性siRNA, 观察其对p65表达的抑制作用及联合化疗药5-FU对食管鳞癌细胞Eca109和EC9706的影响, 探讨将NF- $\kappa$ B作为基因治疗靶点的价值.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 食管癌细胞系Eca109由本室保存, 食管癌细胞系EC9706由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠. 细胞在含有100 mL/L的胎牛血清, 100 kU/L青霉素, 100 mg/L链霉素的1640培养液(Gibco公司)中于37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>的条件下培养, 实验细胞均处于对数生长期. 鼠抗人p65(sc-8008)和鼠抗人Bcl-2(sc-7382)抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司; NF- $\kappa$ B p65 siRNA干扰试剂盒购自Cell Signaling Technology公司; 凋亡试剂盒Annexin V-FITC Kit购自美国Eckman Coulter™公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 siRNA的转染:** 按照siRNA干扰试剂盒说明书的要求, 进行转染. 在转染前, EC9706( $5 \times 10^4$ )和Eca109( $6 \times 10^4$ )按一定细胞数铺于6孔板中, 使用无抗生素的培养基培养24 h. 将含有siRNA的转染试剂与细胞共孵育5 h后, 加入新鲜培养基孵育24 h.

**1.2.2 细胞总RNA的提取和引物设计:** p65 siRNA转染0、24、48和72 h后, 用TRIzol试剂从EC9706和Eca109细胞中提取总RNA, 样品经琼脂糖凝胶电泳观察. 设计p65上下游引物: p65的上游引物为5'-ATAGAAGAGCAGCGTGGGGACT-3', 下游引物为5'-GGATGACGTAAAGGGATAGGGC-3'; 内参GAPDH的上游引物为5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTG-3, 下游引物为5'-CTTGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3'.

**1.2.3 RT-PCR分别合成p65和GAPDH的cDNA** 第一链: 取总RNA 1  $\mu$ g, 随机六合引物1  $\mu$ L, 5 $\times$  AMV Buffer 4  $\mu$ L, Rnase Inhibitor(20 U/ $\mu$ L)1  $\mu$ L, dNTP(10 mmol/L)2  $\mu$ L, AMV RT 1  $\mu$ L, 加DEPC处理水至20  $\mu$ L, 稍离心后混匀, 42℃水浴60 min, 70℃水浴10 min. 从上述反应体系中取2  $\mu$ L, 加10 $\times$ PCR Buffer 5  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L, 50 mmol/L的引物各0.5  $\mu$ L, 1 U/50  $\mu$ L Taq酶1  $\mu$ L, 无菌水36  $\mu$ L, 总体积为50

## ■ 研发前沿

化疗药5-FU是食管癌治疗中最常用的药物之一, 但是逐渐出现的耐药却成为治疗中的一个难题.

## ■相关报道

Ma *et al*的研究中发现,与正常的造血细胞相比,骨髓瘤细胞中存在有I $\kappa$ B $\alpha$ 的磷酸化和降解以及NF- $\kappa$ B活性的增强,并且NF- $\kappa$ B的激活也与骨髓瘤细胞对化疗药物的抗性有关;使用蛋白酶抑制剂PS-341可以阻断NF- $\kappa$ B的核转录及其与DNA的结合活性,降低骨髓瘤细胞对化疗药物的耐受性,而对正常的造血细胞无明显的影响,并且PS-341与化疗药物联合使用可以降低化疗药的副作用。

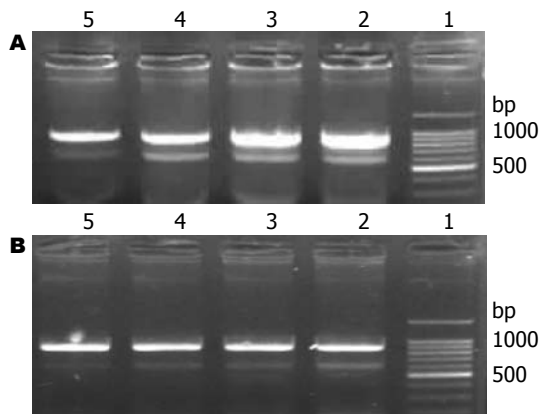


图1 p65 mRNA不同时间点表达的相对含量分析。A: 转染组EC9706细胞; B: 转染组Eca109细胞; 1: marker; 2: 0 h; 3: 24 h; 4: 48 h; 5: 72 h。

$\mu$ L。反应体系为: 94 $^{\circ}$ C预变性2 min后开始循环, 95 $^{\circ}$ C变性1 min, 57 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 30个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。

1.2.4 Western blotting测定蛋白的表达: 按照细胞质蛋白提取试剂盒说明书(Pierce公司), 提取细胞质蛋白, Bradford法检测蛋白质的含量, -70 $^{\circ}$ C保存。转染p65 siRNA 72 h后, 从Eca109和EC9706细胞中取细胞质蛋白, 与预染的蛋白质分子量标准一起上样。检测p65和非靶向MAPK蛋白, 及抗凋亡蛋白Bcl-2的表达, 经120 g/L SDS-PAGE分离, 电转到硝酸纤维素膜上。5%的脱脂奶粉TBST溶液封闭2 h, 抗体按1:100孵育4 $^{\circ}$ C过夜, TBST溶液洗涤10 min $\times$ 3次, 硝酸纤维素膜分别与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:50000)室温孵育1 h后, TBST溶液洗涤10 min $\times$ 3次, DAB显色。实验重复3次。

1.2.5 流式细胞仪检测凋亡细胞: 转染和未转染p65siRNA的食管鳞癌细胞, 单独或联合使用5-FU治疗后72 h, 制备各组单细胞悬液, 做细胞计数。取至少 $10^6$ 个细胞移入新的1.5 mL离心管中, 4 $^{\circ}$ C下500转离心5 min, 形成细胞团。小心移去上清液, 冰预冷PBS洗细胞2次, 保证每管细胞数至少 $10^6$ 个细胞。加5  $\mu$ L Annexin V-FITC和2.5  $\mu$ L PI到100  $\mu$ L的细胞悬液中, 轻轻混匀; 以未染色细胞调零机器, 以Annexin V-FITC单染管和PI单染管做为基准参照, 测定每个上样管数据, 利用CellQuest3.0软件进行参数获取和资料分析, 计算凋亡细胞百分比。

1.2.6 治疗前后细胞形态学观察: 在细胞培养状态下, 用倒置显微镜分别观察两种食管鳞癌细胞未转染组、转染72 h组、5-FU治疗组、转染48 h+5-FU 24 h治疗组的细胞生长状态及形态学改变。

表1 p65 mRNA在EC9706和Eca109细胞中不同时间点表达的相对含量

分组	0 h	24 h	48 h	72 h
EC9706	0.28 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
Eca109	0.38 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 0 h。

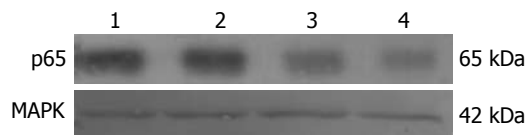


图2 转染p65 siRNA后EC9706和Eca109细胞中p65蛋白的表达。1: EC9706对照组; 2: Eca109对照组; 3: EC9706转染组; 4: Eca109转染组。

**统计学处理** 应用SPSS13.0统计软件进行统计学处理, 统计学数据用mean $\pm$ SD表示, 对计量资料, 两样本均数比较采用 $t$ 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 食管鳞癌细胞转染p65 siRNA后p65 mRNA的表达 与未转染p65 siRNA的EC9706和Eca109细胞相比, 转染后的EC9706和Eca109细胞, p65 mRNA的表达水平下调, 与内参吸收峰面积相比, 他们的相对含量见表1。72 h的阻断效率最为明显, 与0 h相比, 差异有显著性( $P < 0.05$ )。在食管鳞癌细胞中, p65siRNA可以特异性的降解p65 mRNA(图1, 表1)。

2.2 食管鳞癌细胞转染p65 siRNA后各组p65蛋白的表达 EC9706和Eca109细胞转染siRNA 72 h后, 收集各组细胞提取细胞质蛋白, Western blotting检测细胞中p65的蛋白表达水平(图2)。结果表明, 与未转染p65 siRNA的EC9706和Eca109细胞相比, 转染后的EC9706和Eca109细胞, p65蛋白的表达水平下调, 而非靶向蛋白MAPK的表达无影响。说明针对p65的siRNA可特异性的抑制p65的表达, 对其他蛋白的表达无影响。

2.3 p65 siRNA阻断NF- $\kappa$ B信号通路下调Bcl-2的表达 NF- $\kappa$ B可以调控多种下游基因的表达, 如cyclin D1、*c-myc*、Bcl-2等, 这些基因的表达有助于肿瘤细胞的增殖、抗凋亡。食管鳞癌细胞EC9706和Eca109在转染p65 siRNA 72 h后, 提取细胞总蛋白检测抗凋亡蛋白Bcl-2的表达情况。结果表明, 在转染72 h Bcl-2的表达下降(图3)。

表 2 流式细胞仪检测p65 siRNA转染后EC9706和Eca109的细胞凋亡 (%)

分组	EC9706	Eca109
对照组	2.03 $\pm$ 0.08	2.66 $\pm$ 0.25
siRNA转染组	6.65 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	8.03 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
5-FU组	13.54 $\pm$ 0.71	19.20 $\pm$ 0.37
siRNA转染+5-FU组	24.61 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup>	28.87 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 5-FU组。

2.4 p65 siRNA与5-FU单独或联合使用对EC9706和Eca109细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示, EC9706和Eca109在转染p65 siRNA后, 细胞凋亡指数明显升高(表2,  $P < 0.05$ ); 当与5-FU(327 mg/L)联合使用时, 凋亡和坏死的细胞均显著增加(表2,  $P < 0.05$ )。

2.5 p65 siRNA与5-FU单独或联合应用对食管鳞癌细胞形态学特性的影响 经p65 siRNA转染72 h后, EC9706和Eca109细胞出现细胞形态缩小, 漂浮数增加, 细胞增殖较慢; 在p65 siRNA转染48 h后, 与5-FU联合作用24 h, EC9706和Eca109细胞出现细胞形态缩小, 胞质凝缩, 细胞漂浮数明显增加, 细胞数量下降, 增殖明显受到抑制(图4-5)。

### 3 讨论

我们前期研究表明, 活化的NF- $\kappa$ B信号通路存在于食管鳞癌细胞中<sup>[14-15]</sup>, 但是, 激活的NF- $\kappa$ B信号通路在食管鳞癌细胞的增殖、凋亡及对化疗药的耐受性等机制中是否起作用, 尚不清楚。本研究使用RNA干扰技术, 特异性的阻断NF- $\kappa$ B亚单位p65的表达, RT-PCR结果发现, p65 siRNA的mRNA水平随着时间的延长而下降, 在72 h p65的表达受到明显抑制。根据RT-PCR的结果, Western blotting实验中发现, 在转染72 h后, 与未转染细胞相比, p65的蛋白表达水平也明显下降, 而非靶向抗体MAPK的表达水平未受到影响。

化学治疗和放射治疗是通过诱导肿瘤细胞的凋亡起到抗肿瘤的作用<sup>[16-18]</sup>, 活化的NF- $\kappa$ B信号通路在肿瘤细胞的增殖、抗凋亡中起着重要的作用, 一些研究发现, NF- $\kappa$ B在肿瘤细胞抗化疗或抗放疗中也起着一定的作用<sup>[19-21]</sup>。化疗药5-FU是食管癌治疗中最常用的药物之一, 但是逐渐出现的耐药却成为治疗中的一个难题<sup>[22]</sup>。Bcl-2是一类新的癌基因家族成员, 基因转染实验显示Bcl-2高表达广泛抑制大多数刺激剂诱导的细胞凋亡<sup>[23-25]</sup>。Huang *et al*<sup>[26]</sup>使用针对Bcl-2的

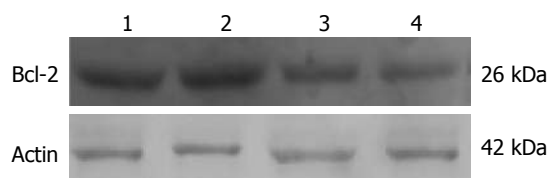


图 3 转染p65 siRNA后Bcl-2在食管鳞癌细胞中的表达。1: EC9706对照组; 2: Eca109对照组; 3: EC9706转染组; 4: Eca109转染组。

### ■应用要点

NF- $\kappa$ B信号通路可以成为食管癌基因治疗中一个强有力的作用靶点, 为食管癌的分子靶向治疗提供基础。

siRNA转染宫颈癌细胞, 通过下调其表达, 研究他在肿瘤细胞凋亡中的作用, 结果发现Bcl-2的低表达会增加肿瘤细胞对化疗药的敏感性。在乳腺癌等多种肿瘤细胞的研究中, 通过使用NF- $\kappa$ B抑制剂可以下调Bcl-2的表达, 促进肿瘤细胞的凋亡, 提示NF- $\kappa$ B和Bcl-2能够成为肿瘤治疗的新靶点<sup>[27-28]</sup>。

NF- $\kappa$ B调控的下游基因包括IL-1、COX2、MMP9等促进肿瘤发生的基因; VEGF、TNF等与肿瘤血管生成有关的基因; ICAM-1、VCAM-1等与肿瘤转移有关的基因; Bcl-2、cIAP、TRAF等与肿瘤抗凋亡有关的基因<sup>[29-30]</sup>。我们采用Western blotting法, 检测转染p65 siRNA, 阻断NF- $\kappa$ B信号通路后, 是否能够下调抗凋亡基因Bcl-2的表达, 结果发现, 与未转染细胞相比, 转染细胞中Bcl-2的表达受到抑制。本研究还采用流式细胞仪检测食管鳞癌细胞在转染前后及单独或联合应用5-FU后, 对细胞凋亡的影响。EC9706和Eca109在转染p65 siRNA后, 细胞凋亡数开始增加; 当转染细胞联合使用5-FU时, 细胞凋亡数明显增加( $P < 0.05$ ), 同时细胞死亡数也明显增加。以上结果显示, Bcl-2是肿瘤细胞抵抗凋亡的一个重要的调节者, 当使用p65 siRNA阻断食管鳞癌细胞中NF- $\kappa$ B信号通路时, Bcl-2的表达下调, 细胞凋亡数增加, 提示Bcl-2也是受NF- $\kappa$ B调节的一个重要的下游基因, NF- $\kappa$ B可以通过下调抗凋亡基因Bcl-2的表达, 增加食管鳞癌细胞的凋亡; 当联合使用化疗药时, 可以明显提高食管鳞癌细胞的凋亡数。因此, 食管鳞癌细胞对5-FU敏感性的增加, 或许是由于NF- $\kappa$ B信号通路的阻断, 抑制了抗凋亡基因Bcl-2的表达, 促进食管鳞癌细胞凋亡。

因此, 激活的NF- $\kappa$ B信号通路在食管鳞癌细胞的增殖、抗凋亡及耐药中起着重要的作用, 通过转染p65 siRNA可以特异性的阻断NF- $\kappa$ B信号通路, 促进细胞的凋亡, 增加细胞对化疗药的敏感性, 提示NF- $\kappa$ B信号通路可以成为食管癌基



#### ■同行评价

本研究立意依据充分, 实验设计合理, 内容丰富, 数据可靠, 结论正确, 是一篇较好的科研论文.

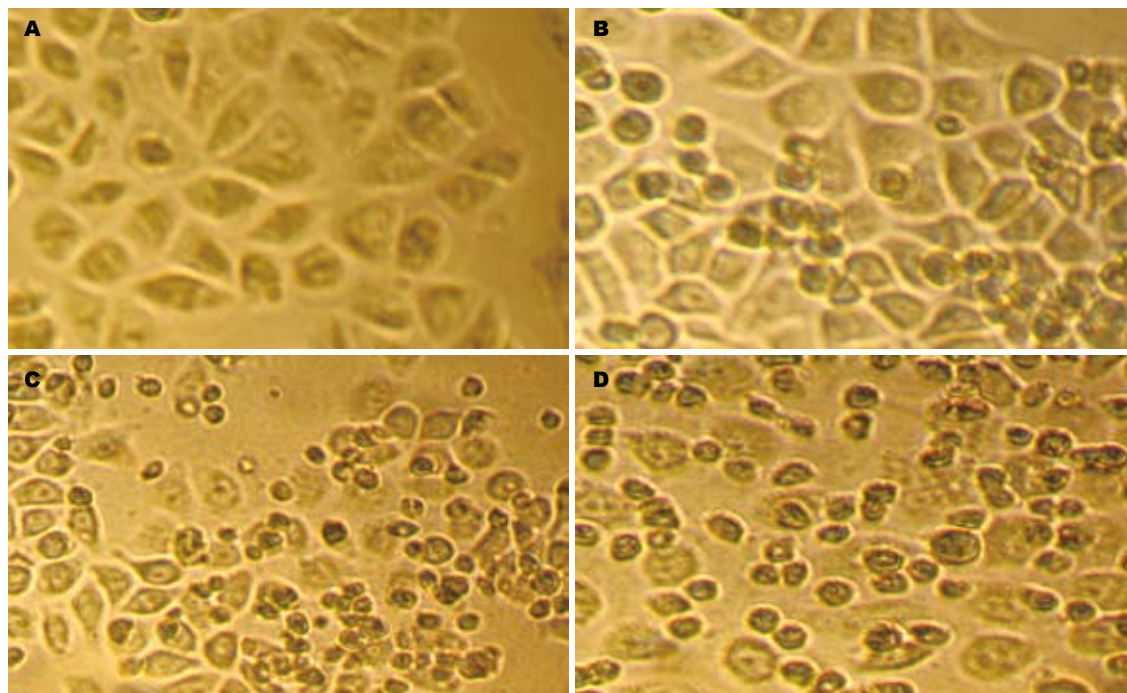


图 4 光学显微镜下各组EC9706细胞形态学( $\times 400$ ). A: 对照组; B: siRNA转染组; C: 5-FU组; D: siRNA转染+5-FU组.

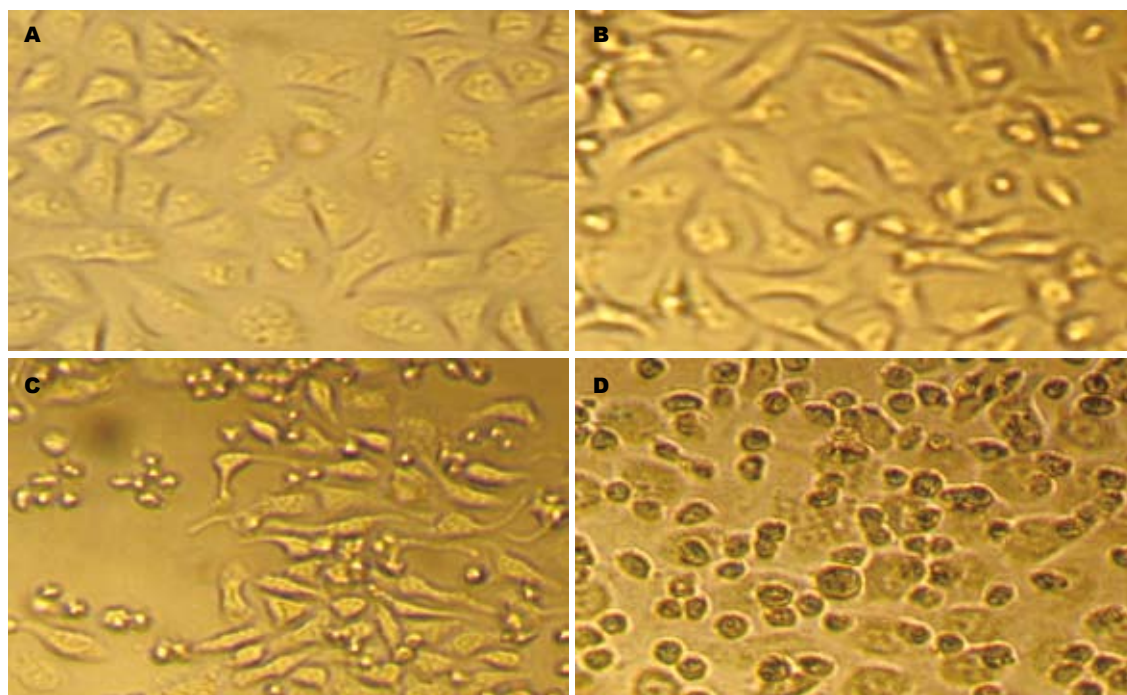


图 5 光学显微镜下各组Eca109细胞形态学. A: 对照组; B: siRNA转染组; C: 5-FU组; D: siRNA转染+5-FU组.

因治疗中一个强有力的作用靶点.

#### 4 参考文献

- Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29
- Wang J, Huang Q, Chen M. The role of NF-kappaB in hepatocellular carcinoma cell. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 747-752
- Qin JM, Wan XW, Zeng JZ, Wu MC. Effect of Sirpalpha1 on the expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 276-283
- Yu HG, Yu LL, Yang Y, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F. Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis. *Oncology* 2003; 65: 37-45
- Yu LL, Yu HG, Yu JP, Luo HS, Xu XM, Li JH.

- Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3255-3260
- 6 Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, Nair B, Karunakaran D. NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* 2003; 22: 50-58
- 7 Im E, Choi SH, Suh H, Choi YH, Yoo YH, Kim ND. Synthetic bile acid derivatives induce apoptosis through a c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent process in human cervical carcinoma cells. *Cancer Lett* 2005; 229: 49-57
- 8 Bass BL. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 2000; 101: 235-238
- 9 Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9742-9747
- 10 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 11 Takahashi Y, Nishikawa M, Kobayashi N, Takakura Y. Gene silencing in primary and metastatic tumors by small interfering RNA delivery in mice: quantitative analysis using melanoma cells expressing firefly and sea pansy luciferases. *J Control Release* 2005; 105: 332-343
- 12 Chen LB, Xu JY, Yang Z, Wang GB. Silencing SMYD3 in hepatoma demethylates RIZ1 promoter induces apoptosis and inhibits cell proliferation and migration. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5718-5724
- 13 Tschaharganeh D, Ehemann V, Nussbaum T, Schirmacher P, Breuhahn K. Non-specific effects of siRNAs on tumor cells with implications on therapeutic applicability using RNA interference. *Pathol Oncol Res* 2007; 13: 84-90
- 14 田芳, 侯卫红, 许培荣, 王建民, 陈华艳, 薛乐勋, 陈奎生. 食管鳞癌细胞中NF- $\kappa$ B与I $\kappa$ B $\alpha$ 的mRNA、蛋白表达. *中国肿瘤临床* 2006; 33: 198-201
- 15 田芳, 许培荣, 侯卫红, 刘红涛, 陈奎生, 薛乐勋. NF- $\kappa$ B信号通路在食管鳞癌细胞系中的激活. *肿瘤防治研究* 2006; 33: 11-14
- 16 Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245-254
- 17 Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* 2005; 4: 1201-1215
- 18 Girdhani S, Bhosle SM, Thulsidas SA, Kumar A, Mishra KP. Potential of radiosensitizing agents in cancer chemo-radiotherapy. *J Cancer Res Ther* 2005; 1: 129-131
- 19 Fraser CC. Exploring the positive and negative consequences of NF-kappaB inhibition for the treatment of human disease. *Cell Cycle* 2006; 5: 1160-1163
- 20 Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death—a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 2005; 115: 2625-2632
- 21 Magné N, Toillon RA, Bottero V, Didelot C, Houtte PV, Gérard JP, Peyron JF. NF-kappaB modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Lett* 2006; 231: 158-168
- 22 Wang MH, Li YP, Wang XD, Zhang H, Xiong LH, Huang HZ. Correlation between serum p53 antibody and chemosensitivity in patient with esophageal cancer. *Ai Zheng* 2004; 23: 467-470
- 23 van Delft MF, Huang DC. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res* 2006; 16: 203-213
- 24 Kock N, Kasmieh R, Weissleder R, Shah K. Tumor therapy mediated by lentiviral expression of shBcl-2 and S-TRAIL. *Neoplasia* 2007; 9: 435-442
- 25 Fu GF, Lin XH, Han QW, Fan YR, Xu YF, Guo D, Xu GX, Hou YY. RNA interference remarkably suppresses bcl-2 gene expression in cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 822-829
- 26 Huang SL, Wu Y, Yu H, Zhang P, Zhang XQ, Ying L, Zhao HF. Inhibition of Bcl-2 expression by a novel tumor-specific RNA interference system increases chemosensitivity to 5-fluorouracil in Hela cells. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 242-248
- 27 Pozo-Guisado E, Merino JM, Mulero-Navarro S, Lorenzo-Benayas MJ, Centeno F, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM. Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *Int J Cancer* 2005; 115: 74-84
- 28 Fahy BN, Schlieman MG, Mortenson MM, Virudachalam S, Bold RJ. Targeting BCL-2 overexpression in various human malignancies through NF-kappaB inhibition by the proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 46-54
- 29 Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005; 446: 475-482
- 30 Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 2007; 29: 19-35

编辑 李军亮 电编 何基才

# 携带肝细胞生长因子基因的减毒沙门氏菌在大鼠胃溃疡治疗中的组织分布

蒋泽斌, 哈小琴, 高鹏

## ■背景资料

胃溃疡是全球性多发病,但目前各种疗法尚不能改变消化性溃疡的自然病程和彻底根治溃疡。随着现代分子生物学技术的进步,基因治疗各种疾病的可能性逐渐受关注。HGF是一种重要的靶基因之一,有望利用其多种功能治疗各种疾病。

蒋泽斌, 兰州大学临床医学院 甘肃省兰州市 730000  
哈小琴, 中国人民解放军兰州军区总医院医学实验中心 甘肃省兰州市 730030  
高鹏, 甘肃省人民医院腹腔镜中心 甘肃省兰州市 730000  
蒋泽斌, 2005级兰州大学临床医学院硕士, 医师, 主要从事腹腔镜外科相关研究。  
甘肃省科技支撑计划资助项目, No. 200701  
博士后基金资助项目, No. 20060390192  
作者贡献分布: 此课题由哈小琴与蒋泽斌设计; 研究过程由高鹏与蒋泽斌操作完成; 研究所用试剂及分析工具由哈小琴提供; 数据分析由蒋泽斌完成; 本论文写作由蒋泽斌、哈小琴及高鹏完成。  
通讯作者: 哈小琴, 730030, 甘肃省兰州市, 中国人民解放军兰州军区总医院医学实验中心。 haxq@yahoo.com  
电话: 0931-8975971  
收稿日期: 2008-01-25 修回日期: 2008-03-18

## Distribution of attenuated *salmonellae* carrying hepatocyte growth factor genes in murine gastric ulcers

Ze-Bin Jiang, Xiao-Qin Ha, Peng Gao

Ze-Bin Jiang, Clinical Medicine College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China  
Xiao-Qin Ha, Medical Experimental Center, General Hospital of Chinese PLA, Lanzhou Command, Lanzhou 730030, Gansu Province, China  
Peng Gao, Laparoscopy Center, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, Gansu Province, China  
Supported by: the Science and Technology Support Projects of Gansu Province, No. 200701; and the Postdoctoral Fund, No. 20060390192  
Correspondence to: Xiao-Qin Ha, Medical Experimental Center, General Hospital of Chinese PLA, Lanzhou Command, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. haxq@yahoo.com  
Received: 2008-01-25 Revised: 2008-03-18

## Abstract

**AIM:** To highlight tissue distribution of attenuated *salmonellae* carrying hepatocyte growth factor (HGF) genes in murine gastric ulcers and thereby to provide a basis for HGF application in gene therapy for gastric ulcers.

**METHODS:** Eighty acetic acid-induced gastric ulcer rats were randomly divided into two groups: HGF treatment group ( $n = 40$  rats) and green fluorescent protein (GFP) treatment group ( $n = 40$  rats). Intragastric administration of at-

tenuated *salmonellae* carrying HGF and GFP was performed on rats, each one with 0.2 mL, and once every two days for totally 3 times. Three rats in GFP group were killed each time on day 1, 3, 5, 7, 9 and frozen sections were made from stomach, liver, intestines, spleen and kidney to observe tissue distribution of target genes under fluorescence microscopy; 3 rats in HCF group were killed each time on day 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21 to observe tissue expression using ELISA and to detect tissue distribution of eukaryotic expression vector using PCR.

**RESULTS:** In GFP group, some strong fluorescence was observed in the stomach and intestines under fluorescence microscopy, and weak fluorescence in liver, spleen and kidneys. The intensity of fluorescence reached its peak on day 5 and day 7. In HGF group, high-level HGF gene expression by ELISA was detected in stomach, liver, spleen, kidney and intestines with higher expression in the intestines and stomach. CMV promoter fragment of eukaryotic expression vectors was detected in stomach, liver, spleen, kidney, large intestine and small intestine.

**CONCLUSION:** As a cellular vector, orally-administrated attenuated *salmonellae* could transfer target genes eukaryotic expression vector into stomach and intestinal tissues for gastric ulcer treatment in rats.

**Key Words:** Hepatocyte growth factor; Attenuated *Salmonella* bacteria; Gastric ulcer; Green fluorescent protein; Eukaryotic expression vector

Jiang ZB, Ha XQ, Gao P. Distribution of attenuated *salmonellae* carrying hepatocyte growth factor genes in murine gastric ulcers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1722-1727

## 摘要

**目的:** 阐明携带肝细胞生长因子(HGF)基因的减毒沙门氏菌在大鼠胃溃疡治疗中的组织分布规律, 为HGF在胃溃疡基因治疗中的实际应用提供依据。

## ■同行评议者

唐文富, 副主任医师, 四川大学华西医院中西医结合科

**方法:** 乙酸诱发80只大鼠胃溃疡模型, 随机分成2组: HGF灌胃组(40只)和绿色荧光蛋白(GFP)灌胃组(40只). 将携带HGF和GFP基因真核表达质粒的减毒沙门氏菌分别给予大鼠灌胃, 每只0.2 mL, 隔日1次, 共3次. GFP灌胃组第1、3、5、7、9天分别处死大鼠3只, 取胃、肠、肝、脾及肾组织制备成冰冻切片, 荧光显微镜下观察目的基因组织分布; HGF灌胃组第1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21天分别处死大鼠3只, ELISA方法检测HGF在各组织中的表达; PCR方法检测真核表达载体在组织中的分布.

**结果:** GFP组大鼠在荧光显微镜下观察到胃、肠组织有较强的荧光, 在肝、脾、肾组织有微弱的荧光, 荧光强度在第5、7天达到峰值; HGF组大鼠胃、肝、脾、肾、大肠、小肠组织, 均检测到有HGF表达, 但胃、肠组织中表达较高; 大鼠胃、肝、脾、肾、大肠、小肠均可检测到真核表达载体的启动子CMV片段.

**结论:** 在大鼠胃溃疡治疗中, 减毒沙门氏菌作为细胞载体以 $po$ 方式可将携带目的基因的真核表达载体相对靶向性转入胃、肠组织中.

**关键词:** 肝细胞生长因子; 减毒沙门氏菌; 胃溃疡; 绿色荧光蛋白; 真核表达载体

蒋泽斌, 哈小琴, 高鹏. 携带肝细胞生长因子基因的减毒沙门氏菌在大鼠胃溃疡治疗中的组织分布. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1722-1727  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1722.asp>

## 0 引言

胃溃疡是全球性多发病, 在不同的国家、不同地区, 其发病率相差悬殊. 据国外报道, 自然人群中约10%的人患过此病. 国内住院患者资料统计中, 本病占0.80%-3.08%, 而且80%溃疡患者发病年龄在40岁以下<sup>[1]</sup>. 但目前现有的各种疗法尚不能改变消化性溃疡的自然病程和彻底根治溃疡. 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是1984年Nakamura从肝部分切除的鼠血浆中分离和部分纯化并命名的<sup>[2]</sup>. HGF是一种多功能生物因子, 在体内广泛分布, 存在于肝、肾、脾、肺、脑、胸腺、胰腺、甲状腺和唾液腺等处. 他是多效性因子, 具有多种生物学活性<sup>[3-6]</sup>, 研究表明, HGF可促进胃肠上皮细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 加快胃肠上皮重建<sup>[7-8]</sup>, 减轻炎症细胞浸润, 减轻症状及黏膜损伤, 促进局部血管形成, 加快胃肠道黏膜损伤愈合<sup>[9-10]</sup>. HGF被证明还具有

免疫调节作用, 对自身免疫性疾病具有治疗潜能<sup>[11-12]</sup>, 而且HGF已证明可抑制瘢痕形成<sup>[13]</sup>. 上皮化和血管形成是胃溃疡愈合必不可少的过程, HGF能促进胃上皮细胞增殖, 因此, HGF具有促进胃溃疡愈合的作用. 但直接应用HGF蛋白治疗胃溃疡存在一些缺陷, 比如HGF蛋白制剂存在半衰期较短, 需要大剂量、反复给药才能维持局部较高的浓度. 有时即使重复应用也难以达到有效浓度, 应用蛋白制剂花费较高, 另外目前的纯化工艺对于人药用级生长因子蛋白的纯化还不是很成熟, 给临床治疗带来很大不便, 所以我们利用减毒沙门氏菌作为基因表达传递载体的优势及对黏膜组织强嗜性的特性, 将HGF基因的真核表达载体转入减毒沙门氏菌中, 制备成一种以减毒沙门氏菌为载体的 $po$ 基因治疗药物, 本文就是观察 $po$ 携带肝细胞生长因子基因真核表达质粒的减毒沙门氏菌在胃溃疡模型大鼠各主要脏器中的表达水平和组织分布, 为HGF在胃溃疡病和其他疾病的基因治疗实际应用提供实验依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 携带HGF基因真核表达质粒的减毒沙门氏菌和携带绿色荧光蛋白(GFP)基因真核表达质粒的减毒沙门氏菌, 均由中国人民解放军兰州军区总医院医学实验中心提供. Taq酶、PCR Buffer、dNTP购自宝生物公司. 抗人HGF mAb(R&D)、重组人HGF蛋白(R&D)、辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠IgG(北京中杉生物公司), 邻苯二胺(OPD); 组织DNA提取试剂盒(优晶生物工程有限公司); 100%冰乙酸(白银化学试剂厂); 引物合成: CMV启动子上游引物5'-CCCAGTACATGACCTTATGGG-3', 下游引物为: 5'-GGAGACTTGGAAATCCCCGT-3', 由上海生工生物有限公司合成; Wistar大鼠80只, 年龄6-7 wk, 雌雄各半, 平均体质量180±10 g. 由中国人民解放军兰州军区总医院实验动物中心提供.

### 1.2 方法

**1.2.1 胃溃疡大鼠动物模型的制备:** 大鼠术前禁食不禁水24 h, 30 g/L戊巴比妥钠溶液40 mg/kg体质量ip麻醉, 剑突下0.5 cm纵向切开腹壁约2 cm, 自肝后找出胃, 轻轻移出腹腔, 用微量注射器在胃前壁胃窦部浆膜下近肌层处注射0.03 mL冰乙酸, 生理盐水冲洗表面后关腹, 其后单笼饲养.

**1.2.2 模型组大鼠分组及基因药物转移:** 将模型组大鼠随机分为2组: 携带HGF基因真核表达质

## ■ 研发前沿

肝细胞生长因子至今尚未批准用于任何一种疾病的治疗. 但他在病毒性肝炎、肿瘤、心血管疾病、胃溃疡和神经保护等方面的作用是近年研究的热点之一.



### ■相关报道

近年来研究表明生长因子在细胞的增殖、运动、损伤修复、细胞外基质形成、血管形成、溃疡愈合及免疫调节等方面起重要作用。

粒的减毒沙门氏菌组(HGF组40只)和携带GFP基因真核表达质粒的减毒沙门氏菌组(GFP组40只)。将携带HGF基因的减毒沙门氏菌菌株及携带GFP基因的减毒沙门氏菌菌株分别接种于2 mL含卡那霉素的LB培养液中,震荡过夜,次日取50  $\mu$ L加入50 mL含卡那霉素的LB培养液中,2 h后收集菌体, PBS清洗后,用100 g/L的NaHCO<sub>3</sub>悬浮,调整细菌数为 $1 \times 10^{12}$  cfu/L, 每只ig 0.2 mL, 隔日1次,共3次。

1.2.3 目的基因分布的观察和HGF在组织中表达: GFP组ig 3次后第1、3、5、7和9天分别处死3只大鼠,取胃、肠、肝、脾和肾组织制备成冰冻切片,荧光显微镜下观察GFP表达分布情况。HGF组ig 3次后第1、3、5、7、9、11、13、15、17、19和21天分别处死3只大鼠,取主要脏器(胃、肝、脾、肾、大肠和小肠),将不同大鼠的同一脏器取同一质量在冰上冷匀浆后离心收集上清,用ELISA方法检测HGF蛋白的表达水平。因为HGF在生理情况下各组织即有,故所有实验数据是以GFP组同时时间处死大鼠的各组织匀浆为对照检测,即生理值为0的情况下的值,也就是外源基因HGF在体内的表达。过程如下:用包被液1:1稀释上清包被酶联免疫吸附板中的各孔,每孔100  $\mu$ L, 4℃过夜;弃包被液体每孔加入120  $\mu$ L封闭液,4℃过夜;PBS-T洗3次,每次5 min;分别加入工作浓度的抗HGF mAb和抗VEGF多克隆抗体,每孔100  $\mu$ L, 37℃孵育1 h; PBS-T洗之;分别加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG及辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG,每孔100  $\mu$ L, 37℃孵育45 min; PBS-T洗之;加入新鲜配制的OPD底物显色液,每孔100  $\mu$ L, 5-10 min避光显色后,用2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,测波长490 nm处吸光度值。同时用重组人HGF标准蛋白作一标准曲线,以计算HGF的表达量。

1.2.4 组织基因组中真核表达载体启动子CMV: HGF组3次ig后,第3天处死大鼠取肝、脾、肾、胃、小肠和大肠脏器,用组织DNA提取试剂盒提取基因组DNA进行PCR反应,上游引物为: 5'-CCCAGTACATGACCTTATGGG-3',下游引物为: 5'-GGAGACTTGGAAATCCCCGT-3',反应条件为: 94℃, 5 min, 94℃, 30 s, 55℃, 30 s, 72℃, 1 min, 72℃, 4 min, 30个循环, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳观察。

## 2 结果

### 2.1 GFP在大鼠主要脏器中的表达 GFP组在ig

后第1、3、5、7和9天大鼠的肝脏、肾脏、脾脏、胃、大肠和小肠中均可观察到GFP的表达,其中以肝脏、胃、肠中表达较强(图1),荧光强度在第5、7天较强,第1、9天次之。

2.2 ELISA方法检测HGF蛋白的表达 组织匀浆后用ELISA检测HGF水平,结果如图2。可以看到HGF蛋白在各组织均有表达,但各组织的HGF蛋白表达水平略有不同:肝、肾在第9天时表达量达到高峰,胃、脾和小肠在第5天时表达量达到高峰,大肠在第13天时表达量达到高峰。随着时间推移表达量开始逐步下降,直至第21天仍有少量表达。

2.3 组织基因组DNA中真核表达载体启动子PCR的检测 HGF实验组第1、3、5、7、9、11、13、15和17天大鼠主要脏器(胃、肝、脾、肾、大肠和小肠)组织基因组DNA中均可扩增出一个141 kb大小的片段,第15天各组织基因组DNA中CMV的PCR扩增如图3,与引物设计时所预计的扩增片段CMV大小相符,说明减毒沙门氏菌将携带HGF基因的真核表达质粒转入了大鼠组织细胞的基因组中。第19、21天大鼠各主要脏器中未扩增出的CMV片段。

## 3 讨论

本实验中,HGF治疗组大鼠各主要脏器组织(胃、肝、脾、肾、大肠和小肠)中可扩增出CMV片段,表明减毒沙门氏菌可将外源HGF基因转入大鼠各组织器官中。并且在胃、肠组织中具有较好的组织靶向性,结合ELISA检测结果可以看出po后第5天表达量达到高峰,正好与GFP组的表达和强度实验结果一致。可以说明在大鼠胃溃疡治疗中,减毒沙门氏菌作为细胞载体以po方式可将携带目的基因的真核表达载体相对靶向性转入胃、肠组织中。为HGF基因药物的实际应用奠定实验基础和实验依据: (1)证明po给药的可行性; (2)证明了减毒沙门氏菌作为载体可以将HGF基因携带并转移到靶组织(胃、肠、肝和肾)发挥其治疗作用; (3)在胃肠组织中的表达量于第5天达到高峰,为后续实验起到指导作用。

沙门氏菌是肠道病原菌,是一种侵袭性胞内菌,他与宿主之间的反应通过III型分泌机制介导,这种机制使细菌的效应蛋白转移到真核细胞<sup>[14-15]</sup>,沙门氏菌可以侵入肠上皮进入淋巴系统,通过血液循环,定居在脾脏和肝脏等器官<sup>[16]</sup>,诱发全身性针对外源抗原的体液免疫和细胞免

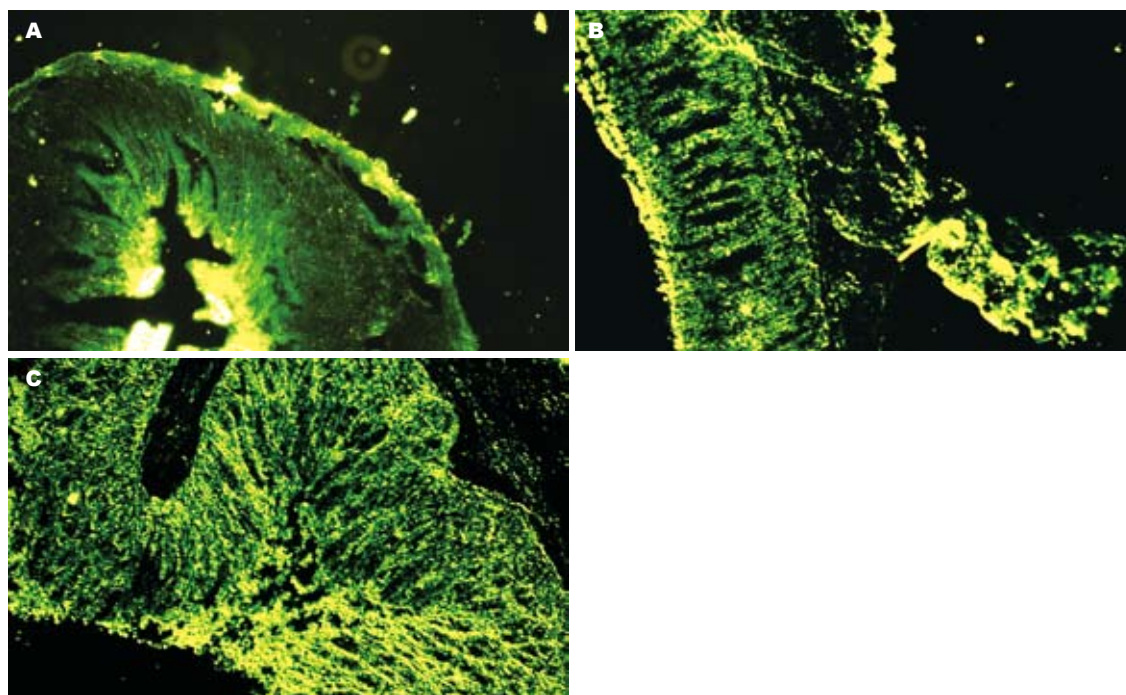


图 1 GFP蛋白在大鼠主要脏器中的表达( $\times 40$ ). A: 小肠; B: 胃; C: 大肠.

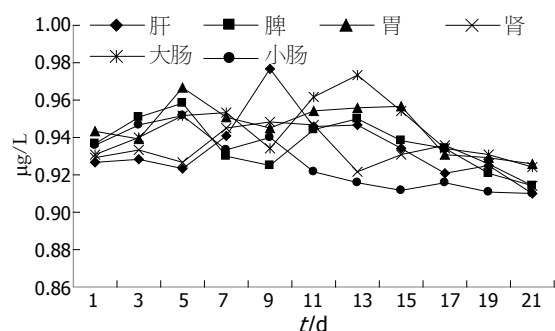


图 2 HGF蛋白在各组织中的表达.

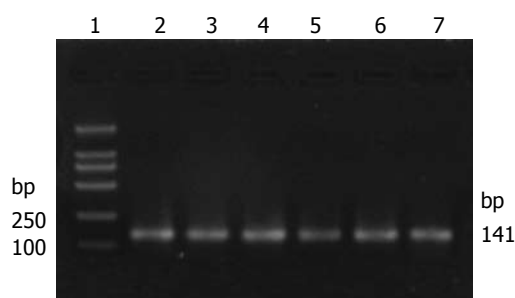


图 3 第15天各组织基因组DNA中CMV的PCR扩增. 1: 2000 bp marker; 2: 胃; 3: 肝; 4: 脾; 5: 肾; 6: 大肠; 7: 小肠.

疫. 通过基因工程方法减毒可降低其对宿主的致病性, 但仍保持良好的侵袭能力, 对黏膜组织有强嗜性. 减毒沙门氏菌已被实验性的用做外源抗原基因载体, 并已初步证明能直接将真核表达质粒携带进入动物细胞内, 表达相应的蛋白而诱发免疫反应. 由于已减毒最终被宿主清除.

近年来研究表明生长因子在细胞的增殖、运动、损伤修复、细胞外基质形成、血管形成、溃疡愈合及免疫调节等方面起重要作用. 已有研究表明, 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)在溃疡病发病、治疗和抗复发方面均有一定意义, 国外已有基因重组的用于治疗溃疡病和烧伤的EGF制剂, 是一个有希望的新型黏膜保护剂<sup>[17]</sup>. 研究表明HGF: (1)可促进肠上皮细胞增殖, 减轻炎症细胞浸润, 促进胃肠道黏膜损伤愈合<sup>[9,18]</sup>; (2)HGF有强的促血管形成的功

能, 局部应用HGF可促进胃肠局部血液供应, 减少氧自由基的产生, 从而减轻黏膜损伤, 促进损伤黏膜修复<sup>[19]</sup>; (3)HGF具有免疫调节作用, 通过诱导Th2细胞分泌细胞因子、抑制树突状细胞功能等来治疗自身免疫性疾病, 如系统性红斑狼疮、移植排斥反应和自身免疫性心肌炎等<sup>[20-21]</sup>. 肝细胞生长因子至今尚未批准用于任何一种疾病的治疗, 但他在病毒性肝炎、肿瘤、心血管疾病、组织黏膜修复、创伤愈合、胃肠道溃疡和神经保护等方面的作用已有较多的报道, 尤其是其在免疫性疾病治疗中的实验研究已是近年来研究的热点之一<sup>[9,18,22]</sup>.

GFP是来自水母的一种基因报告分子也是一种全新的生物发光报告因子<sup>[23]</sup>. 他的生色团是包埋于完整GFP序列中重复出现的三肽Ser-Thyr-Gly组成的. 由于这个重组菌能够表达肉眼

#### ■创新盘点

本实验没有直接用HGF蛋白, 而是采用HGF基因治疗的方法, 并利用减毒沙门氏菌作为细胞载体.

### ■应用要点

本实验为临床治疗胃溃疡提供一个可靠的方法,即利用减毒沙门氏菌为细胞载体,以口服方式将HGF基因携带并转移至损伤部位,从而为HGF基因药物的实际应用奠定实验基础和依据。

可见的绿色荧光蛋白,所以菌落及菌液颜色均呈绿色。同时由于GFP能够在紫外光或蓝光激发下发出明亮的绿色荧光,因此可用FACS技术(流式细胞技术)、荧光显微镜等方法进行检测,为此,我们将GFP插入载体中构建重组质粒,最后转入减毒鼠伤寒沙门氏菌中,建立表达系统。荧光强度是GFP在靶细胞中的表达量,与感染靶细胞的病毒颗粒的多少呈正比关系。目的基因HGF蛋白的表达与GFP荧光强度的表达变化基本一致。

大鼠乙酸性胃溃疡是一种慢性溃疡模型,持续时间长,短则10余天,长则半年,一般第60天左右可自然愈合,大量研究表明此模型方法可靠,重复性好,溃疡深而大,肉眼观和组织形态学观察均与人类的消化性溃疡非常相似<sup>[25]</sup>,所以我们采用王英<sup>[24]</sup>的乙酸致大鼠胃溃疡模型方法建立动物模型,通过观察在大鼠胃溃疡基因治疗中,减毒沙门氏菌作为细胞载体以 $po$ 方式可以将携带目的基因HGF的真核表达载体相对靶向性转入胃肠组织中从而发挥其治疗作用。有学者认为大鼠胃黏膜HGF mRNA分布于再生腺体与黏膜下组织动脉血管之间的基质细胞中,其受体c-met mRNA则位于再生腺体上皮细胞,提示HGF可能通过旁分泌机制在胃溃疡修复中发挥重要作用。HGF能使正常大鼠胃黏膜上皮细胞环氧化酶-2 mRNA和蛋白表达分别增加至236%和175%<sup>[25]</sup>。环氧化酶-2系前列腺素合酶,能促进前列腺素的合成,而前列腺素对胃黏膜细胞具有保护作用,能增加黏膜的血液循环,HGF也可能通过增加前列腺素合成促进胃溃疡的愈合。

基因治疗可能成为一些重大疾病如恶性肿瘤、心血管疾病、消化系统、神经系统疾病、传染病包括艾滋病等的有效治疗手段<sup>[26]</sup>。而基因治疗用于临床所面临的最大问题就是如何建立一个安全、高效、实用、可重复的基因转移系统。转移系统中基因转移载体的选择十分重要,减毒沙门氏菌载体是基因治疗中广为应用的一种基因转移载体,本实验中我们没有直接用HGF蛋白,而是采用HGF基因治疗的方法,并利用减毒沙门氏菌作为细胞载体,目的是:(1)能够解决HGF蛋白直接应用存在的缺陷:细胞因子蛋白制剂存在半衰期较短,需要大剂量、反复给药才能维持局部较高的浓度。有时即使重复应用也难以达到有效浓度,应用蛋白制剂花费较高,另外目前的纯化工艺对于人药用级生长因子蛋白的纯化还不是很成熟,给临床治疗带

来很大不便;(2)减少给药次数使损伤快速修复。将基因携带在真核表达载体上,并将其转移到损伤器官组织部位,使组织成为“微型的药物工厂”,持续分泌一定时间的重组蛋白,以达到治疗疾病的目的。一次服用可以表达一定的时间,从而减少用药次数缩短用药时间。(3)是利用减毒沙门氏菌可以 $po$ 及提高机体免疫力的优势。

总之,10多年的基因治疗临床试验已表明,基因治疗不仅作为一个新的生物医学概念为人们所接受,而且作为一种新的治疗手段和方法被广大研究人员和临床工作者所实践。而且到目前为止所进行的多数研究表明,基因治疗临床试验总体上是安全、有效和易于操作的。

### 4 参考文献

- 1 陈见南. 消化性溃疡病及其治疗药物的昨天、今天和明天. 中国医药情报 1995; 1: 164-167
- 2 姜凯, 黄志强. 肝细胞生长因子和血管内皮细胞生长因子的生物学特性研究进展. 肿瘤防治杂志 2003; 10: 108-112
- 3 Zahm JM, Debordeaux C, Raby B, Klossek JM, Bonnet N, Puchelle E. Motogenic effect of recombinant HGF on airway epithelial cells during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *J Cell Physiol* 2000; 185: 447-453
- 4 Awasthi V, King RJ. PKC, p42/p44 MAPK, and p38 MAPK are required for HGF-induced proliferation of H441 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L942-L949
- 5 van Adelsberg J, Sehgal S, Kukes A, Brady C, Barasch J, Yang J, Huan Y. Activation of hepatocyte growth factor (HGF) by endogenous HGF activator is required for metanephric kidney morphogenesis in vitro. *J Biol Chem* 2001; 276: 15099-15106
- 6 Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest* 2000; 106: 1511-1519
- 7 Murai R, Kanbe T, Mukoyama T, Shimomura T, Hashiguchi K, Yoshida Y, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Shiota G. Effect of rectal administration of rebamipide on dextran sulfate sodium-induced colitis: role of hepatocyte growth factor. *Inflamm Res* 2007; 56: 240-245
- 8 Nanakin A, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Kanda N, Hisatsune H, Seno H, Konda Y, Fujimori T, Chiba T. Expression of the REG IV gene in ulcerative colitis. *Lab Invest* 2007; 87: 304-314
- 9 Kanbe T, Murai R, Mukoyama T, Murawaki Y, Hashiguchi K, Yoshida Y, Tsuchiya H, Kurimasa A, Harada K, Yashima K, Nishimuki E, Shabana N, Kishimoto Y, Kojyo H, Miura K, Murawaki Y, Kawasaki H, Shiota G. Naked gene therapy of hepatocyte growth factor for dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 1517-1525
- 10 Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in

- experimental ulcerative colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 146-151
- 11 Okunishi K, Dohi M, Fujio K, Nakagome K, Tabata Y, Okasora T, Seki M, Shibuya M, Imamura M, Harada H, Tanaka R, Yamamoto K. Hepatocyte growth factor significantly suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 2007; 179: 5504-5513
- 12 Kuroiwa T, Iwasaki T, Imado T, Sekiguchi M, Fujimoto J, Sano H. Hepatocyte growth factor prevents lupus nephritis in a murine lupus model of chronic graft-versus-host disease. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R123
- 13 Ha XQ, Yuan B, Li YM, Lao MF, Wu ZZ. Gene therapy for pathological scar with hepatocyte growth factor mediated by recombinant adenovirus vector. *Science in China* 2003; 46: 320-327
- 14 Kitamura S, Kondo S, Shinomura Y, Isozaki K, Kanayama S, Higashimoto Y, Minami T, Kiyohara T, Yasunaga Y, Ishikawa H, Ohtani T, Ishiguro S, Matsuzawa Y. Expression of hepatocyte growth factor and c-met in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2000; 49: 320-324
- 15 Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* 2001; 39: 260-271
- 16 Platt J, Sodi S, Kelley M, Rockwell S, Bermudes D, Low KB, Pawelek J. Antitumour effects of genetically engineered *Salmonella* in combination with radiation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2397-2402
- 17 Sinha A, Nightingale J, West KP, Berlanga-Acosta J, Playford RJ. Epidermal growth factor enemas with oral mesalamine for mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis or proctitis. *N Engl J Med* 2003; 349: 350-357
- 18 Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 146-151
- 19 Kuenzler KA, Pearson PY, Schwartz MZ. Hepatocyte growth factor pretreatment reduces apoptosis and mucosal damage after intestinal ischemia-reperfusion. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 1093-1097; discussion 1093-1097
- 20 Okunishi K, Dohi M, Nakagome K, Tanaka R, Mizuno S, Matsumoto K, Miyazaki J, Nakamura T, Yamamoto K. A novel role of hepatocyte growth factor as an immune regulator through suppressing dendritic cell function. *J Immunol* 2005; 175: 4745-4753
- 21 Skibinski G. The role of hepatocyte growth factor/c-met interactions in the immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2003; 51: 277-282
- 22 Murai R, Kanbe T, Mukoyama T, Shimomura T, Hashiguchi K, Yoshida Y, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Shiota G. Effect of rectal administration of rebamipide on dextran sulfate sodium-induced colitis: role of hepatocyte growth factor. *Inflamm Res* 2007; 56: 240-245
- 23 何勇, 周峻, 窦科峰. 肝细胞生长因子表达载体的构建及在人肝细胞中的表达. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 1143-1146
- 24 王英. 冰乙酸性大鼠胃溃疡模型制作方法比较. *实用诊断与治疗杂志* 2007; 21: 505-506
- 25 展玉涛, 王宇. 肝细胞生长因子在一些疾病中的变化及意义. *国外医学·内科学分册* 2004; 31: 163-167
- 26 哈小琴, 赵治华, 吕同德, 劳妙芬, 吴祖泽. 大鼠注射重组腺病毒Ad-HGF后血清中抗腺病毒抗体的检测. *中国比较医学杂志* 2006; 16: 515-516

## ■同行评价

本文有很强的创新性和可读性, 是目前研究的热点之一。

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末。标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体。(常务副总编辑: 张海宁 2008-06-08)



# 肝脏脂肪酸在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪性肝病模型中的代谢

陆金来, 陈金联, 陈明祥, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维

## ■背景资料

肝脏是机体新陈代谢、化学反应发生的中心场所, 在代谢过程中具有重要作用。而各种原因使肝脏脂肪代谢障碍, 脂质代谢的动态平衡失调, 脂肪在肝细胞内堆积, 即会发生脂肪肝。目前对NASH的发病机制还未完全清楚, 临床上也缺乏统一的诊断标准和有效的治疗手段。因此有必要从代谢水平对NASH的发生机制进行研究, 为临床诊治提供新的思路。

陆金来, 陈金联, 陈明祥, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233  
陆金来, 2005年上海交通大学医学院硕士, 主要从事肝病及消化系统肿瘤的基础和临床研究。

作者贡献分布: 陆金来与陈金联对此文所作贡献均等; 本研究由陆金来与陈金联设计; GC-MS分析由陆金来、陈维雄、朱金水及陈尼维完成; 数据分析由陆金来、陈明祥及洪静完成; 本论文写作由陆金来与陈金联完成。

通讯作者: 陈金联, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化科, wqj\_021002@163.com  
电话: 021-64369181-8970 传真: 021-64837019  
收稿日期: 2008-01-16 修回日期: 2008-04-25

## Fatty acids metabolic profile in high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats

Jin-Lai Lu, Jin-Lian Chen, Ming-Xiang Chen, Jing Hong, Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen

Jin-Lai Lu, Jin-Lian Chen, Ming-Xiang Chen, Jing Hong, Wei-Xiong Chen, Jin-Shui Zhu, Ni-Wei Chen, Department of Gastroenterology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China  
Correspondence to: Jin-Lian Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. wqj\_021002@163.com  
Received: 2008-01-16 Revised: 2008-04-25

## Abstract

**AIM:** To analyze fatty acid metabolic profile changes of fatty livers induced by a high fat diet and to determine its role in non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

**METHODS:** Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: the control group (treated with normal diet,  $n = 7$ ) and the model group (treated with high fat diet,  $n = 7$ ). The rats were all killed at wk 16 to detect pathological changes in liver tissues. The metabolic profile changes of fatty acid in NASH and normal liver tissue samples were detected by ECF derivatization for GC/MS technology. Data were analyzed using SPSS 11.0 software package.

**RESULTS:** After a high fat diet for 16 wk, severe fatty livers (+++) were present in the high fat diet group with remarkable inflammation.

A significant morphological difference was detected between the two groups. Total ion current (TIC) and principal component analysis (PCA) indicated that there were significantly different metabolic patterns in liver tissues between the two groups. Compared with the control group, all fatty acids were raised significantly except a 56% decrease in dodecanoic acid ( $P < 0.05$ ). Octadecanoic acid, tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, eicosanoic acid, 9-octadecenoic acid, 9, 12, 15-octadecatrienoic acid, 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid and 9, 12-octadecadienoic acid were raised 5.42, 4.10, 11.56, 5.86, 1.82 and 8.00, 2.44-folds, respectively. Moreover,  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ratio was raised.

**CONCLUSION:** Our results suggest that there are significant fatty acids metabolic profile changes in NASH. Excessive fatty acids accumulation in hepatic cells,  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio imbalance and dodecanoic acid decrease may play a crucial role in steatohepatitis and hepatic injury.

**Key Words:** Non-alcoholic liver disease; Fatty acid; Gas chromatography-mass spectrometry; Non-alcoholic steatohepatitis

Lu JL, Chen JL, Chen MX, Hong J, Chen WX, Zhu JS, Chen NW. Fatty acids metabolic profile in high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1728-1733

## 摘要

**目的:** 探索脂肪酸代谢变化在非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)发病中的作用。

**方法:** SD大鼠正常喂养1 wk后, 随机分为正常组和高脂饮食组( $n = 7$ )。正常组大鼠以普通饲料喂养, 高脂饮食组以高脂饲料喂养。实验第16周分别处死大鼠, 观察肝组织的病理改变。ECF衍生GC/MS技术分析NASH大鼠与正常大鼠肝组织脂肪酸代谢的变化, 并运用SPSS11.0软件, 进行主成分分析(PCA), 观察代谢产物信息。

**结果:** 高脂饮食组大鼠脂肪肝病程度均为

## ■同行评议者

何生松, 教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科; 黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

+++，均达到脂肪肝诊断标准，且炎症明显。NASH和正常组大鼠肝组织代谢组形态具有明显差异。高脂饮食大鼠NASH肝脏与正常组相比较，存在明显的脂肪酸谱变化。与对照组相比，除正十二烷酸降低0.56，其余脂肪酸均显著升高( $P<0.05$ )，硬脂酸、十四烷酸、十六烷酸、二十烷酸、油酸、 $\alpha$ -亚麻酸、花生四烯酸和亚油酸分别升高5.42、4.10、11.56、5.86、1.89、1.82、8.00和2.44倍，且 $\omega$ -6/ $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的比值升高。

**结论：**NASH大鼠肝脏存在明显的脂肪酸代谢变化，肝细胞内各类脂肪酸聚积、 $\omega$ -6/ $\omega$ -3多不饱和脂肪酸比率失衡和正十二烷酸降低可能对脂肪肝炎症发生、肝损伤有重要作用。

**关键词：**非酒精性脂肪性肝病；脂肪酸；气相色谱-质谱；非酒精性脂肪性肝炎

陆金来, 陈金联, 陈明祥, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维. 肝脏脂肪酸在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪性肝病模型中的代谢. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1728-1733  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1728.asp>

## 0 引言

近年来，由于饮食结构的西化和生活方式的改变，非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率日益增高<sup>[1-4]</sup>。单纯性脂肪肝可进展为非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)，并进一步发展为肝硬化、肝癌等终末期肝病<sup>[5-7]</sup>。根据脂肪肝的定义，肝组织脂肪含量超过肝重量的5%以上，或在组织学上有1/3以上肝细胞脂肪化时，即称之为脂肪肝<sup>[8]</sup>，但目前对单纯肝脏脂肪储积发展为NASH的机制尚未弄清楚。细胞内许多生命活动实际上是发生在代谢物层面的，关于脂肪肝肝脏代谢的变化报道甚少，故本研究在建立高脂饮食SD大鼠NASH模型的基础上，应用代谢组学的方法，检测肝脏脂肪酸代谢的变化，并研究其在NASH发病中的意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂SD大鼠购于中科院上海实验动物中心，体质量 $220\pm 30$  g，胆固醇由上海盛季科技发展有限公司提供，酸度-乙醇溶解测验合格。GC/MS分析所用试剂和仪器均由上海交通大学药学院提供。试剂主要包括乙基氯甲酸酯(ECF)、吡啶、无水乙醇、氢氧化钠、氯仿、无水硫酸钠分析纯(中国国家药学集团公司)。仪器

主要包括气相色谱-质谱联用仪(Perkin Elmer公司)、WH-90A微型旋涡混合器(上海振荣科学仪器有限公司)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及造模：**大鼠正常喂养1 wk后，随机分为2组，正常组和高脂饮食组( $n=7$ )。高脂饮食组以高脂饲料(0.88普通饲料+0.10猪油+0.02胆固醇)喂养，正常组大鼠予以普通饲料喂养。实验动物均饲养于本院动物房，自由进食和饮水，3-4只/笼。

**1.2.2 标本收集和病理学检查：**实验第16周分别处死正常组和高脂饮食组大鼠。在肝固定部位取2块肝组织，1块以100 g/L中性甲醛固定后，石蜡包埋切片，HE染色，光镜下观察肝病理变化，检测脂肪肝程度，根据肝小叶内含脂滴细胞数占总细胞的比值为0、1/3、1/3-2/3、>2/3将肝脏脂肪变分为-、+、++、+++，达到(++)或以上者，诊断为脂肪肝；另一块立即置-80℃冷冻保存。

**1.2.3 样品制备：**(1)首先提取组织，用蒸馏水和无水乙醇1:1研磨，得到0.1 kg/L的组织，以转速10000 g离心10 min，保留上层水相。(2)接着开始ECF衍生化过程，取上清400  $\mu$ L加入screw-top玻璃管，加入无水乙醇200  $\mu$ L，蒸馏水400  $\mu$ L，吡啶100  $\mu$ L，ECF50  $\mu$ L静置1 min，振荡10 s，进行第1次衍生化；将混合物用40 kHz超声1 min，加入10 mol/L的NaOH 100  $\mu$ L调节pH值，同时加入ECF50  $\mu$ L，振荡10 s，进行第2次衍生化；超声1 min，加入氯仿30  $\mu$ L抽提，振荡30 s，静置5 min，以3000 r/min离心10 min，静置10-20 min。(3)抽出水层，剩下的氯仿层含有衍生物被分离出来，用无水硫酸钠吸干，待进样。

**1.2.4 GC/MS分析过程：**(1)GC/MS分析：衍生萃取物用Perkin Elmer色谱、TurboMass-Autosystem XL质谱仪进行测定。色谱条件：色谱柱DB-5MS毛细管柱(Agilent J&W Scientific, Folsom, CA)，不分流进样，进样量1  $\mu$ L，进样口温度260℃，离子源温度200℃。程序升温起始温度80℃，保持2 min，以10℃/min升至140℃，以4℃/min升至240℃，再以10℃/min升至280℃，保持3 min。以流速1 mL/min的氦气作为载气。质谱条件：电离方式EI，电子能量70 eV，质谱扫描范围： $m/z$ 30-550，全扫描方式。(2)数据分析：利用仪器附带的TurboMass ver4.1.1软件和NIST质谱仪对色谱图中色谱峰进行定性定量分析。所有的GC-MS原始文件多变量分析之前使数据标准化，合成的三维矩阵包括峰指数，样本名称和标

### ■研究前沿

目前对单纯肝脏脂肪储积发展为NASH的机制尚未明了。细胞内许多生命活动实际上是发生在代谢物层面，而关于脂肪肝肝脏代谢的变化报道甚少。

## ■相关报道

代谢组学已被广泛应用于生理、药物毒性试验、疾病的早期诊断和个性化治疗等领域。在代谢组学研究的起步阶段,就已在肝病领域进行了大量研究。有报道代谢谱变化可作为肝毒性和肝损伤严重程度的预测指标。

准的峰面积百分比,引入SPSS11.0,应用主要成分分析(PCA)直观地观察代谢产物信息。

**统计学处理** 采用SPSS11.0软件包统计。计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ,采用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 表示两组代谢产物差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 高脂饮食大鼠脂肪肝病病理变化** 光镜下可见正常大鼠肝组织均无脂肪肝等病理改变。高脂饮食16 wk大鼠脂肪肝明显,病变程度均为+++。100%大鼠达到脂肪肝诊断标准。门管区见慢性炎症细胞浸润,肝小叶内肝细胞内可见大囊泡和小囊泡型脂肪滴贮积,为大泡性和小泡性混合性肝细胞脂肪变性,可见肝细胞坏死,炎症细胞浸润明显,主要以单个核细胞浸润为主,肝间质无纤维化(图1)。

**2.2 GC/MS分析结果** GC/MS分析正常组与高脂饮食组肝脏色谱峰总离子流(total ion current, TIC)表达情况,结果显示正常组与高脂饮食组两组肝脏色谱峰总离子流显著差异(图2)。运用SPSS11.0软件对数据进行PCA,直观地显示各组肝组织的代谢组信息(图3),从图中可以看出两组代谢形态有明显差异。

然后利用仪器附带的TurboMass ver4.1.1软件 and NIST Mass Spectral Database数据库对有表达差异的色谱峰进行质谱解析,结合保留时间进行定性,识别与NASH相关的生物标志物。两组物质进行 $t$ 检验,共得出9个有表达差异的脂肪酸产物( $P < 0.05$ ,表1)。我们可以看出高脂饮食大鼠NASH肝脏与正常组相比较,存在明显的脂肪酸谱变化。与对照组相比较,饱和脂肪酸正十二烷酸降低0.56,硬脂酸、十四烷酸、十六烷酸、二十烷酸分别升高5.42、4.10、11.56、5.86倍;单不饱和脂肪酸油酸升高1.89倍; $\omega$ -3多不饱和脂肪酸 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)升高1.82倍; $\omega$ -6多不饱和脂肪酸包括花生四烯酸(AA)和亚油酸(LA)分别升高8.00和2.44倍。另外 $\omega$ -6升高的程度明显高于 $\omega$ -3,对AA/ALA比值进行统计分析,结果有统计学意义( $P < 0.05$ ),而LA/ALA比值没有统计学意义( $P > 0.05$ ),提示NASH时有 $\omega$ -6/ $\omega$ -3多不饱和脂肪酸比值升高,存在 $\omega$ -6/ $\omega$ -3代谢不平衡。

## 3 讨论

有学者认为NAFLD可能是代谢综合征在肝脏的表现,也有学者认为NAFLD是代谢综合征的病因,因果关系目前尚没有定论。肥胖、糖尿病、

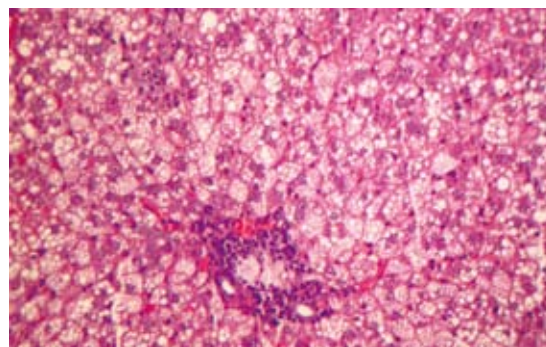


图1 高脂饮食16 wk大鼠肝脏(H&E染色 $\times 200$ )。

高脂血症被认为是NAFLD患者脂肪肝进展的危险因素<sup>[8]</sup>。肝脏是机体能量代谢、脂肪酸代谢和氨基酸代谢的重要部位,正常状态下这些生物工程处于动态平衡状态,当输入肝脏的脂质和脂肪酸过多,而肝脏脂肪酸氧化分解不足,清除脂质的能力下降时,脂肪就会在肝脏沉积,发生脂肪肝。但是当前对单纯性脂肪肝发展为NASH的机制仍未弄清。

本实验采用单纯高脂饮食16 wk成功建立SD大鼠NASH动物模型,组织学观察表明,肝组织NASH的复制率达100%,光镜下可见大泡性和小泡性混合性肝细胞脂肪变性,并伴有肝细胞坏死,炎症细胞浸润明显。采用该方法造模与人类NASH自然发病过程相一致,结果比较可靠<sup>[9]</sup>。目前对NASH代谢组变化的研究少见报道。由于血液中的物质并不能完全代表肝脏内生产物的变化,故本实验应用ECF衍生GC/MS技术直接检测了NASH肝组织的代谢组变化,旨在为NASH的发病机制找到一丝端倪。Qiu *et al*<sup>[10]</sup>在代谢组学的基础上,应用联合氯甲酸乙酯(ECF)衍生气相色谱-质谱(GC/MS)技术成功检测了1, 2-二甲胍(DMH)诱导的癌前期病变大鼠尿中代谢组的变化,证明该技术具有良好的精密度、可重复性和稳定性,适合用于分析伴随代谢障碍的系统整体代谢组研究。ECF衍生化技术的改善与传统GC/MS技术相比较有两个优点,首先衍生过程在水中进行的,因此在反应前不需移走水,有利于样本制备以及提高重复性;其次,分两阶段衍生可以更好地衍生化和数据采集,这样更多的峰可以被检测到。更重要的是,用氢氧化钠调节pH值使待检分子更容易融解,在水中的活性更高<sup>[10]</sup>。本实验结果显示正常组与高脂饮食组肝脏色谱峰TIC图有明显的差异,同一保留时间物质的峰不同,主成分分析图显示两组肝组织的代谢形态有明显差异。

表 1 正常组与高脂饮食组的代谢产物表达情况  $R = (\text{高脂饮食组} - \text{正常组}) / \text{正常组}$ 

化学名称	别名	高脂饮食组	正常组	R
饱和脂肪酸类				
十八烷酸	硬脂酸	276.370 ± 71.399	43.024 ± 6.972	5.42
正十二烷酸	月桂酸	2.613 ± 0.997	5.977 ± 1.293	-0.56
十四烷酸	豆蔻酸	70.429 ± 5.172	13.796 ± 4.168	4.10
十六烷酸	软脂酸	7.448 ± 1.193	0.593 ± 0.435	11.56
二十烷酸	花生酸	18.325 ± 1.991	2.672 ± 1.020	5.86
单不饱和脂肪酸				
十八碳烯-9-酸	油酸	55.539 ± 25.156	19.205 ± 6.011	1.89
ω-3多不饱和脂肪酸				
9, 12, 15十八碳三烯酸	α-亚麻酸	11.482 ± 3.879	4.070 ± 3.035	1.82
ω-6多不饱和脂肪酸				
二十碳四烯酸	花生四烯酸	12.544 ± 1.969	1.394 ± 0.989	8.00
9, 12-十八碳二烯酸	亚油酸	941.604 ± 259.804	273.242 ± 63.920	2.44

## ■ 创新盘点

本研究在建立高脂饮食SD大鼠NASH模型的基础上,应用代谢组学的方法,通过氯甲酸乙酯(ECF)衍生气相色谱-质谱(GC/MS)技术检测肝脏脂肪酸代谢的变化,并研究其在NASH发病中的意义。

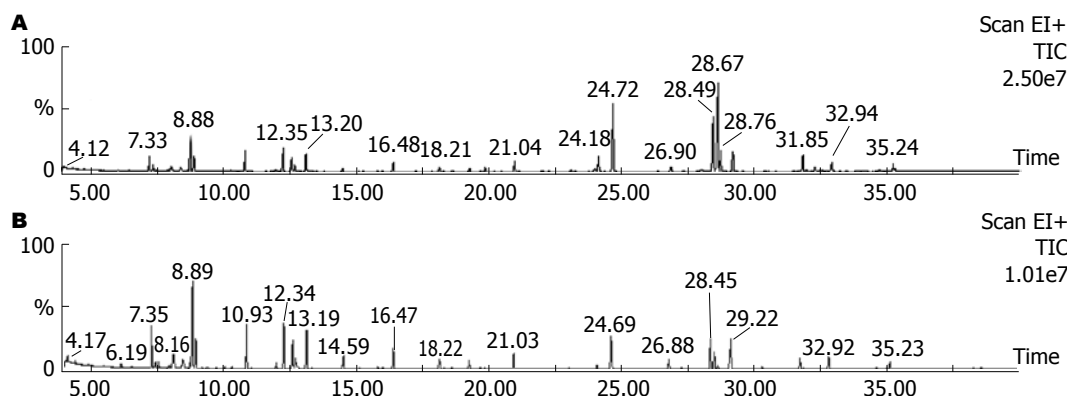


图 2 正常组与高脂饮食组肝脏色谱峰TIC表达. A: 高脂饮食组; B: 正常组.

