

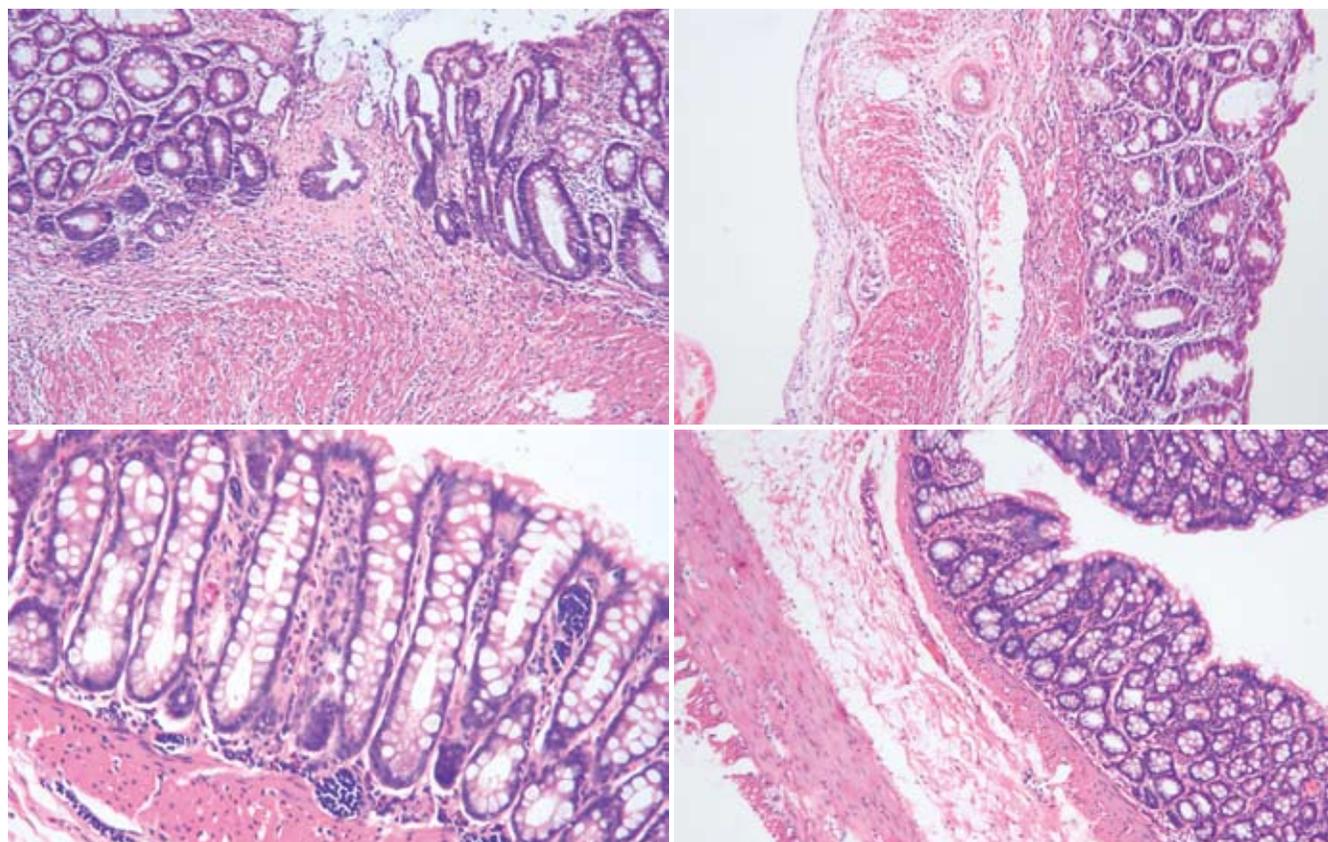
ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年7月18日 第16卷 第20期 (Volume 16 Number 20)



20 / 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  
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  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋于刚教授  
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  
汤恢焕教授  
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  
于良国教授  
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  
刘正穗教授  
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  
唐霓副教授  
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  
杨林副教授  
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  
阴赅宏研究员  
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7月18日 第16卷 第20期 (总第244期)

述 评	2199 肝癌综合治疗的现状 郭武华, 张吉翔
基础研究	2204 胆碱能抗炎通路对急性食管炎大鼠的保护作用 张静, 谢鹏雁, 李慧, 帅晓玮, 王驰 2211 细胞外调节蛋白激酶通路对胃癌细胞化疗效果的影响 刘诗权, 于红刚, 唐国都, 黄杰安, 于皆平 2217 小鼠骨髓基质干细胞体外转化为肝细胞最佳诱导体系的筛选及验证 施晓雷, 毛凉, 许碧云, 谢婷, 朱章华, 陈军浩, 李雷, 丁义涛 2224 补肾柔肝方对二甲亚硝胺诱导大鼠肝纤维化后CTGF mRNA表达的影响 张斌, 王灵台 2229 人参皂苷Rg3对人肝癌细胞Pim-3及Bad凋亡蛋白表达的影响 简捷, 刘利珍, 李小燕, 胡志方, 王稻, 黄缘 2234 姜黄素对缺氧条件下HepG2细胞VEGF表达的影响 侯伟, 覃华, 刘南植, 刘爽, 王颖, 赵秋, 田德安 2239 NO对小鼠结肠平滑肌自主收缩活动的影响及其机制 彭双勤, 龚红萍, 余上斌, 熊宗斌, 祝兰, 胡还忠
临床研究	2244 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在肝癌中的表达及其临床意义 康凯夫, 王晓蔚, 陈小伍, 石祥呈 2248 hPTTG1在结直肠癌中的表达及其临床意义 吴斌文, 马东, 李友佳, 李东风, 邓罡, 曾志刚, 张凯军, 张瑛华, 耿庆山
文献综述	2253 细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝病中的作用 李鹏, 李昌平 2259 炎症性肠病易感基因研究进展 肖玉良, 缪应雷 2267 三叶因子3研究进展 陈美娅, 张靖, 任建林 2274 P53-MDM2负反馈在幽门螺杆菌致病中的作用 杨楨, 吕农华
研究快报	2280 胆囊收缩素对胆固醇结石豚鼠离体胆囊肌条的影响 肖勇, 余保平, 吴志轩, 余志 2285 RNAi抑制结肠癌细胞系DcR3的表达及对癌细胞生长的影响 王鲁平, 杨善明, 徐学明, 陈健, 杨光之, 张鲁榕 2289 氧化苦参碱对实验性结肠炎大鼠肠黏膜细胞因子和核因子- $\kappa$ B p65表达的影响 吕建芳, 范恒, 沈霖, 寿折星, 庄雄
临床经验	2295 食管鳞癌survivin表达与放化疗近期疗效的关系 黄伟剑, 刘孟忠, 胡伟, 杨弘, 郑斌, 王耿, 罗孔嘉, 文静, 傅剑华 2300 伊立替康联合顺铂治疗晚期食管癌27例 梅齐, 汪勇, 李睿, 陈元

	<p>2304 多烯紫杉醇联合顺铂腹腔化疗治疗进展期胃癌45例 郭花, 朱金水, 张强, 达炜, 孙群, 陈尼维</p> <p>2308 APE表达与胃癌患者预后的关系 徐世平, 黄海力, 吴本俨, 王孟薇, 尤纬缔</p> <p>2312 幽门螺杆菌iceA基因型与胃黏膜病变的相关性 张彩凤, 夏永华, 韩宇, 常廷民</p> <p>2316 慢性丙型肝炎患者血清HCV RNA含量与抗核抗体的相关性 陈志刚, 杨军, 周婷, 周迪, 李宏</p>
<b>致 谢</b>	2320 致谢世界华人消化杂志编委
<b>消 息</b>	<p>2203 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>2210 北京百世登生物医学科技有限公司第三期编辑培训纪要</p> <p>2216 世界华人消化杂志名词术语标准</p> <p>2223 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>2233 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知</p> <p>2238 世界华人消化杂志计量单位标准</p> <p>2243 世界华人消化杂志数字用法标准</p> <p>2252 世界华人消化杂志作者署名要求</p> <p>2258 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>2266 世界华人消化杂志被收录情况</p> <p>2279 世界华人消化杂志网络版的发表前链接</p> <p>2284 世界华人消化杂志正文要求</p> <p>2294 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</p> <p>2299 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>2303 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>2307 世界华人消化杂志中文摘要要求</p> <p>2315 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策</p> <p>2319 世界华人消化杂志外文字符标准</p>
<b>封面故事</b>	<p>吕建芳, 范恒, 沈霖, 寿折星, 庄雄. 氧化苦参碱对实验性结肠炎大鼠肠黏膜细胞因子和核因子-<math>\kappa</math>B p65表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2289-2294</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2289.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2289.asp</a></p>
<b>本期责任人</b>	<p>编务 江艳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 郭海丽; 责任编辑 张海宁; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁;</p> <p>形式规范 马连生</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 30%;"> <h2 style="text-align: center;">世界华人消化杂志</h2> <p style="text-align: center;"><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p style="text-align: center;">吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p style="text-align: center;">创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-07-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p> </div> <div style="width: 35%;"> <p><b>编辑</b> 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>出版</b> 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂</p> <p><b>发行</b> 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p><b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p><b>邮购</b> 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> </div> <div style="width: 30%;"> <p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊. 《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<a href="http://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.</p> <p><b>特别声明</b> 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2008年版权归世界华人消化杂志所有</p> </div> </div>	
<p>中国标准连续出版物号 <b>ISSN 1009-3079</b> 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证 CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每份24.00元 全年864.00元 1401004000050</p> <p style="text-align: center;"><a href="http://www.wjgnet.com">www.wjgnet.com</a></p>	

# World Chinese Journal of Digestology

July 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 20

<b>EDITORIAL</b>	2199 Current status on comprehensive treatment of hepatoma <i>Guo WH, Zhang JX</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	2204 Protective effects of cholinergic anti-inflammatory pathway against acute esophagitis in rats <i>Zhang J, Xie PY, Li H, Shuai XW, Wang C</i> 2211 Activation of ERK signaling pathway reduces the chemotherapy sensitivity in gastric cancer cells <i>Liu SQ, Yu HG, Tang GD, Huang JA, Yu JP</i> 2217 Optimization of an effective directed differentiation medium for mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes <i>in vitro</i> <i>Shi XL, Mao L, Xu BY, Xie T, Zhu ZH, Chen JH, Li L, Ding YT</i> 2224 Effects of kidney-tonifying liver-emoliating formula on connective tissue growth factor mRNA expression in hepatic fibrosis rats <i>Zhang B, Wang LT</i> 2229 Effects of ginsenoside Rg3 on the expression of Pim-3 and Bad in human hepatocarcinoma cell lines <i>Jian J, Liu LZ, Li XY, Hu ZF, Wang D, Huang Y</i> 2234 Effect of curcumin on vascular endothelial growth factor expression in HepG2 hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions <i>Hou W, Qin H, Liu NZ, Liu S, Wang Y, Zhao Q, Tian DA</i> 2239 Effect of nitric oxide on spontaneous contraction of rat colon smooth muscle and its mechanism <i>Peng SQ, Gong HP, Yu SB, Xiong ZB, Zhu L, Hu HZ</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	2244 Expression and clinical significance of Beclin1 and NF- $\kappa$ B p65 protein in primary human hepatocellular carcinoma <i>Kang KF, Wang XW, Chen XW, Shi XC</i> 2248 Expression of human pituitary tumor transforming gene 1 in colorectal cancer and its clinical significance <i>Wu BW, Ma D, Li YJ, Li DF, Zheng ZG, Deng G, Zhang KJ, Zhang YH, Geng QS</i>
<b>REVIEW</b>	2253 Role of hepatocyte apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease <i>Li P, Li CP</i> 2259 Research progress in susceptibility genes of inflammatory bowel disease <i>Xiao YL, Miao YL</i> 2267 Advances in research of trefoil factor 3 <i>Chen MY, Zhang J, Ren JL</i> 2274 Role of P53-MDM2 negative-feedback in the pathopoiesis of <i>Helicobacter pylori</i> <i>Yang Z, Lv NH</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	2280 Effects of cholecystokinin on gallbladder muscle stripes of guinea pigs with cholesterol gallstone <i>in vitro</i> <i>Xiao Y, Yu BP, Wu ZX, Yu Z</i> 2285 Depressed DcR3 expression induced by RNA interference and its effect on growth of colonic cancer cells <i>Wang LP, Yang SM, Xu XM, Chen J, Yang GZ, Zhang LR</i> 2289 Effects of Oxymatrine injection on expression of cytokines and nuclear factor- $\kappa$ B p65 in colonic intestinal mucosa of rats with experimental colitis <i>Lv JF, Fan H, Shen L, Shou ZX, Zhuang X</i>

<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>2295 Relationship between survivin expression and chemoradiotherapy response in esophageal squamous cell carcinoma <i>Huang WZ, Liu MZ, Hu Y, Yang H, Zheng B, Wang G, Luo KJ, Wen J, Fu JH</i></p> <p>2300 Irinotecan in combination with cisplatin in treatment of advanced esophageal cancer: an analysis of 27 cases <i>Mei Q, Wang Y, Li R, Chen Y</i></p> <p>2304 Treatment of peritoneal chemotherapy in combination with docetaxel and cisplatin for advanced gastric cancer: an analysis of 45 cases <i>Guo H, Zhu JS, Zhang Q, Da W, Sun Q, Chen NW</i></p> <p>2308 Relation of APE/Ref-1 expression with gastric cancer prognosis <i>Xu SP, Huang HL, Wu BY, Wang MW, You WD</i></p> <p>2312 Correlation between iceA genotypes of <i>Helicobacter pylori</i> and gastric mucosal lesion <i>Zhang CF, Xia YH, Han Y, Chang TM</i></p> <p>2316 Relationship between serum HCV RNA and anti-nuclear antibody in chronic HCV-infected patients <i>Chen ZG, Yang J, Zhou T, Zhou D, Li H</i></p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	2320 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<p><i>Lv JF, Fan H, Shen L, Shou ZX, Zhuang X.</i> Effects of Oxymatrine injection on expression of cytokines and nuclear factor-<math>\kappa</math>B p65 in colonic intestinal mucosa of rats with experimental colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(20): 2289-2294 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2289.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2289.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>Hai-Li Guo</i> Editor-in-Charge: <i>Hai-Ning Zhang</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> 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 July 18, 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@wjcdnet.com](mailto:wjcd@wjcdnet.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@wjcdnet.com](mailto:wjcd@wjcdnet.com)  
<http://www.wjcdnet.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*

# 肝癌综合治疗的现状

郭武华, 张吉翔

郭武华, 南昌大学第二附属医院肿瘤科; 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006

张吉翔, 南昌大学第二附属医院消化科; 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006

郭武华, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事肝癌的综合治疗研究。

作者贡献分布: 郭武华与张吉翔对此文所作贡献均等。

通讯作者: 张吉翔, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院消化科; 江西省分子医学重点实验室. jixiangz@tom.com  
电话: 0791-6292706

收稿日期: 2008-05-16 修回日期: 2008-06-11

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-18

## Current status on comprehensive treatment of hepatoma

Wu-Hua Guo, Ji-Xiang Zhang

Wu-Hua Guo, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jixiangz@tom.com

Received: 2008-05-16 Revised: 2008-06-11

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-18

### Abstract

Although a variety of therapeutic methods, including surgery, chemoembolization via hepatic artery or portal vein, ablation and radiotherapy, play a key role respectively in combined treatment of hepatoma, there are still some difficulties in the management of this malignant tumor. It may lead to a disastrous result if we only focus on the stage of tumor without paying attention to liver functional reserve. Therefore, in order to improve the therapeutic effects, we need to utilize the advantages of individual method according to the stage and liver functional reserve of different patients.

Key Words: Hepatoma; Therapy; Comprehensive treatment

Guo WH, Zhang JX. Current status on comprehensive treatment of hepatoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2199-2203

### 摘要

肝癌的各种治疗手段(如外科治疗、肝动脉/门静脉化疗栓塞术、消融治疗和放射治疗等), 依据各自特点及疗效在治疗中综合运用, 使肝癌的临床疗效有了明显提高。然而肝癌的治疗仍然是临床治疗的难点, 如何合理应用各种综合治疗手段仍然存在一定的争议。对肝癌的治疗, 单一从病程而忽视肝脏本身的功能储备来制定肝癌的治疗策略可能给患者带来严重的不利影响, 仅通过单一治疗手段来治疗肝癌也必然影响患者的疗效。充分评价肝癌患者的病程以及肝脏的储备功能, 优化各种治疗手段进行综合治疗是肝癌治疗发展趋势。

关键词: 肝癌; 治疗; 综合治疗

郭武华, 张吉翔. 肝癌综合治疗的现状. *世界华人消化杂志* 2008; 16(20): 2199-2203

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2199.asp>

### 0 引言

肝癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 由于起病隐匿、进展迅速, 临床治疗效果仍然较差。目前, 由于技术的进步特别是影像技术的提高, 肝癌的临床诊断并不困难, 但临床发现的大多数病例仍然属于中晚期, 未能早期发现是肝癌治疗效果差的最主要的原因。针对恶性实体肿瘤的各种治疗手段包括外科治疗、肝动脉/门静脉化疗栓塞术、消融治疗及放射治疗等均有一定的效果, 利用各种治疗手段对肝癌患者进行综合治疗是目前肝癌治疗的趋势。

### 1 外科治疗

肝癌的外科治疗包括部分肝切除和肝移植, 毫无疑问, 部分肝切除仍然是目前对肝癌患者进行治疗时首先考虑的治疗方案, 也是获得肝癌较长期生存的最重要的治疗手段。由于卫生水平的提高及一级预防意识的增强, 通过甲胎蛋

### ■背景资料

由于发生、发展的特点, 肝癌的临床治疗效果仍然不满意, 众多的研究者试图应用各种治疗手段以期提高肝癌的治疗效果。目前已达成的共识是充分利用各种治疗手段的优势对肝癌患者进行综合治疗, 但如何搭配各种治疗方法以及先后顺序仍有一定的争议。

### ■同行评议者

党双锁, 副教授, 西安交通大学第二医院感染科

## ■ 研发前沿

治疗肝癌的主要手段都达到了一定的治疗效果,使一部分患者明显受益.在不断深入研究各种治疗方法的同时,强调肝癌的综合治疗是肝癌治疗的主要趋势.

白(AFP)及B超、CT、MRI等影像诊断技术,临床上发现越来越多的小肝癌患者.对小肝癌患者,通过外科切除,患者5年生存率可达50%以上<sup>[1-2]</sup>.即使合并有肝硬化的患者,通过局部切除替代规则性的肝叶切除,可大大提高手术切除率,降低手术死亡率,可以取得与规则性外科切除相仿的治疗效果.大肝癌往往代表病程较晚,肝内扩散、远处转移机会增加,对重要的血管如门静脉、肝静脉及下腔静脉压迫或浸润破坏可能性增加,以及肝切除时癌旁肝组织切除较多,因此大肝癌的切除率明显下降,手术风险提高,5年生存率也明显的下降.但外科切除仍然是大肝癌治疗的重要手段,只要患者一般情况良好,无明显心、肺、肾功能损害,肝脏肿瘤局限于半肝或3个肝叶范围之内,健侧肝叶有明显的代偿性增大,肝功能正常,或轻度损害(对Child B级病例,应考虑到残肝量的多少)及无肝内外转移<sup>[3]</sup>,都应该积极进行外科切除肝癌.即使大肝癌初次切除较困难的患者采用多种疗法缩小后再切除的5年生存率为64.7%<sup>[4]</sup>,疗效和小肝癌相仿.

在我国,由于绝大多数肝癌患者都有肝炎特别是乙型肝炎感染背景,许多肝癌患者合并有不同程度的肝硬化、门静脉高压及脾功能亢进,由此影响外科切除率,增加了外科手术的风险.但肝硬化门脉高压并非外科切除肝癌的绝对禁忌证<sup>[5]</sup>, Kawano *et al*<sup>[6]</sup>对合并食道胃底静脉曲张行肝癌切除的患者进行回顾性分析发现,合并食道胃底静脉曲张的肝癌患者的肝癌细胞分化更高,门静脉侵犯率低,肝功能储备差,肝切除范围更小.5年生存率有食道胃底静脉曲张的患者较无曲张的患者更高(70.1% vs 47.5%,  $P = 0.045$ ).因此认为对于合并食道胃底静脉曲张的局部肝癌(Child-Pugh A/B)患者首选局部肝切除. Poon *et al*<sup>[7]</sup>研究合并肝硬化的肝癌患者的外科治疗,认为只要肿瘤位于局部,肝功能储备良好便可进行肝切除,切除范围可达4个肝段.尽管手术时间更长、出血更多,但术后生存时间和小范围的肝切除(小于或等于2段)相似.脾功能亢进血小板减少使患者手术出血的风险增加,部分患者出现明显的皮肤瘀点、瘀斑、鼻衄等表现,一般认为是外科手术的禁忌证.陈孝平 *et al*<sup>[8]</sup>研究认为部分肝癌合并肝硬化、脾功能亢进而致的WBC和PLT减少的患者,有些病例肝功能储备良好,完全可以耐受肝切除联合脾切除术.

与不同时切脾组相比,其并发症发生率分别为16.0%和14.5%,差异无统计学意义,而术后5年无瘤生存率明显高于不切脾组.表明该切除方法治疗肝癌合并肝硬化脾功能亢进,不仅安全,而且可提高疗效.

腹腔镜辅助外科技术是微创外科的重要手段,腹腔镜下肝癌切除有出血少、住院时间短的优点.以往主要局限用于直径小于5 cm的病灶,而且位于肝脏的周边位置(2-6段)<sup>[9]</sup>.詹晓静 *et al*<sup>[10]</sup>根据左肝组织相对较薄、血管位置相对表浅、固定,手术难度相对低的特点,应用手助装置辅助下对肝左叶癌进行切除获得成功,将肝脏肿瘤的部位为左外叶或以左外叶为主但未超过左半肝,肝肿瘤>5 cm,但<15 cm作为腹腔镜大肝癌切除的良好适应症.因为超过15 cm的特大肿瘤加上辅助手,往往造成无手术操作空间.相信腹腔镜下肝癌切除病例的选择会越来越广,但鉴于恶性肿瘤手术要求,腹腔镜下肝癌切除远期疗效还需进一步观察.

肝移植是除部分肝切除外的另一种可治愈肝癌的治疗技术,是终末期肝病唯一可选择的治愈手段.早期对肝癌患者行原位肝移植由于术后复发时间短、5年生存率仅约18%-40%<sup>[11]</sup>,给肝移植的临床应用带来负面的影响.根据1996年制定的米兰标准选择病例进行肝移植(即单一肿瘤直径≤5 cm或多发肿瘤不多于3个,每个肿瘤直径≤3 cm),总的4年生存率是85%,而超出这一选择标准进行肝移植为50%,两组数据差别有明显的统计学意义<sup>[12]</sup>.国内对肝癌直径≤5 cm的肝癌进行肝移植,5年生存率为61.5%<sup>[13]</sup>.目前对肝癌患者进行肝移植的病例选择仍有许多是超出米兰标准的,并取得一定的治疗效果,甚至对于大肝癌,也取得较外科肝切除更好的疗效<sup>[14]</sup>.大肝癌进行肝移植的疗效主要表现在无瘤生存上,但在生存期上能否较其他治疗手段更有效还需要进一步观察.目前争论的焦点主要是对于能进行外科切除的肝癌,是进行肝移植治疗还是先行外科切除肝癌.文献报道肝癌肝移植的疗效较外科切除要好<sup>[15]</sup>,但由于供肝困难、易发生肝内复发、巨额医疗费用以及应用免疫抑制剂造成的机会感染等不利因素,大多数学者接受对于能进行肝切除的肝癌先进行肝切除,通过术后的严密随访来早期发现肝内复发病灶.由于新发现的肝内小的复发病灶,还可进行再次手术切除,如切除复发癌灶有困难的,再接受肝移植,可取得和初次诊断肝癌先行肝移植相

似的治疗效果<sup>[15]</sup>。也就是说,对于能够切除的肝癌,把外科切除作为一线治疗,而把肝移植作为二线治疗方案,这种治疗模式能够显著地延长长期患者的生存期。

## 2 肝动脉/门静脉化疗栓塞术

由于肝癌发病的特点,临床上发现的病例大多不能进行肝脏外科治疗,肝动脉/门静脉化疗栓塞是应用最多的治疗技术,即使患者经过肝癌切除,肝动脉/门静脉化疗栓塞仍然是预防肿瘤复发的最主要的有效治疗方法<sup>[16-17]</sup>。肝动脉/门静脉化疗栓塞术有开腹途径和介入途径。开腹进行肝动脉/门静脉插管化疗栓塞术创伤大,而且由于定位不准确以及术中不能发现患者可能存在的肿瘤异常供应血管、可能存在的动-静脉瘘/动-门静脉瘘、费用大等缺点,现已不把开腹肝动脉/门静脉插管化疗栓塞术作为肝癌患者常用的治疗方法。仅在肝癌切除后为预防肝癌复发转移而在术中置肝动脉/门静脉插管,以备术中术后进行化疗和/或栓塞。

介入肝动脉插管化疗栓塞术(transarterial chemoembolization, TACE)技术操作简单,对患者创伤小,是肝癌患者姑息治疗及术前、术后辅助治疗的有效手段<sup>[18]</sup>。通过DSA造影及X线监视下进行操作,具有定位准确的特点,同时可以发现可能存在的异常血管及动-静脉瘘/动-门静脉瘘。同时由于在X线监视下注入药物和栓塞剂,可避免栓塞剂异位栓塞引起的严重并发症而又能达到最大的栓塞效果。对能进行手术切除的大肝癌,由于介入肝动脉栓塞会增加肝脏的脆性,引起术中出血增多,以及对患者总的生存无影响,大多数学者认为对能手术切除的大肝癌不宜进行术前肝动脉化疗栓塞术,这和其他恶性肿瘤建议进行术前新辅助化/放疗明显不同。介入治疗对肝癌切除有帮助体现在肝癌Ⅱ期切除及肝硬化脾功能亢进引起的血三系减少上,通过介入肝动脉插管化疗栓塞术可使肝癌缩小,肝组织增生,提高了肝癌的切除率<sup>[19]</sup>。对肝癌合并脾功能亢进的患者,同时进行肝癌切除及脾切除手术创伤大,我们的做法是先进进行肝动脉化疗栓塞术加部分脾动脉栓塞术(50%-70%)再择期进行肝癌切除。由于血三系上升特别是血小板大幅提高以及避免脾切除,手术风险明显减小。

肝癌介入治疗的难点仍然在经门静脉的治疗上,由于门静脉解剖上的特点,人体表没有血管和门静脉直接相通,目前采用介入的方法进

入门静脉的主要途径有经皮经肝门静脉穿刺、经颈静脉-肝静脉门静脉穿刺、经皮脾静脉穿刺。肝癌引起门静脉病变主要有门静脉癌栓、动-门静脉瘘以及门静脉高压等,门静脉癌栓是肝癌最常见的病理表现之一,治疗的方法有外科切除、门静脉切开取栓、肝动脉化疗栓塞、门静脉插管化疗栓塞、无水乙醇注射、放射治疗以及门静脉支架植入开通阻塞门静脉等,这些治疗的主要目的是清除癌栓,恢复门静脉的通畅,降低门静脉压力。然而有趣的是,对门静脉分支进行栓塞可控制肿瘤生长和促进肝组织增生,可以提高肝癌的切除率,增加手术的安全性,是一种越来越受重视的治疗手段<sup>[20]</sup>。因此门静脉癌栓的治疗需要充分评价癌栓对机体的病理影响,以决定是清除癌栓或是进一步栓塞门静脉。经皮经肝门静脉穿刺进行门静脉化疗或栓塞是对门静脉癌栓进行治疗最常使用的方法,但如果门静脉癌栓位于右支主干,则对门静脉穿刺插管带来操作上的不便,进一步对门静脉分支进行超选择则更为困难。经皮脾静脉穿刺进行门静脉治疗对选择门静脉分支较为便利,但对脾脏特别是肝硬化脾增大的患者进行脾穿刺的风险是较大的<sup>[21]</sup>,这项技术的推广较为困难。

## 3 消融治疗

肝癌的局部消融治疗主要包括经皮无水酒精注射(percutaneous alcohol injection, PEI)、微波治疗(microwave therapy, MT)及射频消融(radiofrequency ablation, RFA)等,具有微创、安全、有效的特点,成为肝癌综合治疗中最常用的治疗手段之一。现在研究射频消融及微波治疗的文献较多,对其他消融方法应用较少。特别值得一提的是经皮无水酒精注射治疗肝癌,价廉效好,方便反复进行,也极易在各级医院推广应用。一般肝癌消融治疗的最佳适应症为直径 $\leq 3$  cm的肿瘤,而对于直径 $> 3$  cm的肝癌,即使穿刺位于肿块的中央,一次消融治疗也不能完全将肿瘤杀死。对直径 $\leq 3$  cm的肝癌,由于不可能每次都准确穿刺进入肿块的中央,因此消融治疗可能需要进行多次,实时监测消融效果可能提高肝癌消融治疗的疗效<sup>[22]</sup>。经肝动脉化疗栓塞治疗后碘油沉积较好的肝癌病灶中央组织呈凝固性坏死改变,残留的肝癌组织在肿块的边缘,因此对于大肝癌,TACE治疗后碘油沉积较好的病灶结合消融治疗不是一种理想的治疗选择。但也有报道对于单个病灶 $> 3$  cm的肝癌,射频消

### ■ 相关报道

针对肝癌治疗的报道较多,包括不同的方法、肝癌大小及肝脏储备功能等,具有良好的参考应用价值。

### ■应用要点

本文较全面地叙述了肝癌的主要治疗手段在肝癌治疗中的应用及疗效, 强调肝癌综合治疗的重要性, 对肝癌的临床治疗有一定的指导价值。

融结合TACE的疗效好于单用TACE或射频消融治疗<sup>[23]</sup>, 说明对于大肝癌, 射频消融治疗也能使患者受益。各种消融治疗多经皮肝穿刺进行治疗, 但开腹直视及腹腔镜辅助下进行消融治疗也是一种较好的选择。也有将多种消融治疗技术联合应用的, 如同时进行无水乙醇注射加射频消融治疗<sup>[24]</sup>, 可取得良好的效果。

## 4 放射治疗

肝癌的放射治疗已有50余年的历史, 经历了全肝放射、局部放射、全肝移动条放射、局部超分割放射及立体放射等的变迁, 现今主要应用三维适形放疗(3DCRT)技术对肝癌患者进行放射治疗。3DCRT采用多方位、多射束入射, 最后集中到病灶靶区提高放疗增益比, 最大限度的将剂量集中到病变区, 杀灭肿瘤细胞, 而使周围正常组织或器官少受或免受不必要的照射<sup>[25]</sup>, 避免了以往放射治疗引起的放射性肝炎以及因放射治疗剂量低效果不好的缺点, 是近几年肝癌综合治疗中新兴的治疗技术。肝癌放射治疗现应用在肝癌不能切除、动-门静脉瘘、门静脉癌栓、肝静脉癌栓、下腔静脉癌栓以及部分肝外转移的病灶, 取得了肯定的治疗效果, 在肝癌姑息治疗中发挥了积极的作用。对于单个肝癌行TACE治疗后再进行放射治疗是一种理想的选择<sup>[26]</sup>, 如前所述, 经过TACE治疗后, 病灶的中央多是凝固性坏死的组织, 而在肝肿块的边缘残留的肝癌组织血供主要来自门静脉, 是TACE治疗后肝癌复发的主要原因之一。而放射治疗特别是三维适形可以弥补TACE治疗技术的这一缺陷, 通过放射治疗可以杀灭残留的癌细胞, 有利于提高局部控制率及远期疗效。随着调强放疗(intensity modulated radiation therapy, IMRT)、图像引导放疗(image-guided radiotherapy, IGRT)以及主动呼吸门控技术(active breathing control, ABC)<sup>[27]</sup>的应用与发展, 定位准确性及局部治疗剂量的提高, 放射治疗在肝癌综合治疗中会发挥越来越重要的作用。

## 5 结论

针对肝癌的治疗手段还有很多, 除上述的各种局部治疗手段外, 还有全身治疗方法包括化疗、生物治疗、内分泌治疗、中医中药以及分子靶向治疗等。我们一般依据病程作为标准来制定恶性肿瘤的治疗计划, 对肝癌来说, 我们除了要考虑癌的因素还要考虑肝的因素, 忽视肝脏的储备功能而仅考虑肝癌可能对患者带来不

利的影响。只有充分评价每一个肝癌患者病程及肝功能的储备状况, 才能对患者做出合理的个体化治疗。也只有合理应用各种治疗手段, 优化各种治疗手段在每个肝癌患者综合治疗中的前后顺序, 才能达到改善肝癌患者生存质量, 延长患者生存时间的目的。

## 6 参考文献

- Poon RT, Fan ST. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: patient selection and postoperative outcome. *Liver Transpl* 2004; 10: S39-S45
- 樊嘉, 史颖弘. 小肝癌的治疗现状及发展. *中国现代手术学杂志* 2003; 7: 4-6
- 吴孟超, 李爱军. 应重视大肝癌的综合治疗. *中华医学杂志* 2006; 86: 1657-1659
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: G1-G7
- 洪健, 元云飞, 李斌奎, 黄亮, 李锦清, 张亚奇, 李国辉. 67例肝细胞肝癌合并重度肝硬化的手术疗效分析. *癌症* 2007; 26: 620-623
- Kawano Y, Sasaki A, Kai S, Endo Y, Iwaki K, Uchida H, Shibata K, Ohta M, Kitano S. Short- and long-term outcomes after hepatic resection for hepatocellular carcinoma with concomitant esophageal varices in patients with cirrhosis. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1670-1676
- Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Yeung C, Wong J. Extended hepatic resection for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: is it justified? *Ann Surg* 2002; 236: 602-611
- 陈孝平, 吴在德, 裘法祖. 肝癌切除联合脾切除治疗肝癌合并肝硬化、脾功能亢进. *中华外科杂志* 2005; 43: 442-446
- 王悦华, 周宁新, 黄志强. 腹腔镜肝癌切除手术的研究进展及应用. *中国普通外科杂志* 2004; 13: 930-932
- 詹晓静, 张绍庚, 陈永标, 高远, 魏炜明. 手助腹腔镜左肝大肝癌切除22例. *肝胆外科杂志* 2007; 5: 418-420
- Mazzaferro V, Chun YS, Poon RT, Schwartz ME, Yao FY, Marsh JW, Bhoori S, Lee SG. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1001-1007
- Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-699
- 沈中阳, 郑虹, 王政禄, 沈文, 朱志军, 邓永林, 潘澄. 肝癌肝移植Milan标准的临床意义探讨. *中华外科杂志* 2007; 45: 1615-1618
- Volk ML, Vijan S, Marrero JA. A novel model measuring the harm of transplanting hepatocellular carcinoma exceeding Milan criteria. *Am J Transplant* 2008; 8: 839-846
- 杨甲梅. 大肝癌的肝移植治疗. *腹部外科* 2007; 20: 373-374
- 刘允怡. 经肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝细胞肝癌概述. *中华外科杂志* 2004; 42: 257-259
- Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, Yu D, Meyer T, Patch DW, Burroughs AK. Treatment outcomes for hepatocellular carcinoma using chemoembolization in combination with other therapies. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 594-606
- 张志伟, 陈孝平. TACE在肝癌治疗中的价值. *中华肝*

- 胆外科杂志 2003; 9: 638-640
- 19 Seo DD, Lee HC, Jang MK, Min HJ, Kim KM, Lim YS, Chung YH, Lee YS, Suh DJ, Ko GY, Lee YJ, Lee SG. Preoperative portal vein embolization and surgical resection in patients with hepatocellular carcinoma and small future liver remnant volume: comparison with transarterial chemoembolization. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 3501-3509
- 20 Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J, Habib N, Jiao LR. Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg* 2008; 247: 49-57
- 21 Teng GJ, Deng G, Liu ZS, Fang W, Zhu GY, Li GZ, Guo JH, He SC, Dong YH. Ultrafine needle CO2 splenoportography: a comparative investigation with transarterial portography and MR portography. *Eur J Radiol* 2006; 59: 393-400
- 22 Kawasoe H, Eguchi Y, Mizuta T, Yasutake T, Ozaki I, Shimonishi T, Miyazaki K, Tamai T, Kato A, Kudo S, Fujimoto K. Radiofrequency ablation with the real-time virtual sonography system for treating hepatocellular carcinoma difficult to detect by ultrasonography. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40: 66-72
- 23 Cheng BQ, Jia CQ, Liu CT, Fan W, Wang QL, Zhang ZL, Yi CH. Chemoembolization combined with radiofrequency ablation for patients with hepatocellular carcinoma larger than 3 cm: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299: 1669-1677
- 24 Kurokohchi K, Watanabe S, Yoneyama H, Deguchi A, Masaki T, Himoto T, Miyoshi H, Mohammad HS, Kitanaka A, Taminato T, Kuriyama S. A combination therapy of ethanol injection and radiofrequency ablation under general anesthesia for the treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2037-2043
- 25 赵美红, 郎丰平, 江启安, 马静静, 宋玉秀. 三维适形放疗联合肝动脉碘油化疗药物栓塞治疗原发性肝癌疗效分析. *中华放射肿瘤学杂志* 2006; 15: 39-41
- 26 Seo YS, Kim JN, Keum B, Park S, Kwon YD, Kim YS, Jeon YT, Chun HJ, Kim CY, Kim CD, Ryu HS, Um SH. Radiotherapy for 65 patients with advanced unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2394-2400
- 27 Dawson LA, Eccles C, Bissonnette JP, Brock KK. Accuracy of daily image guidance for hypofractionated liver radiotherapy with active breathing control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 1247-1252

■同行评价  
本文较为详细综述了当今肝癌的综合治疗现状, 有一定参考意义。

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性的旬刊杂志, 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 2008-07-18)

## 胆碱能抗炎通路对急性食管炎大鼠的保护作用

张静, 谢鹏雁, 李慧, 帅晓玮, 王驰

### ■背景资料

胃食管反流病(GERD)是一组由多种因素参与促成的上消化道常见疾病。许多研究表明,多种细胞因子在GERD的发病过程中起重要作用。胆碱能抗炎通路(CAP)对于全身和局部炎症的调控作用,在近年来备受关注。

张静, 谢鹏雁, 李慧, 帅晓玮, 王驰, 北京大学第一医院消化内科北京市100034

张静, 2006年北京中医药大学第一附属医院消化内科博士, 主要从事胃食管反流病方面的研究。

国家教育部高校博士学科专项科研基金课题资助项目, No. 20060001128

作者贡献分布: 此课题由张静, 谢鹏雁及帅晓玮设计; 研究过程由张静与李慧操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由帅晓玮与王驰提供; 数据分析由张静完成; 本论文写作由张静与谢鹏雁完成。

通讯作者: 谢鹏雁, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科. xiepengyan@medmail.com.cn  
电话: 010-66551122-2581

收稿日期: 2008-03-20 修回日期: 2008-06-13

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-18

### Protective effects of cholinergic anti-inflammatory pathway against acute esophagitis in rats

Jing Zhang, Peng-Yan Xie, Hui Li, Xiao-Wei Shuai, Chi Wang

Jing Zhang, Peng-Yan Xie, Hui Li, Xiao-Wei Shuai, Chi Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Supported by: the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of Ministry of Education of China, No. 20060001128

Correspondence to: Dr. Peng-Yan Xie, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Peking University, 8 Xishiku Street, Xicheng District, Beijing 100034, China. xiepengyan@medmail.com.cn

Received: 2008-03-20 Revised: 2008-06-13

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the effects of cholinergic anti-inflammatory pathway (CAP) on levels of cytokines, choline acetyltransferase (ChAT) and nitric oxide synthetase (NOS) activities and on the degree of acute esophagitis in rats, and to determine whether CAP has protective effects against experimental esophagitis in rats.

**METHODS:** Acute esophagitis was induced by perfusion of 0.1 mol/L hydrochloric acid with pepsin in the lower part of the esophagus. Forty SD rats were randomly assigned to five groups. Group 1 served as a normal saline-treated control (NS group), while in group 2 the distal

esophagus was exposed to acidified pepsin for 2 h (AP group). In the other three groups, animals were subjected to sham surgery (SHAM group) or bilateral cervical vagotomy alone (VTM group) or with electrical stimulation before and after acid perfusion (VNS group). The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and activities of ChAT and NOS in the esophageal tissues were determined. Esophageal injury was assessed by macroscopic and microscopic examination.

**RESULTS:** The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and activities of ChAT and NOS in the esophageal tissues increased after acid perfusion. Compared to the SHAM group, vagus nerve electrical stimulation inhibited the release of TNF- $\alpha$  ( $135.6 \pm 11.6$  vs  $200.0 \pm 20.5$ ,  $P < 0.05$ ), IL-6 ( $166.9 \pm 44.3$  vs  $305.6 \pm 16.5$ ,  $P < 0.05$ ) and the degree of esophagitis, while the anti-inflammatory cytokine IL-10 was not affected. Conversely, vagotomy resulted in an elevated severity of esophagitis, associated with significant increase of TNF- $\alpha$  ( $283.8 \pm 33.6$  vs  $200.0 \pm 20.5$ ,  $P < 0.05$ ) and IL-6 ( $515.1 \pm 77.1$  vs  $305.6 \pm 16.5$ ,  $P < 0.01$ ) levels and decrease of NOS activity. The esophagitis score was significantly higher in acid treatment group than that in NS group ( $P < 0.01$ ). The macroscopic and microscopic scores increased in VTM group compared with that in SHAM group ( $P < 0.01$  and  $0.05$ ). The esophagitis score was decreased markedly in VNS group compared with that in VTM group ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** The results of this study provide evidence for the involvement of the cholinergic anti-inflammatory pathway in modulating inflammation and injury during experimental esophagitis.

**Key Words:** Acute esophagitis; Cholinergic anti-inflammatory pathway; Vagus nerve; Choline acetyltransferase; Nitric oxide synthetase

Zhang J, Xie PY, Li H, Shuai XW, Wang C. Protective effect of cholinergic anti-inflammatory pathway against acute esophagitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2204-2210

### ■同行评议者

纪小龙, 教授, 中国人民解放军海军总医院纳米医学研究所; 刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

## 摘要

**目的:** 研究胆碱能抗炎通路(CAP)在急性食管炎模型中对大鼠食管组织的细胞因子水平、胆碱乙酰转移酶(ChAT)、一氧化氮合成酶(NOS)的活性以及食管损伤程度的影响,探讨CAP是否对实验性食管炎具有保护作用。

**方法:** 通过对大鼠食管下段持续滴注0.1 mol/L盐酸-胃蛋白酶溶液诱导制备急性食管炎模型。成年♂SD大鼠40只,随机分为5组:生理盐水组(NS组),盐酸-胃蛋白酶滴注组(AP组),假手术组(SHAM组),迷走神经切断组(VTM组)及迷走神经电刺激组(VNS组)。测定食管组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)的浓度及ChAT、NOS的活性,并对食管的损伤程度进行肉眼及光镜下评分。

**结果:** 与NS组相比,在盐酸-胃蛋白酶滴注诱导的大鼠急性食管炎组织中,上述细胞因子的浓度及ChAT、NOS的活性均有所升高。与假手术组相比,通过电刺激迷走神经,可抑制促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的升高( $135.6 \pm 11.6$  vs  $200.0 \pm 20.5$ ,  $166.9 \pm 44.3$  vs  $305.6 \pm 16.5$ , 均  $P < 0.05$ ),但对抑炎因子IL-10的水平并无影响;并且使食管的炎症程度有所减轻。在双侧颈部迷走神经切除后,大鼠食管的炎症损伤程度加重,TNF- $\alpha$ 、IL-6的水平亦明显升高( $283.8 \pm 33.6$  vs  $200.0 \pm 20.5$ ,  $P < 0.05$ ;  $515.1 \pm 77.1$  vs  $305.6 \pm 16.5$ ,  $P < 0.01$ ),食管组织中NOS的活性下降。各滴酸组食管下段的大体和镜下食管炎评分均明显高于NS组( $P < 0.01$ )。VTM组食管组织大体及光镜评分均较SHAM组有明显升高( $P < 0.01$ 及 $0.05$ )。VNS组食管组织的食管炎评分比VTM组显著降低( $P < 0.01$ )。

**结论:** 胆碱能抗炎通路通过传出迷走神经对大鼠实验性食管炎具有一定的保护作用。

**关键词:** 急性食管炎;胆碱能抗炎通路;迷走神经;胆碱乙酰转移酶;一氧化氮合成酶

张静,谢鹏雁,李慧,帅晓玮,王驰.胆碱能抗炎通路对急性食管炎大鼠的保护作用.世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2204-2210  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2204.asp>

## 0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是一组由多种因素促成的上消化道常见疾病,其发病率在世界范围内逐年上升。在其发病机制中,除了食管动力障碍作为重要的致病

因素外,GERD的病理本质主要是胃酸、胃蛋白酶与及胆盐等反流物引起的炎症过程。近年来,许多研究表明<sup>[1]</sup>,多种细胞因子可通过不同的机制和途径,在GERD的发生发展中起重要作用。在系统和局部炎症反应的调控中,“胆碱能抗炎通路”的神经-免疫调节功能在近年来备受关注<sup>[2-5]</sup>。本研究通过在发生急性食管炎的同时,进行神经通路干预,观察大鼠食管组织中细胞因子的水平和ChAT、NOS活性以及食管炎症损伤情况的变化,探讨胆碱能抗炎通路在急性食管炎中是否具有保护作用及其可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂SD大鼠40只,由北京大学第一医院动物实验中心提供,体质量280-350 g,实验前在II级动物室正常喂养1 wk。主要试剂包括胃蛋白酶(Sigma,美国)、氨基甲酸乙酯(北京化学试剂公司)、大鼠TNF- $\alpha$ 、IL-6及IL-10酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(Biosource,美国)、ChAT、NOS检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。主要仪器有DDC-2A型多用电生理刺激器(南京六合无线电元件厂)、酶标仪(Bio-Rad Model 680,美国)、紫外分光光度计(UV2100,日本)、光学显微镜(Nikon TE2000-S,日本)和微量输液泵(浙江大学医学仪器有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 实验动物随机分成5组:生理盐水滴注组(NS组);盐酸-胃蛋白酶滴注组(AP组);假手术组(SHAM组);迷走神经切断组(VTM组)及迷走神经电刺激组(VNS组)。每组8只。

**1.2.2 造模:** 通过对大鼠食管下段持续滴注0.1 mol/L盐酸溶液(含胃蛋白酶3000 kU/L, pH2.0)制备大鼠急性食管炎模型<sup>[6-7]</sup>。实验前禁食10-12 h,自由饮水,氨基甲酸乙酯(1.0 g/kg)ip麻醉。平卧位固定,头部抬高20-30度,切开腹壁和胃壁,将一引流管放置在贲门下方以收集并排出经食管滴注的液体。将一单腔灌流管(内径0.30 mm,外径0.50 mm)经口放置于食管内,导管开口位于食管和胃交界处上约2.5 cm,固定导管,另一端与持续灌流泵相连。按动物分组情况分别给予0.1 mol/L盐酸-胃蛋白酶溶液(37℃)食管内滴注(速度20 mL/h,持续2 h)以及神经通路干预,并设生理盐水滴注对照组,滴注时间与速度同前。(1)NS组。(2)AP组。(3)SHAM组:在食管滴酸前,于喉头与胸骨间沿颈正中中线作一长约3 cm切口,行气管切开插管保持自主呼吸通畅。暴露颈动脉鞘,钝性分离双侧迷走神经干约2 cm,但不结扎

## ■ 研发前沿

GERD的发病机制尚未完全清楚,其病理本质是胃和/或十二指肠反流物导致的炎症过程。而对于CAP是否参与食管炎的调控,目前国内、外尚未见文献报道。

## ■ 相关报道

Borovikova *et al* 研究提示直接电刺激迷走神经可使内毒素休克大鼠体内促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-18的释放减少,但并不影响抑炎因子IL-10的释放,从而阻止了血压的下降。随后的研究中,CAP对全身和局部炎症的调控作用在失血性休克、心肌梗死、肠梗阻、胰腺炎和实验性关节炎等实验模型中均得到证实。

表 1 食管内滴注及神经通路干预对于食管组织内细胞因子、ChAT及NOS的影响 (mean  $\pm$  SD)

分组	<i>n</i>	TNF- $\alpha$ (ng/g protein)	IL-6 (ng/g protein)	IL-10 (ng/g protein)	ChAT (U/g protein)	NOS (kU/g protein)
NS	8	80.7 $\pm$ 10.3	127.7 $\pm$ 14.1	42.7 $\pm$ 5.4	145.2 $\pm$ 10.2	2.0 $\pm$ 0.4
AP	8	146.3 $\pm$ 17.5 <sup>a</sup>	262.1 $\pm$ 30.2 <sup>a</sup>	61.2 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	225.4 $\pm$ 13.3 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
SHAM	8	200.0 $\pm$ 20.5	305.6 $\pm$ 16.5	97.2 $\pm$ 12.8	463.2 $\pm$ 8.4 <sup>h</sup>	3.5 $\pm$ 0.5
VTM	5	283.8 $\pm$ 33.6 <sup>c</sup>	515.1 $\pm$ 77.1 <sup>d</sup>	110.8 $\pm$ 13.2	448.3 $\pm$ 14.8	2.0 $\pm$ 0.3 <sup>d</sup>
VNS	8	135.6 $\pm$ 11.6 <sup>cf</sup>	166.9 $\pm$ 44.3 <sup>cf</sup>	92.6 $\pm$ 7.2	391.8 $\pm$ 30.7	2.9 $\pm$ 0.5

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs NS; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs SHAM; <sup>f</sup>*P*<0.01 vs VTM; <sup>h</sup>*P*<0.01 vs AP.

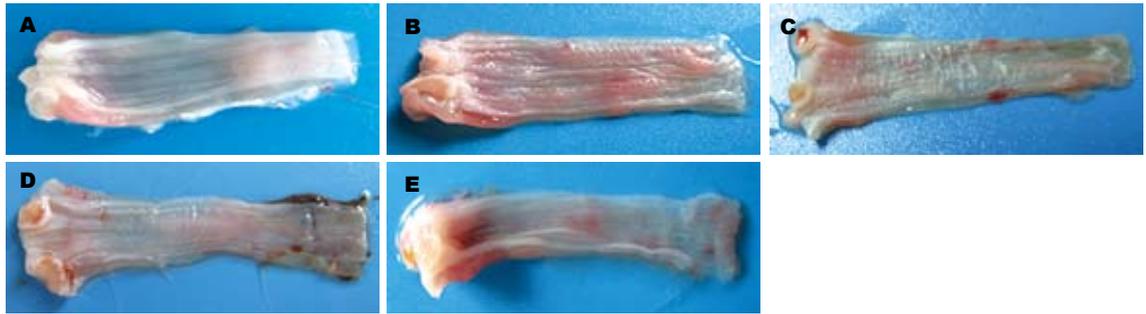


图 1 各组大鼠食管下段肉眼表现。A: 生理盐水滴注组(NS组); B: 盐酸-胃蛋白酶滴注组(AP组); C: 假手术组(SHAM组); D: 迷走神经切断组(VTM组); E: 迷走神经电刺激组(VNS组)。

离断。(4)VTM组: 食管滴酸前,分离双侧颈部迷走神经干后,以4-0丝线结扎并离断。(5)VNS组: 在双侧迷走神经干离断后,左侧迷走神经干远端与双铂电极连接,以5 V(电压)、2 ms(脉冲宽度)、1 Hz(频率)的电流持续刺激30 min(分别在食管滴酸开始前15 min及结束后15 min)<sup>[2]</sup>。

1.2.3 标本处理: 在食管滴注结束1 h后处死大鼠,立即开腹,取下大鼠食管下段组织约1.5-2.0 cm,观察肉眼表现并评分。经冰生理盐水冲洗漂净,然后取小块食管组织置入10%甲醛溶液中固定,标本行常规脱水、石蜡包埋、组织切片和HE染色,光镜下观察食管组织损伤情况并评分。食管炎的评分标准参考既往文献<sup>[6-7]</sup>。采用双盲法观察。剩余的食管组织保存于液氮中。标本收集完成后,待进行组织样本检测前,以生理盐水(pH7.4)制备成匀浆,4℃(3000 r/min, 15 min)离心,取匀浆上清分装保存备检。

1.2.4 指标检测: 根据试剂盒说明操作,通过ELISA方法检测组织匀浆中细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6及IL-10的含量,采用Fonnum法<sup>[8-9]</sup>检测食管组织中ChAT的活力,以及比色法测定NOS的活力,并使用考马斯亮兰法进行组织蛋白定量。

**统计学处理** 应用SPSS13.0统计软件进行数据处理。所有数据均以mean  $\pm$  SD表示。多组均

数比较采用单因素方差分析。组间食管炎评分的比较采用Mann-Whitney U检验。*P*<0.05表示差别具有显著性意义。

## 2 结果

实验过程中,VTM组有3只动物在滴酸约1.5 h后死亡,死亡原因均为食管下段穿孔。其余动物均对食管内滴注及神经通路的干预耐受性良好。

2.1 食管内滴注与神经通路干预对于食管组织TNF- $\alpha$ 、IL-6及IL-10浓度的影响 与NS组相比,AP组食管组织中细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6及IL-10的浓度均有显著升高(*P*<0.05)。SHAM组与AP组的组织细胞因子含量无显著性差异(*P*>0.05)。在行双侧颈部迷走神经切除术后(VTM组),滴酸后的食管组织内TNF- $\alpha$ 和IL-6的浓度明显升高(*P*<0.05或0.01)。而在滴酸前后进行左侧迷走神经的电刺激(VNS组),则使促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 及IL-6的浓度与SHAM组相比显著下降(*P*<0.05)。神经通路干预对于组织内IL-10的浓度并无影响(*P*>0.05,表1)。

2.2 食管组织内ChAT、NOS活力的变化 与NS相比,AP组食管组织内ChAT及NOS的活性均明显增加(*P*<0.05)。SHAM组与AP组比,ChAT的活性进一步升高(*P*<0.01);VTM及VNS组的ChAT活

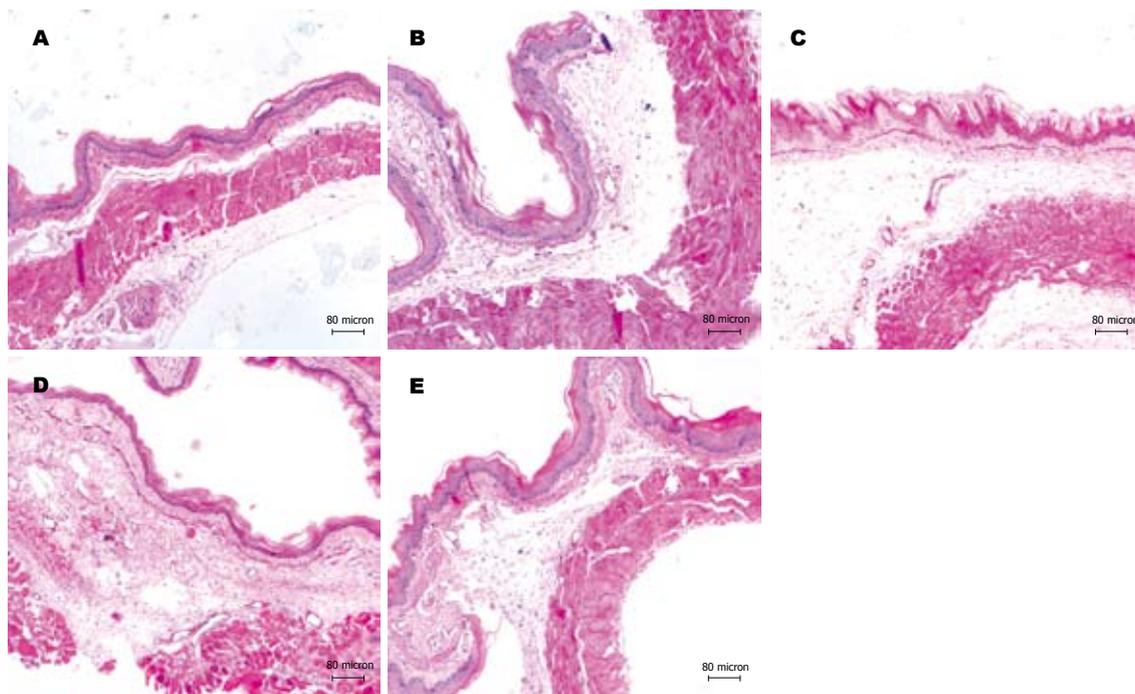


图2 各组大鼠食管下段病理学表现(HE × 10). A: 生理盐水滴注组(NS组); B: 盐酸-胃蛋白酶滴注组(AP组); C: 假手术组(SHAM组); D: 迷走神经切除组(VTM组); E: 迷走神经电刺激组(VNS组).