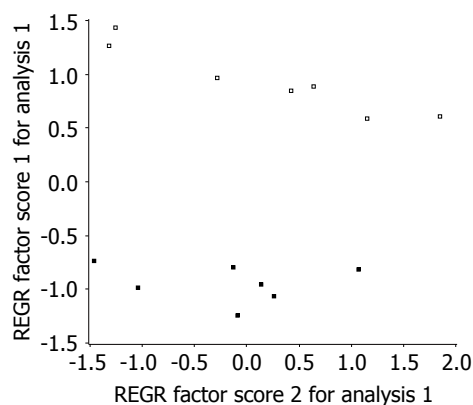


图 3 高脂饮食组和正常组肝组织代谢组主成分分析. 1: 高脂饮食组; 2: 正常组; REGR factor score: 回归因子得分.

本实验结果显示,除了正十二烷酸降低外,其余发现的脂肪酸与正常组相比较均显著升高,有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明NASH大鼠的肝脏存在明显的内生脂肪酸代谢变化.考虑这一方面可能与高脂饮食摄入增多有关,另一方面与机体的内分泌代谢机制有关.已证实胰岛素抵

抗可使脂肪分解增加,循环中FFA增多,增多的FFA可进一步抑制胰岛素的信号转导并减少胰岛素的清除,高胰岛素血症能增加糖降解而增加脂肪酸的合成,这均可使过多的FFA进入肝脏.肉毒碱脂酰转移酶是肝脏脂肪酸β-氧化的限速酶,当脂肪酸的供应量超过该酶的运转能力时,脂酰辅酶A即进入内质网合成脂酰甘油,四癸基环氧丙酸(tetradecylglycidic acid, TDGA)可通过抑制该酶而抑制脂肪酸的氧化分解<sup>[11]</sup>.肝组织固醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)又称脂肪细胞定向和分化因子1(ADD1),主要在啮齿类动物和人类的肝脏和脂肪细胞表达,通过转基因小鼠和基因剔除小鼠的研究发现SREBP-1c与脂肪酸代谢有关<sup>[12]</sup>.艾正琳 *et al*<sup>[13]</sup>研究发现高脂饮食可引起SREBP-1c表达增强,起初为机体的适应性反应,若持续增强,则引起其调控的脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)酶活性增强,从而导致脂肪酸代谢失衡.

我们的实验结果显示NASH大鼠肝组织硬



# ■名词解释

主成分分析: 也称主分量分析, 旨在利用降维的思想, 把多指标转化为少数几个综合指标。主成分分析法是一种数学变换的方法, 他把给定的一组相关变量通过线性变换转成另一组不相关的变量, 这些新的变量按照方差依次递减的顺序排列。在数学变换中保持变量的总方差不变, 使第一变量具有最大的方差, 称为第一主成分, 第二变量的方差次大, 并且和第一变量不相关, 称为第二主成分。依次类推, 一个变量就有一个主成分。选择越少的主成分, 降维就越好。

脂酸、十四烷酸、十六烷酸、二十烷酸、油酸等脂肪酸与正常组比较明显升高。Joshi-Barve *et al*<sup>[14]</sup>将肝细胞(HepG2)暴露于十六烷酸, 发现高水平的十六烷酸可以显著提高有生物活性的中性粒细胞化学引诱物, 激活NF- $\kappa$ B和c-Jun N-末端激酶激活蛋白-1, 刺激促炎细胞因子IL-8分泌引起肝脏炎症反应和肝损伤。Yao *et al*<sup>[15]</sup>发现铁与十六烷酸(PA)结合后可显著的发挥其毒性作用, 使线粒体功能障碍、细胞凋亡、死亡、和染色体突变。十六烷酸通过转铁蛋白受体依赖的机制使铁易位到细胞, 还可使已易位的铁进入线粒体内, 细胞内的铁超载导致ROS过度产生和脂质过氧化。进一步研究发现十六烷酸使铁易位是因为Fe/PA介导的细胞外的氧化应激和随后的膜渗透增高使膜损伤。缺乏线粒体DNA的rho0细胞内Fe/PA介导的毒性明显降低。Feldstein *et al*<sup>[16]</sup>认为是油酸介导的溶酶体的不稳定引起脂毒性。将肝细胞暴露于油酸, 会导致肝细胞的BAX易位到溶酶体, 使溶酶体失去稳定性, 向胞质溶胶内释放一种溶酶体的半胱氨酸蛋白酶-组织蛋白酶B(ctsb), 且与病情的严重性相关, 而使ctsb钝化则可以阻止脂肪肝、肝损伤、胰岛素抵抗相关的代谢综合征的进展。另外, 溶酶体失去稳定性还可以激活NF- $\kappa$ B依赖的TNF- $\alpha$ 表达。Barreyro *et al*<sup>[17]</sup>实验发现饱和脂肪酸(十六烷酸和硬脂酸)在肝细胞内过度聚积, 可促进蛋白质磷酸酶2A的活性, 从而激活依赖该酶的FoxO3a脱磷酸作用, FoxO3a可能同时诱导Bim和FasL的表达从而调节肝细胞的凋亡。Malhi *et al*<sup>[18]</sup>发现低浓度的油酸即可使TRAIL致敏, 认为通过JNK依赖的CD5上调介导的TRAIL致敏可能是其致病的机制。目前花生酸与NASH的关系尚未见报道, 另外, 虽然十四烷酸也未见与NASH的发病有直接联系的报道, 但是Rioux *et al*<sup>[19]</sup>发现他可以调节体内饱和、不饱和脂肪酸的生物合成和代谢, 使肝脏 $\omega$ -3和 $\omega$ -6不饱和脂肪酸聚积。研究结果表明, NAFLD大鼠肝脏存在明显的脂肪酸代谢障碍, 肝细胞内各类脂肪酸堆积引起肝脏炎症、肝损伤。促炎细胞因子、氧化应激和脂质过氧化、肝细胞凋亡增加等可能是脂肪酸导致NASH的机制。

我们的实验结果提示NASH大鼠肝组织内 $\omega$ -3和 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸均显著高于正常组。有研究认为饮食中富含多不饱和脂肪酸(PUFAs)包括 $\alpha$ -亚麻酸、亚油酸、花生四烯酸等可以抑制脂肪在肝细胞聚积, 可能通过上调脂肪酸 $\beta$ -氧化、脂酰辅酶A氧化酶和中链酰基

辅酶A脱氢酶的基因表达, 下调SREBP-1c, 改善胰岛素抵抗等机制<sup>[20-21]</sup>, 且认为 $\alpha$ -亚麻酸的降脂作用强于 $\gamma$ -亚麻酸<sup>[21]</sup>。但也有实验证实t10, c12-共轭亚油酸可引起高胰岛素血症, 增加脂肪摄入和脂肪形成, 其机制可能与触发PPAR- $\gamma$ 产物异位、诱导SREBP-1c和脂肪酸合酶基因表达等有关<sup>[22]</sup>。本实验结果显示 $\omega$ -6/ $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的比值升高, 提示NASH时可能存在 $\omega$ -6/ $\omega$ -3代谢不平衡。 $\omega$ -3 PUFAs的母体是ALA, 在体内可以生成二十二碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)。 $\omega$ -6 PUFAs的母体是LA, 在体内生成 $\gamma$ -亚麻酸(GLA)和AA, 由于人体不能合成ALA和LA, 因此二者又被称为必须脂肪酸。这两族PUFAs在生物体内都发挥了很重要的作用,  $\omega$ -6: $\omega$ -3 PUFAs的平衡对维持机体代谢和功能是必须的<sup>[23-24]</sup>。Conklin *et al*<sup>[25]</sup>发现高水平 $\omega$ -6 PUFAs和低水平 $\omega$ -3 PUFAs跟抑郁症和神经过敏有关。两族PUFAs都需依赖环氧合酶和脂氧合酶生成各类具有生物活性的产物, 存在代谢竞争抑制, 且各种酶对 $\omega$ -3 PUFAs的亲合力更高。环氧合酶可促进AA和EPA转化为前列腺素、血栓素和前列环素, 脂氧合酶促进AA和EPA转化为白三烯等产物, 当体内 $\omega$ -3 PUFAs相对不足时,  $\omega$ -6 PUFAs(AA)就会产生过多的前列腺素发生炎症反应<sup>[24,26]</sup>。另外, Schmöcker *et al*<sup>[27]</sup>实验证实 $\omega$ -6: $\omega$ -3 PUFAs比值降低可以显著下调肝脏炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 和IL-6的表达, 从而减轻肝的炎症损伤。因此我们有理由认为理想的 $\omega$ -6: $\omega$ -3 PUFAs摄入和他们衍生的二十烷酸类(类花生酸)的作用是机体生物需要的,  $\omega$ -6: $\omega$ -3 PUFAs比率紊乱通过肝内的大量脂质的调整使脂肪肝的组织形态发生变化, 两族PUFAs比率失衡可能是NASH发生的重要原因。

我们的实验结果显示饱和脂肪酸中正十二烷酸降低。有文献报道2, 2-二氯-12-(4-氯苯基)正十二烷酸(K-111)是PPAR- $\alpha$ 显效剂, 可能通过抑制c-Jun氨基末端激酶/应激活化蛋白激酶(JNK/SAPK)途径或NF- $\kappa$ B亚基P65, 可以显著减少RAW2647细胞的IL-6和TNF- $\alpha$ 表达<sup>[28]</sup>。Schäfer *et al*研究表明K-111还有潜在增强胰岛素敏感性的作用<sup>[29-31]</sup>, 观察了K-111对有肥胖、前驱期糖尿病、高脂血症的猴的疗效, 结果发现其可以增强胰岛素的敏感性, 改善RI, 且比另一胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类的作用更强, 还有提高脂肪 $\beta$ -氧化, 降低体重和血脂等作用。因此机体可能是通过K-111促进PPAR $\alpha$ 的活性, 抵抗脂肪肝的发展, 而NASH病变大鼠与正常组大鼠比较体

内K-111明显降低, 使机体的保护力量下降, 这也可能是NASH发生的另一原因。

总之, NASH大鼠肝脏存在明显的脂肪酸谱变化, 肝细胞内各类脂肪酸聚积、 $\omega$ -6 :  $\omega$ -3 PUFAs比率失衡和正十二烷酸降低可能对脂肪肝炎症发生、肝损伤有重要作用。而进行饮食补充 $\omega$ -3 PUFAs或药物干预脂肪酸代谢将对NAFLD防治具有重要意义。

#### 4 参考文献

- Chitturi S, Farrell GC, George J. Non-alcoholic steatohepatitis in the Asia-Pacific region: future shock? *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 368-374
- Maier KP. Non-alcoholic steatohepatitis--a new epidemic. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2007; 96: 1857-1860
- Wang CL, Liang L, Fu JF, Zou CC, Hong F, Xue JZ, Lu JR, Wu XM. Effect of lifestyle intervention on non-alcoholic fatty liver disease in Chinese obese children. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1598-1602
- Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2714-2724
- Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca P, Arena A. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 293-303
- Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3540-3553
- 窦爱霞, 陆伦根. 胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1197-1102
- McClain CJ, Mokshagundam SP, Barve SS, Song Z, Hill DB, Chen T, Deaciuc I. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 2004; 34: 67-79
- 钟岚, 范建高, 王国良, 吴伟清, 姜军梅, 史祺. 非酒精性脂肪性肝炎动物模型的建立. *中华实用医学* 2000; 2: 3-6
- Qiu Y, Su M, Liu Y, Chen M, Gu J, Zhang J, Jia W. Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography-mass spectrometry based metabonomic profiling. *Anal Chim Acta* 2007; 583: 277-283
- van der Leij FR, Bloks VW, Grefhorst A, Hoekstra J, Gerding A, Kooi K, Gerbens F, te Meerman G, Kuipers F. Gene expression profiling in livers of mice after acute inhibition of beta-oxidation. *Genomics* 2007; 90: 680-689
- Wang H, Kouri G, Wollheim CB. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity. *J Cell Sci* 2005; 118: 3905-3915
- 艾正琳, 陈东风. SREBP-1c在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义. *第三军医大学学报* 2006; 28: 1063-1065
- Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P, McClain CJ. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 2007; 46: 823-830
- Yao D, Shi W, Gou Y, Zhou X, Yee Aw T, Zhou Y, Liu Z. Fatty acid-mediated intracellular iron translocation: a synergistic mechanism of oxidative injury. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1385-1398
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40: 185-194
- Barreyro FJ, Kobayashi S, Bronk SF, Werneburg NW, Malhi H, Gores GJ. Transcriptional regulation of Bim by FoxO3A mediates hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 27141-27154
- Malhi H, Barreyro FJ, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut* 2007; 56: 1124-1131
- Rioux V, Catheline D, Bouriel M, Legrand P. Dietary myristic acid at physiologically relevant levels increases the tissue content of C20:5 n-3 and C20:3 n-6 in the rat. *Reprod Nutr Dev* 2005; 45: 599-612
- Murase T, Aoki M, Tokimitsu I. Supplementation with alpha-linolenic acid-rich diacylglycerol suppresses fatty liver formation accompanied by an up-regulation of beta-oxidation in Zucker fatty rats. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1733: 224-231
- Buang Y, Cha JY, Nagao K, Wang YM, Inoue N, Yanagita T. Alleviation of fatty liver by alpha-linolenic acid. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2004; 50: 272-276
- Clément L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guerre-Millo M, Krief S, Staels B, Besnard P. Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 2002; 43: 1400-1409
- El-Badry AM, Graf R, Clavien PA. Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver? *J Hepatol* 2007; 47: 718-725
- Dobryniewski J, Szajda SD, Waszkiewicz N, Zwierz K. Biology of essential fatty acids (EFA). *Przegl Lek* 2007; 64: 91-99
- Conklin SM, Manuck SB, Yao JK, Flory JD, Hibbeln JR, Muldoon MF. High omega-6 and low omega-3 fatty acids are associated with depressive symptoms and neuroticism. *Psychosom Med* 2007; 69: 932-934
- Das UN. Biological significance of essential fatty acids. *J Assoc Physicians India* 2006; 54: 309-319
- Schmöcker C, Weylandt KH, Kahlke L, Wang J, Lobeck H, Tiegs G, Berg T, Kang JX. Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology* 2007; 45: 864-869
- Murakami K, Bujo H, Unoki H, Saito Y. Effect of PPARalpha activation of macrophages on the secretion of inflammatory cytokines in cultured adipocytes. *Eur J Pharmacol* 2007; 561: 206-213
- Schäfer SA, Hansen BC, Völkl A, Fahimi HD, Pill J. Biochemical and morphological effects of K-111, a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activator, in non-human primates. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 239-251
- Bodkin NL, Pill J, Meyer K, Hansen BC. The effects of K-111, a new insulin-sensitizer, on metabolic syndrome in obese prediabetic rhesus monkeys. *Horm Metab Res* 2003; 35: 617-624
- Drew BG, Calkin AC. Drug evaluation: K-111, an insulin-sensitizing peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *Curr Opin Investig Drugs* 2007; 8: 324-330

#### ■同行评价

本研究方法、技术有一定特色, 结果较明确, 实验证据充足, 讨论条理分明, 有系统的理论分析和有价值的科学结论, 能较好地反映我国肝病学基础研究的先进水平。

# 鼠特异性Fas抗体对人鼠嵌合肝中人肝细胞增殖的促进作用

蒋黎, 李俊刚, 兰林, 王宇明, 刘国栋

## ■背景资料

人肝细胞移植到鼠体内能够长时间存活并保持功能, 是能够运用人鼠嵌合肝作为理想动物模型的首要条件。要使移植肝细胞大量增殖, 需赋予移植肝细胞更强的生长或生存优势, 和/或受体肝细胞增殖受到抑制。本文运用Fas受体激动剂JO2抗体能特异性诱导小鼠肝细胞凋亡的特性, 诱导鼠肝细胞逐步凋亡, 削弱其对植入的人肝细胞的竞争性抑制作用, 并让出生长空间, 同时也造成小鼠对肝细胞的再生需求, 使人肝细胞在JO2处理的人鼠嵌合肝中存活达20 wk。

## ■同行评议者

朱传武, 副主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科; 赵桂鸣, 主任医师, 天津市肝病研究所天津市传染病医院慢性肝炎科

蒋黎, 李俊刚, 兰林, 王宇明, 刘国栋, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038  
蒋黎, 硕士, 主治医师, 主要从事肝炎发病机制和病毒性肝炎动物模型的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30470882

作者贡献分布: 此课题由兰林设计; 研究过程由兰林与王宇明指导; 研究所用试剂由兰林提供; 动物模型操作由蒋黎, 李俊刚及刘国栋完成; 标本检测、数据分析及论文写作由蒋黎完成。

通讯作者: 兰林, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所。  
lilin6624@hotmail.com

电话: 023-68754289 传真: 023-68754475

收稿日期: 2008-01-12 修回日期: 2008-04-07

## Repopulation of human fetal hepatocytes in nude mouse model with chimeric human liver using mouse-specific anti-Fas antibody

Li Jiang, Jun-Gang Li, Lin Lan, Yu-Ming Wang, Guo-Dong Liu

Li Jiang, Jun-Gang Li, Lin Lan, Yu-Ming Wang, Guo-Dong Liu, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30470882

Correspondence to: Lin Lan, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, 30 Gaotanyan Center Street, Shapingba District, Chongqing 400038, China. lilin6624@hotmail.com

Received: 2008-01-12 Revised: 2008-04-07

## Abstract

**AIM:** To investigate repopulation of human fetal hepatocytes in an animal model of nude mice with chimeric human liver following induction of mouse hepatocyte apoptosis using a mouse-specific anti-Fas monoclonal antibody (Jo2 mAb) that does not engage xenogeneic fas.

**METHODS:** For experiment group, nude mice were transplanted with human fetal hepatocytes intrasplenically and treated with 0.2 mg/kg Jo2 mAb intraperitoneally once a week for 12 weeks consistently. Nude mice in the control group were transplanted with human fetal hepatocytes but not administrated with Jo2 mAb. Liver section from non-transplanted nude mice adminis-

tered with Jo2 mAb were analyzed using hematoxylin and eosin staining and terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and S-P immunohistochemistry were used to detect human albumin mRNA, human albumin and specific proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in chimeric liver tissues.

**RESULTS:** Liver sections from non-transplanted nude mice administered with Jo2 mAb showed hepatocyte death, massive apoptosis and hemorrhage. Nude mice in both experiment group and control group survived 24 weeks after transplantation. Human albumin and specific human PCNA were detected from the week 2 to week 20 after transplantation, but they could only be detected from the week 2 to week 12 in the controls. Human albumin mRNA (356 bp) was detected in mice livers from the week 4 to week 16 after transplantation, but they could only be detected from the week 4 to week 8 in the controls. The number of PCNA in experiment group is significantly higher than in the control group at 8, 12 wk ( $25.7\% \pm 8.5\%$  vs  $13.4\% \pm 7.8\%$ ,  $29.4\% \pm 5.0\%$  vs  $8.5\% \pm 2.3\%$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Human fetal hepatocytes of xenogeneic graft can survive in nude mice. The repopulation of human fetal hepatocytes can be promoted and prolonged in nude mouse model with chimeric human liver using mouse-specific anti-Fas antibody intraperitoneally.

**Key Words:** Anti-Fas antibody; Human hepatocytes; Transplantation; Nude mouse model with chimeric human livers; Repopulation

Jiang L, Li JG, Lan L, Wang YM, Liu GD. Repopulation of human fetal hepatocytes in nude mouse model with chimeric human liver using mouse-specific anti-Fas antibody. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1734-1740

## 摘要

**目的:** 探讨人胎肝细胞移植联合使用JO2抗体的策略, 促进人胎肝细胞在小鼠肝内存活和增殖。

**方法:** 裸鼠经脾移植 $1 \times 10^6$ 人胎肝细胞, 移植后第1天ip JO2抗体, 剂量为0.2 mg/kg, 1次/wk, 持续12 wk为实验组, 裸鼠经人胎肝细胞移植后未给予JO2抗体为对照组, 建立人鼠嵌合肝动物模型. 采用HE染色、原位末端标记方法(TUNEL染色)观察未经人胎肝细胞移植而给予JO2抗体24 h后处死的裸鼠肝脏组织. 免疫组化、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测不同时相点实验组和对照组嵌合肝中肝组织人白蛋白、特异人增殖细胞核抗原(PCNA)和人白蛋白mRNA表达.

**结果:** 未经人胎肝细胞移植而给予JO2抗体的裸鼠病理组织切片发现肝组织出血、坏死和细胞凋亡. 实验组和对照组裸鼠均能存活至24 wk. 移植后嵌合鼠肝组织表达人白蛋白和人PCNA阳性细胞的时间: 实验组2-20 wk, 对照组2-12 wk; 白蛋白mRNA表达: 实验组4-16 wk, 对照组4-8 wk; 实验组与对照组移植后8、12 wk PCNA表达差异有显著性( $25.7\% \pm 8.5\%$  vs  $13.4\% \pm 7.8\%$ ,  $29.4\% \pm 5.0\%$  vs  $8.5\% \pm 2.3\%$ , 均 $P < 0.05$ ).

**结论:** 人肝细胞异种移植于裸鼠体内能够存活, 经小剂量JO2抗体ip裸鼠, 使人鼠嵌合肝中人肝细胞得以增殖, 存活时间延长.

**关键词:** Fas抗体; 人肝细胞; 移植; 人鼠嵌合肝; 增殖

蒋黎, 李俊刚, 兰林, 王宇明, 刘国栋. 鼠特异性Fas抗体对人鼠嵌合肝中人肝细胞增殖的促进作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1734-1740

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1734.asp>

## 0 引言

将异种肝组织移植于小鼠体内可用于研究遗传毒性<sup>[1]</sup>、基因治疗<sup>[2]</sup>、肝再生<sup>[3]</sup>以及肝炎病毒的感染<sup>[4-6]</sup>, 而将人肝细胞定植到鼠的肝脏构建“人鼠嵌合肝”动物模型, 不但解决肝炎病毒感染的种属特异性问题, 而且可用于已知和未知病毒感染的研究, 为病毒性肝炎及相关领域提供一种强有力的工具. 不过, 移植于鼠体内的人肝细胞能够长时间存活并保持功能是需要运用人鼠嵌合肝作为理想动物模型的首要条件. 要想使肝细胞在移植后大量增殖, 需赋予移植肝细胞更强的生长或生存优势, 和/或受体肝细胞增殖受到抑制<sup>[7-9]</sup>. Fas是一种细胞表面信号分子, 属于肿瘤坏死因子受体超家族成员<sup>[10]</sup>. 当与Fas配体或特异性抗体(如JO2)结合后, Fas启动细胞凋亡<sup>[11]</sup>. JO2是从仓鼠体内衍生而制的针对

鼠特异性致凋亡的抗体<sup>[12-14]</sup>, 且具有明显的嗜肝性, 肝细胞对JO2抗体所诱导的细胞凋亡非常敏感, 给小鼠注射小剂量的JO2不会引起肝外组织器官明显损伤, 却可造成肝细胞大面积的凋亡, 引起动物出现爆发性肝衰竭症状和死亡<sup>[15-16]</sup>. 因此, 采用小剂量JO2抗体多次注射裸鼠腹腔内, 诱导鼠肝细胞损伤, 使移植到裸鼠的人胎肝细胞具有增殖优势, 这种方便易行的利于异种细胞移植的方法国内尚无报道, 为建立人鼠嵌合肝探索一种新的策略.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** BALB/C-nu/nu的 $\delta$ 无胸腺裸鼠65只购自北京实验动物中心, 本校实验室SPF级动物房饲养. 选择鼠龄6 wk, 体质量15-20 g为实验对象.

### 1.2 方法

**1.2.1 人胎肝细胞移植:** 经西南医院伦理委员会同意, 并由产妇签署知情同意书. 选择孕期20 wk死胎. 采用体外两步灌注法<sup>[17]</sup>分离人胎肝细胞, 并用液氮罐保存以备. 试验时取出冻存的人胎肝细胞, 移入离心管, 缓慢加入4℃培养液等倍稀释, 30 r/min离心3 min, 弃上清液, 重复2次; 重新混悬于培养液中. 于倒置相差显微镜(日本Olympus公司)下用血细胞计数板计算肝细胞的数量, 台盼蓝拒染法计算胎肝细胞的存活率, 超过80%的用于实验(其中90%为胎肝实质细胞). 戊巴比妥钠肌注麻醉, 小鼠腹白线逐层剪开, 暴露脾, 自脾系膜缘进针, 向脾体和脾尾方向, 将100  $\mu$ L人胎肝细胞培养液(含 $1 \times 10^6$ 个细胞)缓慢注入, 轻压注射点, 退针处用吸收性海绵明胶止血.

**1.2.2 JO2抗体给药方式和标本采集:** 30只经人胎肝细胞移植的裸鼠于第2天, 给予JO2抗体(BD, pharmingen)ip, 剂量为0.2 mg/kg, 1次/wk, 共12 wk为实验组; 30只经人胎肝细胞移植后未ip JO2抗体为对照组; 5只裸鼠未经人胎肝细胞移植而用JO2抗体, 0.2 mg/kg, ip后24 h处死肝组织病理切片观察. 实验组和对照组从2 wk开始, 后4、8、12、16、20、24 wk各处死4只小鼠, 进行组织学观察.

**1.2.3 JO2抗体: ip后肝组织HE染色和原位末端标记方法检测细胞凋亡(TUNEL染色):** 40 g/L多聚甲醛固定肝组织, 经石蜡包埋、切片, 苏木精和伊红染色(HE染色), 光镜下常规病理检查. 按照TUNEL试剂盒(Roche)说明书操作, 最后常规DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封固可在显微镜下观察细胞核中棕黄着色的凋亡细胞.

## ■ 相关报道

Wilson *et al* 将大鼠肝细胞移植到小鼠体内, 经JO2抗体重复诱导, 可使大鼠肝细胞重构小鼠肝脏超过50%.



## ■创新盘点

本文建立人鼠嵌合肝模型,着重探讨诱导受体小鼠肝损伤而使移植的人肝细胞得以增殖和存活的可行性,以期获得建立该实验动物模型较为理想的方法和途径。

表 1 肝移植小鼠肝组织人PCNA的表达变化 (mean  $\pm$  SD, %)

分组	人肝细胞移植后PCNA(wk)						
	2	4	8	12	16	20	24
实验组	18.3 $\pm$ 1.2	20.6 $\pm$ 4.9	25.7 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	29.4 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	24.1 $\pm$ 3.6	19.2 $\pm$ 8.1	0
对照组	14.6 $\pm$ 9.4	15.4 $\pm$ 2.7	13.4 $\pm$ 7.8	8.5 $\pm$ 2.3	0	0	0

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同时对照组。

1.2.4 免疫组织化学检测嵌合鼠肝组织人白蛋白(albumin, ALB)表达: 采用链酶菌亲生物素蛋白-过氧化酶法免疫组织化学染色(S-P试剂盒, Maixin公司), 获取新鲜鼠肝组织用40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋后切片, 常规脱蜡、洗涤、过氧化氢阻断10 min. 加鼠抗人ALB mAb为一抗(Sigma公司, 滴度1:200)4℃过夜. PBS替代一抗作阴性对照. 然后滴加生物素标记二抗, 底物用DAB. 最后以苏木精复染, 中性树胶封片, 光镜下观察染色情况。

1.2.5 免疫组织化学检测嵌合鼠肝组织特异人增殖细胞核抗原(PCNA)表达: 采用S-P法染色, 方法同上, 一抗为特异性人增殖细胞核抗原mAb(DAKO公司, 滴度1:100), 光镜观察结果. PCNA以细胞核呈界限清楚的棕色反应为阳性结果判定标准. 每张切片随机选取5个高倍视野, 半定量计算每个高倍视野下100个细胞内的阳性细胞数, 取均值, 以百分数表示细胞增殖指数。

1.2.6 RT-PCR检测肝组织人ALB mRNA: 按照Tripure RNA提取试剂(Roche公司)操作说明抽提大鼠肝组织总RNA, 采用Promega一步法RT-PCR试剂盒(Promega公司)进行逆转录扩增. 引物由上海Sangon公司合成. 人ALB mRNA引物, 正向引物Hs: 5'-GTAATCGGTTGGCAGCCAATG-3', 逆向引物Ha: 5'-GGTAGAAGTGATTGTCA C-3', 扩增目的片断为358 bp<sup>[18]</sup>. 扩增引物序列经Pub-Med上比对与小鼠未发现同源性. PCR扩增条件: 48℃逆转录45 min, 95℃变性2 min, 而后94℃变性1 min; 55℃退火1 min; 72℃延伸1 min; 共35个循环, 最后72℃延伸10 min. 采用未加入AMV反转录酶的扩增作为阴性对照以排除假阳性的可能. 产物经150 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于凝胶成像仪上获取图像。

**统计学处理** SPSS统计软件包对实验结果进行统计分析. 检测指标以mean  $\pm$  SD表示, 各时间点两组间比较采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

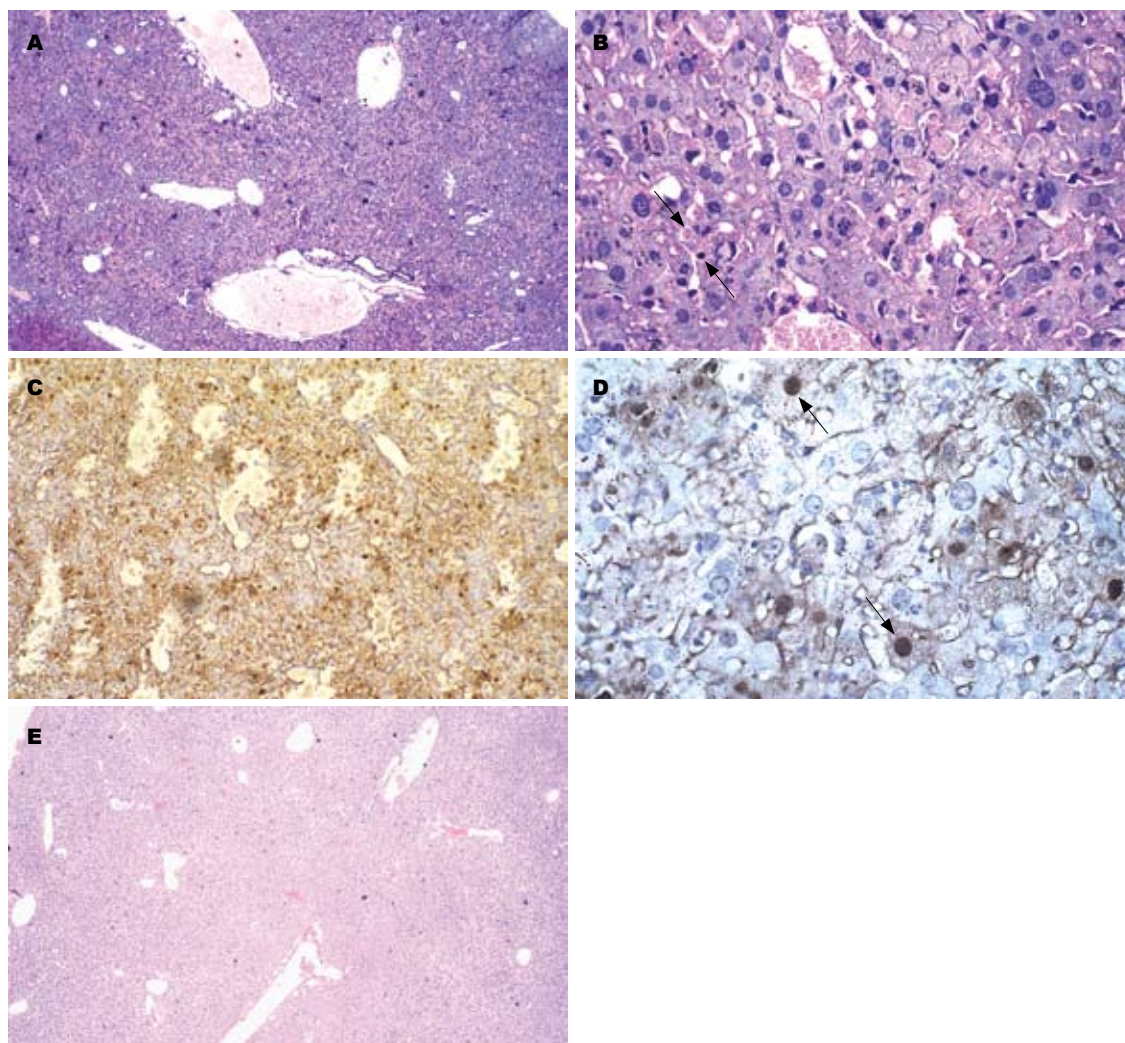
## 2 结果

2.1 JO2抗体ip后肝组织HE染色和TUNEL染色 裸鼠未经人胎肝细胞移植而用JO2抗体ip后, 出现不同程度的懒动、倦怠、厌食, 24 h后处死. 取肝组织HE染色显示肝脏汇管区单核细胞浸润, 肝细胞点、灶状坏死灶, 并可见中央小静脉、肝窦和叶间静脉扩张, 出血, 肝细胞结构模糊, 有凋亡小体及弥漫性炎细胞浸润. TUNEL染色可见观察组肝组织大量细胞核被棕黄色深染的凋亡细胞(图1A-D). 而实验组和对照组小鼠外观、活动无异常, 存活超过24 wk. 实验组经JO2抗体4 wk处理, HE染色显示肝组织只见少量充血, 管腔无明显扩张, 肝组织结构完整, 无明显坏死灶(图1E)。

2.2 免疫组化检测嵌合鼠肝组织中ALB 移植后2 wk处死的实验组和对照组鼠肝组织中即能检测到ALB阳性细胞的表达, 主要位于肝细胞的胞质中, 呈棕黄色. 不过, 实验组鼠肝组织人ALB的表达可持续到移植后20 wk, 高峰期出现在12 wk, 而未用JO2抗体处理的对照组鼠肝组织人ALB的表达只持续到12 wk, 高峰期出现在4 wk. 比较实验组和对照组移植后8 wk的病理切片, 可见前者人ALB的阳性细胞表达明显多于后者(图2)。

2.3 免疫组化检测嵌合鼠肝组织中特异性人PCNA 特异性人PCNA阳性细胞核经DAB显色后为棕色. 移植后2 wk处死的实验组和对照组鼠肝组织中即能检测到特异性人PCNA阳性细胞的表达. 实验组阳性细胞表达可持续到移植后20 wk, 12 wk表达最多, 而未用JO2抗体处理的对照组鼠肝组织只持续到12 wk, 4 wk表达最多(图3). 实验组与对照组移植后8、12 wk PCNA表达差异有显著性( $P < 0.05$ , 表1)。

2.4 RT-PCR检测肝组织人ALB mRNA 移植后4 wk实验组和对照组肝组织中即可检测到ALB mRNA, 实验组持续到16 wk, 而对照组仅持续到8 wk. 采用人ALB mRNA引物作RT-PCR时, 可在



#### ■应用要点

人胎肝细胞移植及联合使用JO2抗体,能延长人胎肝细胞在人鼠嵌合肝中的存活时间,提高增殖能力,有望获得稳定的持续性的动物模型。

图1 JO2抗体ip后肝组织HE和TUNEL染色. A-D: 未经人胎肝细胞移植而用JO2抗体ip 24 h后处死的裸鼠肝组织. A: 肝组织出血、坏死(HE  $\times 40$ ); B: 黑色箭头为凋亡细胞 (HE  $\times 200$ ); C: 裸鼠肝组织(TUNEL  $\times 40$ ); D: 黑色箭头为凋亡细胞(TUNEL  $\times 200$ ). E: 实验组移植后4 wk肝组织. 只见肝组织结构完整, 管腔无明显扩张, 少量充血, 无明显坏死灶(HE  $\times 40$ ).

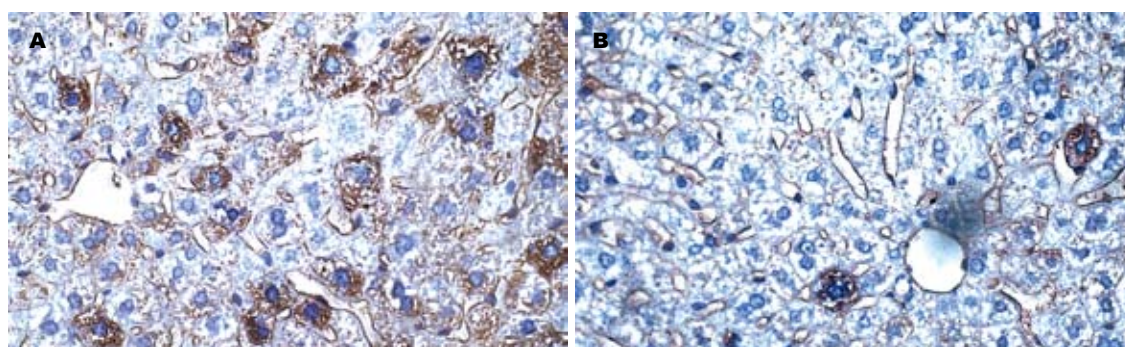


图2 免疫组化检测人肝细胞移植后8 wk嵌合鼠肝组织人ALB的表达(S-P  $\times 200$ ). A: 实验组; B: 对照组..

嵌合鼠肝组织中检测到相应的人ALB mRNA条带(图4).

### 3 讨论

将人肝细胞移植到动物体内, 形成“嵌合肝”, 甚至在动物体内重建人类肝组织, 以期获得理想

的实验动物模型, 是当前肝病研究的一个重要方向. 对啮齿类动物的研究表明, 外源肝细胞移植到动物体内定植的基本条件有: 一是对外源肝细胞无免疫排斥; 二是必须削弱原有“土著”肝细胞对外源肝细胞生长的抑制作用; 三是需出现肝实质损害, 造成肝再生需



### ■同行评价

本研究设计合理,方法得当,结果较为理想,讨论充分,有望为人类嗜肝病毒的研究提供简便的“人鼠嵌合肝”动模模型,具有现实意义。

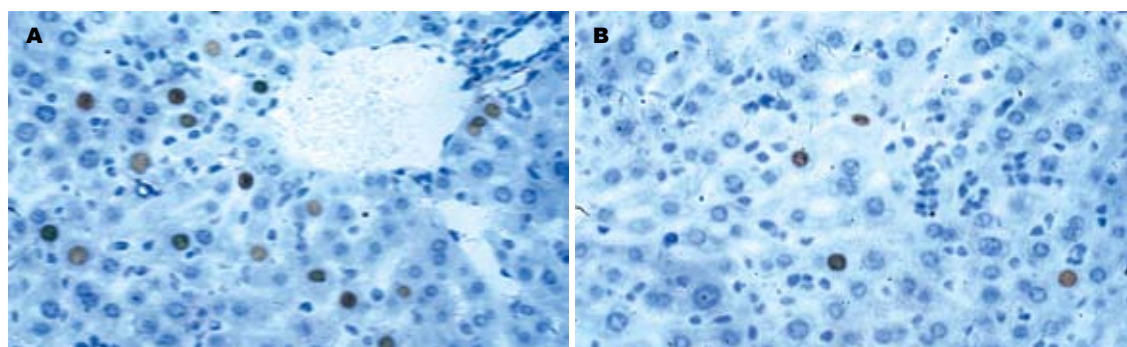


图3 免疫组化检测人肝细胞移植后8wk鼠肝组织人PCNA的表达(S-P×400). A: 实验组; B: 对照组.

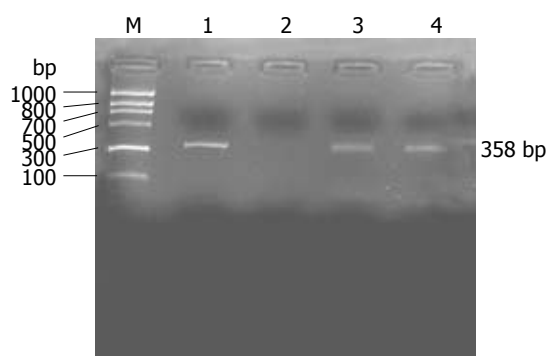


图4 RT-PCR检测肝组织人ALB mRNA. M: marker; 1: 正常人肝组织; 2: 正常小鼠肝组织; 3: 观察组移植后4 wk肝组织; 4: 实验组移植后4 wk肝组织.

求. 为解决免疫排斥的问题, 各国研究者多使用免疫缺陷小鼠, 如裸鼠(nu/nu)、RAG-2基因敲除小鼠(recombinase activating 2 gene, RAG-2)、SCID(severe combined immunodeficiency)小鼠以及为解决原有“土著”鼠肝细胞对进入的外源肝细胞增殖的竞争性抑制问题及造成肝再生需求, 采用的白蛋白-尿激酶型血浆原激活剂转基因小鼠(albumin urokinase-type plasminogen activator, Alb-uPA)<sup>[19-21]</sup>. 同时, 如何使移植的细胞具有增殖优势对于人鼠嵌合肝的建立也意义重大: 在某些刺激增殖的信号存在时, 仅移植的细胞作出反应而受体肝细胞则不, 如生物碱(具有致癌性)<sup>[22]</sup>, 可使受体肝细胞对刺激增殖信号变得无应答; 还可以人为地产生一些刺激增殖的信号, 能使移植的细胞优势生长, 如在移植前对受体进行部分肝切除、再灌注损伤、诱导Fas介导的肝细胞凋亡等(均属于造成肝细胞损伤)和给与肝细胞有丝分裂刺激物(生长因子和甲状腺激素等)<sup>[23-25]</sup>.

研究表明, 胎肝细胞有较高增殖能力、较低免疫原性和抵抗低温储存损伤等优点, 且易于操作、可重复性强是细胞移植的理想选择<sup>[26]</sup>. 人

肝细胞可嵌入大/小鼠肝实质内, 形成“人鼠嵌合肝”, 嵌入的人肝细胞形态及功能类似于人体内肝细胞, 并可成功感染HBV及HCV等人类嗜肝病毒<sup>[27-28]</sup>. 不过人胎肝细胞增殖能力虽然比成熟机体肝细胞要强些, 但他毕竟是一种正常细胞, 而且受宿主体内环境的影响, 不可能无限增殖下去. 裸鼠虽缺乏有功能的T淋巴细胞, 但仍有一定的自然杀伤细胞, 在我们未采取措施时, 对照组经脾移植人肝细胞在裸鼠体内能够存活, 人胎肝细胞分布稀疏, 数量较少, 嵌合鼠肝组织表达人ALB和人PCNA阳性细胞时间为2-12 wk, 检测到肝组织人ALB mRNA表达仅为4-8 wk. 人肝细胞存活时间短, 提示机体对肝细胞增殖的需求可能不足.

我们结合JO2抗体诱导受体小鼠肝细胞凋亡损伤的策略, 经人胎肝细胞脾脏移植裸鼠, 采用免疫组化发现实验组移植后2-20 wk肝组织均表达人ALB和PCNA阳性细胞, RT-PCR检测到鼠肝组织人ALB mRNA的时间为移植后4-16 wk. 肝脏是人体ALB唯一的合成器官, 蛋白质的合成是个复杂的耗能过程, 包括氨基酸的跨膜转运、多肽链的合成等. 因此, ALB的检测可代表肝脏的合成和储备功能. 实验组和对照组中人ALB的检测能够直观说明人肝细胞在小鼠肝组织中不仅存活, 而且具有正常人肝细胞一定的生物学功能. PCNA是一种与细胞周期相关的增殖细胞核抗原, 常用来评估细胞的增殖活跃程度, 他由261个氨基酸组成, 分子质量为36 kDa, 仅着色于核浆中. 静止细胞中PCNA含量很少, 其表达的多少与DNA复制和修复有关. 本研究中, 实验组和对照组均在人肝细胞移植后2 wk发现PCNA表达, 不过实验组PCNA的表达在不同时相点均高于对照组, 肝细胞PCNA标记指数的差异有统计学意义, 且表达时间明显延长, 提示JO2诱导小鼠肝细胞凋亡损伤给移植植物生长提

供了空间, 引发了移植人胎肝细胞持续增殖、再生的需求, 而人胎肝细胞在受体肝损伤状态下, 更有益于自身的定植生长、分化和存活。

另外, 我们用JO2抗体ip未移植人肝细胞的裸鼠, 24 h后获取病理组织切片发现鼠肝组织的严重出血、坏死损伤和细胞凋亡, 证实JO2抗体致小鼠肝细胞凋亡特性。Fas抗原在心、肺也有大量表达<sup>[29]</sup>, 然而在我们试验中并未发现小剂量的JO2反复注射足够引发肝外组织的凋亡, 即使JO2抗体的使用达12 wk之久, 与文献报道一致<sup>[30]</sup>。

Fas是重要的诱导凋亡的受体, 肝脏的许多细胞表达Fas, 小剂量JO2抗体特异性诱导体内小鼠肝细胞凋亡这种特性在小鼠作为肝移植受体的同种或异种基因移植中有重要的作用<sup>[31]</sup>。Gilgenkrantz *et al*巧妙的把Fas和抗Fas诱导凋亡的Bcl-2基因同应用于异源肝细胞移植: 首先使用逆转录病毒载体将Bcl-2基因转入异源鼠肝细胞中, 然后经过脾内注射途径植入正常的小鼠肝内, 接着用亚致死量的JO2抗体iv, 1次/wk, 重复诱导10次, 并辅以一定量的免疫抑制剂<sup>[32-34]</sup>。这一方法的原理是用Bcl-2赋予异源肝细胞抗凋亡的生存优势, 用亚致死剂量的JO2抗体逐步地凋亡不具有抗凋亡能力的原有“土著”鼠肝细胞, 一方面削弱了其对异源肝细胞的竞争性抑制作用, 并让出生长空间。另一方面机体在失去大量原有肝细胞后产生了强烈的再生要求。在这些多因素的共同作用下, 转基因异源肝细胞得以增殖而成为嵌合肝脏的主体细胞。此外, Wilson *et al*将大鼠肝细胞移植到小鼠体内过程中, 经JO2抗体重复诱导, 使大鼠肝细胞重构小鼠肝脏超过50%<sup>[23]</sup>。这种诱导小鼠肝细胞Fas凋亡特性提高移植在嵌合肝中比例的实际效能, 在异体肝细胞移植中发挥着重要作用, 可为相关研究提供一种可靠、价廉、易用的动物模型。

#### 4 参考文献

- Kemper RA, Nabb DL, Gannon SA, Snow TA, Api AM. Comparative metabolism of geranyl nitrile and citronellyl nitrile in mouse, rat, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 1019-1029
- Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med* 2001; 79: 617-630
- Jirtle RL, Michalopoulos G, McLain JR, Crowley J. Transplantation system for determining the clonogenic survival of parenchymal hepatocytes exposed to ionizing radiation. *Cancer Res* 1981; 41: 3512-3518
- Petersen J, Dandri M, Gupta S, Rogler CE. Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 310-315
- Dandri M, Burda MR, Gocht A, Török E, Pollok JM, Rogler CE, Will H, Petersen J. Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology* 2001; 34: 824-833
- Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001; 7: 927-933
- Grompe M. Principles of therapeutic liver repopulation. *J Inher Metab Dis* 2006; 29: 421-425
- Brezillon N, Lambert-Blot M, Morosan S, Couton D, Mitchell C, Kremsdorf D, Costa RH, Gilgenkrantz H, Guidotti JE. Transplanted hepatocytes overexpressing FoxM1B efficiently repopulate chronically injured mouse liver independent of donor age. *Mol Ther* 2007; 15: 1710-1715
- Masumoto N, Tateno C, Tachibana A, Utoh R, Morikawa Y, Shimada T, Momisako H, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K. GH enhances proliferation of human hepatocytes grafted into immunodeficient mice with damaged liver. *J Endocrinol* 2007; 194: 529-537
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456
- Huang DC, Hahne M, Schroeter M, Frei K, Fontana A, Villunger A, Newton K, Tschopp J, Strasser A. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 14871-14876
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43: S31-S44
- Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1756-1760
- Zhang H, Taylor J, Luther D, Johnston J, Murray S, Wyatt JR, Watt AT, Koo S, York-DeFalco C, Stecker K, Dean NM. Antisense oligonucleotide inhibition of Bcl-xL and Bid expression in liver regulates responses in a mouse model of Fas-induced fulminant hepatitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 24-33
- Yonehara S. Death receptor Fas and autoimmune disease: from the original generation to therapeutic application of agonistic anti-Fas monoclonal antibody. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 393-402
- Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992; 24: 3052-3053
- Karligiotou E, Kollia P, Kallitsaris A, Messinis IE. Expression of human serum albumin (HSA) mRNA in human granulosa cells: potential correlation of the 95 amino acid long carboxyl terminal of HSA to gonadotrophin surge-attenuating factor. *Hum*



- Reprod* 2006; 21: 645-650
- 19 Dandri M, Burda MR, Török E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, Petersen J. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 2001; 33: 981-988
  - 20 Nicolini FE, Cashman JD, Hogge DE, Humphries RK, Eaves CJ. NOD/SCID mice engineered to express human IL-3, GM-CSF and Steel factor constitutively mobilize engrafted human progenitors and compromise human stem cell regeneration. *Leukemia* 2004; 18: 341-347
  - 21 Turrini P, Sasso R, Germoni S, Marcucci I, Celluci A, Di Marco A, Marra E, Paonessa G, Eutropi A, Laufer R, Migliaccio G, Padron J. Development of humanized mice for the study of hepatitis C virus infection. *Transplant Proc* 2006; 38: 1181-1184
  - 22 Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM. Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant* 2005; 14: 31-40
  - 23 Wilson JH, Paturzo FX, Johnson LK, Carreiro MP, Hixson DC, Mennone A, Boyer JL, Pober JS, Harding MJ. Rat hepatocyte engraftment in severe combined immunodeficient x beige mice using mouse-specific anti-fas antibody. *Xenotransplantation* 2006; 13: 53-62
  - 24 Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, Kakizaki S, Sato K, Watanabe Y, Mori M. Transforming growth factor- $\alpha$  accelerates hepatocyte repopulation after hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 260-266
  - 25 Oren R, Dabeva MD, Karnezis AN, Petkov PM, Rosencrantz R, Sandhu JP, Moss SF, Wang S, Hurston E, Laconi E, Holt PR, Thung SN, Zhu L, Shafritz DA. Role of thyroid hormone in stimulating liver repopulation in the rat by transplanted hepatocytes. *Hepatology* 1999; 30: 903-913
  - 26 Kulig KM, Vacanti JP. Hepatic tissue engineering. *Transpl Immunol* 2004; 12: 303-310
  - 27 Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tateno C, Yoshizato K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005; 42: 1046-1054
  - 28 Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett* 2007; 581: 1983-1987
  - 29 Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; 148: 1274-1279
  - 30 Jodo S, Kung JT, Xiao S, Chan DV, Kobayashi S, Tateno M, Lafyatis R, Ju ST. Anti-CD95-induced lethality requires radioresistant Fc $\gamma$ RII+ cells. A novel mechanism for fulminant hepatic failure. *J Biol Chem* 2003; 278: 7553-7557
  - 31 Faouzi S, Burckhardt BE, Hanson JC, Campe CB, Schrum LW, Rippe RA, Maher JJ. Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF- $\kappa$ B-independent, caspase-3-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 49077-49082
  - 32 Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998; 4: 1185-1188
  - 33 Mitchell C, Mallet VO, Guidotti JE, Goulenok C, Kahn A, Gilgenkrantz H. Liver repopulation by Bcl-x(L) transgenic hepatocytes. *Am J Pathol* 2002; 160: 31-35
  - 34 Guidotti JE, Mallet VO, Mitchell C, Fabre M, Schoevaert D, Opolon P, Parlier D, Lambert M, Kahn A, Gilgenkrantz H. Selection of in vivo retrovirally transduced hepatocytes leads to efficient and predictable mouse liver repopulation. *FASEB J* 2001; 15: 1849-1851

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志作者署名要求

**本刊讯** 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。(常务副总编辑: 张海宁 2008-06-08)

## 5-杂氮-2'-脱氧胞苷诱导裸鼠HepG2种植瘤细胞T-cadherin的表达及其对种植瘤的抑制作用

梁治坤, 黄志勇, 陈孝平, 刘 聪, 吴在德

梁治坤, 黄志勇, 陈孝平, 吴在德, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心 湖北省武汉市 430030

刘聪, 华中科技大学同济医学院附属同济医院病理科 湖北省武汉市 430030

梁治坤, 2005级华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科硕士, 主要从事肝癌治疗的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471694

教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目, No. NCET-04-0701

作者贡献分布: 此课题由黄志勇与陈孝平设计; 研究过程由梁治坤与刘聪完成; 吴在德指导; 数据分析与论文写作由梁治坤完成。

通讯作者: 黄志勇, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心. zyhuang@medmail.com.cn

电话: 027-83663871 传真: 027-83803209

收稿日期: 2008-01-27 修回日期: 2008-03-30

### 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced T-cadherin expression in HepG2-derived tumors and its inhibitory effects on tumor growth in nude mice

Zhi-Kun Liang, Zhi-Yong Huang, Xiao-Ping Chen, Cong Liu, Zai-De Wu

Zhi-Kun Liang, Zhi-Yong Huang, Xiao-Ping Chen, Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Cong Liu, Department of Pathology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471694; and the New Century Excellent Talent Foundation from Ministry of Education, No. NCET-04-0701

Correspondence to: Zhi-Yong Huang, Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. zyhuang@medmail.com.cn

Received: 2008-01-27 Revised: 2008-03-30

### Abstract

**AIM:** To observe 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR)-induced T-cadherin gene expression in HepG2 cells and to determine its inhibitory effects on proliferation of HepG2-derived tumor cells in nude mice.

**METHODS:** The HepG2-derived tumor model

in nude mice was established by subcutaneous inoculation. Twenty-one Nude mice were randomly divided into two groups: the experiment group ( $n = 11$ ) and control group ( $n = 10$ ). Experiment group nude mice were intraperitoneally injected with 5-Aza-CdR while control group nude mice were only given equivalent volume of PBS. The mice were killed at week 4. Tumor growth in nude mice was observed, and the T-cadherin mRNA and protein expressions of the tumors were detected using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry.

**RESULTS:** At the end of the fourth week, the T-cadherin mRNA expression in the tumors of the experiment group was significantly higher than that the control group ( $t = 6.613$ ,  $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry further showed that the protein expression of T-cadherin was almost not detected in the HepG2-derived tumor cells of the control group while the T-cadherin expression was detected on the membranes of the HepG2-derived tumor cells of the experiment group. After 4 weeks' treatment with 5-Aza-CdR, the average volume of HepG2-derived tumors in the experiment group was significantly smaller than that in the control group ( $t = 2.337$ ,  $P = 0.025$ ).

**CONCLUSION:** 5-Aza-CdR induces HepG2 cells to re-express T-cadherin and inhibits growth of HepG2-derived tumors in nude mice. Its mechanism may be that demethylation of the methylated T-cadherin promoter induced by 5-Aza-CdR restores T-cadherin reexpression and thus inhibits the growth of the HepG2-derived tumors in nude mice.

**Key Words:** HepG2 cells; Nude mouse; 5-Aza-2'-deoxycytidine; T-cadherin; Methylation

Liang ZK, Huang ZY, Chen XP, Liu C, Wu ZD. 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced T-cadherin expression in HepG2-derived tumors and its inhibitory effects on tumor growth in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1741-1745

### ■背景资料

近年来, 遗传表型改变在肝癌发病机制中的作用日益受到重视。众多研究发现, 抑癌基因T-cadherin启动子内出现甲基化导致该基因表达下降或沉默是肝癌发病的重要途径之一。已有体外实验证实5-杂氮-2'-脱氧胞苷能使T-cadherin基因甲基化的人肝癌细胞株HepG2细胞恢复T-cadherin表达, 抑制HepG2细胞增殖。

### ■同行评议者

袁正军, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院普通外科

## ■研究前沿

近年来,对抑癌基因失活与肿瘤发生之间关系的研究越来越受到人们的重视,尤其是对抑癌基因启动子区CpG岛甲基化导致基因失活的研究已渐成为研究的热点。

## 摘要

**目的:**探讨去甲基化药物5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)在裸鼠体内诱导HepG2细胞T-cadherin的表达,及其对HepG2种植瘤生长的抑制作用。

**方法:**皮下接种法建立HepG2细胞裸鼠种植瘤模型,随机分为实验组(11只)和对照组(10只)。实验组裸鼠给予5-Aza-CdR注射,对照组裸鼠注射等量PBS。4 wk后处死裸鼠,观察种植瘤的生长情况,用RT-PCR技术及免疫组织化学技术检测T-cadherin mRNA及蛋白的表达。

**结果:**用药4 wk后,实验组肿瘤组织的T-cadherin mRNA的表达水平显著高于对照组( $t = 6.613$ ,  $P < 0.05$ );对照组HepG2细胞几乎检测不到T-cadherin蛋白表达,而实验组裸鼠种植瘤细胞膜上可检测到T-cadherin蛋白表达;实验组肿瘤的平均体积明显小于对照组肿瘤平均体积( $t = 2.337$ ,  $P = 0.025$ )。

**结论:**5-Aza-CdR能诱导裸鼠皮下种植HepG2瘤细胞的T-cadherin表达,抑制HepG2种植瘤的生长,其机制可能为5-Aza-CdR使甲基化的T-cadherin启动子去甲基化,恢复T-cadherin的表达,从而抑制HepG2种植瘤生长。

**关键词:** HepG2细胞; 裸鼠; 5-杂氮-2'-脱氧胞苷; T-cadherin; 甲基化

梁治坤, 黄志勇, 陈孝平, 刘聪, 吴在德. 5-杂氮-2'-脱氧胞苷诱导裸鼠HepG2种植瘤细胞T-cadherin的表达及其对种植瘤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1741-1745  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1741.asp>

## 0 引言

肝癌的发生是一个多步骤、多阶段的复杂过程,与癌基因激活和抑癌基因失活密切相关。近年来,对抑癌基因失活与肿瘤发生之间关系的研究越来越受到人们的重视,尤其是对抑癌基因启动子区CpG岛甲基化导致基因失活的研究已渐成为目前研究的热点。以往研究发现,对一些启动子区CpG岛甲基化而失活的抑癌基因,应用去甲基化试剂5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)可使这些抑癌基因去甲基化而重新表达<sup>[1-4]</sup>。研究已表明,胶质母细胞瘤C6细胞缺失T-cadherin表达,通过转染使C6细胞过表达T-cadherin可明显抑制C6细胞的增殖及转移,表明T-cadherin分子具有抑癌基因功能<sup>[5]</sup>。我们新近研究发现,T-cadherin基因表达缺失和下调与T-cadherin基

因启动子甲基化、肝癌的恶性生物学特征密切相关,约40%人肝癌组织中存在T-cadherin基因甲基化。进一步研究发现5-Aza-CdR能使T-cadherin基因甲基化的人肝癌细胞株HepG2细胞恢复T-cadherin表达,抑制HepG2细胞增殖<sup>[6]</sup>。本研究进一步探讨5-Aza-CdR能否诱导裸鼠皮下HepG2种植瘤T-cadherin的表达,并对裸鼠皮下HepG2种植瘤生长的抑制作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 5-Aza-CdR购自美国Sigma药物公司; DMEM及胎牛血清购自Hyclone公司, HepG2细胞为华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心实验室提供; 裸鼠购自上海斯莱克实验动物中心,为8 wk龄BALB/C型♂裸鼠,饲养于华中科技大学同济医学院器官移植研究所SPF级动物房; T-cadherin兔抗人多克隆抗体购自Satan Cruz Biotechnology公司(编号: SC-7940),兔/鼠通用型二抗(Dako公司)购自Gene公司; M-MLV逆转录酶及Taq酶为Fermentas公司产品,PCR引物由上海生物工程公司合成。

**1.2 方法** 以含有100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液培养HepG2细胞,置于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养、传代。

**1.2.1 HepG2细胞裸鼠皮下种植瘤模型的建立及实验:**将培养至对数增殖期的HepG2细胞消化后、计数。将含 $1 \times 10^7$ 个HepG2细胞悬浮于200  $\mu$ L PBS液中,注射于裸鼠侧腹皮下,每只裸鼠注射左右两侧各一点,共注射21只裸鼠。注射后14 d,裸鼠皮下形成肉眼可见的肿瘤(直径约0.3 cm)时,将裸鼠随机分为实验组和对照组2组。实验组11只,对照组10只。实验组裸鼠按1 mg/kg ip 5-Aza-CdR(溶解于200  $\mu$ L PBS),3次/wk,连续注射4 wk。对照组裸鼠仅注射等量的PBS。测量肿瘤长径(a),短径(b),计算其体积( $V = ab^2/2$ ),2次/wk;绘制肿瘤生长曲线。在4 wk末处死裸鼠,一部分肿瘤组织用40 g/L多聚甲醛固定,石蜡包埋作免疫组织化学染色,观察T-cadherin蛋白表达,另一部分肿瘤组织用于提取总RNA,分析T-cadherin基因mRNA表达。

**1.2.2 免疫组织化学:**取上述石蜡包埋的肿瘤组织,连续切片,每张4  $\mu$ m厚。T-cadherin一抗用PBS以1:100稀释后4℃孵育过夜, PBS漂洗3次后,加兔/鼠通用型二抗。实验步骤按兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒的说明书进行。PBS代替一抗作为阴性对照,细胞膜被染成棕黄色的细

胞为T-cadherin表达阳性的细胞。

**1.2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR):** 用TRIzol试剂提取上述各裸鼠皮下种植瘤的总RNA(提取步骤按照TRIzol试剂的说明进行), 将其溶于DEPC处理水中, 用紫外分光光度计测浓度定量。用2  $\mu$ g的RNA作为模板进行逆转录反应, PCR反应的引物序列按照以前文章所述<sup>[2]</sup>。T-cadherin上游引物: 5'-TTCAGCAGAAAGTGTTCCATAT-3', 下游引物: 5'-GTGCATGGACGAACAGAGT-3', PCR产物长度为208 bp; 内参以 $\beta$ -actin作为对照, 上游引物: 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3', 下游引物: 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3', PCR产物长度为564 bp。循环过程包括: 起始, 94 $^{\circ}$ C 5 min; 变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s; 退火, 54 $^{\circ}$ C 1 min; 延伸, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共35个循环; 最后72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 用AlphaEaseFC凝胶图像分析仪分析, 测定各条带的吸光度(A)值, 分别以T-cadherin/ $\beta$ -actin (A值的比值)表示T-cadherin mRNA的相对表达水平, 重复3次, 取平均值。

**统计学处理** 采用t检验。数据均采用mean $\pm$ SD表示, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, 采用SPSS13.0软件进行分析。

## 2 结果

**2.1 5-Aza-CdR上调裸鼠HepG2种植瘤细胞T-cadherin基因表达** 对照组裸鼠HepG2种植瘤细胞中T-cadherin mRNA呈低表达(T-cadherin基因PCR产物灰度值与 $\beta$ -actin PCR产物灰度值比值为 $0.256 \pm 0.079$ ), 而注射5-Aza-CdR的裸鼠种植瘤细胞T-cadherin mRNA表达明显增强(T-cadherin基因PCR产物灰度值与 $\beta$ -actin PCR产物灰度值比值为 $0.545 \pm 0.119$ ), 两者相比有统计学显著性差异( $t = 6.613, P < 0.05$ , 图1)。免疫组织化检测发现对照组裸鼠种植瘤细胞上均未见T-cadherin阳性着色, 而注射5-Aza-CdR后的裸鼠种植瘤细胞膜上可见明显棕黄色阳性着色(图2)。表明5-Aza-CdR可恢复裸鼠HepG2种植瘤细胞的T-cadherin mRNA和蛋白表达。

**2.2 5-Aza-CdR抑制人肝癌裸鼠种植瘤的生长** 在给药期间, 共有2只裸鼠死亡, 实验组和对照组各死亡1只(分别于用药后第21天和23天死亡, 死亡原因可能与皮下种植瘤生长较快致恶病质有关)。用药后每周观察、测量肿瘤体积2次, 用药2 wk后即发现实验组裸鼠形成的肿瘤体积较对照组肿瘤体积小, 这种肿瘤体积的差异随给药

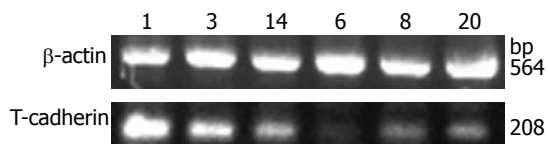


图1 PCR产物电泳图分析瘤体组织中T-cadherin mRNA表达差异。1, 3, 14: 实验组; 6, 8, 20: 对照组(数字为实验中随机设定的裸鼠编号)。

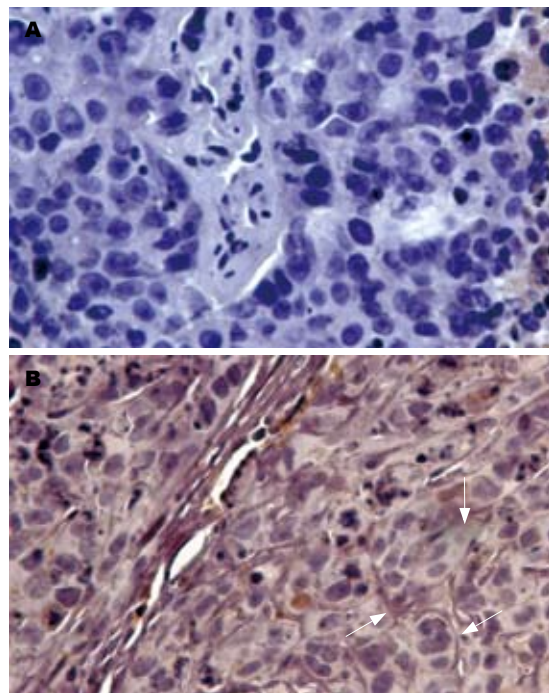


图2 免疫组化分析T-cadherin蛋白在肿瘤组织中的表达。A: 对照组; B: 实验组。

时间延长而增大, 用药4 wk后肿瘤体积差异最明显(图3)。至4 wk后处死裸鼠时, 实验组肿瘤的体积为 $1005.78 \pm 419.69 \text{ mm}^3$ , 对照组为 $1423.78 \pm 645.54 \text{ mm}^3$ , 实验组肿瘤体积明显小于对照组的体积( $t = 2.337, P = 0.025$ , 图4)。

## 3 讨论

肝细胞癌对放、化疗均不敏感, 对不能手术切除和切除后复发或转移的病例, 目前尚无有效的治疗手段。深入研究肝细胞癌的发生、发展及转移的分子机制, 探索新的治疗靶点对肝癌治疗具有重要意义。

细胞黏附分子cadherin家族不仅介导细胞间的黏附<sup>[7]</sup>, 而且还参与细胞间的信号传导机制<sup>[8-9]</sup>。T-cadherin是黏附分子家族较为特殊的一种类型, 因为缺失经典cadherin分子所具有的跨膜区而经糖基磷脂酰肌醇分子附着于细胞膜上<sup>[10]</sup>, 故而命名truncated-cadherin(即T-cadherin,

### ■相关报道

Kantarjian利用5-杂氮-2'-脱氧胞苷(通用名地西他滨, decitabine)临床治疗白血病及高危恶性骨髓增生异常综合征患者, 获得了较好疗效。



## ■应用要点

本文为进一步利用甲基转移酶抑制剂5-杂氮-2'-脱氧胞苷开展临床治疗肝癌的研究提供了实验依据以及可能的靶点。

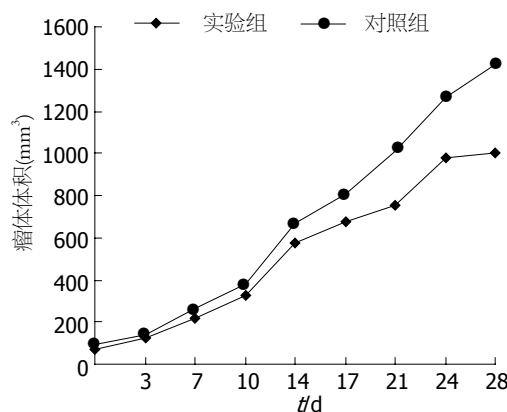


图3 肿瘤生长曲线图。

又称CDH13或H-cadherin), 他主要介导同种细胞间的黏附和迁移<sup>[7,11]</sup>。已有研究报道, T-cadherin在肺癌、胰腺癌等多种肿瘤中表达缺失<sup>[12-13]</sup>。启动子甲基化是导致T-cadherin基因表达缺失或下调重要机制之一, 在卵巢癌<sup>[14]</sup>、胰腺癌<sup>[15-16]</sup>中已证实存在T-cadherin基因频繁甲基化。在胰腺癌中, 约58%的T-cadherin的下调表达是由于启动子甲基化引起的<sup>[13]</sup>。我们前期实验已经证实有40%人肝癌组织存在T-cadherin基因甲基化, 而癌周正常肝组织无T-cadherin基因甲基化。肝癌中T-cadherin基因表达缺失和下调与T-cadherin基因启动子甲基化有关, 而T-cadherin基因表达缺失和下调是促进肝癌的恶性生物学特征进展的重要因素<sup>[6]</sup>。由此可见, 通过对肝癌中甲基化的T-cadherin基因进行去甲基化处理, 可望恢复T-cadherin基因表达, 从而达到抑制肝癌发生、发展的目的。

去甲基化试剂5-Aza-CdR能通过共价键俘获甲基转移酶形成一个稳定的复合物, 使细胞在DNA复制过程中不能将S-腺苷-L-甲硫氨酸上的甲基基团转移至胞嘧啶上, 可有效消除细胞DNA甲基化的功能, 这可导致在DNA经过几个周期的复制后的去甲基化<sup>[17]</sup>。5-Aza-CdR可使存在甲基化的多种肿瘤抑制基因去甲基化后表达, 达到抑制肿瘤生长的目的。Bender *et al*<sup>[3]</sup>发现用5-Aza-CdR处理过的T24膀胱癌细胞接种于裸鼠后形成的肿瘤较未处理的细胞接种的肿瘤明显减小。Lantry *et al*<sup>[4]</sup>发现5-Aza-CdR可以重新激活抑癌基因p16, 从而减少4-(甲基亚硝基)-3-(吡啶)-1-丁酮诱发的小鼠肺癌发生达23%。临床应用5-Aza-CdR治疗肿瘤已见报道, 如利用5-Aza-CdR(通用名地西他滨, decitabine)治疗白血病及高危性骨髓增生异常综合征等, 获得了较好疗效<sup>[18-19]</sup>。

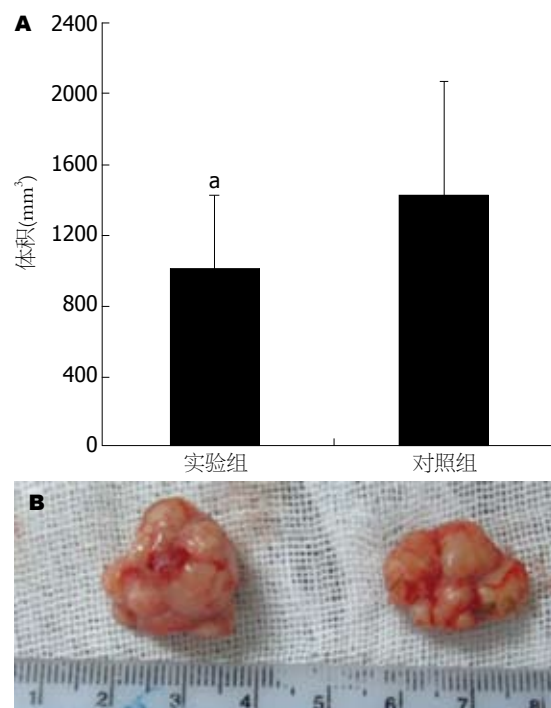


图4 用药4 wk后实验组与对照组瘤体体积比较。A: 实验组与对照组瘤体平均体积; B: 实验组(右)瘤体体积明显小于对照组(左), \* $P < 0.05$  vs 对照组。

在体外研究发现人肝癌细胞株HepG2细胞存在T-cadherin基因启动子甲基化和T-cadherin基因低表达, 5-Aza-CdR作用HepG2细胞后能恢复T-cadherin表达, 并可抑制HepG2细胞增殖<sup>[6]</sup>。本研究在裸鼠体内证实, 5-Aza-CdR对裸鼠体内的人肝癌HepG2细胞的生长具有明显的抑制作用。其机制可能与5-Aza-CdR使甲基化的T-cadherin启动子去甲基化, 恢复T-cadherin基因表达有关。T-cadherin表达上调可诱导p21表达导致细胞周期阻滞, 从而抑制肿瘤细胞增殖, 已在胶质母细胞瘤细胞中得以证实<sup>[5]</sup>。然而, 5-Aza-CdR去甲基化作用并无特异性, 对多种甲基化的基因具有去甲基化作用, 恢复其基因功能。在人肝癌中已证实存在甲基化的多种肿瘤抑制基因, 如E-cadherin基因<sup>[20]</sup>、与多数肿瘤发生密切相关的p15, p16基因<sup>[21]</sup>及p21基因<sup>[22]</sup>等均可能被去甲基化而恢复表达, 进而也会对肿瘤产生抑制作用。因此, 对于5-Aza-CdR抑制裸鼠皮下HepG2种植生长的分子机制有待于进一步深入研究。

本研究通过体内研究发现5-Aza-CdR对裸鼠体内的人肝癌HepG2细胞的生长具有明显的抑制作用。为进一步利用甲基转移酶抑制剂5-Aza-CdR开展治疗肝癌的研究提供了新的思路。

#### 4 参考文献

- 1 Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi

- H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* 2003; 63: 3735-3742
- 2 Toyooka KO, Toyooka S, Virmani AK, Sathyanarayana UG, Euhus DM, Gilcrease M, Minna JD, Gazdar AF. Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas. *Cancer Res* 2001; 61: 4556-4560
- 3 Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 95-101
- 4 Lantry LE, Zhang Z, Crist KA, Wang Y, Kelloff GJ, Lubet RA, You M. 5-Aza-2'-deoxycytidine is chemopreventive in a 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced primary mouse lung tumor model. *Carcinogenesis* 1999; 20: 343-346
- 5 Huang ZY, Wu Y, Hedrick N, Gutmann DH. T-cadherin-mediated cell growth regulation involves G2 phase arrest and requires p21(CIP1/WAF1) expression. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 566-578
- 6 Yan Q, Zhang ZF, Chen XP, Gutmann DH, Xiong M, Xiao ZY, Huang ZY. Reduced T-cadherin expression and promoter methylation are associated with the development and progression of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2008; 32: 1057-1063
- 7 张志发, 严群, 黄志勇. 黏附分子cadherin与肝癌生物学特性的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 697-701
- 8 Levenberg S, Yarden A, Kam Z, Geiger B. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene* 1999; 18: 869-876
- 9 Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66: 1174-1186
- 10 Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 2001; 114: 629-641
- 11 Philippova M, Ivanov D, Tkachuk V, Erne P, Resink TJ. Polarisation of T-cadherin to the leading edge of migrating vascular cells in vitro: a function in vascular cell motility? *Histochem Cell Biol* 2003; 120: 353-360
- 12 Sato M, Mori Y, Sakurada A, Fujimura S, Horii A. The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. *Hum Genet* 1998; 103: 96-101
- 13 Sakai M, Hibi K, Koshikawa K, Inoue S, Takeda S, Kaneko T, Nakao A. Frequent promoter methylation and gene silencing of CDH13 in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2004; 95: 588-591
- 14 Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995; 1: 686-692
- 15 Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3806-3812
- 16 Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 1573-1581
- 17 Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 2001; 134: 573-586
- 18 Wijermans PW, Krulder JW, Huijgens PC, Neve P. Continuous infusion of low-dose 5-Aza-2'-deoxycytidine in elderly patients with high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1997; 11: 1-5
- 19 Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, Faderl S, Bueso-Ramos C, Ravandi F, Estrov Z, Ferrajoli A, Wierda W, Shan J, Davis J, Giles F, Saba HI, Issa JP. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 52-57
- 20 Kanai Y, Ushijima S, Hui AM, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 1997; 71: 355-359
- 21 Lee YY, Kang SH, Seo JY, Jung CW, Lee KU, Choe KJ, Kim BK, Kim NK, Koeffler HP, Bang YJ. Alterations of p16INK4A and p15INK4B genes in gastric carcinomas. *Cancer* 1997; 80: 1889-1896
- 22 Vogt M, Haggbloom C, Yeargin J, Christiansen-Weber T, Haas M. Independent induction of senescence by p16INK4a and p21CIP1 in spontaneously immortalized human fibroblasts. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 139-146

#### ■同行评价

本研究立意有一定新意, 方法成熟, 结论可信, 对进一步研究基因去甲基化治疗肿瘤提供了初步的实验依据, 具有一定学术价值。

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

**本刊讯** 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (2)同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (常务副总编辑: 张海宁 2008-06-08)

# 酵母双杂交技术对人胰腺cDNA文库中HBcAg结合蛋白基因的筛选

张维燕, 张锦前, 王琦, 李国力, 王晓春, 张晨宇, 杨涤, 成军

## ■背景资料

近年来国内外大量的临床病例研究资料及文献提示, 慢性乙型肝炎患者2型糖尿病发病率显著高于普通人群, HBV慢性感染时除引起肝脏病变外, 可能同时还侵犯胰腺进而影响胰腺的分泌功能致糖、脂类代谢异常, 但机制不清, 相关研究甚少。

张维燕, 张锦前, 王琦, 李国力, 王晓春, 张晨宇, 杨涤, 成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011

张维燕, 北京大学医学部硕士, 主治医师, 主要从事肝脏疾病合并糖尿病的研究。

国家自然科学基金项目资助项目, No. 30600524

作者贡献分布: 此课题由张锦前设计; 研究过程由张维燕, 张锦前, 王琦, 李国力, 王晓春及张晨宇操作完成; 数据分析由张维燕, 张锦前, 王琦, 李国力, 杨涤, 王晓春及张晨宇完成; 本论文写作由张维燕、张锦前及成军完成。

通讯作者: 张锦前, 100011, 北京市东城区安定门外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所。

jingwanghou@yahoo.com.cn

电话: 010-64200407

收稿日期: 2008-02-13 修回日期: 2008-04-07

## Screening of proteins binding to hepatitis B core antigen from human pancreas cDNA library by yeast two-hybrid system

Wei-Yan Zhang, Jin-Qian Zhang, Qi Wang, Guo-Li Li, Xiao-Chun Wang, Chen-Yu Zhang, Di Yang, Jun Cheng

Wei-Yan Zhang, Jin-Qian Zhang, Qi Wang, Guo-Li Li, Xiao-Chun Wang, Chen-Yu Zhang, Di Yang, Jun Cheng, the Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600524

Correspondence to: Dr. Jin-Qian Zhang, the Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Andingmenwai Avenue, Dongcheng District, Beijing 100011, China. jingwanghou@yahoo.com.cn

Received: 2008-02-13 Revised: 2008-04-07

## Abstract

**AIM:** To screen proteins in human pancreas cDNA library interacting with hepatitis B core antigen (HBcAg) by yeast two-hybrid system.