#### ■ 创新盘点

本研究通过对大鼠食管下段持续滴注0.1mol/L盐酸-胃蛋白酶溶液建立了急性食管炎模型, 观察了胆碱能抗炎通路在该模型中对食管组织中的细胞因子水平、胆碱乙酰转移酶、一氧化氮合成酶的活性以及食管损伤程度的影响, 详细探讨论证CAP在实验性食管炎中的保护作用及机制.

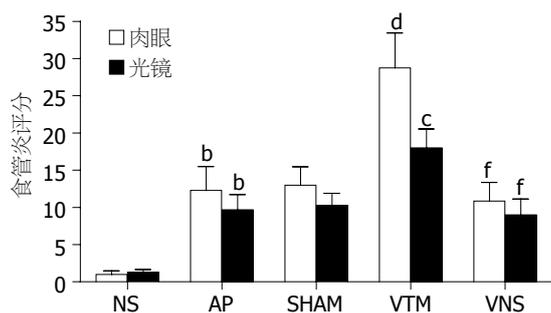


图3 各组大鼠肉眼及光镜下食管炎评分. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs AP; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs SHAM, <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs SHAM; <sup>e</sup> $P < 0.01$  vs VTM.

性与SHAM组比无显著性差异( $P > 0.05$ ). 双侧迷走神经切除术后, 滴酸后的食管组织内NOS活性并无增加, 而出现了显著降低( $P < 0.01$ ); 而进一步的迷走神经电刺激对NOS的活性变化并无显著性影响( $P > 0.05$ , 表1).

**2.3 食管内滴注与神经通路干预对急性食管炎模型大鼠食管组织损伤程度的影响** NS组大鼠下段食管在肉眼上及光镜下表现基本正常(图1A, 图2A). AP组及SHAM组食管组织损伤情况类似, 表现有不同程度的充血、水肿, 少数部位可见黏膜下出血(图1B, 图1C). 光镜下可见基底层细胞增生、核分裂等反应性上皮改变, 部分黏膜有上皮的脱落, 未见糜烂及溃疡形成; 黏膜下层表现为水肿和血管的扩张充血, 甚至出血; 无炎症细胞的浸润(图2B, 图2C). VTM组有3只

大鼠在滴酸1.5 h后死亡, 取出食管后大体肉眼均可见食管下段穿孔及黏膜下大量出血, 该组其余5只大鼠与AP组、SHAM组比, 食管充血和水肿更为明显, 黏膜下出血多见(图1D). 光镜下则可见明显的上皮改变及充血、水肿, 并在黏膜下层出现了少量的中性粒细胞浸润(图2D). VNS组未出现食管穿孔, 肉眼主要表现为充血、水肿, 黏膜下出血少见(图1E). 其光镜下炎症表现也比VTM组明显减轻, 未见炎症细胞的浸润(图2E). 各组食管组织损伤情况的肉眼和光镜评分(图3)与NS组(肉眼 $1.0 \pm 0.5$ 分, 光镜 $1.3 \pm 0.4$ 分)比, 各滴酸组食管下段的大体和镜下食管炎评分均明显高于NS组( $P < 0.01$ ). SHAM组(肉眼 $13.0 \pm 2.5$ 分, 光镜 $10.3 \pm 1.6$ 分)与AP组(肉眼 $12.3 \pm 3.2$ 分, 光镜 $9.7 \pm 2.0$ 分)食管炎评分无显著差异( $P > 0.05$ ). VTM组(肉眼 $28.8 \pm 4.7$ 分, 光镜 $18.0 \pm 2.6$ 分)食管组织大体及光镜评分均较SHAM组有明显升高( $P < 0.01$ 及 $0.05$ ). VNS组(肉眼 $10.9 \pm 2.5$ 分, 光镜 $9.0 \pm 2.1$ 分)食管组织的食管炎评分比VTM组显著降低( $P < 0.01$ ), 与AP组、SHAM组比无显著差异(图3).

### 3 讨论

反流性食管炎是在食管抗反流屏障功能减弱的基础上, 由于反流的胃和/或十二指肠内容物对食管黏膜的侵袭所造成的食管黏膜的损害. 因

### ■应用要点

本研究有助于深入认识GERD发病过程中的神经调节机制,并为合理干预提供理论依据。

此,胃食管反流病、尤其是糜烂性食管炎发生发展的病理本质,最主要是各种攻击因子导致的炎症过程。而细胞因子作为一大类信使蛋白,广泛参与了机体各脏器的炎症反应。近年来,许多研究表明,多种细胞因子在GERD的发病过程中起了重要作用。通过对猫酸滴注诱导食管炎模型的研究发现,食管黏膜中IL-1 $\beta$ 、IL-6的水平高于对照组,并可通过抑制肠肌层的神经元释放乙酰胆碱(acetylcholine, ACh),降低食管下端括约肌的紧张性<sup>[10-12]</sup>。IL-6和IL-10在Barrett食管组织中含量显著增加,提示其在GERD的恶变进展过程中可能起着重要作用<sup>[13-15]</sup>。对于TNF- $\alpha$ 是否在食管炎组织中升高,以往的研究结果并不一致<sup>[10,16-17]</sup>。Cao *et al*<sup>[11]</sup>研究表明,在TNF- $\alpha$ 的影响下,食管平滑肌细胞对于电刺激或ACh作用下的收缩反应有所减弱。本实验通过食管内盐酸-胃蛋白酶溶液的持续滴注,诱发了下段食管肉眼及组织学的损伤,成功制备了大鼠急性食管炎模型。同时通过ELISA的方法检测发现促炎细胞因子IL-6、TNF- $\alpha$ 的浓度在发生炎症的食管组织中明显增加,二者可通过诱导中性粒细胞活化、产生活性氧族及脂质过氧化等作用,并且进一步影响食管平滑肌的张力,促使食管炎症的发生及恶化进展。在本实验模型中,内源性抑炎因子IL-10的含量在病变食管中也显著增多。结合既往的文献报道,考虑机体免疫系统促炎及抗炎机制的调控失衡,可能是食管炎发生发展过程中的一个重要机制。

“胆碱能抗炎通路”的发现,使人们对于迷走神经对炎症的神经-免疫调节功能有了新的认识。神经系统可通过多种通路参与机体免疫反应的调节,其中胆碱能神经通路的机制是近几年研究的新方向。食管的神经支配主要来自于迷走神经,其参与了食管感觉和运动的调控<sup>[18]</sup>。而CAP是否参与食管炎的调控,目前国内尚未见文献报道。本实验在诱发动物食管炎的过程中,进行了迷走神经切断及切断后电刺激的神经通路干预,发现VTM组动物下段食管损伤情况最为严重,甚至导致了滴酸后的食管穿孔;组织内促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6的水平比SHAM组明显升高。在双侧颈部迷走神经切除后再进行神经的电刺激,与VTM组比,食管的炎症损伤情况有明显改善;TNF- $\alpha$ 、IL-6的水平也明显降低。实验结果还提示,神经通路的干预,对于食管炎组织中抗炎细胞因子IL-10的含量无显著影响。因此,本实验结果

表明,迷走神经电刺激能在一定程度上减轻由盐酸-胃蛋白酶刺激引起的食管损伤,即由迷走神经介导的胆碱能抗炎通路,在对于大鼠急性食管炎的调控过程中具有一定的保护作用。体外细胞培养实验也证实<sup>[2]</sup>,迷走神经释放的ACh,通过细胞内信号传导,能抑制内毒素刺激后的巨噬细胞合成和释放促炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-18等,但ACh对抗炎因子IL-10的释放并无影响。迷走神经的抗炎作用是通过免疫细胞上具有 $\alpha 7$ 亚单位的烟碱型(N型)ACh受体来实现的。传入迷走神经将外周免疫信息向中枢神经系统传递,然后激活传出迷走神经,释放ACh,作用于免疫细胞,实现其对炎症的调控。因此,胆碱能神经系统的功能变化在调控食管炎的发病过程中起了重要作用。在本实验中,VNS组食管损伤情况比VTM组有明显减轻,但VNS组与SHAM组的食管炎评分并无显著性差异,考虑一方面是因为迷走神经的电刺激是在神经切断后进行,迷走神经的完整性受到破坏,对炎症程度影响较大;另一方面,对于观察炎症情况的时间以及电刺激强度的选择,也会影响实验结果。这些在今后的研究中可以作进一步的探讨。

胆碱乙酰转移酶(ChAT)广泛分布于胆碱能神经系统中,主要在突触前神经末梢,是神经细胞内ACh的合成酶。以往研究发现<sup>[19-20]</sup>,在体内还存在着非神经元型胆碱能系统,在免疫细胞、血管内皮细胞、肌纤维,还包括消化道的上皮细胞及内分泌细胞内均有ChAT存在,这些细胞均可合成ACh。ChAT的活力反映了胆碱能系统的功能。本实验结果显示AP组食管组织中ChAT的活性比NS对照组明显升高,反映了胆碱能系统功能的增强。食管下段的酸刺激信号,通过迷走神经的感觉传入纤维,激活了高级神经中枢及传出迷走神经,使ChAT的活性增加,ACh释放增多,以进一步调节食管平滑肌的张力及发挥其胆碱能抗炎作用。该过程提示,在急性食管炎发生时,可以活化由迷走神经所介导的防御机制。但另一方面,发生炎症反应的组织产生的促炎细胞因子如IL-1 $\beta$ 、IL-6等,又能反过来抑制ACh的释放<sup>[11]</sup>,削弱了迷走神经在调节食管动力和炎症反应方面的作用,从而促使了食管炎症的加重。既往的实验证实,在慢性食管炎模型中,食管肌层ChAT的活力是下降的<sup>[21]</sup>。推测这可能与慢性炎症使胆碱能神经进一步受损有关,具体机制仍有待研究。我们在实验中还发现,

SHAM组ChAT的活性比AP组进一步升高,除了酸刺激因素以外,考虑可能与假手术中对迷走神经的机械刺激有关.而双侧迷走神经切除,并没有使失去迷走神经支配后的食管内ChAT活性降低.考虑ChAT活性的居高不下,可能与食管组织中独立存在的非神经元型胆碱能系统有关;此外,迷走神经切除后免疫细胞产生的大量TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等细胞因子,也可能通过促进神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的合成,间接使ChAT的活性增加<sup>[22]</sup>.

支配食管的迷走神经由兴奋性胆碱能神经和抑制性非肾上腺能非胆碱能(non-adrenergic non-cholinergic, NANC)神经共同组成.一氧化氮(nitric oxide, NO)作为NANC神经的主要抑制性神经递质,参与了食管下括约肌功能的调节<sup>[23]</sup>.而在食管发生炎症反应时,NO对黏膜的作用具有双重性<sup>[24-26]</sup>.一方面NO有强烈的血管扩张作用,可增加食管黏膜血流以抵抗损伤;还可以通过减少炎症因子间相互作用、抑制胃酸及增加黏膜层厚度等机制起黏膜保护作用.另一方面,NO被认为是重要的炎症介质,不适当的、过量的NO将发挥其细胞毒作用,对组织产生损伤,引起急、慢性炎症.NO由NOS催化产生.在动物模型及GERD患者的实验中均发现,食管组织内NOS的表达明显增多<sup>[27-28]</sup>.本实验结果也证实,与NS组比较,AP组动物食管组织内NOS的活性呈显著增加.提示了发生急性食管炎时,NANC神经的功能也伴随着胆碱能神经活性增加而增强.而在迷走神经切除后,VTM组的组织NOS活性明显下降,进一步的迷走神经电刺激对NOS的活性也没有显著性影响;则提示了发生急性炎症时,食管组织中NOS活性的增加,可能主要是由迷走神经介导.迷走神经切除后,NOS的活性下降,NO合成减少,其黏膜保护作用减弱,可能因此进一步加重了食管黏膜的炎症损害.

总之,迷走神经可以通过胆碱能抗炎通路,在急性食管炎发病过程中起了一定的保护作用.因此,ACh与NO作为迷走神经所释放的最主要的兴奋性和抑制性神经递质,不仅影响着食管的动力,还参与了食管炎症的调控.急性食管炎发生时,迷走神经功能增强,ChAT和NOS的活性增加.然而研究证实,GERD患者的迷走神经传入及传出功能均受损<sup>[29-30]</sup>.因此,本实验的研究结果提示:通过合理调节迷走神经活性,我们或许可以找到一个有效的治疗GERD的新方案.

#### 4 参考文献

- 1 许哲,钟英强.食管炎与细胞因子.国际内科学杂志 2007; 34: 139-142
- 2 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-462
- 3 Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384-388
- 4 Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853-859
- 5 Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 2007; 117: 289-296
- 6 Lanas A, Royo Y, Ortego J, Molina M, Sáinz R. Experimental esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits mimicking human reflux esophagitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 97-107
- 7 Eros G, Kaszaki J, Czobel M, Boros M. Systemic phosphatidylcholine pretreatment protects canine esophageal mucosa during acute experimental biliary reflux. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 271-279
- 8 Waite JJ, Holschneider DP, Scremin OU. Selective immunotoxin-induced cholinergic deafferentation alters blood flow distribution in the cerebral cortex. *Brain Res* 1999; 818: 1-11
- 9 Fonnum F. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem* 1975; 24: 407-409
- 10 Cheng L, Cao W, Behar J, Biancani P, Harnett KM. Inflammation induced changes in arachidonic acid metabolism in cat LES circular muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G787-G797
- 11 Cao W, Cheng L, Behar J, Fiocchi C, Biancani P, Harnett KM. Proinflammatory cytokines alter/reduce esophageal circular muscle contraction in experimental cat esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1131-G1139
- 12 Cao W, Cheng L, Behar J, Biancani P, Harnett KM. IL-1beta signaling in cat lower esophageal sphincter circular muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G672-G680
- 13 Dvorakova K, Payne CM, Ramsey L, Holubec H, Sampliner R, Dominguez J, Dvorak B, Bernstein H, Bernstein C, Prasad A, Fass R, Cui H, Garewal H. Increased expression and secretion of interleukin-6 in patients with Barrett's esophagus. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2020-2028
- 14 Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, Farthing MJ. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut* 2002; 50: 451-459
- 15 Moons LM, Kusters JG, van Delft JH, Kuipers EJ, Gottschalk R, Geldof H, Bode WA, Stof J, van Vliet AH, Ketelslegers HB, Kleinjans JC, Siersema PD. A pro-inflammatory genotype predisposes to Barrett's esophagus. *Carcinogenesis* 2008 Jan 12 [Epub ahead of print]
- 16 Hamaguchi M, Fujiwara Y, Takashima T, Hayakawa T, Sasaki E, Shiba M, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Higuchi K, Arakawa T. Increased expression of cytokines and adhesion molecules in rat chronic esophagitis.

#### ■名词解释

胆碱能抗炎通路:指中枢神经系统的免疫调节信号通过激活传出迷走神经,引起外周神经末梢释放乙酰胆碱,与免疫细胞上具有a7亚单位的N型ACh受体结合,通过细胞内信号传导抑制促炎因子的释放,调控炎症反应.即传出迷走神经具有对炎症反应的神经-免疫调节功能.

### ■同行评价

本文选题、动物模型的构建、立意均较新颖,数据真实可靠,选图精美,论文逻辑性、可读性均较强。

- Digestion* 2003; 68: 189-197
- 17 Yamaguchi T, Yoshida N, Tomatsuri N, Takayama R, Katada K, Takagi T, Ichikawa H, Naito Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Cytokine-induced neutrophil accumulation in the pathogenesis of acute reflux esophagitis in rats. *Int J Mol Med* 2005; 16: 71-77
- 18 牟向东, 谢鹏雁, 刘建湘, 帅晓玮, 李江. 电针刺大鼠足三里穴对LESP血浆胃泌素和胃动素的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1069-1073
- 19 Li J, Chen HZ. [The non-neuronal cholinergic system in immunocompetent cells] *Shengli Kexue Jinzhan* 2005; 36: 193-198
- 20 Jönsson M, Norrgård O, Forsgren S. Presence of a marked nonneuronal cholinergic system in human colon: study of normal colon and colon in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1347-1356
- 21 Cao Y, Xie P, Xing Y. [Role of endogenous cholinergic nerve in esophageal dysmotility with reflux esophagitis] *Zhonghua Neike Zazhi* 2001; 40: 670-672
- 22 Yoshida K, Kakihana M, Chen LS, Ong M, Baird A, Gage FH. Cytokine regulation of nerve growth factor-mediated cholinergic neurotrophic activity synthesized by astrocytes and fibroblasts. *J Neurochem* 1992; 59: 919-931
- 23 Tomita R, Kurosu Y, Munakata K. Relationship between nitric oxide and non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves in human lower esophageal sphincter. *J Gastroenterol* 1997; 32: 1-5
- 24 Lanás AI, Blas JM, Ortego J, Soria J, Sáinz R. Adaptation of esophageal mucosa to acid- and pepsin-induced damage: role of nitric oxide and epidermal growth factor. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1003-1012
- 25 Soteras F, Lanás A, Fiteni I, Royo Y, Jimenez P, Iñarrea P, Ortego J, Esteva F. Nitric oxide and superoxide anion in low-grade esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1802-1809
- 26 Zicari A, Corrado G, Cavaliere M, Frandina G, Rea P, Pontieri G, Cardi E, Cucchiara S. Increased levels of prostaglandins and nitric oxide in esophageal mucosa of children with reflux esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 26: 194-199
- 27 Liu B, Liu X, Tang C, Liu J, Wang H, Xie P. Esophageal dysmotility and the change of synthesis of nitric oxide in a feline esophagitis model. *Dis Esophagus* 2002; 15: 193-198
- 28 黄颖秋, 王昕, 李聪, 刘丽. 胃食管反流病患者食管NOS表达及血清NO含量变化的临床意义. *胃肠病学和肝病杂志* 2000; 9: 273-275
- 29 Heatley RV, Collins RJ, James PD, Atkinson M. Vagal function in relation to gastro-oesophageal reflux and associated motility changes. *Br Med J* 1980; 280: 755-757
- 30 Ogilvie AL, James PD, Atkinson M. Impairment of vagal function in reflux oesophagitis. *Q J Med* 1985; 54: 61-74

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 •

## 北京百世登生物医学科技有限公司第三期编辑培训纪要

本刊讯 2008-01-19下午1时,北京百世登生物医学科技有限公司第三次编辑培训班在北京召开,此次培训由中国科学技术信息研究所马峥老师授课,世界胃肠病学杂志社全体编辑参加培训,培训的主题为“科技期刊引文分析:入门-进阶-精通”。

培训课上,马老师就中国科学技术信息研究所出版的《2007年科技期刊引证报告》中*World Journal of Gastroenterology(WJG)*的各项引文数据进行分析,具体包括总被引频次、影响因子、即年指标、他引率、引用刊数、扩散因子、学科扩散指标、学科影响指标、被引半衰期、来源文献量、文献选出率、参考文献量、平均引文数、平均作者数、地区分布数、机构论文数、海外论文比、基金论文比、引用半衰期和离均差率。

通过此次培训各位编辑了解了科技期刊引文分析指标的含义和计算方法,以及如何使用《中国科技期刊引证报告》中期刊被引用的详细数据。(编务:江艳 2008-07-18)

# 细胞外调节蛋白激酶通路对胃癌细胞化疗效果的影响

刘诗权, 于红刚, 唐国都, 黄杰安, 于皆平

刘诗权, 唐国都, 黄杰安, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

于红刚, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

刘诗权, 2006年武汉大学博士, 主治医师, 主要从事胃癌及肝纤维化的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30300154

作者贡献分布: 此课题由于红刚、刘诗权及于皆平设计; 研究过程由刘诗权操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由于皆平提供; 数据分析由刘诗权及黄杰安完成; 本论文写作由刘诗权、黄杰安及唐国都完成。

通讯作者: 于红刚, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. poempower@163.com

收稿日期: 2008-04-25 修回日期: 2008-06-11

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-18

## Activation of ERK signaling pathway reduces the chemotherapy sensitivity in gastric cancer cells

Shi-Quan Liu, Hong-Gang Yu, Guo-Du Tang, Jie-An Huang, Jie-Ping Yu

Shi-Quan Liu, Guo-Du Tang, Jie-An Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Hong-Gang Yu, Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430026, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30300154

Correspondence to: Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430026, Hubei Province, China. poempower@163.com

Received: 2008-04-25 Revised: 2008-06-11

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular regulated protein kinases (ERK) signaling pathway and chemoresistance in human gastric cancer cell lines SGC7901 and BGC823.

**METHODS:** Cells were exposed to etoposide with or without PD98059 (a special inhibitor of MAPK/ERK pathway). Cell cycle distribution and cell apoptosis analysis were determined using flow cytometry and Hoechst 33258 staining. Cytotoxicity was assessed by determining cell

survival with 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Western blotting was performed to evaluate the phosphorylation level of ERK1/2 and protein expression of c-Myc and P53.

**RESULTS:** Etoposide caused a time- and dose-dependent reduction of cell viability in SGC7901 and BGC823 cells. PD98059 enhanced the cell inhibitory efficiency of etoposide. Compared with control group, the apoptosis rate was elevated in etoposide group ( $19.48\% \pm 1.57\%$  vs  $5.67\% \pm 0.81\%$ ,  $17.38\% \pm 1.49\%$  vs  $4.97\% \pm 0.73\%$ , all  $P < 0.01$ ). Cells treated with and PD98059 showed significantly higher level of apoptotic phenotype than those treated with etoposide alone. The apoptosis rate was  $34.35\% \pm 2.84\%$  and  $32.11\% \pm 3.25\%$  in etoposide and PD98059 groups, respectively ( $P < 0.01$ ). Phosphorylation level of ERK1/2 and expression of c-Myc were significantly induced by etoposide in a time-dependent manner, but there was slight effect on protein expression of P53. PD98059 up-regulated expression of P53 and suppressed the up-regulated c-Myc expression induced by etoposide, strikingly.

**CONCLUSION:** Chemotherapy agent etoposide was able to activate MAPK/ERK signaling pathway of gastric cancer cells SGC7901 and BGC823, which decrease the chemotherapy sensitivity via suppressing the expression of P53 and enhancing the expression of c-Myc. This may be one of the mechanisms responsible for gastric cancer chemoresistance.

**Key Words:** Stomach neoplasm; Extracellular regulated protein kinase; Chemotherapy; Apoptosis

Liu SQ, Yu HG, Tang GD, Huang JA, Yu JP. Activation of ERK signaling pathway reduces the chemotherapy sensitivity in gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2211-2216

### 摘要

**目的:** 观察细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)信号通路对胃癌细胞化疗效果的影响并探讨其机制。

### ■背景资料

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联通路是细胞信号传导的重要途径, 能将募集的多种细胞外信号通过磷酸化活化逐级传递至细胞核, 并激活多种核转录因子, 参与调节细胞多种生理功能, 并在细胞恶性转化及演进中起重要作用。

### ■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

## ■ 研究前沿

磷酸化的ERK(p-ERK)是其活化形式,可介导信号由胞质向胞核传递,促进多种癌基因及细胞周期调节相关基因的转录与表达,参与调节细胞的生长、发育、分化、分裂等多种生理过程,并与细胞的恶性转化密切相关。抗肿瘤药物能够引起白血病细胞和多种癌细胞中MEK/ERK信号传导系统的激活及多药耐药性的产生。然而,MAPK/ERK信号通路在胃癌中的作用以及该通路与胃癌化疗的关系目前仍不清楚。

**方法:** 足叶乙甙作用于胃癌SGC7901和BGC823细胞,采用MTT比色法检测细胞的生存率,采用流式细胞仪和Hoechst33258荧光染色检测细胞周期分布和凋亡,Western杂交法检测ERK1/2的磷酸化以及c-Myc和P53蛋白表达水平。同时采用PD98059抑制ERK信号通路后观察足叶乙甙对细胞增殖、凋亡、c-Myc和P53表达的影响。

**结果:** 足叶乙甙呈时间-剂量依赖性抑制SGC7901和BGC823细胞的生长并明显诱导细胞的凋亡,同时上调ERK1/2的活性(磷酸化水平),并增强c-Myc和P53的表达,与对照组比较,足叶乙甙组凋亡率明显增高(19.48%±1.57% vs 5.67%±0.81%, 17.38%±1.49% vs 4.97%±0.73%, 均 $P<0.01$ ), PD98059可明显增强足叶乙甙的细胞生长抑制作用并提高细胞的凋亡水平,与足叶乙甙组比较,足叶乙甙组+PD98059组凋亡率(34.35%±2.84%, 32.11%±3.25%)明显增加( $P<0.01$ );同时上调足叶乙甙诱导的P53表达,并抑制c-Myc表达的上升趋势。

**结论:** 足叶乙甙可活化胃癌细胞ERK信号通路而影响胃癌细胞的化疗效果,其机制可能是通过抑制P53并上调c-Myc的表达,从而抑制细胞的凋亡实现。

**关键词:** 胃肿瘤; 细胞外调节蛋白激酶; 化疗; 凋亡

刘诗权, 于红刚, 唐国都, 黄杰安, 于皆平. 细胞外调节蛋白激酶通路对胃癌细胞化疗效果的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2211-2216

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2211.asp>

## 0 引言

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)/细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)级联通路是细胞信号转导的重要途径,参与调节细胞多种生理功能,并在细胞恶性转化及演进中起重要作用<sup>[1]</sup>. ERK主要由分子质量分别为44 kDa和42 kDa的ERK1和ERK2蛋白组成. 丝裂原细胞外激酶(mitogen extracellular kinase, MEK)可使ERK1/2磷酸化而影响细胞的增殖、分化和细胞周期的进程<sup>[2]</sup>. 磷酸化的ERK(p-ERK)是其活化形式,可介导信号由胞质向胞核传递,作用于c-Fos、c-Myc、Elk-1等转录因子及核蛋白,促进多种癌基因及细胞周期调节相关基因的转录与表达,参与调节细胞的生长、发育、

分化、分裂等多种生理过程,并与细胞的恶性转化密切相关. 然而,MAPK/ERK信号通路在胃癌中的作用以及该通路与胃癌化疗的关系目前仍不清楚. 本研究应用足叶乙甙及MAPK/ERK信号通路抑制剂PD98059作用于胃癌细胞株SGC7901和BGC823,观察其对胃癌细胞增殖、凋亡、ERK磷酸化以及P53、c-Myc表达的影响,以了解ERK信号通路对胃癌细胞化疗效果的影响并探讨其机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胃癌细胞株SGC7901和BGC823购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库; RPMI 1640培养基和新生小牛血清购自Gibco公司; MTT、DMSO、MEK/ERK抑制剂PD98059和 $\beta$ -actin抗体购自Sigma公司; P53抗体和c-Myc抗体购于Cell Signaling公司; 磷酸化ERK1/2抗体购于Promega公司; ECL化学荧光试剂盒购自Santa-cruz公司; 足叶乙甙购于Alexis Biochemical公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 胃癌细胞常规培养于含100 mL/L灭活新生小牛血清、100 kU/L链霉素和100 kU/L青霉素的RPMI 1640培养液中,培养条件为37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度,每隔2-3天用2.5 g/L胰酶消化,以1:3-1:5传代1次。

**1.2.2 MTT比色法检测细胞增殖活性:** 取对数生长期细胞,接种于96孔培养板,分成7组,分别加入10、20、40  $\mu$ mol/L足叶乙甙; 100  $\mu$ mol/L PD98059预处理2 h后再加入上述不同浓度足叶乙甙,同时以生理盐水代药物作对照组. 每组分别于足叶乙甙作用0、3、6、12、24 h进行MTT检测. 每种药物浓度-时间设立3个平行孔. 以对照组的0 h细胞存活率作为100%,计算细胞存活率. 细胞存活率(%) = 实验孔吸光度(A)值/对照孔A值 $\times$ 100%。

**1.2.3 流式细胞仪检测:** 将对数生长期细胞分成3组,分别加入20  $\mu$ mol/L足叶乙甙; 加入100  $\mu$ mol/L PD98059培养2 h后,再加入20  $\mu$ mol/L的足叶乙甙; 同时以生理盐水代药物作对照组. 足叶乙甙作用24 h后每组收集 $10^6$ 个细胞,冷EDTA-PBS洗二次,乙醇固定,离心,冷EDTA-PBS洗二次, PBS重悬5 min后400目筛网过滤,离心弃上清; 加入PI染色液,并使细胞浓度调节至 $1 \times 10^9$ /L, 4℃避光染色,流式细胞仪检测并分析结果。

**1.2.4 Hoechst33258荧光染色检测凋亡:** 将对数生长期细胞以 $1.0 \times 10^8$ /L密度接种于6孔培养板

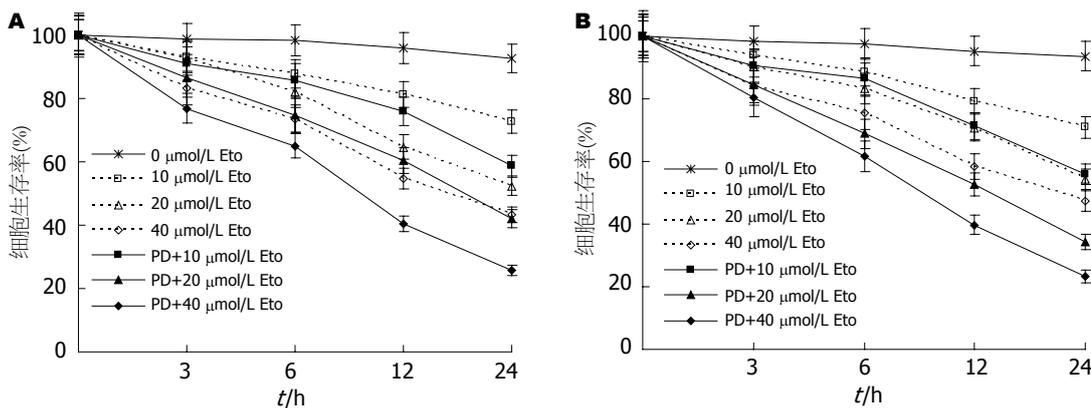


图 1 不同时间、不同浓度足叶乙甙对SGC7901和BGC823细胞的生长抑制作用及PD98059对该过程的影响. A: SGC7901; B: BGC823; PD: PD98059; Eto: 足叶乙甙.

**■ 相关报道**  
在乳腺癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、恶性间皮瘤、肺癌等多种肿瘤中, ERK可被各种因素活化, 抑制ERK的磷酸化水平能抑制肿瘤细胞的生长、运动和浸润并可诱导细胞的凋亡.

表 1 PD98059+足叶乙甙对SGC7901细胞周期和凋亡的影响

分组	细胞周期分布(%)			凋亡率(%)
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
对照组	50.87 ± 5.32	32.51 ± 3.28	13.62 ± 0.98	5.67 ± 0.81
足叶乙甙组	63.34 ± 4.27 <sup>a</sup>	25.69 ± 3.19	10.97 ± 1.26	19.48 ± 1.57 <sup>b</sup>
足叶乙甙+PD98059	73.59 ± 4.95 <sup>bc</sup>	15.89 ± 2.46	10.52 ± 0.93	34.35 ± 2.84 <sup>bd</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs 足叶乙甙组.

(内含盖玻片), 待细胞爬片后药物处理同流式细胞术检测. 足叶乙甙分别作用24 h后将培养液吸出, 固定后取出6孔板中的盖玻片, 漂洗, 室温下自然干燥. 滴加Hoechst33258染液, 37℃避光染色, 漂洗, 晾干封片, 于荧光显微镜450 nm波长处观察并拍照. 每个标本观察400个细胞, 计算其中凋亡细胞的比例, 细胞凋亡指数(AI, %) = 凋亡细胞数/400个细胞 × 100%.

**1.2.5 Western杂交:** 将对数生长期细胞分成2组, 分别加入20 μmol/L足叶乙甙; 先加入100 μmol/L PD98059培养2 h后, 再加入20 μmol/L足叶乙甙. 每组重复5瓶, 加入足叶乙甙后分别培养0、3、6、12、24 h, 加入细胞裂解液, 冰上孵育30 min. 细胞裂解物12 000 r/min低温离心10 min, 取上清液, 用Bradford比色法测定蛋白浓度. 取30 μg加热变性的蛋白, 120 g/L的SDS-PAGE胶电泳, 然后转印至硝酸纤维素膜, 含5%脱脂奶粉的TBST液封闭, 室温振荡2 h, 加一抗4℃振荡过夜, 辣根过氧化物酶标记二抗室温振荡1 h, 采用ECL化学荧光试剂盒检测杂交信号. 然后, X线医学胶片上曝光显影.

**统计学处理** 以上实验均独立重复3次, 数值以mean ± SD表示. 采用Gel-Pro Analyzer4.0软件对Western杂交条带进行A值分析, 以β-actin为系统内参. 所有数据均经SPSS11.0软件分析, 均数

比较采用双侧t检验.

## 2 结果

**2.1 足叶乙甙对胃癌细胞的生长抑制作用及PD98059对该作用的影响** 足叶乙甙时间-剂量依赖性抑制细胞的生长. PD98059可显著增强足叶乙甙对胃癌细胞的生长抑制作用(图1).

**2.2 PD98059对细胞凋亡的影响** 流式细胞仪检测显示足叶乙甙可诱导SGC7901和BGC823细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞, 合用PD98059后细胞凋亡率明显升高(表1-2). Hoechst33258荧光染色显示空白对照组凋亡细胞较少, 呈较弱的弥散均匀荧光; 足叶乙甙作用24 h后细胞核体积变小、皱缩, 其染色质呈浓染的块状或颗粒状, 聚集于核周边或裂解成碎片, 并出现凋亡小体, 凋亡细胞明显增多; 合用PD98059后细胞凋亡率较单独应用足叶乙甙明显升高(P<0.01, 图2).

**2.3 足叶乙甙对ERK1/2活性(磷酸化水平)的影响** 胃癌SGC7901和BGC823细胞无药物干预时有一定程度的ERK1/2磷酸化水平; 足叶乙甙作用后, 胃癌细胞的ERK磷酸化水平逐渐升高, 且呈一定的时间依赖性. 足叶乙甙作用3、6、12、24 h, SGC7901和BGC823细胞ERK磷酸化水平分别为对照组(0 h)的2.17, 8.92, 10.25, 9.92倍和1.72, 2.50, 4.83, 5.33倍; 联合应用PD98059可明显抑

■创新盘点

化疗药足叶乙甙可诱导胃癌细胞MAPK/ERK信号通路的异常激活,而ERK异常激活可通过抑制P53表达并促进c-Myc的表达水平而影响胃癌化疗效果. ERK信号通路抑制剂PD98059能抑制以上通路,从而提高胃癌的化疗敏感性.

表 2 PD98059+足叶乙甙对BGC823细胞周期和凋亡的影响

分组	细胞周期分布(%)			凋亡率(%)
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
对照组	48.24 ± 4.82	35.67 ± 4.61	16.09 ± 1.15	4.97 ± 0.73
足叶乙甙组	64.96 ± 5.47 <sup>a</sup>	23.86 ± 3.08	11.18 ± 1.19	17.38 ± 1.49 <sup>b</sup>
足叶乙甙+PD98059	75.54 ± 4.94 <sup>b</sup>	16.13 ± 2.65	8.33 ± 0.88	32.11 ± 3.25 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.01 vs 足叶乙甙组.

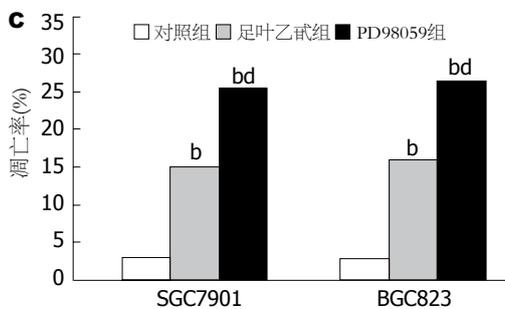
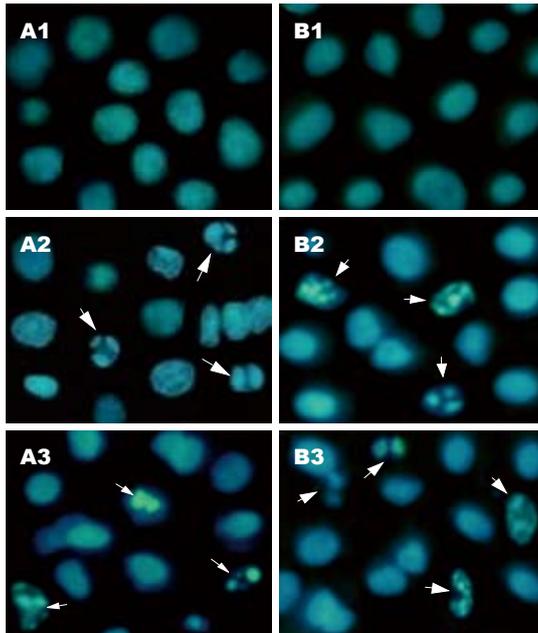


图 2 Hoechst33258荧光染色检测胃癌细胞的凋亡. A1: SGC7901对照组; A2: SGC7901足叶乙甙作用24 h组; A3: SGC7901 PD98059+足叶乙甙作用24 h组; B1: BGC823对照组; B2: BGC823足叶乙甙作用24 h组; B3: BGC823 PD98059+足叶乙甙作用24 h组; C: 各组细胞凋亡指数的比较, 箭头所指为阳性细胞. <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 足叶乙甙组.

制ERK1/2的磷酸化(图3).

2.4 足叶乙甙及PD98059对胃癌细胞c-Myc蛋白表达的影响 c-Myc蛋白表达水平随足叶乙甙作用时间逐渐增强, PD98059明显抑制ERK的磷酸化, 同时明显抑制足叶乙甙诱导的c-Myc蛋白的表达. 足叶乙甙作用3、6、12、24 h, SGC7901和BGC823细胞c-Myc的蛋白表达水平分别为对照组(0 h)的2.13, 3.88, 4.63, 4.88倍和2.67, 3.17,

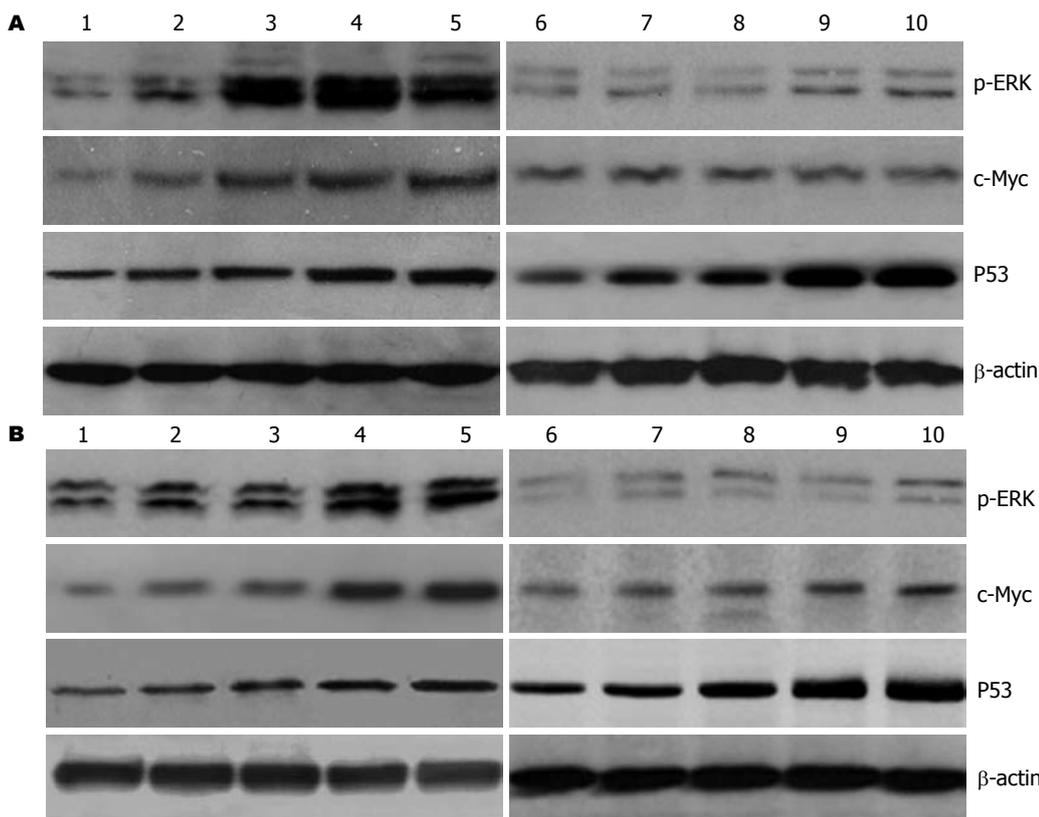
6.50, 8.00倍; PD98059+足叶乙甙作用3、6、12、24 h, SGC7901和BGC823细胞c-Myc的表达水平分别为对照组(0 h)的1.50, 1.61, 1.34, 1.42倍和1.25, 1.50, 1.75, 2.13倍(图3).

2.5 足叶乙甙及PD98059对胃癌细胞P53蛋白表达的影响 P53蛋白表达水平随足叶乙甙作用时间逐渐增强, 但增加趋势较弱. PD98059明显抑制足叶乙甙诱导的ERK磷酸化水平, 并增强P53蛋白的表达水平. 足叶乙甙作用3、6、12、24 h, SGC7901和BGC823细胞P53的表达水平分别为对照组(0 h)的1.23, 1.54, 1.77, 1.85倍和1.47, 1.73, 2.00, 2.67倍; PD98059+足叶乙甙作用3、6、12、24 h, SGC7901和BGC823细胞P53的表达水平分别为对照组(0 h)的1.48, 2.04, 3.70, 4.26倍和1.84, 2.42, 4.11, 5.11倍(图3).

3 讨论

ERK是MAPK系统重要和经典的通路. 在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌等多种肿瘤中, ERK具有高水平的磷酸化或可被各种因素活化, 抑制ERK的磷酸化水平能抑制肿瘤细胞的生长、运动和浸润并可诱导细胞的凋亡<sup>[3-6]</sup>. 研究表明人类胃癌组织中ERK活性较相应正常组织高, CagA可以通过激活ERK1/2信号通路而促进正常胃上皮细胞的转化, 提高发生胃癌的危险性<sup>[7]</sup>. 而且, ERK的活化在幽门螺杆菌诱导的胃癌细胞的转化过程中可能起着重要的作用<sup>[8]</sup>. 抑制ERK1/2的活性, 可降低裸鼠胃癌的微血管密度, 抑制肿瘤的增长和细胞增生, 并可诱导细胞凋亡, 而激活ERK/COX-2/VEGF信号通路可促进裸鼠胃癌的生长和新血管的形成<sup>[9]</sup>. 此外, 激活ERK1/2信号通路可提高胃癌细胞的侵袭能力<sup>[10]</sup>. 总之, MAPK/ERK信号通路活化在胃癌的发生发展过程中起重要作用. 然而MAPK/ERK信号通路在胃癌细胞化疗过程中的作用还有待进一步的研究.

有研究表明ERK信号通路在小细胞肺癌中可被化疗药物激活, 从而使上述癌细胞获得对



**应用要点**  
 MAPK/ERK信号通路的异常激活极可能参与胃癌细胞对化疗药物耐药性的产生, 抑制MAPK/ERK信号通路的激活可能代表着抗胃癌药物发展的新途径。

**图 3** 足叶乙甙以及PD98059+足叶乙甙对胃癌SGC7901细胞(A)和BGC823细胞(B)ERK磷酸化、c-Myc和P53蛋白表达的影响。1: 足叶乙甙作用0 h; 2: 足叶乙甙作用3 h; 3: 足叶乙甙作用6 h; 4: 足叶乙甙作用12 h; 5: 足叶乙甙作用24 h; 6: PD98059+足叶乙甙作用0 h; 7: PD98059+足叶乙甙作用3 h; 8: PD98059+足叶乙甙作用6 h; 9: PD98059+足叶乙甙作用12 h; 10: PD98059+足叶乙甙作用24 h。

化疗药物的抵抗性<sup>[11]</sup>。但在胃癌细胞中还没有相关的报道。本实验中, 化疗药足叶乙甙能明显抑制胃癌细胞株SGC7901和BGC823的生长增殖并显著诱导胃癌细胞的凋亡, 同时ERK的磷酸化水平和活性也明显升高, 且呈时间依赖关系。特异性ERK信号通路抑制剂PD98059不但抑制ERK磷酸化水平, 而且可以明显提高足叶乙甙对胃癌细胞的生长抑制作用和凋亡水平。以上结果说明足叶乙甙可以活化ERK信号通路, 同时降低胃癌细胞的化疗敏感性。ERK信号通路可能参与了胃癌细胞化疗耐药性的产生。然而, 其机制还有待进一步的阐明。

*c-Myc*和*p53*基因是研究较为深入的肿瘤基因。*c-Myc*基因为细胞增殖调控的早期反应基因, 有介导细胞增殖和诱导凋亡双重作用。大多数肿瘤, 包括胃癌, 都检测到了*c-Myc*蛋白的过表达, 而且*c-Myc*蛋白的过表达与细胞的高增殖性、肿瘤的发生、发展以及远处转移密切相关。试验中, 足叶乙甙活化SGC7901和BGC823细胞ERK信号通路, 同时上调*c-Myc*蛋白的表达。PD98059可增强足叶乙甙对SGC7901和BGC823细胞的生长抑制和凋亡诱导作用, 并抑制*c-Myc*

蛋白的表达。表明胃癌细胞中ERK信号通路在调节*c-Myc*活性和表达的过程中起重要的作用。其机制可能是阻断MAPK/ERK信号通路通过抑制*c-Myc*核蛋白体输入片段的活性和蛋白的表达, 阻止*c-Myc*磷酸化而下调*c-Myc*的表达和活性<sup>[12]</sup>。阻断MAPK/ERK通路可能是通过抑制*c-Myc*表达, 从而抑制胃癌细胞的生长和诱导细胞的凋亡。*p53*基因是一种肿瘤抑制基因, 编码磷酸化的核蛋白, 对肿瘤的生长有负性调节作用, 与细胞凋亡密切相关<sup>[13]</sup>。最近, 有研究表明乳腺癌细胞中HER2/neu基因的过表达能够通过激活Akt和ERK信号通路导致野生型P53蛋白含量减少, 可能是HER2/neu过表达乳腺癌患者预后不良及治疗产生抗性的分子机制<sup>[14]</sup>。另有研究表明抑制ERK可以增强*p53*基因的促凋亡作用<sup>[15]</sup>。试验中, PD98059可明显增强足叶乙甙诱导的P53蛋白的表达, 并增强对SGC7901和BGC823细胞的生长抑制和凋亡诱导作用。MAPK/ERK信息通路是重要的生存通路, 阻断MAPK/ERK通路可能是通过促进P53表达, 从而抑制细胞的生长或诱导细胞的凋亡。

由此可见, 足叶乙甙一方面诱导细胞凋亡,

### ■同行评价

本文选题新颖,研究方法科学,行文流畅,对ERK信号通路对胃癌细胞化疗效果的影响及其作用机制提供了有价值的信息,为研究新的抗胃癌药物拓宽了思路,具有很好的学术价值。

另一方面可活化ERK信号通路而影响胃癌细胞的化疗效果。其机制可能是化疗药诱导MAPK/ERK信息通路的异常活化,抑制P53蛋白并促进c-Myc蛋白的表达,从而抑制细胞的凋亡所致。抑制MAPK/ERK信息通路可能是抗胃癌药物发展的新途径。

### 4 参考文献

- 1 Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 395-403
- 2 Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006; 24: 21-44
- 3 Ogunwobi OO, Beales IL. Adiponectin stimulates proliferation and cytokine secretion in colonic epithelial cells. *Regul Pept* 2006; 134: 105-113
- 4 Sawhney RS, Cookson MM, Omar Y, Hauser J, Brattain MG. Integrin alpha2-mediated ERK and calpain activation play a critical role in cell adhesion and motility via focal adhesion kinase signaling: identification of a novel signaling pathway. *J Biol Chem* 2006; 281: 8497-8510
- 5 Dreesen O, Brivanlou AH. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 7-17
- 6 Fortino V, Torricelli C, Capurro E, Sacchi G, Valacchi G, Maioli E. Antiproliferative and survival properties of PMA in MCF-7 breast cancer cell. *Cancer Invest* 2008; 26: 13-21
- 7 Zhu Y, Zhong X, Zheng S, Du Q, Xu W. Transformed immortalized gastric epithelial cells by virulence factor CagA of Helicobacter pylori through Erk mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 2005; 24: 3886-3895
- 8 Kacar F, Meteoglu I, Yasa H, Levi E. Helicobacter pylori-induced changes in the gastric mucosa are associated with mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15: 224-228
- 9 Shin VY, Wu WK, Ye YN, So WH, Koo MW, Liu ES, Luo JC, Cho CH. Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2487-2495
- 10 Pan Y, Zhao L, Liang J, Liu J, Shi Y, Liu N, Zhang G, Jin H, Gao J, Xie H, Wang J, Liu Z, Fan D. Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. *FASEB J* 2006; 20: 1886-1888
- 11 Kraus AC, Ferber I, Bachmann SO, Specht H, Wimmel A, Gross MW, Schlegel J, Suske G, Schuermann M. In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene* 2002; 21: 8683-8695
- 12 Lefevre G, Calipel A, Mouriaux F, Hecquet C, Malecaze F, Mascarelli F. Opposite long-term regulation of c-Myc and p27Kip1 through overactivation of Raf-1 and the MEK/ERK module in proliferating human choroidal melanoma cells. *Oncogene* 2003; 22: 8813-8822
- 13 von Eyben FE. Chromosomes, genes, and development of testicular germ cell tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 151: 93-138
- 14 Kim HS, Hwang JT, Yun H, Chi SG, Lee SJ, Kang I, Yoon KS, Choe WJ, Kim SS, Ha J. Inhibition of AMP-activated protein kinase sensitizes cancer cells to cisplatin-induced apoptosis via hyper-induction of p53. *J Biol Chem* 2008; 283: 3731-3742
- 15 Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Ruvolo V, Andreeff M. Mitogen-activated protein kinase inhibition enhances nuclear proapoptotic function of p53 in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 2007; 67: 3210-3219

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 •

## 世界华人消化杂志名词术语标准

**本刊讯** 本刊名词术语一律标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD<sub>50</sub>, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误,外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则:(1)有对等词者,直接采用原有英语词,如中风stroke,发热fever;(2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词,如八法eight principal methods;(3)英语中没有对等词或相应词者,宜用汉语拼音,如阴yin,阳yang,阴阳学说yinyangology,人中renzhong,气功qigong;汉语拼音要以词为单位分写,如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸),guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(常务副总编辑:张海宁 2008-07-18)

# 小鼠骨髓基质干细胞体外转化为肝细胞最佳诱导体系的筛选及验证

施晓雷, 毛凉, 许碧云, 谢婷, 朱章华, 陈军浩, 李雷, 丁义涛

施晓雷, 毛凉, 谢婷, 朱章华, 丁义涛, 南京大学医学院附属南京鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008  
许碧云, 陈军浩, 李雷, 南京大学医学院附属南京鼓楼医院科研部 江苏省南京市 210008  
施晓雷, 南京大学医学博士, 主治医师, 主要从事干细胞移植治疗肝功能衰竭的治疗。

国家自然科学基金资助项目, No. 30371391;

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2003008

作者贡献分布: 此课题由施晓雷, 毛凉, 许碧云, 谢婷, 朱章华及丁义涛设计; 研究过程由施晓雷, 许碧云, 谢婷, 朱章华, 陈军浩及李雷操作完成; 数据分析由施晓雷与毛凉完成; 本论文写作由施晓雷, 毛凉及丁义涛完成。

通讯作者: 丁义涛, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属南京鼓楼医院肝胆外科. yitaoding@hotmail.com

电话: 025-83304616-66866 传真: 025-83317016

收稿日期: 2008-03-24 修回日期: 2008-05-07

接受日期: 2008-05-12 在线出版日期: 2008-07-18

## Optimization of an effective directed differentiation medium for mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes *in vitro*

Xiao-Lei Shi, Liang Mao, Bi-Yun Xu, Ting Xie, Zhang-Hua Zhu, Jun-Hao Chen, Lei Li, Yi-Tao Ding

Xiao-Lei Shi, Liang Mao, Ting Xie, Zhang-Hua Zhu, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical College, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Bi-Yun Xu, Jun-Hao Chen, Lei Li, Scientific Research Department, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical College, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30371391; the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2003008

Correspondence to: Professor Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical College, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, China. yitaoding@hotmail.com

Received: 2008-03-24 Revised: 2008-05-07

Accepted: 2008-05-12 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To explore the most effective directed differentiation medium (MEDDM) for differentiating mouse bone marrow mesenchymal stem cells (mMSCs) into hepatocytes *in vitro*.

**METHODS:** Eight differentiation medium

groups were arranged following uniform design. Positive expression rates of ALB<sup>+</sup> and CK18<sup>+</sup> cells in each group were determined using flow cytometry. The best suitable factors and their concentrations in MEDDM were then identified using stepwise regression analysis. Determination and confirmation of hepatocytes from mMSCs were performed using RNA and protein expression and synthesis.

**RESULTS:** At concentrations of 35 µg/L hepatocyte growth factor (FGF) and 30 µg/L oncostatin M (OSM), the medium yielded the highest percentage of ALB<sup>+</sup> and CK18<sup>+</sup> cells. During directed differentiation using MEDDM, expression of ALB, CK18, TTR, AFP mRNAs were detected. And ALB and CK18 proteins were detected in cells. On day 21, the ratio of ALB-positive cells was 82.83% ± 9.03%, and the ratio of CK18-positive cells was 74.79% ± 8.41%. The differentiated cells produced albumin and urea in a time dependent manner.

**CONCLUSION:** Uniform design is adequate for choosing the MEDDM of mMSCs. MEDDM containing 35 µg/L FGF and 30 µg/L OSM is effective to differentiate mMSCs into hepatocytes.

**Key Words:** Bone marrow mesenchymal stem cells; Hepatocyte; Differentiation; Uniform design

Shi XL, Mao L, Xu BY, Xie T, Zhu ZH, Chen JH, Li L, Ding YT. Optimization of an effective directed differentiation medium for mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2217-2223

### 摘要

**目的:** 采用均匀设计法筛选及验证小鼠骨髓基质干细胞体外转化为肝细胞的最佳诱导培养体系。

**方法:** 获取小鼠骨髓基质干细胞, 根据均匀设计法分8组进行体外诱导实验. 通过流式细胞术检测各组ALB及CK18的阳性表达率, 通过

### 背景资料

以往研究报道, 在一定的体外条件下, MSC可以向肝样细胞进行分化. 但多数报道仅是对此进行现象观察, 而未重视其可重复性和如何提高分化效率. 本实验通过研究HGF, FGF-4, EGF, OSM这4个因素和ALB和CK18两变量之间的定性和定量关系, 来筛选最佳的因素组合.