**METHODS:** After amplification, purification, and identification, the human pancreas cDNA library plasmid was transformed into yeast Y187. Thereafter, the reconstructed bait plasmid (pGBKT7-HBcAg) was transformed into yeast cells AH109. Then, the transformed AH109 was mated with Y187 that contained the library plasmid. The diploid yeast cells were plated on nutrient

deficiency medium SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade and SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade containing X-α-gal for selecting. The plasmids in diploid yeast cells were extracted and electrotransformed into *E. coli* DH5α. The plasmids in DH5α were extracted, sequenced and analyzed by bioinformatic methods.

**RESULTS:** The human pancreas cDNA library was constructed successfully. The reconstructed bait plasmid (pGBKT7-HBcAg) was transformed into yeast cells AH109 successfully. Nine proteins interacting with HBcAg were screened, and their sequences were homologous with human pancreatic lipase (PNLIP), CEL, CTRE, trypsinogen, carboxypeptidase 1 (CPB1), human complete mitochondrial genome, human pancreatic elastinase 2A, human complement lipase (CLPS) and human ribosomal protein (RPL10A).

**CONCLUSION:** HBcAg protein may be related with the exocrine pancreatic function and metabolism of glucose or lipid. HBV infection probably leads to metabolic abnormality or metabolic diseases through interacting with pancreatic enzymes.

**Key Words:** Hepatitis B core antigen; Pancreas cDNA library; Yeast two-hybrid system

Zhang WY, Zhang JQ, Wang Q, Li GL, Wang XC, Zhang CY, Yang D, Cheng J. Screening of proteins binding to hepatitis B core antigen from human pancreas cDNA library by yeast two-hybrid system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1746-1750

## 摘要

**目的:** 应用酵母双杂交技术, 筛选人胰腺cDNA文库中与HBV核心抗原结合的蛋白的基因。

**方法:** 扩增人胰腺cDNA文库并纯化鉴定, 将其转化至酵母菌Y187; 诱饵质粒pGBKT7-HBcAg转化酵母菌AH109并筛选鉴定。应用酵母双杂交系统3进行配合, 在SD/-Trp/-Leu/-

## ■同行评议者

高春芳, 研究员, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科; 王凯, 教授, 山东大学齐鲁医院肝病科

His<sup>-</sup>-Ade培养基和含X-gal的SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上进行双重筛选, 提取阳性酵母菌落的质粒转化大肠埃希菌DH5 $\alpha$ , 提取质粒并测序, 对测序结果进行生物信息学分析。

**结果:** 人胰腺cDNA文库的构建以及pGBKT7-HBcAg质粒转化AH109酵母菌株均获成功, 并从人胰腺cDNA文库中筛选出9个与HBcAg蛋白相结合的蛋白基因, 分别与以下已知的9种编码蛋白基因序列同源: 人胰脂肪酶(PNLIP)、人胆盐刺激酯酶(CEL)、人胰凝乳蛋白C(CTRC)、人胰蛋白酶原、人羧肽酶B1(CPB1)、人线粒体全基因组、人胰弹性酶2A、人辅脂肪酶(CLPS)和人核糖体蛋白(RPL10A)。

**结论:** 筛选出的与HBcAg蛋白相结合的蛋白基因主要与胰腺外分泌功能相关, HBV感染可能通过与胰腺所分泌的糖、脂类代谢相关的酶类结合, 而引发代谢性疾病。

**关键词:** HBcAg; 人胰腺cDNA文库; 酵母双杂交技术

张维燕, 张锦前, 王琦, 李国力, 王晓春, 张晨宇, 杨淦, 成军. 酵母双杂交技术对人胰腺cDNA文库中HBcAg结合蛋白基因的筛选. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1746-1750  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1746.asp>

## 0 引言

近年来国内外大量的临床病例研究资料及文献提示, 慢性乙型肝炎患者2型糖尿病发病率显著高于普通人群并存在胰岛素抵抗, 这种现象逐渐受到人们关注<sup>[1-5]</sup>. 有研究者还进行了相关的机制研究, 但尚无法定论. 研究者通过对胰腺组织进行原位杂交及免疫组化检测发现, HBV慢性感染者胰腺组织中存在HBsAg、HBcAg及HBV DNA<sup>[6-8]</sup>. 这些提示HBV慢性感染时除引起肝脏病变外, 可能同时还侵犯胰腺并引起相应的病理改变, 进而影响胰腺的分泌功能致糖、脂类物质代谢异常甚至是代谢性疾病. 但这些可能性及其机制还需要进一步研究验证. 因此, 我们从蛋白质水平运用酵母双杂交技术筛选人胰腺cDNA文库中与HBcAg结合蛋白的基因, 从而为相关理论提供实验依据, 为相关研究的提供思路 and 方向。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 酵母双杂交系统3该试剂盒包括人类胰腺cDNA文库、pGADT7-AD克隆载体、pGBKT7-BD克隆载体、酵母菌株AH109、酵母

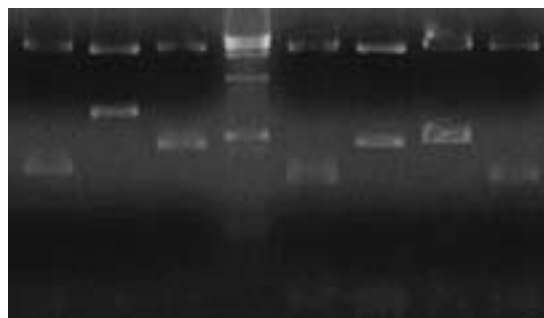


图1 胰腺cDNA文库EcoRI/XhoI双酶切分析。

菌株Y187, 购自Clontech公司. BglII购自TaKaRa公司. X- $\alpha$ -gal、酵母YPD培养基、酵母YPD Agar培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His以及SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基均购自Clontech公司. 鲑精DNA(DNA, from herring sperm)购自Sigma公司. 引物合成及测序由奥科公司完成。

**1.2 方法** 酵母胰腺cDNA文库的构建按Clontech公司的说明书对文库进行扩增, 用Qiagen公司的操作手册(Qiagen plasmid Maxi kit)对文库进行纯化. 取纯化的文库质粒1  $\mu$ L转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 随机挑取6个单克隆提取质粒, EcoRI、XhoI双酶切鉴定cDNA文库多样性. 文库质粒转化酵母, 制备酵母人胰腺cDNA文库. 提取新鲜生长的Y187酵母菌落接种于YPDA液体培养基中, 振荡后以醋酸锂法将文库质粒转化至其中, 然后将转化物铺SD/-Leu板筛选. 同时将转化产物按1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:1 $\times$ 10<sup>4</sup>, 1:1 $\times$ 10<sup>6</sup>, 1:1 $\times$ 10<sup>8</sup>分别铺于SD/-Leu培养基上检验转化效率. HBcAg蛋白的酵母表达载体pGBKT7-HBcAg由本室构建, 醋酸锂法转入酵母菌株AH109. 转化后铺板筛选, 挑取新鲜生长的经菌落PCR鉴定正确的AH109酵母菌落接种于SD/-Trp液体培养基中, 振荡培养后, 离心并重悬于2 $\times$ YPDA培养基中, 与含胰腺文库的酵母细胞配合24 h. 观察到三叶草状的二倍体细胞后, 将其离心并重悬于0.25 $\times$ YPDA培养基中, 然后铺SD/-Trp/-Leu/-His平板和SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade平板各25块, 孵育培养. 同时将配合产物按1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>分别铺于培养基上检验配合效率. 生长16 d后把直径>2 mm的菌落划线于铺有X-Gal的培养基, 在此培养基上生长且变成蓝色的为阳性菌落. 挑取阳性菌落于液体培养基中, 振荡后提取酵母质粒. 电穿孔法将提取的质粒转化感受态细胞并于含有氨苄青霉素的LB平板上培养, 所获得菌落质粒行BglII酶切鉴定

## ■ 相关报道

有研究通过对胰腺组织进行原位杂交及免疫组化检测发现, HBV慢性感染者胰腺组织中存在HBsAg、HBcAg及HBV DNA. 这提示HBV慢性感染时可能侵犯胰腺并引起相应的病理改变, 进而影响胰腺的分泌功能致糖、脂类物质代谢异常甚至是代谢性疾病。



### ■创新盘点

本研究从蛋白质水平运用酵母双杂交技术筛选人胰腺cDNA文库中与HBcAg结合蛋白的基因,从而证实HBV慢性感染致胰腺损害的机制及其与糖、脂类代谢相关性。

表 1 阳性克隆进行生物学信息学分析结果

序号	GenBank序号	已知的同源序列编码蛋白基因	相同克隆数	同源性
1	000936.2	人胰脂肪酶(PNLIP)	5	98
2	001807.2	人胆汁刺激酯酶(CEL)	1	97
3	007272.2	人胰凝乳蛋白C(CTRC)	1	100
4	002769.2	人胰蛋白酶原	4	99
5	001871.2	人羧肽酶B1(CPB1)	2	98
6	001807.4	人线粒体全基因组	1	97
7	033440.1	人胰弹性酶2A	1	99
8	001832.2	人辅脂肪酶(CLPS)	2	99
9	007104.4	人核糖体蛋白(RPL10A)	2	100

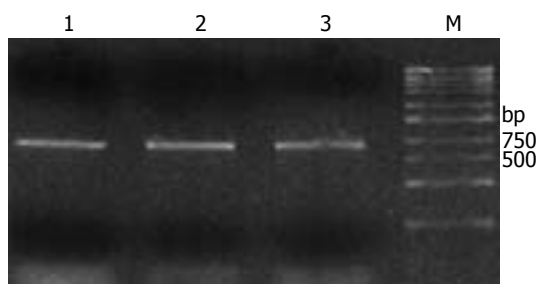


图 2 PGBKT7-HBcAg的PCR鉴定。

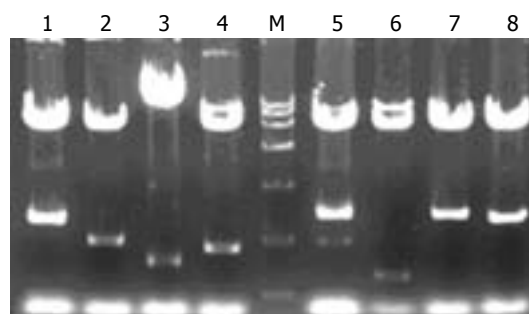


图 3 部分真阳性文库质粒Bgl II 酶切分析。

后测序,对测序结果进行生物信息学分析。

## 2 结果

**2.1 酵母胰腺cDNA文库的构建** 经测定,待转化的胰腺cDNA文库滴度在 $4 \times 10^7$ 左右。用EcoR I、Xho I 双酶切鉴定cDNA文库的多样性。结果显示插入片段大小不一(图1),说明文库具有很好的多样性。经转化效率的检验,确定文库细胞计数大于 $1 \times 10^9$ 细胞/L。

**2.2 pGBKT7-HBcAg质粒转化AH109酵母菌株** 用醋酸锂法转化酵母细胞后在缺陷型SD/-Trp培养基上筛选生长。培养4 d后,挑取菌落进行PCR扩增HBcAg,结果显示转化成功(图2)。

**2.3 部分筛选克隆Bgl II 酶切鉴定结果** pACT2载体上含有的2个Bgl II 酶切位点分别位于多克隆位点两侧,故使用该内切酶消化将释放出所筛选到的胰腺文库的基因片段。图3所示Bgl II 酶切、琼脂糖凝胶电泳后的不同大小胰腺cDNA文库片段。

**2.4 筛选出的基因序列进行生物学信息学分析** 挑选26个阳性克隆测序后,进行生物学信息学分析(表1)。

## 3 讨论

HBV慢性感染除引起肝脏损害外还可能与很多

肝外组织损害密切相关,尤其与2型糖尿病之间的关联更是引起众多学者的关注。国内外很多研究者提供的流行病学和临床病例资料报道提示,HBV慢性感染患者糖尿病的发病率显著高于普通人群<sup>[9-10]</sup>。Custro *et al*<sup>[11]</sup>报道,成人慢性乙型肝炎2型糖尿病的发病率为25%,是普通人群发病率的4倍。北京地坛医院<sup>[12]</sup>曾调查北京2303例慢性肝炎患者,发现2型糖尿病发病率是普通人群的3倍。这些说明HBV慢性感染可能会导致2型糖尿病的发生,也可能2型糖尿病的又一危险因素。

有研究者发现,HBV慢性感染者伴发2型糖尿病与HBV损伤胰岛细胞有关。研究显示慢性HBV感染患者中糖耐量异常者(IGT)胰腺细胞HBV DNA检测阳性率显著高于糖耐量正常者(NGT),免疫荧光组织化学双重染色显示胰岛细胞胰岛素受体阳性部位有HBsAg存在,提示HBV不仅能侵害肝细胞,也可能直接侵害胰岛细胞,可能是HBV感染伴发2型糖尿病的原因之一<sup>[5]</sup>。HBV DNA可能会导致胰岛β细胞功能障碍,或者造成编码胰岛素基因突变,使胰腺β细胞不能分泌成熟的胰岛素,而分泌更多的前体胰岛素或变形胰岛素。还有研究发现HBV病毒核心抗原(HBcAg)结合蛋白C-12与胰岛素受体有相

互作用关系<sup>[12]</sup>. 这些研究从机制方面进一步说明了HBV慢性感染与2型糖尿病可能密切相关, 但是糖代谢过程及其机制极为复杂, HBV慢性感染是影响这一过程中的某一环节还是某几个环节, 而且是通过怎样的作用过程和机制影响的我们还不清楚. 到目前为止, 国内外相关机制的研究报道甚少, 更缺少充分的证据.

我们在此基础上考虑, HBV慢性感染时某些病毒蛋白可能影响了糖代谢过程的某些环节. 因此我们采用酵母双杂交技术从蛋白质水平研究相关的机制, 本文筛选了人胰腺cDNA文库中的HBcAg结合蛋白基因, 发现了与HBcAg存在相互作用的几种胰腺分泌的酶, 如胰弹性蛋白酶、胰脂肪酶、辅脂肪酶、胆盐刺激酯酶, 而这些酶是胰腺外分泌功能中的重要组分, 他们在糖、脂代谢过程中均起重要作用.

值得人们关注的是, 大约10%-30%的1型和2型糖尿病患者存在胰腺外分泌功能异常, 并且与早发的胰腺功能衰竭、低体质量指数、糖尿病病程有关<sup>[13-15]</sup>. 2型糖尿病患者胰腺外分泌功能障碍显著高于正常对照组, 并且随着体重指数的增加胰腺外分泌发生障碍的可能性也会相应增加<sup>[16]</sup>. 而胰弹性蛋白酶是一个重复性非常好的评价胰腺外分泌功能的指标<sup>[17-18]</sup>. Vesterhus *et al*<sup>[19]</sup>研究发现, 所有青春型糖尿病(MODY3)患者中胰弹性蛋白酶缺乏者脂肪排泄增加. 有研究发现, 弹性蛋白酶可抑制大白鼠和小白鼠自发性糖尿病; 抑制实验性肝纤维化、增强脂肪肝时的肝脏脂肪分解. 其作为药物主要可用于防治动脉硬化症、高脂血症(高胆固醇、高甘油三酯)、高血压、糖尿病和脂肪肝等<sup>[20-24]</sup>.

另外, 胰腺分泌的脂肪分解酶包括胰脂肪酶(pancreatic lipase, PL)和胆盐刺激酯酶(carboxyl ester lipase, CEL). PL主要分解食物中的甘油三酯; CEL主要消化胆固醇酯和视黄酯. 而辅脂肪酶是胰脂肪酶对消化脂类物质时不可缺少的辅助因子. 他们作为胰腺外分泌的主要成分都参与食物脂肪的消化和吸收. 对小鼠动物模型的研究发现, PL和CEL主要作用分别是机体对甘油三酯和胆固醇的吸收. 还有研究发现PL和CEL在脂类吸收中有互补作用<sup>[20]</sup>. 辅脂肪酶基因敲除小鼠试验中同样出现脂肪吸收下降<sup>[26]</sup>. 脂肪酶在糖代谢中也具有重要作用<sup>[27-28]</sup>. 有研究发现, 对非糖尿病CEL基因变异者行MRI和超声检查提示胰腺存在脂肪变倾向, 他们在发生2型糖尿病之前胰腺脂肪聚集<sup>[29]</sup>. 而胰腺脂

肪量是胰腺B细胞功能障碍的原因之一, 并可能影响2型糖尿病的发展<sup>[30]</sup>.

这些研究提示胰腺外分泌功能障碍在胰腺脂肪变和糖尿病发展进程中起了一定作用. 这些胰腺外分泌功能中重要的酶类物质, 如果他们的分泌及功能出现异常则极可能进一步影响相应的代谢过程而导致脂类代谢异常, 甚至最终引发胰岛素抵抗、糖代谢异常和2型糖尿病. 而HBcAg与这些酶类物质结合后就可能影响他们的结构、功能, 从而进一步导致一系列的不良结果. 因此, HBV慢性感染影响胰腺外分泌功能可能就是其影响糖、脂代谢过程的可能机制之一, 这需要进一步证实.

总之, HBV慢性感染时同样可能感染胰腺细胞, 我们的研究发现HBcAg与胰腺分泌的多种酶类物质存在相互作用, 尤其是其中几种与胰腺外分泌功能密切相关. 他们之间的相互作用可能就是HBV感染引发糖、脂类代谢异常甚至糖尿病的可能机制. 我们的研究为进一步探索HBV慢性感染与胰腺功能、糖类代谢、脂类代谢和2型糖尿病提供了新的良好的思路和研究方向.

## 4 参考文献

- 1 Mohammad Alizadeh AH, Fallahian F, Alavian SM, Ranjbar M, Hedayati M, Rahimi F, Khedmat H, Etemadi A, Zali MR, Azizi F. Insulin resistance in chronic hepatitis B and C. *Indian J Gastroenterol* 2006; 25: 286-289
- 2 范小玲, 徐道振, 李瑾, 张月珍, 李保顺. 北京地区慢性肝炎合并糖尿病临床调查. *中华传染病杂志* 2001; 2: 115-116
- 3 Tai TY, Lu JY, Chen CL, Lai MY, Chen PJ, Kao JH, Lee CZ, Lee HS, Chuang LM, Jeng YM. Interferon-alpha reduces insulin resistance and beta-cell secretion in responders among patients with chronic hepatitis B and C. *J Endocrinol* 2003; 178: 457-465
- 4 Kwon SY, Kim SS, Kwon OS, Kwon KA, Chung MG, Park DK, Kim YS, Koo YS, Kim YK, Choi DJ, Kim JH. Prognostic significance of glycaemic control in patients with HBV and HCV-related cirrhosis and diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005; 22: 1530-1535
- 5 Akbar DH, Siddique AM, Ahmed MM. Prevalence of Type-2 diabetes in patients with hepatitis C and B virus infection in Jeddah, Saudi Arabia. *Med Princ Pract* 2002; 11: 82-85
- 6 时德仁, 东传凌, 陆立, 丛闻天, 周燕. 肝硬化时糖代谢紊乱与肝细胞胰岛素受体及胰腺细胞HBV DNA表达的关系. *中华实验和临床病毒学杂志* 2003; 17: 372-374
- 7 李雪梅, 郎振为, 崔世昌, 朱仁平, 廖惠钰, 秦天云. 重症乙肝患者肝、胰组织内HBsAg、HBcAg的检测及其与糖代谢异常关系的探讨重症乙肝患者肝、胰组织内HBsAg、HBcAg的检测及其与糖代谢异常关系

## ■应用要点

本研究为HBV慢性感染致胰腺损害及其与糖、脂类代谢异常、2型糖尿病相关性的机制提供实验依据, 为进一步研究提供思路和指导.

## ■同行评价

本文选题明确, 设计思路清晰合理, 研究方法简单可靠, 可重复性强, 具有较强的科学性和创新性。

- 8 黄生福, 杨竹林, 李清龙, 王群伟, 邓星辉, 李永国. 胰腺癌和原发性肝癌组织中HBV DNA原位杂交的研究. *中国现代医学杂志* 2004; 14: 52-54
- 9 Jan CF, Chen CJ, Chiu YH, Chen LS, Wu HM, Huang CC, Yen MF, Chen TH. A population-based study investigating the association between metabolic syndrome and hepatitis B/C infection (Keelung Community-based Integrated Screening study No. 10). *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 794-799
- 10 Zhang X, Shen W, Shen DM. A clinical analysis of liver disease patients with abnormal glucose metabolism. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 289-292
- 11 Custro N, Carroccio A, Ganci A, Scafidi V, Campagna P, Di Prima L, Montalto G. Glycemic homeostasis in chronic viral hepatitis and liver cirrhosis. *Diabetes Metab* 2001; 27: 476-481
- 12 陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. HBsAg结合蛋白C-12基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 62-65
- 13 Hardt PD, Hauenschild A, Nalop J, Marzeion AM, Jaeger C, Teichmann J, Bretzel RG, Hollenhorst M, Kloer HU. High prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in diabetes mellitus. A multicenter study screening fecal elastase 1 concentrations in 1,021 diabetic patients. *Pancreatology* 2003; 3: 395-402
- 14 Adedeji OO, Oyakhire GK, Ene DM, Al-Ghamdi SA. Role of lipase in glucose and lipid metabolisms. *Saudi Med J* 2007; 28: 841-843
- 15 Hardt PD, Hauenschild A, Nalop J, Marzeion AM, Jaeger C, Teichmann J, Bretzel RG, Hollenhorst M, Kloer HU. High prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in diabetes mellitus. A multicenter study screening fecal elastase 1 concentrations in 1,021 diabetic patients. *Pancreatology* 2003; 3: 395-402
- 16 Nunes AC, Pontes JM, Rosa A, Gomes L, Carneiro M, Freitas D. Screening for pancreatic exocrine insufficiency in patients with diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2672-2675
- 17 Naruse S, Ishiguro H, Ko SB, Yoshikawa T, Yamamoto T, Yamamoto A, Futakuchi S, Goto H, Saito Y, Takahashi S. Fecal pancreatic elastase: a reproducible marker for severe exocrine pancreatic insufficiency. *J Gastroenterol* 2006; 41: 901-908
- 18 Mancilla A C, Hurtado H C, Tobar A E, Orellana N I, Pineda B P, Castillo M I, Ledezma R R, Berger F Z. Pancreatic exocrine function in diabetes mellitus. Determination of fecal elastase. *Rev Med Chil* 2006; 134: 407-414
- 19 Vesterhus M, Raeder H, Johansson S, Molven A, Njølstad PR. Pancreatic exocrine dysfunction in maturity-onset diabetes of the young type 3. *Diabetes Care* 2008; 31: 306-310
- 20 Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1119-1127
- 21 张玲, 高军, 李兆申, 龚燕芳, 金晶, 吴洪玉, 满晓华. 胰腺癌和慢性胰腺炎中弹性蛋白酶3B基因甲基化状态检测. *胃肠病学* 2007; 12: 461-464
- 22 蒋建, 谭善忠, 谭春雨, 刘成海, 徐列明. 扶正化疗方对肝纤维化大鼠弹力蛋白酶表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 307-308
- 23 舒强, 凌光烈, 蒋建. 血管紧张素转换酶抑制剂对损伤后动脉弹性蛋白酶的影响. *中国病理生理学杂志* 2001; 17: 1172-1174
- 24 朱广博, 孙静, 刘静. 血清胰弹性蛋白酶-I连续监测法实验探讨. *临床检验杂志* 2003; 21: 209-210
- 25 Gilham D, Labonté ED, Rojas JC, Jandacek RJ, Howles PN, Hui DY. Carboxyl ester lipase deficiency exacerbates dietary lipid absorption abnormalities and resistance to diet-induced obesity in pancreatic triglyceride lipase knockout mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 24642-24649
- 26 D'Agostino D, Cordle RA, Kullman J, Erlanson-Albertsson C, Muglia LJ, Lowe ME. Decreased postnatal survival and altered body weight regulation in procolipase-deficient mice. *J Biol Chem* 2002; 277: 7170-7177
- 27 Adedeji OO, Oyakhire GK, Ene DM, Al-Ghamdi SA. Role of lipase in glucose and lipid metabolisms. *Saudi Med J* 2007; 28: 841-843
- 28 Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, Nermoen I, Eide SA, Grevle L, Bjørkhaug L, Sagen JV, Aksnes L, Søvik O, Lombardo D, Molven A, Njølstad PR. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet* 2006; 38: 54-62
- 29 Raeder H, Haldorsen IS, Ersland L, Grüner R, Taxt T, Søvik O, Molven A, Njølstad PR. Pancreatic lipomatosis is a structural marker in nondiabetic children with mutations in carboxyl-ester lipase. *Diabetes* 2007; 56: 444-449
- 30 Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, van Waesberghe JH, Schindhelm RK, Mari A, Heine RJ, Diamant M. Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 2916-2921

编辑 李军亮 电编 何基才

# 主动外排泵外膜蛋白编码基因 $hefA$ 在幽门螺杆菌多重耐药中的重要作用

刘志强, 郑鹏远

刘志强, 郑鹏远, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014

刘志强, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

河南省杰出青年基金资助项目, No. 074100510017

河南省高校创新人才基金计划资助项目, No. 2005

作者贡献分布: 刘志强与郑鹏远对此文所作贡献均等; 此课题由郑鹏远与刘志强设计; 研究过程由郑鹏远与刘志强操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郑鹏远提供; 数据分析由刘志强完成; 本论文写作由刘志强与郑鹏远完成。

通讯作者: 郑鹏远, 450014, 河南省郑州大学第二附属医院消化内科. medp7123@yahoo.com

电话: 0371-65261035

收稿日期: 2007-12-10 修回日期: 2008-04-08

## Important role of efflux pump gene $hefA$ in multidrug resistance of *Helicobacter pylori*

Zhi-Qiang Liu, Peng-Yuan Zheng

Zhi-Qiang Liu, Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Supported by: the Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Henan Province, No.074100510017; and the Henan Province Innovation Research Foundation for Talents of Higher Education, No. 2005

Correspondence to: Dr. Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@yahoo.com

Received: 2007-12-10 Revised: 2008-04-08

## Abstract

**AIM:** To determine whether efflux systems contribute to multidrug resistance(MDR) in *Helicobacter pylori* ( $H. pylori$ ).

**METHODS:** A chloramphenicol-induced MDR model ex vivo was developed in six susceptible  $H. pylori$  strains (5 isolates and  $H. pylori$  NCTC11637). The minimal inhibitory concentrations (MICs) of erythromycin, metronidazole, penicillin G, tetracycline and ciprofloxacin were determined using agar dilution tests and MDR strains were selected accordingly. The mRNA expression level of  $hefA$  was estimated using fluorescence real-time quantitative PCR. A  $H. pylori$  LZ1026 knockout mutant ( $\Delta$ HpLZ1026) for (pu-

tative) efflux protein was constructed through insertion of the Kanamycin resistance cassette from pEGFP-N2 into  $hefA$ , and its susceptibility profiles to 10 antibiotics were estimated. Expressions of  $hefA$  and  $hefC$  genes were detected using PCR in 20 clinically isolated  $H. pylori$  strains.

**RESULTS:** There was similar multidrug-resistance in chloramphenicol-induced screened multidrug-resistant (MDR) strains. Expression level of  $hefA$  gene in the 6 MDR strains was significantly higher compared with drug-sensitive strains ( $5.8466 \pm 2.9370$  vs  $2.6356 \pm 1.7245$ ,  $P = 0.033$ ).  $\Delta$ HpLZ1026 was constructed successfully and its sensitivity to four of ten antibiotics was significantly increased. In all the 20 isolated strains,  $hefA$  and  $hefC$  genes were detected while strains of  $hefABC$  gene depletion were not found.

**CONCLUSION:** Efflux pump gene  $hefA$  plays an important role in multidrug resistance of  $H. pylori$  in vivo. The  $hefABC$  gene exists universally in  $H. pylori$ , which plays an essential role in mechanism underlying multidrug resistance.

**Key Words:**  $H. pylori$ ; Multidrug resistance; Efflux pump; Fluorescence real-time quantitative PCR; Knockout mutant

Liu ZQ, Zheng PY. Important role of efflux pump gene  $hefA$  in multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1751-1756

## 摘要

**目的:** 研究幽门螺杆菌( $H. pylori$ )分离株的多重耐药机制。

**方法:** 用氯霉素对临床分离株 $H. pylori$ 和标准株 $H. pylori$ 进行体外诱导, 琼脂稀释法测定诱导后菌株对甲硝唑、四环素、琥乙红霉素、环丙沙星和青霉素G的耐药性, 从而筛选出多重耐药株; 实时定量PCR检测多重耐药株和敏感株中编码主动外排泵外膜蛋白的结构基因 $hefA$ 的mRNA水平。通过构建 $hefA$ 基因敲除株, 测定敲除前后菌株对10种抗生素的敏感

## ■背景资料

在目前广泛应用抗生素的背景下, 细菌耐药已经成为一个世界性的课题, 尤其是多重耐药菌株的出现给临床感染性疾病的治疗带来了新的难题。对细菌外排泵的研究已有十几年的历史, 其中对大肠杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌等研究比较深入, 存在多种抗生素耐药性有关的主动外排泵系统。而对 $H. pylori$ 多重耐药机制的研究较少, 在 $H. pylori$ 对抗生素耐药机制中外排泵是否起作用还不甚明了。本文旨在通过分子生物学技术研究 $H. pylori$ 多重耐药性机制, 为克服 $H. pylori$ 多重耐药的产生提供理论基础。

## ■同行评议者

赵平, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室



## ■ 研发前沿

随着*H pylori*对抗生素耐药的发生率不断上升,探讨其发生机制已经成为目前医学研究的热点。细菌对抗生素产生耐药的可能内在机制包括药物吸收的减少和外排的增加。细菌多重耐药机制仍有待于进一步研究。

性。PCR扩增20株*H pylori*临床分离株主动外排泵结构基因*hefA*和*hefC*。

**结果:**经氯霉素诱导后,筛选出的耐药菌株均表现出相似的多重耐药性,6株多重耐药株*hefA*基因mRNA水平显著高于敏感株( $5.8466 \pm 2.9370$  vs  $2.6356 \pm 1.7245$ ,  $P = 0.033$ );成功构建了*hefA*基因敲除株( $\Delta$ HpLZ1026), $\Delta$ HpLZ1026对4种抗生素的敏感性明显增加;所有20株临床分离株中均检测出*hefA*和*hefC*基因,未发现*hefABC*基因缺失株。

**结论:**主动外排系统*hefA*基因高表达导致体外人工诱导*H pylori*多重耐药的产生;*hefABC*基因在*H pylori*中普遍存在,且在*H pylori*多重耐药机制中起重要作用。

**关键词:**幽门螺杆菌;多重耐药;外排泵;实时定量PCR;基因敲除

刘志强, 郑鹏远. 主动外排泵外膜蛋白编码基因*hefA*在幽门螺杆菌多重耐药的重要作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1751-1756

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1751.asp>

## 0 引言

世界50%以上人口存在幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染<sup>[1-4]</sup>。已经证实*H pylori*感染是慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的主要病因,与胃癌的发生亦有密切关系<sup>[5-6]</sup>。随着抗生素在根除*H pylori*治疗中的广泛应用,*H pylori*耐药的发生率不断上升,而且,已经出现同时对甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林耐药的三重耐药株<sup>[7]</sup>。研究表明,能将抗生素主动排出体外的外排泵在细菌的多重耐药机制中起重要作用<sup>[8-11]</sup>。与细菌多重抗生素耐药性有关的主动外排泵系统主要归于5个家族/类<sup>[12-13]</sup>,其中,耐受-生节-分裂家族(resistance-nodulation-division[RND]family),在革兰氏阴性菌多重耐药中起重要作用,能够排出底物相似性很小底物,包括多类抗菌药物,也包括用于消毒灭菌的抑菌剂、去污剂、表面活性剂、染料及有机溶剂等<sup>[8,10]</sup>。杨海燕 *et al*<sup>[14]</sup>研究发现acrAB-RND泵的过度表达与志贺菌的多重耐药产生密切相关。Bina *et al*<sup>[15]</sup>鉴定了*H pylori*中存在*hefABC*, *hefDEF*, *hefGHI* 3种RND类主动外排系统,通过基因敲除技术分别使3种外排泵功能失活后,用纸片扩散法对敲除前后菌株进行药敏试验,结果显示RND类外排泵在

*H pylori*产生多重耐药中的作用仍未明了;而van Amsterdam *et al*<sup>[16]</sup>通过敲除tolC同源<sup>[17]</sup>的外膜通道蛋白编码基因,显示外排泵在*H pylori*对甲硝唑耐药机制中起重要作用,然而外排泵的编码基因在*H pylori*多重耐药株中的表达情况未精确定量。由于亚洲*H pylori*菌株在生物学性状与欧美地区*H pylori*菌株存在诸多不同<sup>[18]</sup>,本文以中国*H pylori*菌株为研究对象,研究主动外排系统*hefABC*在*H pylori*临床分离株中的诱导表达情况,采用更加精确的琼脂二倍稀释法测定*hefA*基因敲除株*H pylori*对多种抗生素的耐药性,为克服*H pylori*的多重耐药产生提供理论基础。结果报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 用于体外诱导耐药试验的*H pylori*和*H pylori* LZ1026株随机选取于消化性溃疡或慢性活动性胃炎患者胃黏膜活检标本(郑州大学第二附属医院消化内科胃镜室, 2006-03/2007-07),采用含70 mL/L羊血的布氏培养基, 37℃微需氧(850 mL/L N<sub>2</sub>、100 mL/L CO<sub>2</sub>、50 mL/L O<sub>2</sub>)、相对湿度>98%的条件下培养3 d,菌株经生化反应(尿素酶、触酶、氧化酶)及HE染色、形态学鉴定,获取临床分离株;*H pylori* NCTC11637、质粒pBluescript II SK(-)和pEGFP-N2由河南分子医学重点实验室提供。阿莫西林、头孢他定、萘啶酸、庆大霉素、多黏霉素B、克拉霉素、氟哌酸、四环素、氯霉素、环丙沙星、甲硝唑、头孢噻肟、琥乙红霉素和青霉素G均购自中国药品生物制品检验所;DNA提取试剂盒、总RNA抽提试剂盒和cDNA第一链合成试剂盒购自北京赛百盛生物公司; pMD19-T vector购自TaKaRa公司; RealMasterMix(SYBR Green)试剂盒均购自宝赛公司; 荧光定量仪: Gene Amp 5700 Sequence Detector定量PCR扩增仪及配套分析软件Gene Amp 5700 SDS(美国Perkin-Elmer公司)。PCR引物设计,参照Bina *et al*<sup>[15]</sup>在GenBank上公布的*H pylori hefABC*基因序列,进行同源性序列分析,在其保守区段内设计,参考文献[19],内参选用*gyrB*基因(DNA旋转酶B亚单位基因),由上海生物工程技术服务公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 多重耐药*H pylori*的体外诱导和筛选:** (1)对临床分离敏感菌株进行单菌落传代培养,测定诱导剂氯霉素对受试菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC); (2)在含

1/2×MIC诱导剂的培养基接种3 μL培养物( $10^8$  cfu/L), 37℃培养48 h. 挑选生长良好的菌落, 接种于含1×MIC诱导剂的培养基, 37℃培养48 h. 不断提高诱导剂在培养基中的浓度, 重复传代培养, 直至诱导剂浓度大于或等于128×MIC, (3)上一步最后得到的耐药株, 作4次无诱导剂传代培养后, 接种于含4×MIC诱导剂的培养基培养, 证实耐药菌株为非适应性耐药<sup>[20-21]</sup>. 将经诱导获得的菌株作琼脂平板培养, 分别接种于含四环素、青霉素G、环丙沙星、甲硝唑、琥乙红霉素药物(4×MIC)的琼脂平板, 37℃培养48 h, 筛选出多重耐药菌株<sup>[22]</sup>.

1.2.2 抗菌药物最低抑菌浓度测定: 用琼脂平皿二倍稀释法测定5种抗菌药物对多重耐药株的最低抑菌浓度. 并确定其多重耐药谱及相应的MIC.

1.2.3 *H pylori hefA*、*hefC*基因的检测: 采用DNA提取试剂盒提取*H pylori*基因组DNA. PCR扩增体系50 μL, 三蒸水24.5 μL, 10×PCR反应缓冲液5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3 μL, 1 mmol/L×dNTP 4 μL, 2.5 μmol/L引物各2.5 μL, 模板DNA 8 μL, 5 U Taq酶0.5 μL, 94℃变性1 min, PCR循环参数为: 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 120 s共30个循环, 最后72℃延伸600 s. 用含0.5 mg/L溴化乙锭的10 g/L琼脂糖电泳分析PCR产物并拍照, 扩增用引物见表1(*hefA*, *hefC*).

1.2.4 *H pylori hefA*基因表达水平的检测与分析: 取37℃微需氧(850 mL/L N<sub>2</sub>、100 mL/L CO<sub>2</sub>、50 mL/L O<sub>2</sub>)、相对湿度>98%的条件下培养3 d *H pylori*, 从培养基上收集*H pylori*重悬于磷酸盐缓冲液中, 紫外分光光度计测定浓度, 当 $A_{660\text{nm}} = 0.1$ , 取1 mL提取其总RNA. *H pylori*总RNA的提取按TRIzol试剂盒说明书步骤操作, 紫外分光光度计测定RNA含量. 反转录体系如下: M-MLV酶200 U, 5×缓冲液4 μL, 0.1 mol/L DTT 2 μL, RNasin 20 U, 5 mmol/L dNTPs 2 μL, RNA 2 μg, 100 mg/L随机引物1 μL, 加DEPC处理水至总体积20 μL, 37℃ 1 h. 将上述反转录产物进行PCR扩增, 引物见表1(*hefA*, *gyrB*), 反应体积及参数同1.2.3.

1.2.5 实时定量PCR: 取*hefA*表达阳性菌株*H pylori* 11032的*hefA*, *gyrB*反转录PCR产物(cDNA), 纯化后连接于pMD19-T质粒, 重组质粒纯化后进行浓度测定, 梯度稀释作为标准曲线用标准品. 25 μL PCR反应体系中包括: 上下游引物各0.5 μL(10 μmol), 2×Mix12.5 μL(包括反应缓冲液、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、SYBRGreen I、

Taq酶), 双蒸水11 μL, cDNA标本1 μL. 将不同浓度的标准模板同时进行PCR, 扩增条件同1.2.4, 循环35次, 同时进行RNA为模板的阴性对照, 每个样本进行三次重复. 将检测的临界点设定在PCR扩增过程中, 荧光信号由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环数(threshold cycle, CT)作为模板初始浓度的间接指标, 将不同浓度的标准模板拷贝的对数和相应的CT值作图, 得到标准曲线. 将所扩增的PCR产物同时进行琼脂糖凝胶电泳和溶解曲线分析<sup>[23-26]</sup>.

1.2.6 *hefA*基因敲除株的构建: DNA扩增、转化、酶切鉴定参照文献[27-28]方法进行, 以临床分离株*H pylori* LZ1026(分离于胃溃疡患者)为模板, PCR扩增*hefA*基因编码区277-1574 bp, 1298 bp大小片段(*hefA*<sup>M</sup>)(参照GenBank上公布的*H pylori* 11637 *hefA*序列设计引物), 以质粒pEGFP-N2为模板, 扩增卡那霉素抗性基因(km<sup>R</sup>), 引物设计及扩增片段大小见表1(*hefA*<sup>M</sup>, km<sup>R</sup>), DNA序列测定由上海生物工程技术服务公司完成. *hefA*, pBluescript II SK(-)经*Xba* I, *Xho* I 双酶切后, 连接鉴定; 在*hefA*基因715 bp位点处插入*kmR*抗性基因, 提取重组质粒电转化经微需氧培养*H pylori*: 自培养72 h的固体培养基上刮取*H pylori*于1 mL150 mL/L甘油-9%蔗糖溶液, 4℃ 5000 r/min离心10 min(重复3次), 沉淀重悬于50 μL150 mL/L甘油-9%蔗糖溶液中, 应用U-2001紫外可见分光光度计, 测定 $A_{660\text{nm}}$ 吸光度值( $A_{660\text{nm}} = 1$ , 细菌浓度约 $10^{11}$  cfu/L), 调整细菌浓度为 $10^{13}$  cfu/L. 4℃放置10 min, 加打靶载体pBSK-*hefA*-mutant 500 ng, 冰上静置5 min, 移入-20℃预冷的0.1 cm电击池中, 冰浴5 min, 电击池置电穿孔架上, 设定电击条件: 25 F, 1.8 kV, 200 Ω, 4.92 s, 电击后, 立即加SOC缓冲液100 μL与电击池中细菌混匀, 静置5 min, 将电转液均匀涂布于普通*H pylori*培养平板上, 37℃微需氧培养48 h后, 刮取平板上所有菌落于无菌生理盐水中混匀, 转涂于含25 mg/L卡那霉素的*H pylori*平板上继续培养3-6 d, 挑取单个菌落培养鉴定. 用琼脂平皿二倍稀释法测定10种抗菌药物对*hefA*基因敲除前后菌株的最低抑菌浓度.

**统计学处理** 采用配对*t*检验分析在野生敏感株和多药耐药株之间mRNA表达水平的差异. 数据采用SPSS10.0统计软件包进行统计分析.

## 2 结果

2.1 临床分离*H pylori*诱导耐药结果 在5株野生敏感株和1株标准株(NCTC11637)中, 经氯霉素

## ■ 相关报道

2000年, Bina *et al* 在*H pylori* 11637菌株中鉴定了3种编码RND外排泵系统同源基因, 分别命名为*hefABC*、*hefDEF*和*hefGHI*. 通过敲除相应编码质膜主动转运体*hefC*、*hefF*和*hefI*结构基因及用质子动力解偶联剂氟氯苯脒(CCCP)抑制外排泵, 分别做药敏试验分析, 得出结论认为*hef*-RND系统在*H pylori*对多种抗生素耐药的内在机制中不起作用.

## ■创新盘点

本文以中国 *H. pylori* 菌株为研究对象, 研究主动外排系统 *hefABC* 在 *H. pylori* 临床分离株中的诱导表达情况, 采用更加精确的琼脂二倍稀释法测定 *hefA* 基因敲除株 *H. pylori* 对多种抗生素的耐药性, 并用实时定量的方法对外排泵的编码基因在 *H. pylori* 多重耐药株中的表达情况精确定量。

表 1 PCR引物列表

引物名称	序列	扩增大小(bp)
<i>hefA</i>	F: 5'-ACGCCTCGAGTAAAAGCGCAAGGGAATTTG-3' R: 5'-ACGCTCTAGATTCGCTAATTGGCCTAGCAT-3'	142
<i>hefC</i>	F: 5'-TGGAAATCACAGAACTAAAAGC-3' R: 5'-TGGTTGAAGGGGCGAATTA-3'	162
<i>gyrB</i>	F: 5'-TTACTACGACTTATCCTGGGGCTAGCGCTG-3' R: 5'-CCCCATCAATTTCCACATTCTCCGC-3'	267
<i>hefA<sup>Δ</sup></i>	F: 5'-GCGCTCGAGGTGGGGCTACCACTAATCTC-3' R: 5'-CGTCTAGACAATCCCTGTGCTGTCTA-3'	1298
<i>km<sup>r</sup></i>	F: 5'-GCAAGCTTAATGATTGAACAAGATGGATTG-3' R: 5'-GCAAGCTTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG-3'	800

黑体部分为基因敲除用酶切位点, F: 上游引物, R: 下游引物。

表 2 氯霉素诱导株的多重耐药性比较 (mg/L)

菌株	处理	甲硝唑	琥乙红霉素	环丙沙星	四环素	青霉素G
03154	诱导前MIC	0.125	0.125	0.25	0.25	0.125
	诱导后MIC提高倍数	8×	4×	4×	8×	16×
12025	诱导前MIC	2.0	0.0625	0.125	0.03	0.0625
	诱导后MIC提高倍数	16×	2×	8×	4×	16×
12021	诱导前MIC	4.0	0.125	0.25	0.125	0.0625
	诱导后MIC提高倍数	16×	1×	16×	8×	8×
11032	诱导前MIC	1.0	0.0625	0.0625	0.0625	0.25
	诱导后MIC提高倍数	8×	4×	4×	16×	16×
03174	诱导前MIC	0.5	0.125	0.25	0.125	0.125
	诱导后MIC提高倍数	8×	1×	8×	4×	32×
11637	诱导前MIC	0.5	0.0625	0.125	0.03	0.25
	诱导后MIC提高倍数	4×	2×	4×	8×	16×

诱导和筛选出的耐药菌株, 均表现出相似的多重耐药性。5种受试的抗菌药中, 四环素、青霉素G、环丙沙星和甲硝唑的MIC都程度不同地明显提高, 其中4株菌未诱导出对琥乙红霉素较高浓度的耐药(表2)。

2.2 临床分离 *H. pylori hefA* 的表达水平 *H. pylori* RNA提取、反转录PCR结果如图1。荧光实时定量PCR检测 *H. pylori hefA* 相对表达量: 本研究中将 *hefA* 基因mRNA的初始浓度与相对应的 *gyrA* 基因的初始浓度相除来进行标准化, 从而得出 *hefA* 基因产物的相对定量。5株敏感野生株和 *H. pylori* 11637中均可检测出不同程度的 *hefA* mRNA表达, 相对表达量为  $2.6356 \pm 1.7245$ ; 其相对应的氯霉素诱导后多药耐药株中亦可检测出 *hefA* mRNA的表达, 其相对表达量为  $5.8466 \pm 2.9370$ (表3)。MDR组 *hefA* 基因表达水平显著高于敏感野生株 ( $P = 0.033$ , 图2)。

2.3 *hefA* 基因敲除株的药敏试验 成功构建了

表 3 敏感野生株及MDR菌株实时定量PCR结果

菌株	WT ( <i>gyrB</i> )	WT ( <i>hefA</i> )	MDR ( <i>gyrB</i> )	MDR ( <i>hefA</i> )	WT ( <i>hefA/gyrB</i> )	MDR ( <i>hefA/gyrB</i> )
03154	0.379	0.71	0.33	0.86	1.87	2.67
12025	0.78	0.25	0.21	0.59	0.32	2.84
12021	0.80	0.98	0.02	0.17	1.22	8.94
11032	0.32	1.26	0.03	0.18	3.84	5.04
03174	0.13	0.54	0.02	0.11	4.16	6.03
11637	0.23	1.03	0.05	0.49	4.41	9.56

WT: 野生敏感株; MDR: 多重耐药株。

*hefA* 基因敲除株 ( $\Delta H. pylori$  LZ1026), *hefA* 基因编码区内1147 bp大小片段被测序并提交GenBank数据库(登录号EU271683)。与基因敲除前野生株 *H. pylori* LZ1026相比, 琼脂稀释法测定MIC显示, 10种抗生素(阿莫西林、头孢他定、萘啶酸、庆大霉素、多粘霉素B、克拉霉素、

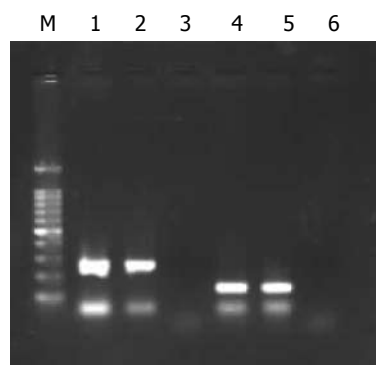


图 1  $hefA$ 、 $gyrB$  反转录 PCR 产物电泳图。M: 100 bp marker; 1-2:  $gyrB$ ; 3-5:  $hefA$ ; 6: RNA 模板阴性对照。

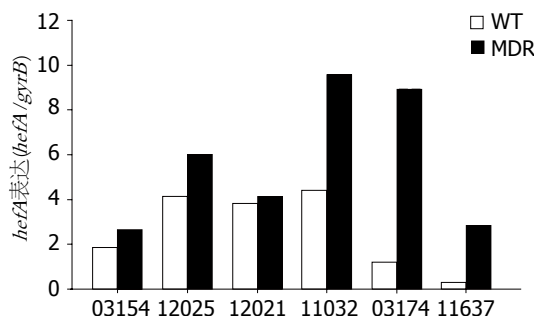


图 2  $hefA$  在野生株和多药耐药株中的表达。

**■应用要点**  
本研究显示外排泵在  $H. pylori$  多重耐药中起重要作用, 从而为  $H. pylori$  的耐药机制找到新的依据, 为  $H. pylori$  多重耐药外排泵抑制剂的研发提供理论基础。

氟哌酸、环丙沙星、头孢噻肟和氯霉素)中, 有4种抗生素MIC比敲除前野生株下降8倍, 分别为: 克拉霉素降低8倍、头孢噻肟降低32倍、氯霉素降低16倍、庆大霉素降低8倍。

**2.4  $H. pylori$   $hefABC$  基因检测结果** 随机筛选20株临床分离幽门螺杆菌均检测出 $hefA$ ,  $hefC$ 基因, PCR扩增产物分别为140 bp、162 bp, 未发现 $hefABC$ 基因缺失株。

### 3 讨论

研究表明, 能将抗生素主动排出体外的外排系统在细菌的多重耐药机制中起重要作用<sup>[8-11]</sup>, 主动外排系统(外排泵)机制被认为是细菌产生多重耐药的主要机制<sup>[8,10]</sup>。革兰氏阴性菌多重耐药中起重要作用RND多重药物主动外排系统, 是由3个蛋白成分形成的蛋白复合体<sup>[9,12]</sup>, 即质膜主动转运体位于细菌质膜(内膜), 并与系于质膜的膜融合蛋白, 及位于细菌外膜但延伸向质膜的外膜因子蛋白一起形成转运复合体, 以达到有效外排药物的功能。RND主动外排系统中3个蛋白成分中任一蛋白的功能缺陷都会导致外排功能的失活。随着抗生素在根除 $H. pylori$ 治疗中的广泛应用,  $H. pylori$ 耐药的发生率不断上升, 而且, 已经出现多重耐药株<sup>[7]</sup>。RND类外排系统介导的药物外排作用是其可能机制。 $H. pylori$ 中存在 $hefABC$ ,  $hefDEF$ ,  $hefGHI$  3种RND类主动外排系统, 其中 $hefA$ ,  $hefD$ ,  $hefG$ 编码外膜因子蛋白,  $hefB$ ,  $hefE$ ,  $hefH$ 编码膜融合蛋白,  $hefC$ ,  $hefF$ ,  $hefI$ 编码质膜主动转运体; 经过反转录PCR扩增, 显示 $hefDEF$ ,  $hefGHI$ 在体外表达量很少或不表达<sup>[15]</sup>。Apweiler *et al*<sup>[29]</sup>报道, 在 $H. pylori$  26695基因组中共有27个外排泵质膜主动转运体基因, 只存在4种编码外膜蛋白基因( $H. pylori$  0605,  $H. pylori$  0971,  $H. pylori$  1327和 $H. pylori$  1489), 外膜蛋白的缺失将严重影响外排系统的功能<sup>[16]</sup>。

本文以 $H. pylori$ 的外膜通道蛋白的编码基因 $hefA$ ( $H. pylori$  0605)为研究对象, 进行了 $H. pylori$

临床分离株在次抑菌浓度下的氯霉素耐药性诱导试验<sup>[9]</sup>, 首次建立了 $H. pylori$ 的多药耐药性诱导试验模型, 因纸片扩散法敏感性差, 可能导致阴性的药敏结果的产生<sup>[15]</sup>, 我们采用琼脂二倍稀释法测定抗生素对菌株的MIC, 经氯霉素诱导后的6株敏感株 $H. pylori$ , 在对氯霉素产生耐药的同时, 也产生了对结构和作用机制不同的四环素、环丙沙星、甲硝唑、琥乙红霉素、青霉素G 5种抗生素不同程度的耐药, 诱导耐药株对5种抗生素的MIC值比诱导前敏感株增加了4倍以上, 提示外排泵的存在<sup>[30]</sup>。本实验中4株菌未诱导出对琥乙红霉素较高浓度的耐药, 可能因为, 与其他革兰氏阴性菌不同<sup>[31-33]</sup>, RND类外排系统在 $H. pylori$ 中有着不同的底物特异性。对其外排泵 $hefABC$ 结构基因中编码外膜通道蛋白基因 $hefA$ 的mRNA表达量, 用实时定量PCR进行精确定量, 显示在多药耐药株中表达量明显高于野生敏感株( $P = 0.033$ )。对中国临床分离株 $H. pylori$  LZ1026通过基因敲除技术, 敲除 $hefA$ 基因, 使 $H. pylori$ 中 $hefABC$ -RND外排系统功能失活, 并测定敲除前后对多种抗生素的MIC, 显示敲除后 $\Delta H. pylori$  LZ1026对10种抗生素中的4种敏感性明显增加, 进一步证实 $hefA$ 基因在 $H. pylori$ 多重耐药产生机制中起重要作用。 $\Delta H. pylori$  LZ1026对其他6种抗生素敏感性与敲除前相比未显示增加, 可能因为 $H. pylori$ 中除了 $hefABC$ 外排系统, 还有其他外排机制的存在<sup>[12]</sup>。

外排泵在敏感菌株之间不表达或表达量很低, 在接触抗生素之后, 表达量明显增加, 从而对在一定抗生素浓度下的细菌起到保护作用, 为存活下来的细菌进一步获得特异性耐药(如药物靶位突变)提供机会, 产生具有临床意义的多重耐药株。多重耐药性外排泵和其他耐药机制如基因位点的突变等机制协同作用, 共同提高 $H. pylori$ 的耐药性, 可能导致高水平耐药株的产生。本研究发现, 对20株临床分离 $H. pylori$   $hefABC$ 基因进行扩增显示, 未见 $hefA$ ,  $hefC$ 基因缺失株, 证明外排



## ■同行评价

本研究方法科学, 结果可靠, 结论有价值, 具有较好的学术价值。

泵在*H pylori*中普遍存在。本研究表明, 外排泵在*H pylori*多重耐药中起重要作用, 介导了*H pylori*多药耐药株的产生。

致谢: 本试验在河南省分子重点实验室完成, 在此感谢段广才、黄志刚及许庆党在试验中给予的大力帮助。

## 4 参考文献

- Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9 Suppl 2: 33-39
- Shi R, Xu S, Zhang H, Ding Y, Sun G, Huang X, Chen X, Li X, Yan Z, Zhang G. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. *Helicobacter* 2008; 13: 157-165
- Raymond J, Nguyen VB, Vidal-Trecan G, Kalach N. *Helicobacter pylori* infection in children of developing countries. *Med Trop (Mars)* 2005; 65: 383-388
- Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 205-214
- Axon AT. Relationship between *Helicobacter pylori* gastritis, gastric cancer and gastric acid secretion. *Adv Med Sci* 2007; 52: 55-60
- Makola D, Peura DA, Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 548-558
- 陈洁, 陈飞波, 余金丹, 陈学军, 李中跃, 章许平. 幽门螺杆菌对克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑体外耐药性和敏感性的初步分析. *中华儿科杂志* 2004; 42: 769
- Borges-Walmsley MJ, Walmsley AR. The structure and function of drug pumps. *Trends Microbiol* 2001; 9: 71-79
- Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 1998; 27 Suppl 1: S32-S41
- Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol* 1999; 31: 394-395
- De Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30: 36-52
- Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 672-693
- Zgurskaya HI, Krishnamoorthy G, Tikhonova EB, Lau SY, Stratton KL. Mechanism of antibiotic efflux in Gram-negative bacteria. *Front Biosci* 2003; 8: s862-s873
- 杨海燕, 段广才, 郝园林. 主动外排系统acrAB在志贺菌中分布和表达. *中国公共卫生* 2005; 21: 685
- Bina JE, Alm RA, Uria-Nickelsen M, Thomas SR, Trust TJ, Hancock RE. *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 248-254
- van Amsterdam K, Bart A, van der Ende A. A *Helicobacter pylori* TolC efflux pump confers resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1477-1482
- Koronakis V, Eswaran J, Hughes C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 467-489
- Monteiro MA, Zheng P, Ho B, Yokota S, Amano K, Pan Z, Berg DE, Chan KH, MacLean LL, Perry MB. Expression of histo-blood group antigens by lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains from asian hosts: the propensity to express type 1 blood-group antigens. *Glycobiology* 2000; 10: 701-713
- 余菲菲, 丁惠, 林建银, 刘君炎, 陈月秀. 球形与螺旋形幽门螺杆菌基因表达差异的研究. *中国微生态学杂志* 2003; 15: 131
- 苏林光, 贾杰, 潘光华. 次抑菌浓度的药物诱导细菌耐药与交叉耐药. *中国抗生素杂志* 1997; 22: 301
- 张海旺, 邓旭明, 任晓慧, 唐峰, 褚秀玲. 主动外排系统介导的大肠杆菌多重耐药性的确证. *中国兽医学报* 2005; 25: 173
- 梁晓, 刘文忠, 陆红, 徐蔚文, 萧树东. 幽门螺杆菌体外诱导耐药试验和耐药率监测. *中华消化杂志* 2003; 23: 146-148
- Aellen S, Que YA, Guignard B, Haenni M, Moreillon P. Detection of live and antibiotic-killed bacteria by quantitative real-time PCR of specific fragments of rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1913-1920
- Nygard AB, Jorgensen CB, Cirera S, Fredholm M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 67
- Romanowski T, Markiewicz A, Bednars N, Bielawski KP. Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; 61: 500-510
- Shamanina MI, Vavilin VA, Mordvinov VA, Katokhin AV, Kuznetsova TN, Liakhovich VV. Real-time polymerase chain reaction and its potential clinical application. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2007; 37-46
- Yuan JP, Li T, Shi XD, Hu BY, Yang GZ, Tong SQ, Guo XK. Deletion of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene by introduction of directed mutagenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2251-2257
- Burns BP, Hazell SL, Mendz GL, Kolesnikow T, Tillet D, Neilan BA. The *Helicobacter pylori* pyrB gene encoding aspartate carbamoyltransferase is essential for bacterial survival. *Arch Biochem Biophys* 2000; 380: 78-84
- Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh LS. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D115-D119
- Wierzbowski AK, Boyd D, Mulvey M, Hoban DJ, Zhanel GG. Expression of the mef(E) gene encoding the macrolide efflux pump protein increases in *Streptococcus pneumoniae* with increasing resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4635-4640
- Burse A, Weingart H, Ullrich MS. NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in in vitro competition with other epiphytic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 693-703
- Fehlner-Gardiner CC, Valvano MA. Cloning and characterization of the *Burkholderia vietnamiensis* norM gene encoding a multi-drug efflux protein. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215: 279-283
- Morita Y, Kodama K, Shiota S, Mine T, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1778-1782

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

# E-cadherin、 $\beta$ -catenin和CathepsinD在食管鳞状细胞癌中的表达及其意义

马红, 陈晓, 马海梅, 尼加提·热合木, 蒲红伟

马红, 陈晓, 马海梅, 尼加提·热合木, 蒲红伟, 新疆医科大学基础医学院病理学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830011

马红, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事肿瘤病理学研究。

作者贡献分布: 此课题由马红, 陈晓及尼加提·热合木设计; 研究过程由马红, 马海梅及蒲红伟操作完成; 数据分析由马红, 陈晓及马海梅完成; 本论文写作由马红与陈晓完成。

通讯作者: 陈晓, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新医路8号, 新疆医科大学基础医学院. chen-xiao2626@163.com  
电话: 0991-4361759

收稿日期: 2007-12-28 修回日期: 2008-04-10

## Significance of E-cadherin, $\beta$ -catenin and CathepsinD expression in esophageal squamous cell carcinoma

Hong Ma, Xiao Chen, Hai-Mei Ma, Rehemu·Nijati, Hong-Wei Pu

Hong Ma, Xiao Chen, Hai-Mei Ma, Rehemu·Nijati, Hong-Wei Pu, Pathology Section, Preclinical Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Xiao Chen, Preclinical Medical College, Xinjiang Medical University, 8 Xinyi Road, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. chen-xiao2626@163.com

Received: 2007-12-28 Revised: 2008-04-10

## Abstract

**AIM:** To investigate the correlation between expression of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and CathepsinD, and to determine their clinicopathologic features in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

**METHODS:** Sixty surgically excised and pathologically confirmed ESCC specimens were selected from preclinical medical college, Xinjiang Medical University from June 2003 to July 2007, while 15 cases of normal esophageal tissues were taken as the control group. Immunohistochemical EnVision method was used to determine the expression of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and CathepsinD in 60 ESCC specimens and 15 specimens of normal esophageal tissues, and their correlation with the clinicopathologic characteristics of ESCC were analyzed.

**RESULTS:** Aberrant expression rates of E-cadherin and  $\beta$ -catenin were 61.67% and 66.67% respectively, and the positive expression rate of CathepsinD was 60% in ESCC, which were all higher than those in normal esophageal tissues (0%, 0%, 0%, all  $P < 0.01$ ), respectively. Aberrant expression rates of E-cadherin and  $\beta$ -catenin and the positive expression rate of CathepsinD were significantly higher in the moderate-low differentiation group, infiltration into muscular layer group, lymphatic metastasis group than in the well-differentiated ESCC group, no infiltration into muscular layer group, non-metastatic group ( $P < 0.01$ ). E-cadherin aberrant expression was positively correlated with  $\beta$ -catenin in ESCC ( $r = 0.679$ ,  $P < 0.01$ ). The positive expression of CathepsinD was positively correlated with aberrant expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin ( $r = 0.616$ ,  $r = 0.505$ , both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Aberrant expression of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and positive expression of CathepsinD suggest their correlation with infiltration and development of ESCC. E-cadherin,  $\beta$ -catenin and CathepsinD can be used as valuable molecular markers for progression and prognosis of ESCC.