### 同行评议者

刘彬彬, 副研究员, 复旦大学附属中山医院、复旦大学肝癌研究所; 潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

## ■ 研发前沿

近年来对骨髓干细胞的研究发现,在体外通过特殊的诱导分化条件,可以使骨髓干细胞分化为肝样细胞。其中,诱导分化条件的设定直接影响诱导后分化的效果。所以对诱导体系的优化是最近该领域的研究重点,而可重复性和诱导效率则是评价诱导体系优劣的最重要的指标。

逐步回归分析法确立最佳细胞因子组合及浓度,从基因水平、蛋白水平以及细胞合成代谢功能检测,证实诱导的细胞为有功能的肝细胞。

**结果:** FGF取35  $\mu\text{g/L}$ , OSM取30  $\mu\text{g/L}$ 时, ALB及CK18的阳性细胞达到最高值。采用该最佳诱导体系诱导过程中可检测到细胞表达ALB mRNA、CK18 mRNA、AFP mRNA、TTR mRNA; 以及ALB、CK18蛋白表达; 第21天最佳体系诱导组ALB阳性细胞的比例为82.83%  $\pm$  9.03%, CK18阳性细胞的比例为74.79%  $\pm$  8.41%。诱导培养过程中细胞分泌尿素及白蛋白,且随诱导时间的延长而增强。

**结论:** 均匀设计法可有效进行最佳诱导体系的筛选,以35  $\mu\text{g/L}$  FGF、30  $\mu\text{g/L}$  OSM为主的诱导培养体系,可以有效地促进骨髓基质干细胞体外定向转化为有功能的肝细胞。

**关键词:** 骨髓基质干细胞; 肝细胞; 分化; 均匀设计

施晓雷, 毛琼, 许碧云, 谢婷, 朱章华, 陈军浩, 李雷, 丁义涛. 小鼠骨髓基质干细胞体外转化为肝细胞最佳诱导体系的筛选及验证. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2217-2223  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2217.asp>

## 0 引言

干细胞是一种具有克隆形成和自我更新能力的细胞,在恰当的条件下或给予不同信号刺激能转化为不同组织来源的细胞<sup>[1]</sup>。目前研究已经证实骨髓中存在一种基质干细胞系能转化为肝细胞<sup>[2-6]</sup>。干细胞的分化过程复杂,细胞外基质及多种可溶性配体组成的信号链,操纵着干细胞的生长、分化及形态发展<sup>[7-8]</sup>。其中,肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、成纤维样细胞生长因子4(fibroblast growth factor-4, FGF-4)、抑瘤素(oncostatin M, OSM)和表皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)等对肝脏的发生发展起重要作用<sup>[9-12]</sup>。之前的研究中,我们采用FGF-4, OSM, HGF和EGF细胞因子作为诱导因子,成功地将小鼠骨髓基质干细胞(mouse bone marrow mesenchymal stem cells, mMSCs)诱导为肝细胞样细胞<sup>[13]</sup>,但影响骨髓基质干细胞体外诱导为肝细胞样细胞的确切因子还未说明。本文,我们对各种细胞生长因子的交互作用进行分析,以期能够筛选出骨髓基质干细胞体外转化肝细胞的最佳诱导体系。并通过mRNA分析,蛋白表达,细胞功能测定等手段检测该最佳

体系在体外将骨髓基质干细胞诱导为肝细胞样细胞的可行性及效果。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SPF级近交系C57BL/6小鼠,体质量10-12 g,购于南京大学模式动物中心。DMEM-LG、IMDM、L-谷氨酰胺(L-glutamine)及FCS购于Hyclone公司; MCDB-201、ITS、地塞米松(dexamethasone)、抗坏血酸、胰岛素(insulin)、青霉素(penicillin)、链霉素(streptomycin)、FITC-连接的二抗、PE-连接的二抗、TRIZOL RNA提取试剂盒II型胶原酶、HRP-连接的二抗、FITC-连接的二抗、PE-连接的二抗、TRITC-连接的二抗及纤维连接蛋白(fibronectin)均购于Sigma公司; 重组人肝细胞生长因子(rhHGF)、重组人碱性成纤维样细胞生长因子4(rhFGF-4)及rhOSM及重组小鼠表皮生长因子(rmEGF)购于RD公司; 抗小鼠白蛋白抗体购于Dako公司; 抗小鼠CK18抗体购于Chemicon公司; TITANIUMTM one-step RT-PCR试剂盒购于Clontech公司; Modified lowry protein assay kit购于Pierce公司; 抗小鼠白蛋白抗体购于Dako公司; 抗小鼠CK18抗体及抗小鼠HNF-3 $\beta$ 抗体购于Chemicon公司; 抗小鼠 $\beta$ -actin抗体购于Abcam公司; DAB(diaminiobenzidine)显色试剂盒购于北京中山生物公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠骨髓基质干细胞的分离与鉴定:** 骨髓基质干细胞的准备如参考文献<sup>[14]</sup>所述,采用SPF级近交系C57BL/6小鼠,无菌条件下从股骨和胫骨抽取新鲜骨髓5-7 mL,悬浮于DMEM-LG培养液,离心去除脂肪等杂质; 细胞重悬后加于密度为1.077 kg/L的Percoll分离液上层,室温下以2200 r/min离心30 min; 吸取Percoll分离液表面的白膜层,洗涤后重悬。台盼蓝染色计算细胞活力,细胞活力>95%才被使用。

骨髓基质干细胞接种于事先用10  $\mu\text{g/L}$ 纤维连接蛋白处理过的培养瓶中,以540 g/L DMEM-LG, 360 g/L MCDB 201, 100 mL/L FCS, 1  $\times$  ITS, 10<sup>-8</sup> mol/L地塞米松, 10<sup>-4</sup> mol/L抗坏血酸, 100 kU/L青霉素, 100 mg/L链霉素, 2 mmol/L L-谷氨酰胺作为基础培养体系。细胞在37 $^{\circ}\text{C}$  5%饱和湿度培养箱中培养。3 d后去除未贴壁细胞并更换新鲜培养液。以后每3-4 d换液1次。细胞达到80%融合后,胰酶消化并传代。通过这种贴壁选择的方法不断纯化骨髓基质干细胞,直至第4代细胞

后开始行干细胞表面标志鉴定。

获取第4代骨髓基质干细胞, 用含50 mL/L FBS的PBS洗涤后, 将 $2 \times 10^5$ 细胞重悬于含20 g/L多聚甲醛的0.5 mL PBS中。在冰浴中避光分别与下列荧光抗体孵育30 min: CD29-PE、CD44-PE、CD90-PE和CD45-FITC, 后通过流式细胞仪检测。

1.2.2 筛选最佳诱导体系: 根据预实验结果, 我们选取4个因子在4个浓度水平进行分析。4因子分别为HGF、FGF-4、EGF和OSM。每个因子设4个浓度, 分别为HGF和FGF-4: 0、20、40、60  $\mu\text{g/L}$ ; EGF和OSM: 0、10、20、30  $\mu\text{g/L}$ 。考虑到各因素之间的交互作用, 并忽略高阶交互作用, 通过查阅和分析, 我们选择比较恰当的8组实验均匀设计表U8(44)(网址: [http://www.math.hkbu.edu.hk/uniform design](http://www.math.hkbu.edu.hk/uniform%20design))。以此为依据, 我们建立了8组不同的诱导培养体系, 分别对骨髓基质干细胞在不同的体系下进行诱导培养。除采用共同的基础培养体系外, 每组按表1添加不同浓度的诱导因子。细胞在37 $^{\circ}\text{C}$  5%饱和湿度培养箱中培养, 每3 d换液1次, 第21天所有细胞消化后进行流式细胞检测。

各组培养第21天细胞消化后顺序与一抗抗小鼠白蛋白、抗小鼠CK18和二抗(FITC-连接的二抗或PE-连接的二抗)孵育, 生理盐水重悬后于流式细胞仪进行检测。

1.2.3 采用最佳诱导体系体外诱导骨髓基质干细胞: 骨髓基质干细胞接种于事先用10  $\mu\text{g/L}$ 的Fibronectin处理过的培养瓶中, 接种密度为 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 。基础培养体系: 540 g/L DMEM-LG, 360 g/L MCDB201, 100 mL/L FCS,  $1 \times \text{ITS}$ ,  $10^{-8}$  mol/L地塞米松,  $10^{-4}$  mol/L抗坏血酸, 100 kU/L青霉素, 100 mg/L链霉素, 2 mmol/L L-谷氨酰胺。诱导组加入下列细胞因子: FGF-4 35  $\mu\text{g/L}$ , OSM 30  $\mu\text{g/L}$ ; 非诱导组(对照组)不加上述细胞因子, 直接以基础培养体系进行培养。在培养过程中, 通过Olympus倒置显微镜观察细胞形态的变化, 第21天所有细胞消化后进行相关检测。

1.2.4 RT-PCR检测肝细胞特异性基因表达: 分别从新鲜mMSCs、非诱导组mMSCs、最佳诱导体系诱导组mMSCs中采用TRIzol试剂抽提总RNA, 并以小鼠肝脏细胞作为阳性对照。RT-PCR采用一步法, 对于ALB、CK18、AFP和TTR, 具体反应条件如下: 50 $^{\circ}\text{C}$  逆转录1 h; 94 $^{\circ}\text{C}$  RNA/DNA杂交变性及逆转录酶失活5 min; PCR: 40个循环, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  退火1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸1

min, 72 $^{\circ}\text{C}$  再延伸5 min。引物序列如下: AFP(184 bp): 5'-GTGAAACAGACTTCCTGGTCCT-3', 5'-GCCCTACAGACCATGAAACAAG-3'; Albumin (148 bp): 5'-TCAACTGTCAGAGCAGAGAAGC-3', 5'-AGACTGCCTTGTGTGGAAGACT-3'; CK18(127 bp): 5'-TGGTACTCTCCTCAATCTGTG-3', 5'-CTCTGGATTGACTGTGGAAGTG-3'; TTR(105 bp): 5'-TCTCTCAATTCTGGGGGTTG-3', 5'-TTTCACAGCCAACGACTCTG-3'; Beta-actin(587 bp): 5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAA GATGAC-3', 5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGC CAGAC-3'。所有引物由上海生物工程公司合成, 以 $\beta$ -actin作为内参, 扩增产物在含有溴化乙锭的10 g/L琼脂糖凝胶上电泳, 电泳结果应用紫外成像分析。

1.2.5 免疫荧光染色检测ALB及CK18: 将非诱导组21 d的细胞及诱导组第21天的细胞离心涂片, 用4%多聚甲醛室温固定10 min、-20 $^{\circ}\text{C}$  甲醇固定2 min后, 用山羊血清室温封闭1 h。分别进行下列反应: 1:100抗小鼠白蛋白单抗室温作用1h, 1:100 FITC标记二抗1 h; 1:100抗小鼠CK18单抗室温作用1 h, 1:100 TRITC标记二抗1 h。以小鼠肝细胞作为阳性对照, PBS替代一抗作为阴性对照, 最后用荧光显微镜观察。

1.2.6 流式细胞术检测ALB+和CK18+细胞: 培养第21天细胞消化后顺序与一抗抗小鼠白蛋白、抗小鼠CK18和二抗(FITC-连接的二抗或PE-连接的二抗)孵育, 生理盐水重悬后上机检测。

1.2.7 白蛋白分泌功能检测: 在诱导组和非诱导组分别取第3、6、9、12、15、18、21天的细胞培养液, 以小鼠肝细胞作为阳性对照, 包被缓冲液以1:100稀释特异性抗小鼠白蛋白抗体并包被96孔板, 每孔加入100  $\mu\text{L}$ 抗体稀释液, 孵育60 min; 移去上述液体后, 洗液洗涤; 每孔加入200  $\mu\text{L}$ 封闭液, 孵育30 min, 移去上述液体后, 用洗液洗涤3遍; 用样品稀释液倍比稀释标准品(即小鼠参照血清), 其浓度由10 000  $\mu\text{g/L}$ , 500  $\mu\text{g/L}$ 至7.8  $\mu\text{g/L}$ , 用于制作标准曲线; 将稀释的标准品及样品以100  $\mu\text{L}$ /孔加入96孔板内(每一时点均有复孔), 孵育60 min, 移去孔内液体并清洗, 将HRP以1:10 000稀释后加入样品孔内, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 孵育60 min, 移去孔内液体并清洗; 加入酶显色剂TMB后孵育30 min; 加入2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  100  $\mu\text{L}$ /孔终止显色反应, 酶标仪测A值(TMB检测波长为450 nm), 绘制曲线。

1.2.8 尿素合成实验: 在诱导组和非诱导组分

#### ■ 相关报道

在骨髓干细胞体外向肝细胞转化的研究中, 细胞因子HGF、HGF和EGF, HGF和/或FGF-4均有采用, 但这些细胞因子间的相互作用以及如何组合搭配方能提高可重复性、获得较高的诱导效率则尚无相关研究报道。

### ■ 创新盘点

本实验借助统计学均匀设计的方法,研究了不同诱导因子在诱导体系中的作用,进而筛选出最佳诱导体系需含的诱导因子种类及浓度,并采用该最佳诱导体系成功且高效地将骨髓基质干细胞在体外诱导分化为肝样细胞。

别取第3、6、9、12、15、18、21天的细胞,在培养体系中加入5 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 于37°C在50 mL/L  $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育24 h,通过日立全自动生化分析仪测量细胞上清液中尿素的浓度.小鼠肝细胞用于阳性对照,培养液用于阴性对照。

**统计学处理** 使用SPSS-15.0软件进行统计学分析.连续性资料两个样本均数比较用Student's test,多组样本均数比较用One-ANOVA及Student-Newman-Keuls post-hoc比较.检验水准: $P = 0.05$ .

## 2 结果

**2.1 小鼠骨髓基质干细胞鉴定** CD29, CD44, CD45和CD90作为细胞表面标志进行流式鉴定,超过90%的P4细胞为CD45阴性,CD29, CD44, CD90阳性。

**2.2 最佳诱导体系筛选** 各组细胞ALB和CK18阳性表达率见表2. 变量定义:  $X_1$ - $X_4$ 分别代表4个细胞生长因子HGF、FGF-4、EGF和OSM,  $X_5$ - $X_{14}$ 为其二阶主效应及交互项. 他们分别表示:  $X_5 = X_1 \times X_1$ ;  $X_6 = X_2 \times X_2$ ;  $X_7 = X_3 \times X_3$ ;  $X_8 = X_4 \times X_4$ ;  $X_9 = X_1 \times X_2$ ;  $X_{10} = X_1 \times X_3$ ;  $X_{11} = X_1 \times X_4$ ;  $X_{12} = X_2 \times X_3$ ;  $X_{13} = X_2 \times X_4$ ;  $X_{14} = X_3 \times X_4$ . 其中 $X_5 = X_1 \times X_1$ 表示变量 $X_5$ 是变量 $X_1$ 的二阶主效应,  $X_9 = X_1 \times X_2$ 表示变量 $X_9$ 是 $X_1$ 与 $X_2$ 的交互项,依次类推.  $Y_{11}$ 代表“ALB”%;  $Y_{12}$ 代表“CK18”%. 逐步回归分析: 由于无细胞因子培养体系中不会出现ALB和CK18阳性细胞数,因此在建模时不考虑截距项,变量筛选采用向前法,变量进入模型的显著性水平定为0.05. 对于 $Y_{11}$ 的筛选结果,只有 $X_4$ 进入模型,回归模型为 $Y_{11} = 2.82629 \times X_4$ ;  $R^2 = 0.6873$ ,提示 $Y_{11}$ 与 $X_4$ 有关,且取最大值35  $\mu\text{g/L}$ 时 $Y_{11}$ 达到最大. 对于 $Y_{12}$ 的筛选结果,回归模型为 $Y_{12} = 2.77339 \times X_2 - 0.03840 \times X_2 \times X_2 + 1.03535 \times X_4$ ;  $R^2 = 0.9465$ . 解该方程的方法: 每个因素的浓度以5个单位递增,寻找不同组合下的最大值,结果为:  $X_2 = 35 \mu\text{g/L}$ ,  $X_4 = 30 \mu\text{g/L}$ 时,  $Y_{12}$ 最大. 35  $\mu\text{g/L}$  FGF和30  $\mu\text{g/L}$  OSM时为我们筛选的理想结果。

**2.3 最佳诱导体系可高效诱导骨髓基质干细胞**

**2.3.1 肝脏特异性标记物基因的表达:** 诱导组21天肝脏特异性标记物基因ALB、CK18、TTR和AFP均有表达,而新鲜mMSCs及非诱导组则无表达,小鼠肝细胞为阳性对照(图1)。

**2.3.2 肝脏特异性标记物的蛋白表达:** 诱导组中,细胞同时表达ALB和CK18, ALB表达于胞质和

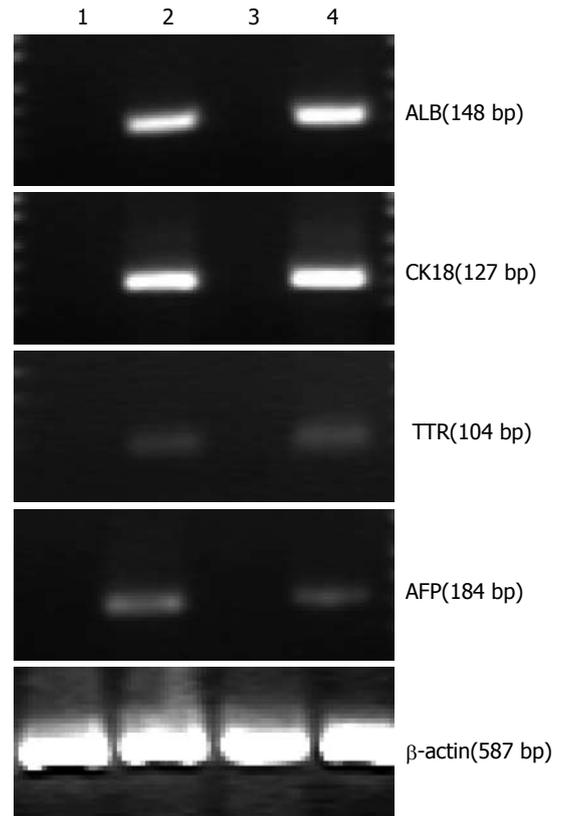


图1 RT-PCR结果. 1: 新鲜mMSCs; 2: 最佳诱导体系培养第21天mMSCs; 3: 基础培养基培养第21天mMSCs; 4: 小鼠肝细胞。

胞膜, CK18表达于胞质(图2). 第21天流式细胞术检测诱导组ALB阳性细胞的比例为 $82.83\% \pm 9.03\%$ , CK18阳性细胞的比例为 $74.79\% \pm 8.41\%$ .

**2.3.3 肝细胞功能实验:** 在诱导组中,细胞从3 d以后开始分泌ALB,并随着诱导时间的延长,分泌ALB量不断增多;到第15天时,ALB的分泌达到高峰,以后随着诱导时间的延长,ALB分泌量略有减少,但仍维持在较高水平(图3)在诱导组中,细胞第3天开始具有合成尿素的能力,并随着诱导时间的延长,合成尿素的功能不断增强,到第15天时,尿素的合成达到高峰,以后随着诱导时间的延长,尿素合成略有减少,但仍维持在较高水平(图4)。

## 3 讨论

肝脏的发生发育需要一系列生理过程. 在该过程中,多种生长因子和细胞因子参与肝脏的发生发展. 小鼠的胎肝发生于胚胎期第9天,在胚胎发育过程中,肝脏属于内胚层来源,由前肠内胚层和心脏源性中胚层的相互作用而形成<sup>[15-16]</sup>. 在此过程中,FGF-4可以作用于肝脏发生的起始阶段,参与了内胚层向肝脏的转化<sup>[9]</sup>,OSM则在胚胎发育的中晚期对肝脏的发育成熟具有重要

表 1 实验分组 (μg/L)

分组	HGF	FGF-4	EGF	OSM
1	40	0	10	0
2	20	40	30	0
3	0	20	0	10
4	40	0	20	30
5	40	40	0	30
6	60	60	30	10
7	0	60	10	20
8	60	20	30	20

表 2 各组细胞ALB和CK18阳性表达率 (mean ± SD, %)

分组	ALB	CK18
1	47.76 ± 9.84	19.85 ± 5.12
2	52.48 ± 10.12	47.21 ± 8.64
3	78.95 ± 11.23	69.54 ± 9.79
4	47.54 ± 8.76	39.95 ± 8.22
5	85.91 ± 11.67	67.37 ± 10.01
6	29.44 ± 5.61	47.83 ± 6.91
7	50.88 ± 9.53	44.74 ± 9.22
8	90.43 ± 10.71	57.22 ± 9.87

■应用要点

实验者通过均匀设计的方法进行实验分组, 每组搭配不同的诱导因子及浓度. 在规定的诱导时间, 对各组有多少干细胞分化为肝细胞进行计数, 经过统计学分析计算后, 找到具体的诱导因子及其浓度. 采用以上的最佳诱导体系, 从细胞形态, 特征性基因、蛋白质表达情况, 以及合成、代谢功能的检测, 来验证分化得到的是有功能的肝细胞.

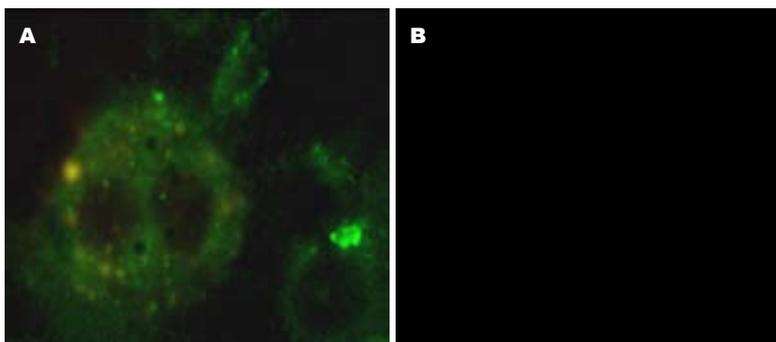


图 2 免疫荧光染色. A: 最佳体系诱导组21 d细胞ALB-FITC(绿色)+CK18-TRITC(红色), 但在同一滤光片下为橙黄色); B: 非诱导组细胞ALB-FITC+CK18-TRITC(未显色 × 1000).

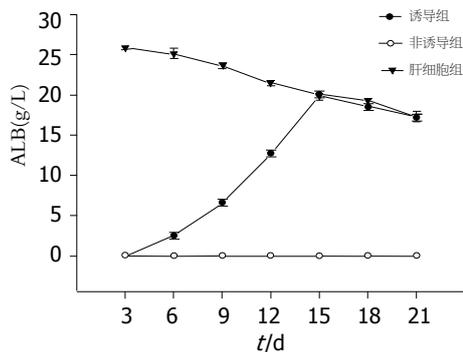


图 3 白蛋白分泌量检测.

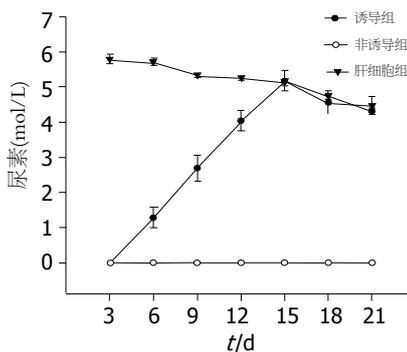


图 4 尿素分泌量检测.

作用<sup>[10]</sup>. 另外, HGF对于肝脏的产生、分化以及出生后肝脏的成熟过程中具有重要作用<sup>[11]</sup>. 其他细胞因子如EGF, TGF等在肝脏发育及再生过程中也有重要作用<sup>[12]</sup>.

细胞体外诱导分化的条件可能有别于体内. 在骨髓干细胞体外向肝细胞转化的研究中, HGF<sup>[17-19]</sup>, HGF和EGF<sup>[20]</sup>, HGF和/或FGF-4<sup>[21]</sup>均有采用, 但是目前仍未有对其相互作用做系统深入研究的报道. 在体外的诱导培养条件中, HGF, FGF-4, EGF, OSM<sup>[9-12,15]</sup>对骨髓干细胞转化为肝细胞是否都有作用? 他们之间有无交互作用? 本研究的目的是通过统计学交叉设计分组研究的方法, 对各种细胞生长因子的交互作用进行探讨, 以期能够筛选出骨髓单个核细胞体外转化肝细胞的最佳诱导体系. 并采用通过RNA

水平、蛋白水平以及细胞的功能实验3方面检测来验证该最佳体系的实际诱导效果. 我们之前的研究清晰地显示采用FGF-4, OSM, HGF和EGF<sup>[13]</sup>可以将骨髓基质干细胞诱导为肝细胞样细胞, 所以我们选取该4个因子在4个不同浓度水平进行分析. ALB和CK18是目前认同的可以用来确定细胞是否为肝细胞的标记物<sup>[16-18]</sup>. 故我们选择ALB和CK18作为2变量, 通过研究HGF, FGF-4, EGF, OSM这4个因素和CK18和ALB 2变量之间的定性和定量关系, 来筛选最佳的因素组合.

通常采用的实验设计方法有全面实验法、正交实验法和均匀设计法. 全面实验法是让每个因素的每个水平都有配合的机会, 并且配合的次数一样多, 其优点是结论较精确, 缺点是实验次

### ■同行评价

本文实验设计合理,方法得当,结果可靠,有较好的学术价值。

数太多<sup>[24]</sup>。本实验设计4因素4浓度水平的研究,如果使用全面实验法,所要分的实验组或实验次数为256组/次,显然不符合实验实际情况;正交实验法是使用一套规格化的正交表,排出最有代表新的实验,合理节省实验次数,并从实验数据中充分提取所需信息,特点是具有均匀分散,整齐可比性。在正交实验中,如果有s个因素,他们各取q个水平,如果高阶交互作用可以忽略不计,其实实验数n必须大于 $s(q-1)+0.5s(s-1)(q-1)$ <sup>[25-27]</sup>。本实验如果考虑使用正交设计,在高阶交互作用忽略不计情况下,实验次数还需要66次,也不符合实验实际情况。故我们采用4因素4水平的均匀设计法,均匀设计是一种以最少的实验次数揭示事物本质的实验设计与参数优化方法,每因素容纳较多的水平,不考虑“整齐可比”而保持“均衡分散”,用多元回归分析等数理统计手段对实验结果进行定量分析,按均匀设计表即U表安排实验,用更少的实验次数获取更多的信息<sup>[27-28]</sup>。因此,这种实验方法的主要优点为:第一,实验次数少,节约时间和成本;第二,可以考虑因素之间的交互作用;第三,能够建立描述各实验因素在其条件范围内与实验指标间关系的数学模型(建立回归模型),筛选变量方便;第四,在建立了有效回归模型后找出使实验指标达到最好的各实验因素间的水平组合方式,使实验条件最优化;第五,均匀设计表即U表在网上可以直接查阅并使用,网址为www.math.hkbu.edu.hk/uniform design<sup>[28-29]</sup>。

以此为依据,我们建立8组不同的诱导培养体系,分别对骨髓基质干细胞在不同的体系下进行诱导培养。我们选择ALB和CK18阳性细胞的百分率作为研究的变量。通过流式细胞仪检测在不同诱导体系下ALB和CK18阳性细胞的百分率。实验结果通过线性回归分析,我们发现CK18的表达和FGF与OSM有关;ALB的表达和OSM有关。结合肝脏发生发育过程中,各细胞因子和生长因子对肝脏发生发育的影响和作用<sup>[9-10,15-16]</sup>,我们在体外实验中筛选的结果和肝脏发生发育的理论是吻合的,说明均匀设计实验方法在本实验设计中运用是准确的,研究结果可靠。

为了验证最佳诱导体系的诱导效率及效果,我们通过RNA水平、蛋白水平以及细胞的功能实验三方面研究和鉴定。首先,我们选择AFP, ALB, CK18和TTR作为肝细胞特异性标记。AFP是内胚层分化以及胎肝细胞早期的标记;ALB在胎肝细胞中开始表达,成熟肝细胞表达最

高<sup>[22]</sup>;CK18是细胞骨架蛋白,表达于成熟肝细胞;TTR在肝脏发育的整个过程都有表达<sup>[30]</sup>。本实验中,我们在干细胞诱导的过程中,在基因水平和蛋白水平均检测到以上标志的表达。体外诱导转化的细胞还能够合成尿素和分泌白蛋白,这些合成功能有时间依赖性。尽管肝细胞和肾小管上皮均能产生尿素,而白蛋白的产生是肝细胞特有的功能活动<sup>[31]</sup>。因此实验的结果足以说明诱导的细胞表现了肝细胞的合成和代谢功能。并且其诱导效率高于以往研究报道<sup>[13]</sup>。研究结果表明,通过以FGF-4和OSM等诱导因子为主建立的诱导体系的培养,骨髓基质干细胞可以转化为具有肝细胞形态,结构和功能的细胞,诱导体系的建立是成功的。同时,诱导体系中采用FGF-4 35  $\mu\text{g/L}$ 和OSM 30  $\mu\text{g/L}$ 可以获得最佳的诱导结果,具有合理性和有效性。该结果有助于其在人工肝支持系统以及肝细胞输注方面的应用。

均匀设计实验方法可以有效筛选出骨髓基质干细胞体外分化为肝细胞的最佳诱导体系,以35  $\mu\text{g/L}$  FGF、30  $\mu\text{g/L}$  OSM为主的诱导培养体系,可以有效地促进骨髓干细胞体外定向转化为肝细胞。

## 4 参考文献

- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-168
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49
- Hemler ME, Rutishauser U. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Editorial overview Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 539-541
- Birchmeier C, Brohmann H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells.

- Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 725-730
- 9 Wells JM, Melton DA. Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 393-410
  - 10 Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 797-819
  - 11 Somerset DA, Afford SC, Strain AJ, Kilby MD. Fetal growth restriction and hepatocyte growth factor. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 77: F244-F248
  - 12 Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001; 492: 90-94
  - 13 Shi XL, Qiu YD, Wu XY, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, Li L, Ding YT. In vitro differentiation of mouse bone marrow mononuclear cells into hepatocyte-like cells. *Hepatol Res* 2005; 31: 223-231
  - 14 Levite M, Meshorer A, Reisner Y. A rapid method for obtaining murine bone marrow cells in high yield. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 225-227
  - 15 Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 2000; 92: 83-88
  - 16 Zaret KS. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 568-574
  - 17 Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, Luk JM. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 712-716
  - 18 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504
  - 19 Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 98-104
  - 20 Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 24-30
  - 21 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
  - 22 Pan CJ, Lei KJ, Chen H, Ward JM, Chou JY. Ontogeny of the murine glucose-6-phosphatase system. *Arch Biochem Biophys* 1998; 358: 17-24
  - 23 Tateno C, Yoshizato K. Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. *Am J Pathol* 1996; 149: 1593-1605
  - 24 Atkinson AC, Donev AN. Optimum Experimental Designs. Oxford, Clarendon Press: 1992
  - 25 Goupy JL. Methods for experimental design: Principles and Application for physicists and Chemists. Amsterdam, Elsevier: 1993
  - 26 方开泰, 均匀. 数论方法在实验设计的应用. *应用数学学报* 1980; 3: 363-372
  - 27 曾昭钧. 均匀设计及其应用. 第1版. 沈阳: 辽宁人民出版社, 1994: 54-60
  - 28 Fang KT, Lin DKJ, Winker P, Zhang Y. Uniform design: Theory and Applications. *Technometrics* 2000; 42: 237-248
  - 29 Liang YZ, Xu QS, Xu QS. Uniform design and its applications in chemistry and chemical engineering. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2001; 58: 43-57
  - 30 Makover A, Soprano DR, Wyatt ML, Goodman DS. An in situ-hybridization study of the localization of retinol-binding protein and transthyretin messenger RNAs during fetal development in the rat. *Differentiation* 1989; 40: 17-25
  - 31 Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML. Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* 1991; 7: 237-245

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 2008-07-18)

# 补肾柔肝方对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化后CTGF mRNA表达的影响

张斌, 王灵台

## ■背景资料

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化发展的必经之路, 目前认为肝纤维化通过积极治疗是可以逆转的, 但关键是早期得到及时诊断和治疗。补肾柔肝方能显著降低肝纤维化大鼠血清纤维化相关指标, 改善肝组织病理学损害, 有效的干预大鼠肝纤维化。

张斌, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院感染科 上海市 200433

王灵台, 上海中医药大学附属曙光医院肝病科 上海市 200021

张斌, 主治医师, 博士, 主要从事肝病方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由张斌和王灵台共同设计; 研究过程由张斌操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王灵台提供; 数据分析由张斌完成; 本论文写作由张斌完成。

通讯作者: 张斌, 200433, 上海市长海路174号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院感染科. zhxy2010@163.com  
电话: 021-25070610

收稿日期: 2008-04-30 修回日期: 2008-06-10

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-18

## Effects of kidney-tonifying liver-emoliating formula on connective tissue growth factor mRNA expression in hepatic fibrosis rats

Bin Zhang, Ling-Tai Wang

Bin Zhang, Department of Infectious Diseases, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Ling-Tai Wang, Department of Liver Diseases, Shuguang Hospital, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

Correspondence to: Bin Zhang, Department of Infectious Diseases, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 174 changhai Road, Shanghai 200433, China. zhxy2010@163.com

Received: 2008-04-30 Revised: 2008-06-10

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-18

## Abstract

**AIM:** To investigate effects of kidney-tonifying liver-emoliating formula (KTLEF) on expression of connective tissue growth factor (CTGF) mRNA in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis rats and thereby to elucidate its therapeutic effects and its underlying molecular mechanism.

**METHODS:** Forty male Wistar rats were randomly assigned to normal control group ( $n = 10$ ), model group ( $n = 15$ ) and KTLEF-treated group ( $n = 15$ ). Except the normal control group, all the rats received intraperitoneal DMN injection once a day for 3 successive days for 4 wk.

Then only the model group was given KTLEF for another 4 wk. Rats were all executed at week 8. The serum liver fibrosis markers, such as HA, LN and IV-C, were measured using ELISA and RIA. The Hepatic inflammatory necrosis and collagen deposition were determined by HE staining and Sirius red staining, and CTGF mRNA expression was detected using RT-PCR.

**RESULTS:** The rat model of liver fibrosis induced by DMN was successfully constructed. Serum HA, LN and IV-C levels were significantly declined in BSRGF-treated group compared with those in the model-group (HA:  $319.75 \pm 63.23$  pg/L vs  $434.44 \pm 98.81$  pg/L; LN:  $44.83 \pm 4.09$  pg/L vs  $70.67 \pm 6.32$  pg/L; IV-C:  $52.79 \pm 5.71$  pg/L vs  $79.39 \pm 10.52$  pg/L, all  $P < 0.01$ ). The expression level of CTGF mRNA was lower in the KTLEF-treated group than that in the fibrosis model group (CTGF/ $\beta$ -actin:  $0.76 \pm 0.10$  vs  $1.08 \pm 0.17$ ,  $P < 0.01$ ), and the least in the normal control group.

**CONCLUSION:** The expression of CTGF mRNA is increased in the hepatic fibrosis rats, and is supposed to be one possible mechanism of hepatic fibrosis. KTLEF can significantly inhibit CTGF mRNA expression and then effectively counteract hepatic fibrosis.

**Key Words:** Kidney-tonifying liver-emoliating formula; Hepatic fibrosis; Dimethylnitrosamine; Connective tissue growth factor; Animals; Laboratory

Zhang B, Wang LT. Expression of connective tissue growth factor mRNA in hepatic fibrosis rats and the therapeutic effects of Bushen Rougan Recipe. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2224-2228

## 摘要

**目的:** 探讨中药复方补肾柔肝方对二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导大鼠肝纤维化后肝脏组织结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF) mRNA的表达影响, 以了解其对肝纤维化的治疗作用和分子机制。

## ■同行评议者

张声生, 教授, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心

**方法:** ♂ Wistar大鼠40只, 随机分为正常对照组( $n=10$ )、模型组( $n=15$ )及治疗组( $n=15$ )。模型组和治疗组以10 mg/kg的剂量腹腔注射DMN, 每天1次, 每周连续3 d, 共4 wk。模型组在造模结束后给予生理盐水ig, 而治疗组在造模结束后给补肾柔肝方ig进行治疗干预, 用药4 wk。第8周末处死全部大鼠, 用放射免疫试剂盒方法检测血清胶原成分HA、LN及IV-C的含量; 用HE和天狼猩红染色法观察肝组织的炎症及纤维增生情况。并采用RT-PCR半定量方法, 探讨大鼠肝组织CTGF mRNA的表达水平。

**结果:** 治疗组大鼠一般状态明显好于模型组; 正常组大鼠无死亡, 模型组死亡率为40%, 治疗组死亡率20%。模型组血清胶原成分HA、LN及IV-C的含量较正常组显著增高, 治疗组较模型组显著下降(HA:  $319.75 \pm 63.23$  pg/L vs  $434.44 \pm 98.81$  pg/L; LN:  $44.83 \pm 4.09$  pg/L vs  $70.67 \pm 6.32$  pg/L; IV-C:  $52.79 \pm 5.71$  pg/L vs  $79.39 \pm 10.52$  pg/L, 均 $P<0.01$ )。DMN可以成功诱导大鼠肝纤维化, 模型组肝组织CTGF mRNA表达明显增强, 中药复方治疗组与模型组相比明显减弱(CTGF/ $\beta$ -actin:  $0.76 \pm 0.10$  vs  $1.08 \pm 0.17$ ,  $P<0.01$ ), 而正常对照组表达较少。

**结论:** CTGF mRNA的表达可能与肝纤维化的发生密切相关, 中药复方补肾柔肝方具有较好的抗肝纤维化作用, 可以显著抑制大鼠肝组织CTGF mRNA的表达。

**关键词:** 补肾柔肝方; 肝纤维化; 二甲基亚硝胺; 结缔组织生长因子; 动物; 实验

张斌, 王灵台. 补肾柔肝方对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化后CTGF mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2224-2228

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2224.asp>

## 0 引言

肝纤维化是肝脏对各种原因所致肝损伤的创伤愈合反应, 表现为肝内结缔组织增生与沉积。细胞因子促进肝纤维化的作用已较明确, 尤其是转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )、金属蛋白酶组织抑制因子1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)和血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等, 他们可直接作用于肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)和肝细胞等, 使其增殖和活化<sup>[1-7]</sup>。尽管如此, 人们对肝纤维化的形成机制仍没有清楚。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是转化生长因子(transforming growth factor,

TGF)的下游效应介质, 可诱导纤维母细胞细胞外基质成分基因的表达, 多数学者认为与肝纤维化关系密切<sup>[8-10]</sup>, 但是也有学者持不同意见<sup>[11]</sup>, 为此, 我们运用二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导大鼠肝纤维模型, 观察CTGF在肝纤维化大鼠肝组织内的表达状况, 并运用补肾柔肝方(kindney-tonifyis liver-emoliating formula, KTLEF)进行治疗, 以观察中药复方抗肝纤维化的疗效, 并分析其作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ Wistar大鼠40只, 清洁级, 体质量 $150 \pm 10$  g, 购于中科院上海实验动物中心。补肾柔肝方(主要成分为仙灵脾、炙鳖甲及黄芪等多种中药), 由上海中医药大学附属曙光医院制剂室提供, 制备成含生药1.6 kg/L的流浸膏灌胃液; DMN, 购自日本东京化成工业株式会社; 透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)及IV胶原检测试剂盒购自上海海军医学研究所生物技术中心。高氯酸(批号: 19880907), 分析纯, 上海桃浦化工厂提供。柠檬酸钠、无水乙酸钠, 分析纯, 购自上海化学试剂有限公司。AA-200分析天平, Densere仪器公司; 日立7020自动生化分析仪、轮转切片機(RM2035)、冰冻切片機(CM1850)、H11220烤片機、H11210恒温水浴, 均购自德国Leica公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模及分组:** Wistar大鼠随机分组, 正常对照组10只, 模型组和治疗组分别15只, 对模型组和治疗组进行DMN造模, 采取每周连续3 d, 每天ip DMN 10 mg/kg, 共4 wk, 治疗组在造模4 wk后给予补肾柔肝方ig, 剂量10 mL/(kg·d), 共治疗4 wk。研究过程的第8周末处死全部大鼠, 留取血清及肝组织标本。

**1.2.2 RT-PCR半定量检测肝组织CTGF mRNA表达:** 分别取正常组、模型组和治疗组各3个肝组织进行研究, CTGF引物(由中国南方基因中心合成, 产物383 bp): 上游5'-CTAAGACCTGTGGATGGGC-3'; 下游5'-CTCAAAGATGTCATTGTCCC-3';  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)引物(内参照物, 由中国南方基因中心合成, 产物300 bp), 上游5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'; 下游5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'。TRIzol抽提肝组织RNA, 进行RT-PCR扩增。PCR反应体系为20  $\mu$ L, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 54 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C复性30 s, 共30-35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。每次PCR反应均以无菌双蒸水代替cDNA模板作为阴性对

## ■ 相关报道

本课题组前期研究证实, 补肾柔肝方可以有效的改善肝纤维化大鼠的肝功能、抑制肝纤维化的发生和发展, 提高大鼠的生存率。

### ■应用要点

本研究运用二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化,对大鼠肝组织中的结缔组织生长因子的表达水平进行研究,有助于进一步阐明肝纤维化的发病机制,同时也有助于阐明补肾柔肝方抗肝纤维化的疗效机制。

表 1 各组大鼠血清HA、LN及IV-C成分的变化 (mean ± SD)

分组	n	HA(pg/L)	LN(pg/L)	IV-C(pg/L)
正常组	10	252.90 ± 26.59	37.90 ± 5.97	21.40 ± 4.17
模型组	9	434.44 ± 98.81 <sup>b</sup>	70.67 ± 6.32 <sup>b</sup>	79.39 ± 10.52 <sup>b</sup>
治疗组	12	319.75 ± 63.23 <sup>d</sup>	44.83 ± 4.09 <sup>d</sup>	52.79 ± 5.71 <sup>d</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 正常组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 模型组。

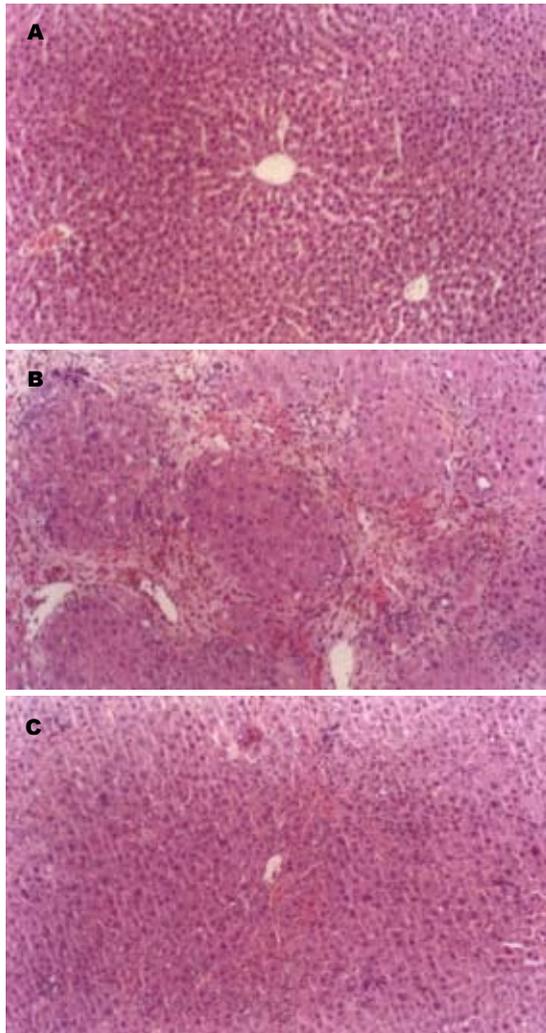


图 1 各组大鼠肝组织病理改变(HE × 100)。A: 正常组; B: 模型组; C: 治疗组。

照。取7 μL PCR产物在15 g/L琼脂糖凝胶中进行电泳,紫外线下观察结果,并在凝胶电泳分析系统下拍照。求出每条带的密度值,以β-actin PCR产物作为内参照。求出每条目的条带与β-actin条带的比值,进行统计学处理。

1.2.3 生化指标检测以及病理组织观察: 大鼠氯胺酮麻醉后,下腔静脉采血,离心分离血清。放射免疫试剂盒方法检测血清胶原成分HA、LN及IV-C的含量。HE染色观察肝组织炎症活动情况,天狼猩红染色观察肝组织纤维化程度,并按

照改良Knodell HAI<sup>[12]</sup>对纤维化程度进行判断。

**统计学处理** 实验数据以mean ± SD表示,应用SPSS10.0统计软件进行t检验及方差分析。

## 2 结果

2.1 大鼠一般情况 正常组大鼠生长状态良好,体质量增加显著,皮毛光滑,二便如常;模型组活动少,精神萎靡,胡须下垂,喜睡少动,体重增加减少,甚至较前下降,皮毛欠光滑,尿色黄,有腹泻;治疗组一般状态明显好于模型组。在第8周的治疗过程中,正常大鼠无死亡,而模型大鼠死亡率为40%(6/15),治疗组死亡率为20%(3/15),所有大鼠经过解剖发现,正常大鼠无腹水,模型组大鼠腹水发生率为60%(9/15),治疗组大鼠腹水发生率为33.33%(5/15)。可见,治疗组与模型组有显著性差异(P<0.01)。

2.2 血清胶原成分 模型组血清胶原成分HA、LN及IV-C的含量均较正常组显著增高,分别为正常组的分别为正常组的1.72、1.86、3.71倍,表现出明显的肝纤维化特征。药物治疗组HA、LN、IV-C均较模型组显著下降,分别为正常组的1.26、1.18、2.47倍(表1)。

2.3 病理组织学检查 正常组: 肝小叶结构正常,无界面性炎症及纤维化;肝条索排列规整,以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞无变性、坏死。模型组: 肝内纤维化间隔增多增宽,自汇管区和中央静脉区向周围延伸,小叶内中央静脉偏离或消失;肝细胞索排列紊乱,少数细胞肿胀,散在不同程度的小叶内坏死、碎屑坏死、桥接坏死。治疗组: 增生纤维细菲薄,肝小叶未被完全分割;肝细胞排列接近正常,肝细胞变性明显减轻,偶见点状坏死,有再生肝细胞,汇管区有炎症细胞浸润(图1)。根据天狼猩红染色结果进行纤维化程度判断: 各组大鼠肝组织胶原纤维增生程度比较(表2),其中治疗组结果要显著好于模型组(P<0.05)。

2.4 肝组织CTGF mRNA的表达 模型组CTGF/β-actin的比值为1.08 ± 0.17,治疗组为0.76 ± 0.10,两者有显著性差异(P<0.01),而正常组仅为0.28 ±

表 2 各组大鼠肝脏组织胶原纤维增生程度比较

分组	n	纤维化分级					Ridit分析
		-	+	++	+++	++++	
正常组	10	10					$P < 0.01$
模型组	9	0	0	4	2	3	
治疗组	12	0	0	6	5	1	$P < 0.05$

0.03. CTGF mRNA基因扩增电泳结果如图2所示.

### 3 讨论

DMN是一种具有肝毒性、细胞毒性和免疫毒性的药物,可用于大鼠肝纤维化模型的制作,其给药途径为ip,其造模机理主要与毒性产物引起核酸和蛋白质的甲基化从而导致肝细胞坏死有关,形成的纤维化相对稳定而不易吸收,此模型与人类肝硬化早期改变及胶原纤维沉积相似,可作为筛选抗肝纤维化药物的方便模型<sup>[13-17]</sup>. 缺点是不容易掌握剂量,因为小剂量不易形成肝纤维化,大剂量应用可致大鼠肝细胞坏死后肝纤维化. 另外还存在死亡率高和容易出血等不足. 本研究中尽管造模是成功的,但是仍存在死亡率偏高的情况,考虑与DMN剂量偏高或造模时间偏长有关,有关造模的最佳条件,还需要做进一步深入研究.

细胞因子作为促进肝纤维化的重要调节因子的作用已较明确,尤其是TGF- $\beta$ 、TIMP-1和PDGF等在肝纤维化形成过程中的作用比较明确<sup>[18-22]</sup>,但是许多其他细胞因子的作用也引起人们的高度重视,其中CTGF在肝纤维化形成过程中的作用也引起需要学者的高度重视<sup>[23-25]</sup>. CTGF是高度保守的CCN多肽家族成员之一,分子质量38 kDa,含349个氨基酸,富含半胱氨酸,具有明显的丝裂原性和趋化性,能诱导成纤维细胞增殖和分泌细胞外基质,参与调节细胞增生、分化、胚胎发育以及伤口愈合, Li *et al*<sup>[26]</sup>研究认为CTGF具有有促进炎症和纤维化形成的作用. George *et al*<sup>[27]</sup>运用DMN诱导老鼠肝纤维化的模型后发现模型组肝组织的CTGF和TGF- $\beta$ 表达均显著提高,通过运用针对CTGF的小干扰RNA(siRNA)后进行干预,发现可以下调CTGF和TGF- $\beta$ 的表达,有抑制肝纤维化的形成和发展的作用. Weng *et al*<sup>[28]</sup>研究认为CTGF具有上调TGF- $\beta$ 活性的作用,从而促进肝纤维化的形成和发展,其机制可能与纤维化发生过程中的细胞信号转导激活有关,其中Smad3、Smad7等信号蛋白参与其发病的过程. Hora *et al*<sup>[29]</sup>研究发现,

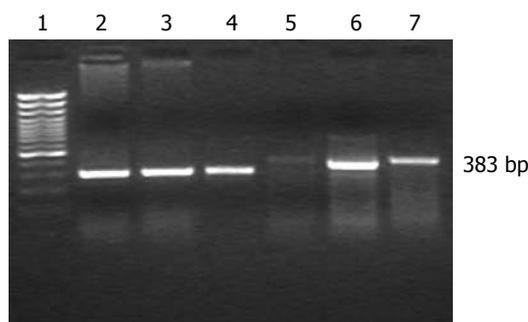


图 2 CTGF mRNA基因扩增. 1: DNA marker; 2-4: 内参照物PCR产物(300 bp); 5: 正常组PCR扩增; 6: 模型组PCR产物(383 bp); 7: 治疗组PCR产物(383 bp).

在丙型肝炎患者, CTGF是促进肝纤维化的炎症介质,可能是通过提高瘦素(leptin)水平来实现的. 本研究结果显示,运用补肾柔肝方进行治疗后,大鼠肝细胞的变性和坏死程度得到显著改善,肝纤维化有显著减轻. 基因半定量研究结果表明,他可以显著减少肝组织CTGF mRNA的基因表达水平. 以上表明补肾柔肝方对肝纤维化具有较好的疗效,其抗肝纤维的分子机制可能与下调CTGF有关,可以使HSC的活化得到抑制,从而减少肝纤维化的发生和发展.

中医中药治疗肝胆疾病,如黄疸、臌胀、胁痛等,已有悠久的历史,大量临床实践也证实其疗效. 补肾柔肝方攻补兼施,攻而不破,补而不膩,攻补力量较为平均,其以仙灵脾、枸杞、鳖甲等以补肾而软坚散结;黄芪、白术等健脾,以益气生血,以丹参等补血活血,诸药合用,共奏补肾健脾活血软坚之功,是治疗慢性肝病肝纤维化脾肾亏虚较为严重,瘀血内阻较为明显的安全、有效的中药处方. 其独到之处在于注重肾在肝病发病过程中的调节,认为肝纤维化发生与机体正气亏虚有关,提出“从肾治肝,扶助正气”的治肝观点,这是治疗的一个创新,符合中医基础理论中的“肝肾同源”的原理,在先前的研究中也证实具有良好的抗肝纤维化作用<sup>[30-31]</sup>. 本研究表明,治疗组可以使HA、LN、IV-C均较模型组显著下降,显示补肾柔肝方对DMN诱导的肝纤维化形成和发展具有良好的治疗作用. 其良好的抗肝纤维化作用也得到了病理学研究的证实,与正常对照组比较,模型组和治疗组的肝组织有显著的肝细胞炎症、水肿和出血,有显著的肝纤维化表现,同时治疗组与模型组比较其程度有不同的减轻. 本研究对补肾柔肝方的抗肝纤维化的疗效及机制进行了初步研究,为中医药防治肝纤维化提供新的思路和方法.

### ■ 名词解释

DMN: 一种具有肝毒性、细胞毒性和免疫毒性的药物,可用于大鼠肝纤维化模型的制作,其给药途径为腹腔注射,其造模机理主要与毒性产物引起核酸和蛋白质的甲基化从而导致肝细胞坏死有关,形成的纤维化相对稳定而不易吸收.

## ■同行评价

本研究采用较成熟的肝纤维化的造模方法,观察中药复方补肾柔肝方对大鼠模型血肝纤指标和肝脏组织结缔组织生长因子(CTGF)mRNA的表达影响,研究方法较规范,取得了较好的结果;行文表达较流畅,具有较好的学术价值。

## 4 参考文献

- Murata K, Kamata Y, Munakata H, Sugai M, Sasaki M. Immunohistochemical study on liver fibrosis in biliary atresia. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 179-183
- Chen HN, Fan S, Weng CF. Down-regulation of TGFbeta1 and leptin ameliorates thioacetamide-induced liver injury in lipopolysaccharide-primed rats. *J Endotoxin Res* 2007; 13: 176-188
- Meindl-Beinker NM, Dooley S. Transforming growth factor-beta and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S122-S127
- Brocks B, Kraft S, Zahn S, Noll S, Pan C, Schauer M, Krebs B. Generation and optimization of human antagonistic antibodies against TIMP-1 as potential therapeutic agents in fibrotic diseases. *Hum Antibodies* 2006; 15: 115-124
- Sentías-Gómez MD, Gálvez-Gastélum FJ, Meza-García E, Armendáriz-Borunda J. [Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteases and TGFbeta] *Gac Med Mex* 2005; 141: 315-322
- García de León Mdel C, Montfort I, Tello Montes E, López Vancell R, Olivos García A, González Canto A, Nequiz-Avendaño M, Pérez-Tamayo R. Hepatocyte production of modulators of extracellular liver matrix in normal and cirrhotic rat liver. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 97-108
- Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, Odell MM, Bauer RL, Ren HP, Haugen HS, Yeh MM, Fausto N. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3389-3394
- Zhang C, Zhu Y, Wan J, Xu H, Shi H, Lu X. Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation, cytokines and extracellular matrix of hepatic stellate cells. *Liver Int* 2006; 26: 1283-1290
- Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2003; 26: 1-9
- Gressner AM, Yagmur E, Lahme B, Gressner O, Stanzel S. Connective tissue growth factor in serum as a new candidate test for assessment of hepatic fibrosis. *Clin Chem* 2006; 52: 1815-1817
- Gressner OA, Lahme B, Demirci I, Gressner AM, Weiskirchen R. Differential effects of TGF-beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol* 2007; 47: 699-710
- Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000; 31: 241-246
- He JY, Ge WH, Chen Y. Iron deposition and fat accumulation in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rat. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2061-2065
- Saha JK, Xia J, Sandusky GE, Chen YF, Gerlitz B, Grinnell B, Jakubowski JA. Study of plasma protein C and inflammatory pathways: biomarkers for dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 575: 158-167
- Wu JW, Lin LC, Hung SC, Lin CH, Chi CW, Tsai TH. Hepatobiliary excretion of silibinin in normal and liver cirrhotic rats. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 589-596
- Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, Ask K, Kolb M. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 661-664
- Kim EY, Kim EK, Lee HS, Sohn Y, Soh Y, Jung HS, Sohn NW. Protective effects of Cuscutae semen against dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in Sprague-Dawley rats. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 1427-1431
- Chen MH, Chen SH, Wang QF, Chen JC, Chang DC, Hsu SL, Chen CH, Sheue CR, Liu YW. The molecular mechanism of gypenosides-induced G1 growth arrest of rat hepatic stellate cells. *J Ethnopharmacol* 2008; 117: 309-317
- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214: 199-210
- Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007; 13: 1324-1332
- Zhang LJ, Zheng WD, Chen YX, Huang YH, Chen ZX, Zhang SJ, Shi MN, Wang XZ. Antifibrotic effects of interleukin-10 on experimental hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 2092-2098
- Hu YB, Li DG, Lu HM. Modified synthetic siRNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits hepatic fibrogenesis in rats. *J Gene Med* 2007; 9: 217-229
- Yuhua Z, Wanhua R, Chenggang S, Jun S, Yanjun W, Chunqing Z. Disruption of connective tissue growth factor by short hairpin RNA inhibits collagen synthesis and extracellular matrix secretion in hepatic stellate cells. *Liver Int* 2008; 28: 632-639
- Li GM, Li DG, Xie Q, Shi Y, Jiang S, Zhou HJ, Lu HM, Jin YX. [Effect of silencing connective tissue growth factor on rat liver fibrosis and the accumulation of extracellular matrix.] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2008; 16: 188-192
- Chen A, Zheng S. Curcumin inhibits connective tissue growth factor gene expression in activated hepatic stellate cells in vitro by blocking NF-kappaB and ERK signalling. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 557-567
- Li G, Xie Q, Shi Y, Li D, Zhang M, Jiang S, Zhou H, Lu H, Jin Y. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *J Gene Med* 2006; 8: 889-900
- George J, Tsutsumi M. siRNA-mediated knockdown of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Gene Ther* 2007; 14: 790-803
- Weng HL, Ciucan L, Liu Y, Hamzavi J, Godoy P, Gaitantzi H, Kanzler S, Heuchel R, Ueberham U, Gebhardt R, Breilkopf K, Dooley S. Profibrogenic transforming growth factor-beta/activin receptor-like kinase 5 signaling via connective tissue growth factor expression in hepatocytes. *Hepatology* 2007; 46: 1257-1270
- Hora C, Negro F, Leandro G, Oneta CM, Rubbia-Brandt L, Muellhaupt B, Helbling B, Malinverni R, Gonvers JJ, Dufour JF. Connective tissue growth factor, steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 2008; 28: 370-376
- 张斌, 万谟彬, 王灵台. 中药复方对DMN诱导的肝纤维化大鼠IV型胶原和TGF-β1蛋白表达的影响. *中医药学报* 2005; 33: 25-27
- Zhang B, Wan MB, Wang LT. [Therapeutic effect of Bushen Rougan Recipe on hepatic fibrosis in rats] *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2005; 3: 132-135

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# 人参皂苷Rg3对人肝癌细胞Pim-3及Bad凋亡蛋白表达的影响

简捷, 刘利珍, 李小燕, 胡志方, 王稻, 黄缘

简捷, 黄缘, 李小燕, 胡志方, 南昌大学第二附属医院消化内科; 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006  
刘利珍, 南昌大学第二附属医院肿瘤科; 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006  
王稻, 江西省萍乡市人民医院肾内科 江西省萍乡市 337055  
简捷, 2006级南昌大学第二附属医院在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤基因治疗的基础和临床研究。  
作者贡献分布: 简捷与刘利珍对此文所作贡献均等; 此课题由简捷, 刘利珍及黄缘设计; 研究过程由简捷, 刘利珍, 李小燕, 胡志方, 王稻及黄缘操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由简捷提供; 数据分析由刘利珍完成; 本论文写作由简捷与刘利珍完成。  
通讯作者: 黄缘, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科; 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com  
电话: 0791-6292163 传真: 0791-6292163  
收稿日期: 2008-04-02 修回日期: 2008-04-23  
接受日期: 2008-05-05 在线出版日期: 2008-07-18

## Effects of ginsenoside Rg3 on the expression of Pim-3 and Bad in human hepatocarcinoma cell lines

Jie Jian, Li-Zhen Liu, Xiao-Yan Li, Zhi-Fang Hu, Dao Wang, Yuan Huang

Jie Jian, Yuan Huang, Xiao-Yan Li, Zhi-Fang Hu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Li-Zhen Liu, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Dao Wang, Department of Kidney, the People's Hospital of Pingxiang, Pingxiang 337055, Jiangxi Province, China  
Correspondence to: Yuan Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huang9815@yahoo.com  
Received: 2008-04-02 Revised: 2008-04-23  
Accepted: 2008-05-05 Published online: 2008-07-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of ginsenoside Rg3 on the expression of Pim-3 and Bad phosphorylated proteins including pBad (Ser112) and pBad (Ser136) in human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721.