**Key Words:** E-cadherin;  $\beta$ -catenin; CathepsinD; Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry

Ma H, Chen X, Ma HM, NiJT·RHM, Pu HW. Significance of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and CathepsinD expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1757-1762

## 摘要

**目的:** 探讨上皮型钙黏素(E-cadherin)、 $\beta$ -连环素( $\beta$ -catenin)和组织蛋白酶D(CathepsinD)在食管鳞状细胞癌(ESCC)中的表达及其与临床病理特征的关系。

**方法:** 选取新疆医科大学第一附属医院2003-06/2007-07手术切除并经病理证实的ESCC标本60例, 同时选取15例正常食管组

## ■背景资料

食管癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤, 居肿瘤死亡的第4位, 且以鳞状细胞癌为主。我国新疆维吾尔自治区是食管癌高发区之一, 且食管癌的发生有着显著的地域性和民族聚集性特征, 哈萨克族是食管癌高发民族之一。侵袭转移是造成食管癌患者死亡的主要原因。因此, 阐明食管癌浸润、转移机制显得尤为重要。

## ■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

## ■相关报道

王斌 *et al* 研究表明随着食管鳞癌分化程度降低、浸润深度增加和临床分期加重及淋巴结转移的发生, E-cad阳性表达率下降, 且E-cad阴性表达患者术后复发转移机会增多, 存活率减低。

组织作对照。采用免疫组织化学EnVision二步法检测各组织中E-cadherin、 $\beta$ -catenin及CathepsinD的表达, 分析其与食管鳞状细胞癌临床病理特征的关系。

**结果:** ESCC组织中, E-cadherin和 $\beta$ -catenin异常表达率分别为61.67%和66.67%, CathepsinD的阳性表达率为60%, 分别高于正常食管组织(0%, 0%, 0%, 均 $P<0.01$ )。中低分化组、侵及肌层组及有淋巴结转移组中, E-cadherin和 $\beta$ -catenin的异常表达和CathepsinD的阳性表达均高于高分化组、未侵及肌层组及无淋巴结转移组, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。ESCC组织中E-cadherin和 $\beta$ -catenin的异常表达呈正相关( $r = 0.679, P<0.01$ ), CathepsinD的阳性表达与E-cadherin、 $\beta$ -catenin的异常表达呈正相关( $r = 0.616, r = 0.505, P<0.01$ )。

**结论:** ESCC中E-cadherin、 $\beta$ -catenin的异常表达和CathepsinD的阳性表达与肿瘤的浸润和发展有关, 联合检测E-cadherin、 $\beta$ -catenin和CathepsinD有可能成为判断ESCC恶性程度和预后的重要指标。

**关键词:** 上皮型钙黏素;  $\beta$ -连环素; 组织蛋白酶D; 食管鳞状细胞癌; 免疫组化

马红, 陈晓, 马海梅, 尼加提·热合木, 蒲红伟. E-cadherin、 $\beta$ -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(16): 1757-1762  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1757.asp>

## 0 引言

食管癌是世界上最常见的十大恶性肿瘤之一, 据世界范围内统计, 每年大约有30万的食管癌新发病例, 并且大多发生于发展中国家<sup>[1]</sup>。我国新疆维吾尔自治区食管癌死亡率为13.05/10万, 在全国居第13位, 其中哈萨克族是食管癌高发民族之一, 其食管癌死亡率为68.88/10万, 且具有明显的地区性和家族聚集性<sup>[2-3]</sup>。侵袭转移是食管癌患者死亡的首要原因<sup>[4]</sup>。因此, 阐明食管癌浸润、转移机制显得尤为重要。本研究采用免疫组织化学方法检测食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中上皮型钙黏素(E-cadherin, E-cad)、 $\beta$ -连环素( $\beta$ -catenin,  $\beta$ -cat)和组织蛋白酶D(CathepsinD, Cath-D)的表达, 探讨他们在ESCC发生发展及侵袭转移中的作用和意义<sup>[5-6]</sup>。

## 1 材料和方法

1.1 材料 选取新疆医科大学第一附属医院

2003-06/2007-07手术切除并经病理证实ESCC标本60例, 男33例, 女27例, 年龄38-74(中位年龄62)岁。所有病例术前未经任何放疗和化疗。按照WHO分类标准进行病理分级: 高分化26例, 中低分化34例。无淋巴结转移31例, 有淋巴结转移29例; 未侵及肌层15例, 侵及肌层45例。汉族36例, 哈萨克族24例。同时选取15例正常食管组织(距食管鳞癌原发灶3 cm)作对照。标本均经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续4  $\mu$ m厚度切片。鼠抗人E-cad(MAB-0247)mAb、鼠抗人 $\beta$ -cat(MAB-0259)mAb和兔抗人Cath-D(RAB-0029)pAb均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 方法 按免疫组织化学EnVision法检测ESCC组织中E-cad、 $\beta$ -cat和Cath-D蛋白的表达。用已知乳腺癌组织作为阳性对照, 0.01 mol/L PBS代替一抗作空白对照。E-cad和 $\beta$ -cat阳性染色为细胞膜出现棕黄色颗粒。每张切片随机选择10个高倍视野, 每个视野计数100个细胞。正常表达: 阳性细胞数 $\geq 90\%$ ; 异常表达: 切片内阳性细胞 $<90\%$ 。Cath-D以胞质有明显棕黄色颗粒为阳性, 无明显阳性细胞或阳性细胞小于25%为阴性, 阳性细胞大于25%为阳性。

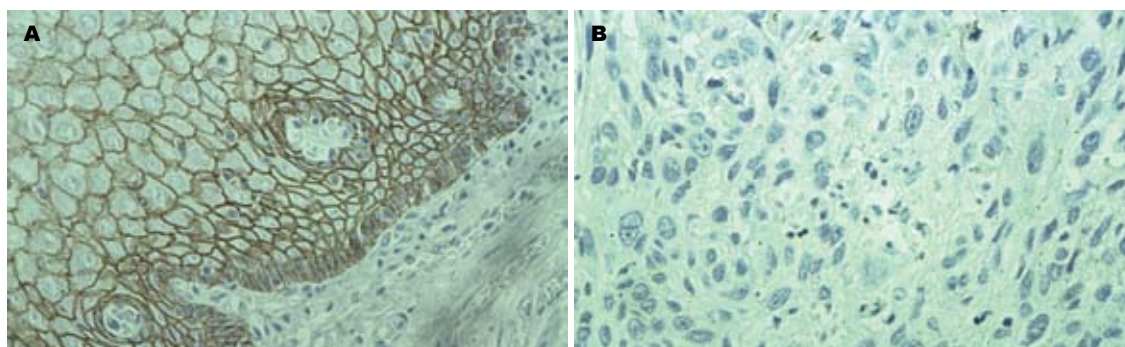
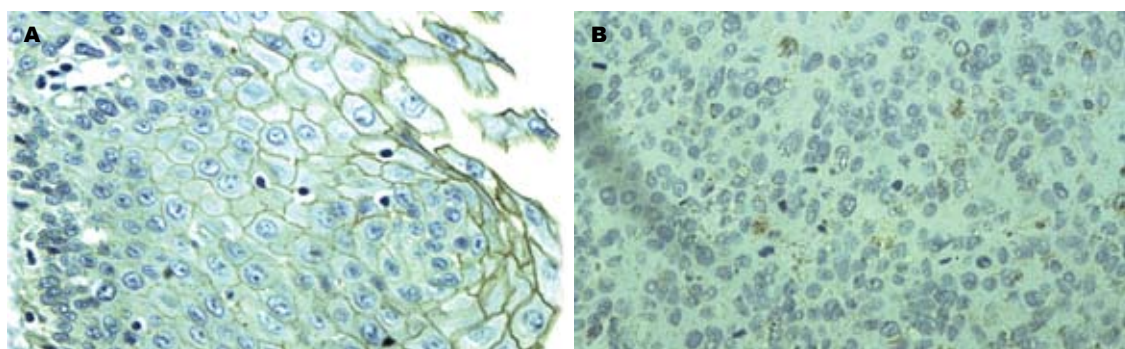
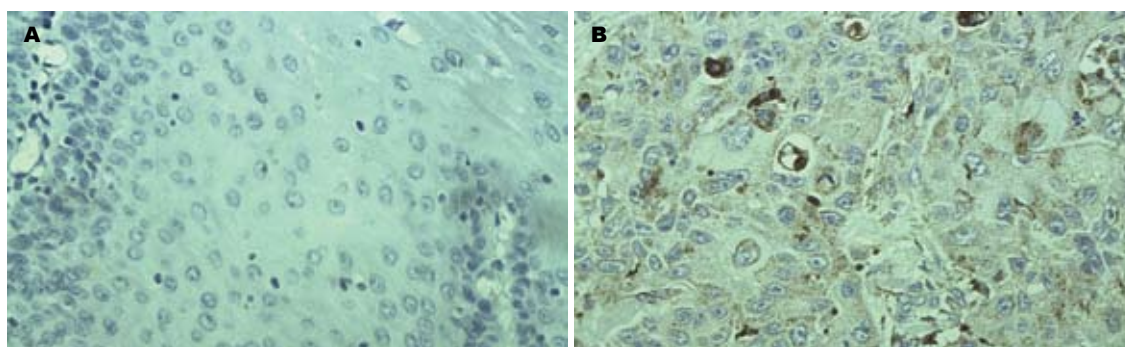
**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件包进行 $\chi^2$ 检验及Spearman相关分析,  $P<0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 E-cad、 $\beta$ -cat和Cath-D在正常食管组织和ESCC中的表达 15例正常食管黏膜上皮中E-cad和 $\beta$ -cat均呈正常表达, 细胞膜为棕黄色, 胞质和胞核未见表达(图1A, 图2A), Cath-D呈阴性表达(图3A)。60例ESCC组织中, E-cad和 $\beta$ -cat细胞膜表达降低,  $\beta$ -cat部分出现细胞质阳性异常染色或以细胞质为主的混合性染色, 异常表达率分别为61.67%(37/60)和66.67%(40/60)(图1B, 图2B)。Cath-D的阳性表达率为60%(36/60), 高于正常食管组织(0%)( $P<0.01$ , 表1), 癌细胞胞质和部分间质细胞出现棕黄色颗粒(图3B)。

2.2 E-cad、 $\beta$ -cat和Cath-D与ESCC临床病理特征的关系 E-cad在有淋巴结转移组中的异常表达率82.76%(24/29)高于无淋巴结转移组41.94%(13/31), 两组差异有统计学意义( $P<0.01$ ); E-cad在中低分化组和侵及肌层组中的异常表达率分别为85.29%、73.33%, 分别高于高分化组和未侵及肌层组, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。 $\beta$ -cat在中低分化组、侵及肌层组及



图 1 E-cad的表达(EnVision  $\times 400$ ). A: 正常食管黏膜; B: ESCC组织.图 2  $\beta$ -cat的表达(EnVision  $\times 400$ ). A: 正常食管黏膜; B: ESCC组织.图 3 Cath-D的表达(EnVision  $\times 400$ ). A: 正常食管黏膜; B: ESCC组织.

## ■创新盘点

本研究联合检测 E-cad、 $\beta$ -cat 和 Cath-D 在食管鳞状细胞癌中的表达及相关性, 对判断食管鳞状细胞癌恶性程度、预测侵袭转移趋势和预后具有重要意义.

表 1 E-cad、 $\beta$ -cat 和 Cath-D 在正常食管组织及食管鳞状细胞癌中的表达 ( $n, \%$ )

分组	$n$	E-cad		$\beta$ -cat		Cath-D	
		正常	异常	正常	异常	阴性	阳性
对照组	15	15(100)	0(0)	15(100)	0(0)	15(100)	0(0)
ESCC	60	23(38.33)	37(61.67)	20(33.33)	40(66.67)	24(40)	36(60)

有淋巴结转移组中异常表达率分别为88.23%、77.78%和86.21%, 分别高于高分化组、未侵及肌层组及无淋巴结转移组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ). Cath-D在中低分化组、侵及肌层组及有淋巴结转移组中异常表达率分别为76.47%、73.33%和89.66%, 分别高于高分化组、未侵及

肌层组及无淋巴结转移组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 表2). E-cad、 $\beta$ -cat 和 Cath-D在汉族、哈萨克族食管癌中的表达, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表2).

2.3 E-cad、 $\beta$ -cat 和 Cath-D在ESCC中表达的关系  
在60例ESCC组织中, E-cad和 $\beta$ -cat均正常表达者17例, 均异常表达者34例, 两者的表达呈正相关 ( $r = 0.679$ ,  $P < 0.01$ ). 在E-cad正常表达的23例中, 5例Cath-D呈阳性表达; 而在E-cad异常表达的37例中, 31例Cath-D呈阳性表达, E-cad异常表达与Cath-D阳性表达呈正相关 ( $r = 0.616$ ,  $P < 0.01$ ).  $\beta$ -cat正常表达的20例中, 5例Cath-D呈阳性表达; 而在 $\beta$ -cat异常表达的40例中, 31例Cath-D呈阳性表达,  $\beta$ -cat异常表达与Cath-D阳性表达呈正相



## ■应用要点

E-cad、 $\beta$ -cat异常表达可能与食管鳞状细胞癌发生和发展有关,联合检测E-cad和 $\beta$ -cat蛋白表达可能成为监测食管鳞状细胞癌恶性程度和转移潜能的重要指标。

表 2 E-cad、 $\beta$ -cat异常表达和Cath-D阳性表达与食管鳞状细胞癌临床病理特征的关系

临床病理特征			E-cad		$\beta$ -cat		Cath-D	
			<i>n</i>	异常表达( <i>n</i> ) %	异常表达( <i>n</i> ) %	异常表达( <i>n</i> ) %	阳性表达( <i>n</i> ) %	阳性表达( <i>n</i> ) %
分化程度	高	26	8	30.77	10	38.46	10	38.46
	中/低	34	29	85.29	30	88.23	26	76.47
浸润深度	未侵及肌层	15	4	26.67	5	33.33	3	20.00
	侵及肌层	45	33	73.33	35	77.78	33	73.33
淋巴结转移	有	29	24	82.76	25	86.21	26	89.66
	无	31	13	41.94	15	48.39	10	32.26
民族	汉族	36	21	58.33	22	61.11	21	58.33
	哈萨克族	24	16	66.67	18	75.00	15	62.50

关( $r = 0.505, P < 0.01$ ).

## 3 讨论

E-cad是一类介导细胞之间互相黏附的钙依赖性跨膜糖蛋白, E-cad胞质末端与连环蛋白( $\alpha$ -cat,  $\beta$ -cat,  $\gamma$ -cat)及肌动蛋白细胞骨架结合形成钙黏附素连环素复合体(E-cad/cat), 不仅介导细胞黏附, 还直接和间接的参与细胞内信号传导, 与肿瘤的侵袭和转移行为密切相关<sup>[7-8]</sup>. 已有研究认为在胃癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤中E-cad表达缺失, 会触发癌细胞从原发癌巢释放并赋予肿瘤细胞侵袭特性<sup>[9-12]</sup>. 王斌 *et al*<sup>[13]</sup>研究表明, 随着食管鳞癌分化程度降低、浸润深度增加和临床分期加重及淋巴结转移的发生, E-cad阳性表达率下降, 且E-cad阴性表达患者术后复发转移机会增多, 存活率减低. 本研究结果显示, E-cad在正常食管黏膜上皮中呈正常表达, 而在ESCC中出现膜表达降低, 异常表达率为61.67%; 且随着ESCC分化程度的降低、浸润深度的增加及淋巴结转移的发生, E-cad异常表达率升高, 提示E-cad的异常表达促进ESCC去分化、侵袭和转移, 可作为肿瘤预后不良的分子标志. 基因突变、转录和翻译失常等导致E-cad异常表达, 使肿瘤细胞黏附功能降低, 肿瘤细胞易从原发部位脱落, 这一现象可能在肿瘤的扩散中起关键性的启动作用. 张友才 *et al*<sup>[14]</sup>研究表明E-cad基因启动子CpG岛甲基化可能参与胃肠腺癌的发生. 目前, 在对食管癌中E-cad调控的确切机制尚待深入研究.

在catenin家族中以 $\beta$ -cat与肿瘤的关系最为密切<sup>[15]</sup>.  $\beta$ -cat除与E-cad结合介导细胞黏附反应外, 还参与Wnt信号转导通路<sup>[16]</sup>. 当 $\beta$ -cat蛋白本身异常或降解途径异常时, 造成Wnt信号传导通路的异常激活,  $\beta$ -cat进入核内与转录调控因子

TCF/LEF家族成员结合, 继而激活下游靶基因CyclinD1, *c-mys*等癌基因, 导致肿瘤的发生<sup>[17-18]</sup>. Kawasaki、Zhang *et al*报道 $\beta$ -cat与结直肠癌、乳腺癌和胃癌等多种肿瘤发生有关<sup>[19-21]</sup>. 吴永廉 *et al*<sup>[22]</sup>应用免疫组化SP法检测 $\beta$ -cat在100例食管癌组织中的表达, 研究结果表明,  $\beta$ -cat在分化程度低和浸润深的食管癌组织中异常表达率高, 淋巴结有转移的比无转移的异常表达率高, 且 $\beta$ -cat异常表达者5年生存率低, 认为 $\beta$ -cat异常表达与食管癌浸润转移存在一定关系. 本研究结果显示,  $\beta$ -cat在正常食管黏膜上皮中呈正常表达, 而在ESCC中出现膜表达降低, 部分出现细胞质阳性异常染色, 异常表达率为66.67%; 中低分化组、侵及肌层组和有淋巴结转移组中 $\beta$ -cat异常表达率明显高于高分化组、未侵及肌层组和无淋巴结转移组, 提示 $\beta$ -cat异常表达介导的Wnt信号通路异常激活导致ESCC发生可能是早期事件; 而 $\beta$ -cat异常表达导致E-cad/cat复合体结构破坏和功能障碍, 是肿瘤获得高侵袭、转移潜能的重要原因之一, 可能是ESCC发生发展过程中的晚期事件.

Cath-D是一种天门冬氨酸肽链内切酶, 广泛存在于不同的组织细胞和肿瘤细胞, 研究认为Cath-D能溶解基底膜、细胞外基质和结缔组织, 从而在恶性肿瘤细胞的浸润和转移机制上起着一种重要作用<sup>[23-24]</sup>. 关于Cath-D的表达在乳腺癌浸润转移中的意义, 目前尚存在一定争议, 绝大多数研究认为Cath-D高表达提示预后不良<sup>[25-26]</sup>. 吴风云 *et al*<sup>[27]</sup>采用免疫组化法对160例乳腺癌标本进行分析, 发现Cath-D表达与临床分期、肿块大小和组织学分级有关, 提示Cath-D过度表达与乳腺癌细胞浸润性生长存在密切关系. 然而Cath-D表达与腋淋巴结转移无明显相关性, 认为Cath-D在影响癌细胞淋巴结转移上作用不大, 由

于Cath-D对肿瘤血管基底膜具有溶解作用,使肿瘤细胞能够进入血管,故其诱发肿瘤细胞转移的主要途径很可能是血道转移。本研究显示,ESCC中Cath-D的表达阳性率为60%,Cath-D在中低分化组、侵及肌层组及有淋巴结转移组中异常表达率分别为76.47%、73.33%和89.66%,分别高于高分化组、未侵及肌层组及无淋巴结转移组,且Cath-D在部分间质细胞亦有表达,由此提示Cath-D阳性表达可能与ESCC的生长和分化有关,是ESCC演进过程动态变化的形态和功能特征之一;其机制可能与肿瘤细胞分泌Cath D降解基底膜和细胞外基质,促进肿瘤细胞向外侵袭和转移有关。

另外,实验结果显示ESCC中E-cad和 $\beta$ -cat的表达呈正相关,提示在ESCC发展过程中E-cad和 $\beta$ -cat可能具有协同作用,对ESCC恶性转化及侵袭性生长具有重要意义。Cath-D的阳性表达与E-cad和 $\beta$ -cat的异常表达呈正相关( $P<0.01$ ),提示在ESCC的发生发展、浸润转移过程中Cath-D与E-cad和 $\beta$ -cat可能具有协同作用。其确切调控机制有待进一步探讨。本研究发现在60例汉族和哈萨克族ESCC中,E-cad、 $\beta$ -cat和Cath-D的表达在不同民族之间无显著性差异,提示在新疆的汉族和哈萨克族ESCC的发生发展中,E-cad、 $\beta$ -cat和Cath-D的表达具有共同性,无民族间基因背景差异。

总之,在肿瘤发生发展的多基因网络调节过程中,E-cad和 $\beta$ -cat异常表达导致细胞黏附复合体功能异常,Cath-D降解细胞外基质、破坏宿主屏障,他们共同促进肿瘤的侵袭和转移。因此,联合检测E-cad、 $\beta$ -cat和Cath-D的表达在预测ESCC转移潜能、评价预后、指导临床处理等方面有重要意义。

#### 4 参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543
- 2 陈晓,张月明,温浩,阿孜古丽·吐尔逊江,吴明拜,张铸,赵春芳,冯晓辉,王昊,张亚楼,伊力亚尔. 原代培养建立哈萨克族食管癌细胞系的研究. *新疆医科大学学报* 2002; 25: 20-21
- 3 陈晓,张亚楼,拉莱·苏孜克. 新疆哈萨克族与汉族食管鳞癌组织中Survivin、Fas、bax的表达及其与细胞凋亡的关系. *陕西医学杂志* 2006; 35: 1256-1259
- 4 李杰茹,齐凤英,左连富,李丽,李子良. MMP-2与TIMP-2的比值与食管癌侵袭转移的关系. *肿瘤防治杂志* 2005; 12: 1083-1086
- 5 Wang K, Ma Q, Ren Y, He J, Zhang Y, Zhang Y, Chen W. Geldanamycin destabilizes HER2 tyrosine kinase and suppresses Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in HER2 overexpressing human breast cancer cells.

- Oncol Rep* 2007; 17: 89-96
- 6 Dvalishvili I, Charkviani L, Charkviani T, Turashvili G, Burkadze G. Clinical prognostic factors and expression of cathepsin D in endometrioid adenocarcinoma. *Georgian Med News* 2005; 27-31
- 7 Shih HC, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Feng YZ, Kurai M, Konishi I. Immunohistochemical expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in the normal and malignant human endometrium: an inverse correlation between E-cadherin and nuclear  $\beta$ -catenin expression. *Anticancer Res* 2004; 24: 3843-3850
- 8 Pelosi G, Scarpa A, Puppa G, Veronesi G, Spaggiari L, Pasini F, Maisonneuve P, Iannucci A, Arrigoni G, Viale G. Alteration of the E-cadherin/ $\beta$ -catenin cell adhesion system is common in pulmonary neuroendocrine tumors and is an independent predictor of lymph node metastasis in atypical carcinoids. *Cancer* 2005; 103: 1154-1164
- 9 Agnantis NJ, Goussia AC, Batistatou A, Stefanou D. Tumor markers in cancer patients. an update of their prognostic significance. Part II. *In Vivo* 2004; 18: 481-488
- 10 Ge J, Chen ZH, Chen ZK, Yuan WJ. Expressions of homeobox transcription factor-2 and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2008; 28: 279-281
- 11 Saha B, Chaiwun B, Imam SS, Tsao-Wei DD, Groshen S, Naritoku WY, Imam SA. Overexpression of E-cadherin protein in metastatic breast cancer cells in bone. *Anticancer Res* 2007; 27: 3903-3908
- 12 Weng MX, Wu CH, Yang XP. Expression and Significance of E-cadherin, CD44v6, and Proliferating Cell Nuclear Antigen in Non-small Cell Lung Cancer. *Ai Zheng* 2008; 27: 191-195
- 13 王斌,徐少勇,曹淑芬,张丽,卢光新,杜勇. E-钙粘素和CD44V6表达与食管癌预后的关系. *中国现代医学杂志* 2006; 16: 2468-2471
- 14 张友才,陈金霞,陈永平,邓长生. 上皮型钙粘素基因启动子甲基化与胃肠腺癌的关系及意义. *山东医药* 2007; 47: 16-17
- 15 Sierra J, Yoshida T, Joazeiro CA, Jones KA. The APC tumor suppressor counteracts  $\beta$ -catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev* 2006; 20: 586-600
- 16 Michaelson JS, Leder P.  $\beta$ -catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene* 2001; 20: 5093-5099
- 17 Prasad CP, Gupta SD, Rath G, Ralhan R. Wnt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between  $\beta$ -catenin, dishevelled and cyclin D1 expression. *Oncology* 2007; 73: 112-117
- 18 Ravindranath A, O'Connell A, Johnston PG, El-Tanani MK. The role of LEF/TCF factors in neoplastic transformation. *Curr Mol Med* 2008; 8: 38-50
- 19 Kawasaki T, Noshio K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Dehari R, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Ogino S. Correlation of  $\beta$ -catenin localization with cyclooxygenase-2 expression and CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Neoplasia* 2007; 9: 569-577
- 20 Zhang YG, Du J, Tian XX, Zhong YF, Fang WG. Expression of E-cadherin,  $\beta$ -catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal

#### ■名词解释

钙黏附素连环素复合体: E-cad胞内区与连环素及肌动蛋白细胞骨架结合形成钙黏附素连环素复合体。不仅介导细胞黏附,还直接和间接的参与细胞内信号传导,与肿瘤的侵袭和转移行为密切相关。

## ■同行评价

本文条理清晰, 实验技术方法成熟, 对照合理, 具有一定的参考价值和临床意义。

- breast carcinomas. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 1597-1605
- 21 Udhayakumar G, Jayanthi V, Devaraj N, Devaraj H. Interaction of MUC1 with beta-catenin modulates the Wnt target gene cyclinD1 in *H. pylori*-induced gastric cancer. *Mol Carcinog* 2007; 46: 807-817
- 22 吴永廉, 郑建盛, 陈秀娇.  $\alpha$ -cat和 $\beta$ -cat及E-cad在食管癌组织中的表达及其临床意义. *中华肿瘤防治杂志* 2006; 13: 752-755
- 23 Glondou M, Liaudet-Coopman E, Derocq D, Platet N, Rochefort H, Garcia M. Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 5127-5134
- 24 Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 355-366
- 25 Kristek J, Dmitrovic B, Kurbel S, Sakic K, Krajcinovic Z, Blazicevic V, Has B, Marjanovic K. Tumor growth fraction, expression of estrogen and progesterone receptors, p53, bcl-2 and cathepsin D activity in primary ductal invasive breast carcinoma and their axillary lymph node metastases. *Coll Antropol* 2007; 31: 1043-1047
- 26 Fernandez-Aguilar S, Noel JC. Expression of cathepsin D and galectin 3 in tubular carcinomas of the breast. *APMIS* 2008; 116: 33-40
- 27 吴凤云, 刘运江. 组织蛋白酶D在乳腺癌浸润转移中作用的研究. *肿瘤防治研究* 2004; 31: 730-732

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志修回稿须知

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

## 1 修回稿信件

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

## 2 稿件修改

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

## 3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑: 张海宁 2008-06-08)

# 胃泌素和生长激素在卵巢癌患者胃轻瘫发生中的作用

夏志军, 吴波, 谷艳萍, 胡清, 陈少夫, 赵晓东

夏志军, 胡清, 中国医科大学盛京医院妇产科 辽宁省沈阳市 110004

吴波, 中国医科大学盛京医院内分泌科 辽宁省沈阳市 110004

谷艳萍, 大石桥市中心医院妇产科 辽宁省大石桥市 115000

陈少夫, 中国医科大学盛京医院消化科 辽宁省沈阳市 110004

赵晓东, 中国医科大学盛京医院病理科 辽宁省沈阳市 110004

夏志军, 2005年中国医科大学博士, 副教授, 主要从事妇科肿瘤的研究尤其是卵巢癌的研究。

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 2005-2008

作者贡献分布: 夏志军与吴波对此文所作贡献均等; 此课题由夏志军, 吴波及陈少夫设计; 研究过程由陈少夫, 赵晓东及胡清操作完成; 数据分析由谷艳萍与胡清完成; 本论文写作由夏志军与吴波完成。

通讯作者: 夏志军, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院妇产科. xiazhijunhosp2@sina.com

收稿日期: 2007-11-13 修回日期: 2008-03-19

## Roles of gastrin and somatostatin in ovarian cancer with gastroparesis syndrome

Zhi-Jun Xia, Bo Wu, Yan-Ping Gu, Qing Hu, Shao-Fu Chen, Xiao-Dong Zhao

Zhi-Jun Xia, Qing Hu, Department of Gynecology and Obstetrics, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Bo Wu, Department of Endocrinology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Yan-Ping Gu, Department of Gynecology and Obstetrics, Central Hospital of Dashi-qiao city, Dashi-qiao 115000, Liaoning Province, China

Shao-Fu Chen, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Xiao-Dong Zhao, Department of Pathology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 2005-2008

Correspondence to: Zhi-Jun Xia, Department of Gynecology and Obstetrics, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. xiazhijunhosp2@sina.com

Received: 2007-11-13 Revised: 2008-03-19

## Abstract

**AIM:** To determine roles of gastrin(GAS) and somatostatin(SS) in ovarian cancer with gastroparesis syndrome, and therefore to explore approaches to early diagnosis and treatment for ovarian cancer.

**METHODS:** Fifty-six patients with pathologically-confirmed ovarian cancer admitted to our hospital from January 2005 to January 2007 were divided into three groups: normal control group, ovarian benign tumor group and ovarian malignant tumor group. Radioimmunity method and RT-PCR were performed to measure expressions of GAS and SS in the serum and tissues. Their correlation with ovarian cancer were analyzed using *t* test.

**RESULTS:** In ovarian malignant tumor group, expression of serum GAS was elevated while serum SS was decreased. There was very significant difference between the malignant group and the control group (GAS:  $146.6 \pm 28.8$  ng/L vs  $83.5 \pm 14.4$  ng/L, SS:  $16.2 \pm 3.9$  ng/L vs  $52.1 \pm 15.1$  ng/L, both  $P < 0.01$ ). There was significant difference between the malignant and benign tumor groups (GAS:  $102.2 \pm 21.5$  ng/L, SS:  $42.6 \pm 13.6$  ng/L,  $P < 0.05$ ). There was significant difference between ovarian benign tumor group and normal control group ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression level of GAS is increased, and SS is decreased in ovarian malignant tumor group. Celiac factors and body fluid factors may be responsible for these changes. This is helpful for the early diagnosis and treatments for ovarian cancer.

**Key Words:** Ovarian cancer; Gastroparesis syndrome; Gastrin; Somatostatin; Early diagnosis for ovarian cancer

Xia ZJ, Wu B, Gu YP, Hu Q, Chen SF, Zhao XD. Roles of gastrin and somatostatin in ovarian cancer with gastroparesis syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1763-1767

## 摘要

**目的:** 研究胃泌素(GAS)和生长抑素(SS)在卵巢癌患者胃轻瘫发生中的作用, 进而探讨卵巢癌的早期诊断与治疗。

**方法:** 我院2005-01/2007-01住院卵巢癌患者56例, 所有病例均经手术和病理证实, 并分

## ■背景资料

卵巢癌是威胁女性生命的主要恶性肿瘤之一, 很多患者被发现患有卵巢癌, 大多处于晚期, 追问病史, 发现大多患者早期存在早饱、恶心、腹胀、呕吐和食欲不振等胃轻瘫症状, 且当时并无腹水存在, 由此推测是否存在某些因子在卵巢癌早期即发挥作用, 而引起早期症状的出现, 本研究分析了胃泌素和生长抑素在卵巢癌患者胃轻瘫发生中的作用, 进而探讨卵巢癌的早期诊断与治疗。

## ■同行评议者

季国忠, 副教授, 南京医科大学第二附属医院消化科



## ■研发前沿

卵巢癌早期诊断  
与治疗是目前国  
内外卵巢癌学者  
密切关注的问题。

为正常对照组, 卵巢良性肿瘤组和卵巢癌组。GAS和SS的放免测定及RT-PCR法检测血清及组织中GAS和SS表达, 统计学分析法分析GAS和SS与卵巢癌相关性。

**结果:** 卵巢癌组织和血清中GAS表达升高, SS表达降低, 与正常对照组比较差异非常显著(GAS:  $146.6 \pm 28.8$  ng/L vs  $83.5 \pm 14.4$  ng/L, SS:  $16.2 \pm 3.9$  ng/L vs  $52.1 \pm 15.1$  ng/L, 均 $P < 0.01$ ), 与卵巢良性肿瘤组(GAS:  $102.2 \pm 21.5$  ng/L, SS:  $42.6 \pm 13.6$  ng/L)比较, 差异显著(均 $P < 0.05$ ), 卵巢良性肿瘤组组织和血清中GAS和SS表达与正常对照组比较差异显著( $P < 0.05$ )。

**结论:** 卵巢癌组织中GAS表达上升, SS表达下降, 其变化可能与腹腔因素和全身体液因素的作用有关, 其对卵巢癌的早期诊断和治疗有指导意义。

**关键词:** 卵巢癌; 胃轻瘫; 胃泌素; 生长抑素; 卵巢癌早期诊断

夏志军, 吴波, 谷艳萍, 胡清, 陈绍夫, 赵晓东. 胃泌素和生长激素在卵巢癌患者胃轻瘫发生中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1763-1767

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1763.asp>

## 0 引言

胃轻瘫<sup>[1]</sup>(gastroparesis syndrome)是内科常见的慢性并发症, 其主要特点是胃动力下降、胃排空迟缓和胃节律紊乱, 从而导致胃潴留。症状包括早饱、恶心、腹胀、呕吐和食欲不振, 也可以仅有胃动力的障碍而无明显症状。胃轻瘫的发病原因是多方面的, 确切的机制目前尚不十分清楚, 争论颇多。除了与神经病变、血管病变、高血糖及代谢紊乱有关外, 胃肠激素对胃肠运动有非常广泛的调节作用, 特别是胃泌素<sup>[2]</sup>(gastrin, GAS)及生长抑素<sup>[3]</sup>(somatostatin, SS)在胃轻瘫的发生发展中有重要地位, 并受到人们的关注。卵巢癌作为一种有全身综合表现的疾病, 即使在早期, 也会有最为早期的临床症状-轻重不同腹胀, 纳差等, 这些早期症状出现原因在不伴腹水的情况下很难解释清楚。是否存在某些因子在卵巢癌早期即发挥作用, 而引起早期症状的出现, 探讨如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2005-01/2007-01住院卵巢癌患者56例, 符合1997年WHO诊断标准, 所有病例均经过手

术和病理证实, 平均年龄 $53.6 \pm 14.7$ 岁。无糖尿病史, 无胃肠疾病史, 肝肾功能正常, 近期无服药史。经核素标记胃半排时间测定分为正常对照组11例, 平均年龄 $47.1 \pm 6.7$ 岁; 卵巢良性肿瘤组15例, 平均年龄 $45.6 \pm 11.3$ 岁; 卵巢癌组30例, 平均年龄 $53.6 \pm 14.7$ 岁。受试者1 wk内未服用过制酸剂、H<sub>2</sub>受体阻滞剂、质子泵抑制剂及内分泌类药物等。胃泌素和生长抑素等放免盒; FT-613型自动计数125I放免测量仪, 美国GE双探头Spect核素扫描仪, 日本Pentax-EG-2901电子胃镜等。

**1.2 方法** 应用美国GE双探头Spect核素扫描仪, 采集距阵 $128 \times 128$ , 准直器LEHR。受试者空腹10 h, 在2 min内吞下半固体放射性试餐(200 g面包粥+74 MBq<sup>99</sup>Tc-DTPA), 仰卧于检查床上。探头对准胃区和上腹部, 启动采集程序, 每15 min采集1幅, 间断采集6次。图象处理: 调用胃排空软件处理包, 依次画出各时间点胃感兴趣区, 程序自动计算胃排空率、胃排空时间、胃半排时间和胃排空曲线, 自动进行放射性时间校正(图1-3)。晚餐后禁食, 次日晨空腹抽取静脉血4 mL, 分别将2 mL置于2个试管中, 一管分离血清待测GAS, 另一管内加入100 g/L EDTA-二钠30  $\mu$ L及抑肽酶40  $\mu$ L, 4℃离心10 min(3000 r/min), 取血清待测SS, 二者均贮存于-70℃冰箱保存。受试者在胃镜直视下于胃窦部(距幽门3 cm以内)取大弯侧黏膜活检1块, 放于-70℃冰箱保存待测。

**1.2.1 GAS和SS的放免测定:** 依据标准加样程序测定; 并绘制标准曲线测量标本含量。B/Bo% = [沉淀B(cpm)-NSB(cpm)]/[Bo(cpm)-NSB(cpm)]  $\times 100\%$ 。以标准管B/Bo%为纵坐标, 以标准浓度为横坐标, 在半对数表上绘制标准曲线, 样品管以同样方式计算B/Bo%, 在标准曲线上查出相应的GAS和SS浓度。

**1.2.2 胃黏膜GAS和SS mRNA测定:** 按TRIzol抽提试剂盒说明提取组织总RNA; 紫外分光光度计检测RNA纯度, 放置-70℃冰箱保存。引物序列: GAST-human-Mrna, NM-000805(61-890): 230 bp, 55.9℃。GAST-F 5'-TCT TTG CAC TGG CTC TGG-3', GAST-R 5'-GGC TTC TTC TTC CTC C-3'。SST-human-Mrna, NM-001048(306-562): 257 bp, 53.3℃。SST-F 5'-CAG ACG GAG AAT GAT GCC-3', SST-R 5'-TCG CTG AAG ACT TGG AGG-3'。用 $\beta$ -actin为内参照, 引物序列(498 bp) $\beta$ -actin human F, 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3',

## ■相关报道

Yamamoto *et al*报道GAS可破坏自发和MTL诱发的MMCⅢ期活动, 使空腹样胃肠运动转变为餐后样运动, 而使DGP患者胃窦部缺乏MMCⅢ期运动。

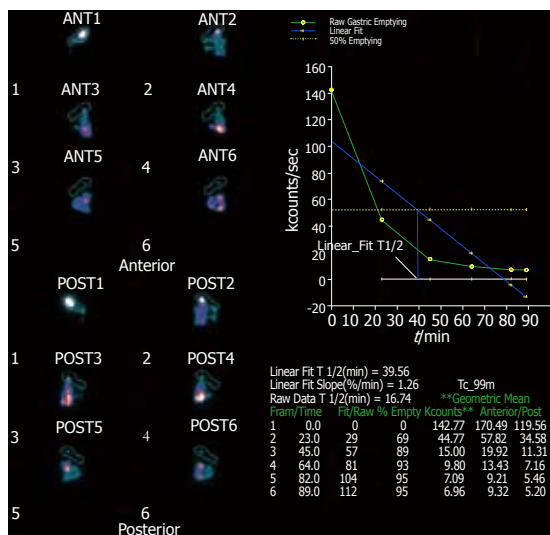


图 1 正常对照组半固体餐胃排空正常图.

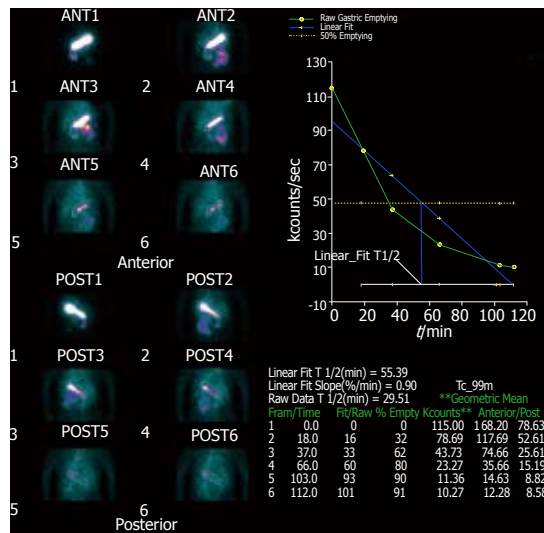


图 3 卵巢癌组半固体餐胃排空延迟图.

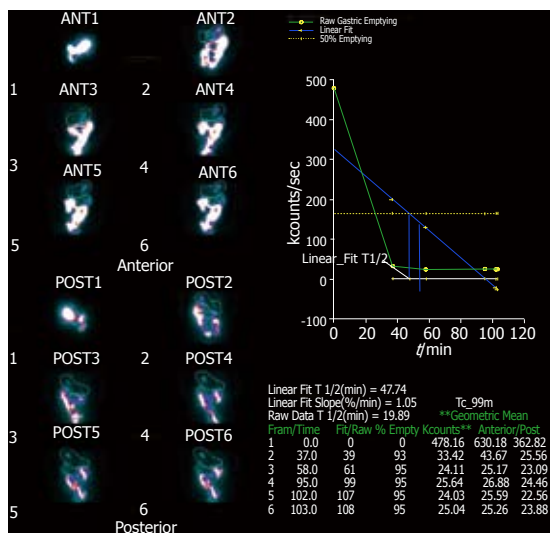


图 2 卵巢良性肿瘤组半固体餐胃排空正常图.

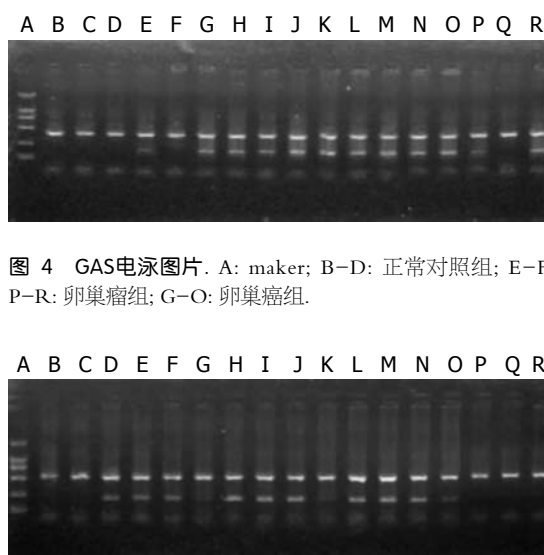


图 4 GAS电泳图片. A: maker; B-D: 正常对照组; E-F, P-R: 卵巢癌组; G-O: 卵巢癌组.



图 5 SS电泳图片. A: maker; H-J: 正常对照组; D-G, L-O: 卵巢癌组; B-C, P-R: 卵巢癌组.

$\beta$ -actin human R, 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'. 在逆转录反应体系20  $\mu$ L中, 加入RNA 2  $\mu$ L, 引物1  $\mu$ L, 在设定条件下进行反应. 取cDNA 3  $\mu$ L, 上下游引物各0.05  $\mu$ L, Taq DNA聚合酶0.2  $\mu$ L, 加入PCR反应体系中扩增. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 然后94 $^{\circ}$ C 45 s, 52.5 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 7 min共进行35个循环.

PCR产物用15 g/L琼脂糖电泳, 在紫外透射仪下鉴定. PCR产物采用20 g/L琼脂糖凝胶电泳检查, 紫外透射仪下观察, 拍照并记录. 经分析系统扫描后测定扩增带平均灰度值, 计算各基因mRNA表达指数(I), 以 $\beta$ -actin为参照, 求出其相对值 I (GAS gene) = GAS gene/ $\beta$ -actin, I (SS gene) = SS gene/ $\beta$ -actin. 提取的总RNA经检验 $A_{260nm/280nm} = 1.916 \pm 0.118$ , 提示获得的RNA纯度高. RT-PCR产

## 创新盘点

本研究首次进行卵巢癌早期腹胀与胃肠肽相关性研究.

物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳后, 紫外透射仪下可见扩增之特异产物条带, 且目的基因片段产物与引物设计之目的片段大小完全吻合.

**统计学处理** GAS和SS的含量用mean $\pm$ SD表示, 组间比较用t检验或 $t'$ 检验.

## 2 结果

**2.1 血GAS和SS含量** 正常对照组: GAS为83.5 $\pm$ 14.4 ng/L, SS为52.1 $\pm$ 15.1 ng/L. 卵巢良性瘤组: GAS为102.2 $\pm$ 21.5 ng/L, 与正常对照组比较差异显著( $P < 0.05$ ); SS为42.6 $\pm$ 13.6 ng/L, 与正常对照组比较差异显著( $P < 0.05$ ). 卵巢癌组: GAS为146.6 $\pm$ 28.8 ng/L, SS为16.2 $\pm$ 3.9 ng/L, 与正常对照组比较差异非常显著( $P < 0.01$ ); 与卵巢良性瘤

### ■同行评价

本文做了大量卵巢癌患者中胃轻瘫以及两者相关性的研究工作,有一定的学术价值和临床的指导意义。

组比较差异显著( $P<0.05$ )。

2.2 胃黏膜GAS和SS mRNA表达 正常对照组: GAS I 值 $0.338\pm0.313$ ; SS I 值 $0.756\pm0.302$ 。卵巢良性瘤组: GAS I 值 $0.408\pm0.439$ , 与正常对照组比较差异显著( $P<0.05$ ); SS I 值为 $0.521\pm0.232$ , 与正常对照组比较差异显著( $P<0.05$ )。卵巢癌组: GAS I 值 $0.662\pm0.301$ , SS I 值 $0.326\pm0.282$ , 与正常对照组比较差异非常显著( $P<0.01$ ); 与卵巢良性瘤组比较差异显著( $P<0.05$ , 图4-5)。

### 3 讨论

卵巢癌胃轻瘫表现多认为由癌性腹水或肿瘤组织直接侵袭所致,但临床上早期卵巢癌无腹水,无肿瘤侵袭者,仍有消化道症状,其原因尚不清楚。这些症状除外消化道疾患可能因素有:(1)腹水对腹腔腹膜和内脏的作用;(2)自主神经受癌肿,应激等异常因素影响;(3)业已证实胃肠激素及脑肠肽在消化道运动功能调节方面起重要作用,如胃肠激素和肽类激素水平异常,将会引起一系列胃肠道不良症状。

GAS为胃窦黏膜中G细胞分泌的激素,是胃酸分泌的主要调节激素,对胃黏膜具有生长促进作用。GAS作为神经递质,通过迷走神经在中枢和外周水平上对胃肠活动和胃排空进行细致调节,可刺激多种消化液(如,胰液和胆汁等)的分泌及促进胃肠的收缩和运动,其水平的高低在一定程度上反映了消化道的分泌、消化功能<sup>[4]</sup>。生理量的GAS除可引起胃酸分泌外,对胃的运动有中等程度的刺激作用,并提高幽门泵的活动。GAS的主要作用有刺激胃酸分泌、对泌酸区胃黏膜的营养支持作用和刺激胃窦部运动<sup>[5]</sup>。SS有多种分子形式,主要有SS-14和SS-28。SS受体有5种亚型(SS1-SS5),分布于7个跨膜区,属于G-蛋白偶联受体超家族<sup>[6-7]</sup>。SS通过与这些特定的、高亲和力的膜结合受体相结合而发挥作用<sup>[8]</sup>。卵巢癌是否有SS分泌减少,从而减轻了对GAS的抑制作用,使GAS的合成和分泌增加,引起胃十二指肠不协调的收缩或反馈性抑制,最终导致胃排空障碍。Yamamoto *et al*<sup>[9]</sup>报道GAS可破坏自发和MTL诱发的MMCIII期活动,使空腹样胃肠运动转变为食后样运动,而使DGP患者胃窦部缺乏MMCIII期运动。SS的作用通过细胞膜上SS受体介导<sup>[10]</sup>,SSTR通过G蛋白与腺苷酸环化酶、钾离子通道、钙离子通道偶联,作用于细胞内相应的效应系统,或者通过非偶联G蛋白途径调节酪氨酸蛋白磷酸激酶、 $\text{Na}^+-\text{H}^+$ 交换和

细胞增生等。SSTR家族共分5型,SSTR1是SSTR家族中较为独特的受体,在胃肠道有分布,他虽有类似G蛋白受体的跨膜结构,但不与G蛋白偶联。SSTR1也能介导抑制AC活性,通过cAMP传递跨膜信号,在中枢神经系统还可协调锥体外系运动功能与感觉功能。SS在中枢神经系统和胃肠道中均有广泛的分布<sup>[3]</sup>,据现代免疫学研究证实,免疫系统的细胞能释放上述因子并含有其高亲和力结合位点。其对免疫系统的作用包括刺激淋巴细胞在体内体外的增殖。SS作为免疫调节递质,作用于外周T细胞上的胃肠肽受体,对细胞免疫功能发挥调节作用,并通过SS间接影响多种细胞因子的变化,从而达到对胃肠道免疫的调节,实现对胃肠道疾病及功能的调整作用。本实验结果表明有消化道症状的卵巢癌患者体内缺乏SS,而抑制了胃肠道的功能及免疫调节,使卵巢癌患者出现一系列胃肠道症状。SS的缺乏与卵巢癌的期别负呈相关,可能与免疫系统受抑制程度不同而出现不同反应。GAS主要由小肠上部的G细胞释放,还存在于神经组织及垂体、大脑皮层等部位,因此胃动素也是一种脑肠肽。卵巢癌患者血浆GAS变化机制尚不清楚。本研究提示,卵巢癌患者引起GAS的变化胃肠动力学的改变,出现胃轻瘫临床表现。引起其改变考虑可能与以下因素有关:(1)免疫系统或应激反应引起胃动素活性下降,降低了对胃肠平滑肌的直接作用。反馈性引起胃动素升高;(2)腹水、癌肿或癌性粘连引起机械性因素引发胃肠运动受阻;(3)胃肠道可能发生淤血、水肿,迷走神经张力升高,从而刺激胃动素的分泌;(4)腹腔植物神经受到影响,使得胃动素通过胆碱能神经产生胃肠运动受阻;(5)精神、神经因素异常可能减少胃肠激素分泌的抑制,而使胃动素升高。

可见卵巢癌患者血清中出现脑肠肽异常多由于免疫状态或免疫调节异常引起,提示免疫系统异常变化与卵巢癌发生同步,程度与期别相关。其早期伴随发生的消化道症状是全身免疫系统异常的部分反应,应引起重视。肿瘤组织直接侵袭引起消化道症状是卵巢癌晚期表现的主要因素。本实验结果表明,血清GAS和SS与胃窦部组织RT-PCR检测GAS和SS的基因表达具有一致性:卵巢癌组与对照组和卵巢瘤组比较的结果差异显著;恶性肿瘤为全身疾病,腹腔物理因素和全身体液因素的作用影响可能导致GAS和SS变化,进而出现腹胀症状,对卵巢癌的早期诊断与治疗有提示及指导意义。

#### 4 参考文献

- 1 Patrick A, Epstein O. Review article: gastroparesis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 724-740
- 2 Schafer J, Baumeister H, Lorenz A, Meyerhof W. Localization of somatostatin receptor subtype mRNA in the rat gastrointestinal tract and regulation of SSTR1 gene expression. *Z Ernahrungswiss* 1998; 37 Suppl 1: 75-79
- 3 Janson ET, Oberg K. Somatostatin receptor ligands and their use in the treatment of endocrine disorders. *Curr Pharm Des* 1999; 5: 693-705
- 4 周建伟, 张凡, 肖鸣. 药条灸对脾虚症患者血清胃泌素D木糖排泄率及细胞亚群的影响. *中国针灸* 1998; 18: 15
- 5 Migdalis L, Thomaides T, Chairopoulos C, Kalogeropoulou C, Charalabides J, Mantzara F. Changes of gastric emptying rate and gastrin levels are early indicators of autonomic neuropathy in type II diabetic patients. *Clin Auton Res* 2001; 11: 259-263
- 6 Patel YC. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest* 1997; 20: 348-367
- 7 Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family. *Life Sci* 1995; 57: 1249-1265
- 8 Patel YC, Greenwood M, Panetta R, Hukovic N, Grigorakis S, Robertson LA, Srikant CB. Molecular biology of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism* 1996; 45: 31-38
- 9 Yamamoto O, Matsunaga Y, Shiba Y, Haga N, Sano I, Itoh Z. Inhibition of motilin-induced phase III contractions by pentagastrin in Heidenhain pouch dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 1471-1476
- 10 Watt HL, Kharmate G, Kumar U. Biology of somatostatin in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2008

编辑 师忠芳 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

**本刊讯** 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008-11在上海市召开第二十次全国中西医结合消化系统疾病学术会议, 并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)新技术新理论继续教育学习班. 学习班招收对象: 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等. 参加学习班者授予国家级1类继续教育学分; 大会论文报告者另授继续教育学分6分.

#### 1 征稿内容

消化内镜技术及其中西医结合临床应用; 脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究; 消化道肿瘤中西医结合诊疗; 脾胃学说及其临床应用; 其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

#### 2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编. 稿件请附800字论文摘要, 尽可能以电子信件的形式将稿件传送, 截稿日期: 2008-09-30.

#### 3 联系方式

刘成海, 201203, 上海市浦东新区张衡路528号上海中医药大学附属曙光医院肝病所, 传真: 021-51324445或51328500, shxhhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com



# NOX家族在肝纤维化中的作用

罗俊, 杨丽

## ■背景资料

肝纤维化是多种病因引起的肝组织慢性炎症修复反应, 以细胞外基质过度沉积为特征。其发生的分子机制多种多样, 以肝星状细胞的活化为中心环节, NOX家族在其中扮演了重要角色, 对他的研究将为肝纤维化的诊断和治疗提供新的方向。

罗俊, 杨丽, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041

作者贡献分布: 本文选题、文献检索、资料分析及撰写由罗俊完成; 杨丽审校。

通讯作者: 杨丽, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院消化内科. lila.yang@medmail.com.cn

电话: 028-81812276

收稿日期: 2008-01-25 修回日期: 2008-03-25

## Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase family in liver fibrogenesis

Jun Luo, Li Yang

Jun Luo, Li Yang, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Li Yang, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, 37 Guoxue Road, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. lila.yang@medmail.com.cn

Received: 2008-01-25 Revised: 2008-03-25

## Abstract

NADPH oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase, NOX) is a multi-protein complex producing reactive oxygen species (ROS), present both in phagocytes, being essential in host defense and in non-phagocytic cells, regulating intracellular signaling. In liver, NADPH oxidase plays a central role in fibrogenesis. A functionally active form of NADPH oxidase is expressed not only in Kupffer cells (phagocytic cell type) but also in hepatic stellate cells (HSCs) (non-phagocytic cell type), suggestive of its role the non-phagocytic NADPH oxidase in HSCs activation. This paper reviewed effects of NOX in liver fibrogenesis.

Key Words: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; Reactive oxygen species; Oxidative stress; Liver fibrosis

Luo J, Yang L. Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase family in liver fibrogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1768-1773

## 摘要

还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶

(NADPH oxidase, NOX)是一种多蛋白质亚基组成的复合物, 存在于吞噬细胞和非吞噬细胞中, 能生成消除病原微生物的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)。在肝脏, NOX参与肝纤维化过程, 并发挥重要作用。激活后具有功能的NOX不仅在Kupffer细胞(KC)中(吞噬细胞型)存在, 在肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)中(非吞噬细胞型)同样存在, 非吞噬细胞型NOX在HSCs的活化中发挥作用。本文就NOX在肝纤维化形成过程中所起的作用进行综述。

关键词: NADPH氧化酶; 活性氧簇; 氧化应激; 肝纤维化

罗俊, 杨丽. NOX家族在肝纤维化中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(16): 1768-1773

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1768.asp>

## 0 引言

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复的代偿反应, 由于肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)特别是胶原的异常过度沉积, 形成纤维隔, 肝脏原有结构被破坏, 引发肝纤维化。在肝纤维化中起决定性作用的是肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)<sup>[1-2]</sup>, 激活的HSCs具有合成分泌大量ECM的能力。研究显示, 活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)能激活HSCs使其获得较强的增殖能力并处于持续活化状态, 在介导肝损伤和肝纤维化中发挥了重要作用<sup>[3-4]</sup>。慢性肝损伤时与ROS大量生成有关的各种分子中<sup>[5-6]</sup>, 存在于吞噬细胞和非吞噬细胞的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NADPH oxidase, NOX)作为一种多蛋白质亚基组成的复合物发挥了关键性作用。本文就其在肝纤维化形成过程中所起的作用综述如下。

## 1 肝纤维化与ROS

在已知调节肝纤维化形成的可能机制中, ROS扮演了重要角色<sup>[7]</sup>。ROS包括超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、羟自由基(OH·)和一氧化氮(NO)

## ■同行评议者

赵桂鸣, 主任医师, 天津市肝病研究所, 天津市传染病医院慢性肝炎科

等, 是正常有氧代谢的副产品. 在肝脏, 内皮一氧化氮合酶(eNOS)、线粒体解偶联呼吸链、细胞色素P450 II E1(CYP2E1)和NOX构成了ROS的来源. 其中, NOX是ROS的主要来源. 肝脏中, NOX在吞噬细胞(如Kupffer细胞, KC)<sup>[3]</sup>和非吞噬细胞(如肝星状细胞, HSCs)<sup>[8]</sup>均存在. 慢性肝病时, ROS产生过多或发生代谢障碍而超过内源性抗氧化防御系统对其的消除能力, 过剩的ROS就会参与氧化生物大分子, 如DNA、脂质、蛋白质和碳水化合物, 这一过程称为氧化应激<sup>[9-13]</sup>. 在酒精性、乙肝病毒感染性、铁超负荷及慢性胆汁淤积性慢性肝病患者<sup>[7]</sup>和大多数实验性肝纤维化模型中<sup>[14]</sup>都已证实氧化应激的存在. 氧化应激不仅是慢性肝损伤的结果, 同时又反过来促进组织病理性重构和纤维化的形成. 其主要损伤作用-膜脂质过氧化(lipid peroxidation, LP)增强, 同时形成多种生物活性物质, 如前列腺素、血栓素和白三烯等参与肝脏炎症反应和纤维化形成, 而过氧化脂质和羟基壬烯(hydroxynonenal, HNE)作为2个强毒力的脂质过氧化产物参与介导肝细胞死亡、Mallory小体形成、HSCs活化和肝纤维化以及肝内炎症细胞浸润等病变. 同时, HSCs内活化的非吞噬细胞型NOX生成的ROS主要作为第二信使直接或间接参与HSCs活化和增殖的调节, 在促进肝纤维化形成中扮演了更重要的角色<sup>[11,15]</sup>.

## 2 NOX家族

**2.1 NOX的结构和功能** NOX(原名黄素细胞色素B)存在于细胞膜上, 带有细胞色素C和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)基因. 该酶由催化亚基gp91<sup>phox</sup>(又名NOX2)、调节亚基p22<sup>phox</sup>、p47<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>和小分子量的三磷酸鸟嘌呤核苷结合蛋白Rac1或Rac2<sup>[16-18]</sup>6种亚基组成. gp91<sup>phox</sup>和p22<sup>phox</sup>位于细胞膜和细胞质囊上, 他们构成一个膜复合体称为细胞色素b558(cytochrome b558, Cyto b558). 当与胞质中的另外几种亚基结合时可形成有活性的NOX复合体. 其中gp91<sup>phox</sup>是其主要的功能亚基, 与1个FAD和2个亚铁血红素分子相连. p22<sup>phox</sup>的C末端有一富含脯氨酸的尾巴, 可能用来结合NOX的胞质激活因子, 从而发挥细胞内调节作用. 哺乳动物细胞中有计划的ROS生成是由吞噬细胞型NOX(PHOX)催化的呼吸爆发完成的<sup>[19-20]</sup>. PHOX通常是处于静止或低活性状态, 当感受到胞外信息, 如细胞因子、激素和病原微生物等物质的刺激时, 胞质中的

p47<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>和Rac通过p22<sup>phox</sup>上富含脯氨酸的尾巴与之结合形成酶复合体, 这种结合能够使gp91<sup>phox</sup>的构象发生变化, 并通过诱导电子的跨膜运动激活该酶, 产生大量ROS, 直接杀伤入侵的病原微生物, 在宿主的防御反应中发挥不可缺少的作用<sup>[21]</sup>. De Minicis *et al*研究认为, p47<sup>phox</sup>在整个激活过程中可能起关键作用<sup>[22]</sup>. 因为NOX的非正常激活会对细胞造成损伤, 所以该酶的激活是受到高度调节的.

**2.2 NOX蛋白家族** 近年来, 在不同种类非吞噬细胞的质膜上发现了NOX催化亚基gp91<sup>phox</sup>的同源物家族, 即NOX蛋白家族, 有NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1和DUOX2<sup>[23]</sup>, 为非吞噬细胞ROS的产生提供直接证据<sup>[24]</sup>, 并改变人们对ROS的传统认识, 为肝纤维化的研究开辟新的思路. 非吞噬细胞型NOX在结构和功能上与PHOX相似, 他能够将分子氧通过单电子还原产生过氧化自由基, 并以此为基础形成一系列ROS产物<sup>[23,25]</sup>. 生理情况下, 非吞噬细胞型NOX处于低表达与低活性状态, 通过其生成的ROS水平仅为吞噬细胞生成量的百分之几. 但与吞噬细胞ROS主要参与宿主防御不同, 非吞噬细胞ROS主要作为第二信使直接或间接作用于信号传导途径中的蛋白激酶、蛋白磷酸酶、转录因子等, 参与细胞增殖和分化等精细的生物调节, 并在特定激动剂干预后, 如血管紧张素II(Ang II)、血小板衍化生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF))出现高水平表达<sup>[8,26-27]</sup>. 而这些激动剂促进ROS生成也是通过P38MAPKs和腺苷酸激酶脂肪活化酶(AKT)等胞内几种与氧化还原相关的信号传递途径实现的<sup>[28]</sup>.

**2.3 NOX蛋白家族的基本结构及其分布** NOX蛋白家族大致可以分为2个大的结构域: N端的疏水跨膜区和C端的黄素蛋白结合区<sup>[24]</sup>. 该黄素蛋白结合区与许多FAD结合蛋白包括细胞色素P450还原酶、ferredoxin-NADP氧化还原酶等也有微弱的同源性. NOX家族的分子量介于564-737之间, 他们都有6个跨膜片段, 一些保守的区段可能与NADPH、FAD的结合有关.

NOX1主要在消化道上皮细胞中表达, 血管平滑肌中也可见到, 主要可能代替NOX2发挥重要功能<sup>[29-31]</sup>. NOX3在内耳的特定部位高表达, 如耳蜗前庭感受细胞和螺旋神经节, 在耳石形成中有重要作用<sup>[32]</sup>. NOX4主要在肾脏组织中大量表达, 可以持续介导生成ROS, 并且不依赖

## ■研发前沿

NOX家族在肝纤维化中的作用是近年来国内外研究的热点. 相关报道主要集中于NOX家族对肝星状细胞的活化, 及其在血管紧张素II、血小板衍化生长因子和凋亡小体促纤维化中发挥的重要作用.

## ■创新盘点

本文系统总结近年来NOX家族在肝纤维化发生发展过程中所发挥的作用,尤其是肝星状细胞活化、介导血管紧张素II、血小板衍生生长因子和凋亡小体促纤维化这些热点领域的研究成果。

于其他NADPH氧化酶亚基的活化<sup>[33]</sup>。NOX1、NOX2、NOX3、NOX4发挥活性无需Ca<sup>2+</sup>的参与,而主要在精子和淋巴细胞中表达的NOX5的活性却是Ca<sup>2+</sup>依赖性的,并随Ca<sup>2+</sup>浓度的增加而活性增强<sup>[34]</sup>。NOX2的同源物DUOX1和DUOX2最近被证实<sup>[35]</sup>,他们主要在肺、小肠和甲状腺中表达,其特点是具有一附加的过氧化物酶结构域<sup>[36-37]</sup>。另外,NOXO1(NOX organizer 1)是p47<sup>phox</sup>的同源物,NOXA1(NOX activated 1)是p67<sup>phox</sup>的同源物<sup>[38]</sup>。由此可见,NOX蛋白家族的表达具有组织特异性,但不同成员都可以生成ROS。事实上,每一种细胞类型可能只含有唯一一套组件,以唯一一种途径组合在一起并相互调节,从而完成特定的细胞功能<sup>[27]</sup>。至今,HSCs中非吞噬细胞型NOX的确切结构和功能并不完全清楚,尽管已有很多研究证明p47<sup>phox</sup>和Rac1在NOX的活化中发挥了关键性作用<sup>[22]</sup>。

### 3 NOX在HSCs中的活性及其促纤维化机制

近期的一系列研究显示,HSCs中非吞噬细胞型NOX主要发挥细胞内生物学调节功能<sup>[8,39-40]</sup>。生理情况下,HSCs中仅产生少量ROS,但在如Ang II刺激后会产生大量ROS,导致氧化应激的产生<sup>[8,26-27]</sup>。现认为HSCs中NOX活性的调节至少发生在2个水平上。一是NOX亚基的过度表达。从患酒精性肝炎患者所获得的肝组织样本应用微点阵分析法研究显示,NOX许多亚基均出现明显表达上调,包括NOX1、NOX4、p47<sup>phox</sup>、p22<sup>phox</sup>和p67<sup>phox</sup>等<sup>[41-42]</sup>。二是在翻译后修饰,包括磷酸化和膜易位。Bataller *et al*研究发现,HSCs能表达非吞噬细胞型NOX的主要成分<sup>[8]</sup>,Ang II通过结合HSCs表面的AT-1受体,使p47<sup>phox</sup>发生广泛磷酸化,调节NOX的亚基,通过NADPH氧化酶途径,介导ROS的形成。在完整的细胞内,p47<sup>phox</sup>中特定部位的丝氨酸变异为丙氨酸而失去促进NOX活化的作用。体外实验发现p47<sup>phox</sup>结构中S304和S328为丝氨酸,被AKT磷酸化后活性增加,同时与p67<sup>phox</sup>发生膜易位,从胞质移至胞膜,与膜亚基gp91<sup>phox</sup>结合,激活NOX。AKT与磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI-3K)有密切联系,AKT调节PI-3K依赖的p47<sup>phox</sup>磷酸化。

### 4 NOX介导的Ang II 促肝纤维化作用

在HSCs中,NOX介导Ang II发挥其调节细胞内信号通路的作用<sup>[8,43]</sup>。这一发现与早期研究结论一致。早期研究显示,通过抑制Ang II 和/或阻断

AT-1受体,可以显著地减轻慢性肝损伤实验动物模型的肝脏炎症及纤维化程度<sup>[44-46]</sup>。基于这一发现,Paizis *et al*提出,Ang II在肝脏中的促纤维化作用<sup>[47-48]</sup>直接发生于HSCs内,其通过NOX复合体的活化、ROS的大量生成及随后HSCs的持续激活而实现<sup>[8]</sup>。

通过DCFDA荧光显像法显示,用10-8 mol/L的Ang II干预活化的人HSCs后可诱导ROS生成显著增加。而当分别用NOX抑制剂二亚苯基碘(diphenyliodonium, DPI)和AT-1阻断剂氯沙坦干预后,Ang II诱导HSCs内ROS生成又显著减少<sup>[44,49]</sup>。HSCs经由NOX活化而产生对Ang II反应的实验证实,HSCs上所表达的AT-1受体直接与NOX复合体相联系,从而参与调节细胞内信号传递的作用<sup>[8]</sup>。

NOX亚基p47<sup>phox</sup>在活化的HSCs中表达增加。p47<sup>phox</sup>基因敲除(p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>)小鼠模型已被广泛的用于研究吞噬细胞<sup>[50-51]</sup>和非吞噬细胞<sup>[8,22,52-53]</sup>中NOX的抑制效应。研究发现,Ang II可以诱导野生型C57BL/6小鼠HSCs内ROS的生成增加,但对p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>小鼠却无此效应。另外,10-8 mol/L的Ang II可以诱导野生型C57BL/6小鼠HSCs的DNA合成增加及细胞移行,同时导致ERK和c-Jun的磷酸化,但在p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>小鼠中却没发现这种效应。此外,p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>小鼠行胆总管结扎(BDL)2 wk后的肝损伤程度也较野生型C57BL/6小鼠明显减轻。相对于野生型C57BL/6小鼠而言,p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>小鼠产生的羟脯氨酸更少,胶原沉积更轻,且没有桥接纤维化的形成。综上研究结论推断,NOX介导的ROS生成在Ang II诱导的HSCs活化中发挥了重要作用,其中p47<sup>phox</sup>扮演了关键性角色。因此,NOX被抑制后,无论是基因水平的p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>还是应用DPI,都可以减轻肝纤维化的程度。这一效应与Ang II通过HSCs致纤维化作用减弱相关。

### 5 PDGF和NOX

NOX在HSCs活化中发挥重要作用的认识还被另外一些实验支持。其中,PDGF作为HSCs的一种最重要的有效促细胞分裂剂,被证明通过NOX发挥其作用<sup>[15]</sup>。应用免疫组织化学和原位杂交技术对来自慢性肝炎或肝硬化患者的肝组织进行研究发现,PDGF及PDGF受体在mRNA和蛋白质水平均呈过表达,并与组织损伤和胶原沉积程度显著相关。这些研究结论强烈的提示PDGF对慢性肝病患者的肝纤维化形成有促进作用。特别要指出的是,用抗氧化剂

Mn-TBAP(100 nmol/L), 或者用DPI(25  $\mu$ mol/L)或夹竹桃麻素(100  $\mu$ mol/L)对HSCs进行干预后, PDGF诱导的DNA合成会出现明显地下降. PDGF和NOX间的相互作用支持了NOX在HSCs中起关键作用的观点.

## 6 凋亡小体激活NOX

除受体介导的激动剂可以激活NOX外, 死亡肝细胞所形成的凋亡小体被HSCs吞噬后也可以激活NOX, 从而导致HSCs内胶原蛋白 $\alpha 1$ (I)表达上调<sup>[54]</sup>. 凋亡小体的形成是慢性肝病的共同特征. 凋亡小体被吞噬后不仅刺激巨噬细胞生成TGF $\beta 1$ <sup>[55]</sup>, 还可以促进HSCs的活化<sup>[54]</sup>. Zhan *et al* 研究显示, 凋亡小体激活了HSCs中的NOX, 从而进一步促进HSCs的活化和纤维化的形成<sup>[56]</sup>. 对 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA, 肌成纤维细胞的标志蛋白)和E-cadherine的双重染色证明, HSCs中确实有凋亡小体的存在. HSCs内的凋亡小体促进依赖NADPH的ROS产物增加. 事实上, 凋亡小体诱导的氧化应激产物的增加效应能被DPI(10  $\mu$ mol/L)所阻断. 另外, 在HSCs内观察到的凋亡小体诱导的胶原蛋白 $\alpha 1$ (I)表达上调也被DPI抑制. 虽然, 对这些实验结果的判读受单一非特异性药物抑制剂的局限, 但这些结果却再一次支持NOX在HSCs活化中发挥重要作用的结论.

## 7 结论

HSCs中有非吞噬细胞型NOX存在的研究结论引领研究者进一步探究该复合体在肝纤维化形成过程中究竟发挥了多大的作用. 研究结果证实, HSCs中的NOX参与调节HSCs的活化过程, 所以Ang II、PDGF或凋亡小体通过NOX调节了肝纤维化进程. 因为NOX参与了其他肝细胞外激动剂(如来普汀、内皮素和高半胱氨酸)的效应发挥<sup>[57-59]</sup>, 这些有趣的潜在激动剂在HSCs活化中的作用值得进一步研究. 另外, NOX的2种类型(吞噬细胞型和非吞噬细胞型)均在肝纤维化形成中发挥作用. 但哪种类型在肝纤维化形成中起到更关键的作用仍然未知. 尽管PHOX的结构和功能已经研究的较清楚, 但关于HSCs中非吞噬细胞型NOX的结构和各亚基间的相互作用仍有诸多疑问. 而关于这些疑问的进一步研究将为肝纤维化的诊断和治疗提供新的方向.

## 8 参考文献

- 1 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 2 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 3 Wheeler MD, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteel GE, Gabele E, Rusyn I, Yamashina S, Froh M, Adachi Y, Iimuro Y, Bradford BU, Smutney OM, Connor HD, Mason RP, Goyert SM, Peters JM, Gonzalez FJ, Samulski RJ, Thurman RG. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1544-1549
- 4 Hornyak SC, Gehlsen KR, Haaparanta T. Histamine dihydrochloride protects against early alcohol-induced liver injury in a rat model. *Inflammation* 2003; 27: 317-327
- 5 Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, Jansen P, Benedetti A, Moshage H. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver* 2001; 21: 1-12
- 6 Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002; 35: 62-73
- 7 Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35: 297-306
- 8 Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383-1394
- 9 Arteel GE. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 778-790
- 10 Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farre S, Galeotti T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 191-198
- 11 Moon KH, Hood BL, Kim BJ, Hardwick JP, Conrads TP, Veenstra TD, Song BJ. Inactivation of oxidized and S-nitrosylated mitochondrial proteins in alcoholic fatty liver of rats. *Hepatology* 2006; 44: 1218-1230
- 12 Purohit V, Brenner DA. Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology* 2006; 43: 872-878
- 13 Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99-S112
- 14 Kim KY, Choi I, Kim SS. Progression of hepatic stellate cell activation is associated with the level of oxidative stress rather than cytokines during CCl<sub>4</sub>-induced fibrogenesis. *Mol Cells* 2000; 10: 289-300
- 15 Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281
- 16 Dang PM, Cross AR, Quinn MT, Babior BM. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4262-4265
- 17 Bokoch GM, Zhao T. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox*

## ■应用要点

本文为肝纤维化的诊断和基因治疗提供了新的思路.



## ■名词解释

- NOX家族: 指一类存在于多种非吞噬细胞质膜上的NADPH氧化酶催化亚基gp91<sup>phox</sup>同源物, 包括NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1和DUOX2。可介导产生一系列过氧化物产物, 在肝纤维化中发挥重要作用。
- Signal 2006; 8: 1533-1548
- 18 Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J* 2002; 21: 6312-6320
  - 19 Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1428-1459
  - 20 Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 342-344
  - 21 Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 4474-4479
  - 22 De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology* 2006; 131: 272-275
  - 23 Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 16-27
  - 24 Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001; 269: 131-140
  - 25 Weintraub NL. Nox response to injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 4-5
  - 26 Wang HD, Johns DG, Xu S, Cohen RA. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1697-H1702
  - 27 Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313
  - 28 Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 940-948
  - 29 Cheng G, Diebold BA, Hughes Y, Lambeth JD. Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* 2006; 281: 17718-17726
  - 30 Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 2003; 278: 3510-3513
  - 31 Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1456-1464
  - 32 Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J, Russ A, Stumm G, Schimenti JC, Bergstrom DE. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 2004; 18: 486-491
  - 33 Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8010-8014
  - 34 Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demareux N, Krause KH. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001; 276: 37594-37601
  - 35 De Deken X, Wang D, Dumont JE, Miot F. Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating system. *Exp Cell Res* 2002; 273: 187-196
  - 36 Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J* 2003; 17: 1502-1504
  - 37 Lambeth JD. Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 11-17
  - 38 Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 2003; 278: 25234-25246
  - 39 Takeya R, Ueno N, Sumimoto H. Regulation of superoxide-producing NADPH oxidases in nonphagocytic cells. *Methods Enzymol* 2006; 406: 456-468
  - 40 Takeya R, Sumimoto H. Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1523-1532
  - 41 Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 2006; 65: 278-290
  - 42 Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, Bellot P, Miquel R, Moreno M, Jares P, Bosch J, Arroyo V, Caballeria J, Gines P. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology* 2007; 132: 687-697
  - 43 Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Brenner DA. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1346-1355
  - 44 Croquet V, Moal F, Veal N, Wang J, Oberti F, Roux J, Vuillemin E, Gallois Y, Douay O, Chappard D, Calas P. Hemodynamic and antifibrotic effects of losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37: 773-780
  - 45 Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 2001; 35: 376-385
  - 46 Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF. The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 824-828
  - 47 Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1667-1676
  - 48 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31: 828-833
  - 49 Kono H, Rusyn I, Uesugi T, Yamashina S, Connor HD, Dikalova A, Mason RP, Thurman RG. Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver

- injury in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1005-G1012
- 50 Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000; 106: 867-872
- 51 Gao XP, Standiford TJ, Rahman A, Newstead M, Holland SM, Dinauer MC, Liu QH, Malik AB. Role of NADPH oxidase in the mechanism of lung neutrophil sequestration and microvessel injury induced by Gram-negative sepsis: studies in p47phox<sup>-/-</sup> and gp91phox<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol* 2002; 168: 3974-3982
- 52 Li JM, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem* 2003; 278: 12094-12100
- 53 Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 2002; 40: 511-515
- 54 Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003; 83: 655-663
- 55 Szondy Z, Sarang Z, Molnar P, Nemeth T, Piacentini M, Mastroberardino PG, Falasca L, Aeschlimann D, Kovacs J, Kiss I, Szegezdi E, Lakos G, Rajnavolgyi E, Birckbichler PJ, Melino G, Fesus L. Transglutaminase 2<sup>-/-</sup> mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7812-7817
- 56 Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, Torok NJ. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* 2006; 43: 435-443
- 57 Marciniak A, Borkowska E, Kedra A, Rychlik M, Beltowski J. Time-dependent transition from H(2)O(2)-extracellular signal-regulated kinase- to O(2)-nitric oxide-dependent mechanisms in the stimulatory effect of leptin on renal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 1216-1224
- 58 Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 1058-1064
- 59 Siow YL, Au-Yeung KK, Woo CW, O K. Homocysteine stimulates phosphorylation of NADPH oxidase p47phox and p67phox subunits in monocytes via protein kinase C $\beta$  activation. *Biochem J* 2006; 398: 73-82

## ■同行评价

本文内容充分, 资料详尽, 参考文献较新, 具有一定的学术参考价值。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 中华医学会第八次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2008-10-09/12在西安市召开第八次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下:

## 1 征文内容

与消化系统疾病有关的流行病学、基础及临床研究. 根据以下分类请在论文摘要右下角标明: 功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); 幽门螺杆菌及其相关疾病; 胰腺疾病; 肝胆疾病; 胃肠道肿瘤; 炎症性肠病; 胃肠激素; 消化疾病介入治疗; 青年委员会专场(全部用英文交流).