**METHODS:** SMMC-7721 cells were exposed

to 0, 5, 10, 20, 40 and 80  $\mu\text{mol/L}$  ginsenoside Rg3 for 24 h. The effect of ginsenoside Rg3 on cell proliferation was measured using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, and the apoptosis of SMMC-7721 cells was evaluated by inverted microscopy and flow cytometry. The expression of Pim-3 and pBad (Ser112) and pBad (Ser136) were measured by Western blot.

**RESULTS:** The inhibitory rates were 4.69%, 15.53%, 22.17%, 50.97% and 61.65% respectively, after SMMC-7721 cells were exposed to 5, 10, 20, 40 and 80  $\mu\text{mol/L}$  ginsenoside Rg3 for 24 h. Marked morphological changes of apoptosis were observed following exposure to 5-80  $\mu\text{mol/L}$  ginsenoside Rg3. Flow cytometry showed the apoptosis rate was 0.39% in the normal control cells and 16.49% in the cells exposed to 80  $\mu\text{mol/L}$  ginsenoside Rg3 for 24 h, indicating a marked elevation in apoptosis rate ( $P < 0.01$ ). Ginsenoside Rg3 had no marked influences on the total Bad protein expression. Pim-3 expression was decreased with elevated ginsenoside Rg3 concentration, and the pBad (Ser112) was increased with elevated ginsenoside Rg3. But the pBad (Ser136) was not expressed.

**CONCLUSION:** The anti-cancer action of ginsenoside Rg3 may be associated with the decreased expression of Pim-3 and the increased expression of pBad (Ser112).

**Key Words:** Ginsenoside Rg3; Hepatocarcinoma; Serine/threonine kinase Pim-3; Apoptosis

Jian J, Liu LZ, Li XY, Hu ZF, Wang D, Huang Y. Effect of ginsenoside Rg3 on the expression of Pim-3 and Bad in human hepatocarcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2229-2233

## 摘要

**目的:** 研究人参皂苷Rg3对人肝癌细胞SMMC-7721中Pim-3及磷酸化Bad蛋白pBad(Ser112), pBad(Ser136)表达的影响。

## 背景资料

研究表明人参皂苷Rg3对多种肿瘤均有抑制作用。Pim-3作为一种丝/苏氨酸蛋白激酶Pim家族中的成员,具有磷酸化凋亡蛋白Bad,抑制细胞凋亡,促进细胞增值。在人类许多肿瘤中均发现Pim-3。因此, Pim-3及Bad可成为抗肿瘤治疗的一个新靶点。探讨Pim-3抑制肝癌细胞增值与其影响磷酸化Bad蛋白表达的关系有助于揭示人参皂苷Rg3的抗癌机制,为将来人参皂苷Rg3应用于预防和治疗肝癌提供理论依据。

## 同行评议者

王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

## ■ 研发前沿

自从发现人参皂苷Rg3能选择性抑制肿瘤细胞转移和浸润及抑制肿瘤新生血管的形成,其抗癌活性引起广泛关注。体内体外实验及流行病学研究结果显示,人参皂苷Rg3对多种肿瘤均有抑制作用。研究人参皂苷Rg3对肿瘤细胞中信号传导途径的调节作用已经成为研究其抗癌活性机制的一个重要环节。

**方法:** 用浓度为0、5、10、20、40和80  $\mu\text{mol/L}$  的人参皂苷Rg3处理SMMC-7721细胞24 h后,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)方法检测人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞增殖的抑制作用,倒置显微镜和流式细胞术观察人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞凋亡的诱导作用,Western blot方法检测不同浓度人参皂苷Rg3处理后SMMC-7721细胞中Pim-3, pBad(Ser112)和pBad(Ser136)的表达情况。

**结果:** 5、10、20、40和80  $\mu\text{mol/L}$  的人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞增殖的抑制率分别为4.69%、15.53%、22.17%、50.97%、61.65%。5-80  $\mu\text{mol/L}$  的人参皂苷Rg3处理细胞呈现明显的凋亡形态学改变,80  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷Rg3处理SMMC-7721细胞24 h后,处理组比正常对照组凋亡明显增加,差异有统计意义(16.5%  $\pm$  4.3% vs 0.4%  $\pm$  1.3%,  $P < 0.01$ )。人参皂苷Rg3对细胞中Bad总蛋白的表达没有明显影响。Pim-3的表达随人参皂苷Rg3浓度的增加而逐渐减弱,而pBad(Ser112)的表达随人参皂苷Rg3浓度的增加而逐渐增强;pBad(Ser136)不表达。

**结论:** 人参皂苷Rg3的抗癌活性与其促进磷酸化Bad蛋白表达有关。

**关键词:** 人参皂苷Rg3; 肝癌; 丝/苏氨酸蛋白激酶Pim-3; 凋亡

简捷, 刘利珍, 李小燕, 胡志方, 王稻, 黄缘. 人参皂苷Rg3对人肝癌细胞Pim-3及Bad凋亡蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2229-2233

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2229.asp>

## 0 引言

人参皂苷Rg3是从中药人参中提取的单一成分,具有抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,并能选择性抑制肿瘤细胞转移和浸润及抑制肿瘤新生血管的形成,而且还能明显提高化疗疗效,起到化疗增敏的作用,抑制肿瘤细胞生长<sup>[1]</sup>。Pim激酶家族是一组钙/钙调蛋白调节激酶(calcium/calmodulin-regulatede kinase, CAMP)家族,该家族各成员(Pim-1, Pim-2, Pim-3)在激酶结构域高度同源,其生物学功能也存在显著的重叠。与其他丝/苏氨酸蛋白激酶如p13k-Akt, mtor等一样, Pim家族激酶能使在细胞生长通路中起关键作用的蛋白质分子内的丝/苏氨酸残基磷酸化,并通过不同于p13k-Akt-mtor的另一条通路<sup>[2]</sup>,促进细胞的生存和增殖。多种细胞生长因子、激素和细胞生长通路如JAK/STAT、p13k和

Akt等可在不同水平上介导Pim的表达<sup>[3]</sup>。最近研究发现Pim-3在肝癌<sup>[4]</sup>,胰腺癌<sup>[5]</sup>,结肠癌<sup>[6]</sup>和胃癌<sup>[7]</sup>中异常表达增加。Pim激酶可活化Bad凋亡蛋白,使其112位丝氨酸磷酸化,从而失去活性,细胞凋亡减少,增殖增多<sup>[8]</sup>。因此, Pim-3可能成为抗肿瘤治疗的一个新靶点。我们采用体外细胞培养技术,拟研究人参皂苷Rg3对人肝癌细胞SMMC-7721中Pim-3及磷酸化蛋白pBad(Ser112)和pBad(Ser136)表达的影响,探讨人参皂苷Rg3抑制肝癌细胞增殖与其影响Pim-3表达和磷酸化Bad蛋白表达的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人参皂苷Rg3购自吉林亚泰制药股份有限公司, MTT和胰酶购自美国Sigma公司, RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司。羊抗人Pim-3, Bad, pBad(Ser112)和pBad(Ser136)抗体购自美国Santa Cruz公司。碱性磷酸酶标记兔抗羊二抗和BCIP/NBT显色系统购自美国Promega公司。SMMC-7721由江西省医学分子中心提供。细胞常规培养于含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液中。人参皂苷Rg3用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配制成80 mmol/L的储备液,用培养液稀释至所需浓度。DMSO在各组培养液中的终浓度均为1 mL/L。

## 1.2 方法

**1.2.1 人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞增殖的抑制作用检测:** 取对数生长期的SMMC-7721细胞,常规胰酶消化接种于96孔板,每孔 $4 \times 10^3$ 个细胞,培养24 h后加入人参皂苷Rg3使其终浓度为0, 5, 10, 20, 40和80  $\mu\text{mol/L}$ ,每个浓度设6个平行孔。培养24 h后加入5 g/L MTT 20  $\mu\text{L}$ 。再培养4 h后倒尽板中的培养液,各孔加100  $\mu\text{L}$  DMSO,轻轻振荡后用酶标仪(波长490 nm)测定各孔的吸光值,以每组6个孔的平均值作为各组的平均值。实验重复3次。根据下列公式计算人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞的抑制率:抑制率 = (1-实验值/对照值)  $\times$  100%。

**1.2.2 倒置显微镜观察人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞凋亡的作用:** 常规培养SMMC-7721细胞,按 $1 \times 10^5$ 个/孔接种于24孔细胞培养板。用含不同溶度人参皂苷Rg3处理SMMC-7721细胞24 h后置倒置显微镜下观察其形态变化。收集经人参皂苷Rg3处理过的SMMC-7721细胞,制备细胞悬液,于流式细胞仪检测细胞凋亡率。

## ■ 相关报道

研究已发现人参皂苷Rg3能明显抑制小鼠腹水肝癌细胞、黑色素瘤、人小细胞肺癌和人胰腺癌细胞的单层浸润。

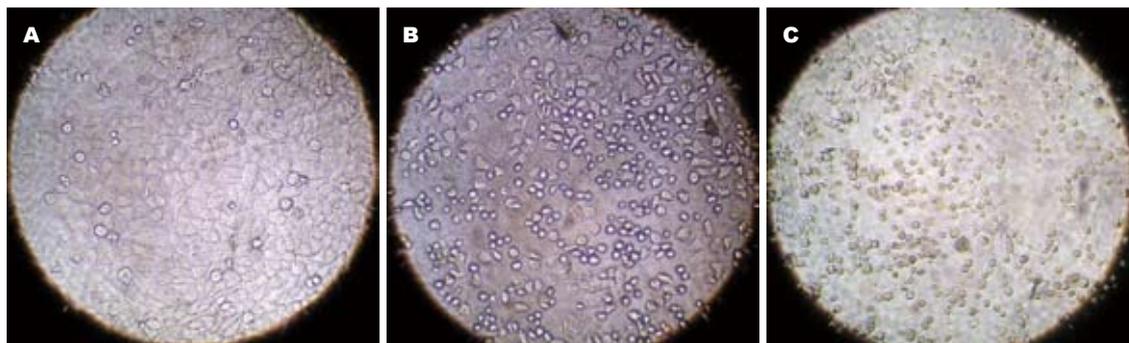


图 1 倒置显微镜观察不同浓度人参皂苷Rg3处理SMMC-7721肝癌细胞后形态学改变. A: 0 μmol/L组; B: 40 μmol/L组; C: 80 μmol/L(sp × 200).

**■创新盘点**  
 本研究发现人参皂苷Rg3抑制Pim-3的表达, 促进pBad(Ser112)的表达可能是人参皂苷Rg3诱导人肝癌细胞SMMC-7721细胞凋亡, 抑制其增殖的原因之一.

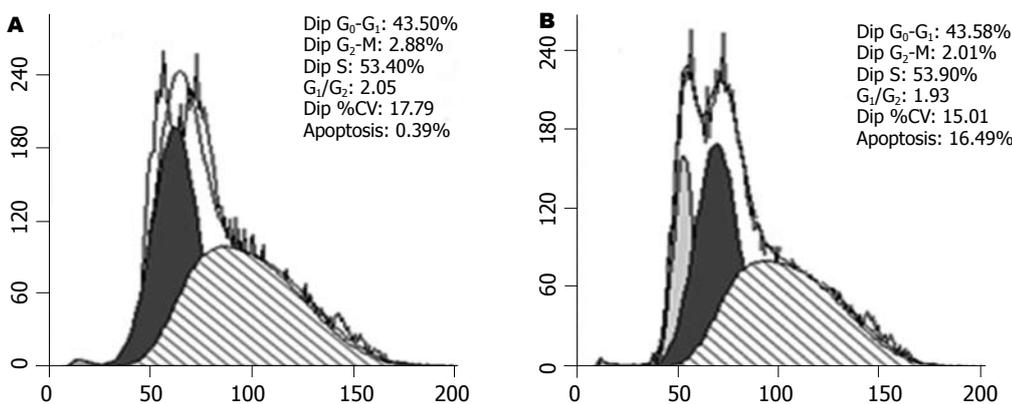


图 2 人参皂苷Rg3处理SMMC-7721肝癌细胞24 h后细胞凋亡的流式细胞术检查. A: 正常对照组; B: 80 μmol/L人参皂苷Rg3处理组.

1.2.3 检测人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞中Pim-3, Bad, pBad(Ser112)和pBad(Ser136)表达的影响: 常规收集不同浓度人参皂苷Rg3处理24 h的细胞, 提取细胞总蛋白; 用Bradford法测定含量后, 取50 g总蛋白经100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至硝酸纤维素膜上. 用含10 g/L BSA的TBST室温封闭1 h; 分别加1:600稀释的羊抗人Pim-3, Bad, pBad(Ser112)和pBad(Ser136)抗体, 室温孵育2 h, 用TBST漂洗10 min, 3次, 加1:7500稀释的碱性磷酸酶标记的二抗, 室温孵育1 h, 用TBST漂洗10 min, 3次, TBS漂洗2次, NBT/BCIP显色, 去离子水漂洗, 上海天能凝胶成像图像分析系统照相记录结果.

**统计学处理** 采用SPSS12.0统计软件进行单因素方差分析, 组间比较用LSD法.

## 2 结果

2.1 人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞增殖的抑制作用 在5-80 μmol/L浓度时, 人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞的增殖有明显抑制作用, 并且其抑制作用随着人参皂苷Rg3浓度的提高而增强(表1).

2.2 人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞凋亡的诱导作用 在倒置显微镜下观察, 正常细胞呈现弥漫均匀, 细胞边缘整齐, 凋亡细胞变圆、体积缩小, 核碎裂呈大小不等的圆形小体. 本实验对照组偶见凋亡细胞, 而各人参皂苷Rg3处理组则可见较多的凋亡细胞, 并且随着人参皂苷Rg3浓度的提高, 凋亡细胞数明显增多(图1). 流式细胞术结果: 正常对照组凋亡细胞占(0.39±1.3)%; 80 μmol/L人参皂苷Rg3处理SMMC-7721细胞24 h后, 凋亡细胞占(16.49±4.3)%, 处理组比正常对照组凋亡明显增加, 差异有统计意义(P<0.01, 图2).

2.3 人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞中Pim-3及两种P-Bad表达的影响 不同浓度人参皂苷Rg3处理SMMC-7721细胞24 h后, Pim-3的表达随人参皂苷Rg3浓度的增加而逐渐减弱; pBad(Ser112)的表达随人参皂苷Rg3浓度的增加而逐渐增强; 人参皂苷Rg3对细胞中Bad总蛋白的表达没有明显影响, Bad总蛋白的表达不变; pBad(Ser136)不表达(图3).

## 3 讨论

人参皂苷Rg3作为一种抗肿瘤中药成分, 其抗癌

**■应用要点**  
 探讨人参皂苷Rg3抑制肝癌细胞增殖与其影响Pim-3以及pBad(Ser112)的表达的关系有助于揭示人参皂苷Rg3的抗癌机制, 为将来人参皂苷Rg3应用于预防和治疗肝癌提供理论依据.

### ■名词解释

Pim激酶家族: 是一组丝/苏氨酸激酶Pim家族, 他拥有3个成员分别为Pim-1, Pim-2, Pim-3. 该家族各成员在激酶结构域高度同源, 其生物学功能也存在显著的重叠. Pim激酶家族能使在细胞生长通路中起关键作用的蛋白质分子内的丝/苏氨酸残基磷酸化, 并通过不同于p13k-Akt-mtor的另一条通路, 促进细胞的生存和增殖.

表 1 不同浓度人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞的抑制作用 (mean ± SD, %, n = 6)

Rg3(μmol/L)	A值	存活率(%)	抑制率(%)
0	0.618 ± 0.038	100.00	0.00
5	0.589 ± 0.070 <sup>a</sup>	95.31	4.69 <sup>a</sup>
10	0.522 ± 0.036 <sup>a</sup>	84.47	15.53 <sup>a</sup>
20	0.481 ± 0.057 <sup>a</sup>	77.83	22.17 <sup>a</sup>
40	0.303 ± 0.029 <sup>b</sup>	49.03	50.97 <sup>b</sup>
80	0.237 ± 0.015 <sup>b</sup>	38.35	61.65 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组; <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组.

活性引起广泛关注. 体内体外实验及流行病学研究结果显示, 人参皂苷Rg3对多种肿瘤均有抑制作用. 人参皂苷Rg3可选择性抑制癌细胞的浸润<sup>[9]</sup>. 通过体外抗浸润试验证明表明: 人参皂苷Rg3能明显抑制小鼠腹水肝癌细胞(rat ascites hepatoma cells MM1)、B16FE7黑色素瘤、人小细胞肺癌(OC10)和人胰腺癌细胞(PAN-1)的单层浸润<sup>[10]</sup>. 人参皂苷Rg3对高转移性的小鼠黑色素瘤细胞(B16FE7)肺转移及Balb/c小鼠结肠癌细胞(26-M3.1)肺转移具有抑制作用<sup>[11]</sup>. 本研究采用MTT方法也证实人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞体外增殖有抑制作用, 并且20-80 μmol/L的人参皂苷Rg3处理能诱导SMMC-7721细胞形成典型的凋亡形态学改变. 上述研究结果说明, 人参皂苷Rg3具有抑制肿瘤细胞增殖的作用.

Pim-3是一种丝/苏氨酸蛋白激酶Pim家族中的成员. Pim激酶主要通过以下途径来发挥其生物学作用: (1)抑制Bcl-2家族的前凋亡基因Bad, 阻止Bad-Bcl-x1的相互作用, 抑制凋亡<sup>[12]</sup>; (2)使酪氨酸磷酸酶PTP-U2S磷酸化, 抑制其磷酸酶的活性, 从而阻止细胞凋亡的发生<sup>[13]</sup>; (3)通过协同或调控Bcl-2家族的抗凋亡蛋白的功能, 抑制细胞凋亡的线粒体通路<sup>[14]</sup>. 研究还发现Pim激酶具有加速细胞周期进程的效应<sup>[15]</sup>: (1)使p21磷酸化, 促使休眠期细胞进入细胞周期; (2)激活Cdc25A, 促进细胞的G<sub>1</sub>期进程; (3)抑制C-TAK1的活性, 促进G<sub>2</sub>/M转换; (4)激活STAT3信号途径, 促进细胞G<sub>1</sub>/S周期的进程. 本研究中我们发现, 不同浓度人参皂苷Rg3处理SMMC-7721细胞24 h后, 不同浓度人参皂苷Rg3处理SMMC-7721细胞24 h后, Pim-3的表达随人参皂苷Rg3浓度的增加而逐渐减弱, 而pBad(Ser112)的表达随人参皂苷Rg3浓度的增加而逐渐强; pBad(Ser136)不表达. 因此, 人参皂苷Rg3可通过促进Bad活性形式一

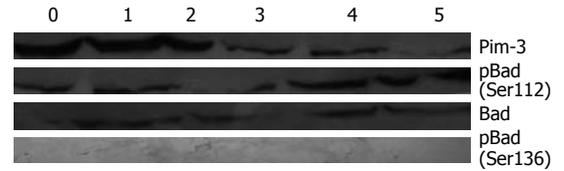


图 3 人参皂苷Rg3对SMMC-7721细胞中Pim-3及两种p-Bad表达的影响. 0: 0 μmol/L; 1: 5 μmol/L; 2: 10 μmol/L; 3: 20 μmol/L; 4: 40 μmol/L; 5: 80 μmol/L.

磷酸化Bad的形成而诱导肿瘤细胞的凋亡、抑制肿瘤细胞的增殖.

总之, Pim-3可成为肿瘤治疗的一个新靶点, 本研究结果表明, 抑制Pim-3的表达可能是人参皂苷Rg3诱导人肝癌细胞SMMC-7721细胞凋亡, 抑制其增殖的原因之一.

### 4 参考文献

- 1 Iishi H, Tatsuta M, Baba M, Uehara H, Nakaizumi A, Shinkai K, Akedo H, Funai H, Ishiguro S, Kitagawa I. Inhibition by ginsenoside Rg3 of bombesin-enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane in Wistar rats. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15: 603-611
- 2 Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. *J Exp Med* 2005; 201: 259-266
- 3 Jacobs MD, Black J, Futer O, Swenson L, Hare B, Fleming M, Saxena K. Pim-1 ligand-bound structures reveal the mechanism of serine/threonine kinase inhibition by LY294002. *J Biol Chem* 2005; 280: 13728-13734
- 4 Fujii C, Nakamoto Y, Lu P, Tsuneyama K, Popivanova BK, Kaneko S, Mukaida N. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer* 2005; 114: 209-218
- 5 Li YY, Popivanova BK, Nagai Y, Ishikura H, Fujii C, Mukaida N. Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human pancreatic cancer and phosphorylates bad to block bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 2006; 66: 6741-6747
- 6 Popivanova BK, Li YY, Zheng H, Omura K, Fujii C, Tsuneyama K, Mukaida N. Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Sci* 2007; 98: 321-328
- 7 Zheng HC, Tsuneyama K, Takahashi H, Miwa S, Sugiyama T, Popivanova BK, Fujii C, Nomoto K, Mukaida N, Takano Y. Aberrant Pim-3 expression is involved in gastric adenoma-adenocarcinoma sequence and cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 481-488
- 8 Yan B, Zemskova M, Holder S, Chin V, Kraft A, Koskinen PJ, Lilly M. The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *J Biol Chem* 2003; 278: 45358-45367
- 9 Xu TM, Xin Y, Cui MH, Jiang X, Gu LP. Inhibitory

- effect of ginsenoside Rg3 combined with cyclophosphamide on growth and angiogenesis of ovarian cancer. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 584-588
- 10 Shinkai K, Akedo H, Mukai M, Imamura F, Isoai A, Kobayashi M, Kitagawa I. Inhibition of in vitro tumor cell invasion by ginsenoside Rg3. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 357-362
- 11 Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tono-oka S, Samukawa K, Azuma I. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1197-1202
- 12 Aho TL, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M, Koskinen PJ. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett* 2004; 571: 43-49
- 13 Wang Z, Bhattacharya N, Meyer MK, Seimiya H, Tsuruo T, Tonani JA, Magnuson NS. Pim-1 negatively regulates the activity of PTP-U2S phosphatase and influences terminal differentiation and apoptosis of monoblastoid leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* 2001; 390: 9-18
- 14 Lilly M, Sandholm J, Cooper JJ, Koskinen PJ, Kraft A. The PIM-1 serine kinase prolongs survival and inhibits apoptosis-related mitochondrial dysfunction in part through a bcl-2-dependent pathway. *Oncogene* 1999; 18: 4022-4031
- 15 Bachmann M, Hennemann H, Xing PX, Hoffmann I, Moroy T. The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J Biol Chem* 2004; 279: 48319-48328

■同行评价  
本文思路清晰, 行文流畅, 论据充分, 参考文献全面, 具有一定的学术价值。

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 •

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

# 姜黄素对缺氧条件下HepG2细胞VEGF表达的影响

侯伟, 覃华, 刘南植, 刘爽, 王颖, 赵秋, 田德安

## ■背景资料

血管内皮生长因子(VEGF)是重要的促血管生成因子,在肝癌组织中高表达,与肝癌浸润和转移密切相关。姜黄素是一种常见的天然黄酮类化合物,已作为癌症预防和治疗药物进入临床试验。姜黄素抗肿瘤机制复杂,近来研究发现其机制之一为抑制肿瘤血管生成。

侯伟,覃华,刘南植,王颖,赵秋,田德安,华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

刘爽,湖北省疾病预防控制中心卫生监督检验防护所 湖北省武汉市 430079

侯伟,2003年华中科技大学同济医学院硕士,主要从事消化系统疾病的临床和基础研究。

作者贡献分布:此课题由侯伟,刘南植,赵秋及田德安设计;研究过程由侯伟,覃华,刘爽及王颖操作完成;研究所用新试剂及分析工具由赵秋提供;数据分析由侯伟和刘爽完成;本论文写作由侯伟和刘南植完成。

通讯作者:刘南植,430030,湖北省武汉市解放大道1095号,华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。lnz3208@sina.com 电话:027-83663208

收稿日期:2008-03-18 修回日期:2008-04-17

接受日期:2008-04-21 在线出版日期:2008-07-18

## Effect of curcumin on vascular endothelial growth factor expression in HepG2 hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions

Wei Hou, Hua Qin, Nan-Zhi Liu, Shuang Liu, Ying Wang, Qiu Zhao, De-An Tian

Wei Hou, Hua Qin, Nan-Zhi Liu, Ying Wang, Qiu Zhao, De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Shuang Liu, Institute of Health Surveillance, Analysis and Protection, Hubei Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Correspondence to: Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. lnz3208@sina.com

Received: 2008-03-18 Revised: 2008-04-17

Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of curcumin on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in hepatocellular carcinoma cell line HepG2 under hypoxic conditions.

**METHODS:** Hepatocellular carcinoma HepG2 cells were treated with different concentrations (0, 1, 2, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) of curcumin under hypoxic conditions for 6 h. Cellular viability was detected by MTT assay. The level of VEGF expression was detected at protein and mRNA

level by Western blot technique and reverse transcription-poly chain reaction respectively.

**RESULTS:** The levels of VEGF protein and mRNA decreased significantly in the cells co-incubated with curcumin at 1, 2, 5, and 10  $\mu\text{mol/L}$  for 6 h in a dose-dependent manner as compared with those in the control cells (0  $\mu\text{mol/L}$  curcumin treatment) (VEGF protein:  $2.12 \pm 0.23$ ,  $1.59 \pm 0.13$ ,  $0.82 \pm 0.11$ ,  $0.33 \pm 0.05$  vs  $2.85 \pm 0.37$ ,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ; VEGF mRNA:  $0.60 \pm 0.05$ ,  $0.54 \pm 0.04$ ,  $0.16 \pm 0.02$ ,  $0.06 \pm 0.01$  vs  $0.81 \pm 0.07$ , all  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Curcumin can decrease the expression of VEGF in hepatocellular carcinoma HepG2 cells.