## 2 征文要求

(1)报送的论文要求800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者姓名、单位及邮编. 投青年会专场的论文必须附相应的英文摘要, 第一作者年龄须在45周岁以下(1963-11后出生). (2)凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不予受理. (3)报送的论文要求电脑打印稿, 经所在单位审查盖章, 通过本次会议专用网站报送电子文稿及报名注册, 会议将不再接受书面投稿. (4)截稿日期: 2008-07-15(以当地邮戳为准), 文责自负. 会议网址: <http://www.csge.org.cn>.

希望各省、自治区、直辖市医学会消化病学分会委员积极、认真组织所在地区的相关医生踊跃投稿并参会.

# 手术为主的大肠癌综合治疗

崔恒官, 曹秀峰

## ■背景资料

大肠癌是国内最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率随着生活水平的提高而不断增加。手术作为大肠癌的首选治疗方法, 5年生存率仅为50%。近些年来大肠癌以手术为主的综合治疗获得了国际上很多学者的重视, 并取得了可喜的成果。

崔恒官, 曹秀峰, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心  
江苏省南京市 210006

作者贡献分布: 此课题由崔恒官综述; 曹秀峰审校。

通讯作者: 曹秀峰, 210006, 江苏省南京市长乐路68号, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心。 cxf551101@sina.com  
电话: 025-85223071

收稿日期: 2008-02-19 修回日期: 2008-04-15

## Surgery-predominant combined treatment for colorectal cancer

Heng-Guan Cui, Xiu-Feng Cao

Heng-Guan Cui, Xiu-Feng Cao, Center of Oncology, the First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiu-Feng Cao, Center of Oncology, the First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 68 Changle Road, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. cxf551101@sina.com

Received: 2008-02-19 Revised: 2008-04-15

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the fifth leading cause of cancer-related mortality in China with an increasing trend, which is emphasizing the need for improvements in therapeutic options. The 5-year survival rate of surgery, the first-line treatment for CRC, is just about 50 percent. In recent years many patients with CRC have benefited from the combined treatment with surgery for CRC, which integrates chemotherapy, radiotherapy, concurrent chemoradiotherapy, biotherapy, traditional Chinese medicine, etc., especially patients at advanced stage. This paper highlighted current situation for combined treatment with surgery for CRC.

Key Words: Colorectal cancer; Surgery; Combined treatment

Cui HG, Cao XF. Surgery-predominant combined treatment for colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1774-1780

## 摘要

大肠癌(colorectal cancer, CRC)在国内其发病

率排第3位, 恶性肿瘤致死因素排第5位, 且都一直处于上升趋势。手术治疗作为CRC的首选治疗方法, 5年生存率仅在50%左右。近年来国际上很多学者采用在CRC手术治疗的基础上辅助以包括化疗、放疗、同步放化疗、生物治疗和中医药治疗等在内的一系列综合治疗手段, 在提高CRC患者, 特别是中晚期患者的治疗效果中取得了较为满意的结果。

关键词: 大肠癌; 手术; 综合治疗

崔恒官, 曹秀峰. 手术为主的大肠癌综合治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1774-1780

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1774.asp>

## 0 引言

大肠癌包括结肠癌和直肠癌, 是国内最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率排第3位, 致死因素第5位, 且随着生活水平的提高而不断增加。手术治疗作为大肠癌治疗的首选方法, 5年生存率仅在50%左右。近些年来国际上很多学者采用在大肠癌的手术治疗的基础上辅助以化疗、放疗、同步放化疗、生物治疗和中医药治疗等在内的一系列综合治疗手段, 在提高大肠癌治疗效果中取得可喜的成果。本文以手术为主的大肠癌的综合治疗现状进行综述如下。

## 1 手术与化疗

大约一半的大肠癌患者手术后5年内都有转移复发, 因此中晚期的大肠癌患者均需要接受化疗。5-氟尿嘧啶(5-FU)作为第1个用于临床的大肠癌化疗药物, 已经成为大肠癌化疗方案的基础, 其静脉化疗效果比口服化疗更有优势<sup>[1]</sup>。甲酰四氢叶酸(folinic acid/leucovorin, LV)是核酸合成的辅酶, 在与5-FU联合使用时可促使5-FU的活性代谢产物5-氟尿嘧啶脱氧核苷酸(5-FuDMP)与胸苷酸合成酶(TS)稳定结合, 从而增强5-FU的疗效<sup>[2]</sup>, 可以提高生存率<sup>[3]</sup>。5-FU+LV联合用药已成为国际上公认的标准疗法。目前LV在临床上使用甲酰四氢叶酸钙(calcium folinate, CF)最广。羟基喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT, CPT-11)是作用

## ■同行评议者

高泽立, 副教授,  
上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

于S期的细胞周期的特异性药物, 能通过有选择性的抑制拓扑异构酶 I 来干扰DNA的复制, 与临床上常用的抗肿瘤药物无交叉耐药性. 从面世以来就受到了广大医生的关注, Douillard *et al*<sup>[4]</sup> 研究显示CPT-11类药物依立替康(irinotecan)与5-FU联合使用疗效明显优于对照组. 有报道显示Irinotecan+5-FU+LV可以提高总存活时间和无进展存活时间<sup>[5]</sup>, 欧美已将5-FU+LV+CPT-11定为进展期大肠癌的一线化疗方案<sup>[6]</sup>. 第三代铂类抗肿瘤药物草酸铂(oxaliplatin, L-OHP)因为能够与DNA特定定位点结合来阻止DNA的转录和合成, 从而起到抗肿瘤的效果. L-OHP和顺铂等(DDP)的抗癌谱不完全相同, 无交叉耐药性, 对DDP治疗失败的大肠癌患者仍可能有效, 且与5-FU有协同作用<sup>[7]</sup>, 成为最受欢迎的抗肿瘤药物之一. De Gramont *et al*<sup>[8]</sup>报道5-FU+LV+L-OHP方案有相当明显的优势. Colucci *et al*<sup>[9]</sup>认为FOLFIRI和FOLFOX疗效类似, 主要区别在于不良反应方面.

全身静脉化疗包括术前化疗和术后化疗. 术前化疗也称新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy), 可以使局部肿瘤缩小, 降低癌细胞生命力, 利于切除, 预防远处转移. 术前化疗大都采用全身静脉联合化疗或口服给药化疗, 近来推荐的方案大都以5-FU+LV为基础, 主要包括FOLFIRI和FOLFOX等, 已有研究表明可显著提高患者疗效和安全性<sup>[10]</sup>, 但上述方案在大肠癌辅助化疗中的地位, 尚需进一步的临床研究对其进行评价, 目前相关报道已显示有效的术前化疗联合外科手术可以使患者延长中位生存期和肿瘤进展期<sup>[11]</sup>. 术后辅助化疗的意义早已明确, 用药的基础仍是5-FU+LV. 大量临床研究最后证实5-FU+LV化疗可以提高生存率, 减少毒副作用<sup>[12-14]</sup>. 因此, 5-FU+LV辅助化疗被确定为大肠癌术后辅助化疗的标准方案<sup>[12]</sup>. FOLFIRI结合手术治疗转移性大肠癌, FOLFOX4作为第二线方案, 取得较好的结果<sup>[15]</sup>. FOLFIRI和FOLFOX方案的辅助手术治疗的疗效比较尚在进一步研究中.

大肠癌的口服化疗药是氟嘧啶类前体药物, 吸收后通过体内代谢转变成5-FU, 起到抗癌的效果. 口服化疗具有疗效高、不良反应少, 治疗方便等优点, 发展口服化疗药物已成为大肠癌综合治疗中重要的一步<sup>[16]</sup>. 主要有喃氟嘧啶(FD-1)、优福啶(UFT, 即FT-207)、去氧氟尿苷(氟铁龙, FTL)和卡培他滨(capecitabine)等. 卡培他滨又称希罗达(xeloda), 是5-FU的前体药物. 有研究表明Xeloda治疗晚期大肠癌的效果相当于

5-FU+CF<sup>[17-18]</sup>, 甚至比Mayo方案更易于被患者接受<sup>[19]</sup>, 术前使用可以降低病理分期, 增加手术中保肛的可能<sup>[20]</sup>. 而且Xeloda的不良反应较轻, 仅手足综合症和腹泻较多. 他取代5-FU+LV与其他新药联合应用是近年的研究热点之一<sup>[21]</sup>. 替吉奥(S-1)是日本在以替加氟为基础开发出来的新口服化疗药, 有S-1+CPT-11与FOLFIRI(5-FU+LV+CPT-11)的研究显示: S-1+CPT-11与FOLFIRI疗效近似, 且毒性反应小<sup>[22]</sup>, 一种很有前途的和有效的治疗方法<sup>[23]</sup>. 因此也受到了广大临床医生的重视, 2003年被批准用于大肠癌的治疗<sup>[24]</sup>.

大肠癌术后转移和复发的重要原因之一是大肠癌的术后腹腔转移. 行腹腔区域性给药可以获得远高于经全身静脉途径的药物浓度, 而且全身药物不良反应也少于后者. 目前在基于手术治疗的大肠癌的治疗中比较广泛应用的有腹腔灌注化疗和区域性动脉灌注化疗. 腹腔灌注化疗可以提高局部药物浓度、降低全身副作用且能辅助手术治疗大肠癌<sup>[25]</sup>. 广泛的肿瘤细胞减灭术和腹腔热化疗是可行的, 可达到与传统的姑息性手术及全身化疗类似效果的方法<sup>[26]</sup>, 可以提高患者生存时间<sup>[27-28]</sup>, 腹腔热化疗与手术切除被认为是有效的, 将来可以通过改善常规使用的热疗方案来进一步提高疗效<sup>[29]</sup>. 相关研究显示大肠癌患者辅以腹腔动脉区域性灌注化疗可以提高治疗效果、利于预防肿瘤的肝转移和复发<sup>[30]</sup>. 但Nordlinger *et al*<sup>[31]</sup>的研究显示在全身系统性化疗的基础上联合以5-FU为主的区域化疗并没有比全身化疗获得更大的收益. 大肠癌的腹腔区域性化疗能够提高化疗药物的局部浓度来发挥作用, 在增强疗效和减少不良反应等方面有一定的优势, 吸引了许多医学工作者.

## 2 手术与放疗

在大肠癌中放疗适用于直肠癌. 近年来, 随着全直肠系膜切除(total mesorectal excision, TME)手术的开展, 大大提高了治疗效果, 已逐渐成为了直肠癌的首选术式. 但在目前单纯手术已无法再明显地提高直肠癌患者的疗效, 在直肠癌治疗中联合放疗则可以显著提高局部控制、增加保肛的机率、提高生活质量及生存率. 术前放疗因未遭手术破坏, 局部血供及含氧条件较好, 可以起到降期和减少术中出血的作用. 直肠癌术前放疗的照射野应包括全盆腔淋巴引流区, 如已有相邻脏器受累, 应包括髂外淋巴结, 照射

### ■ 研发前沿

随着分子生物学和基因工程技术的不断发展, 生物免疫治疗已经在直肠癌治疗中显示出了良好的发展前景, 成为肿瘤治疗的第4种模式.



# ■相关报道

De Gramont *et al* 报道5-FU+LV+L-OHP方案有相当明显的优势。Colucci *et al* 认为FOLFOX和FOLFIRI疗效类似,主要区别在于不良反应方面。

野上界在L5下缘,包括腹主动脉周围淋巴结区,下界应包括全部会阴。研究表明中低位直肠癌新辅助术前放疗能获得较高局部控制率并提高生存期,可以提高保存括约肌手术率<sup>[32]</sup>。其缺点在于无确定的病理所导致的过度或不必要的放射。术后放疗由于分期合理,与术前相比更有选择性,可以减少放疗的盲目性和治疗负荷。报道显示Dukes C直肠癌患者手术后放疗可以提高生存期,降低局部复发率<sup>[33]</sup>。但由于术后目标区域往往血供欠佳,而组织血氧浓度降低是明显影响放射效果的一个因素,并且易发生放射性粘连、小肠会阴瘘放射性直肠炎和吻合口狭窄等并发症,同时直肠癌术后放疗吻合口、会阴部复发较为常见。因此虽然术前和术后放疗各有其特点,但术后放疗的缺点和术前放疗的优点明显使人们更倾向于用以取代术后放疗<sup>[34-35]</sup>。但术前放疗也有争议,Frileux *et al*<sup>[36]</sup>的研究认为术前影像未发现周边侵犯者可不考虑术前放疗。

直肠癌术后患者有约半数死于局部复发或局部侵袭,因此为加强直肠癌局部控制和减少复发,在手术中植入粒子行近距离放疗,作为手术治疗的补充,在直肠癌的治疗中取得了较好的效果。临床研究表明在规范的保护下结合<sup>125</sup>I粒子永久植入治疗肿瘤对患者和环境都是安全的<sup>[37]</sup>,并可作为手术的补充,能达到长期的局部控制及提高生存率<sup>[38]</sup>。Luo *et al*<sup>[39]</sup>的研究显示:A组(直肠造口术+肛门括约肌保存术)3年局部复发率高于B组(改良的TME+肛门括约肌保存术+<sup>125</sup>I近距离放疗),而3年生存率低于后者。

## 3 手术与放化疗

化疗和放疗都是直肠癌的重要治疗方法,为增强疗效,提高治疗生存率,在术前或术后行放化疗,已经获得了临床肿瘤界的广泛关注。早在10余年前,就有研究表明术后联合以5-FU为基础的放化疗可以提高局部进展期直肠癌患者的总生存时间<sup>[40-41]</sup>。这一疗法一度成为国际公认的UICC-II、III期直肠癌的标准疗法。然而因为该疗法毒副作用较强等原因,使人们越来越重视术前放化疗也就是新辅助治疗(neoadjuvant therapy)。一项术前和术后放化疗的比较研究显示术前放化疗比术后有着稍高的总生存率,而局部治疗失败率(包括局部复发和肿瘤持续存在)的差异无统计学意义<sup>[42]</sup>。EORTC试验显示:术前放化疗的联合进行可利于提高病理降期,

减少对血管、神经和淋巴管的侵犯,但对局控和生存的影响还需长期随访<sup>[43-44]</sup>。研究显示新辅助放化疗可有效达到肿瘤病理降期的目的,提高了局部进展期低位直肠癌的根切率和保肛率,进一步降低了局部复发率和总复发率,并明显提高了无瘤生存率和总生存率<sup>[45-47]</sup>。

## 4 肿瘤生物治疗

随着分子生物学和基因工程技术的不断发展,肿瘤的治疗已不局限于传统的手术治疗、放疗和化疗,生物免疫治疗已经显示出良好的发展前景,已成为肿瘤治疗的第四种模式。肿瘤的生物治疗研究主要包括肿瘤细胞因子治疗、肿瘤疫苗、肿瘤靶向治疗和肿瘤基因治疗。

肿瘤的细胞因子治疗是通过从体外补充、诱导或活化体内生物反应调节系统具有的细胞活性因子,以达到抗肿瘤或治疗抗肿瘤药物的不良反应的作用,包括细胞因子白介素(interleukin, IL)、干扰素(interferon, IFN)和造血生长因子等。研究表明IL-2能够提高T细胞和NK细胞在肿瘤组织的活性<sup>[48]</sup>。目前特异性抗肿瘤细胞因子在大肠癌中的治疗效果仍缺少大量的研究结果来证实,但造血生长因子等在临床中已取得广泛的应用,如粒-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、促血小板生成因子(thrombopoietin, TPO)等。细胞免疫治疗与化疗的联合使用也是研究的重点之一,有研究表明化疗与免疫治疗是可以相互结合的,在治疗某些情况下还有协同增强作用<sup>[49]</sup>。

肿瘤疫苗作为肿瘤生物治疗的一种重要手段,已成为抗肿瘤免疫治疗研究的热点之一。他是利用肿瘤疫苗诱导机体主动特异或非特异免疫反应,产生抗体或免疫效应细胞来杀伤肿瘤细胞,从而抑制肿瘤的生长和转移。目前所研究的肿瘤疫苗主要是基因工程疫苗、肽疫苗、核酸疫苗、分子靶向疫苗和树突疫苗。Hoffmann *et al*<sup>[50]</sup>研究提示麻疹病毒可以作为增强细胞因子表达的肿瘤疫苗平台。Babatz *et al*<sup>[51]</sup>的实验也提示树突状细胞疫苗同样适用于特异性治疗大肠癌。虽然肿瘤疫苗的理论研究与实际应用目前仍存在一定差距,但其设计理念与研究成果已显示出强大的生命力,有望在抑制肿瘤生长、转移和复发等方面取得突破。

肿瘤的基因治疗通过矫正缺陷基因,选择性过度表达某些基因等方法产生抗肿瘤作用<sup>[52]</sup>。主

要包括基因修正治疗、导入自杀基因治疗、免疫基因治疗、多药耐药基因治疗和肿瘤血管基因治疗等方面。自从1990年美国首次应用基因治疗以来,国际上开展了各种基因治疗的临床试验,目前已有大量的基因治疗方案应用于肿瘤的治疗,虽说大肠癌的基因治疗已经从理论走向实践,其有效性也已在细胞学和动物的模型上得到了验证<sup>[53-55]</sup>,但现在大肠癌的基因治疗研究绝大多数仍处于实验阶段,基因治疗策略可以提高患者存活率与治疗疗效,但安全性是目前首要关注的问题<sup>[56]</sup>,另外如选择高效表达的载体以及适用于临床的基因转移方法等方面的问题都是基因治疗应用于大肠癌的综合治疗的一道门槛。

随着一系列包括作用于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等在内的分子靶向性药物的临床应用,肿瘤分子靶向治疗在辅助治疗中的作用也逐渐受到人们的重视。目前靶向治疗药物可分为单克隆抗体和小分子化合物,根据作用靶点不同又可分为作用于EGFR和作用于VEGF的药物。有研究表明EGFR在25%-81%的大肠癌中表达<sup>[57]</sup>,并通过介导多个通路来调节细胞的生长和分化,促进血管生成、抑制肿瘤细胞的凋亡<sup>[58]</sup>。西妥昔单抗(cetuximab, erbitux, C225)是第一个上市的可预防新生血管生成的重组人源化抗EGFR的mAb,其最大优点之一是不会引起肿瘤耐药。在2004年获得美国FDA批准用于治疗晚期结直肠癌,法国的一项临床试验支持了西妥昔单抗的有效性和可行性<sup>[59]</sup>。目前该药已进入III期临床试验。ABX-EGF(panitumab)是全人源化的EGFR的mAb,在2006-09获美国FDA批准上市,但其在大肠癌一线治疗中的作用尚需大量的临床研究证实。Sørbye *et al*<sup>[60]</sup>认为西妥昔单抗联合伊立替康是一个可能的第三线治疗方法。小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)也是目前研究的热点之一,如吉非替尼(gefitinib, ZD1839),有研究已经证实吉非替尼联合FOLFOX6(L-OHP/LV/5-FU)作为晚期大肠癌患者一线治疗安全有效<sup>[61]</sup>。VEGF与肿瘤的远处转移、复发密切相关,因此阻断VEGF可抑制血管新生,是治疗大肠癌的有效手段。贝伐单抗(bevacizumab, avastin)是目前最有前景的mAb之一,可抑制内皮细胞增生和新生血管形成,延缓肿瘤的生长和转移<sup>[62]</sup>。2004年美国FDA批准贝伐单抗与标准的IFL方案(CPT-

11/5-FU/LV)联合用于转移性结肠癌的一线治疗,贝伐单抗加入FOLFOX可以延长进展时间和总生存期<sup>[63]</sup>。不过,来自英国的从国民健康服务的角度来看的研究显示,结合5-FU+LV或5-FU+LV+CPT-11,贝伐单抗不太可能代表一个符合成本效益的国民保健服务资源<sup>[64]</sup>。研究显示贝伐单抗联合FOLFOX4可以显著提高转移性结直肠癌的生存期<sup>[65]</sup>。2006年美国FDA又批准贝伐单抗联合FOLFOX4作为转移性结直肠癌二线治疗方案<sup>[66]</sup>。Vatalanib(PTK787/ZK222584)是一种新的VEGFR的酪氨酸激酶抑制剂,可口服给药,在大肠癌患者的早期试验中取得的令人鼓舞的效果,第三阶段的临床方案中仍在进行进一步的研究<sup>[67]</sup>。EGFR和VEGF等分子靶向性药物结合5-FU+LV化疗药物的联合应用的相关研究也仍在进一步的进行中<sup>[68]</sup>。

## 5 手术与中医药治疗

中医药治疗大肠癌,是我国肿瘤治疗领域的一大特色。在中医中大肠癌属于“肠积”、“脏毒”、“肠癖”、“锁肛痔”、“便血”等范畴。大量的临床研究表明:包括手术、放疗、化疗等在内大肠癌的现代治疗方法在治疗肿瘤的同时也损害了机体的正常功能。中医的辨证施治对减少复发和转移、增强化疗效果以及减少不良反应等方面均起着重要作用<sup>[69-71]</sup>。可是目前中医药治疗大肠癌的研究特别是基础实验方面的研究还不够深入,对中医药抗肿瘤机制的分子水平研究等方面的研究远远落后于肿瘤发生演变机制的研究。但随着中医药研究的不断深入和广泛应用,中医药治疗在大肠癌的综合治疗中必将拥有更为广阔的前景。

大肠癌以手术为主的综合治疗的原则:在手术基础上根据患者体质、肿瘤部位、病理类型、浸润深度和转移情况,有计划、合理地综合应用现有的各种治疗手段,最大限度地提高肿瘤治愈效果和改善患者的生活质量。目前,国际上提倡的大肠癌治疗原则是: Dukes A期: 应尽早手术,无需做辅助放、化疗; Dukes B-C期: 在根治的基础上,可采用放疗降低局部复发率,采用化疗降低远处转移率,采用加热治疗提高化疗放疗疗效,减轻副反应采用生物免疫治疗增强机体免疫力等; Dukes D期: 尽可能切除原发灶,对远处转移灶能手术者尽量手术,有条件者可采用介入治疗等,联合以放、化疗等各种治疗方法。对不能切除的肿瘤,也应持积极态度,

## ■创新盘点

本文较系统地阐述当前手术为主的大肠癌的综合治疗现状,同时提出当前研究中的一些争议性问题。

# ■名词解释

区域化疗:是经动脉、门脉和腹腔等途径给药化疗,保证了局部区域性的高药物浓度对癌灶的杀伤作用,减少了化疗药物的全身性副作用。

在转流或造瘘等对症处理的基础上,采用物理治疗的方法处理局部病灶,也可采用放疗减少便血,减轻疼痛,适当全身化疗、肠内化疗、介入治疗等减慢肿瘤生长,改善症状。延长生存期,提高生活质量。

总之,大肠癌以手术为主的综合治疗是在个体化治疗原则下,充分发挥各种治疗手段的综合优势,谋取最大的治疗效果,目前已取得了一定的进展,但如何将各种治疗手段有机地结合,提高患者远期生存率和生活质量还有待进一步研究,这将是临床工作者下一步研究的重点所在。

## 6 参考文献

- Folprecht G, Cunningham D, Ross P, Glimelius B, Di Costanzo F, Wils J, Scheithauer W, Rougier P, Aranda E, Hecker H, Kohne CH. Efficacy of 5-fluorouracil-based chemotherapy in elderly patients with metastatic colorectal cancer: a pooled analysis of clinical trials. *Ann Oncol* 2004; 15: 1330-1338
- Omura K. Advances in chemotherapy against advanced or metastatic colorectal cancer. *Digestion* 2008; 77 Suppl 1: 13-22
- Kosmider S, Lipton L. Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3799-3805
- Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000; 355: 1041-1047
- Yamazaki K, Yoshino T, Boku N. IFL. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33: 907-910
- Uemura N, Yamada Y. FOLFIRI regimen for metastatic or recurrent colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33: 904-906
- Bleiberg H. Oxaliplatin (L-OHP): a new reality in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 77 Suppl 4: 1-3
- de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-2947
- Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Carteni G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarossa A, Lorusso V, Di Bisceglie M, Chiarenza M, Valerio MR, Guida T, Leonardi V, Pisconti S, Rosati G, Carrozza F, Nettis G, Valdesi M, Filippelli G, Fortunato S, Mancarella S, Brunetti C. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4866-4875
- Saeki H, Higashi H, Maehara S, Tanaka J, Makino I, Imamura S, Aso M, Katoh H, Kakeji Y, Maehara Y. Clinical outcomes of FOLFOX/FOLFIRI for the Japanese patients with far-advanced or recurrent colorectal cancer. *Fukuoka Igaku Zasshi* 2007; 98: 253-259
- Delaunoy T, Alberts SR, Sargent DJ, Green E, Goldberg RM, Krook J, Fuchs C, Ramanathan RK, Williamson SK, Morton RF, Findlay BP. Chemotherapy permits resection of metastatic colorectal cancer: experience from Intergroup N9741. *Ann Oncol* 2005; 16: 425-429
- Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995; 345: 939-944
- Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, Jones J, Mamounas EP, Ore L, Petrelli NJ. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1879-1887
- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2936-2943
- Popov IP, Milicevic M, Kecmanovic D, Tomasevic Z, Radosevic-Jelic Lj, Borojevic N, Micev MT, Kezic I. Incomplete operative removal of colorectal liver metastases followed by chemotherapy decreases survival in comparison to chemotherapy alone. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25: 313-319
- Prabhudesai AG, Kumar D. Adjuvant therapy of colorectal cancer: the next step forward. *Curr Med Res Opin* 2002; 18: 249-257
- Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, Bugat R, Findlay M, Frings S, Jahn M, McKendrick J, Osterwalder B, Perez-Manga G, Rosso R, Rougier P, Schmiegel WH, Seitz JF, Thompson P, Vieitez JM, Weitzel C, Harper P. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol* 2001; 19: 4097-4106
- Twelves CJ. Xeloda in Adjuvant Colon Cancer Therapy (X-ACT) trial: overview of efficacy, safety, and cost-effectiveness. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6: 278-287
- Twelves C, Gollins S, Grieve R, Samuel L. A randomised cross-over trial comparing patient preference for oral capecitabine and 5-fluorouracil/leucovorin regimens in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 239-245
- Velenik V, Anderluh F, Oblak I, Strojanc P, Zakotnik B. Capecitabine as a radiosensitizing agent in neoadjuvant treatment of locally advanced resectable rectal cancer: prospective phase II trial. *Croat Med J* 2006; 47: 693-700
- Kayaalp C, Sengul N, Akoglu M. Importance of cyst content in hydatid liver surgery. *Arch Surg* 2002; 137: 159-163
- Yoshimatsu K, Yokomizo H, Fujimoto T, Umehara A, Otani T, Matsumoto A, Osawa G, Ogawa K. Pilot study of simplified low-dose S-1 plus CPT-11 as first-line chemotherapy for patients with advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 1657-1661
- Koga M, Kamitani T, Futami K, Arima S. A case of

- ascending colon cancer with enlarged metastatic lymph nodes around superior mesenteric arterial root that responded dramatically to S-1 and CPT-11 combination chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34: 779-781
- 24 Shirao K, Ohtsu A, Takada H, Mitachi Y, Hirakawa K, Horikoshi N, Okamura T, Hirata K, Saitoh S, Isomoto H, Satoh A. Phase II study of oral S-1 for treatment of metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 2355-2361
  - 25 de Bree E, Witkamp AJ, Zoetmulder FA. Intraperitoneal chemotherapy for colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2002; 79: 46-61
  - 26 Witkamp AJ, de Bree E, Kaag MM, Boot H, Beijnen JH, van Slooten GW, van Coevorden F, Zoetmulder FA. Extensive cytoreductive surgery followed by intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with mitomycin-C in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Eur J Cancer* 2001; 37: 979-984
  - 27 Vaira M, Scuderi S, Costamagna D, Barone R, Aghemo B, Miodi PR, De Simone M. Cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic-antiblastic therapy (HAPP) in peritoneal carcinomatosis. *Minerva Chir* 2002; 57: 597-605
  - 28 Glehen O, Kwiatkowski F, Sugarbaker PH, Elias D, Levine EA, De Simone M, Barone R, Yonemura Y, Cavaliere F, Quenet F, Gutman M, Tentes AA, Lorimier G, Bernard JL, Bereder JM, Porcheron J, Gomez-Portilla A, Shen P, Deraco M, Rat P. Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3284-3292
  - 29 Elias D, Blot F, El Otmány A, Antoun S, Lasser P, Boige V, Rougier P, Ducreux M. Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy. *Cancer* 2001; 92: 71-76
  - 30 Chan R, Kerr D. Hepatic arterial chemotherapy for colorectal cancer liver metastases: a review of advances in 2003. *Curr Opin Oncol* 2004; 16: 378-384
  - 31 Nordlinger B, Rougier P, Arnaud JP, Debois M, Wils J, Ollier JC, Grobost O, Lasser P, Wals J, Lacourt J, Seitz JF, Guimares dos Santos J, Bleiberg H, Mackiewicz R, Conroy T, Bouche O, Morin T, Baila L, van Cutsem E, Bedenne L. Adjuvant regional chemotherapy and systemic chemotherapy versus systemic chemotherapy alone in patients with stage II-III colorectal cancer: a multicentre randomised controlled phase III trial. *Lancet Oncol* 2005; 6: 459-468
  - 32 Cao WG, Zhao R, Xi WQ, Ma T, Li H, Xu HP, Che JF, Jin YN. Evaluation of preoperative radiotherapy or chemoradiotherapy in sphincter preservation for locally advanced middle-low rectal cancer. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2007; 29: 225-227
  - 33 Heriot AG, Kumar D. Adjuvant therapy for resectable rectal and colonic cancer. *Br J Surg* 1998; 85: 300-309
  - 34 Baxter NN, Hartman LK, Tepper JE, Ricciardi R, Durham SB, Virnig BA. Postoperative irradiation for rectal cancer increases the risk of small bowel obstruction after surgery. *Ann Surg* 2007; 245: 553-559
  - 35 Vini L. Neoadjuvant radiochemotherapy for rectal cancer. *Dig Dis* 2007; 25: 56-66
  - 36 Frileux P, Burdy G, Aegerter P, Dubost G, Bernier M, Mabro M, Caillard C, Dubrez J, Brams A. Surgical treatment of rectal cancer: results of a strategy for selective preoperative radiotherapy. *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 934-940
  - 37 Zhuo SQ, Chen L, Zhang FJ, Zhao M, Zhang L, Liu J, Li K, Wu PH, Zheng QS, Wang Y. Environmental radiation dose monitor after 125I radioactive seed implantation. *Ai Zheng* 2007; 26: 666-668
  - 38 Nag S, DeHaan M, Scruggs G, Mayr N, Martin EW. Long-term follow-up of patients of intrahepatic malignancies treated with iodine-125 brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64: 736-744
  - 39 Luo KY, Shao QH, Yang GK, Mao WY, Li B, Yang R, Duan BF, Yang Y, Wang MC, Liu WZ. [125I seed implantation in sphincter preservation for treatment of low rectal cancer. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 1355-1357
  - 40 Douglass HO Jr, Moertel CG, Mayer RJ, Thomas PR, Lindblad AS, Mittleman A, Stablein DM, Bruckner HW. Survival after postoperative combination treatment of rectal cancer. *N Engl J Med* 1986; 315: 1294-1295
  - 41 Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, Kubista TP, Poon MA, Meyers WC, Mailliard JA. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 709-715
  - 42 Taher AN, El-Baradie MM, Nasr AM, Khorshid O, Morsi A, Hamza MR, Mokhtar N, Ezzat S. Locally advanced rectal carcinoma: preoperative radiotherapy versus postoperative chemoradiation, 10-year follow-up results of a randomized clinical study. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18: 233-243
  - 43 Bosset JF, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radoscovic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Briffaux A, Collette L. Enhanced tumorocidal effect of chemotherapy with preoperative radiotherapy for rectal cancer: preliminary results--EORTC 22921. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5620-5627
  - 44 Arraras Urdaniz JI, Arias de la Vega F, Vera García R, Manterola Burgaleta A, Martínez Aguillo M, Villafranca Iturre E, Salgado Pascual E. Quality of Life assessment through the EORTC questionnaires of locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemo-radiotherapy. *Clin Transl Oncol* 2006; 8: 423-429
  - 45 Yu BM, Zhang M, Wu WQ, Chen LW, Fu J, Fei CS, Shen Y. Efficacy of neoadjuvant radiochemotherapy in treatment of locally advanced low rectal cancer. *Zhonghua Waike Zazhi* 2007; 45: 445-448
  - 46 Bosset JF, Nguyen F, Bosset M, Servagi-Vernat S, Sedrati A, Lorgis V. Preoperative treatments of rectal cancers. *Cancer Radiother* 2007; 11: 349-352
  - 47 Lee SH, Lee KC, Choi JH, Oh JH, Baek JH, Park SH, Shin DB. Chemoradiotherapy followed by surgery in rectal cancer: improved local control using a moderately high pelvic radiation dose. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38: 112-121
  - 48 Chen J, Cao ZY, Zhang P, Peng ZL, Yang YL, Bi JH. Study on the TIL and NK of IL-2 injected via pelvic retroperitoneal space in gynecological cancer patient. *Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2004; 35: 406-408
  - 49 Mazzolini G, Murillo O, Atorrasagasti C, Dubrot J, Tirapu I, Rizzo M, Arina A, Alfaro C, Azpilicueta

#### 同行评价

本文内容新颖, 实用、全面, 层次清楚, 对临床医生有一定的指导意义。



- A, Berasain C, Perez-Gracia JL, Gonzalez A, Melero I. Immunotherapy and immunoescape in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5822-5831
- 50 Hoffmann D, Bayer W, Wildner O. In situ tumor vaccination with adenovirus vectors encoding measles virus fusogenic membrane proteins and cytokines. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3063-3070
  - 51 Babatz J, Röllig C, Löbel B, Folprecht G, Haack M, Günther H, Köhne CH, Ehninger G, Schmitz M, Bornhäuser M. Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 268-276
  - 52 Durai R, Yang SY, Seifalian AM, Winslet MC. Principles and applications of gene therapy in colon cancer. *J Gastrointest Liver Dis* 2008; 17: 59-67
  - 53 Hanari N, Matsubara H, Hoshino I, Akutsu Y, Nishimori T, Murakami K, Sakata H, Miyazawa Y, Ochiai T. Combinatory gene therapy with electrotransfer of midkine promoter-HSV-TK and interleukin-21. *Anticancer Res* 2007; 27: 2305-2310
  - 54 Schmitz V, Vilanueva H, Raskopf E, Hilbert T, Barajas M, Dzienisowicz C, Gorschlüter M, Strehl J, Rabe C, Sauerbruch T, Prieto J, Caselmann WH, Qian C. Increased VEGF levels induced by anti-VEGF treatment are independent of tumor burden in colorectal carcinomas in mice. *Gene Ther* 2006; 13: 1198-1205
  - 55 Kanagawa N, Niwa M, Hatanaka Y, Tani Y, Nakagawa S, Fujita T, Yamamoto A, Okada N. CC-chemokine ligand 17 gene therapy induces tumor regression through augmentation of tumor-infiltrating immune cells in a murine model of preexisting CT26 colon carcinoma. *Int J Cancer* 2007; 121: 2013-2022
  - 56 Mohr A, Lyons M, Mohr W, Zwacka RM. Gene therapy strategies for colorectal cancer. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132: 567-570
  - 57 Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, Attar A, Benichou J, Martin A, Morere JF, Raphael M, Penault-Llorca F, Breau JL, Fagard R, Khayat D, Wind P. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 2005; 16: 102-108
  - 58 Castillo L, Etienne-Grimaldi MC, Fischel JL, Formento P, Magné N, Milano G. Pharmacological background of EGFR targeting. *Ann Oncol* 2004; 15: 1007-1012
  - 59 Bachet JB, Afchain P, Fermanian C, Bouchahda M, Mitry E, Landi B, André T, Lièvre A, Louvet C, Aegerter P, Levi F, Rougier P. Cetuximab efficacy in patients treated routinely in university hospitals. *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 941-949
  - 60 Sørbye H, Braendengen M, Balteskard L. Palliative chemotherapy and radiotherapy for metastatic colorectal cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2008; 128: 194-197
  - 61 Zampino MG, Magni E, Massacesi C, Zaniboni A, Martignetti A, Zorzino L, Lorzio K, Santoro L, Boselli S, de Braud F. First clinical experience of orally active epidermal growth factor receptor inhibitor combined with simplified FOLFOX6 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2007; 110: 752-758
  - 62 McCormack PL, Keam SJ. Bevacizumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs* 2008; 68: 487-506
  - 63 Bir A, Tan W, Wilding GE, Lombardo J, Fakih MG. 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin plus bevacizumab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: a single-institute study. *Oncology* 2007; 72: 4-9
  - 64 Tappenden P, Jones R, Paisley S, Carroll C. The cost-effectiveness of bevacizumab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer in England and Wales. *Eur J Cancer* 2007; 43: 2487-2494
  - 65 Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB 3rd. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1539-1544
  - 66 Cohen MH, Gootenberg J, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer. *Oncologist* 2007; 12: 356-361
  - 67 Scott EN, Meinhardt G, Jacques C, Laurent D, Thomas AL. Vatalanib: the clinical development of a tyrosine kinase inhibitor of angiogenesis in solid tumours. *Expert Opin Investig Drugs* 2007; 16: 367-379
  - 68 de Gramont A, Tournigand C, André T, Larsen AK, Louvet C. Targeted agents for adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol* 2006; 33: S42-S45
  - 69 Luo L, Yang YF, Li PH. Cohort study on fuzheng capsule and quxie capsule in reducing relapse and metastasis of cancer in patients with stage II and III colorectal carcinoma after operation. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2006; 26: 677-680
  - 70 Zhu WR, Zheng L, Guo YB, Yuan JM, Shen XH. Clinical research of intraperitoneal chemotherapy plus Shenmai Injection in treating advanced colorectal cancer. *Zhong Xiyi Jiehe Xuebao* 2005; 3: 266-269
  - 71 Liu J, Wang WP, Zhou YY. Observation on therapeutic effect of jianpi huoxue herbs combined with chemotherapy in treating post-operational colonic cancer patients. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2005; 25: 207-209

编辑 李军亮 电编 何基才

# 细胞重要分子表型与肿瘤个体化治疗的研究进展

何平, 赵晓航

何平, 赵晓航, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021  
国家自然科学基金资助项目, No. 30772507, No. 30721001  
国家重点基础研究发展规划资助项目, No. 2004CB518707  
高技术发展计划“863”资助项目, No. 2006AA02Z19B  
作者贡献分布: 本文写作由何平完成; 赵晓航审阅。  
通讯作者: 赵晓航, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室, zhaoxh@cicams.ac.cn  
电话: 010-67709015 传真: 010-87778360  
收稿日期: 2008-02-27 修回日期: 2008-04-01

## Advances in tumor-related molecular phenotypes and personalized therapy

Ping He, Xiao-Hang Zhao

Ping He, Xiao-Hang Zhao, State key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772507, No. 30721001; the State Key Project for Basic Research, No. 2004CB518707, and the High-Tech Research and Development Program“863”, No. 2006AA02Z19B

Correspondence to: Dr. Xiao-Hang Zhao, State key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 17 Panjiayuananli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. zhaoxh@cicams.ac.cn

Received: 2008-02-27 Revised: 2008-04-01

## Abstract

Malignant tumor impairs human's health severely. Although progresses have been made in tumor's etiology, clinical management of tumor is still confronted by challenges. The standard treatments against tumor, including surgery, chemotherapy and radiotherapy, are not effective for all patients. The clinicians often feel confused while selecting appropriate therapeutic pattern and judging patients' prognosis. The clinical outcome of target-protein-based cancer therapy revealed that personalized molecular signature determined individualized curative effect. Effective management of tumor needs patient-tailored design. The so-called “omic” researches accelerate the studies in specific molecule phenotype of tumor cells, and the personalized

therapy against such individualized malignant phenotype will represent the future direction in tumor treatment.

**Key Words:** Molecular phenotype; Personalized therapy; Proteomics; Tumor marker; Signaling pathway

He P, Zhao XH. Advances in tumor-related molecular phenotypes and personalized therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1781-1787

## 摘要

恶性肿瘤严重危害着人类的健康。尽管肿瘤的病因学研究取得了一定进展, 肿瘤的临床处置依然面临挑战, 包括手术切除、化学药物治疗和放射治疗在内的标准治疗模式不能对所有患者都奏效。如何选择合适的治疗方案和准确评估患者的预后, 临床医生经常感到困惑。针对信号通路重要蛋白的分子靶向治疗的结果显示, 不同肿瘤患者具有独特的分子表型特征并决定了肿瘤治疗的疗效。有效治疗肿瘤需要量体裁衣式地设计出个体化的治疗方案。通过“组”学研究发现了许多肿瘤细胞特异的分子表型, 而针对这些表型的个体化治疗将是未来肿瘤治疗的方向。

**关键词:** 分子表型; 个体化治疗; 蛋白质组学; 肿瘤标志; 信号通路

何平, 赵晓航. 细胞重要分子表型与肿瘤个体化治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(16): 1781-1787  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1781.asp>

## 0 引言

肿瘤已成为我国城镇人口第一死因, 严重危害人类健康。尽管对肿瘤的病因学研究和以手术切除、放射治疗和化学药物治疗为主的综合治疗取得一定进展, 肿瘤治疗仍然面临巨大挑战<sup>[1]</sup>。对不同肿瘤类型和病理分期的个体采用相同的治疗方案也许是疗效不佳的原因之一, 个体差异与疗效的关系越来越受到临床医生和研究者的重视<sup>[2-6]</sup>。如果肿瘤治疗能够做到“因人而异、量体裁衣”似的个体化, 将能提高疗效、避免

## ■背景资料

肿瘤严重危害人类健康。尽管对肿瘤的病因学研究取得一定进展, 肿瘤临床处置依然面临巨大挑战。对不同肿瘤类型和病理分期的个体采用相同的治疗方案也许是疗效不佳的原因之一。

## ■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科; 黄文林, 教授, 中山大学附属肿瘤医院, 中山大学肿瘤防治中心

## ■ 研发前沿

目前肿瘤个体化研究的热点是应用高通量的“组”学技术描绘个体化的分子特征, 针对这些特征设计个体化靶向治疗方案, 并应用于肿瘤的临床治疗。

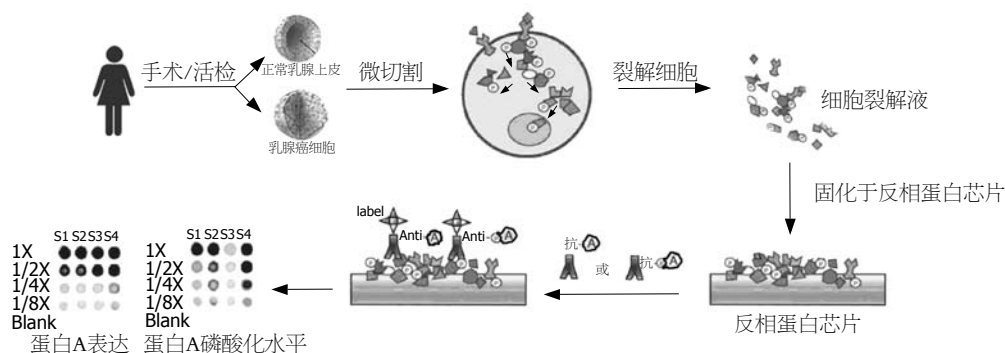


图1 分析信号传导通路激酶底物的表达和磷酸化水平。

过度治疗和降低患者经济负担, 减少医疗资源的浪费<sup>[7-8]</sup>。研究发现, 肿瘤细胞信号传导通路及其调节网络存在个体化差异<sup>[9-15]</sup>。而这种个体癌细胞分子水平的差异决定了治疗效果的差异, 所以根据肿瘤个体分子表型的特征选择治疗方案可能是个体化治疗的一个方向。高通量的“组学”技术适合全面的描述个体分子表型并发现肿瘤治疗的“新靶点”, 针对细胞异常信号传导通路中关键作用分子的肿瘤靶向治疗逐渐呈现个体化趋势<sup>[16-18]</sup>。

### 1 肿瘤细胞信号传导通路活性的个体化差异

细胞信号传导通路是由一系列级联放大的酶促反应被激活的。激酶底物蛋白的磷酸化是信号传递的驱动力。由此, 阐明特定细胞信号通路的激活程度, 了解该信号通路中关键激酶底物被磷酸化的状态十分重要<sup>[19]</sup>。研究证实, 细胞信号传导通路的异常活化是导致肿瘤发生发展的重要原因之一<sup>[20]</sup>。通过比较肿瘤患者样本不同时间点、不同病程阶段、治疗前后的关键激酶底物磷酸化水平, 可以了解特定细胞信号传导通路中关键激酶活性水平, 间接了解个体生理或病理状态。因此, 了解肿瘤细胞内关键细胞信号传导通路功能状态的网络图, 即关键靶点分子的表达水平和磷酸化程度, 将会成为肿瘤个体化治疗的一种新依据<sup>[9]</sup>。

Petricoin *et al*<sup>[21]</sup>分析了45例乳腺癌和9例良性乳腺病患者的癌组织和正常乳腺上皮中激酶底物磷酸化水平及其信号传导通路的磷酸化状态。乳腺癌手术切除或乳腺细针穿刺活检取材样本, 经显微切割获取癌细胞和正常乳腺上皮。全细胞裂解蛋白按不同稀释度被固定于反相蛋白质芯片上。用抗特定激酶底物蛋白抗体和抗该蛋白磷酸化抗体与固定于芯片上的靶蛋白杂交, 同时检测这些信号传导通路中特定激酶底物的表

达和磷酸化水平(图1)。如图所示, 蛋白A在4个样本(S1、S2、S3和S4)中表达水平是一致的, 但磷酸化程度不同, 在样本3(S3)中蛋白A的磷酸化水平明显低于来自其他个体的样本。结果显示, 细胞信号传导通路的活跃程度存在显著个体差异; 每个个体的肿瘤细胞呈现各不相同的激酶活性及其相应被活化的信号通路。尽管慢性粒细胞性白血病、间质瘤等某些肿瘤存在共同的细胞信号通路异常活化或功能障碍, 如c-kit家族信号传递异常活化<sup>[22-23]</sup>, 但多数散发的乳腺癌和某些上皮来源性恶性肿瘤是由复杂的、各不相同的细胞信号传导网络失调所引起的。

Irish *et al*<sup>[24]</sup>对急性粒细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)化疗前、后细胞样本做了多参数流式细胞学分析, 发现不同个体白血病细胞中STAT和MAPK等细胞重要信号传导通路的激酶底物磷酸化程度不尽相同。急性粒细胞白血病中常见两条平行的信号通路的异常活化<sup>[25]</sup>, 即STAT通路<sup>[26]</sup>和Ras/MAPK通路<sup>[27]</sup>。研究发现, STATs, 如STAT3和STAT5, 在AML中组成性活化<sup>[28-29]</sup>, 但是在AML患者的癌细胞中还未发现基础STAT磷酸化水平与白血病发生之间的因果联系。fms样酪氨酸激酶3(fms-like tyrosine kinase 3, Flt3)是以上2条通路的上游分子<sup>[30]</sup>, 其异常改变见于30%的AML患者, 而且Flt3还是AML不良预后的重要指示分子<sup>[31]</sup>。在细胞系中已发现突变且活化的Flt3可以激活STAT和Ras/MAPK通路<sup>[32]</sup>。然而, 也有研究发现Stat5磷酸化的基础水平在Flt3野生型和突变型的AML患者癌细胞并无统计学差异<sup>[33]</sup>。细胞系与患者原始样本之间的相反观察结果提示, 关键蛋白在信号传递网络中的作用模式而非绝对表达量(或是基础磷酸化状态)更能反应癌症的信号传递状态。基于以上考虑, Irish *et al*以已知发生Flt3突变和其他细胞遗传学异常改变的AML患者为研

表 1 美国FDA批准的靶向治疗药物

药物名称	商品名	分子靶点	药物性质	针对肿瘤类型
西妥昔(cetuximab)	爱必妥(Erbitux)	EGFR	mAb	结直肠癌、头颈鳞状细胞癌
曲妥珠(trastuzumab)	赫赛汀(Herceptin)	ERBB2	mAb	乳腺癌
贝伐(bevacizumab)	阿瓦斯丁(Avastin)	VEGF	mAb	结直肠癌
利妥昔(rituximab)	美罗华(Rituxan)	CD20	mAb	B细胞淋巴瘤
替伊莫(ibrutinib)	泽娃灵(Zevalin)	CD20	mAb	B细胞淋巴瘤
托西莫(tositumomab- <sup>131</sup> )	Bexxar	CD20	mAb	B细胞淋巴瘤
吉妥(gemtuzumab ozogamicin)	麦罗塔(Mylotarg)	CD33	mAb	急性粒细胞白血病
alemtuzumab	坎帕斯(CamPATH)	CD52	mAb	B细胞慢性淋巴细胞白血病
伊马替尼(imatinib mesylate)	格列卫(Gleevec)	BCR-ABL、KIT、PDGFR	SMI	胃肠间质瘤、慢性粒细胞白血病
吉非替尼(gefitinib)	易瑞沙(Iressa)	EGFR	SMI	非小细胞肺癌
艾罗替尼(erlotinib)	特罗凯(Tarceva)	EGFR	SMI	非小细胞肺癌、胰腺癌
舒尼替尼(sunitinib)	Sutent	VEGFR、KIT、PDGFR、FLT3	SMI	胃肠间质瘤、肾癌
索拉非尼(sorafenib)	多吉美(Nexavar)	B-Raf、EGFR、VEGFR2、PDGFR	SMI	肾癌
硼替佐米(bortezomib)	万珂(Velcade)	28S protease	SMI	多发性骨髓瘤

SMI: 小分子抑制剂。

研究对象,应用细胞内磷酸化特异流式细胞仪检测来源于患者外周血白血病细胞内的多个磷酸化、活化信号传递分子,并绘制磷酸化蛋白功能网络图。结果发现,AML不同遗传和临床表型有着不同的磷酸化蛋白信号传导网络特征。根据这种特征可以划分同一个体的不同癌细胞亚群,可以将AML患者分为对化疗反应和预后显著不同的四个亚类,并最终确定AML中与Flt3突变、其他遗传学改变、细胞表面标志物CD15表达以及对化疗敏感表型密切相关的磷酸化蛋白表达谱。由此可见,肿瘤细胞信号传导异常具有个性化特征。

## 2 常见肿瘤治疗分子靶标与疗效个体差异

随着对肿瘤细胞异常信号传导通路的了解,那些在肿瘤细胞中起关键调节作用的分子逐渐成为肿瘤靶向治疗潜在的“靶标”,例如细胞增殖、分化、迁移、血管形成和细胞周期调节的关键调节因子<sup>[34-35]</sup>。针对这些信号通路关键分子的肿瘤靶向药物按照化学性质通常可分为单克隆抗体类药物和小分子抑制剂类药物。单克隆抗体类药物可以直接和间接地杀伤肿瘤细胞。抗体直接阻断或激活靶信号分子及其受体,抑制细胞周期或DNA修复<sup>[36]</sup>,抑制血管形成<sup>[37]</sup>,增强受体内吞<sup>[38]</sup>。同时,抗体类药物还可以通过激活免疫效应细胞,通过补体依赖的细胞毒性

反应(complement-dependent cytotoxicity, CDC)和抗体依赖的细胞毒性反应(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)间接清除肿瘤细胞<sup>[39]</sup>。此类药物根据其人源化的程度又可分为嵌合抗体、人源化抗体和完全人抗体。小分子抑制剂可直接抑制信号传导通路中关键分子的活性,从而抑制肿瘤生长。其中最常见的是蛋白酪氨酸激酶的小分子抑制剂,他们大多是ATP的类似物,可竞争性地结合激酶,抑制激酶的活性<sup>[40]</sup>。表1列举了目前应用于肿瘤临床治疗的主要分子靶向药物。

临床研究提示,对于特定肿瘤患者,应用这种针对特异分子靶点的靶向治疗通常能够有效地控制肿瘤,但是也存在对此类药物不敏感的肿瘤个体。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的异常活化与多种肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[41-43]</sup>。EGFR的酪氨酸激酶结构域是其活性所必需的,针对这一结构域的小分子特异抑制剂-吉非替尼(gefitinib)和艾罗替尼(erlotinib)已被应用于晚期非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCL)的临床治疗<sup>[34-35,39-40]</sup>。然而,80%以上的非小细胞肺癌对这两种抑制剂并无反应<sup>[44-47]</sup>,提示只有部分人群肿瘤细胞内存在EGFR的异常传导通路<sup>[48]</sup>。研究提示,EGFR基因突变<sup>[49-50]</sup>、扩增<sup>[46,51-52]</sup>以及EGFR蛋白表达升高<sup>[52]</sup>与吉非替尼和艾罗替尼的药物

## ■相关报道

Marko-Varga *et al*综述了目前最先进的蛋白质组学研究方法的特点,并进一步介绍这些技术方法进行个体化治疗的实例。提出建立广泛的统计分析可以更好地理解个体差异的来源(如蛋白表达谱的差异),有助于对临床结局做出正确的判断。



# ■创新盘点

本文根据国内外最新资料,介绍针对肿瘤患者个体化分子表型的靶向治疗最新进展,提出建立在个体化分子特征基础上的用药模式。

敏感性呈正相关<sup>[53-55]</sup>。同时, K-ras基因的突变也与以上两种药物的抵抗性呈正相关<sup>[56]</sup>。然而,也有研究发现, EGFR基因的突变与艾罗替尼的药物疗效无关<sup>[46]</sup>。此外,发现对于EGFR基因突变几率低的男性、吸烟和肺鳞癌人群,艾罗替尼也可以延长患者的总体生存时间<sup>[57]</sup>。这种看似矛盾的研究结果提示,个体化分子特征决定个体疗效。实际上,每一个肿瘤个体都存在独特的疾病相关分子表达谱<sup>[10,15]</sup>,某类治疗方案可能仅对部分存在特异分子靶点的个体有效。因此,针对肿瘤个体特定分子表达谱的个体化治疗(personalized therapy)是肿瘤靶向治疗的方向<sup>[6]</sup>。

## 3 蛋白质组学研究在肿瘤个体化治疗中的探索性应用

“组学”技术是研究生物系统功能状态的有力工具,应用该技术可以综合评价肿瘤患者的个体差异。以基因芯片为代表的基因组学技术可分析肿瘤个体的基因表达谱,结合病理分期和生存资料将患者分成几个亚类<sup>[58-59]</sup>,便于进行有针对性的个体化治疗。然而,基因转录水平的改变不能完全反映蛋白质表达水平的异常,尤其是蛋白质的翻译后修饰、蛋白质相互作用和细胞信号传导通路的改变。通过蛋白质组学分析,可以展示特定细胞表达的全部蛋白质及其功能状态,通过检测信号通路中重要功能蛋白的表达和活性,区分肿瘤细胞特定分子表型与肿瘤靶向治疗的疗效关系,以实现肿瘤治疗的个体化<sup>[60-64]</sup>。

Taguchi *et al*<sup>[65]</sup>应用基质辅助激光解吸质谱(matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry, MALDI-MS)研究了吉非替尼/艾罗替尼治疗非小细胞肺癌的敏感性,从外周血分离、鉴定了一种基于8个特征性蛋白谱型,该蛋白谱型能够区分对EGFR抑制剂治疗敏感的人群。研究分为建立模型和验证两阶段。首先,采集139例未接受吉非替尼或艾罗替尼治疗的非小细胞肺癌外周血样本,进行MALDI-MS分析。从两个研究所分别采集了原始质谱数据,经分析得到可预测临床结局的基于8个特征谱型的算法。这些特征谱型用于区分两个研究所用药后不同临床结局人群的一致性为97.1%。进而,用已建立模型分别验证67和96个接受吉非替尼或艾罗替尼治疗的两组患者和158例未接受该药物治疗的患者(对照组)。吉非替尼治疗组病例被预测为“良好预后”和“不良预后”的生存

时间分别是207 d和92 d;艾罗替尼治疗组患者被预测为“良好预后”和“不良预后”的生存时间分别是306 d和107 d。未接受治疗的对照组,这8个特征谱型预测为“良好预后”和“不良预后”患者的生存时间无显著差异。因此,这种算法可以区分对小分子抑制剂吉非替尼和艾罗替尼有无反应的人群、判断预后,在治疗前预测哪些人接受吉非替尼/艾罗替尼治疗后可能有良好的疗效和预后,指导临床医师有针对性地用药。

Okano *et al*<sup>[66]</sup>应用双向差异凝胶电泳(two dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)分析了对吉非替尼敏感和不敏感肺腺癌组织差异表达蛋白。共鉴定87个差异蛋白,经过数据分析确定其中9个蛋白的组合可以准确区分对吉非替尼敏感和不敏感的肺腺癌人群。心型脂肪酸结合蛋白经酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)验证在对吉非替尼不敏感的肺腺癌人群中表达下降。由于EGFR的突变与吉非替尼敏感性有关<sup>[49-50]</sup>,该研究小组还分析了这些差异蛋白与EGFR突变的相关性,确定了与EGFR突变紧密相关的12个蛋白组合。这些差异蛋白有可能成为对肺腺癌吉非替尼靶向治疗疗效预测的候选标志分子,从而指导吉非替尼的个体化用药。

抗神经母细胞瘤的靶向治疗中广泛应用了拓扑异构酶抑制剂依托泊苷(etoposide)。拓扑异构酶可逆地与DNA结合,改变DNA三级结构,在DNA复制过程中发挥重要作用<sup>[67]</sup>。依托泊苷是拓扑异构酶II的选择性抑制剂,通过干扰其介导的DNA再连接而稳定拓扑异构酶II-断裂DNA复合物,从而抑制DNA复制<sup>[68]</sup>。依托泊苷的耐药性主要源于药物诱导的肿瘤细胞凋亡能力的下降。应用二维电泳(two dimensional electrophoresis, 2DE)技术, Urbani *et al*<sup>[69]</sup>在依托泊苷耐药的神经母细胞瘤细胞中发现一组高表达蛋白,如peroxiredoxin 1、 $\beta$ 半乳糖苷可溶性凝集素结合蛋白、Vimentin、热休克蛋白27和异质性核糖核蛋白K。此外,在依托泊苷耐药细胞克隆中还发现了表达水平明显下降的蛋白,即dUTP焦磷酸酶。这些蛋白抵抗依托泊苷的作用机制还不十分清楚,也可能是药物诱导的产物,他们有望成为预测神经母细胞瘤化疗敏感性的候选标志分子。Shin *et al*<sup>[70]</sup>用类似的差异蛋白质组学技术筛查了对5氟尿嘧啶(5-FU)化疗敏感/不敏感的结肠癌细胞的差异蛋白表达谱。发现,在对

5-FU不敏感的结肠癌细胞中线粒体F1F0-ATP合成酶的 $\alpha$ 亚基表达明显减少. 进一步分析发现在5-FU不敏感的结肠癌细胞中ATP合成酶亚基、ATP合成酶活性以及细胞内ATP含量都有所下降. 提示ATP合成酶的下调可能会导致细胞对5-FU化疗不敏感, 因此, 对于组织中ATP合成酶低表达的结肠癌来说, 5-FU化疗可能不是首选的化疗方案.

Allal *et al*<sup>[71]</sup>用比较蛋白质组学技术策略从17例直肠癌患者肿瘤组织分离、鉴定了放疗抵抗相关蛋白. 首先, 于治疗前采集直肠癌组织标本, 然后进行术前放疗, 放疗6 wk后患者接受手术治疗与临床反应评估. 从对治疗敏感或抵抗的肿瘤组织提取的总蛋白, 经2DE分离和MALDI-TOF-MS/MS串联质谱鉴定, 获得差异表达蛋白. 其中, 角蛋白I型蛋白、notch 2蛋白类似物以及DNA修复蛋白RAD51L3等蛋白的差异表达与放疗敏感性相关; 而tropomodulin、热休克蛋白42、 $\beta$ -tubulin、annexin V和calsenilin等则与放疗抵抗相关. 所鉴定的这些对放疗敏感或抵抗相关蛋白及其组合不但可以增加对放疗杀伤肿瘤细胞分子机制的认识, 还可以在放疗前辅助选择适应治疗的个体, 避免无效和/或过度治疗.

#### 4 结论

肿瘤生物学的个体化差异决定了肿瘤靶向治疗的个体化. 只有从每个肿瘤患者的个体入手, 分析其个体特性, 有针对性的“量体裁衣”, 才是肿瘤治疗有效和经济的途径. 肿瘤细胞信号传导异常具有个性化特征, 个体化治疗疗效优于传统的单一治疗模式. 然而, 肿瘤个体化治疗是肿瘤治疗的理想境界. 达到这个目标, 在今天看来并非易事, 可能的原因有: 缺乏检测个体化分子特征的工具, 缺乏对潜在指示个体化疗效分子标志的后期验证, 无法合理解释这些标志在肿瘤发生发展过程中发挥的确切作用, 缺乏利用这些个体化分子特征进一步指导临床治疗的经验等. 其中重要的原因是人类目前还远没有搞清楚细胞癌变的分子机制. 随着生物学研究技术的改进和人类对肿瘤发生发展机制认识的不断深入, 肿瘤治疗将会逐步接近个体化.

实际上, 在手术切除、放射治疗和化学药物治疗这3种治疗肿瘤的方法中, 最能体现针对细胞重要表型进行个体化干预的治疗手段是药物治疗. 其理想的治疗模式是: 临床医师在用药前

采集肿瘤患者的体液标本(包括血液、脑脊液和尿液等)并通过手术或穿刺技术采集肿瘤组织; 科研人员通过基因组学、蛋白质组学或代谢组学研究确认个体化的分子表型, 并将信息反馈给临床医师; 最后临床医师将这些个体化的分子表型信息与患者的临床症状、影像学 and 病理学的报告结果结合起来, 确定适合不同个体自身情况的用药方案.

#### 5 参考文献

- 1 Varmus H. The new era in cancer research. *Science* 2006; 312: 1162-1165
- 2 Calvo KR, Liotta LA, Petricoin EF. Clinical proteomics: from biomarker discovery and cell signaling profiles to individualized personal therapy. *Biosci Rep* 2005; 25: 107-125
- 3 Verrills NM. Clinical proteomics: present and future prospects. *Clin Biochem Rev* 2006; 27: 99-116
- 4 Jain KK. Personalized medicine. *Curr Opin Mol Ther* 2002; 4: 548-558
- 5 Petricoin E, Wulfkuhle J, Espina V, Liotta LA. Clinical proteomics: revolutionizing disease detection and patient tailoring therapy. *J Proteome Res* 2004; 3: 209-217
- 6 Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF. Clinical proteomics: personalized molecular medicine. *JAMA* 2001; 286: 2211-2214
- 7 Dalton WS, Friend SH. Cancer biomarkers--an invitation to the table. *Science* 2006; 312: 1165-1168
- 8 纪小龙. 癌症的个体化治疗. *肿瘤防治杂志* 2005; 12: 1833-1838
- 9 Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 683-695
- 10 Liotta L, Petricoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 48-56
- 11 Paweletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin III EF, Liotta LA. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 2001; 20: 1981-1989
- 12 VanMeter A, Signore M, Pierobon M, Espina V, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Reverse-phase protein microarrays: application to biomarker discovery and translational medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7: 625-633
- 13 Speer R, Wulfkuhle J, Espina V, Aurajo R, Edmiston KH, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Development of reverse phase protein microarrays for clinical applications and patient-tailored therapy. *Cancer Genomics Proteomics* 2007; 4: 157-164
- 14 Liotta LA, Espina V, Mehta AI, Calvert V, Rosenblatt K, Geho D, Munson PJ, Young L, Wulfkuhle J, Petricoin EF 3rd. Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell* 2003; 3: 317-325
- 15 Grubb RL, Calvert VS, Wulfkuhle JD, Paweletz CP, Linehan WM, Phillips JL, Chuaqui R, Valasco A, Gillespie J, Emmert-Buck M, Liotta LA, Petricoin EF. Signal pathway profiling of prostate cancer

#### ■应用要点

针对肿瘤个体化分子表型的个体化治疗将是未来肿瘤治疗的方向之一.

# ■名词解释

反相蛋白质芯片 (RPA): 是将待检测的样品固化在芯片的每个点上, 这样一张芯片可以同时固化成百上千的不同患者的样品或细胞裂解液。在该体系中, 每张芯片一次同一种检测蛋白 (如抗体) 杂交, 该蛋白同时在不同的样品得以检测, 从而在不同样品间进行平行比较。

- using reverse phase protein arrays. *Proteomics* 2003; 3: 2142-2146
- Smith L, Lind MJ, Welham KJ, Cawkwell L; Cancer Biology Proteomics Group. Cancer proteomics and its application to discovery of therapy response markers in human cancer. *Cancer* 2006; 107: 232-241
- Petricoin EF, Liotta LA. Clinical applications of proteomics. *J Nutr* 2003; 133: 2476S-2484S
- Wulfkühle JD, Edmiston KH, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Technology insight: pharmacoproteomics for cancer--promises of patient-tailored medicine using protein microarrays. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3: 256-268
- Thor AD, Liu S, Edgerton S, Moore D 2nd, Kasowitz KM, Benz CC, Stern DF, DiGiovanna MP. Activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3230-3239
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
- Petricoin EF 3rd, Bichsel VE, Calvert VS, Espina V, Winters M, Young L, Belluco C, Trock BJ, Lippman M, Fishman DA, Sgroi DC, Munson PJ, Esserman LJ, Liotta LA. Mapping molecular networks using proteomics: a vision for patient-tailored combination therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3614-3621
- Hochhaus A. Imatinib mesylate (Gleevec, Glivec) in the treatment of chronic myelogenous leukemia (CML) and gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Ann Hematol* 2004; 83 Suppl 1: S65-S66
- Nakajima M, Toga W. Tyrosine kinase inhibitor as a therapeutic drug for chronic myelogenous leukemia and gastrointestinal stromal tumor. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2003; 122: 482-490
- Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, Perez OD, Bruserud Ø, Gjertsen BT, Nolan GP. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell* 2004; 118: 217-228
- Stirewalt DL, Meshinchi S, Radich JP. Molecular targets in acute myelogenous leukemia. *Blood Rev* 2003; 17: 15-23
- Smithgall TE, Briggs SD, Schreiner S, Lerner EC, Cheng H, Wilson MB. Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* 2000; 19: 2612-2618
- Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003; 101: 4667-4679
- Xia Z, Baer MR, Block AW, Baumann H, Wetzler M. Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. *Cancer Res* 1998; 58: 3173-3180
- Benekli M, Xia Z, Donohue KA, Ford LA, Pixley LA, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood* 2002; 99: 252-257
- Gilliland DG, Griffin JD. Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 274-281
- Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100: 1532-1542
- Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19: 624-631
- Pallis M, Seedhouse C, Grundy M, Russell N. Flow cytometric measurement of phosphorylated STAT5 in AML: lack of specific association with FLT3 internal tandem duplications. *Leuk Res* 2003; 27: 803-805
- Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005; 353: 172-187
- Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008; 358: 1160-1174
- Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994; 9: 1829-1838
- Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 2002; 416: 279-280
- Harding J, Burtress B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc)* 2005; 41: 107-127
- Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 714-727
- Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 2006; 312: 1175-1178
- Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 505-516
- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 341-354
- Bubril EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 124-134
- Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2237-2246
- Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ Jr, Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ, Kay AC. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2003; 290: 2149-2158
- Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005; 353: 133-144
- Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, Li AR, Patel JD, Heelan RT, Kris MG, Sandler AB, Carbone DP, Tsao A, Herbst RS, Heller G, Ladanyi M, Pao W, Johnson DH. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J*

- Clin Oncol* 2008; 26: 1472-1478
- 48 Dancey JE, Freidlin B. Targeting epidermal growth factor receptor--are we missing the mark? *Lancet* 2003; 362: 62-64
  - 49 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-2139
  - 50 Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500
  - 51 Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643-655
  - 52 Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, Chang A, Parikh P, Pereira JR, Ciuleanu T, von Pawel J, Watkins C, Flannery A, Ellison G, Donald E, Knight L, Parums D, Botwood N, Holloway B. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5034-5042
  - 53 Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 169-181
  - 54 Wheatley-Price P, Shepherd FA. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of lung cancer: reality and hopes. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 162-175
  - 55 Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol* 2008; 26: 983-994
  - 56 Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005; 2: e17
  - 57 Clark GM, Zborowski DM, Santabarbara P, Ding K, Whitehead M, Seymour L, Shepherd FA. Smoking history and epidermal growth factor receptor expression as predictors of survival benefit from erlotinib for patients with non-small-cell lung cancer in the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study BR.21. *Clin Lung Cancer* 2006; 7: 389-394
  - 58 Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 124-134
  - 59 Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltman JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937-1947
  - 60 Aguilar-Mahecha A, Hassan S, Ferrario C, Basik M. Microarrays as validation strategies in clinical samples: tissue and protein microarrays. *OMICS* 2006; 10: 311-326
  - 61 Azad NS, Rasool N, Annunziata CM, Minasian L, Whiteley G, Kohn EC. Proteomics in clinical trials and practice: present uses and future promise. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1819-1829
  - 62 Caprioli RM. Deciphering protein molecular signatures in cancer tissues to aid in diagnosis, prognosis, and therapy. *Cancer Res* 2005; 65: 10642-10645
  - 63 Petricoin EF, Liotta LA. Proteomic approaches in cancer risk and response assessment. *Trends Mol Med* 2004; 10: 59-64
  - 64 Hasan RK, Wulfkühle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Studentjama. Molecular technologies for personalized cancer management. *JAMA* 2004; 291: 1644-1645
  - 65 Taguchi F, Solomon B, Gregorc V, Roder H, Gray R, Kasahara K, Nishio M, Brahmer J, Spreafico A, Ludovini V, Massion PP, Dziadziuszko R, Schiller J, Grigorieva J, Tsybin M, Hunsucker SW, Caprioli R, Duncan MW, Hirsch FR, Bunn PA Jr, Carbone DP. Mass spectrometry to classify non-small-cell lung cancer patients for clinical outcome after treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a multicohort cross-institutional study. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 838-846
  - 66 Okano T, Kondo T, Fujii K, Nishimura T, Takano T, Ohe Y, Tsuta K, Matsuno Y, Gemma A, Kato H, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signature corresponding to the response to gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 799-805
  - 67 Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 1996; 379: 225-232
  - 68 Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 635-692
  - 69 Urbani A, Poland J, Bernardini S, Bellincampi L, Biroccio A, Schnölzer M, Sinha P, Federici G. A proteomic investigation into etoposide chemoresistance of neuroblastoma cell lines. *Proteomics* 2005; 5: 796-804
  - 70 Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, Jeon E, Hong SH, Jung MS, Lim SJ, Park JG. Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* 2005; 65: 3162-3170
  - 71 Allal AS, Kähne T, Reverdin AK, Lippert H, Schlegel W, Reymond MA. Radioreistance-related proteins in rectal cancer. *Proteomics* 2004; 4: 2261-2269

# 同行评价

本文选题紧密结合临床亟待解决的难题, 起点高, 论证较充分, 参考文献新, 行文流畅, 具有较好的可读性。

编辑 李军亮 电编 何基才



# 乙型肝炎病毒囊膜蛋白候选结合蛋白的研究进展

周 飞, 任建林, 董 菁

## ■背景资料

HBV的S基因表现出编码多样性, 其不同长度的编码产物可能通过蛋白-蛋白相互作用影响宿主细胞的代谢、分化、凋亡乃至肿瘤的产生。

周飞, 任建林, 董菁, 厦门大学附属中山医院消化内科; 福建医科大学教学医院; 厦门市消化疾病研究所 福建省厦门市 361004

作者贡献分布: 本文由周飞撰写; 任建林与董菁立题及审校。

通讯作者: 董菁, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科; 福建医科大学教学医院; 厦门大学消化疾病研究所. dj@xmzsh.com

电话: 0592-2293170 传真: 0592-2293170

收稿日期: 2008-02-21 修回日期: 2008-04-02

## Advances of candidate binding protein to envelope protein of hepatitis B virus

Fei Zhou, Jian-Lin Ren, Jing Dong

Fei Zhou, Jian-Lin Ren, Jing Dong, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital of Xiamen University; Teaching Hospital of Fujian Medical University; Gastroenterology Institute of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Correspondence to: Jing Dong, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital of Xiamen University; Teaching Hospital of Fujian Medical University; Gastroenterology Institute of Xiamen University, 201 Hubin Southern Road, Xiamen 361004, Fujian Province, China. dj@xmzsh.com

Received: 2008-02-21 Revised: 2008-04-02

## Abstract

There are at least 4 initial coding positions in S gene of hepatitis B virus (HBV), encoding pre-pre-S, pre-S1, pre-S2 as well as major protein. There are no definite evidences to prove that envelope protein will interact with human cellular protein. This review focused on research approaches to the existing protein-protein interaction and summarized proteins of liver cells that may interact with current HBV envelope protein. However, most of currently available results need further verification.

Key Words: Hepatitis B Virus; Envelope protein; Interacting protein

Zhou F, Ren JL, Dong J. Advances of candidate binding protein to envelope protein of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1788-1792

## 摘要

HBV囊膜蛋白基因具有多个可变的起始编码

位置, 囊膜蛋白可能包含前前-S、前-S1、前-S2以及主蛋白等区域, 不同长度的囊膜蛋白组分与肝细胞内蛋白的相互作用机制并不清楚。本文着重探讨了现有的蛋白-蛋白相互作用的研究手段, 总结了目前宿主肝细胞可能与HBV囊膜蛋白相互作用的蛋白, 但目前获得的大部分结果需进一步验证。

关键词: 乙型肝炎病毒; 囊膜蛋白; 相互作用蛋白

周飞, 任建林, 董菁. 乙型肝炎病毒囊膜蛋白候选结合蛋白的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(16): 1788-1792

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1788.asp>

## 0 引言

2005年世界卫生组织调查结果显示全世界约有4亿HBV感染者<sup>[1]</sup>, HBV严重威胁着人类的健康。近年来研究发现HBV编码的病毒蛋白在感染肝细胞方面起重要作用, 对肝细胞代谢有重要影响, 但病毒蛋白产生病理作用的生物学机制尚不明。本文对近年来HBV编码病毒囊膜蛋白及其结合蛋白相互作用的研究进展进行总结。

## 1 HBV S基因分区的研究进展

HBV基因组是一种部分双链DNA病毒, 具有独特而精密的结构, 全长约3200 bp。1980年代初Galibert *et al*<sup>[2]</sup>通过对HBV基因组进行开放读码框(open reading frame, ORF)进行了界定分析, 确定了前C/C、P、S、X基因, 之后在S基因上游确定了前-S1、前-S2区<sup>[3]</sup>。1983年Fujiyama *et al*<sup>[4]</sup>在其研究中被提及前-S区之前的ORF, 作者认为该ORF身份不明; Mimms *et al*<sup>[5]</sup>将Fujiyama研究的克隆分析后认为, 该段多肽是前-S1多肽的一部分, 但该段编码存在的广泛性未得到承认。目前国内外仍沿用公认的前-S1、前-S2和S基因的分区方法(图1), 分别编码HBsAg包括小(SHBs), 中(MHBs)和大(LHBs)蛋白, 他们各自具有糖基化和非糖基化两种形式<sup>[6-9]</sup>。近年来董菁 *et al*<sup>[10]</sup>围绕HBV准种的研究提供了我国大陆新的HBV分子流行病学资料, 认为Fujiyama *et al*发现的前-S1上游的编码序列在亚洲具有地域流行性特征,

## ■同行评议者

张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心; 高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

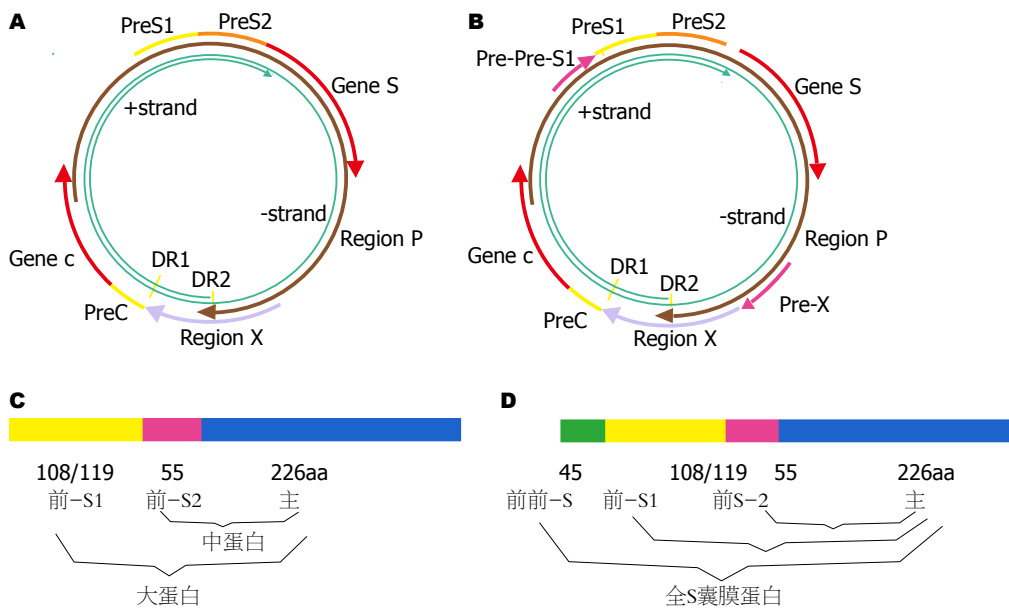


图 1 HBV的开放读码框. A: 原定义的HBV开放读码框; B: 新定义的HBV开放读码框; C: 原定义ay(ad)血清型的S基因编码蛋白; D: 新定义ay(ad)血清型的S基因编码蛋白.

故提出前前-S区这一概念, 并将我国的HBV部分病毒株的S区重新定义为前前-S、前-S1、前-S2及S区基因; 结合前-X流行病学资料, 新提出的HBV基因结构图(图1), 本文提到的全S蛋白即编码前前-S多肽与大蛋白的病毒蛋白, 具有一定的地域性.

## 2 囊膜蛋白结合蛋白的研究进展

HBV进入肝细胞的机制不明确, 可能是通过病毒蛋白与肝细胞膜蛋白(受体)相互作用, 或者是通过肝细胞胞饮作用进入细胞, 目前尚无定论. HBV囊膜蛋白是病毒与肝细胞膜病毒受体结合的最有可能的蛋白成分. HBV囊膜蛋白在被感染肝细胞内呈过度表达, 可能与宿主蛋白之间存在相互作用, 进而影响肝细胞功能. 下文探讨了目前常用的蛋白-蛋白相互作用的研究方法, 并对近年来囊膜蛋白结合蛋白的研究结果进行总结.

**2.1 蛋白-蛋白相互作用研究方法** 目前常用的蛋白-蛋白相互作用的研究方法主要有酵母双杂交技术(yeast two-hybrid)、哺乳动物细胞双杂交(mammalian two-hybrid)、噬菌体表面展示(phage display)技术、免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation)及谷胱甘肽(GST)-pull down等生物学技术. 下面就这5种分子生物学技术进行概述:

酵母双杂交技术是利用酵母双杂交系统研究细胞内蛋白之间相互作用的一种分子遗传学技术<sup>[11]</sup>, 具有操作简便、不经蛋白质纯化即可

获得配体蛋白的编码基因等特点, 可从cDNA文库和基因文库中直接筛选出蛋白间相互作用<sup>[12]</sup>. 该技术主要应用于: 验证蛋白-蛋白相互作用、确定蛋白-蛋白特异性相互作用的关键结构域、筛选文库以获得可能与已知蛋白存在特异相互作用的蛋白质等<sup>[13-17]</sup>. 该技术缺点在于: 不适用于所有蛋白相互作用的研究、可能筛出假阳性的结果、酵母菌株中表达外源蛋白质质常会带来毒性作用造成的假阴性结果<sup>[18-20]</sup>.

哺乳动物细胞双杂交是在体内检测蛋白-蛋白相互作用的强有力方法, 其原理类似于酵母双杂交, 需要诱饵蛋白、猎物蛋白相互作用后才激活报告基因的表达, 只不过两者的宿主不同, 一个在哺乳动物细胞, 另一个在酵母细胞<sup>[21]</sup>. 哺乳动物细胞双杂交的优点在于, 所研究靶蛋白基本处于原来构型, 保持了诸如糖基化、磷酸化和酰基化等翻译后的修饰; 报告系统可以定量显示相互作用. 缺点在于, 细胞转化效率不稳定, 重复性差; 不适合文库的筛选. 哺乳动物细胞双杂交适用于蛋白的相互作用的确证研究, 或应用于识别涉及蛋白-蛋白相互作用的域/残基, 通常用于酵母双杂交筛选出的相互作用的蛋白进行验证<sup>[22-23]</sup>.

噬菌体展示技术是一种基因表达产物与亲和选择相结合的技术, 该技术以改构的噬菌体为载体, 把待选基因片段以多肽/蛋白形式展示于噬菌体表面, 通过与另一个噬菌体展示库的相互作用, 可以导致待选基因表达产物选择性地与其

## ■ 相关报道

国内成军、王小众 *et al* 实验室较为系统的应用酵母双杂交方法筛选了HBV囊膜蛋白各个分区的宿主结合蛋白, 有部分结果予以多种技术手段加以验证, 结果较为可靠, 为进一步研究提出了新的思路.

## ■ 创新盘点

本文系统阐述了目前HBV S基因的研究现状, 指出全S蛋白可能是一种重要的病毒蛋白形式, 主张加强对病毒蛋白-宿主蛋白相互作用研究, 并探讨病毒蛋白影响宿主细胞的生长、代谢及分化的具体途径.

## ■应用要点

本文收集并系统分析了目前HBV囊膜蛋白候选结合蛋白的研究方法及其初步结果,为下一步的研究方向提出新的思路。

可能具有相互作用的某个外源肽相结合,从而研究该噬菌体所含外源基因的生物学功能<sup>[24-25]</sup>。噬菌体展示技术优点在于,序列的多样性,其组合肽文库有着巨大的编码潜力;可通过体外筛选组合肽文库得到与靶目标结合的多肽配基。噬菌体展示技术缺点在于,受噬菌体系统所固有的生理属性的限制,其结果经常会得到非相关的多肽序列。该技术主要应用于重组肽库(识别肽受体配基)的亲合筛选,确定单克隆抗体的抗原表位,选择酶作用底物以及筛选克隆的全套抗体<sup>[26-28]</sup>。

免疫共沉淀技术是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础的应用于研究蛋白质相互作用的一种方法<sup>[29]</sup>,可有效确定2种蛋白在完整细胞内生理性相互作用的方法。其原理是:当细胞在非变性条件下被裂解时,完整细胞内存在的许多蛋白质-蛋白质间的相互作用被保留了下来,之后以特异性抗体检测已知蛋白与其他蛋白的结合作用。该方法优点在于,相互作用的蛋白都是经翻译后修饰的,处于天然状态;蛋白的相互作用是在相对自然状态下进行的,可以避免实验手段造成的影响;可以分离天然状态的相互作用蛋白复合物<sup>[30-31]</sup>。该方法缺点在于,所检测的两种蛋白可能通过第3种蛋白在中间起桥梁作用而相互作用;实验前需要获得至少1种蛋白的抗体。该方法用于测定2种目标蛋白是否结合,也用于确定一种已知蛋白的结合蛋白,往往还需要联合质谱分析来判定结合蛋白的序列及性质。适用于酵母双杂交相互作用蛋白的验证<sup>[32]</sup>。

GST-pull down技术利用了融合表达蛋白的谷胱甘肽(GST)标签对GST偶联球珠的亲合性,从非相互作用蛋白的溶液中纯化相互作用蛋白,该技术在于探测蛋白在溶液中的相互作用,而这种作用在膜性分析中可能是检测不到的<sup>[33]</sup>。该技术缺点在于,只用于确定体外的相互作用,这种体外的相互作用需要进一步在体内通过单独的方法进行证实,如免疫共沉淀;对检测的未知蛋白必须有足够的量存在;必须对每个蛋白质复合物的分析进行优化,其中最重要的变量是发生相互作用的缓冲液在检测SDS聚丙烯酰胺凝胶出现阴性结果时需要进行变性/复性过程才有可能出现阳性结果。该技术通常应用于确定融合蛋白与未知(或靶)蛋白间及证实探针蛋白与已知蛋白可疑的相互作用<sup>[34-36]</sup>。

综上所述各种分子生物学技术各有其优

缺点,酵母双杂交和噬菌体展示技术主要适用于文库的筛选,前者更适合进行蛋白-蛋白相互作用研究,后者更适合抗体或多肽药物的筛选;哺乳动物细胞双杂交、免疫共沉淀和GST-pull down技术不适用于结合蛋白的筛选,更适合于验证特定蛋白之间相互作用关系。在实际的研究中,单一实验方法是不能完全确证蛋白之间的相互作用,需要综合的运用,各种方法相互验证<sup>[37-39]</sup>。

**2.2 HBV囊膜蛋白候选结合蛋白的研究现状** 由于HBV囊膜蛋白的结构复杂,国内外多个研究组对HBV S基因分段编码多肽/蛋白与宿主细胞蛋白之间的相互作用总结如下。(1)前前-S蛋白结合蛋白: 蔺淑梅 *et al*<sup>[40]</sup>利用酵母双杂交技术,以前前-S蛋白为诱饵,对肝文库进行筛选,发现了30种已知蛋白基因及8种未知蛋白,如: 人类醛缩酶B, 人类金属硫蛋白2A在多个研究结果中出现,但未见作者用其它方法进一步验证的报道。该研究获得前前-S蛋白结合蛋白的结果,只能提示前前-S蛋白可能与肝文库中的38种蛋白结合,但特异性可能不高。(2)前-S1蛋白结合蛋白: Ryu *et al*<sup>[41]</sup>利用GST-pull down技术研究前-S1蛋白结合蛋白,发现了p80(80 kDa)蛋白能和前S1蛋白结合,但未见有后续研究报道;李丹 *et al*<sup>[42-43]</sup>利用酵母双杂交技术初步证实了前-S1蛋白能与多肽相关复合体 $\alpha$ 亚单位(NACA)结合,并利用免疫共沉淀技术进行了验证,结果高度提示NACA可能与前-S1蛋白产生特异性结合,研究结果可信度较高。李丹 *et al*<sup>[44]</sup>继续利用酵母双杂交技术又发现了一个能与前-S1蛋白结合的蛋白,为丝裂原活化蛋白激酶,有待其进一步验证。董菁 *et al*<sup>[45]</sup>利用噬菌体表面展示技术来研究前-S1蛋白的结合,发现了神经胶质瘤抑制基因区候选基因2(GLTSCR2)能与前-S1蛋白结合,未再进行深入研究,故筛选出的结合肽有待验证。(3)前-S2蛋白结合蛋白: 陆荫英 *et al*<sup>[46]</sup>利用酵母双杂交技术,以前-S2蛋白为诱饵,对肝文库进行筛选,发现10个能与前-S2蛋白的结合蛋白,其中8个为已知功能蛋白,2个为未知功能蛋白,但未对其筛选结果进行验证。其中的金属硫蛋白2A基因及白蛋白为多个不同大小囊膜蛋白的研究结果中出现,故需进一步验证。(4)前-S蛋白结合蛋白(前-S1蛋白和前-S2蛋白): Deng *et al*<sup>[47]</sup>利用噬菌体表面展示技术来寻找前-S蛋白的配体,筛选出5个氨基酸序列能与前-S1结合,未进一步验

证. Deng *et al*<sup>[48]</sup>再利用噬菌体表面展示技术来寻找前-S蛋白的受体, 发现了脂蛋白脂肪酶A能与前-S蛋白结合, 并利用了GST-pull down技术进行了验证, 故可信度高. (5)中蛋白结合蛋白: 李志群 *et al*<sup>[49]</sup>利用酵母双杂交技术, 以中蛋白为诱饵, 对肝文库进行筛选, 研究结果提示了醛缩酶B和未知功能MBP1蛋白能与中蛋白结合, 但也未对其进一步研究. 其中的醛缩酶B为多个不同大小的囊膜蛋白研究结果中都有. (6)截短型中蛋白结合蛋白: 李志群 *et al*<sup>[50]</sup>利用酵母双杂交技术, 以羧基末端截短型中蛋白(MHBst167)为诱饵, 对肝文库进行筛选, 获得了7个已知功能蛋白能与羧基末端截短型中蛋白结合蛋白, 但未进一步研究. 其中筛选出的醛缩酶B结合蛋白也能与前前-S蛋白及中蛋白结合. (7)主蛋白结合蛋白: Toh *et al*<sup>[51]</sup>利用酵母双杂交分离的泛素系统(一种新型的膜蛋白酵母双杂交系统), 进行主蛋白的膜结合蛋白筛选, 获得了3个能与主蛋白相结合的蛋白; 分别为硫氧蛋白相关转膜蛋白2、连接相关蛋白复合体2、补体加速降解因子; 而Tan *et al*<sup>[52]</sup>利用噬菌体表面展示技术筛选出ETGAKPH多肽能与主蛋白特异位点结合. 两者的研究都未见后续报道, 尚待验证可信度不高. (8)全S蛋白结合蛋白: Bai *et al*<sup>[53]</sup>利用酵母双杂交技术对全S蛋白进行了筛选, 获得10个能与全S蛋白结合的蛋白, 并利用免疫共沉淀对其筛选出的蛋白进行了验证, 证明一个未知功能蛋白与全S蛋白特异性结合. 筛选结果中有白蛋白与以前S2蛋白为诱饵筛选的结果相同; 而筛选出的金属硫蛋白A2不仅与前S2蛋白为诱饵筛选的结果相同, 也与以前前-S蛋白为诱饵筛选出的结果也相同. 这说明白蛋白和金属硫蛋白A2可能与囊膜蛋白结合, 从而对肝细胞产生影响.

乙型肝炎病毒囊膜蛋白的研究取得一定成果, 筛选出的结果大部分为非特异蛋白, 其内部可能存在特定的空间结构可与囊膜蛋白相互结合, 从而影响肝细胞的新陈代谢. 从以上结果中未能找到能够与囊膜蛋白结合的而又明确的肝细胞膜受体. 李丹研究发现的丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路, 可能为囊膜蛋白产生生物学作用的机制, 但未对其进行验证, 仍待进一步研究. 从以上研究结果看出, 只有李丹 *et al*的研究联合了两种以上的蛋白-蛋白相互作用方法, 故可信度高.

### 3 结论

关于HBV囊膜蛋白的结合蛋白方面研究取得一定成果, 但主要问题在于上述大部分结果多是单向试验结果, 目前的结果中没有跨膜蛋白被证明与HBV囊膜蛋白具有明确的相互作用, 其肝细胞受体假说尚未明确, 仍需我们进一步去研究.

### 4 参考文献

- 1 Gish RG. Current treatment and future directions in the management of chronic hepatitis B viral infection. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 541-565
- 2 Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. *Nature* 1979; 281: 646-650
- 3 Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* 1984; 52: 396-402
- 4 Fujiyama A, Miyanohara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, Matsubara K. Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 4601-4610
- 5 Mimms LT, Solomon LR, Ebert JW, Fields H. Unique preS sequence in a gibbon-derived hepatitis B virus variant. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 186-191
- 6 Chai N, Gudima S, Chang J, Taylor J. Immunoadhesins containing pre-S domains of hepatitis B virus large envelope protein are secreted and inhibit virus infection. *J Virol* 2007; 81: 4912-4918
- 7 Blanchet M, Sureau C. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* 2006; 80: 11935-11945
- 8 Lambert C, Prange R. Posttranslational N-glycosylation of the hepatitis B virus large envelope protein. *Virol J* 2007; 4: 45
- 9 Sureau C, Fournier-Wirth C, Maurel P. Role of N glycosylation of hepatitis B virus envelope proteins in morphogenesis and infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol* 2003; 77: 5519-5523
- 10 董菁, 任建林, 卢雅丞. 乙型肝炎病毒蛋白表型定义初探. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2074-2085
- 11 Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340: 245-6
- 12 Osman A. Yeast two-hybrid assay for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 2004; 270: 403-422
- 13 Miller J, Stagljar I. Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins. *Methods Mol Biol* 2004; 261: 247-262
- 14 Wang H, Peters GA, Zeng X, Tang M, Ip W, Khan SA. Yeast two-hybrid system demonstrates that estrogen receptor dimerization is ligand-dependent in vivo. *J Biol Chem* 1995; 270: 23322-23329
- 15 Legrain P, Selig L. Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Lett* 2000; 480: 32-36
- 16 Walhout AJ, Vidal M. High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* 2001; 24: 297-306
- 17 Maple J, Moller SG. Yeast two-hybrid screening.

### ■名词解释

1 前前S编码区: 是指存在于前S1区之前的一段编码区域, 长度135 bp, 编码45 aa, 可能具有前导肽功能.  
2 全S蛋白: 是指编码自前前S区至主蛋白的第4种HBV囊膜蛋白表达形式, 可能是亚洲流行病毒株的一种特异性表现.



## ■同行评价

本文内容新颖, 科学性较强, 思路清晰, 具有很好的学术价值。

- 18 Legrain P, Wojcik J, Gauthier JM. Protein-protein interaction maps: a lead towards cellular functions. *Trends Genet* 2001; 17: 346-352
- 19 Vidalain PO, Boxem M, Ge H, Li S, Vidal M. Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods* 2004; 32: 363-370
- 20 Chen J, Chua HN, Hsu W, Lee ML, Ng SK, Saito R, Sung WK, Wong L. Increasing confidence of protein-protein interactomes. *Genome Inform* 2006; 17: 284-297
- 21 Uytendaele I, Lemmens I, Verhee A, De Smet AS, Vandekerckhove J, Lavens D, Peelman F, Tavernier J. Mammalian protein-protein interaction trap (MAPPIT) analysis of STAT5, CIS, and SOCS2 interactions with the growth hormone receptor. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2821-2831
- 22 Matsuzawa S, Reed JC. Yeast and mammalian two-hybrid systems for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 2007; 383: 215-225
- 23 Lee JW, Lee SK. Mammalian two-hybrid assay for detecting protein-protein interactions in vivo. *Methods Mol Biol* 2004; 261: 327-336
- 24 Rodi DJ, Makowski L, Kay BK. One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6: 92-96
- 25 Sidhu SS, Koide S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17: 481-487
- 26 Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1622-1654
- 27 Hust M, Dubel S, Schirrmann T. Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. *Methods Mol Biol* 2007; 408: 243-255
- 28 Rojas G, Talavera A, Munoz Y, Rengifo E, Krenzel U, Angstrom J, Gavilondo J, Moreno E. Light-chain shuffling results in successful phage display selection of functional prokaryotic-expressed antibody fragments to N-glycolyl GM3 ganglioside. *J Immunol Methods* 2004; 293: 71-83
- 29 Berggard T, Linse S, James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 2007; 7: 2833-2842
- 30 Masters SC. Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods Mol Biol* 2004; 261: 337-350
- 31 Elion EA, Wang Y. Making protein immunoprecipitates. *Methods Mol Biol* 2004; 284: 1-14
- 32 Tanowitz M, von Zastrow M. Identification of protein interactions by yeast two-hybrid screening and coimmunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2004; 259: 353-369
- 33 Brymora A, Valova VA, Robinson PJ. Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry. *Curr Protoc Cell Biol* 2004; Chapter 17: Unit 17.5
- 34 Nagaya T, Seo H. Functional analysis of nuclear hormone receptors. *Nippon Rinsho* 1998; 56: 1688-1692
- 35 Kishimoto A, Ogura T, Esumi H. A pull-down assay for 5' AMP-activated protein kinase activity using the GST-fused protein. *Mol Biotechnol* 2006; 32: 17-21
- 36 Craig TJ, Ciufo LF, Morgan A. A protein-protein binding assay using coated microtitre plates: increased throughput, reproducibility and speed compared to bead-based assays. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 60: 49-60
- 37 Ledee DR, Tripathi BK, Zelenka PS. The CDK5 activator, p39, binds specifically to myosin essential light chain. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 1034-1039
- 38 Liu JP, Liu NS, Yuan HY, Guo Q, Lu H, Li YY. Human homologue of SETA binding protein 1 interacts with cathepsin B and participates in TNF-Induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2006; 292: 189-195
- 39 Swick L, Kapatos G. A yeast 2-hybrid analysis of human GTP cyclohydrolase I protein interactions. *J Neurochem* 2006; 97: 1447-1455
- 40 蔺淑梅, 张树林, 成军, 刘敏, 王琳, 王建军, 杨倩, 黄燕萍, 白桂芹. 肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒前-S蛋白结合蛋白基因筛选. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2907-2910
- 41 Ryu CJ, Cho DY, Gripon P, Kim HS, Guguen-Guillouzo C, Hong HJ. An 80-kilodalton protein that binds to the pre-S1 domain of hepatitis B virus. *J Virol* 2000; 74: 110-116
- 42 李丹, 王小众, 陈治新, 黄月红. 酵母双杂交体系筛选乙型肝炎病毒前S1蛋白相关蛋白. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 334-337
- 43 Li D, Wang XZ, Ding J, Yu JP. NACA as a potential cellular target of hepatitis B virus preS1 protein. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1156-1160
- 44 李丹, 王小众, 林纳, 陈丰霖. 乙型肝炎病毒前S1结合蛋白的筛选和鉴定. *中华传染病杂志* 2007; 25: 20-24
- 45 董菁, 王业东, 成军, 皇甫竞坤, 钟彦伟, 杨倩. 噬菌体表面展示技术筛选乙型肝炎病毒前S1蛋白结合蛋白基因. *解放军医学杂志* 2004; 29: 13-15
- 46 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前S2蛋白结合蛋白基因的筛选. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 8-10
- 47 Deng Q, Zhuang M, Kong YY, Xie YH, Wang Y. Screening for PreS specific binding ligands with a phage displayed peptides library. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4018-4023
- 48 Deng Q, Zhai JW, Michel ML, Zhang J, Qin J, Kong YY, Zhang XX, Budkowska A, Tiollais P, Wang Y, Xie YH. Identification and characterization of peptides that interact with hepatitis B virus via the putative receptor binding site. *J Virol* 2007; 81: 4244-4254
- 49 李志群, 马英骥, 成军. 酵母双杂交筛选肝细胞中乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白结合蛋白基因. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 111-113
- 50 李志群, 马英骥, 成军. 酵母双杂交技术筛选肝细胞中与羧基末端截短型乙型肝炎表面抗原中蛋白MHBS<sup>167</sup>蛋白结合蛋白的研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2006; 15: 138-140
- 51 Toh QC, Tan TL, Teo WQ, Ho CY, Parida S, Chen WN. Identification of cellular membrane proteins interacting with hepatitis B surface antigen using yeast split-ubiquitin system. *Int J Med Sci* 2005; 2: 114-117
- 52 Tan WS, Tan GH, Yusoff K, Seow HF. A phage-displayed cyclic peptide that interacts tightly with the immunodominant region of hepatitis B surface antigen. *J Clin Virol* 2005; 34: 35-41
- 53 Bai GQ, Cheng J, Zhang SL, Huang YP, Wang L, Liu Y, Lin SM. Screening of hepatocyte proteins binding to complete S protein of hepatitis B virus by yeast-two hybrid system. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3899-3904

编辑 李军亮 电编 郭海丽

# 塞来昔布对人肝癌细胞株HepG2细胞核转录因子- $\kappa$ B活性及蛋白表达的抑制

卢栋, 李永华, 纪龙, 李龙嫚, 杜玉开, 余红平

卢栋, 杜玉开, 华中科技大学同济医学院公共卫生学院 湖北省武汉市 430030

李永华, 钦州市中医药研究所 广西壮族自治区钦州市 535000

纪龙, 李龙嫚, 余红平, 广西医科大学公共卫生学院 广西壮族自治区南宁市 530021

广西自然科学基金资助项目, No. 桂科攻0592007-21

广西医科大学博士启动基金资助项目, No. 304173

作者贡献分布: 此课题由余红平, 杜玉开, 卢栋及李永华设计; 研究过程由卢栋, 李永华, 纪龙及李龙嫚操作完成; 研究所用试剂及分析工具由卢栋与余红平提供; 数据分析由纪龙与李龙嫚完成; 本论文写作由卢栋, 李永华, 杜玉开及余红平完成。

通讯作者: 余红平, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学公共卫生学院. yuhongping@hotmail.com

电话: 0771-5358847 传真: 0771-5358847

收稿日期: 2008-01-14 修回日期: 2008-03-12

## Celecoxib inhibited activation of NF- $\kappa$ B and expression of NF- $\kappa$ B P65 protein in HepG2 cells

Dong Lu, Yong-Hua Li, Long Ji, Long-Man Li, Yu-Kai Du, Hong-Ping Yu

Dong Lu, Yu-Kai Du, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Yong-Hua Li, Qinzhou Institute of Traditional of Chinese Medicine, Qinzhou 535000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Long Ji, Long-Man Li, Hong-Ping Yu, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Science and Technology Development Project of Guangxi, No. 0592007-21; and the Start-up Fund of Doctor of Guangxi Medical University, No. 304173

Correspondence to: Hong-Ping Yu, School of Public Health, Guangxi Medical University, 22 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yhp268@163.com

Received: 2008-01-14 Revised: 2008-03-12

## Abstract

**AIM:** To investigate effects of COX-2 inhibitor celecoxib on activation of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and on protein expression of NF- $\kappa$ B P65 in human liver cancer cell line HepG2.

**METHODS:** HepG2 cells were treated with various concentrations of celecoxib. The NF- $\kappa$ B DNA binding activation was detected using electrophoresis mobility shift assay and protein

expression of NF- $\kappa$ B p65 was determined using western blotting in HepG2 cells.

**RESULTS:** After HepG2 cells were treated with different concentrations of celecoxib (25 and 50  $\mu$ mol/L, respectively), NF- $\kappa$ B DNA binding activation were significantly reduced ( $t = 12.58$ ,  $P = 0.000$ ;  $t = 17.97$ ,  $P = 0.000$ ) and protein expression of NF- $\kappa$ B p65 were significantly inhibited in celecoxib-treated HepG2 cells as compared with those in the empty control group ( $t = 4.24$ ,  $P = 0.013$ ;  $P = 6.38$ ,  $P = 0.003$ ).

**CONCLUSION:** Activation of NF- $\kappa$ B and expression of NF- $\kappa$ B p65 protein in HepG2 cells are effectively inhibited by celecoxib.

**Key Words:** Celecoxib; Hepatocarcinoma; Nuclear factor-kappa B; Human liver cancer cell line HepG2

Lu D, Li YH, Ji L, Li LM, Du YK, Yu HP. Celecoxib inhibited activation of NF- $\kappa$ B and expression of NF- $\kappa$ B P65 protein in HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1793-1796

## 摘要

**目的:** 探讨环氧合酶-2选择性抑制剂塞来昔布(celecoxib)对人肝癌细胞株HepG2细胞核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)活性和蛋白表达的影响。

**方法:** 不同浓度的塞来昔布作用于HepG2细胞后, 应用凝胶电泳迁移率改变分析技术检测HepG2细胞中NF- $\kappa$ B DNA结合活性; 用Western blotting法检测HepG2细胞NF- $\kappa$ B p65蛋白表达。

**结果:** 25、50  $\mu$ mol/L塞来昔布作用于HepG2细胞后, 药物处理组HepG2细胞NF- $\kappa$ B DNA结合活性明显降低, 与空白对照组相比有显著性差异( $t = 12.58$ ,  $P = 0.000$ ;  $t = 17.97$ ,  $P = 0.000$ ); 塞来昔布可明显抑制HepG2细胞NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平, 与空白对照组相比, 差异均有统计学意义( $t = 4.24$ ,  $P = 0.013$ ;  $t = 6.38$ ,  $P = 0.003$ )。

**结论:** 塞来昔布能有效抑制HepG2细胞NF- $\kappa$ B

## ■背景资料

COX-2在恶性肿瘤的发生发展过程中起重要作用, COX-2可能成为化学预防和化学辅助治疗恶性肿瘤的新靶点。塞来昔布(celecoxib)是一种选择性COX-2抑制剂, 可抑制多种肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡, 抑制肿瘤新生血管形成以及预防肿瘤发生等抗肿瘤作用。

## ■同行评议者

沈守荣, 教授, 中南大学湘雅三医院消化内科

## ■研发前沿

celecoxib作为选择性COX-2抑制剂抗肿瘤药,已成为近年恶性肿瘤化学预防和治疗的研究热点。

活性及NF- $\kappa$ B p65蛋白表达。

**关键词:** 塞来昔布; 肝癌; 细胞核转录因子- $\kappa$ B; 人肝癌细胞株HepG2

卢栋, 李永华, 纪龙, 李龙嫒, 杜玉开, 余红平. 塞来昔布对人肝癌细胞株HepG2细胞核转录因子- $\kappa$ B活性及蛋白表达的抑制. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1793-1796  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1793.asp>

## 0 引言

近年来研究表明环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在多种恶性肿瘤包括肝细胞癌组织以及癌前病变组织中表达明显增高,提示COX-2在恶性肿瘤的发生发展过程中起重要作用,COX-2可能成为化学预防和化学辅助治疗恶性肿瘤新的靶点和选择<sup>[1-3]</sup>.塞来昔布(celecoxib)是一种选择性COX-2抑制剂,大量的流行病学、临床和体内外实验研究证实celecoxib可抑制多种肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡,抑制肿瘤新生血管形成以及预防肿瘤发生等抗肿瘤作用<sup>[4-6]</sup>.celecoxib抗肿瘤作用的确切机制仍不明确,目前认为是通过COX-2依赖途径和COX-2非依赖途径发挥抗肿瘤作用<sup>[5]</sup>.

作为转录调控因子的NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)在细胞增殖、抑制细胞凋亡中起关键作用<sup>[7]</sup>.近年来研究发现大多数肿瘤都表现出NF- $\kappa$ B活性高表达,多种致癌因素可通过激活NF- $\kappa$ B促进细胞生长、抗凋亡、使细胞发生恶性转化并促进肿瘤细胞的转移等,NF- $\kappa$ B活性失控与肿瘤的形成有关<sup>[7-8]</sup>.抑制NF- $\kappa$ B活性可以抑制肿瘤细胞增长、促进凋亡、增加抗肿瘤细胞对化疗的敏感性、抑制炎症、减少肿瘤血管生成等<sup>[7-8]</sup>.因此我们推测celecoxib的抗肿瘤作用部分是通过调节NF- $\kappa$ B活性.我们应用celecoxib作用于人肝癌细胞株HepG2细胞,检测HepG2细胞NF- $\kappa$ B DNA结合活性及NF- $\kappa$ B p65蛋白表达变化,探讨celecoxib对HepG2细胞NF- $\kappa$ B活性及NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** celecoxib购自于美国Cayman公司, Gel shift试剂盒购自于美国Promega公司,  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP、Sephadex G-25购自于英国Pharmacia公司,兔p65多克隆抗体购自于美国Santa Cruz公司, DAB显色试剂盒购自于北京中山公司.其余试剂均为国产分析纯.人肝癌细胞株HepG2由广西医科大学医学科学实验中心保存.细胞用含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养液传代。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞处理:** 取对数生长期的HepG2细胞,将 $1 \times 10^6$ 个细胞接种于100 mL培养瓶,在37℃、饱和湿度及50 mL/L CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内培养24 h,细胞贴壁后换液,分别加入celecoxib,并调整celecoxib的工作浓度分别为25、50  $\mu$ mol/L,同时设不加药物组为空白对照组,继续培养48 h.

**1.2.2 Western blot检测NF- $\kappa$ B p65蛋白表达:** 收集HepG2细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液漂洗细胞,加入100  $\mu$ L预冷的细胞裂解液[50 mmol/L的Tris-Cl, 200 mmol/L的NaCl, 2 mmol/L的EDTA, 10 mL/L的Triton X-100、0.1 mmol/L的PMSF],于冰上孵育20 min后,15 000 g 4℃离心5 min,提取蛋白,用BCA试剂盒并按照其说明测定蛋白浓度.以细胞裂解液将待测样品蛋白浓度稀释至4 g/L.以20  $\mu$ g总蛋白上样于SDS-PAGE,电泳分离后转移至硝酸纤维素滤膜,50 g/L脱脂奶粉溶液封闭,加入兔抗人NF- $\kappa$ B p65多克隆抗体(1:50),4℃冰箱过夜.磷酸盐缓冲液漂洗滤膜3次,每次10 min.分别用羊抗兔二抗(1:1000)37℃温育1 h, PBS漂洗3次,每次10 min, DAB显色.岛津CS-930薄层扫描图像分析仪计算蛋白条带的积分A值。

**1.2.3 凝胶电泳迁移率改变分析(electrophoresis mobility shift assay, EMSA):** 检测NF- $\kappa$ B DNA结合活性NF- $\kappa$ B寡核苷酸序列为: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'.收集 $1 \times 10^7$ 培养细胞,磷酸盐缓冲液洗涤细胞后,提取细胞核蛋白<sup>[9]</sup>.用BCA试剂盒并按照其说明测定蛋白浓度,-80℃保存.用 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP末端标记试剂盒并按其说明书对NF- $\kappa$ B寡核苷酸探针的5'末端进行标记.用Sephadex G-25纯化标记的寡核苷酸.取10  $\mu$ g核蛋白与同位素标记的探针在室温下孵育30 min.同时设特异性竞争试验,在加标记探针之前,在反应体系中先加入50、100倍未标记的特异性和100倍非特异性(SP1)寡核苷酸探针及阴性对照组(不加任何提取物).将反应产物分别上样于40 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶,电泳分离,干胶,于-70℃放射自显影于X线片上.用Image Pro Plus 5.0图像分析软件对电泳谱带进行半定量分析,取其面积与灰度值的乘积(A值)表示核提取物中NF- $\kappa$ B与标记探针结合的活性。

**统计学处理** 所有结果用SPSS13.0软件进行t检验分析.当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

## 2 结果

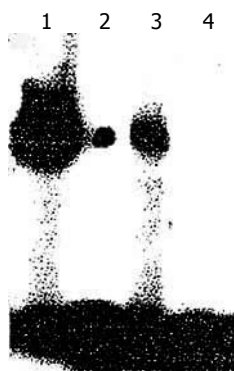
**2.1 celecoxib对NF- $\kappa$ B DNA结合活性的影响** 在

## ■相关报道

Subhashini *et al*报道celecoxib可通过抑制白血病细胞中NF- $\kappa$ B DNA结合活性而抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡. Narayanan *et al*观察了celecoxib对小鼠前列腺癌动物模型的体内抑瘤作用并探讨其机制,结果发现celecoxib能促进肿瘤细胞凋亡,有效抑制模型动物肿瘤生长,其作用机制是通过抑制NF- $\kappa$ B和COX-2活性表达而实现。

表 1 celecoxib对HepG2细胞NF- $\kappa$ B DNA结合活性的影响

celecoxib ( $\mu$ mol/L)	NF- $\kappa$ B DNA结合活性 (mean $\pm$ SD)	<i>t</i>	<i>P</i>
0	49.11 $\pm$ 3.63		
25	18.57 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	12.58	0.000
50	8.59 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	17.97	0.000

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 0  $\mu$ mol/L组.图 1 EMSA检测celecoxib对HepG2细胞NF- $\kappa$ B DNA结合活性的影响. 1: 空白对照组; 2: 50  $\mu$ mol/L celecoxib组; 3: 25  $\mu$ mol/L celecoxib组; 4: 阴性对照.

阴性对照组(未加核蛋白)未见电泳滞后带; 在空白对照组(未用celecoxib处理HepG2)可见电泳滞后带, 空白对照组NF- $\kappa$ B DNA结合活性为49.11  $\pm$  3.63; 25、50  $\mu$ mol/L celecoxib处理组NF- $\kappa$ B DNA结合活性分别为18.57  $\pm$  2.13和8.59  $\pm$  1.45, 均显著低于空白对照组( $t = 12.58$ ,  $P = 0.000$ ,  $t = 17.97$ ,  $P = 0.000$ , 表1, 图1). 在特异性竞争抑制组中, 未标记探针(同源性寡核苷酸, 含NF- $\kappa$ B结合位点)的浓度达标记探针的50倍时, 电泳滞后带变淡, 达100倍时, 仅见一极弱滞后带; 而加入100倍非特异性(SPI)寡核苷酸探针, 电泳滞后带仍然存在, 证实滞后带由特异性的NF- $\kappa$ B DNA结合序列与核蛋白中的NF- $\kappa$ B蛋白结合合所形成(图2).

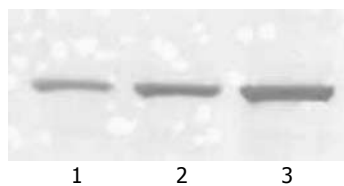
2.2 celecoxib对HepG2细胞NF- $\kappa$ B p65蛋白表达影响 Western blot检测结果显示, celecoxib处理前, HepG2细胞NF- $\kappa$ B p65的蛋白条带的积分A值为25.55  $\pm$  2.35; 25、50  $\mu$ mol/L celecoxib处理后, NF- $\kappa$ B p65的A值均明显降低, 分别为18.89  $\pm$  1.37和13.24  $\pm$  2.38, 与空白对照组相比差异具有统计学意义(表2, 图3).

### 3 讨论

选择性COX-2抑制剂celecoxib能抑制肺癌、胃癌、肝癌和结肠癌等多种肿瘤细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 并能预防肿瘤的发生, 但其中机制尚不明确. NF- $\kappa$ B是一种重要的转录因子蛋白, 研

表 2 celecoxib对NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的影响

celecoxib ( $\mu$ mol/L)	A值 (mean $\pm$ SD)	<i>t</i>	<i>P</i>
0	25.55 $\pm$ 2.35		
25	18.89 $\pm$ 1.37 <sup>a</sup>	4.24	0.013
50	13.24 $\pm$ 2.38 <sup>a</sup>	6.38	0.003

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 0  $\mu$ mol/L组.图 2 EMSA竞争实验. 1: 空白对照组; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照; 4: 特异性竞争( $\times 100$ ); 5: 非特异性竞争( $\times 50$ ).图 3 Western blot检测HepG2细胞NF- $\kappa$ B p65蛋白表达. 1: 50  $\mu$ mol/L celecoxib; 2: 25  $\mu$ mol/L celecoxib; 3: 空白对照组.

究表明NF- $\kappa$ B除了具有调节炎症、免疫反应相关基因转录作用外, 还可以调节细胞增殖及抗凋亡基因的转录, 参与细胞的增殖、抑制细胞的凋亡, 与多种肿瘤的形成有关, 在肿瘤发生发展过程中具有重要作用<sup>[10-11]</sup>. 因此, 在本次实验中我们探讨celecoxib对HepG2细胞NF- $\kappa$ B活性及NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的影响.

NF- $\kappa$ B几乎存在于所有细胞, 与p50/p65结合形成二聚体. 静息状态时, p65与 $\kappa$ B抑制蛋白(inhibitory kappaB, I $\kappa$ B)结合, 以非活性状态存在于细胞质中, 不具有调节基因转录的能力. 当细胞受到内毒素、病毒蛋白、致癌物等细胞外信号刺激时, 蛋白激酶被激活, I $\kappa$ B磷酸化并降解, 从而释放NF- $\kappa$ B二聚体, 使其得以转位进入细胞核中, 与靶基因启动子区域中特定的DNA序列结合, 诱导抗凋亡基因和促生长基因等靶基因的转录. 我们的研究发现肝肿瘤细胞株HepG2细胞表达NF- $\kappa$ B活性. 用不同药物浓度的celecoxib处理HepG2细胞, EMSA检

### 应用要点

本研究结果有助于阐明celecoxib抗肿瘤作用的机制, 对选择性COX-2抑制剂在肝癌化学预防和治疗的的应用提供了一定的实验依据.



## ■同行评价

本研究设计合理,方法可靠,结果可信,结论中肯,为COX-2抑制剂应用于肝癌的防治提供了一定的实验依据。

测结果显示药物处理后的HepG2细胞中NF- $\kappa$ B DNA结合活性明显受到抑制,表明celecoxib可抑制HepG2细胞NF- $\kappa$ B与靶DNA的结合活性。Subhashini *et al*<sup>[12]</sup>亦报道celecoxib可抑制K562、HL60和U937等白血病细胞中NF- $\kappa$ B DNA结合活性。另一些NSAIDs如阿司匹林(aspirin)、水杨酸钠盐和舒林酸等也有抑制NF- $\kappa$ B DNA结合活性的作用<sup>[13-14]</sup>。同时Western blot检测结果显示celecoxib处理后的HepG2细胞NF- $\kappa$ B p65蛋白表达较处理前明显降低,celecoxib能显著抑制NF- $\kappa$ B p65蛋白表达。提示celecoxib也可通过抑制HepG2细胞NF- $\kappa$ B p65蛋白表达而发挥抗肿瘤作用。新近Márquez-Rosado *et al*<sup>[15]</sup>报道的研究结果与我们的相似,他们观察了celecoxib对小鼠前列腺癌动物模型的体内抑瘤作用并探讨其机制,结果发现celecoxib能促进肿瘤细胞凋亡,有效抑制模型动物肿瘤生长,其作用机制是通过抑制NF- $\kappa$ B p65和COX-2活性表达而实现。

我们的研究结果提示celecoxib可抑制HepG2细胞NF- $\kappa$ B DNA结合活性和NF- $\kappa$ B p65蛋白表达,此可能为celecoxib抑制肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡,抑制肿瘤新生血管形成以及预防肿瘤发生等抗肿瘤作用的另一作用机制。

## 4 参考文献

- 1 Castells A, Balaguer F, Gonzalo V, Castellví-Bel S. Cyclooxygenase 2 and colorectal cancer: therapeutic implications. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 280-284
- 2 Chi-Man Tang T, Tung-Ping Poon R, Fan ST. The significance of cyclooxygenase-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 2: S311-S316
- 3 Amir M, Agarwal HK. Role of COX-2 selective inhibitors for prevention and treatment of cancer. *Pharmazie* 2005; 60: 563-570
- 4 Schönthal AH. Direct non-cyclooxygenase-2 targets of celecoxib and their potential relevance for cancer therapy. *Br J Cancer* 2007; 97: 1465-1468
- 5 Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 736-747
- 6 Farooqui M, Li Y, Rogers T, Poonawala T, Griffin RJ, Song CW, Gupta K. COX-2 inhibitor celecoxib prevents chronic morphine-induced promotion of angiogenesis, tumour growth, metastasis and mortality, without compromising analgesia. *Br J Cancer* 2007; 97: 1523-1531
- 7 Sarkar FH, Li Y. NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Front Biosci* 2008; 13: 2950-2959
- 8 Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008; 233: 21-31
- 9 Kamogawa Y, Minasi LA, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell* 1993; 75: 985-995
- 10 Verma A, Mehta K. Transglutaminase-mediated activation of nuclear transcription factor-kappaB in cancer cells: a new therapeutic opportunity. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 559-565
- 11 Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 2007; 29: 19-35
- 12 Subhashini J, Mahipal SV, Reddanna P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro. *Cancer Lett* 2005; 224: 31-43
- 13 Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997; 39: 1-20
- 14 Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 27307-27314
- 15 Márquez-Rosado L, Trejo-Solís MC, García-Cuellar CM, Villa-Treviño S. celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, prevents induction of liver preneoplastic lesions in rats. *J Hepatol* 2005; 43: 653-660

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。(常务副总编辑:张海宁 2008-06-08)

# VEGFR-3 siRNA体外对人结肠癌细胞生长的抑制作用

贾如江, 侯丽艳, 张有成, 吕志诚

贾如江, 张有成, 兰州大学第二医院普外科 甘肃省兰州市 730001

侯丽艳, 邯郸市中心医院ICU科 河北省邯郸市 056002

吕志诚, 中国人民解放军兰州陆军总医院肿瘤科 甘肃省兰州市 730001

作者贡献分布: 贾如江与张有成对此文所作贡献均等; 此课题由贾如江, 张有成及侯丽艳设计; 研究过程由贾如江与吕志诚操作完成; 研究所用试剂及分析工具均由贾如江, 侯丽艳及吕志诚提供; 数据分析由贾如江, 侯丽艳及张有成完成; 本论文写作由贾如江与侯丽艳完成。

通讯作者: 张有成, 730001, 甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院普外科. zhangychengmd@126.com

电话: 0931-8942287

收稿日期: 2007-12-22 修回日期: 2008-04-30

## Ex vivo inhibitory effects of VEGFR-3 siRNA on growth of human colon cancer cells

Ru-Jiang Jia, Li-Yan Hou, You-Cheng Zhang, Zhi-Cheng Lv

Ru-Jiang Jia, You-Cheng Zhang, Department of General Surgery, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730001, Gansu Province, China

Li-Yan Hou, Department of Intensive Care Unit, Central Hospital of Handan City, Handan 056002, Hebei Province, China

Zhi-Cheng Lv, Department of Oncology, General Hospital of Chinese PLA, Lanzhou Command, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: You-Cheng Zhang, Department of General Surgery, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730001, Gansu Province, China. zhangychengmd@126.com

Received: 2007-12-22 Revised: 2008-04-30

## Abstract

**AIM:** To construct small interfering RNA (siRNA) expression vector (psiRNA-VEGFR-3) targeting vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) gene and to investigate effects of psiRNA-VEGFR-3 on suppressing the VEGFR-3 gene expression in human colon cancer cell lines.

**METHODS:** Three pairs of 19 bp reverse repeated sequence targeting VEGFR-3 mRNA spaced by 9 bp nucleotide were designed and synthesized, through directional cloning plasmid pSUPER to construct siRNA eukaryotic expression vector. LoVo cells were transfected with psiRNA-VEGFR-3 vectors by lipofectamine 2000. The

expression of VEGFR-3 mRNA was detected by semi-quantitative real time PCR. MTT assay was used to measure cell growth and flow cytometry was used to analyze apoptosis.

**RESULTS:** The VEGFR-3 siRNA expression vector was constructed successfully; psiRNA-VEGFR-3 significantly inhibited VEGFR-3 expression in LoVo cells. Transfected psiRNA-VEGFR-3 markedly inhibited cell growth, and induced apoptosis in LoVo cells.

**CONCLUSION:** psiRNA-VEGFR-3 vectors can initiate RNA interference, downregulate expression of VEGFR-3 gene, which can inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis.

**Key Words:** RNA interference; Small interfering RNA; Vascular endothelial growth factor receptor-3; Expression vector; LoVo cells; Apoptosis

Jia RJ, Hou LY, Zhang YC, Lv ZC. Ex vivo inhibitory effects of VEGFR-3 siRNA on growth of human colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1797-1801

## 摘要

**目的:** 探讨血管内皮生长因子受体-3(VEGFR-3)在肿瘤细胞生长中的作用。

**方法:** 根据人VEGFR-3 mRNA编码序列, 设计3个RNA干涉靶点, 构建siRNA表达载体, 并转染到LoVo细胞中, 应用半定量RT-PCR检测基因转染前后VEGFR-3 mRNA表达水平的变化, 采用四甲基偶氮唑蓝显色法(MTT)观察细胞生长变化, 并应用流式细胞计数仪分析细胞凋亡的情况。

**结果:** 针对VEGFR-3基因的siRNA表达载体成功构建, psiRNA-VEGFR-3可显著抑制LoVo细胞中VEGFR-3基因的表达, 转染psiRNA-VEGFR-3细胞生长明显抑制, 并可诱导LoVo细胞出现凋亡。

**结论:** psiRNA-VEGFR-3载体能够在LoVo细胞中引发RNA干扰效应, 下调VEGFR-3基因

## ■背景资料

研究发现, VEGFR-3基因在许多恶性肿瘤组织中高表达, VEGFR-3主要通过与其配体VEGF-C、VEGF-D结合后, 促进淋巴内皮细胞的增殖、分化, 诱导淋巴管生成, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移。抑制VEGFR-3的活性可以抑制肿瘤细胞的淋巴转移和远处转移。RNA干扰(RNAi)是通过短片断双链RNA(siRNA)引起同源mRNA降解, 致相应基因沉默, 高特异性, 高效率等优点, 因其简便、快速、经济, 目前已广泛应用于抗肿瘤研究。

## ■同行评议者

曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心; 杜雅莉, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

## ■相关报道

Roberts *et al*的动物实验研究显示VEGFR-3可以介导乳腺癌的淋巴转移和肺转移,而通过对其抑制可以降低转移风险; Su *et al*在非小细胞肺癌研究发现, VEGF-C/VEGFR3生物轴有促进肿瘤细胞运动、增加其侵袭性、促进肿瘤细胞转移的效应, 肿瘤组织中VEGF-C的表达与临床转移发生正相关和生存率负相关。

的表达可以抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡。

**关键词:** RNA干扰; 小分子干扰RNA; 血管内皮生长因子受体-3; 表达载体; LoVo细胞; 凋亡

贾如江, 侯丽艳, 张有成, 吕志诚. VEGFR-3 siRNA体外对人结肠癌细胞生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1797-1801

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1797.asp>

## 0 引言

血管内皮生长因子受体-3(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)属于酪氨酸激酶受体家族, 在胚胎发生的初始阶段存在于所有的内皮细胞, 随后定位于小静脉和淋巴管, 是成熟淋巴管内皮细胞的特异性标志物。VEGFR-3主要通过与其配体VEGF-C、VEGF-D结合后, 促进淋巴内皮细胞的增殖、分化, 诱导淋巴管生成, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移。现有研究表明, VEGFR-3在多数肿瘤细胞上也有相应表达<sup>[1-2]</sup>。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)介导的一种进化上保守的细胞防御机制, 它能够特异而有效的引起转录后mRNA水平关闭相应基因表达的过程<sup>[3]</sup>。因此, 在功能基因研究方面, RNAi具有稳定、特异、细胞毒性低以及作用持久、强大等优点, RNAi技术在肿瘤、基因功能和病毒性疾病等的研究中均展现出良好的应用前景。siRNA现已被广泛用来抑制特定基因的表达。本实验拟靶向VEGFR-3基因构建siRNA表达载体, 并探讨这一载体是否能在人结肠癌细胞株LoVo细胞中引发RNAi效应, 抑制VEGFR-3基因表达及其生物学效应。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** pSUPER质粒由荷兰莱顿大学医学中心人类遗传学系Yvonne D Krom教授惠赠, DH5a大肠杆菌, *Hind* III和*Bgl* II限制性内切酶、T4DNA连接酶、Taq DNA聚合酶、RNA Extraction Kit购自TaKaRa公司(中国), 质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海生工公司, RPMI 1640培养基购自Gibco公司, LoVo细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所, 胎牛血清购自杭州四季青生物制品有限公司, 脂质体Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司, TaKaRa One Step RNA PCR Kit购自TaKaRa公司(中国)。

## 1.2 方法

## 1.2.1 VEGFR-3 siRNA表达载体的构建:

(1)VEGFR-3基因发夹siRNA模板寡核苷酸的设计: 在NCBI数据库中查找VEGFR-3全序列, 参照siRNA的设计原则, 从VEGFR-3编码区中寻找符合设计原则的靶序列, 按照pSUPER载体的要求设计3对6条能编码siRNA的寡核苷酸链。寡核苷酸序列两端包含*Bgl* II和*Hind* III酶切位点, 能直接与经相同酶切的pSUPER载体连接。编码区干涉位点的正义序列分别位于806-825位碱基CGGGAGGTGTGTATAGATG、1580-1599CATGCAGCTGTTACAGACG、1863-1882位碱基GGCCTCTTGTAAGACTGG为作用靶点, 合成3对64 nt的寡核苷酸, 分别命名为no.1、no.2、no.3每条寡核苷酸链中有2个反向互补排列的19 nt的VEGFR-3靶序列。另我们设计了可形成发夹结构短链RNA的对照序列。此序列的19个核苷酸与806-825位碱基序列组成相同, 但是顺序不同, 命名为no.4。此4个序列均经过通过BLAST软件确定与其他非相关基因无同源性, 不会影响其他基因的表达。寡核苷酸序列由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成。(2)siRNA表达载体的构建: 将2对寡核苷酸的正义链和反义链分别用TE液配成浓度为100  $\mu$ m/L的溶液, 吸取正义链和反义链各2  $\mu$ L, 加入退火缓冲液30  $\mu$ L、双蒸水6  $\mu$ L, 混匀, 95 $^{\circ}$ C孵育5 min, 70 $^{\circ}$ C孵育10 min, 缓慢冷却至室温得到退火双链DNA, -20 $^{\circ}$ C保存。各取2  $\mu$ L退火产物, 10  $\mu$ L经*Bgl* II和*Hind* III双酶切的线性pSUPER质粒, 1  $\mu$ L T4 DNA连接酶缓冲液, 在1  $\mu$ L T4 DNA连接酶的作用下于16 $^{\circ}$ C连接反应过夜。(3)重组质粒的转化和克隆挑选: 将连接产物转化感受态的DH5a, 菌液涂于含氨苄青霉素的LB培养板上, 37 $^{\circ}$ C过夜。挑取单个菌落并提取质粒, 酶切鉴定重组质粒后, 送上海生工以T7启动子引物进行测序。重组后的质粒分别命名为siRNA no.1、siRNA no.2、siRNA no.3和SCR no.4。

**1.2.2 细胞培养及转染:** LoVo细胞采用含100 mL/L新生牛血清、RPMI 1640培养基于37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO<sub>2</sub>孵箱内培养, 每3天更换培养液, 细胞长满时用2.5 g/L胰酶消化传代。将生长良好、处于对数生长期的细胞以1 $\times$ 10<sup>6</sup>个/孔接种于6孔培养板, 等细胞融合达80%-90%时, 参照Lipofectamine 2000使用说明书进行转染。实验分为以下5组: 转染siRNA no.1(A组)、siRNA no.2(B组)、siRNA no.3(C组), 转染SCR no.4组(D组); 转染pSUPER空质粒组(E组)。

**1.2.3 RT-PCR检测VEGFR-3表达水平:** 转染

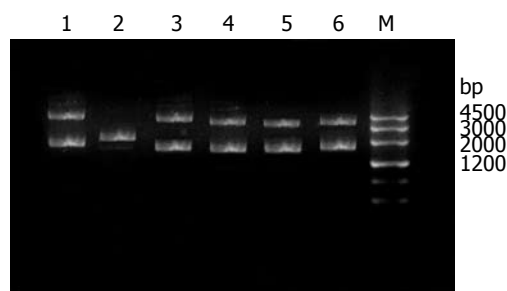


图1 重组质粒酶切鉴定图. M: marker; 1: pSUPER空质粒; 2: pSUPER被*Bgl*Ⅱ单酶切成线形; 3: SCR no.4; 4: siRNA no.1; 5: siRNA no.2; 6: siRNA no.1.

72 h后, 收获各组细胞 $1 \times 10^6$ , 按TRIzol的操作说明提取总RNA, 按反转录试剂盒操作方法获得单链cDNA, 以此为底物用PCR检测VEGFR-3的表达, VEGFR-3上游引物AGCCATTCATCAACAAGCCT, 下游引物GGCAACAGCTGGATGTCATA (扩增片段长度为298 bp); 内参照 $\beta$ -actin上游引物CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC, 下游引物AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC (扩增片段长度为587 bp), PCR引物均由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成. 扩增产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, YLN-2000凝胶成像分析系统, 测定各条带的积分吸光度(A), 每个条带测定10次.

1.2.4 流式细胞计数仪分析细胞增殖周期变化: 转染LoVo细胞24、48、72 h后取收集转染后的各组LoVo细胞 $5 \times 10^5$ 个. 1000 r/min离心10 min, 细胞沉淀用PBS洗1次, 分散成单细胞悬液, 加入700 mL/L冷乙醇4℃固定. 1000 r/min离心10 min, 少量PBS重悬细胞, 加入碘化丙啶(PI), 使终浓度为100 mg/L, 混匀后置于冰上30 min, 在流式细胞仪上检测细胞增殖周期的变化.

1.2.5 细胞生长曲线(MTT法)测定: 每组取200  $\mu$ L加入96孔板中, 分别检测转染后第0、24、48和72 h MTT的吸光度值, 每组计数3孔, 取均值. 收获细胞前4 h, 每孔加入45  $\mu$ g/L MTT液20  $\mu$ L, 继续培养4 h后弃培养基, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu$ L, 室温下振荡10 min. 应用酶标仪, 在570 nm波长测吸光度值(以不加血清的RPMI 1640为空白调零). 以时间为横轴, 细胞吸光度为纵轴绘制细胞生长曲线.

**统计学处理** 用SPSS10.0统计学软件进行分析, 计量资料数据以mean $\pm$ SD表示, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行方差分析并两两比较.  $\alpha = 0.05$ 为检验水准,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

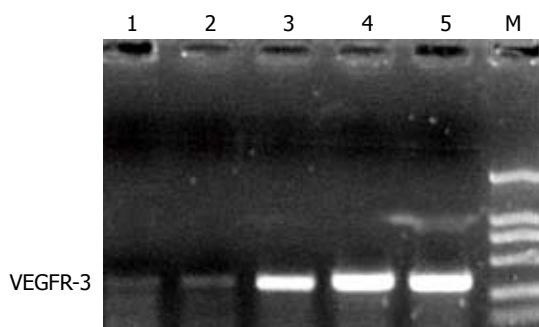


图2 转染后LoVo细胞VEGFR-3 mRNA表达. 1: 转染siRNA no.1细胞; 2: 转染siRNA no.2细胞; 3: 转染siRNA no.3细胞; 4: 转染SCR no.4细胞; 5: 转染pSUPER空质粒细胞; M: DL2000 marker.

## 2 结果

2.1 重组质粒鉴定结果 合成的64 nt寡核苷酸退火后, 将其插入*Hind*Ⅲ和*Bgl*Ⅱ双酶切后的pSUPER载体, 该载体原有的*Bgl*Ⅱ酶切位点被破坏. 酶切鉴定结果显示: 空pSUPER载体被*Bgl*Ⅱ单酶切成线形质粒, 阳性重组质粒siRNA no.1、siRNA no.2、siRNA no.3和SCR no.4不能被*Bgl*Ⅱ酶切(图1), DNA测序结果也证实重组质粒中已插入目的片段, 构建psiRNA-VEGFR-3表达载体成功.

2.2 LoVo细胞VEGFR-3 mRNA水平 Real Time PCR检测结果显示, 转染siRNA no.1、siRNA no.2、siRNA no.3 72 h后LoVo细胞VEGFR-3 mRNA产物电泳带较转染和SCR no.4、转染pSUPER空载体组明显减弱, A、B、C组细胞VEGFR-3 mRNA较E组分别下降了79.76%、79.46%、28.15%, A、D、E组比较,  $F$ 值为 $8.8 \times 10^9$ ,  $P$ 均 $< 0.01$ , B、D、E组比较,  $F$ 值为 $8.6 \times 10^9$ ,  $P$ 均 $< 0.01$ , C、D、E组比较,  $F$ 值为 $1.1 \times 10^9$ ,  $P$ 均 $< 0.01$ , 差异均有统计学意义, LSD两两比较, D组与E组比较,  $P > 0.05$ , 差异无统计学意义. 结果表明转染siRNA no.1、siRNA no.2、siRNA no.3可明显抑制LoVo细胞VEGFR-3基因的表达, 其中以siRNA no.1组抑制效果最好(图2).

2.3 流式细胞计数仪检测细胞凋亡 转染LoVo细胞24、48、72 h后取转染siRNA no.1、siRNA no.2、siRNA no.3、SCR no.4和转染pSUPER空载体组LoVo细胞进行流式细胞技术分析: 结果显示, 转染后24 h各转染组细胞凋亡无明显差别, 48 h后转染siRNA no.1、siRNA no.2、siRNA no.3的3组细胞凋亡率开始增加, 72 h后3组细胞凋亡率明显增加, 其中以转染siRNA no.1组细胞凋亡率最高, 而转染SCR no.4和转染pSUPER空质粒组细胞凋亡率并无变化(表1).

## ■创新盘点

本文设计合成3对靶向VEGFR-3的siRNA, 其中2对具有高效性, 寻找到了高效阻断VEGFR-3表达的基因序列.



## ■应用要点

以 VEGFR-3 为靶基因设计的 siRNA 表达框架构建 iRNA 表达载体, 转染后可通过抑制结肠癌细胞增殖, 促进结肠癌细胞的凋亡而发挥抗肿瘤作用。

表 1 转染后各组细胞凋亡率的变化 (mean ± SD, %)

时间点(h)	细胞凋亡率				
	siRNA no.1	siRNA no.2	siRNA no.3	SCR no.4	pSUPER
24	1.61 ± 0.55	1.52 ± 0.42	1.48 ± 0.47	1.35 ± 0.62	1.36 ± 0.56
48	9.55 ± 0.69	9.48 ± 0.58	4.65 ± 0.57	1.58 ± 0.53	1.55 ± 0.59
72	15.78 ± 0.52	14.96 ± 0.45	9.56 ± 0.39	1.65 ± 0.45	1.64 ± 0.46

表 2 转染后各组细胞吸光度值的变化 (mean ± SD)

时间点(h)	$A_{570\text{ nm}}$				
	siRNA no.1	siRNA no.2	siRNA no.3	SCR no.4	pSUPER
0	0.501 ± 0.024	0.510 ± 0.032	0.505 ± 0.036	0.538 ± 0.037	0.527 ± 0.029
24	0.921 ± 0.035	0.922 ± 0.042	0.933 ± 0.040	0.945 ± 0.032	0.961 ± 0.036
48	0.821 ± 0.039	0.848 ± 0.038	1.125 ± 0.051	1.580 ± 0.053	1.625 ± 0.050
72	0.760 ± 0.052	0.780 ± 0.045	1.256 ± 0.039	1.659 ± 0.045	1.764 ± 0.046

2.4 LoVo细胞生长检测 根据MTT比色法结果绘制的生长曲线, 可见转染siRNA no.1、siRNA no.2、siRNA no.3后3组细胞生长均明显受到抑制, 而对照组细胞生长无明显影响。根据公式: 细胞生长抑制率(%) = [对照组( $A_{570}$ )-实验组( $A_{570}$ )]/对照组( $A_{570}$ ) × 100%, 计算转染siRNA no.1、siRNA no.2、siRNA no.3后72 h的3组细胞生长与转染空质粒组相比较抑制率分别为56.91%、55.78%、28.80%, 同样显示以siRNA no.1组抑制效果最好(表2)。

### 3 讨论

VEGFR-3是VEGF家族成员VEGF-C的受体, 是第1个被发现的淋巴管内皮标志物, 特异地表达于淋巴管内皮细胞, 亦表达于某些血管内皮<sup>[4]</sup>。国内外多数研究表明, VEGF-C/VEGFR-3在肿瘤周边的新生淋巴管内皮细胞呈高表达, 与肿瘤的淋巴结转移呈高度相关<sup>[5-6]</sup>。Wang *et al*<sup>[7]</sup>发现胃癌患者的血浆VEGF-C水平和淋巴管密度与肿瘤的淋巴管转移及其患者的预后有关。实验研究发现, VEGF-C通过受体VEGFR-3的信号传导诱导淋巴管生成, 促进肿瘤的侵袭和淋巴转移<sup>[8-10]</sup>, 而阻断VEGF-C的受体VEGFR-3的信号传导可抑制肿瘤的淋巴管生成和淋巴结转移, 而对其他现有的淋巴管功能无任何影响<sup>[11-12]</sup>。VEGF-C与VEGFR-3结合, 引起VEGFR-3自身磷酸化, 通过PI3K引起Akt的Ser473、Thr308磷酸化, 激活抗凋亡蛋白Akt/PKB, 而抑制癌细胞的凋亡。研究表明胃癌细胞通过VEGF-C与VEGFR-3相互作用, 可调节自身生长, 促进增

殖、抑制凋亡, 从而具有更高的增殖活性及浸润性<sup>[13]</sup>。

siRNA可以高效、特异地阻断体内同源基因表达, 促使同源mRNA降解, 诱使细胞表现出特定基因缺失的表型, 称为RNAi。体外实验证实siRNA与反义RNA相比, 具有稳定性高、抑制作用强、细胞摄取相对容易等不可比拟的优点<sup>[14]</sup>, siRNA较单链反义DNA、反义RNA有更高效率的表达基因抑制效果<sup>[15]</sup>。与其他基因敲除技术相比, 此项技术具有高效性、高特异性、高稳定性、可传播性和可遗传性的分子生物学特征<sup>[16]</sup>, 已被广泛应用于肿瘤的化疗耐药及逆转方面的研究, 并成为研究领域的热点研究中<sup>[17]</sup>。在肿瘤基因治疗中, 通过人合成特定癌基因靶向的siRNA或构建siRNA的表达载体, 并将他导入肿瘤细胞中, 可以特异性地抑制目的基因的表达<sup>[18-21]</sup>。siRNA已成为肿瘤基因治疗领域新的热点。

本研究采用RNA干涉技术, 针对VEGFR-3构建了可在体内表达siRNA的真核表达载体。我们设计、合成3对VEGFR-3编码基因的反向重复序列, 通过实验观察到siRNA可有效抑制LoVo细胞中VEGFR-3 mRNA的表达, 其中2对抑制效率较高。转染psiRNA-VEGFR-3后LoVo细胞中VEGFR-3 mRNA的表达下降, 部分LoVo细胞出现凋亡, 可引起LoVo细胞生长抑制, 增殖速度减慢。推测可能是通过降低LoVo细胞VEGFR-3的表达, 继而抑制VEGFR-3所介导的信号通路发挥作用。但是LoVo细胞中VEGFR-3 mRNA的表达抑制率与LoVo细胞生长抑制、凋亡率并不完全一致, 我们推测VEGFR-3所介导



的信号通路在LoVo细胞生长和凋亡中只是起部分作用。

总之, 我们认为, 应用针对VEGFR-3 RNA干涉技术既可阻断肿瘤的淋巴道转移, 又可促使肿瘤细胞凋亡, 不失为未来临床抗肿瘤治疗的一个新的选择。这一研究有望为肿瘤基因治疗提供一种新的思路。

#### 4 参考文献

- 1 Van Iterson V, Leidenius M, Von Smitten K, Bono P, Heikkilä P. VEGF-D in association with VEGFR-3 promotes nodal metastasis in human invasive lobular breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 759-766
- 2 刘鹏飞, 刘兵团, 沈卫东, 施瑞华, 朱宏. 血管内皮生长因子C与其受体在食管鳞癌中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 431-435
- 3 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 4 Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 1999; 86: 2406-2412
- 5 Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabinska S, Persaud K, Wu Y, Pytowski B, Skobe M. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res* 2006; 66: 2650-2657
- 6 He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1654: 3-12
- 7 Wang TB, Deng MH, Qiu WS, Dong WG. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1794-1797; discussion 1797-1798
- 8 Lin J, Lalani AS, Harding TC, Gonzalez M, Wu WW, Luan B, Tu GH, Koprivnikar K, VanRoey MJ, He Y, Alitalo K, Jooss K. Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res* 2005; 65: 6901-6909
- 9 Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; 20: 672-682
- 10 Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-198
- 11 He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 819-825
- 12 Pytowski B, Goldman J, Persaud K, Wu Y, Witte L, Hicklin DJ, Skobe M, Boardman KC, Swartz MA. Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 14-21
- 13 Straume O, Jackson DG, Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 250-256
- 14 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 15 Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9742-9747
- 16 Yoshida Y, Wang IC, Yoder HM, Davidson NO, Costa RH. The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007; 132: 1420-1431
- 17 Iorns E, Lord CJ, Turner N, Ashworth A. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 556-568
- 18 Bulk E, Hascher A, Liersch R, Mesters RM, Diederichs S, Sargin B, Gerke V, Hotfilder M, Vormoor J, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. Adjuvant therapy with small hairpin RNA interference prevents non-small cell lung cancer metastasis development in mice. *Cancer Res* 2008; 68: 1896-1904
- 19 Davenport RJ. Gene silencing. A faster way to shut down genes. *Science* 2001; 292: 1469-1471
- 20 Toiyama Y, Mizoguchi A, Kimura K, Hiro J, Inoue Y, Tutumi T, Miki C, Kusunoki M. TTYH2, a human homologue of the *Drosophila melanogaster* gene twenty, is up-regulated in colon carcinoma and involved in cell proliferation and cell aggregation. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2717-2721
- 21 檀英霞, 刘志玄, 李素波, 田曙光, 卞丽红, 宫锋. RNA干扰对肝素酶在肝癌细胞中表达及其肿瘤生长抑制的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 138-143

#### ■同行评价

本研究过程复杂, 结论有一定的科学性, 为指导肿瘤的基因治疗研究提供了新线索。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# A型肉毒毒素对大鼠胃排空及血浆胃动素、血清瘦素的影响

刘文徽, 刘庆森, 韩辉, 吴本俨

## ■背景资料

肉毒毒素(BT)是由厌氧的梭状芽孢杆菌产生的外毒素,属于一种高分子蛋白的神经毒素。根据毒素抗原的不同,分为7个血清型,其中A型毒力最强,也是临床上应用最广泛的一型。

刘文徽, 吴本俨, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市100853

刘庆森, 中国人民解放军总医院消化科 北京市100853

韩辉, 中国人民解放军总医院急诊科 北京市100853

作者贡献分布: 此课题由刘文徽, 韩辉及刘庆森共同设计; 研究过程由刘文徽与韩辉合作完成; 数据分析及论文写作由刘庆森及吴本俨指导。

通讯作者: 刘庆森, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院消化科. liuqs301@msn.com

电话: 010-88276226

收稿日期: 2007-11-25 修回日期: 2008-03-19

## Effects of botulinum toxin-A on gastric emptying, plasma motilin and serum leptin in rats

Wen-Hui Liu, Qing-Sen Liu, Hui Han, Ben-Yan Wu

Wen-Hui Liu, Ben-Yan Wu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Qing-Sen Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Hui Han, Department of Emergency, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Qing-Sen Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. liuqs301@msn.com

Received: 2007-11-25 Revised: 2008-03-19

## Abstract

**AIM:** To study the effect of botulinum toxin-A (BT-A) on gastric emptying and on plasma motilin and serum leptin in rats.

**METHODS:** Male Wistar rats of nine weeks were divided into four groups: small dose group, middle dose group, high dose group and control group. Each rat received an intramuscular injection of BT-A into the gastric antrum. During the subsequent twelve weeks, weight and diet of every rat in four groups were recorded. At the end of the twelfth week, gastric semi-empty time (min) was determined using nuclide scan and the contents of motilin and leptin were measured using radio-immunity method.

**RESULTS:** Diet and weight were significantly lower in middle dose group and high dose

group than those in control group ( $24.25 \pm 1.33$  g,  $25.02 \pm 1.81$  g vs  $30.61 \pm 2.07$  g;  $441.54 \pm 14.64$  g,  $437.33 \pm 20.73$  g vs  $517.98 \pm 24.11$  g, all  $P < 0.05$ ). At the twelfth weekend, gastric semi-empty time in middle dose group and large dose group were significantly longer than that in control group ( $161.67 \pm 23.53$  min,  $200.33 \pm 44.37$  min vs  $86.83 \pm 22.98$  min, all  $P < 0.05$ ). Plasma motilin in middle dose group and high dose group were significantly lower than those in control group ( $80.56 \pm 10.43$  ng/L,  $65.99 \pm 10.50$  ng/L vs  $123.65 \pm 31.10$  ng/L,  $P < 0.05$ ). Serum leptin levels in the three treatment groups were significantly lower than that in the control group ( $0.99 \pm 0.13$   $\mu$ g/L,  $0.97 \pm 0.18$   $\mu$ g/L,  $0.83 \pm 0.23$   $\mu$ g/L vs  $1.28 \pm 0.25$   $\mu$ g/L,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Muscular injection of BT-A into gastric antrum in rats can decrease gastric motilin, prolong gastric emptying, cut down food intake and cause weight loss. The changes of motilin and leptin may be associated with secretion of some hormones.

**Key Words:** Botulinum toxin A; Gastric emptying; Motilin; Leptin

Liu WH, Liu QS, Han H, Wu BY. Effects of botulinum toxin-A on gastric emptying, plasma motilin and serum leptin in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1802-1806

## 摘要

**目的:** 探讨A型肉毒毒素(botulinum A, BTA)对大鼠胃排空及某些激素的影响。

**方法:** 选用♂ Wistar大鼠40只, 随机分为4组: 对照组、BTA小剂量(10 U)组、中剂量(20 U)组及大剂量(40 U)组。给药方法均为剖腹胃窦部肌层注射。观察12 wk, 记录进食量及体质量变化。12 wk末, 测定胃半排空时间, 放免法测定血浆胃动素和血清瘦素含量。

**结果:** 12 wk, 与对照组相比, 中、高剂量组大鼠进食量及体质量明显降低( $24.25 \pm 1.33$  g,  $25.02 \pm 1.81$  g vs  $30.61 \pm 2.07$  g;  $441.54 \pm 14.64$  g,  $437.33 \pm 20.73$  g vs  $517.98 \pm 24.11$  g, 均 $P < 0.05$ ),

## ■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

胃半排时间显著延长( $161.67 \pm 23.53$  min,  $200.33 \pm 44.37$  min vs  $86.83 \pm 22.98$  min,  $P < 0.05$ ), 血浆胃动素含量减少, 差别有统计学意义( $80.56 \pm 10.43$  ng/L,  $65.99 \pm 10.50$  ng/L vs  $123.65 \pm 31.10$  ng/L,  $P < 0.05$ ); 小、中、大剂量组血清瘦素均显著低于对照组( $0.99 \pm 0.13$   $\mu$ g/L,  $0.97 \pm 0.18$   $\mu$ g/L,  $0.83 \pm 0.23$   $\mu$ g/L vs  $1.28 \pm 0.25$   $\mu$ g/L), 差别有统计学意义( $P < 0.05$ ).

**结论:** 大鼠注射BTA后体内胃动素、瘦素含量减少, 其可能影响体内某些激素的分泌.

**关键词:** A型肉毒毒素; 胃排空; 胃动素; 瘦素

刘文徽, 刘庆森, 韩辉, 吴本俨. A型肉毒毒素对大鼠胃排空及血浆胃动素、血清瘦素的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1802-1806

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1802.asp>

## 0 引言

A型肉毒毒素(botulinum A, BTA)可抑制所有副交感和胆碱能节后交感神经元ACh释放, 故被广泛用于多种消化道痉挛性疾病的治疗<sup>[1]</sup>. 国内刘庆森 *et al*<sup>[2]</sup>于1997年率先开展BTA治疗贲门失弛缓症, 症状缓解率达95%. 王斌<sup>[3]</sup>报告将BTA注射于贲门失弛缓症模型犬的LES内, 降低了LES的张力并使其松弛. 有关BTA对胃窦平滑肌的作用报导甚少, 本研究通过于大鼠胃窦部肌层注射BTA后, 观察大鼠胃排空的改变及血浆胃动素(MTL)、血清瘦素(LEP)含量的变化, 为其更广泛的临床应用提供新依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $\delta$  Wistar大鼠40只, 体质量270-320 g, 购自中国人民解放军总医院动物中心. BTA(97卫药准字S-01号)由兰州生物制品研究所赠送,  $^{99}\text{TcM-DTPA}$ 购于中国科学院原子能研究所), E.cam型SPECT机为德国Siemens公司产品, MTL、LEP放免药盒购于东亚放免所. TP-2000型电子天平由湘仪天平仪器厂生产.

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:**  $\delta$  Wistar大鼠40只, 随机分为4组, 小剂量组(BTA 10 U)、中剂量组(BTA 20 U)、大剂量组(BTA 40 U)和对照组(生理盐水组). 以100 g/L水合氯醛ip麻醉后, 剑突下腹正中切口长约2.5-3 cm, 暴露胃窦部. 小、中、大剂量组于胃窦部四壁(大弯、小弯、前壁、后壁)各点分别注射药物2.5、5和10 U, 均为BTA溶液(以生理盐水稀释)0.1 mL. 对照组同样方法注射生



图1 动态采集图像感兴趣区(ROI)勾画方法.

## ■ 研发前沿

有关BTA对胃动力的作用机制正成为研究热点, 国外学者分别将BTA注射于动物及肥胖患者的胃窦平滑肌, 降低了胃动力, 达到减轻体质量的目的. 但是对上述现象的机制研究甚少.

理盐水0.1 mL.

**1.2.2 体质量与进食量检测:** 从购进之日起, 每只大鼠分笼独立饲养, 正常饲食、饮水, 每天称体质量与进食量至术后4 wk末各组大鼠体质量完全恢复术前值后, 改为每3 d称体质量及记录进食量1次, 至12 wk末. 采用漏底鼠盒, 在盒子下面的托盘上, 加料位置下, 垫硬纸盒以接住漏下的鼠料, 进食量 = 加的总量 - 余量 - 漏到底盘上的料量. 为消除生物节律影响, 均于上午8时开始称质量.

**1.2.3 核素扫描胃固相排空实验:** 12 wk末, 将核素 $^{99}\text{TcM-DTPA}$  3 mci注入生鸡蛋黄内煮熟、打成匀浆后稀释至15 mL作为灌胃液. 大鼠禁食24 h, 取灌胃液3 mL(含核素0.6 mci)ig后, 连同支架将大鼠放置于SPECT机检查床上. ig 10 min后开始采集图像, 1 帧/min, 每帧采集60 s, 共采集90帧. 采用ROI技术勾画出胃的轮廓及感兴趣区(图1). 绘出时间-放射性曲线, 按公式计算各时相胃排空率:  $T$ 时胃排空率(%) = 总放射性 -  $t$ 时胃内放射性K/总放射性  $\times 100\%$

**1.2.4. 放射免疫分析法测定血浆MTL、血清LEP含量:** 12 wk末, 大鼠心腔内采血, 每只动物血样分2份, 一份加抗凝剂, 另一份不加抗凝剂, 以4000 r/min 4℃离心, 取上清, -20℃冰箱保存, 用于检测MTL及LEP含量. 操作方法按放免药盒说明书进行.

**统计学处理** 计量资料以mean  $\pm$  SD描述, 组间变量比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 大鼠进食量** 1 d进食量实验组与对照组间无差异( $P > 0.05$ ). 观察1 wk, 术前2 d各实验组进食量与对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ). 术后1 wk, 小剂量、大剂量组进食量与对照组有显著差异( $P < 0.05$ ). 至术后4 wk和8 wk, 各实验组进食量显著低于对照组( $P < 0.05$ ). 术后70 d起, 小

## ■创新亮点

本文通过大鼠胃窦部肌层注射BTA, 除记录大鼠体质量及进食量变化外, 还通过核素扫描方法测定胃固相排空速率, 并检测血浆胃动素、血清瘦素水平变化, 进一步探讨BTA对胃排空及胃肠激素的影响。

表 1 大鼠进食量的变化 (mean  $\pm$  SD, g)

分组	进食				
	初始	术前	术后4 wk	术后8 wk	术后12 wk
小剂量组	23.74 $\pm$ 3.66	29.48 $\pm$ 1.96	24.49 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup>	25.90 $\pm$ 1.51 <sup>a</sup>	28.54 $\pm$ 2.17
中剂量组	24.16 $\pm$ 4.08	29.54 $\pm$ 1.87	22.98 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup>	24.81 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	24.25 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>
大剂量组	23.98 $\pm$ 4.11	30.76 $\pm$ 1.64	20.76 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>	24.87 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	25.02 $\pm$ 1.81 <sup>a</sup>
对照组	27.78 $\pm$ 4.74	29.66 $\pm$ 2.73	31.78 $\pm$ 3.34	30.21 $\pm$ 1.79	30.61 $\pm$ 2.07

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。表 2 大鼠体质量变化情况 (mean  $\pm$  SD, g)

分组	体质量				
	初始	术前(术当日)	术后12 wk	最大体质量下降	最大体质量下降占术前体质量百分比(%)
小剂量组	293.20 $\pm$ 11.30	314.30 $\pm$ 11.59	498.73 $\pm$ 16.23	18.42 $\pm$ 3.29	5.83 $\pm$ 1.07
中剂量组	290.74 $\pm$ 9.31	311.98 $\pm$ 9.23	441.54 $\pm$ 14.64 <sup>a</sup>	23.26 $\pm$ 5.71 <sup>a</sup>	7.45 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>
大剂量组	296.72 $\pm$ 9.29	318.00 $\pm$ 7.19	437.33 $\pm$ 20.73 <sup>a</sup>	30.73 $\pm$ 5.69 <sup>a</sup>	8.72 $\pm$ 3.76 <sup>a</sup>
对照组	293.06 $\pm$ 11.63	307.02 $\pm$ 11.95	517.98 $\pm$ 24.11	12.44 $\pm$ 7.63	4.06 $\pm$ 2.56

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。表 3 12 wk血浆MTL及血清LEP含量 (mean  $\pm$  SD)

分组	MTL(ng/L)	LEP( $\mu$ g/L)
小剂量组	114.49 $\pm$ 15.93	0.99 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
中剂量组	80.56 $\pm$ 10.43 <sup>a</sup>	0.97 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
大剂量组	65.99 $\pm$ 10.50 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>
对照组	123.65 $\pm$ 31.10	1.28 $\pm$ 0.25

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

剂量组与对照组进食量相比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。12 wk末, 中、大剂量组进食量与对照组间仍有显著差异( $P < 0.05$ , 表1)。

2.2 大鼠体质量 各实验组与对照组的初始体质量无差别( $P > 0.05$ ); 每天记录体质量, 至术前组间比较体质量无差异( $P > 0.05$ ), 具有可比性。中、大剂量组最大体质量下降值与对照组比较差别有统计学意义( $P < 0.05$ )。中、大剂量组最大体质量下降占术前体质量百分比与对照组比较差别有统计学意义( $P < 0.05$ , 表2)。

2.3 核素胃排空实验 12 wk末中、大剂量组胃半排时间(分别为161.67  $\pm$  23.53 min、200.33  $\pm$  44.37 min)显著长于对照组(86.83  $\pm$  22.98 min), 且差别有统计学意义( $P < 0.05$ ), 小剂量组胃半排时间(110.5  $\pm$  26.67 min)虽长于对照组, 但两组间无差别。

2.4 血浆MTL及血清LEP水平 12 wk小剂量组与对照组间血浆MTL水平差别无统计学意义( $P > 0.05$ ); 中剂量组、大剂量组均低于对照组, 且差别有统计学意义( $P < 0.05$ ); 小、中、大剂量组血清LEP均低于对照组, 差别有统计学意义( $P < 0.05$ , 表3)。

### 3 讨论

肉毒毒素(botulinum toxin, BT)是由厌氧的梭状芽孢肉毒杆菌产生的外毒素, 属于一种高分子蛋白的神经毒素。根据毒素抗原的不同, 分为7个血清型, 其中A型毒力最强<sup>[4]</sup>, 也是临床上应用最广泛的一型。BTA与神经肌肉接头处突触前膜胆碱能神经末梢快速而强烈的结合, 选择性裂开突触蛋白质(SNAP-25)的锌依赖性蛋白酶而抑制ACh的释出, 阻断神经肌肉的传导<sup>[5]</sup>。除了强烈阻滞骨骼肌神经外, 还可抑制胃肠道平滑肌的收缩, 广泛用于治疗贲门失弛缓症、Oddis括约肌功能失调、出口梗阻型便秘、肛门痉挛等疾病, 且疗效显著<sup>[6]</sup>。胃肠运动受肠神经系统(ENS)、中枢神经系统以及体液因子的调节<sup>[7]</sup>。ENS在调节胃肠运动中起重要作用, 含多种神经元。胃肠运动的主要兴奋性神经递质是ACh。MTL、SP是促进胃肠运动的主要胃肠激素, 而VIP、NO和ATP是胃肠运动的主要抑制性神经递质。



在胃内, 外来的迷走神经介导餐后胃窦收缩和胃底舒张, 研磨固体食物, 有选择的将固体和液体食物推送入十二指肠, 近端胃(胃底和口侧1/3胃体)通过持续收缩对胃内容物产生恒定的压力, 对胃液体排空起主要作用。相反, 远端胃(胃体远端2/3和胃窦)控制固体的排空<sup>[8]</sup>。本研究中, 胃窦部肌层注射BTA后, 大鼠体质量和进食量的下降表明胃固体食物排空受到强烈抑制。推测BTA可能通过抑制胃窦部兴奋性神经递质-ACh的释放, 降低了蠕动波的强度, 选择性的干扰了固体食物的胃排空, 产生早饱感, 因此进食量减少, 能量摄入减低, 体质量增长减慢。而胃窦的动力改变并不影响液体的排空, 治疗期间动物没有因脱水死亡, 这与胃液体食物排空不受影响相一致。应用BTA除皱有剂量依赖性, 一般来说剂量越大作用时间越长, 麻痹效果越强, 但当超过50 kU/L时, 效果并不增加<sup>[9]</sup>。本实验发现小剂量组减轻体质量和进食量的作用维持时间较短, 而中剂量组与大剂量组间并未见到显著差别, 这提示BTA作用于胃窦部时的量效关系也可能与上述相同。另外, 本实验结果与Gui *et al*<sup>[10]</sup>的BTA治疗大鼠体质量减轻和摄食减少的报道相符合。而且, 我们也通过核素扫描胃固相排空试验证明了BTA治疗组大鼠胃半排时间延长, 提示大鼠胃窦部注射BTA可导致胃排空减慢。分析胃排空减慢的机制主要是BTA通过抑制胃窦部ACh的释放, 使胃窦平滑肌的收缩幅度和频率均有不同程度下降, 导致胃窦运动异常。

MTL是M<sub>0</sub>细胞分泌的由22个氨基酸组成的直链多肽, 在消化间期, MTL周期性释放, 使胃和上部小肠产生IMCIII相, 并诱发胃强烈收缩和小肠明显的分节运动, 对胃内容物排空起主要作用<sup>[11]</sup>。Jonsson *et al*<sup>[12]</sup>报道胃动力障碍者胃排空延迟, IMCIII相减少、缺失。普遍认为迷走神经能影响MTL的释放。本研究发现胃窦部注射中、高剂量BTA 12 wk后, 与对照组比较, 大鼠血浆MTL含量下降, 推测可能是BTA抑制了胆碱能神经末梢突触前膜释放ACh, 发生了化学性去神经支配, 进而使MTL分泌减少。然而, BTA是否也直接作用于胃窦部的M<sub>0</sub>分泌细胞, 阻断了MTL的分泌通路, 而使其分泌减少, 本实验未做深入探讨, 国内外也未见相关报道, 有待进一步研究。

LEP又名消脂素, 分子量为16 kDa, 由脂肪细胞ob基因编码合成, 释放入血<sup>[13]</sup>。LEP作为

调节能量平衡的重要激素, 可通过多种途径发挥作用。LEP的中枢作用主要通过下丘脑-神经肽通路实现。Williams *et al*<sup>[14]</sup>认为体质量增加时LEP分泌增加, 作用于下丘脑原阿片黑皮素(POMC)系统, 经M4受体, 引起一系列对肥胖的反应, 即摄食减少, 脂肪消耗; 同时, LEP与下丘脑的LEP受体结合, 抑制神经肽Y(NPY)的释放, 导致食欲下降, 能耗增加, 减少体质量。反之亦然。此外, 也通过兴奋交感神经系统, 提高组织代谢, 动员机体的脂肪储存, 促进能量的转化和消耗<sup>[15]</sup>。有研究认为LEP尚可直接作用于体内的脂肪细胞, 抑制脂肪的合成。本研究中, 三个实验组大鼠的终点体质量均低于对照组, 瘦素水平也低于对照组, 符合LEP与体质量及脂肪含量正相关。LEP通过中枢神经及外周机制, 起到抑制食欲、减少能量摄取、同时通过提高代谢率而增加能量消耗及转化, 抑制脂肪合成, 减少脂肪的堆积而使体质量减轻的作用。

#### 4 参考文献

- 1 Madalinski M. Botulinum neurotoxin and other treatments for fissure-in-ano and pelvic floor disorders. *Br J Surg* 2002; 89: 1620-1621; author reply 1821
- 2 刘庆森, 蔡逢春, 郭荣斌, 毛永平, 卢忠生, 范开春, 刘迎娣, 孟江云, 程留芳. A型肉毒毒素治疗贲门失弛缓及远期疗效观察. *现代康复* 2000; 4: 1336-1337
- 3 王斌. A型肉毒毒素对犬下食管括约肌的作用. *第二军医大学学报* 2002; 8: 23
- 4 Pasricha PJ, Ravich WJ, Hendrix TR, Sostre S, Jones B, Kalloo AN. Intraspincteric botulinum toxin for the treatment of achalasia. *N Engl J Med* 1995; 332: 774-778
- 5 Chen S, Kim JJ, Barbieri JT. Mechanism of substrate recognition by botulinum neurotoxin serotype A. *J Biol Chem* 2007; 282: 9621-9627
- 6 Friedenber F, Gollamudi S, Parkman HP. The use of botulinum toxin for the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 165-175
- 7 韩辉, 刘庆森, 刘文徽. A型肉毒毒素腹腔注射对大鼠小肠通过速度及胆碱酯酶和P物质表达的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1412-1415
- 8 Rollnik JD, Meier PN, Manns MP, Göke M. Antral injections of botulinum a toxin for the treatment of obesity. *Ann Intern Med* 2003; 138: 359-360
- 9 Benedetto AV. The cosmetic uses of Botulinum toxin type A. *Int J Dermatol* 1999; 38: 641-655
- 10 Gui D, De Gaetano A, Spada PL, Viggiano A, Cassetta E, Albanese A. Botulinum toxin injected in the gastric wall reduces body weight and food intake in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 829-834
- 11 周吕, 柯美云. 胃肠动力学: 基础与临床. 北京: 科学出版社, 1999: 429-437
- 12 Jonsson BH, Uvnäs-Moberg K, Theorell T, Gotthard R. Gastrin, cholecystokinin, and somatostatin in a laboratory experiment of patients with functional

#### ■应用要点

本实验为BTA更广泛的临床应用提供新依据。不久, BTA可能成为肥胖症治疗的有力武器。

## ■同行评价

本研究内容新颖, 结果可信, 对探索肥胖的治病策略有一定的研究应用价值。

- 13 dyspepsia. *Psychosom Med* 1998; 60: 331-337  
Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lehouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398-401
- 14 Williams G, Harrold JA, Cutler DJ. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 385-396
- 15 Machinal-Quélin F, Dieudonné MN, Pecquery R, Leneveu MC, Giudicelli Y. Direct in vitro effects of androgens and estrogens on ob gene expression and leptin secretion in human adipose tissue. *Endocrine* 2002; 18: 179-184

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入 新技术研讨会征文通知

**本刊讯** 为满足全国专家、学者和临床一线医师对消化性病变介入/内镜新技术研究、探讨和交流的需求, 进一步提升国内消化系疾病尤其是消化道恶性病变介入/内镜诊治的技术水平, 上海同仁医院联合福建省肿瘤医院, 定于2008-11-7/12在福建省福州市举办第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会。会议由福建省抗癌协会、福建省消化内镜学会和福建省放射学会介入学组具体承办。中华消化内镜学杂志、中华放射学杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同参与协办。会议将着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法, 为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台。本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管和胃肠道等消化道管腔内支架治疗应用技术和发生的问题, 以及消化道病变的消化内镜、介入放射和内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨。会议中还将安排疑难案例讨论及手术操作演示, 内容精彩。参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分。

### 1 征稿内容

消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等; 消化系良性病变(如: 门静脉高压、胆道结石和消化道出血等)的内镜及介入新技术应用; 消化病诊治边缘交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验和个案报告等稿件。

### 2 征稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文; (2)论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果和结论四要素。经验交流、短篇报道等全文限1000字以内; (3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文。优秀论文将安排在国家级杂志上发表; (4)邮寄稿件要求Word格式打印, 并附软盘, 特别鼓励E-mail投稿(以附件Word格式传送); (5)截稿日期: 2008-08-31。

### 3 联系方式

林海澜, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院介入科。hailan@pub2.fz.fj.cn; 手机: 13850171973, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120  
施宏, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院内镜科。endoshihong@hotmail.com; 手机: 13959105615, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

# 原发性胃淋巴瘤的CT表现及误诊原因

任小军, 章士正, 董旦君, 王丽华, 金重午

任小军, 章士正, 董旦君, 王丽华, 金重午, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院放射科; 浙江大学邵逸夫临床医学研究所浙江省杭州市 310016

作者贡献分布: 此课题由任小军设计; 研究过程由任小军, 章士正, 董旦君及王丽华完成; 部分图像收集由金重午完成; 本论文写作由任小军, 董旦君及王丽华完成; 章士正审阅。

通讯作者: 任小军, 310016, 浙江省杭州市庆春东路3号, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院放射科. renxjun@163.com

电话: 0571-86006764

收稿日期: 2008-02-24 修回日期: 2008-05-01

## CT presentations and cause analysis of misdiagnosis for primary gastric lymphoma

Xiao-Jun Ren, Shi-Zheng Zhang, Dan-Jun Dong, Li-Hua Wang, Chong-Wu Jin

Xiao-Jun Ren, Shi-Zheng Zhang, Dan-Jun Dong, Li-Hua Wang, Chong-Wu Jin, Department of Radiology, Sir Run-Run Shaw Hospital Affiliated to School of Medicine, Zhejiang University; Sir Run-Run Shaw Institute of Clinical Medicine of Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Xiao-Jun Ren, Department of Radiology, Sir Run-Run Shaw Hospital Affiliated to School of Medicine, Zhejiang University, 3 Qingchun Eastern Road, Hangzhou 310016, Zhejiang Province, China. renxjun@163.com  
Received: 2008-02-24 Revised: 2008-05-01

## Abstract

**AIM:** To improve the computed tomography (CT) diagnosis of primary gastric lymphoma by describing its CT presentations and possible reasons for misdiagnosis.

**METHODS:** CT scans were retrospectively reviewed in 22 patients with pathologically confirmed primary gastric lymphoma, and 13 misdiagnosis cases were analyzed for its possible causes.

**RESULTS:** Primary gastric lymphoma involved two or three sites of the gastric antrum, gastric body and fundus of stomach in 20 patients and only one site in 2 patients. CT findings showed thickened gastric wall in 21 patients (6 mm-60 mm) and gastric multiple nodules in one patient. Among the 21 patients with thickened gastric wall, 2 cases were found to have gastric masses, 8 cases multiple ulcers, 16 cases destructed mu-

cosal lining, 11 cases intact mucosal line. Six of the 21 patients with thickened gastric wall presented with stratified gastric layers and mucosal damage. In the remaining fifteen of the 22 patients, the stomach remained distensible without significant luminal narrowing. Primary gastric lymphoma was misdiagnosed as infiltrative gastric carcinoma in eleven patients, as stromal tumor in one patient and as normal mucosa in one patient.

**CONCLUSION:** Primary gastric lymphoma include gastric wall thickening with two or three-site involvement, intact mucosal line with stratified mural enhancement in the initial stage, distensible stomach without significant luminal narrowing. Primary gastric lymphoma is easily misdiagnosed as infiltrative gastric carcinoma using CT.

**Key Words:** Lymphoma; Diagnosis; Computed tomography; Stomach

Ren XJ, Zhang SZ, Dong DJ, Wang LH, Jin CW. CT presentations and cause analysis of misdiagnosis for primary gastric lymphoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1807-1811

## 摘要

**目的:** 总结原发性胃淋巴瘤的CT表现及误诊原因, 提高其CT诊断水平。

**方法:** 回顾性分析经病理确诊的22例原发性胃淋巴瘤的CT表现及其中13例误诊原因。

**结果:** 病变累及胃窦、体及底部2个或3个部位20例, 仅累及1个部位2例。CT表现为胃壁增厚(6 mm-60 mm)21例, 仅表现为多发结节1例(4.5%)。伴有肿块2例, 多发溃疡8例。胃壁黏膜线破坏16例, 黏膜线完整11例。胃壁增厚的21例中6例既有较薄的胃壁分层强化, 又有较厚的胃壁黏膜破坏, 胃腔可扩张、无明显狭窄15例。CT误诊为浸润型胃癌11例, 间质瘤1例, 将多发结节误诊为正常黏膜1例。

**结论:** 原发性胃淋巴瘤的CT表现为多累及2个

## ■背景资料

原发性胃淋巴瘤发病率远远低于胃癌, 近年来多采用“保胃治疗”-化疗和放疗, 而胃癌首选手术切除。原发性胃淋巴瘤初期多在黏膜下浸润生长, 胃肠钡剂造影及胃镜检查难以诊断, 当病变进展破坏黏膜后才能发现病变, 获得病理诊断。螺旋CT, 尤其是多层螺旋CT, 在胃腔充盈良好的情况下, 可清楚显示胃壁的厚度, 发现黏膜下及胃腔外病变, 从而指导胃镜在增厚胃壁深处活检而获得正确诊断。

## ■同行评议者

李健丁, 教授, 山西医科大学第一医院放射科

## ■相关报道

陈宇 *et al*报道一组19例胃原发非霍奇金淋巴瘤和48例胃低分化腺癌的对照研究,认为CT扫描可以显示胃壁病变的厚度、密度、范围与周围组织的关系以及腹腔腹膜后淋巴结肿大的情况。当病变外侵和/或有腹腔淋巴结肿大时,胃癌可能性较淋巴瘤大;而当病变厚度和侵犯周径较大时,淋巴瘤可能性较胃癌大。

或3个部位的胃壁增厚,初期因黏膜完整胃壁呈分层强化,胃腔可扩张或无狭窄,CT易误诊为浸润型胃癌。

**关键词:** 淋巴瘤; 诊断; CT; 胃

任小军, 章士正, 董旦君, 王丽华, 金重午. 原发性胃淋巴瘤的CT表现及误诊原因. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1807-1811

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1807.asp>

## 0 引言

原发性胃淋巴瘤(primary gastric lymphoma, PGL)是原发于淋巴结最常见的恶性淋巴瘤,近10年来采取抗幽门螺杆菌(*H pylori*)治疗,或化疗联合局部放疗的保胃治疗,可保持或提高传统手术治疗疗效,提高患者生活质量<sup>[1-6]</sup>,但PGL多在黏膜下浸润生长,术前钡餐造影及胃镜检查易漏诊或误诊,部分患者手术后才能获得正确诊断<sup>[7-10]</sup>. 因此,本文总结了原发性胃淋巴瘤22例的CT表现并分析其中13例误诊原因,以提高术前诊断水平,减少误诊。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本文收集在本院行上腹部CT检查的PGL患者22例,其中男性16例,女性6例,年龄41-73(平均58)岁。临床表现均有腹痛或腹胀,纳差14例,黑便9例,消瘦8例。

**1.2 方法** CT检查前禁食6 h, 5例扫描前10 min *po* 对比剂30 g/L泛影葡胺1000 mL, 17例*po*等渗甘露醇1000 mL。平扫后行动脉期和静脉期增强扫描,动脉期延迟25-30 s,静脉期延迟70 s,静脉注射对比剂为欧乃派克90 mL,注射速率2.5-3.0 mL/s,重建层厚7 mm,间隔7 mm。使用CT机器为GE Hispeed和Siemens Somatom Sensation 16. 分析病变CT表现,包括部位、范围、胃壁厚度(>5 mm为胃壁增厚)及密度、强化程度,胃腔有无狭窄及扩张,胃周淋巴结显示情况,肝脏有无转移灶,并分析CT误诊原因。

## 2 结果

**2.1 CT表现** 累及胃窦及胃体18例(81.8%),胃底和胃体12例(54.5%),胃底、体及窦部3个部位均累及11例(50%),累及两个或3个部位共20例(90.9%),仅累及1个部位2例(9.1%)。胃壁增厚21例(95.5%),呈弥漫浸润型(病变超过或等于胃长轴1/2,图1)12例(54.5%),节段浸润型(小于胃长轴1/2,图2)9例(40.9%),仅表现为多发结节1例

(4.5%,图3),伴有肿块2例,多发溃疡8例。增厚胃壁厚度为6-60 mm,平扫CT值为34-45 HU,动脉期为36-58 HU,静脉期为50-90 HU,19例(86.4%)增厚胃壁静脉期CT值≤65 HU,增强幅度为14-30 HU,另3例静脉期CT值≥84 HU,增强幅度达40-55 HU(均伴有多发溃疡,1例病理示嗜酸细胞及浆细胞聚集,血管增生)。胃壁黏膜线中断、破坏16例,其中14例(87.5%)胃壁厚度≥10 mm,增强后呈均匀强化,另2例黏膜破坏处胃壁厚度分别为8 mm和9 mm;胃壁黏膜线完整连续11例,其胃壁厚度均(100%)<10 mm并呈分层强化。胃壁增厚的21例中6例(28.6%)既有较薄的胃壁黏膜完整呈分层强化,又有较厚的胃壁黏膜破坏、分层结构消失(图4)。胃腔在三期扫描形态可变或无明显狭窄15例(68.2%,图5)。周围淋巴结肿大19例,肝脏均未见转移病灶。

**2.2 病理及CT诊断** 胃镜活检22例,初次诊断胃淋巴瘤18例,误诊为慢性浅表性胃炎4例,经再次多点深取活检才诊断为胃淋巴瘤;手术病理诊断4例。病理为黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤1例,弥漫性大B细胞淋巴瘤20例, T细胞淋巴瘤1例。CT误诊为浸润型胃癌11例,间质瘤1例,将多发结节误诊为正常黏膜1例,误诊率59.1%。

## 3 讨论

PGL几乎均为非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin lymphoma, NHL), MALT淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤占绝大多数, MALT淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤的早期患者应用非手术治疗,可避免胃部手术切除引起的不良反应和并发症,提高患者生活质量,而其预后与胃部手术切除加化疗及放疗并无明显差异<sup>[1-5]</sup>。因此,应用影像学 and 胃镜检查而非手术切除获得原发性胃淋巴瘤的准确诊断,具有非常重要的意义。

本组病例可以看出,胃淋巴瘤累及范围广,多累及胃窦及胃体(81.8%),大多数累及2或3个部位(90.9%),累及胃底、体及窦部3个部位达11例(50%)。由于低恶性度的MALT淋巴瘤与 *H pylori* 感染有关,并可进展为高恶性度的弥漫性大B细胞淋巴瘤,故胃淋巴瘤多累及胃窦和胃体是否与 *H pylori* 多感染该2个部位有关,有待于进一步研究。胃淋巴瘤的好发部位与胃癌有所不同,胃癌位于胃窦占30%,胃体30%,胃底贲门30%,累及全胃仅10%<sup>[11]</sup>。由于胃淋巴瘤往往先在胃黏膜固有层和黏膜下层蔓延,再向腔内、

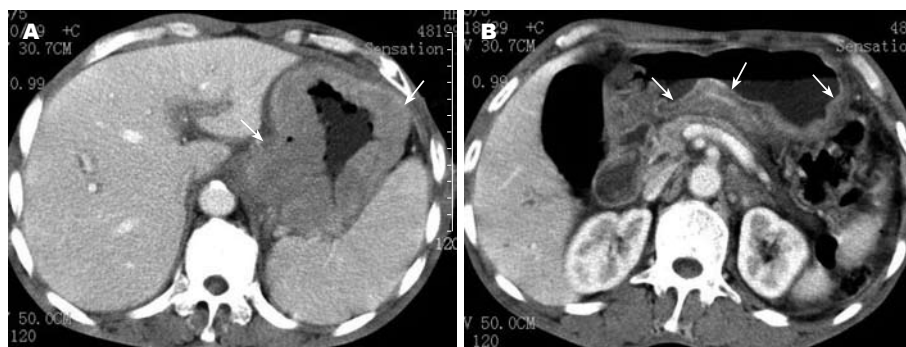


图 1 弥漫浸润型原发性胃淋巴瘤CT图像. A: 胃底、胃体壁增厚(箭头); B: 胃体、胃窦壁增厚(箭头).

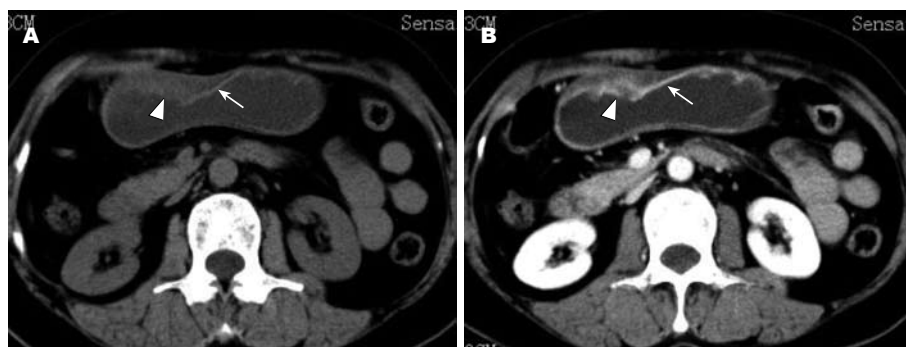


图 2 节段型原发性胃淋巴瘤CT图像. A: 平扫; B: 增强扫描静脉期(箭头完整黏膜, 箭头示破坏黏膜)



图 3 多发结节(箭头)原发性胃淋巴瘤CT图像.

外侵犯, 肿瘤不含大量纤维组织, 胃腔狭窄不明显, 食物可以通过, 营养吸收影响较小, 临床症状不严重, 所以就诊时多数病变已很广泛, 累及胃2个或3个部位, 甚至部分病变沿胃壁向远端浸润经过幽门至十二指肠<sup>[7,11]</sup>. 陈宇 *et al*<sup>[12]</sup>报道一组胃淋巴瘤与胃癌对照研究病例也认为胃淋巴瘤侵犯的范围较胃癌广泛.

本组病例无1例肝脏转移病灶, 绝大多数表现为胃壁增厚(95.5%), 仅1例表现为胃窦、体及底部3个散在结节. 胃壁增厚呈节段性或弥漫性, 内壁黏膜可光滑完整, 也可增粗、隆起、破坏、多发溃疡形成. 本组资料显示, 胃壁厚度 $\geq 10$  mm时黏膜破坏, 胃壁为均匀一致的肿瘤组织, 增强后均匀强化, 分层结构消失; 而胃壁厚度 $<10$  mm时多数黏膜线完整连续, 强化明显而呈高密度, 黏膜下层因肿瘤组织浸润而增厚, 强

化较弱呈低密度, 胃壁呈高、低密度相间的分层结构; 胃壁厚度为8-10 mm的少数胃壁黏膜线模糊, 黏膜皱壁粗大隆起. 部分病例既有较薄的胃壁黏膜层完整连续, 局部胃壁分层强化, 又有较厚的胃壁黏膜层破坏、消失, 局部胃壁呈均质强化, 两者之间明显强化的黏膜线随着胃壁增厚而变得逐渐模糊、不光整, 直至破坏、胃壁分层结构消失. 这种征象正反映了淋巴瘤初期在黏膜下浸润生长, 随后逐渐向黏膜表面及深部肌层破坏, 最后累及胃壁全层的病理过程, 与胃癌首先破坏黏膜层导致胃壁分层结构在初期即消失的表现不同. 这时, 钡餐造影和胃镜活检结果容易出现阴性, 如重视胃壁增厚并分层这种重要CT征象, 提示胃淋巴瘤的可能性, 行胃镜多点深部活检可获得准确的病理诊断而不致误诊. 本组4例即由于初次胃镜活检结果阴性, CT检查发现胃壁黏膜下层增厚, 黏膜线完整连续, 增强后呈分层强化, 经再次胃镜下深部活检才获得正确诊断. 由于胃淋巴瘤肿瘤细胞密集, 血供较少, 增强后多呈轻、中度强化, 静脉期增强幅度为14-30 HU, CT值 $\leq 65$  HU. 本组资料与文献[13]报道基本一致, 但3例静脉期强化明显, CT值 $\geq 84$  HU, CT及胃镜或手术病理均见胃壁多发溃疡形成, 1例手术病理示胃壁嗜酸细胞及浆细胞聚集、血管增生的炎症改变, 因此, 考虑多发溃疡继发炎症充血而致CT扫描静脉期显著强化. 部分PGL(15例, 62.5%)虽有胃壁增厚, 甚

#### ■创新盘点

本文强调了胃淋巴瘤较早期在黏膜下层浸润的CT表现, 即胃壁增厚较轻, 黏膜线完整, 胃壁呈分层强化, 并逐渐发展成胃壁明显增厚, 黏膜破坏, 表现为均匀一致的肿瘤组织, 即均匀强化, 并强调胃淋巴瘤广泛性、多灶性、胃腔可扩张的CT表现特点, 以便与胃癌鉴别.



### ■应用要点

CT检查胃壁及胃外情况,可避免漏诊胃壁及胃外病变,发现胃壁增厚时,可指导胃镜在相应部位行深部活检获得准确病理诊断。



图4 胃壁强化不同表现。A:胃底、体厚壁均匀强化(箭头);B:胃窦薄壁分层强化(箭头),厚壁均匀强化(箭头)。



图5 胃腔不狭窄。

至厚达6 cm,但胃腔狭窄不明显,在三期扫描中仔细观察,胃腔形态不同,与文献报道一致<sup>[11]</sup>。另外,胃腔有狭窄的病例均无近端梗阻,食物可通过而无滞留,与浸润型胃癌引起的胃腔狭窄、僵硬、形态固定不同,也反映了胃淋巴瘤无纤维组织增生而不引起胃壁僵硬的“革袋胃”表现。

本组病例只有4例弥漫浸润型PGL行手术切除,其余病例均经胃镜活检确诊后行化疗或化疗加放疗,所以免疫组化仅1例诊断为MALT淋巴瘤,其他胃镜标本只能获得弥漫性大B细胞淋巴瘤的诊断,实际上其中部分病例可能属于MALT淋巴瘤。Choi *et al*<sup>[14]</sup>认为低恶性度MALT淋巴瘤类似于*H. pylori*感染引起的胃炎和早期胃癌,容易误诊和漏诊,文献报道术前影像学及内镜检查的误诊率达75%-92.3%<sup>[9-10,15]</sup>。回顾性分析本组误诊病例发现,3例多发溃疡继发炎症致增强后胃壁明显强化而误诊,7例节段性胃壁增厚,最厚胃壁>20 mm,但均无胃腔狭窄,忽略了胃腔形态对胃癌和胃淋巴瘤鉴别的重要意义;并且其中3例胃壁见分层强化,1例胃体壁厚达45 mm的局部胃腔狭窄,但壁厚较轻的胃窦黏膜连续,呈分层强化,并且该处胃腔无狭窄,因而没有认识到增厚胃壁黏膜完整并呈分层强化对淋巴瘤诊断的重要价值。1例小弯广泛胃壁增厚,大弯可见多处局限性黏膜增粗、隆起,另1例胃镜示胃底、体、窦部及食道下端多个直径8-10 mm

的结节,病理均为大B细胞淋巴瘤,CT误以为正常黏膜皱壁而漏诊,这2例忽略了淋巴瘤可以多发并可呈散在结节的表现。1例多发淋巴结肿大、融合被误诊为间质瘤,而没有仔细分析邻近胃壁增厚的原因。

总之,CT误诊原因主要是对胃淋巴瘤的病理特点及CT表现认识不足,将胃壁增厚单纯考虑为常见的胃癌,没有重视胃腔无明显狭窄、胃壁黏膜完整连续呈分层强化对胃淋巴瘤的诊断价值,没有重视广泛、多灶性病变是胃淋巴瘤的特点<sup>[7,16-17]</sup>,即广泛胃壁浸润、多处胃壁增厚、多发结节和溃疡。综合分析这些特点有助于胃淋巴瘤与胃癌的鉴别诊断,减少胃淋巴瘤的误诊。

### 4 参考文献

- 1 Liu HT, Hsu C, Chen CL, Chiang IP, Chen LT, Chen YC, Cheng AL. Chemotherapy alone versus surgery followed by chemotherapy for stage I/II large-cell lymphoma of the stomach. *Am J Hematol* 2000; 64: 175-179
- 2 Willich NA, Reinartz G, Horst EJ, Delker G, Reers B, Hiddemann W, Tiemann M, Parwaresch R, Grothaus-Pinke B, Kocik J, Koch P. Operative and conservative management of primary gastric lymphoma: interim results of a German multicenter study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 895-901
- 3 Koch P, del Valle F, Berdel WE, Willich NA, Reers B, Hiddemann W, Grothaus-Pinke B, Reinartz G, Brockmann J, Temmesfeld A, Schmitz R, Rübe C, Probst A, Jaenke G, Bodenstein H, Junker A, Pott C, Schultze J, Heinecke A, Parwaresch R, Tiemann M; German Multicenter Study Group. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: I. Anatomic and histologic distribution, clinical features, and survival data of 371 patients registered in the German Multicenter Study GIT NHL 01/92. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3861-3873
- 4 Koch P, del Valle F, Berdel WE, Willich NA, Reers B, Hiddemann W, Grothaus-Pinke B, Reinartz G, Brockmann J, Temmesfeld A, Schmitz R, Rübe C, Probst A, Jaenke G, Bodenstein H, Junker A, Pott C, Schultze J, Heinecke A, Parwaresch R, Tiemann M; German Multicenter Study Group. Primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: II. Combined surgical and conservative or conservative management only in localized gastric

- lymphoma--results of the prospective German Multicenter Study GIT NHL 01/92. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3874-3883
- 5 Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Cavalli F. The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood* 2000; 96: 410-419
- 6 勇威本. 胃淋巴瘤的新认识呼唤改变传统的治疗策略. *世界临床药物* 2003; 24: 329-333
- 7 严瑾, 欧阳钦, 黄丽彬, 杨锦林. 原发性胃淋巴瘤内镜下表现及误诊分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1658-1661
- 8 王纯斌, 孙乃同. 原发性胃肠道恶性淋巴瘤38例报告. *临床误诊误治* 2006; 19: 27-28
- 9 王纯斌, 卞杰, 顾明. 原发性胃肠道恶性淋巴瘤诊治探讨. *白血病·淋巴瘤* 2002; 11: 286-288
- 10 许永春, 邹晓平, 孙振兴, 金震东, 宛新建, 李兆申. 原发性胃恶性淋巴瘤的内镜诊断. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 241-244
- 11 Ba-Ssalamah A, Prokop M, Uffmann M, Pokieser P, Teleky B, Lechner G. Dedicated multidetector CT of the stomach: spectrum of diseases. *Radiographics* 2003; 23: 625-644
- 12 陈宇, 石木兰, 郭向东. CT在胃原发非霍奇金淋巴瘤与胃低分化腺癌鉴别诊断中的应用价值. *临床放射学杂志* 2003; 22: 203-206
- 13 王锡明, 纪洪升, 武乐斌, 李振家. 多层螺旋CT动态强化扫描诊断原发性胃恶性淋巴瘤. *中国医学影像技术* 2005; 21: 389-391
- 14 Choi D, Lim HK, Lee SJ, Lim JH, Kim SH, Lee WJ, Lee JH, Kim YH, Rhee PL, Kim JJ, Ko YH. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: helical CT findings and pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 178: 1117-1122
- 15 王旦, 黄磊, 吴建胜, 吴明, 黄智铭, 陈民新. CT联合内镜检查对胃肠道恶性淋巴瘤的诊断价值. *中国内镜杂志* 2007; 13: 182-185
- 16 余日胜, 向可伟, 李蓉芬. 胃肠道黏膜相关淋巴组织淋巴瘤六例报告及文献复习. *中华放射学杂志* 2002; 36: 617-620
- 17 靳勇, 张华, 吴达明, 陈克敏. 胃肠道淋巴瘤的多层螺旋CT影像学分析. *临床放射学杂志* 2006; 25: 928-931

#### ■同行评价

本文具有很强的科学性和可读性, 较好的反映我国胃淋巴瘤的CT特点, 总体效果较好.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ···; B: ···; C: ···; D: ···; E: ···; F: ···; G: ···. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t=4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-06-08)

# 镍钛记忆合金加压吻合夹在胃肠吻合中的应用

王剑平, 徐志峰, 王明元, 蔡绍环, 黄春开

## ■背景资料

镍钛记忆合金加压吻合夹(CAC)由以色列生产,并于2002年最早应用于临床结肠吻合,2004年该产品引入我国后,临床上应用CAC进行结肠吻合、小肠吻合的研究,本课题组于2006年开展CAC在胃肠吻合的应用研究,在胃肠吻合中取得满意效果。

王剑平, 徐志峰, 王明元, 蔡绍环, 黄春开, 中国人民解放军南京军区福州总医院九五临床部普通外科 福建省莆田市 351100

作者贡献分布: 王剑平与徐志峰对此文所作贡献均等; 此研究由王剑平、徐志峰、王明元、蔡绍环及黄春开设计; 研究过程由王明元、徐志峰、王剑平、蔡绍环及黄春开操作完成; 研究所用器械由王明元提供; 数据分析由王剑平、徐志峰、蔡绍环及王明元完成; 本论文写作由王剑平、徐志峰、王明元及黄春开完成。

通讯作者: 黄春开, 351100, 福建省莆田市, 中国人民解放军南京军区福州总医院九五临床部普通外科。wjping163@tom.com  
电话: 0594-2292361-60623 传真: 0594-2292361

收稿日期: 2008-01-06 修回日期: 2008-03-04

## Application of compression anastomosis clip in gastroenterostomy

Jian-Ping Wang, Zhi-Feng Xu, Ming-Yuan Wang, Shao-Huan Cai, Chun-Kai Huang

Jian-Ping Wang, Zhi-Feng Xu, Ming-Yuan Wang, Shao-Huan Cai, Chun-Kai Huang, Department of General Surgery, the 95th Clinical Department of Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Putian 351100, Fujian Province, China

Correspondence to: Chun-Kai Huang, Department of General Surgery, the 95th Clinical Department of Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Putian 351100, Fujian Province, China. wjping163@tom.com

Received: 2008-01-06 Revised: 2008-03-04

## Abstract

**AIM:** To evaluate safety and efficacy of compression anastomosis clip (CAC) for gastrointestinal anastomosis.

**METHODS:** Forty patients who underwent subtotal gastrectomy and gastrojejunostomy were assigned randomly to use either CAC or a curved stapler. Anastomotic complications were observed; The first post-operation flatus and bowel movement and extrusion of clip device were recorded. All statistics were analyzed using SPSS software package.

**RESULTS:** Neither group had gastrointestinal anastomotic complications such as leakage or obstruction. The clip was evacuated with the stool within 10-30 days after operation in the experiment group, but no significant difference was detected between the two groups. Two

groups had the similar results in recovery of bowel function.

**CONCLUSION:** CAC is safe and simple to use for gastroenterostomy.

**Key Words:** Subtotal gastrectomy; Gastrointestinal anastomosis; Compression anastomosis clip

Wang JP, Xu ZF, Wang MY, Cai SH, Huang CK. Application of compression anastomosis clip in gastroenterostomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1812-1814

## 摘要

**目的:** 评价一种新型镍钛记忆合金加压吻合夹(CAC)进行胃肠吻合的安全性及有效性。

**方法:** 2006-04/2007-09行远端胃大部切除胃空肠吻合的患者40例随机分为2组,各20例。研究组使用CAC进行胃空肠吻合;对照组使用管型吻合器进行胃空肠吻合。术后观察有无发生与胃肠吻合相关的并发症,并观察肛门排气、排便时间以及CAC的排出时间。

**结果:** 两组患者术后均未出现与吻合相关的胃肠吻合口瘘、吻合口狭窄或肠梗阻等并发症,术后肛门排气、排便时间两组差异无统计学意义。研究组CAC均于术后10-30 d排出体外。

**结论:** 应用CAC进行胃肠吻合安全可靠,使用简便。

**关键词:** 远端胃大部切除; 胃肠吻合; 加压吻合夹

王剑平, 徐志峰, 王明元, 蔡绍环, 黄春开. 镍钛记忆合金加压吻合夹在胃肠吻合中的应用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(16): 1812-1814

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1812.asp>

## 0 引言

目前临床常用的胃肠道吻合术包括手工缝合法和机械缝合法(吻合器法<sup>[1]</sup>)。近年来一种新型的肠吻合装置—镍钛记忆合金加压吻合夹

## ■同行评议者

曹杰, 主任医师, 广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科

表 1 40例患者的临床资料及手术情况 ( $n = 20$ , mean  $\pm$  SD)

项目	CAC组	对照组
年龄(岁)	57.5 $\pm$ 16.9	56.3 $\pm$ 15.3
男/女	16/4	13/7
体质量(kg)	54.6 $\pm$ 6.2	56.4 $\pm$ 17.4
胃溃疡	12	14
胃肿瘤	8	6
胃空肠吻合时间(min)	8.3 $\pm$ 1.2	10.1 $\pm$ 1.8
术后肠排气时间(d)	4.3 $\pm$ 1.8	4.5 $\pm$ 1.4
术后进食时间(d)	5.1 $\pm$ 1.7	5.3 $\pm$ 2.1
术后住院时间(d)	11.4 $\pm$ 2.1	11.7 $\pm$ 3.2

(compression anastomosis clip, CAC)已在国内外临床开腹手术或腔镜辅助手术中成功用于消化道吻合, 并形成相应的标准操作方法<sup>[2-6]</sup>. 2006-04/2007-09我科对行远端胃大部切除患者使用CAC行胃空肠吻合共20例, 现报告如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2006-04/2007-09行远端胃大部切除胃空肠吻合的患者40例. 随机分为2组, 各20例. 研究组使用CAC进行胃肠吻合, 对照组使用一次性管型吻合器进行胃肠吻合. 两组患者年龄及疾病分布无差异. 所有患者均签署知情同意书. 夹直径30 mm的CAC由以色列尼泰医疗技术公司(niti alloys technologies, Ltd, Israel)提供. FH-Y型线型缝合器(以下简称缝合器)和一次性管型吻合器(WH-Y型吻合器)由常州市智业医疗仪器研究所生产.

**1.2 方法** 2组患者均先行远端胃大部切除, 使用缝合器关闭十二指肠残端, 对照组使用WH-Y型吻合器经残端胃后壁行胃空肠吻合术, 再使用缝合器关闭胃残端, 最后用1号丝线间断浆肌层缝合. 研究组先使用缝合器关闭胃残端, 1号丝线间断浆肌层缝合, 后使用CAC行结肠前胃空肠吻合. 将胃残端、近端空肠相对平行排列, 相互重叠约5 cm, 以1号丝线将胃残端后壁、空肠对系膜缘侧壁固定一针. 使用电刀在两袢上各切开一长约5 mm的切口, 准备通过小切口内进行吻合. CAC装置在冰水中冷却20 s后, 将其推向上夹器, 击发第1次使吻合夹达到展开位, 将吻合夹经胃残端后壁、空肠袢上的小切口置入胃肠腔中. 击发第2次使吻合夹闭合回缩, 然后进行第3次击发, 上夹器内置的刀片将双夹所夹的胃后壁、肠侧壁开孔, 以形成临时性的通道, 使肠内容物能自由通过吻合口. 接着击发最后1次, 使上夹器与环夹分离, 退出上夹器, 而环夹

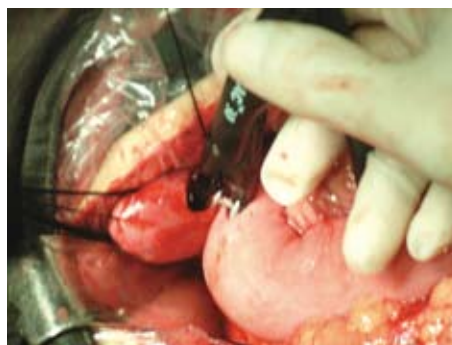


图 1 应用镍钛记忆合金加压吻合夹进行胃空肠吻合.



图 2 术后3 d腹部平片显示CAC在胃空肠吻合口处.

保留在吻合的胃肠段(图1). 然后用弯止血钳尖确定开孔口, 并适当扩大之. 胃残端、空肠袢上的5 mm切口用3-0可吸收线全层内翻缝合, 再加浆肌层包埋, 剪掉固定线.

**统计学处理** 应用SPSS 11.5统计软件进行统计分析, 数据以mean  $\pm$  SD表示, 均数比较采用 $t$ 检验.

## 2 结果

两组术后均未发生与吻合口相关的并发症, 如: 吻合口瘘、吻合口狭窄或肠梗阻等. 2组在胃空肠吻合时间、术后肠蠕动恢复、进食时间及术后住院时间等方面差异均无显著性(表1). 在研究组中, 术后3 d腹部X线检查显示CAC均在原位(图2). CAC于术后10-30 d由粪便中排出, 5例患者在出院前排出, 15例患者出院后在家中排出. 全组患者术后随访1-3 mo, 其中2例最晚术后30 d才排出, 并出现过阵发性腹痛, 但均无感染、肠梗阻和吻合口狭窄等副反应发生, 术后3 mo均复查胃镜, 显示胃肠吻合口光滑平整.

## 3 讨论

加压吻合是一种较新的吻合方法, 临床应用CAC进行的结肠吻合首先是在以色列完成<sup>[7]</sup>, 近几年临床运用已较成熟. 在以往的研究中发现, 生物降解环进行的加压吻合方法, 无论是在手

### ■应用要点

镍钛记忆合金加压吻合夹进行胃肠吻合安全有效, 值得临床推广使用.

# ■同行评价

本研究统计学方法合理, 样本量充足, 科学性、创新性和可读性较好, 具有较好的参考价值。

术时间、术后并发症及肠功能的恢复方面, 均优于使用常规的管型吻合器的方法<sup>[8-9]</sup>。CAC是由记忆金属镍钛合金制成, 具有随温度的变化而改变形态的独特功能<sup>[10]</sup>, 其机制类似于以往的肠道加压吻合装置Murphy按钮和生物降解环<sup>[11]</sup>, 他直接对肠壁组织产生很强的均匀一致的压力, 从而引起肠壁局部坏死<sup>[12-13]</sup>。一旦肠壁组织完全坏死, CAC将脱离到肠腔中随粪便排出, 肠壁组织坏死的同时伴随有肠壁愈合的形成, 最终形成1个均匀一致的加压吻合口; 而Murphy按钮和生物降解环具有压力不一致、内径过小、价格昂贵等缺点<sup>[14]</sup>。

使用CAC进行胃肠吻合与使用管型吻合器相比: (1)进行CAC操作时, 在胃肠壁上只须切开1个小孔以便放入CAC装置, CAC短暂留在肠道中, 几天后将随粪便排出。同时CAC采用几乎“无接触”的操作技术, 有利于防止肠腔内容物的污染, 减少感染的发生; 而常规使用的管型吻合器需要一个较大的孔径, 并且击发吻合器后, 需从污染的胃残端中取出而进入清洁的手术野, 有增加污染的可能。(2)CAC加压吻合后, 粘膜覆盖切缘形成一个完整光滑、均匀一致的吻合口。而管型吻合器切割肠壁后在缝合钉附近形成一个新的粗糙创口, 有可能术后发生狭窄。管型的残留有可能影响患者的影像学检查, 而应用CAC行胃肠吻合, 吻合口处光滑平整无异物残留。(3)使用CAC进行胃肠吻合简便易于操作, 与管型吻合器相比, 在胃空肠吻合时间、术后肠蠕动恢复、进食时间及术后住院时间等方面无明显差异。

我们在使用CAC进行胃肠吻合操作中有几点体会: (1)胃肠吻合前, 胃残端后壁、空肠对系膜缘侧壁不需固定2-3针, 只需在两袢切开处固定一针, 以手辅助使两袢相互重叠约5 cm, 更便于放置吻合夹。(2)上吻合夹并退出上夹器后, 用弯止血钳确定开孔口, 可扩大以调整大小, 防止吻合夹出现未切割、切割不完全及切割口偏小等情况发生。(3)用3-0可吸收线内翻缝合切口, 浆肌层加固, 即使缝合住吻合夹, 可吸收线在被化解后, 仍可脱落, 并确保吻合夹脱落后吻合口光滑平整无异物残留。

有关使用CAC是否会出现脱落过早或过迟及能否导致肠梗阻等问题, 国内江志伟 *et al*<sup>[15]</sup>研究表明: 直径为3 cm呈橄榄形的CAC均能在术后安全地通过回盲瓣排出体外, 不致造成术后

肠梗阻; CAC排出体外时间约为术后第11天。我们观察CAC排出时间, 发现较之前报道的略偏晚, 原因有待进一步研究, 其中2例术后出现阵发性腹痛, 解痉后很快缓解, 1 mo才排出体外, 但均未造成大碍。本研究证实使用CAC进行胃肠吻合安全有效, 值得推广运用。

# 4 参考文献

- McGuire J, Wright IC, Leverment JN. Surgical staplers: a review. *J R Coll Surg Edinb* 1997; 42: 1-9
- Nudelman, Fuko, Rubin, Lelcuk. A memory-shape temperature-dependent nickel-titanium device for colonic anastomosis in laparoscopic surgery. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2004; 13: 36-41
- Song C, Frank T, Cuschieri A. Shape memory alloy clip for compression colonic anastomosis. *J Biomech Eng* 2005; 127: 351-354
- Nudelman I, Fuko V, Waserberg N, Niv Y, Rubin M, Szold A, Lelcuk S. Colonic anastomosis performed with a memory-shaped device. *Am J Surg* 2005; 190: 434-438
- 江志伟, 李宁, 黎介寿, 汪志明, 刘碧竹. 应用镍钛记忆合金加压吻合夹进行结肠吻合的临床研究. *中国实用外科杂志* 2006; 26: 364-365
- 曾毅, 陈夏, 应敏刚. 镍钛记忆合金加压吻合夹在腹腔镜结肠癌手术中的应用. *中华胃肠外科杂志* 2007; 10: 539
- Nudelman IL, Fuko V, Greif F, Lelcuk S. Colonic anastomosis with the nickel-titanium temperature-dependent memory-shape device. *Am J Surg* 2002; 183: 697-701
- Corman ML, Prager ED, Hardy TG Jr, Bubrick MP. Comparison of the Valtrac biofragmentable anastomosis ring with conventional suture and stapled anastomosis in colon surgery. Results of a prospective, randomized clinical trial. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 183-187
- Wullstein C, Gross E. Compression anastomosis (AKA-2) in colorectal surgery: results in 442 consecutive patients. *Br J Surg* 2000; 87: 1071-1075
- 尚培中, 张振海. 镍钛合金在我国腹部外科的应用现状. *中国普通外科杂志* 1997; 6: 382-384
- Thiede A, Geiger D, Dietz UA, Debus ES, Engemann R, Lexer GC, Lünstedt B, Mokros W. Overview on compression anastomoses: biofragmentable anastomosis ring multicenter prospective trial of 1666 anastomoses. *World J Surg* 1998; 22: 78-86; discussion 87
- Nudelman IL, Fuko VV, Morgenstern S, Giler S, Lelcuk S. Gastrointestinal anastomosis with the nickel-titanium double ring. *World J Surg* 2000; 24: 874-877
- Nudelman I, Fuko V, Rubin M, Lelcuk S. A nickel-titanium memory-shape device for colonic anastomosis in laparoscopic surgery. *Surg Endosc* 2004; 18: 1085-1089
- Dietz UA, Debus ES, Hirt AL, Czezczko NG, Malafaia O, Geiger D, Thiede A. From Murphy's button to the Valtrac Ring. 100 years in search of a paradigm. *Zentralbl Chir* 1999; 124: 653-656
- 江志伟, 李宁, 黎介寿, 汪志明, 丁凯, 刘碧竹. 应用镍钛记忆合金加压吻合夹进行小肠吻合的临床研究. *中华胃肠外科杂志* 2006; 9: 392-394



# 原发性肝细胞癌射频消融后快速广泛复发的因素

翟博, 徐爱民, 李晓燕, 刘晟, 陈夷, 吴孟超

翟博, 李晓燕, 刘晟, 陈夷, 吴孟超, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院超声介入科 上海市 200438  
徐爱民, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院放射介入科 上海市 200438

作者贡献分布: 翟博与徐爱民对此文所作贡献均等; 此课题由翟博, 徐爱民, 刘晟, 李晓燕及陈夷共同设计; 翟博, 刘晟和李小燕负责射频消融操作; 徐爱民实施TACE治疗; 数据分析由翟博完成; 本论文写作由翟博及徐爱民完成; 陈夷和吴孟超院士对论文进行指导和修改。

通讯作者: 陈夷, 200438, 上海市长海路225号, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院. cheniyi57@sina.com  
电话: 021-25074927

收稿日期: 2007-01-20 修回日期: 2008-04-09

## Risk factors of rapid and extensive intrahepatic neoplastic progression after radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma

Bo Zhai, Ai-Min Xu, Xiao-Yan Li, Sheng Liu, Yi Chen, Meng-Chao Wu

Bo Zhai, Xiao-Yan Li, Sheng Liu, Yi Chen, Meng-Chao Wu, Department of Ultrasonic Intervention, the Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China  
Ai-Min Xu, Department of Radiology and Intervention, the Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Correspondence to: Yi Chen, Department of Ultrasonic Intervention, the Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 225 Changhai Road, Shanghai 200438, China. cheniyi57@sina.com

Received: 2007-01-20 Revised: 2008-04-09

## Abstract

**AIM:** To study the mechanism and influencing factors of rapid and extensive intrahepatic neoplastic progression after radiofrequency ablation (RFA) in hepatocellular carcinoma (HCC) patients.

**METHODS:** A total of 926 consecutive HCC patients admitted to RFA between January 1999 and June 2006 were enrolled. In all cases RFA was performed with percutaneous approach under ultrasound guidance. Treatment efficacy (necrosis and recurrence) was assessed using dual phase computed tomography (CT) or MRI

and alpha-fetoprotein (AFP) level within 45 days after RFA treatment. Ten potential variables for rapid and extensive intrahepatic neoplastic progression were analyzed, including liver function Child-Pugh classification, the number of tumor, size, location, growth pattern, AFP value, tumor differentiation, portal vein cancerous thrombosis, the type of RF treatment system (or electrode-type) and transarterial chemoembolization (TACE).

**RESULTS:** Complete follow-up data were obtained from 874 cases of patients (94.4%). In 54 patients, although complete local necrosis was achieved, we observed rapid intrahepatic neoplastic progression 30-45 d after treatment. Risk factors analysis by Logistic regression suggested risk factors for rapid and extensive intrahepatic neoplastic progression of HCC after RFA were tumor type, portal vein cancerous thrombosis, tumor cite and TACE treatment ( $OR = 2.647, P < 0.001$ ;  $OR = 1.341, P < 0.001$ ;  $OR = 0.197, P = 0.006$ ;  $OR = 1.512, P = 0.042$ , respectively).

**CONCLUSION:** RFA is an effective treatment for HCC. Tumor near portal branches, infiltrative growth, vessel invasion of portal branches and TACE treatment are risk factors for rapid neoplastic progression after RFA. TACE treatment is a better choice for those patients.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Radiofrequency ablation; Rapid intrahepatic neoplastic progression; Transarterial chemoembolization

Zhai B, Xu AM, Li XY, Liu S, Chen Y, Wu MC. Risk factors of rapid and extensive intrahepatic neoplastic progression after radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1815-1819

## 摘要

**目的:** 探讨原发性肝细胞癌患者射频消融后肝内肿瘤快速广泛复发的发生机制及影响因素。

**方法:** 1999-12/2006-03我院接受经皮射频消融的原发性肝细胞癌患者926例, 术后30-45 d内CT、MRI及AFP复查, 并进行随访, 分析10

## ■背景资料

目前, 射频消融等局部微创治疗某种程度上已成为原发性肝癌(尤其小肝癌)患者外科手术的良好补充和替代。射频消融治疗疗效好、创伤小、并发症少而轻, 患者恢复快、生活质量高。但实践中常发现射频消融后肝内肿瘤快速广泛复发的现象。

## ■同行评议者

钱林学, 教授, 首都医科大学附属北京友谊医院内科

## ■研究前沿

射频消融疗效确切,但病例选择必须谨慎,对于浸润性生长、位于肝脏主要血管附近,尤其伴有门脉癌栓者,最好射频消融前首先实施TACE治疗,以最大限度减少术后发生肿瘤快速广泛复发的风险。

个可能影响肿瘤射频后快速复发的变量,包括肝功能Child-Pugh分级、肿瘤数目、大小、部位、生长方式、AFP值、肿瘤分化程度、有无门脉癌栓、射频治疗系统类型(或电极针类型)以及术前有无实施肝动脉化学栓塞(TACE)。

**结果:** 874例患者获得有效随访记录。54例患者初始治疗后获得局部完全坏死,但术后30-45 d首次复查即发生肝内肿瘤快速广泛复发。射频消融后肿瘤广泛快速复发的危险因素分别为肿瘤类型( $OR = 2.647, P < 0.001$ )、门脉癌栓( $OR = 1.341, P < 0.001$ )、肿瘤部位( $OR = 0.197, P = 0.006$ )和射频前有无进行TACE( $OR = 1.512, P = 0.042$ )。

**结论:** 位于主要门脉分支处、浸润性生长及术前存在血管侵袭是射频消融后肿瘤快速广泛复发的影响因素,这些类型的肝细胞癌患者射频消融前更应实施TACE治疗。

**关键词:** 肝细胞癌; 射频消融; 肝内肿瘤快速复发; 动脉化学栓塞

翟博, 徐爱民, 李晓燕, 刘晟, 陈夷, 吴孟超. 原发性肝细胞癌射频消融后快速广泛复发的因素. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1815-1819  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1815.asp>

## 0 引言

原发性肝癌, 尤其原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 是最常见的恶性肿瘤之一, 只有10%-20%的患者能够实施外科手术或肝移植<sup>[1-2]</sup>。近年来, 射频消融(radiofrequency ablation, RFA)、微波固化、冷冻以及瘤内酒精注射等局部治疗为不适合外科切除的肝癌患者带来了新的机遇, 成为继外科切除、放射介入和放疗等传统方法之后又一条前景光明的治疗途径。RFA治疗创伤小、并发症少而轻, 患者恢复快、生活质量高, 某种程度上可部分替代肝癌(尤其小肝癌)的手术治疗。尽管如此, 临床工作中常发现RFA后肝内肿瘤快速广泛复发的现象。本研究通过总结我科有随访记录的HCC患者874例的治疗资料, 以探讨RFA后肝内肿瘤快速广泛复发的发生机制和影响因素。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1999-12/2006-04, 我院共有HCC 926例患者接受了超声引导下经皮RFA术。患者年龄

12-83(平均54.6)岁。因各种原因(如严重肝硬化、凝血机制障碍和心肺功能不全等)未行手术者根据超声、CT或MRI等影像学表现及甲胎蛋白(AFP)加以确诊, 少数仍未明确者实施针刺活检。既往曾接受过外科切除者根据影像学、AFP以及术后病理加以诊断。患者详细资料见表1。本组患者符合下列条件: (1)无同时存在的肝外脏器转移; (2)病灶数目 $< 7$ 个; (3)患者拒绝手术而选择RFA; (4)原发性肝癌(HCC)诊断明确; (5)无出血倾向(PT时间延长 $< 4$  s, 血小板计数 $> 4 \times 10^{12}/L$ ); 肝功能Child B级以上或经保肝治疗后达到B级以上(尤其总胆红素 $< 40$  mmol/L); 无明显腹水; (6)肿瘤能够超声下精确定位; (7)肿瘤远离主要血管、胆管和空腔脏器至少0.5 cm; (8)单一肿瘤最大直径 $< 8$  cm, 多发肿瘤最大直径 $< 5$  cm; (10)身体状况不适合肝脏外科切除术。

**1.2 方法** 治疗采用Electrome 106 HiTT射频治疗系统(Berchtold. Wir helfen)以及RF2000型射频治疗系统(Radio Therapeutics Corp.)。前者治疗针为17G单针电极, 最大输出功率60 W。后者电极针为多极特制带鞘针(LeVeen 3515), 最大输出功率100 W, 展开直径为4.0 cm。直径 $< 3$  cm的肿瘤2种电极针均可选用, 3 cm以上者采用可张开式电极, 4 cm以上者应用可张开式电极针实施多电极、多位点治疗。

术前根据肿瘤部位和大小给予局麻或持续硬膜外麻醉(肿瘤较大或过多者可采用全麻)。B超引导下于肋间或肋缘下进针, 注意避开主要血管和胆管的较大分支。刺入肿瘤后推出电极子针, 电极的最佳位置必须保证肿瘤周围0.5-1 cm正常肝组织完全热凝坏死。治疗初始功率为50 W, 间隔1 min增加10 W渐至90 W。当阻抗显著上升和输出功率自动降至10 W以下时, 1次热凝或再次热凝结束后拔除电极结束治疗。RFA后第1天常规检查血常规和肝功能。

治疗后30-45 d通过CT/MRI及AFP实施第1次复查, 以评估治疗效果。CT/MRI检查后在消融灶边缘或内部没有病理性增强定义为肿瘤完全坏死。肝内肿瘤较射频前数目增多(新生肿瘤, 数目 $\geq 2$ 个以上)或体积明显增大并存在边缘或内部增强定义为“快速广泛复发”(即爆发性新生肿瘤形成和消融灶局部广泛复发)。

926例患者均在术后通过回院复查、电话和信件等方式进行随访。分析10个可能影响肿瘤射频后快速复发的变量, 包括肝功能Child-Pugh分级、肿瘤数目、大小、部位、生

表 1 926例HCC患者的基本资料 (n, %)

特征	n	%
性别		
男	728	78.6
女	198	21.4
Child-Pugh肝功能分级		
A	737	79.6
B	183	19.8
C	6	0.6
病灶数目		
单个	539	58.2
多个	387	41.8
肿瘤生长方式		
浸润性	308	33.3
非浸润性	614	66.7
AFP值		
<20 ng/L	197	21.3
>20 ng/L	729	78.7
外科手术		
有	723	78.1
无	203	21.9
术前TACE		
有	585	63.2
无	341	36.8

长方式、AFP值、肿瘤分化程度、有无门脉癌栓、射频治疗系统类型(或电极针类型)以及术前有无实施肝动脉化学栓塞(transarterial chemoembolization, TACE).

**统计学处理** 用 $\chi^2$ 检验对所有计数资料进行统计学处理, 对有统计意义的因素再作多因素非条件Logistic逐步回归分析,  $P<0.05$ 为显著相关. 数据均应用SPSS12.0统计软件进行分析.

## 2 结果

874例患者得到有效随访记录. 统计PRFA术后30-45 d第1次复查时肿瘤的消融情况. 54例患者术中超声显示病灶完全覆盖, 术后第1次复查发现肿瘤快速广泛复发或新生, 其中42例术前AFP高于正常, 术后第1次复查时38例出现AFP值迅速增加, 4例基本没有变化. 12例术前AFP正常者术后第1次复查时均未出现升高.

单因素分析发现, 多发性肿瘤与单发性肿瘤( $P<0.001$ ), 位于门脉分支附近的肿瘤与远离门脉分支者( $P<0.001$ ), 分化程度良好与分化不良者( $P=0.008$ ), 浸润性生长的肿瘤与边缘较清晰者( $P=0.010$ )相比以及术前存在血管侵袭或门脉癌栓者( $P=0.014$ )均易发生RFA后肿瘤快速

表 2 874例肝癌患者射频后快速广泛复发单因素分析结果 (n, %)

指标	快速广泛复发		P
	无	有	
Child-Pugh肝功能分级			
A	678	39	0.093
B	136	15	
C	6	0	
病灶数目			
单个	489	18	0.000
多个	331	36	
AFP 值			
<20 ng/L	177	12	0.866
>20 ng/L	643	42	
肿瘤大小			
<3 cm	589	33	0.216
3-5 cm	237	15	
5-8 cm	48	6	
肿瘤类型			
浸润性	252	26	0.010
非浸润性	568	28	
门脉癌栓			
无	712	40	0.014
有	108	14	
肿瘤部位			
远离主要血管分支	644	22	0.000
主要血管分支附近	176	32	
射频发生器类型			
RF2000	519	31	0.387
HITT	301	23	
肿瘤分化程度			
I - II	16	0	0.008
III	618	32	
IV	187	22	
术前股动脉化学栓塞			
有	527	26	0.020
无	293	28	

广泛复发. 术前曾接受TACE者与未行TACE者更常见术后肿瘤广泛快速复发( $P=0.020$ , 表2). 而患者的年龄、性别、大小、射频治疗系统(或电极针类型)、术前AFP的大小、肝硬化的程度等指标与术后快速广泛复发未见明显相关性.

将上述6个变量同时引入非条件Logistic逐步回归分析模型, 筛选出4个RFA后肿瘤广泛快速复发的危险因素, 分别为肿瘤类型( $OR=2.647$ ,  $P<0.001$ )、门脉癌栓( $OR=1.341$ ,  $P<0.001$ )、肿瘤部位( $OR=0.197$ ,  $P=0.006$ )和射频前有无进行TACE( $OR=1.512$ ,  $P=0.042$ ). 其他均被排除(表3).

## ■ 相关报道

有关射频消融后肿瘤快速广泛复发的报道较少, 有限的研究显示此种并发症与门脉癌栓的存在有关, 射频消融前TACE治疗某种程度上也促进了该并发症的发生.

# ■创新盘点

本文通过总结874例原发性肝癌患者的治疗资料,探讨射频消融后肝内肿瘤快速广泛复发的发生机制和影响因素。

表 3 874例肝癌患者射频后快速广泛复发危险因素的Logistic逐步回归分析结果

相关因素	参考估计值	标准误(SE)	OR	P	95% CI
常数	-6.329	0.398			
病灶数目	0.581	0.163	1.482	0.064	1.024-2.532
肿瘤类型	1.110	0.186	2.647	0.000	2.002-4.634
门脉癌栓	0.384	0.071	1.341	0.000	1.127-1.652
肿瘤部位	0.548	0.197	1.635	0.006	1.190-2.642
分化程度	0.011	0.365	1.125	0.846	0.497-2.002
术前TACE	0.412	0.236	1.512	0.042	1.047-2.029

## 3 讨论

RFA是近年来肝癌治疗的新进展之一,其较大并发症的发生率为5%-15%<sup>[3-4]</sup>,主要包括包膜坏死、腹腔内出血、包膜下出血、胆囊炎、肝脓肿以及相邻空腔脏器穿孔等。近年来,人们开始注意到射频后肿瘤的快速广泛复发问题。

据我们所知, Seki *et al*<sup>[5]</sup>首次报道了这种RFA后并发症,该例患者RFA前接受了TACE。作者认为肿瘤术后快速侵袭性复发与肿瘤发生的生物学特性有关,肿瘤坏死后细胞间黏附力减低, TACE则进一步推动了肿瘤细胞的播散。 Ruzzenente *et al*<sup>[6]</sup>也报道, 87例伴有肝硬化的HCC患者中4例(4.59%)实施射频后获得了初始局部完全坏死,但治疗后1 mo即发生肝内快速新生物形成,证实术前AFP升高以及肿瘤位于门脉主要分支附近是该并发症的风险因素。与之相似,我们也发现位于主要血管附近的肿瘤实施RFA后更容易发生肿瘤快速广泛复发(15.4%)。 Ruzzenente将之归因为下列机制: (1)伴有血管侵袭的肿瘤具有肿瘤内部压力升高的特征。 RFA期间能量的释放可能增加了肿瘤内部的压力,助长了肿瘤在血管内的播散<sup>[7]</sup>。 (2)可张开式电极展开的子针可能推动有迁移能力的肿瘤细胞进入门脉分支。 (3)操作后产生的动静脉瘘可能促进了肿瘤细胞移动进入门静脉循环<sup>[3,8]</sup>。上述推断建立在应用可张开式电极的基础上,从我们的研究来看,相比可张开式电极, HITT电极在减少术后肿瘤快速广泛复发方面并无优越之处,因此上述第二种机制的推断有待进一步论证。

本研究还发现血管浸润也与射频后快速广泛复发有关。这可能与门脉癌栓患者更容易发生广泛播散,在射频治疗前肝内可能已经形成多个转移的微环境有关,而RFA可能进一步促成了肿瘤的爆发性发生。 Takada *et al*<sup>[9]</sup>也报道了2例RFA后伴有门静脉血栓形成的快速侵袭性复发

的病例,并认为治疗后肿瘤周围的不可见卫星结节仍旧存在活力,射频治疗后便以1种浸润性的方式快速生长起来。由于卫星结节可能来源于门静脉系统的肝内转移,先前存在的微转移灶可能与门脉癌栓有关。射频的热效应可能增加了肿瘤的恶性潜力,造成这种快速进展。

另外,从本研究来看,射频后的广泛快速复发也与肿瘤的生长方式有关,浸润性生长者更易发生,这可能与RFA未能完整涵盖整个肿瘤边缘、甚至建立一个安全边缘(一般1 cm以上)有关,而术前TACE对肿瘤边缘血管的封堵效应某种程度上可以弥补这一缺陷,因此术前实施肝动脉化学栓塞可能会起到抑制或延迟射频后肿瘤广泛快速复发的效果。

事实上,本研究也涉及了该方面的探讨。与Seki *et al*的结果相反,本组患者RFA前实施TACE不仅没有增强肿瘤细胞的传播,相反由于化疗药物和碘油的长期作用,尤其对较小病灶的摧毁作用和肿瘤周围血管的封闭作用,射频后肿瘤更少出现广泛快速复发。既往有不少学者<sup>[10-12]</sup>探讨了TACE对肝癌RFA治疗效果的影响,大多数均证实术前TACE对于防止或延缓肿瘤复发或新生,延长生存期均有着积极的意义。我们认为,对于肿瘤较大、多发、位于肝门部等状况下的肝癌患者最好应在RFA前先应用TACE,这对于增强消融效果,防止RFA后肿瘤快速广泛复发有着重要价值。

值得一提的是,本研究的单因素分析发现肿瘤分化程度及肿瘤数目也与射频后快速广泛复发有关,但Logistic回归分析却不支持二者作为RFA后肿瘤快速广泛复发的独立影响因素。理论上讲,由于分化能力差的肿瘤细胞更容易发生脱落和血管侵袭,进而引起肿瘤的爆发性发生,但RFA可能尚无力对该过程产生强烈影响。另外,多灶性发生的肿瘤具有更难抑制的发生

速度和强度, 该类患者的免疫功能可能较单发者更为低下, 因而肿瘤细胞的侵袭活性更强. 尽管多项研究<sup>[13-15]</sup>证实RFA灶周围表现为免疫活性提高, 但对于处于影像学显示范围之外的肿瘤仍然无能为力, 因此RFA后发生肿瘤的广泛新生可能更取决于肿瘤本身的分子生物学性质, 而与RFA的实施与否无关.

总之, RFA后肿瘤快速广泛复发尽管较少见, 但应引起高度重视. 对于位于主要门脉分支处、浸润性生长, 尤其已经存在血管侵袭的患者更应该仔细评估. 最好RFA前实施TACE治疗, 如此才可能最大限度防止该并发症的发生.

#### 4 参考文献

- 1 Farinati F, Rinaldi M, Gianni S, Naccarato R. How should patients with hepatocellular carcinoma be staged? Validation of a new prognostic system. *Cancer* 2000; 89: 2266-2273
- 2 Llovet JM, Bustamante J, Castells A, Vilana R, Ayuso Mdel C, Sala M, Brú C, Rodés J, Bruix J. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999; 29: 62-67
- 3 Mulier S, Mulier P, Ni Y, Miao Y, Dupas B, Marchal G, De Wever I, Michel L. Complications of radiofrequency coagulation of liver tumours. *Br J Surg* 2002; 89: 1206-1222
- 4 de Baere T, Risse O, Kuoch V, Dromain C, Sengel C, Smayra T, Gamal El Din M, Letoublon C, Elias D. Adverse events during radiofrequency treatment of 582 hepatic tumors. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 181: 695-700
- 5 Seki T, Tamai T, Ikeda K, Imamura M, Nishimura A, Yamashiki N, Nakagawa T, Inoue K. Rapid progression of hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous radiofrequency ablation in the primary tumour region. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 291-294
- 6 Ruzzenente A, Manzoni GD, Molfetta M, Pachera S, Genco B, Donatiggio M, Guglielmi A. Rapid progression of hepatocellular carcinoma after Radiofrequency Ablation. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1137-1140
- 7 Tanaka T, Yamanaka N, Oriyama T, Furukawa K, Okamoto E. Factors regulating tumor pressure in hepatocellular carcinoma and implications for tumor spread. *Hepatology* 1997; 26: 283-287
- 8 Catalano O, Esposito M, Nunziata A, Siani A. Multiphase helical CT findings after percutaneous ablation procedures for hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging* 2000; 25: 607-614
- 9 Takada Y, Kurata M, Ohkohchi N. Rapid and aggressive recurrence accompanied by portal tumor thrombus after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2003; 8: 332-335
- 10 Veltri A, Moretto P, Doriguzzi A, Pagano E, Carrara G, Gandini G. Radiofrequency thermal ablation (RFA) after transarterial chemoembolization (TACE) as a combined therapy for unresectable non-early hepatocellular carcinoma (HCC). *Eur Radiol* 2006; 16: 661-669
- 11 Yamasaki T, Kimura T, Kurokawa F, Aoyama K, Ishikawa T, Tajima K, Yokoyama Y, Takami T, Omori K, Kawaguchi K, Tsuchiya M, Terai S, Sakaida I, Okita K. Percutaneous radiofrequency ablation with cooled electrodes combined with hepatic arterial balloon occlusion in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2005; 40: 171-178
- 12 Liem MS, Poon RT, Lo CM, Tso WK, Fan ST. Outcome of transarterial chemoembolization in patients with inoperable hepatocellular carcinoma eligible for radiofrequency ablation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4465-4471
- 13 Wissniowski TT, Hansler J, Neureiter D, Frieser M, Schaber S, Esslinger B, Voll R, Strobel D, Hahn EG, Schuppan D. Activation of tumor-specific T lymphocytes by radio-frequency ablation of the VX2 hepatoma in rabbits. *Cancer Res* 2003; 63: 6496-6500
- 14 van Duijnhoven FH, Rovers JP, Engelmann K, Krajina Z, Purkiss SF, Zoetmulder FA, Vogl TJ, Terpstra OT. Photodynamic therapy with 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin for colorectal liver metastases is safe and feasible: results from a phase I study. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 808-816
- 15 Yu HC, Moon JI, Jin ZW, Lee DY, Kim CY, Song CH, Cho BH. Effect of radiofrequency ablation of the liver on cell-mediated immunity in rats. *World J Surg* 2005; 29: 739-743

#### ■同行评价

本研究信息充足, 内容新颖, 符合伦理学要求, 具有一定的临床参考价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-06-08)



# 促凋亡因子PDCD5与Fas在肝癌及其癌旁组织中的表达

余康康, 刘顺爱, 李文凡, 沈冰, 兰孟东, 郎振为, 成军

## ■背景资料

程序化细胞死亡分子5(PDCD5), 是北京大学人类疾病基因研究中心于1998年克隆得到的新功能基因, 原名TFAR19. 多项研究表明, PDCD5促进多种细胞的凋亡, 与多种疾病的发生发展相关, 尤其在肿瘤组织中PDCD5表达减弱. 本文进行肝癌组织及其癌旁组织中PDCD5表达变化研究, 拟阐明PDCD5在肝癌发生发展中的作用及意义.

余康康, 兰州大学临床医学院 甘肃省兰州市 730000  
刘顺爱, 成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011  
李文凡, 甘肃省人民医院消化科 甘肃省兰州市 730000  
沈冰, 兰孟东, 郎振为, 北京地坛医院病理科 北京市 100011  
余康康, 在读硕士, 主要从事肝病发病机制的研究.  
北京市自然科学基金资助项目, No. 7042028  
北京市留学人员科技活动项目择优资助经费资助项目  
作者贡献分布: 余康康与刘顺爱对此文所作贡献均等; 此课题由刘顺爱, 李文凡, 及成军设计; 研究过程由余康康, 刘顺爱, 沈冰, 兰孟东及郎振为操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘顺爱提供; 数据分析由余康康与刘顺爱完成; 本论文写作由余康康与刘顺爱完成.  
通讯作者: 刘顺爱, 100011, 北京市东城区安定门外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. liusa1031@sina.com  
电话: 010-64211031-2358  
收稿日期: 2008-01-12 修回日期: 2008-04-25

## Elevated expression of PDCD5 and Fas in hepatocellular carcinoma and its adjacent tissues

Kang-Kang Yu, Shun-Ai Liu, Wen-Fan Li, Bing Shen, Meng-Dong Lan, Zhen-Wei Lang, Jun Cheng

Kang-Kang Yu, Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China  
Shun-Ai Liu, Jun-Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China  
Wen-Fan Li, Department of Gastroenterology, Gansu Province People Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China  
Bing Shen, Meng-Dong Lan, Zhen-Wei Lang, Department of Pathology, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Beijing City, No.7042028; and the Scientific and Technological foundation for distinguished returned overseas Chinese scholars, Beijing City

Correspondence to: Shun-Ai Liu, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Andingmenwai Avenue, Dongcheng District, Beijing 100011, China. liusa1031@sina.com

Received: 2008-01-12 Revised: 2008-04-25

## Abstract

**AIM:** To investigate expression of programmed cell death 5 (PDCD5) and Fas in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and its adjacent tissues and liver cirrhosis tissues and thereby to explore relationship between PDCD5 and HCC.

**METHODS:** Protein expression of PDCD5 and Fas from 40 HCC and its adjacent tissues (including 24 cases of liver cirrhosis, 16 cases of

chronic liver hepatitis) were analyzed using immunohistochemistry. Positive protein expression rates and intensity of PDCD5 and Fas were investigated under microscopy. Statistics were analyzed using Kruskal-Wallis H test and Spearman's Rank correlation coefficient.

**RESULTS:** There was PDCD5 negative expression in HCC and raised expression rate in HCC adjacent tissues. There were significant difference in PDCD5 expression among HCC group, HCC adjacent tissue group and cirrhosis, chronic hepatitis group ( $\chi^2 = 46.03$ ,  $P = 0.000$ ). The same significance between HCC and cirrhosis or chronic hepatitis was detected for Fas expression ( $\chi^2 = 24.45$ ,  $P = 0.000$ ). Correlation analysis showed that PDCD5 was positively correlated with Fas ( $r = 0.839$ ,  $P = 0.001$ ).

**CONCLUSION:** PDCD5 is an important apoptosis-regulating factor in hepatocellular carcinoma pathogenesis.

**Key Words:** Apoptosis; Programmed cell death 5; Fas; Hepatocellular carcinoma; Immunohistochemistry; Apoptosis-regulating factor

Yu KK, Liu SA, Li WF, Shen B, Lan MD, Lang ZW, Cheng J. Elevated expression of PDCD5 and Fas in hepatocellular carcinoma and its adjacent tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1820-1824

## 摘要

**目的:** 分析新凋亡促进因子-程序化细胞死亡分子5(programmed cell death 5, PDCD5)在肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生发展中的作用.

**方法:** 用免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)检测40例HCC及其癌旁组织(包括24例肝硬化和16例慢性肝炎)中的PDCD5和Fas蛋白表达. 用等级资料Kruskal-Wallis H检验方法进行统计学分析, 并用Spearman's等级资料的相关分析比较PDCD5和Fas的表达差异.

**结果:** PDCD5在肝癌组织中多呈阴性表达, 在

## ■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

癌旁肝组织中表达增加. 肝癌及其癌旁肝硬化肝炎各组间PDCD5表达具有显著性差异( $\chi^2 = 46.03$ ,  $P = 0.000$ ). Fas在肝癌组织及其癌旁肝硬化或慢性肝炎组织中的表达分布与PDCD5相似, 各组间Fas表达有显著性差异( $\chi^2 = 24.45$ ,  $P = 0.000$ ). PDCD5与Fas的相关性分析结果显示, 两者呈正相关( $r = 0.839$ ,  $P = 0.001$ ).

**结论:** PDCD5是HCC发生、发展过程中的一个重要凋亡调控因子.

**关键词:** 凋亡; 程序化细胞死亡分子5; Fas; 肝细胞癌; 免疫组织化学; 凋亡调控因子

余康康, 刘顺爱, 李文凡, 沈冰, 兰孟东, 郎振为, 成军. 促凋亡因子PDCD5与Fas在肝癌及其癌旁组织中的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1820-1824

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1820.asp>

## 0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国发病率及死亡率均较高的恶性肿瘤, 其形成是一个多因素、多阶段长期相互作用的过程. 研究表明, 细胞凋亡与肝癌的发生发展密切相关. PDCD5是具有我国自主知识产权的凋亡相关新基因, 原名TFAR19(TF-1 cell apoptosis-related gene 19)<sup>[1]</sup>, 后被国际人类基因命名委员会建议命名为PDCD5. PDCD5基因定位于染色体19q12-q13.1, cDNA全长为559 bp, 编码125个氨基酸. 多项研究表明, PDCD5分子在不同的种属之间高度保守, 提示他具有重要生物学功能的基因; PDCD5在人体多种组织中均有表达, 并促进多种细胞的凋亡. 目前已有报道PDCD5与多种疾病的发生发展相关<sup>[2-4]</sup>, 尤其在肿瘤组织中PDCD5表达减弱<sup>[5-8]</sup>, 但尚没有在大量肝炎、肝硬化及肝癌系列标本中的表达研究. 本文报道PDCD5和Fas在肝细胞癌及其癌旁组织中的表达, 通过PDCD5在其中的表达变化及其与Fas表达相关性分析, 拟阐明PDCD5在肝癌发生发展中的作用及意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2006-2007年北京地坛医院病理科肝癌组织标本40例, 其中包括高分化肝细胞癌4例; 中分化肝细胞癌26例; 低分化肝细胞癌10例. 癌旁组织是指离肝癌组织<1.5 cm的癌周围肝组织, 本文40例肝癌病例的癌旁组织包括肝硬化24例、慢性肝炎16例, 所有标本经过HE染色的病理诊断. 标本以蜡块形式保存, 实验前统一切成4

$\mu\text{m}$ 厚的连续石蜡切片. 小鼠抗人PDCD5 mAb由北京大学人类疾病基因研究中心提供; 小鼠抗人Fas mAb购自北京中杉金桥公司; 羊抗兔/鼠通用IgG-HRP和DAB显色液为DAKO公司产品.

**1.2 方法** 免疫组织化学实验采用EnVision二步法, 具体操作步骤如下: 石蜡切片逐级脱蜡入水, PBS洗后3%过氧化氢室温孵育10 min以消除内源性过氧化物酶的活性; PBS洗后用高压修复法进行抗原修复(PDCD5为pH6.0枸橼酸, Fas为pH9.0 Tris/EDTA); PBS洗后滴加1:150稀释的抗PDCD5 mAb或1:50稀释的抗Fas抗体, 置湿盒内4℃孵育过夜; 第2天室温复温30 min并PBS洗后, 滴加EnVision抗体工作液, 置湿盒内37℃孵育30 min; PBS洗后滴加新鲜配置的DAB显色液显色, 自来水冲洗终止显色; 苏木素复染、封片之后显微镜下判定结果. 以上PBS洗涤均为5 min $\times$ 3次; 每次实验设计阳性对照(已知阳性片)和阴性对照(PBS代替一抗). 每张片子分肿瘤部分及癌旁组织各随机取5个高倍视野, 每个视野计数100个细胞, 观察染色强度并计算阳性率. 结果按阳性细胞百分率(Y)分4级: Y=0为0; 0<Y $\leq$ 25%为1; 25%<Y $\leq$ 50%为2; Y>50%为3, 按阳性细胞染色强度(X)分4级: 无染色细胞为0; 淡黄色为1; 棕黄色为2; 棕褐色为3. 把阳性细胞百分率Y分数和阳性细胞染色强度X分数相加后得出阳性积分, 积分0分为阴性(-); 2分为弱阳性(+); 3-4分为阳性(++); 5-6分为强阳性(+++).

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件进行数据分析, 采用等级资料的Kruskal-Wallis H检验进行显著性分析, 采用Spearman等级相关分析进行相关性分析.

## 2 结果

**2.1 PDCD5在肝癌及癌旁肝硬化、肝炎组织中的表达** PDCD5的免疫组化结果显示, PDCD5在肝癌及癌旁肝硬化、肝炎组织中的肝细胞和部分浸润的淋巴细胞胞质内(在本文中淋巴细胞不算在结果之内), 阳性细胞以黄色、棕黄色及棕褐色细颗粒状均匀着色. PDCD5在肝癌组织中多呈阴性表达, 在癌旁肝组织中表达增加, 其中在癌旁肝炎组织中的表达细胞多呈均匀阳性, 而癌旁肝硬化组织多以假小叶为单位表达, 部分假小叶为均匀阳性, 而部分假小叶为全阴性. 肝癌细胞旁不典型性增生细胞(liver cell dysplasia LCD)-目前被认为是一种处于癌前不同演变阶段的异常增生的细胞群体, 其PDCD5呈点、

### ■研发前沿

肝细胞凋亡不仅与肿瘤的发生、发展有关, 而且与肿瘤的预后判定和治疗密切相关. PDCD5作为新的促凋亡因子, 其在肝细胞凋亡中所起作用及与其他凋亡相关基因的关系、以及能否作为新的肿瘤治疗靶点等, 是未来PDCD5的研究方向. PDCD5在肝癌的发病机制和肝癌生物治疗中的作用有待阐明.

### ■相关报道

已有报道PDCD5在髓性白血病、卵巢癌、宫颈癌、肾透明细胞癌和胃癌等肿瘤组织中表达均明显下调, 并随肿瘤的分化程度其表达递减.

## ■创新盘点

本研究比较PDCD5及Fas在肝癌组织及其癌旁组织中的表达变化,拟阐明肝癌的发病机制及PDCD5在其中的作用。

表 1 不同病理组织的肝细胞PDCD5和Fas的表达 (n, %)

	n	PDCD5				Fas			
		阴性	弱阳	阳性	强阳	阴性	弱阳	阳性	强阳
肝炎	16	4(25)	2(12)	7(44)	3(19)	5(31)	5(31)	4(25)	2(13)
肝硬化	24	1(4)	0	10(42)	13(54)	3(13)	2(8)	11(46)	8(33)
肿瘤	40	36(90)	0	3(7)	1(3)	30(75)	2(5)	5(13)	3(7)

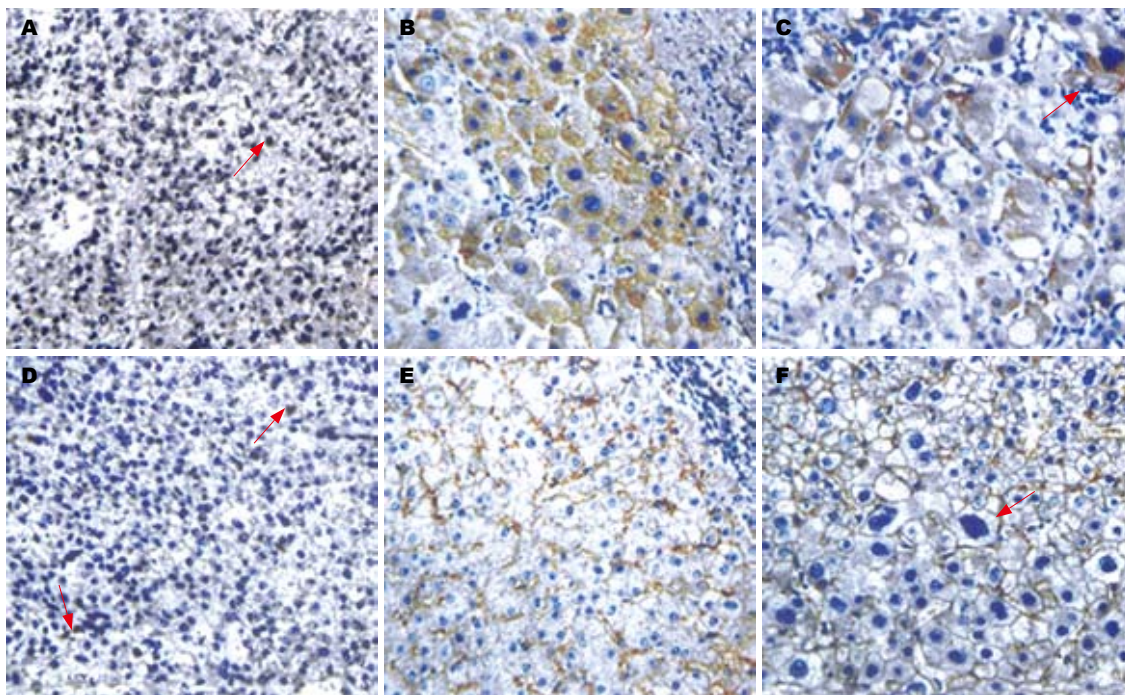


图 1 肝癌及其癌旁组织中PDCD5和Fas表达(免疫组化EnVision × 400). A: 肝癌组织PDCD5阴性表达(箭头所指肿瘤细胞间浸润的淋巴细胞); B: 癌旁慢性肝硬化组织PDCD5阳性表达; C: 癌旁LCD细胞PDCD5阳性表达(箭头指向多核LCD细胞); D: 肝癌Fas阴性表达(箭头所指肿瘤细胞间浸润的淋巴细胞); E: 癌旁肝硬化组织Fas阳性表达; F: 癌旁LCD细胞Fas阳性表达(箭头指向多核细胞)。

灶状强表达。各组织中的PDCD5表达见图1A-C。各组织中的PDCD5表达数据见表1。采用等级资料的Kruskal-Wallis H秩和检验统计结果表明,各组间PDCD5表达具有显著性差异( $\chi^2 = 46.03, P = 0.000$ ),并且,任意两组间PDCD5表达均有统计学意义,其中:肝癌与肝硬化之间 $\chi^2 = 41.19, P = 0.000$ ;肝癌和肝炎之间 $\chi^2 = 21.95, P = 0.000$ ;肝硬化和肝炎之间 $\chi^2 = 7.76, P < 0.005$ 。以上结果提示:PDCD5在肿瘤细胞中的表达相较于癌旁组织明显降低。进一步分析不同分化程度肝癌组织中PDCD5表达,表达阴性率分别为高分化肝癌75%(3/4);中分化肝癌88%(23/26);低分化肝癌100%(10/10),显示随着肿瘤组织分化程度的降低PDCD5的表达也降低,但没有统计学意义,有可能与标本量不多有关。

## 2.2 Fas在肝癌及癌旁肝硬化、肝炎组织中的表

达 Fas的免疫组化结果显示,Fas在肝癌及癌旁肝硬化、肝炎组织中的肝细胞和部分浸润的淋巴细胞细胞膜和胞质内,以细胞膜表达为主,阳性细胞呈现网格状(在本文中淋巴细胞不算在结果之内)。Fas表达的分布特点与PDCD5类似,癌旁肝硬化组织以假小叶为单位表达,部分假小叶Fas呈比较均匀表达阳性,部分假小叶Fas表达为全阴性。各组织中的Fas表达见图1D-F。等级资料的秩和检验统计结果表明,各组间Fas表达有显著性差异( $\chi^2 = 24.45, P = 0.000$ ),并且,任一两组间比较均有统计学意义,具体结果为:肝癌和肝硬化之间 $\chi^2 = 22.58, P = 0.000$ ;肝癌与肝炎之间 $\chi^2 = 6.86, P = 0.009$ ;肝炎和肝硬化之间 $\chi^2 = 5.64, P = 0.017$ (表1)。

## 2.3 PDCD5与Fas的相关性分析 肝癌及癌旁肝硬化、肝炎组织不同组间PDCD5与Fas表达Spear-



man等级相关分析结果显示, Spearman等级相关系数为 $r = 0.839$ ,  $P = 0.001$ , PDCD5与Fas的表达之间存在正相关性。

### 3 讨论

随着人类基因组计划的完成, 目前我国在人类功能基因研究领域已经从大规模cDNA测序转向细胞水平的功能研究、疾病相关性研究、相互作用蛋白的研究及蛋白质组学研究等, 并已经获得一批具有源头创新的成果。北京大学人类疾病基因研究中心重点开展细胞凋亡相关基因及新细胞因子基因的研究, 其中PDCD5是此中心克隆和研究的重要新基因<sup>[9]</sup>。近几年的研究资料表明, PDCD5是一个重要的细胞凋亡正调控基因, 与多种疾病的发生发展相关, 有可能成为上述疾病的辅助诊断标志或治疗靶点<sup>[10]</sup>。

原发性肝癌为我国常见恶性肿瘤之一, 其发生发展过程中, 凋亡起着至关重要的作用。细胞凋亡与增殖之间的平衡失调, 是引起肿瘤形成的重要机制之一<sup>[11]</sup>。凋亡不足, 清除携带变异基因的细胞减少并且在持续炎症环境下增生失调, 可以促使肿瘤的发生; 凋亡过度, 慢性凋亡的刺激因为引起组织频繁的再生也可诱发肿瘤; 另外, 肿瘤中免疫细胞凋亡增多也是肿瘤免疫逃避的机制之一<sup>[12-13]</sup>。不同病因造成的肝炎引起肝细胞不断破坏和肝细胞异常增殖反复发生, 使肝脏病变由肝炎经肝硬化再向肝癌演变。肝癌中的凋亡调控基因研究在阐明发病机制及寻找治疗靶点中具有重要意义。目前, 已经清楚Fas介导的凋亡在急性肝炎病毒的清除、肝炎的慢性化、纤维化及癌变的发生、发展中起着至关重要的作用<sup>[14-18]</sup>, Fas介导的细胞凋亡是清除肿瘤细胞的重要机制。肝癌细胞上的Fas表达减少, 或sFas竞争性地与FasL结合, 阻断了Fas/FasL介导的细胞凋亡, 引起肝细胞凋亡耐受, 导致肝癌的发生。我们在本文进行了新的促凋亡因子PDCD5和Fas在肝癌及其癌旁组织中的表达研究并进行了两者的比较分析。

我们的实验结果显示, PDCD5与Fas在肝癌及其癌旁组织中的表达类似, 两者在肝癌细胞中的表达与其癌旁肝细胞相比, 呈明显减弱甚至消失, 统计学结果显示两者呈正相关。本次实验中同时观察到, 部分肝癌组织中浸润的淋巴细胞也表达PDCD5和Fas, 有可能PDCD5也参与肿瘤细胞诱导免疫细胞凋亡而逃避免疫清除。在我们的结果中, LCD细胞的PDCD5表达与癌

旁其他肝细胞相比有所不同。一般, 癌旁肝炎、肝硬化多为片状阳性或弱阳性表达, 而LCD细胞上PDCD5阳性细胞数量减少, 但阳性信号增强, 呈点、灶状强表达。虽然目前关于癌旁LCD是否为癌前病变仍有争议, 但至少由HBV病毒引起的LCD与肝癌的形成有密切关系<sup>[19-21]</sup>。LCD细胞显示PDCD5表达降低是否说明, 这些发生凋亡抑制的LCD细胞最终能发展为肿瘤细胞, 仍有待进一步证实。总之, PDCD5有可能与Fas一样, 在肝炎-肝硬化-肝癌的发展演变中发挥重要作用。

我们除了进行肝癌及其癌旁组织中的PDCD5表达研究外, 已进一步进行了PDCD5在HBV感染后携带者、急性肝炎、慢性炎症、肝硬化、肝癌患者肝组织中的表达研究(未发表资料), 这些结果更有可能阐明PDCD5在肿瘤发生发展中的意义及其肝炎-肝硬化-肝癌演变的机制。有关PDCD5在肝细胞中表达下调的机制有待进一步进行研究。

**致谢:**衷心感谢北京大学人类疾病基因研究中心马大龙教授及其他各位老师和北京地坛医院病理科各位工作人员给予本研究的大力支持。

### 4 参考文献

- 1 Liu H, Wang Y, Zhang Y, Song Q, Di C, Chen G, Tang J, Ma D. TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 203-210
- 2 Spinola M, Meyer P, Kammerer S, Falvella FS, Boettger MB, Hoyal CR, Pignatiello C, Fischer R, Roth RB, Pastorino U, Haeussinger K, Nelson MR, Dierkesmann R, Dragani TA, Braun A. Association of the PDCD5 locus with lung cancer risk and prognosis in smokers. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1672-1678
- 3 Liu ZH, Zhang D, Li KM, Liao QP. Expression of PDCD5 in tissues of normal cervix, CIN I-III and cervical cancer. *Beijing Daxue Xuebao* 2004; 36: 407-410
- 4 杜颖, 洪天配. TF-1细胞凋亡相关基因19与甲状腺肿瘤之间关系的初步探讨. *中华内科杂志* 2003; 42: 492-494
- 5 熊林, 谭万龙, 郁兆存, 吴元东, 黄河, 赵国志, 朱文辉, 郑少斌. TFAR19(PDCD5)蛋白在正常肾、肾透明细胞癌组织及正常膀胱、膀胱癌组织中的表达. *南方医科大学学报* 2006; 26: 805-809
- 6 Yang YH, Zhao M, Li WM, Lu YY, Chen YY, Kang B, Lu YY. Expression of programmed cell death 5 gene involves in regulation of apoptosis in gastric tumor cells. *Apoptosis* 2006; 11: 993-1001
- 7 Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, Zhang X, Xiao HS, Qu J, Liu F, Huang QH, Cheng ZH, Li NG, Du JJ, Hu W, Shen KT, Lu G, Fu G, Zhong M, Xu SH, Gu WY, Huang

### ■应用要点

PDCD5可望成为辅助检测肝脏病理组织癌变的标志物, 并有可能成为判断肝癌的预后和生存时间的指标之一。

## ■同行评价

本文对临床医师了解PDCD5的功能及其病理学意义有一定意义,但学术价值一般。

- W, Zhao XT, Hu GX, Gu JR, Chen Z, Han ZG. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 15089-15094
- 8 Ruan GR, Qin YZ, Chen SS, Li JL, Ma X, Chang Y, Wang YZ, Fu JY, Liu YR. Abnormal expression of the programmed cell death 5 gene in acute and chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2006; 30: 1159-1165
- 9 马大龙. 我国人类功能基因研究进展. 北京大学学报(医学版) 2003; 35: 337-339
- 10 赵杰, 张秀军, 赵静, 赵丽娜, 刘鹏. PDCD5基因及其与疾病的关系. 生命的化学 2006; 26: 138-140
- 11 Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005; 54: 1024-1033
- 12 Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996; 2: 1361-1366
- 13 Fukuzawa K, Takahashi K, Furuta K, Tagaya T, Ishikawa T, Wada K, Omoto Y, Koji T, Kakumu S. Expression of fas/fas ligand (fasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC). *J Gastroenterol* 2001; 36: 681-688
- 14 Nakamoto Y, Kaneko S, Fan H, Momoi T, Tsutsui H, Nakanishi K, Kobayashi K, Suda T. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. *J Exp Med* 2002; 196: 1105-1111
- 15 Oksuz M, Akkiz H, Isiksal YF, Saydaoglu G, Serin M, Kayaselcuk F, Abayli B, Tuncer I. Expression of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis B and C. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 341-345
- 16 Kiyici M, Gurel S, Budak F, Dolar E, Gulten M, Nak SG, Memik F. Fas antigen (CD95) expression and apoptosis in hepatocytes of patients with chronic viral hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1079-1084
- 17 Chen J, Su XS, Jiang YF, Gong GZ, Zheng YH, Li GY. Transfection of apoptosis related gene Fas ligand in human hepatocellular carcinoma cells and its significance in apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2653-2655
- 18 Kawada N. Human hepatic stellate cells are resistant to apoptosis: implications for human fibrogenic liver disease. *Gut* 2006; 55: 1073-1074
- 19 Park YN, Roncalli M. Large liver cell dysplasia: a controversial entity. *J Hepatol* 2006; 45: 734-743
- 20 Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver Int* 2005; 25: 16-27
- 21 Koo JS, Seong JK, Park C, Yu DY, Oh BK, Oh SH, Park YN. Large liver cell dysplasia in hepatitis B virus x transgenic mouse liver and human chronic hepatitis B virus-infected liver. *Intervirology* 2005; 48: 16-22

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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。(常务副总编辑: 张海宁 2008-06-08)



# 大承气汤辅助治疗反复发作性急性胰腺炎25例

赵宏智

赵宏智, 中国人民解放军军医进修学院 北京市 100853  
通讯作者: 赵宏智, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军军医进修学院. zhzhfp@163bj.com  
电话: 010-66399258 传真: 010-66398353  
收稿日期: 2008-04-03 修回日期: 2008-05-08

## Curative effect of Dachengqi decoction as an adjunct therapy on recurrent acute pancreatitis: an analysis of 25 cases

Hong-Zhi Zhao

Hong-Zhi Zhao, Postgraduate Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China  
Correspondence to: Hong-Zhi Zhao, Postgraduate Medical School of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. zhzhfp@163bj.com  
Received: 2008-04-03 Revised: 2008-05-08

### Abstract

**AIM:** To evaluate the therapeutic effects of Dachengqi decoction as an adjunct therapy on recurrent acute pancreatitis.

**METHODS:** Fifty patients with recurrent acute pancreatitis were randomly divided into control group ( $n = 25$ ) and treatment group ( $n = 25$ ). Control group received routine comprehensive treatment only while treatment group received additional Dachengqi decoction as an adjunct therapy. Clinical manifestations such as the acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II) score, serum amylase, abdominal pain on day 1, 3, 5 were assessed and analyzed in addition to duration of fasting and hospitalization, incidence of complications and recurrence rate of 1-year follow-up.

**RESULTS:** Compared with the control group, (APACHE II) score on day 3 ( $6.03 \pm 0.36$  vs  $9.07 \pm 0.52$ ,  $P < 0.05$ ) and leukocyte count ( $10.37 \pm 1.22 \times 10^9$  vs  $14.91 \pm 1.41 \times 10^9$ ,  $P < 0.05$ ), serum amylase ( $57 \pm 19$  vs  $101 \pm 22$ ,  $P < 0.05$ ) on day 5 were significantly decreased; the time of fasting ( $6.1 \pm 1.1$  vs  $10.4 \pm 1.5$ ,  $P < 0.05$ ), abdominal pain ( $3.3 \pm 1.2$  vs  $5.4 \pm 1.4$ ,  $P < 0.05$ ), abdominal distention

( $4.2 \pm 2.5$  vs  $7.1 \pm 2.2$ ,  $P < 0.05$ ) and duration of hospitalization ( $11.6 \pm 3.3$  vs  $19.7 \pm 4.2$ ,  $P < 0.05$ ), the incidence of complications (12% vs 24%,  $P < 0.05$ ) and relapse rate of one-year follow-up (24% vs 52%,  $P < 0.05$ ) were significantly reduced in treatment group.

**CONCLUSION:** Dachengqi decoction has some accessory effect for the patients with recurrent acute pancreatitis.

**Key Words:** Dachengqi decoction; Recurrent attacks acute pancreatitis; Adjutant therapy

Zhao HZ. Curative effect of Dachengqi decoction as an adjunct therapy on recurrent acute pancreatitis: an analysis of 25 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1825-1827

### 摘要

**目的:** 探讨大承气汤辅助治疗反复发作性急性胰腺炎的临床疗效。

**方法:** 反复发作性胰腺炎患者50例, 随机分成2组: 治疗组和对照组( $n = 25$ )。对照组常规综合对症治疗, 治疗组在常规综合对症治疗的基础上给予大承气汤辅助治疗。观察2组患者治疗第1、3、5天APACHE II评分、血清淀粉酶、腹痛和腹胀等主要临床症状, 以及禁食和住院天数、并发症发生率及随访1年复发率。

**结果:** 与对照组相比, 治疗组治疗后第3天APACHE II评分、第5天白细胞计数和血清淀粉酶水平均明显降低( $6.03 \pm 0.36$  vs  $9.07 \pm 0.52$ ,  $10.37 \pm 1.22 \times 10^9$  vs  $14.91 \pm 1.41 \times 10^9$ ,  $57 \pm 19$  vs  $101 \pm 22$ , 均 $P < 0.05$ ), 禁食、腹痛、腹胀及住院天数均明显缩短( $6.1 \pm 1.1$  vs  $10.4 \pm 1.5$ ,  $3.3 \pm 1.2$  vs  $5.4 \pm 1.4$ ,  $4.2 \pm 2.5$  vs  $7.1 \pm 2.2$ ,  $11.6 \pm 3.3$  vs  $19.7 \pm 4.2$ , 均 $P < 0.05$ ), 并发症发生率和1年复发率显著降低(12% vs 24%, 24% vs 52%, 均 $P < 0.05$ )。

**结论:** 大承气汤对反复发作性急性胰腺炎的治疗有一定的辅助作用。

**关键词:** 大承气汤; 反复发作性急性胰腺炎; 辅助治疗

### ■背景资料

急性胰腺炎是临床常见的急腹症之一, 随着急性胰腺炎发病率的逐年上升, 对急性胰腺炎尤其是重症急性胰腺炎的治疗也就成为临床医师的研究热点。

### ■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

## ■研究前沿

急性胰腺炎反复发作的发病机制及中西医结合治疗的研究是目前研究热点。中西医结合治疗重症急性胰腺炎可使病情较快控制, 症状较快缓解, 住院天数明显缩短。中西医结合治疗方法亟待进一步深入研究及统一。

赵宏智. 大承气汤辅助治疗反复发作性急性胰腺炎25例. 世界华人消化杂志 2008; 16(16): 1825-1827

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1825.asp>

## 0 引言

急性复发性胰腺炎是指急性胰腺炎反复发作, 而每次发作缓解后不遗留胰腺功能或组织学改变的胰腺炎症。该病具有反复发作、无明确影像学改变特点, 且一般每次发作时间较短, 能完全恢复, 缓解期胰功能试验正常<sup>[1-2]</sup>。由于该病的发病机制尚未完全阐明, 故治疗方法仍有待于探索。我们早期应用大承气汤辅助治疗反复发作性急性胰腺炎取得良好疗效, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 病例选自我院2003-10/2007-04收治的经临床确诊为反复发作性急性胰腺炎<sup>[1]</sup>的患者50例, 其中男性35例, 女性15例, 年龄21-72(平均54±22)岁, APACHE II评分8-12分, 其中胆源性27例, 酒精性17例, 不明原因6例。

**1.2 方法** 50例患者按照简单随机抽样法分为治疗组( $n = 25$ )和对照组( $n = 25$ )。两组患者性别、年龄、病因及入院时APACHE II评分等一般临床情况无显著性差异, 具有可比性。所有患者入院后均给予常规综合对症治疗, 包括禁食、胃肠减压、抑制胰酶分泌, 解痉止痛, 维持水电解质平衡、补充血容量、全静脉营养、抗炎等; 治疗组: 在上述的基础上, 给予大承气汤100 mL胃管注入, 3次/d; 同时给予大承气汤100 mL保留灌肠, 1-2次/d; 连续用4 wk。观察两组患者治疗第1、3、5天APACHE II评分、血清淀粉酶、血尿素氮、血钙、血糖的变化、腹痛、腹胀等主要临床症状改善情况及禁食和住院天数、并发症发生率及随访1年复发率。

**统计学处理** 所有数据均采用mean±SD表示, 用SPSS12.0统计软件进行统计学分析, 计量资料用 $t$ 检验或 $t'$ 检验, 计数资料用 $\chi^2$ 检验或校正 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组患者治疗前后APACHE II评分比较** 两组患者第1天APACHE II评分比较, 无显著性差异。对照组治疗后第5天APACHE II评分明显低于第1天; 治疗组第3天和第5天APACHE II评分均显著降低( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 治疗组第3天APACHE II评分下降更为明显( $P < 0.05$ , 表1)。

**2.2 两组患者治疗过程中实验室检查指标的比**

表 1 两组患者治疗前后APACHE II 评分比较 ( $n = 25$ )

分组	第1天	第3天	第5天
治疗组	10.32 ± 1.01	6.03 ± 0.36 <sup>ac</sup>	5.59 ± 0.23 <sup>a</sup>
对照组	10.41 ± 1.05	9.07 ± 0.52	6.01 ± 0.25 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 第1天; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

较与第1天相比, 各组患者治疗后第3天和第5天血清淀粉酶、血尿素氮、血糖和白细胞计数明显降低( $P < 0.05$ ), 血钙升高( $P < 0.05$ ); 与对照组相比, 治疗组治疗后第5天白细胞计数和血清淀粉酶明显下降( $P < 0.05$ , 表2)。

**2.3 两组治疗后疗效比较** 与对照组相比, 治疗组患者经大承气汤辅助治疗后, 禁食、腹痛、腹胀及住院天数均明显缩短( $P < 0.05$ ), 并发症(休克、ARDS、肾衰、胰性脑病及上消化道出血等)发生率和1年复发率显著降低( $P < 0.05$ ), 差异具有统计学意义(表3)。

## 3 讨论

急性胰腺炎反复发作的发病机制至今未能完全阐明, 一般认为, 高脂血症、胆道结石、酗酒是引起急性胰腺炎反复发作的重要诱因, 而胆道水肿、梗阻和感染是引起胰腺炎反复发作的直接重要原因<sup>[1-4]</sup>。除传统的胰酶在胰腺内被激活, 引起自身消化外, 胰腺缺血再灌注后自由基水平升高, 钙离子向细胞内流动, 多种细胞因子、血管活性物质对胰腺细胞的损伤等均参与了该病的发生、发展<sup>[5-7]</sup>。促进肠道正常蠕动, 消除腹胀, 减轻肠道淤积, 增加肠道黏膜的抵抗力, 减少肠道细菌移位, 保证胆汁、胰液的引流通畅, 控制肠道、胆道炎症及防止并发症等, 已成为治疗急性胰腺炎的重要措施。大承气汤以大黄、厚朴、枳实、芒硝为主药, 为疏肝利胆、活血化瘀之中药, 可有利于十二指肠炎症、水肿的消退, 促进细小结石和胆汁胰液的排除, 降低胰胆管内压<sup>[8-9]</sup>; 除了能抑制胰酶的分泌外, 还具有导泻的作用, 可提高肠道跨膜电位, 兴奋胃肠道平滑肌, 促进胃肠蠕动, 解除肠麻痹, 达到清除肠道内毒素和腐败物质的作用。胰腺炎反复发作时, 肠道屏障功能受损导致肠道内毒素的移位, 成为全身炎症介质和细胞因子大量表达、释放的始动因素, 从而诱发全身炎症反应, 严重者可导致多脏器功能不全<sup>[10]</sup>。而大承气汤可降低内毒素所致的肠黏膜通透性增高, 保护肠黏膜屏障功能, 抑制肠道细菌移位维持肠道菌

## ■应用要点

大承气汤可降低内毒素所致的肠黏膜通透性增高, 保护肠黏膜屏障功能, 抑制肠道细菌移位维持肠道菌群平衡, 避免胰腺感染, 改善预后。

表 2 两组血清淀粉酶、血尿素氮、血钙、血糖和白细胞计数的比较 ( $n = 25$ )

分组		血清淀粉酶(U/L)	血尿素氮(mmol/L)	血钙(mmol/L)	血糖(mmol/L)	白细胞( $\times 10^9$ )
治疗组	第1天	538 ± 143	19.67 ± 3.07	1.41 ± 0.23	16.65 ± 2.14	23.29 ± 3.27
	第3天	302 ± 142 <sup>a</sup>	11.32 ± 2.53 <sup>a</sup>	1.51 ± 0.23 <sup>a</sup>	13.59 ± 1.9 <sup>a</sup>	17.67 ± 3.19 <sup>a</sup>
	第5天	57 ± 19 <sup>ac</sup>	6.41 ± 1.93 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.15 <sup>a</sup>	7.42 ± 2.0 <sup>a</sup>	10.37 ± 1.22 <sup>ac</sup>
对照组	第1天	542 ± 191	18.70 ± 2.20	1.50 ± 0.30	17.05 ± 2.02	22.05 ± 2.70
	第3天	323 ± 151 <sup>a</sup>	11.35 ± 3.50 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.24 <sup>a</sup>	14.10 ± 1.2 <sup>a</sup>	17.91 ± 4.15 <sup>a</sup>
	第5天	101 ± 22 <sup>a</sup>	7.12 ± 2.01 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.11 <sup>a</sup>	7.34 ± 1.60 <sup>a</sup>	14.91 ± 1.41 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 第1天; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 对照组(第1、3、5天).

表 3 两组治疗后疗效比较 ( $n = 25$ )

分组	禁食(d)	并发症发生率(%)	住院天数(d)	1年复发率(%)	腹痛(d)	腹胀(d)
治疗组	6.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	3(12) <sup>a</sup>	11.6 ± 3.3 <sup>a</sup>	6(24) <sup>a</sup>	3.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	4.2 ± 2.5 <sup>a</sup>
对照组	10.4 ± 1.5	6(24)	19.7 ± 4.2	13(52)	5.4 ± 1.4	7.1 ± 2.2

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

群平衡, 对抗肠源性感染导致的“二次打击”, 通过促进肠运动, 能防治细菌移位, 避免胰腺感染, 改善预后<sup>[11-12]</sup>. 我们通过临床观察发现, 使用大承气汤辅助治疗的反复发作性急性胰腺炎患者后, 其APACHE II评分下降速度较传统治疗快, 提示大承气汤辅助治疗可使患者病情严重程度迅速降低; 通过观察其治疗过程中的各项实验室指标后发现, 与传统治疗组相比, 大承气汤辅助治疗后第5天白细胞计数和血清淀粉酶下降更为明显, 进一步证明了大承气汤辅助治疗的有效性; 此外, 患者经大承气汤辅助治疗后, 禁食、腹痛、腹胀及住院天数均明显缩短, 并发症发生率和1年复发率也显著降低, 说明大承气汤对反复发作性急性胰腺炎的治疗确实有一定的辅助作用, 对降低其复发率、改善预后具有重要价值.

#### 4 参考文献

- Testoni PA. Recurrent acute pancreatitis: from the editor. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 994
- Delhay M, Matos C, Arvanitakis M, Deviere J. Pancreatic ductal system obstruction and acute recurrent pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1027-1033
- McLoughlin MT, Mitchell RM. Sphincter of Oddi dysfunction and pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6333-6343
- Gan SI, Edwards AL, Symonds CJ, Beck PL. Hypertriglyceridemia-induced pancreatitis: A case-based review. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7197-7202
- 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 417-421
- 韩德五. 肠源性内毒素血症在胰腺炎发病中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2825-2829
- 刘晓臣, 彭燕. 肠屏障功能障碍与重症急性胰腺炎. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3131-3135
- 周国芳. 大黄、芒硝在重症急性胰腺炎中的应用体会. *中国临床医生* 2005; 1: 51-52
- 黄阿方, 张鸣杰, 张国雷. 大承气汤对急性胰腺炎患者腹腔内压的影响. *中国中西医结合外科杂志* 2008; 1: 6-8
- 鲍兵. 大承气汤对重症急性胰腺炎细胞因子水平的影响. *中国急救医学* 2006; 1: 69-70
- 俞勇, 张立, 蔡乾荣, 徐烨. 大承气汤空肠管灌注治疗急性胰腺炎疗效观察. *浙江中医杂志* 2006; 8: 49-51
- 阮洁明, 沈跃建, 莫耘松, 白玉芬. 大承气汤加味灌肠治疗急性胰腺炎肠麻痹36例. *中国中医急症* 2006; 11: 104

编辑 李军亮 电编 何基才

#### 同行评价

本研究具有一定的临床参考价值, 但学术价值一般.

# 趋化因子受体CCR7在结直肠癌中的异常表达

张义侠, 赵成海, 张海鹏

## ■背景资料

近年研究发现, 肿瘤细胞表面可表达趋化因子受体。肿瘤细胞在部分趋化物质的作用下, 可出现定向的趋化运动, 并导致肿瘤出现转移。

张义侠, 中国医科大学附属第一医院超声诊断科 辽宁省沈阳市 110001

赵成海, 张海鹏, 中国医科大学基础医学院病理生理教研室 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 此课题由张义侠, 赵成海及张海鹏设计; 研究过程由张义侠与赵成海操作完成; 数据分析由张义侠完成; 本论文写作由张义侠完成。

通讯作者: 张义侠, 110001, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院超声诊断科. dennywy@21cn.com  
电话: 024-23256666-5308

收稿日期: 2008-02-20 修回日期: 2008-04-01

## Aberrant expression of chemokine receptor 7 in colorectal cancer

Yi-Xia Zhang, Cheng-Hai Zhao, Hai-Peng Zhang

Yi-Xia Zhang, Department of Ultrasonic Diagnosis, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Cheng-Hai Zhao, Hai-Peng Zhang, Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yi-Xia Zhang, Department of Ultrasonic Diagnostic, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing Northern Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. dennywy@21cn.com

Received: 2008-02-20 Revised: 2008-04-01

## Abstract

**AIM:** To determine expression level of chemokine receptor 7 (CCR7) and explore its role in colorectal tumor pathogenesis.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect CCR7 protein in specimens. Expression of CCR7 mRNA was determined using reverse transcription PCR (RT-PCR). And Western blotting was used to detect CCR7 protein in colon cancer cells.

**RESULTS:** CCR7 mRNA expression was found in 45 colorectal cancer specimens and 12 cancer-adjacent normal tissues ( $\chi^2 = 34.44$ ,  $P < 0.01$ ). CCR7 protein expression was found in 34 colorectal cancer specimens and 6 cancer-adjacent normal tissues ( $\chi^2 = 28.51$ ,  $P < 0.01$ ). CCR7 mRNA and protein were expressed highly in colon cancer cell line SW-480, but lowly in HT-29.

## ■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

**CONCLUSION:** CCR7 is involved in colorectal cancer pathogenesis and its expression in metastasis.

**Key Words:** Colorectal cancer; Chemokine receptor; Chemokine receptor 7; Pathogenesis

Zhang YX, Zhao CH, Zhang HP. Aberrant expression of chemokine receptor 7 in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(16): 1828-1831

## 摘要

**目的:** 检测趋化因子受体CCR7在结直肠癌中的表达状态, 探讨CCR7在结直肠癌发病中的作用。

**方法:** 采用免疫组化检测标本中CCR7蛋白表达, 逆转录PCR(RT-PCR)检测CCR7 mRNA表达, Western blotting检测结肠癌细胞CCR7蛋白表达。

**结果:** 45例结直肠癌组织标本检出CCR7 mRNA表达, 而其相应的癌旁组织中12例检出( $\chi^2 = 34.44$ ,  $P < 0.01$ )。34例结直肠癌组织标本检出CCR7蛋白表达, 其相应的癌旁组织中, 则有6例检出( $\chi^2 = 28.51$ ,  $P < 0.01$ )。结肠癌细胞SW-480中CCR7 mRNA和蛋白表达显著, 而在HT-29中表达较弱。

**结论:** CCR7参与结直肠癌的发病过程, 其表达与结直肠癌转移有关。

**关键词:** 结直肠癌; 趋化因子受体; CCR7; 转移

张义侠, 赵成海, 张海鹏. 趋化因子受体CCR7在结直肠癌中的异常表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16(16): 1828-1831

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1828.asp>

## 0 引言

趋化因子受体是7次跨膜受体, 其家族根据氨基酸序列可分为4种类型, 即CR, CCR, CXCR和CX3CR。由于白细胞表面能够表达趋化因子受体, 因此在趋化因子的作用下, 白细胞可发生定向的趋化运动, 参与炎症的发展过程。近些年研究发现, 肿瘤细胞表面可表达趋化因子受体。这



些肿瘤细胞在部分趋化物质的作用下, 可出现定向的趋化运动, 并导致肿瘤出现转移. 目前研究显示趋化因子受体CXCR4<sup>[1-4]</sup>和CCR7<sup>[5-8]</sup>在多种肿瘤中存在过度表达, 表明这些趋化因子受体参与了肿瘤的发生发展过程<sup>[9]</sup>. 本文对结直肠癌中CCR7的表达情况进行检测, 并对其与结直肠癌临床特征之间的相关性进行分析, 以探讨CCR7在结直肠癌发病机制中的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 结直肠癌及相应的癌旁正常组织标本各64例, 均来自于中国医科大学附属第一医院. 标本获取后即冷冻于液氮之中, 并保存在-80℃条件下备用. 采用HE染色确定肿瘤标本主要由肿瘤组织构成, 癌旁正常组织没有肿瘤细胞浸润. 人类结肠癌细胞系SW-480和HT-29购自于南京凯基(KeyGen)生物科技发展公司, 培养于RPMI 1640培养基中, 其中含有100 mL/L胎牛血清, 青霉素( $1 \times 10^5$  IU/L)及链霉素(100 mg/L), 于37℃下置于含有50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中.

### 1.2 方法

1.2.1 RNA提取和逆转录PCR反应: 采用RNAiso试剂(TaKaRa公司)进行RNA提取, 具体步骤参照其说明书进行. 采用随机9引物和AMV逆转录酶进行逆转录反应. 反应体系共10 μL, 逆转录反应条件: 30℃ 10 min; 42℃ 25 min; 99℃ 5 min; 5℃ 5 min, 共1个循环. PCR总反应体系40 μL, 反应条件为: 94℃ 2 min, 1个循环. 94℃ 30 s; 60℃ 30 s; 72℃ 2 min, 共30个循环. CCR7基因引物序列参考文献[10].

1.2.2 免疫组化染色: 冰冻切片在室温下风扇吹干. 采用40 g/L多聚甲醛固定30 min. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1份加纯甲醇50份混合, 室温浸泡30 min, 以灭活内源性过氧化物酶. 滴加50 g/L BSA封闭液, 室温下20 min. 滴加多克隆CCR7抗体(武汉博士得公司), 20℃下2 h. 滴加生物素化山羊抗小鼠IgG, 20-37℃下20 min. 滴加试剂SABC, 20-37℃下20 min. DAB显色, 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜观察.

1.2.3 Western blot: 使用裂解液裂解细胞, 收集样品蛋白. 取蛋白20 μg, 加入适量浓缩的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 沸水浴加热3-5 min, 以充分变性蛋白. 冷却到室温后, 把蛋白样品直接上样到SDS-PAGE胶加样孔内, 进行凝胶电泳. 常规转膜. 将膜洗涤后, 用真空泵吸净洗涤液. 加入封闭液, 4℃过夜. 按1:1000稀释CCR7多

克隆抗体. 用真空泵吸净封闭液, 加入一抗. 4℃孵育过夜. 按1:1000稀释加辣根过氧化物酶标记兔抗羊Ⅱ抗. 吸净洗涤液以后, 加入二抗, 4℃孵育1 h.

**统计学处理** 肿瘤组织与癌旁正常组织之间比较采用卡方检验, CCR7蛋白表达与患者临床病理特征之间的相关性采用Fisher's exact检验分析.  $P < 0.05$ 为有显著性差异.

## 2 结果

2.1 CCR7在结直肠癌及癌旁正常组织标本中的表达 采用RT-PCR技术对肿瘤标本和癌旁正常组织标本CCR7 mRNA表达情况进行检测, 在64例结直肠癌组织标本中, 有45例(70.3%)检出CCR7 mRNA表达. 在其相应的癌旁组织中, 则有12例(18.8%)检出CCR7 mRNA表达, 两者差异显著( $\chi^2 = 34.44$ ,  $P < 0.01$ ). 采用免疫组织化学技术对肿瘤标本和癌旁正常组织标本CCR7蛋白表达情况进行检测, 显示在64例结直肠癌组织标本中, 有34例(53.1%)检出CCR7蛋白表达. 在其相应的癌旁组织中, 则有6例(9.4%)检出CCR7蛋白表达, 两者差异显著( $\chi^2 = 28.51$ ,  $P < 0.01$ ).

2.2 CCR7蛋白表达与结直肠癌临床病理特征之间的相关性 采用Fisher's检验, 我们对CCR7表达与结直肠癌患者的临床病理特征之间的相关性进行分析. 按诊断时年龄进行年龄分组: 大于50岁, 小于等于50岁; 肿瘤大小以直径大于3 cm,  $\leq 3$  cm. 淋巴结转移状况按是否有转移进行分组. 在肿瘤分期上, T1和T2分为一组, T3和T4分为一组. 结果显示, CCR7表达与患者年龄、性别、肿瘤大小均无相关性, 而与肿瘤分期( $P = 0.01$ )、淋巴结转移情况( $P = 0.01$ )具有相关性(表1).

2.3 CCR7在结肠癌细胞系中的表达 采用RT-PCR技术对结肠癌细胞系SW-480和HT-29 CCR7 mRNA表达情况进行检测. 结果显示在SW-480中CCR7 mRNA表达显著, 而在HT-29表达较弱(图1A). 采用Western blot技术对结肠癌细胞系SW-480和HT-29 CCR7蛋白表达情况进行检测. 结果显示在SW-480中CCR7蛋白表达显著, 而在HT-29表达较弱(图1B). CCR7蛋白表达结果与mRNA表达结果一致.

## 3 讨论

结直肠癌是人类常见的肿瘤之一, 在西方国家一直具有较高的发病率和致死率. 结直肠癌的发病主要与环境因素和遗传因素有关. 低叶酸

### ■创新盘点

本文检测结直肠癌中CCR7的表达情况, 并对其与结直肠癌临床特征之间的相关性进行了分析.



## ■应用要点

本研究提示CCR7在结直肠癌发生及转移中起到一定的作用, 对这部分肿瘤的基因治疗提供帮助。

表 1 结直肠癌患者CCR7蛋白表达与临床病理特征的关系

因素	分类	n	CCR7(+)	P
性别	男	38	20	0.2
	女	26	14	
年龄	>50	42	22	0.21
	≤50	22	12	
分期	T1与T2	30	11	0.01
	T3与T4	34	23	
淋巴结	N0	29	10	0.01
转移	N1与N2	35	24	
肿瘤大小	>3 cm	36	18	0.17
	≤3 cm	28	16	

盐、低蔬菜、高脂、高红肉饮食、吸烟、饮酒及缺乏运动等都是结直肠癌的风险因素。近几年来, 随着研究的深入, 目前普遍认为绝大多数结直肠癌由腺瘤转化而来。在腺瘤形成及向结直肠癌转化的过程中, 涉及到多重基因突变或表达改变, 其中包括抑癌基因失活和原癌基因激活等。这些基因表达改变导致细胞增殖过度 and 凋亡减弱, 从而导致细胞出现失控性生长。同时, 在研究中发现, 这些肿瘤细胞表面常常出现了部分趋化因子受体的过度表达, 提示这些趋化因子受体参与结直肠癌的发生发展过程。

趋化因子受体家族根据氨基酸序列可分为4种类型, 即CR, CCR, CXCR和CX3CR。白细胞对某种特殊趋化因子的反应能力依赖于其细胞表面所表达的趋化因子受体。在趋化因子受体作用下, 白细胞向趋化因子所在部位进行运动, 参与炎症的发展过程。近些年研究发现, 肿瘤细胞表面亦可表达趋化因子受体, 这些受体包括CXCR4<sup>[9-12]</sup>、CCR7<sup>[13]</sup>、CXCR3<sup>[14-15]</sup>、CCR10<sup>[16]</sup>、CCR9<sup>[17-18]</sup>、CCR4<sup>[19]</sup>和CCR3<sup>[20]</sup>等。其中CXCR4的研究最为广泛, 其已被发现参与20多种肿瘤的发病过程。研究显示CCL21(CCR7配体)和CXCL12(CXCR4配体)在淋巴结、肺和肝脏等组织中高度表达, 故表达CCR7和CXCR4的肿瘤常常转移到这些部位。

由于趋化因子受体在结直肠癌发病中的作用, 目前仍缺乏足够的研究。我们对CCR7在结直肠癌中的表达情况进行研究。RT-PCR检测结果显示在64例结直肠癌组织标本中, 70.3%检出CCR7 mRNA表达。而在其相应的癌旁组织中, 则有18.8%检出CCR7 mRNA表达。CCR7在结直肠癌组织中的表达频率显著高于癌旁正常组织。免疫组织化学检测结果显示在64例结直肠癌组

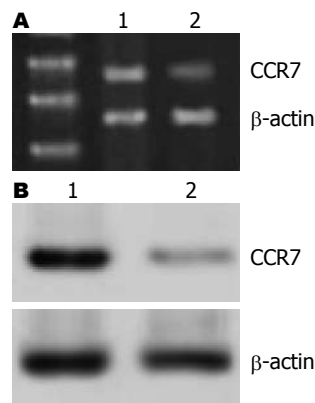


图 1 CCR7 mRNA及CCR7蛋白在结肠癌细胞系SW-480和HT-29中的表达。A: CCR7 mRNA; B: CCR7蛋白; 1: SW-480; 2: HT-29。

织标本中, 有53.1%检出CCR7蛋白表达。在其相应的癌旁组织中, 则只有9.4%检出CCR7蛋白表达, 两者差异亦显著。在对结肠癌细胞系的检测中亦发现存在CCR7表达。以上结果提示CCR7参与了结直肠癌的发病过程。采用Fisher's检验, 我们对CCR7表达与结直肠癌患者的临床病理特征之间的相关性进行分析。结果显示, CCR7表达与患者年龄、性别、肿瘤大小均无相关性, 而与肿瘤分期和淋巴结转移情况具有明显相关性。结果提示CCR7在结直肠癌中的表达参与其转移过程。

## 4 参考文献

- Kodama J, Hasengaowa, Seki N, Kusumoto T, Hiramatsu Y. Expression of the CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in human endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28: 370-375
- Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 2003; 63: 3833-3839
- Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Saitoh Y, Arita Y, Shinohara K, Minami T, Nakayama T, Sakurai H, Takahashi Y, Yoshie O, Saiki I. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 2181-2187
- Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, Belperio JA, Strieter RM. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 2006; 5: 56
- Ishigami S, Natsugoe S, Nakajo A, Tokuda K, Uenosono Y, Arigami T, Matsumoto M, Okumura H, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of CCR7 expression in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1025-1028
- Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 2937-2941
- Wilson JL, Burchell J, Grimshaw MJ. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible

- factor-1. *Cancer Res* 2006; 66: 11802-11807
- 8 Heresi GA, Wang J, Taichman R, Chirinos JA, Regalado JJ, Lichtstein DM, Rosenblatt JD. Expression of the chemokine receptor CCR7 in prostate cancer presenting with generalized lymphadenopathy: report of a case, review of the literature, and analysis of chemokine receptor expression. *Urol Oncol* 2005; 23: 261-267
- 9 Engl T, Relja B, Marian D, Blumenberg C, Müller I, Beecken WD, Jones J, Ringel EM, Bereiter-Hahn J, Jonas D, Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins. *Neoplasia* 2006; 8: 290-301
- 10 Rubie C, Frick VO, Wagner M, Weber C, Kruse B, Kempf K, König J, Rau B, Schilling M. Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6627-6633
- 11 Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, Deschênes J, Sauter G, Simon R, Bianchi R, Basik M. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 97: 275-283
- 12 Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA, Cavalli M, Simeone E, Giuliano P, Napolitano M, Franco R, Botti G, Castello G. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1835-1841
- 13 Mori T, Kim J, Yamano T, Takeuchi H, Huang S, Umetani N, Koyanagi K, Hoon DS. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 1800-1807
- 14 Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, Sakai Y, Takabayashi A, Oshima M, Taketo MM. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* 2007; 26: 4679-4688
- 15 Ocaña E, Delgado-Pérez L, Campos-Caro A, Muñoz J, Paz A, Franco R, Brieva JA. The prognostic role of CXCR3 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica* 2007; 92: 349-356
- 16 Notohamiprodjo M, Segerer S, Huss R, Hildebrandt B, Soler D, Djafarzadeh R, Buck W, Nelson PJ, von Lüttichau I. CCR10 is expressed in cutaneous T-cell lymphoma. *Int J Cancer* 2005; 115: 641-647
- 17 Singh S, Singh UP, Stiles JK, Grizzle WE, Lillard JW Jr. Expression and functional role of CCR9 in prostate cancer cell migration and invasion. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8743-8750
- 18 Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Assfalg G, Asemisen AM, Thiel E, Scheibenbogen C. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 685-690
- 19 Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, Kusumoto S, Ri M, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. The CCR4 as a novel-specific molecular target for immunotherapy in Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2006; 20: 2162-2168
- 20 Jöhrer K, Zelle-Rieser C, Perathoner A, Moser P, Hager M, Ramoner R, Gander H, Höltl L, Bartsch G, Greil R, Thurnher M. Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2459-2465

## ■同行评价

本文探讨趋化因子受体CCR在结直肠癌中的异常表达, 内容新颖, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008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/> 无法在线提交的通过 [submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893 寻求帮助。投稿须知下载网址 <<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>> 审稿过程平均时间需要14 d。所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑: 张海宁 2008-06-08)

## 致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈凇 教授  
中国人民解放军总医院普通外科

曹志成 院士  
香港伊丽莎白医院临床肿瘤部、肿瘤科研部

陈建荣 副教授  
南通大学第二附属医院急诊医学中心

丁惠国 主任医师  
首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

樊晓明 主任医师  
复旦大学附属金山医院消化科

高润平 教授  
吉林大学第一医院肝病科

高泽立 副教授  
上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

龚国忠 教授  
中南大学湘雅二医院肝病研究中心

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

李瑗 教授  
广西肿瘤研究所

梁力建 教授  
中山大学附属第一医院肝胆外科

刘作金 副教授  
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

禄韶英 主治医师  
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

倪润洲 教授  
南通大学附属医院消化内科

彭曦 副研究员  
重庆市西南医院烧伤研究所

朴云峰 教授  
吉林大学第一附属医院消化科

乔岐禄 主任医师  
北京大学第一医院外科

施瑞华 教授  
南京医科大学第一附属医院消化科

唐文富 副主任医师  
四川大学华西医院中西医结合科

王鲁 副教授  
复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

王振宁 教授  
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

魏经国 教授  
中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科

吴云林 教授  
上海交通大学医学院附属瑞金医院消化科

熊斌 教授  
武汉大学中南医院肿瘤科

许文燮 教授  
上海交通大学生命科学院生物医学工程系

张继明 教授  
复旦大学附属华山医院肝炎研究室

张锦生 教授  
复旦大学上海医学院病理学系

周士胜 教授  
大连大学医学院医学研究中心

朱传武 副主任医师  
江苏省苏州市第五人民医院传染科