**Key Words:** Curcumin; Hepatocellular carcinoma; Anoxia; Vascular endothelial growth factor

Hou W, Qin H, Liu NZ, Liu S, Wang Y, Zhao Q, Tian DA. Effect of curcumin on vascular endothelial growth factor expression in HepG2 hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2234-2238

## 摘要

**目的:** 研究姜黄素对缺氧条件下人肝癌细胞HepG2中血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。

**方法:** 姜黄素(0、1、2、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )处理缺氧条件下的HepG2细胞6 h后,采用四唑盐(MTT)法观察HepG2细胞活性的变化,Western blot观察VEGF的蛋白水平变化,RT-PCR检测VEGF mRNA表达水平变化。

**结果:** HepG2细胞经1、2、5、10  $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素处理后,VEGF蛋白和mRNA水平与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理)比较明显降低(蛋白: $2.12 \pm 0.23$ ,  $1.59 \pm 0.13$ ,  $0.82 \pm 0.11$ ,  $0.33 \pm 0.05$  vs  $2.85 \pm 0.37$ ,  $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ; mRNA:  $0.60 \pm 0.05$ ,  $0.54 \pm 0.04$ ,  $0.16 \pm 0.02$ ,  $0.06 \pm 0.01$  vs  $0.81 \pm 0.07$ , 均 $P < 0.01$ ),且降低程度随着姜黄素处理浓度的增加而变大。

## ■同行评议者

姚希贤,教授,河北医科大学附属第二医院消化内科;周霞秋,主任医师,上海瑞金医院感染科

**结论:** 姜黄素可抑制HepG2细胞中VEGF的基因表达.

**关键词:** 姜黄素; 肝细胞癌; 缺氧; 血管内皮生长因子

侯伟, 覃华, 刘南植, 刘爽, 王颖, 赵秋, 田德安. 姜黄素对缺氧条件下HepG2细胞VEGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2234-2238  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2234.asp>

## 0 引言

血管新生是恶性肿瘤生长和转移的先决条件. 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为重要的血管生成促进因子, 能够通过旁分泌和自分泌途径诱导血管生成, 促进肿瘤生长<sup>[1]</sup>. 抑制肿瘤血管新生已成为当前抗肿瘤治疗的重要策略之一<sup>[2]</sup>, 而寻找安全、有效的抗肿瘤新药也成为肿瘤防治研究领域的重要课题. 姜黄素是植物中存在的天然黄酮类化合物, 能拮抗肿瘤血管生成, 抑制肿瘤细胞增殖和促凋亡<sup>[3-5]</sup>, 是具有极大开发前景的癌症预防及化学治疗药物. 肝癌是最常见的实体器官恶性肿瘤之一, 在肿瘤发病率中位列第三. Suzuki *et al*<sup>[6]</sup>发现VEGF在富含血管的肝癌组织中高表达, 且主要位于坏死区周围缺氧的肝癌细胞内. 杜静 *et al*<sup>[7]</sup>的实验观察到, 人肝癌细胞HepG2在缺氧条件下, VEGF的表达较常氧条件下显著升高. 姜黄素是否能抑制缺氧肝癌细胞内VEGF的表达从而减少新生血管的形成呢? 目前相关的报道并不多见. 鉴于此, 本实验拟选取人肝癌HepG2细胞作为研究对象, 观察姜黄素对缺氧条件下的HepG2细胞内VEGF表达的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌HepG2细胞为同济医院肝病研究所自备, DMEM高糖培养基和胎牛血清(美国Gibco公司), 姜黄素、氯化钴(CoCl<sub>2</sub>)和MTT(美国Sigma公司), CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱(日本Sanyo公司), Spectra Max M2全能酶标仪(美国Molecular Devices公司), 鼠抗人VEGF抗体(美国Santa Cruz公司), 鼠抗 $\alpha$ -tubulin抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗(美国Sigma公司), 蛋白定量试剂盒、电泳和转膜装置(美国Bio-rad公司), 增强化学发光剂(ELC)和显影暗盒(英国Amersham公司), 显影胶片(英国宝丽莱T667胶片), 莫洛尼鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录酶试剂(美国Promega公司), Taq DNA聚合酶(美国MBI公司),  $\beta$ -actin和VEGF引物由北京奥科生物

技术有限责任公司合成, PCR仪和图像分析(德国Biometra公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及处理:** HepG2细胞中加入含50 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基, 置于50 mL/L CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度的常氧环境培养箱内培养, 待细胞贴壁融合至80%时更换新鲜无血清培养基, 继续培养24 h后, 细胞进入试验. 为了充分模拟缺氧微环境, 将培养箱调至50 mL/L CO<sub>2</sub>、950 mL/L N<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度的缺氧条件, 并在细胞缺氧培养前5 min往培养基内添加终浓度300  $\mu$ mol/L的CoCl<sub>2</sub><sup>[8]</sup>. 细胞在缺氧培养条件下, 分别加入终浓度为1、2、5、10  $\mu$ mol/L的姜黄素作用6 h. 作用完成后收集细胞, 提取细胞蛋白和mRNA. 以0  $\mu$ mol/L姜黄素作用的HepG2细胞作为对照组.

**1.2.2 MTT法检测细胞活力:** HepG2细胞悬液按每孔10<sup>4</sup>个细胞接种于96孔板中, 每孔体积200  $\mu$ L. 按实验安排加入不同剂量姜黄素, 常氧条件下培养6 h, 每个剂量组6个复孔. 作用结束后吸弃培养基, 细胞用PBS洗3次, 每孔加入200  $\mu$ L新鲜无血清培养基及20  $\mu$ L MTT溶液(5 g/L), 继续孵育4 h后终止培养. 小心吸弃孔内培养上清, 每孔再加入150  $\mu$ L二甲基亚砜, 振荡10 min, 使结晶充分溶解. 自动酶标仪上用490 nm波长测各孔光吸收值, 用试验孔与对照孔的吸光度百分比值表示细胞活力.

**1.2.3 Western blot免疫印迹法检测VEGF的蛋白表达水平:** 细胞用细胞裂解液裂解后提取全细胞蛋白并定量. 将点样蛋白浓度调成一致后电泳分离、转膜. 转膜后的硝酸纤维素膜用50 g/L脱脂奶粉缓冲液封闭4℃封闭过夜, 加一抗VEGF(1:200)室温振荡孵育2 h, 洗膜30 min后加二抗(1:8000)室温振荡孵育1 h, 再洗膜30 min除去未结合的二抗, 暗盒显影. 免疫反应带用ELC试剂盒检测, 化学发光信号用自显影胶片记录. 内参选用 $\alpha$ -tubulin. Biometra图像分析仪对条带积分吸光度进行定量分析. 用VEGF/ $\beta$ -actin表示VEGF蛋白的相对表达量. 每个实验组重复3次计算统计量.

**1.2.4 RT-PCR检测VEGF的mRNA水平:** 按照TRIzol说明书方法提取细胞总RNA, 测总RNA浓度和纯度. 在25  $\mu$ L逆转录反应体系中, 以1  $\mu$ g总RNA为模板, 以随机引物Random 9mers为引物, 用M-MLV逆转录酶将mRNA逆转录为cDNA. 取3  $\mu$ L逆转录产物cDNA, 用Taq DNA

### ■ 研发前沿

抑制肿瘤血管新生是当前抗肿瘤治疗的重要策略之一. 寻找并研发安全、有效的抗肿瘤血管新生药物, 是肿瘤防治研究领域亟待解决的关键问题.

### ■ 创新盘点

目前国内外关于姜黄素对缺氧肝癌细胞内VEGF基因表达影响的报道并不多见。本文观察了不同剂量姜黄素作用下,人肝癌细胞HepG2在缺氧环境中VEGF表达的变化,发现姜黄素能抑制肝癌细胞中VEGF的mRNA和蛋白表达,且呈一定的剂量依赖效应。

表1 姜黄素在缺氧条件下作用于HepG2细胞时VEGF的表达水平

剂量 ( $\mu\text{mol/L}$ )	VEGF蛋白 (VEGF/ $\alpha$ -tublin)	VEGF mRNA (VEGF/ $\beta$ -actin)
0	$2.85 \pm 0.37$	$0.81 \pm 0.07$
1	$2.12 \pm 0.23^a$	$0.60 \pm 0.05^b$
2	$1.59 \pm 0.13^b$	$0.54 \pm 0.04^b$
5	$0.82 \pm 0.11^b$	$0.16 \pm 0.02^b$
10	$0.33 \pm 0.05^b$	$0.06 \pm 0.01^b$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )。

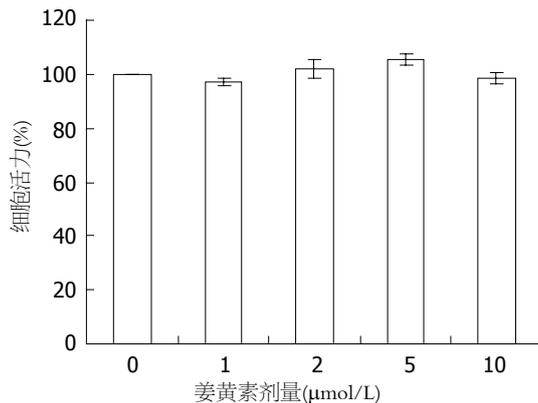


图1 姜黄素对HepG2细胞活力的影响。

聚合酶进行PCR反应, PCR反应体积25  $\mu\text{L}$ 。以 $\beta$ -actin作为内参。引物序列如下: VEGF: 上游引物5'-GAGGGCAGAATCATCACGAAG-3', 下游引物5'-AGGGAACGCTCCAGGACTTAT-3', 扩增产物长度402 bp;  $\beta$ -actin: 上游引物5'-CATCACTATCGGCAATGAGC-3', 下游引物5'-GACAGCACTGTGTTGGCATA-3', 扩增产物长度156 bp。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min后, VEGF: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸35 s;  $\beta$ -actin: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min。30个循环后72 $^{\circ}\text{C}$ 维持5 min, PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统进行半定量分析, 用VEGF/ $\beta$ -actin表示VEGF基因的相对表达量。每个实验组重复3次计算统计量。

**统计学处理** 实验数据用mean $\pm$ SD表示, 使用SPSS12.0软件进行组间方差分析。

## 2 结果

**2.1 姜黄素对缺氧条件下HepG2细胞活力的影响** 1、2、5、10  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理的HepG2细胞相对活力与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )相比较, 差异无统计学意义(图1)。

**2.2 姜黄素对缺氧条件下HepG2细胞内VEGF的**



图2 姜黄素在缺氧条件下作用于HepG2细胞的VEGF蛋白表达水平。

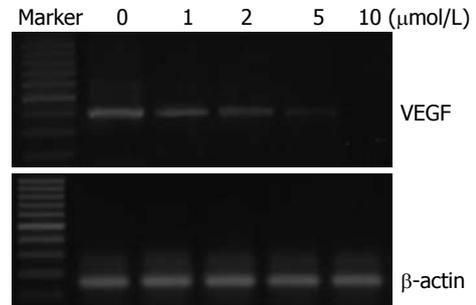


图3 姜黄素在缺氧条件下作用于HepG2细胞时VEGF的mRNA表达水平。

表达影响 1  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理使HepG2细胞缺氧6 h后的VEGF蛋白表达明显下降, 与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 2、5、10  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的处理使HepG2细胞内VEGF蛋白表达水平的下降更为明显, 各剂量组与对照组相比, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(表1, 图2); 1-10  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理使HepG2细胞缺氧6 h后的VEGF mRNA表达水平明显下降, 下降趋势与蛋白表达变化趋势一致, 呈一定的剂量效应关系, 各剂量组与对照组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 表1, 图3)。

## 3 讨论

肿瘤的主要生物学特征是肿瘤细胞的快速生长并伴缺氧微环境的形成<sup>[9]</sup>。缺氧能激活多种血管生成因子表达, 是促血管生成的诱因<sup>[10-11]</sup>。而血管生成是实体肿瘤生长、侵袭、扩散和转移的基础和关键, 是肿瘤治疗的靶点。VEGF广泛分布于人体内, 是诱导肿瘤产生新生血管的主要细胞因子。VEGF可诱导肝癌中新生微血管形成, 为肝癌组织提供充分的养分, 同时能增加微血管的通透性, 利于肝癌细胞透过发育不完善的新生微血管进入循环转移扩散, 促进肝癌细胞的转移和增生<sup>[12-14]</sup>。肝癌组织中VEGF的表达量被发现与肿瘤的增殖活性及新生化程度有显著相关性<sup>[15]</sup>。而血清VEGF的测定则被认为和血清甲胎蛋白一样, 是诊断肝细胞癌及其预后判断的重要指标<sup>[16]</sup>。因此, 抑制VEGF的表达可以通过减少血管生成和肿瘤细胞异常增殖等机制发挥抗肝癌作用。

姜黄素是从姜科植物姜黄根茎中提取的酚性色素, 是姜黄最重要的活性成分, 具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、降血脂等多种药理作用<sup>[17-18]</sup>。临床研究发现姜黄素能使癌前病变逆转<sup>[19]</sup>。美国国立肿瘤研究所也将其列为第三代癌症化学预防药物, 进入一期临床试验。姜黄素的抗癌作用复杂, 确切的抗癌效应机制依然不明<sup>[20]</sup>。最近的研究发现姜黄素能抑制体外血管内皮细胞增殖和体内毛细血管的形成<sup>[21-23]</sup>。这证明姜黄素肿瘤的预防效能起码有部分是因他对血管生成的直接抑制。但是姜黄素抗肿瘤血管生成的作用机制尚不完全清楚。Gururaj *et al*<sup>[24]</sup>发现姜黄素能通过抑制EAT细胞的VEGF表达来抑制肿瘤血管生成。我们的实验结果表明, 1-10  $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素能剂量依赖性地抑制人肝癌细胞HepG2在缺氧条件下的VEGF mRNA表达和蛋白表达。这与Bae *et al*<sup>[25]</sup>的实验结果一致。同时, 我们观察了1-10  $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用6 h对缺氧条件下的HepG2细胞活力的影响, 发现1-10  $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素对HepG2细胞没有产生急性毒性。这说明姜黄素对HepG2细胞中VEGF表达影响的结果不会因为其致细胞死亡而产生便倚。提示姜黄素确实可抑制肝癌细胞中VEGF的基因表达, 从而抑制肝癌组织缺氧诱导的血管形成和肝癌细胞生长、转移。

中医运用姜黄来治疗肝病、散风活血、通经止痛由来已久, 印度早在3000多年前就将富含姜黄素的咖喱作为日常食物食用。现在, 姜黄素已被WHO/FDA列为天然食用色素, 并且已有临床实验在逐步研究姜黄素的药物代谢动力学和癌症治疗的生物有效剂量<sup>[19,26]</sup>。因此姜黄素极有可能成为未来安全有效的肝癌预防与治疗剂。下一步, 我们将着手研究姜黄素对HepG2细胞缺氧诱导VEGF表达的抑制作用的可能分子机制和体内效应, 为开发和筛选新型临床抗肝癌药物提供进一步的理论依据。

#### 4 参考文献

- Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 5736-5740
- 杨军, 陈明清, 董坚. VEGF/VEGFR2信号转导通路在抗肿瘤血管生成中的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3611-3616
- Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4: 376-383
- Han SS, Chung ST, Robertson DA, Ranjan D,

- Bondada S. Curcumin causes the growth arrest and apoptosis of B cell lymphoma by downregulation of *egr-1*, *c-myc*, *bcl-XL*, *NF-kappa B*, and *p53*. *Clin Immunol* 1999; 93: 152-161
- Moragoda L, Jaszewski R, Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells. *Anticancer Res* 2001; 21: 873-878
- Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Nakase H, Noda K, Enomoto N, Arai K, Yamada Y, Yoshihara H, Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3004-3009
- 杜静, 赵秋, 谷华, 滕晓丽, 覃华, 刘南植, 梁扩寰. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 及其靶基因在人肝癌HepG2细胞中的表达和意义. *中华肝脏病杂志* 2006, 14: 607-609
- Huang Y, Du KM, Xue ZH, Yan H, Li D, Liu W, Chen Z, Zhao Q, Tong JH, Zhu YS, Chen GQ. Cobalt chloride and low oxygen tension trigger differentiation of acute myeloid leukemic cells: possible mediation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Leukemia* 2003; 17: 2065-2073
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 6449-6465
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410
- Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 5: 10-17
- Schmitt M, Horbach A, Kubitz R, Frilling A, Haussinger D. Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. *J Hepatol* 2004; 41: 274-283
- 赵一鸣, 王鲁. 血管内皮生长因子受体与肝细胞癌血管生成关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 596-600
- 毛华, 黄纯焯, 赵敏芳, 宋卫生. P38MAPK信号通路调控VEGF诱导肝癌细胞黏附作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 778-783
- Tian Z, Yang M, Huang F, Li K, Si J, Shi L, Chen S, Xiao P. Cytotoxicity of three cycloartane triterpenoids from *Cimicifuga dahurica*. *Cancer Lett* 2005; 226: 65-75
- 侯振江, 王秀文, 张丽华, 周秀艳, 戴殿祿, 闫金辉. 原发性肝癌患者血清leptin, VEGF和AFP表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3195-3200
- Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan KN, Kuttan R. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett* 1995; 94: 79-83
- Kawamori T, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Kaskey RB, Rao CV, Reddy BS. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 597-601
- Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W, Yu HS, Jee SH, Chen GS, Chen TM, Chen CA, Lai MK, Pu YS, Pan MH, Wang YJ, Tsai CC, Hsieh CY. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 2001; 21: 2895-2900
- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical

#### ■应用要点

研究姜黄素对缺氧人肝癌细胞中VEGF基因表达的影响, 为进一步深入探讨姜黄素抗肝癌作用机制及开发、筛选新型临床抗肝癌药物提供了一定的理论依据。

### ■同行评价

本研究设计合理, 统计学方法正确, 结论明确, 论证条理分明, 合乎逻辑, 具有科学性和可读性。

- studies. *Anticancer Res* 2003; 23: 363-398
- 21 Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, Raizman MB, Fini ME. Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem* 2000; 275: 10405-10412
- 22 Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, Park HJ, Shim BS, Choi SH, Kwon HJ. Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin. *Chem Biol* 2003; 10: 695-704
- 23 Choi H, Chun YS, Kim SW, Kim MS, Park JW. Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1664-1671
- 24 Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marme D, Salimath BP. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 934-942
- 25 Bae MK, Kim SH, Jeong JW, Lee YM, Kim HS, Kim SR, Yun I, Bae SK, Kim KW. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. *Oncol Rep* 2006; 15: 1557-1562
- 26 Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, Marczylo TH, Morgan B, Hemingway D, Plummer SM, Pirmohamed M, Gescher AJ, Steward WP. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6847-6854

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 •

### 世界华人消化杂志计量单位标准

**本刊讯** 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa( $M$ 大写斜体,  $r$ 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ ( $A$ 大写斜体,  $r$ 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 $u$ (小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ,  $45.6 \pm 24$ 岁,  $56.4 \pm 0.5$  d.  $3.56 \pm 0.27$  pg/ml应为 $3.56 \pm 0.27$  ng/L,  $131.6 \pm 0.4$  mmol/L,  $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$ , WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm $\times$ 6 cm $\times$ 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B<sub>12</sub>用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5  $\mu\text{g}$ , hr改成h, 重量 $\gamma$ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg $\cdot$ d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-18)

# NO对小鼠结肠平滑肌自主收缩活动的影响及其机制

彭双勤, 龚红萍, 余上斌, 熊宗斌, 祝兰, 胡还忠

彭双勤, 祝兰, 华中科技大学同济医学院生理系 湖北省武汉市 430030  
龚红萍, 武汉市第五医院功能科 湖北省武汉市 430050  
余上斌, 熊宗斌, 华中科技大学同济医学院机能学中心实验室 湖北省武汉市 430030  
胡还忠, 华中科技大学同济医学院生理系; 同济医学院机能学中心实验室 湖北省武汉市 430030  
彭双勤, 2005级华中科技大学同济医学院生理学硕士, 主要从事消化道生理与临床研究。  
作者贡献分布: 彭双勤与胡还忠对此文所作贡献均等; 此课题由胡还忠, 彭双勤, 龚红萍, 祝兰, 余上斌及熊宗斌共同设计; 研究过程由胡还忠, 彭双勤, 龚红萍, 祝兰, 余上斌及熊宗斌操作完成; 数据分析由彭双勤与胡还忠完成; 本论文写作由彭双勤与胡还忠完成。  
通讯作者: 胡还忠, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院生理系, huhuanzh@163.com  
电话: 0411-83600680 传真: 0411-83631284  
收稿日期: 2008-04-07 修回日期: 2008-05-07  
接受日期: 2008-05-12 在线出版日期: 2008-07-18

## Effect of nitric oxide on spontaneous contraction of rat colon smooth muscle and its mechanism

Shuang-Qin Peng, Hong-Ping Gong, Shang-Bin Yu, Zong-Bin Xiong, Lan Zhu, Huan-Zhong Hu

Shuang-Qin Peng, Lan Zhu, Department of Physiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Hong-Ping Gong, Department of Functional Examination, Wuhan Fifth Hospital, Wuhan 430050, Hubei Province, China  
Shang-Bin Yu, Zong-Bin Xiong, Functional Science Central Laboratory, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Huan-Zhong Hu, Department of Physiology and Functional Science; Central Laboratory, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Correspondence to: Huan-Zhong Hu, Department of Physiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. huhuanzh@163.com  
Received: 2008-04-07 Revised: 2008-05-07  
Accepted: 2008-05-12 Published online: 2008-07-18

## Abstract

**AIM:** To observe the effects and mechanism of *L*-arginine (*L*-Arg), the donor of nitric oxide (NO), on spontaneous contraction of rat colon smooth muscle *in vitro*.

**METHODS:** Effects of NO and influence of

*L*-NNA, ODQ, aminophylline, atropine and acetylcholine on NO were recorded in terms of tension change in rat colon smooth muscle stripe *in vitro* using tension transducer.

**RESULTS:** *L*-Arg inhibited spontaneous contraction of rat colon in a dose-dependent manner at different concentrations ranging from  $1 \times 10^{-8}$  to  $1 \times 10^{-3}$  mol/L. The contraction amplitude was decreased by  $38.0\% \pm 4.2\%$  and  $55.7\% \pm 4.4\%$  respectively when  $1 \times 10^{-5}$  and  $1 \times 10^{-3}$  mol/L *L*-Arg were used.  $1 \times 10^{-8}$  mol/L *L*-Arg showed no significant effect on spontaneous activities of rat colon. Inhibitory effects of *L*-Arg on colon muscle stripe were decreased in presence of ODQ ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) or in presence of acetylcholine ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L), but markedly elevated in presence of aminophylline ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) or in presence of atropine ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L).

**CONCLUSION:** *L*-Arg inhibits the spontaneous activities of mouse colon smooth muscle by the path of NO-sGC-cGMP and the pathway of M-receptor involved in this effect too.

**Key Words:** Nitric oxide; M-receptor; Smooth muscle; Spontaneous contraction; Colon

Peng SQ, Gong HP, Yu SB, Xiong ZB, Zhu L, Hu HZ. Effect of nitric oxide on spontaneous contraction of rat colon smooth muscle and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2239-2243

## 摘要

**目的:** 观察一氧化氮(NO)供体左旋精氨酸(*L*-arginine, *L*-Arg)对小鼠离体结肠自主收缩活动的影响及其机制。

**方法:** 用张力换能器记录肌标本自主收缩的方法, 以离体结肠肌条收缩张力的变化为指标, 观察NO的作用及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂*L*-NNA、可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylyl cyclase, sGC)抑制剂ODQ、磷酸二酯酶抑制剂氨茶碱(aminophylline)、M-受体的阻断剂阿托品(atropine)和激动剂乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)对NO作用的影响。

## ■背景资料

临床上不少疾病(如肝病)易影响消化道平滑肌的运动功能, 导致腹胀或腹泻, 而胃肠道平滑肌运动方式特殊, 影响因素颇多, 其机制并不清楚。本文观察NO供体*L*-Arg对小鼠结肠自主收缩活动的影响, 并初步探讨NO的作用机制, 以期为消化道相关疾病的诊断和治疗研究提供理论依据。

## ■同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

### ■ 研究前沿

NO对大鼠、小鼠消化道平滑肌的自主收缩活动有明显抑制作用,其作用机制尚不完全明确。

**结果:** NO抑制小鼠结肠平滑肌自主收缩活动,抑制效应呈浓度依赖性,  $1 \times 10^{-3}$  和  $1 \times 10^{-5}$  的 *L*-Arg抑制百分率分别为  $55.7\% \pm 4.4\%$  和  $38.0\% \pm 4.2\%$ ,  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 时对结肠自主收缩幅度的影响无显著性。 *L*-NNA ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L) 明显减弱 *L*-Arg 的抑制效应。 ODQ ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 减弱 *L*-Arg 的抑制效应。 aminophylline ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 使 *L*-Arg 的效应明显增强。 atropine ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 明显增强 *L*-Arg 的抑制效应。 ACh ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 减弱 *L*-Arg 的效应。

**结论:** *L*-Arg 由 NOS 催化生成 NO 后经 cGMP 途径发挥对小鼠结肠自主收缩的抑制作用, M-受体途径也部分参与了 NO 的作用过程。

**关键词:** 一氧化氮; M-受体; 平滑肌; 自主收缩; 结肠

彭双勤, 龚红萍, 余上斌, 熊宗斌, 祝兰, 胡还忠. NO 对小鼠结肠平滑肌自主收缩活动的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2239-2243

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2239.asp>

## 0 引言

NO 为小分子生物活性物质, 参与胃肠道许多生理和病理过程的调控<sup>[1]</sup>. 在啮齿类动物的胃肠道, NO 是最主要的非肾上腺素能非胆碱能 (nonadrenergic noncholinergic neurons, NANC) 抑制性递质<sup>[2-3]</sup>. 有证据表明, NO 对大鼠、小鼠消化道平滑肌的自主收缩活动有明显抑制作用<sup>[4-7]</sup>. 其作用机制尚不完全明确, NO 对空肠平滑肌相位性收缩的抑制作用, 可能与  $\alpha$ 、 $\beta$ 、M 受体有关<sup>[5-6]</sup>. 有学者认为, 在心血管、消化道等系统, NO 通过对其他神经递质如乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 等的调制而间接发挥作用<sup>[8-10]</sup>. 免疫组织化学研究显示, 棕色田鼠胃肠道内一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 分布密度在结肠内最高<sup>[11]</sup>. 光镜下观察大鼠肠道内 NOS 与乙酰胆碱酯酶 (acetylcholine esterase, AChE) 的分布, 结果 NOS 与 AChE 存在共染. 提示, NO 与胆碱能神经在消化道功能调节上, 可能存在相互协调作用<sup>[12]</sup>. 有关 NO 对小鼠结肠平滑肌中的作用的报道甚少. 本文观察 NO 供体 *L*-Arg 对小鼠结肠自主收缩活动的影响, 并初步探讨 NO 的作用机制, 以期为消化道相关疾病的诊断和治疗研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年昆明  $\delta$  小白鼠 35-40 g, 华中科技大学同济医学院动物中心提供. 适应性喂

养 1 wk. 实验前禁食 24 h, 自由饮水. 颈椎脱臼处死, 迅速打开腹腔, 从距回盲部 2 cm 以内取近端结肠约 1.5 cm, 置于 950 mL/L  $O_2$  + 50 mL/L  $CO_2$  饱和的 Krebs 液中备用. 本实验所用 *L*-NNA (*L*-nitro-*L*-arginine), ODQ, aminophylline 等试剂购于 Sigma 公司. *L*-Arg 购于中国科学院武汉分院 (日本分装). Atropine, ACh 购于武汉远大制药集团股份有限公司. NaCl, KCl,  $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $NaHCO_3$ ,  $KH_2PO_4$ , Glucose 均为国产分析纯试剂. ODQ 用二甲亚砜配置, 其他试剂用 Krebs 液配置到所需的浓度。

**1.2 方法** 在盛有 950 mL/L  $O_2$  + 50 mL/L  $CO_2$  饱和的 Krebs 液的培养皿中, 清除结肠肠系膜, 制成 0.5 cm 长的标本. 将其置于  $37 \pm 0.5^\circ C$ 、盛有 10 mL Krebs 液 (950 mL/L  $O_2$  + 50 mL/L  $CO_2$  饱和) 的恒温浴槽中. 标本一端固定于恒温浴槽底部的通气钩上, 另一端连于 5Gjz100 型肌肉张力换能器 (高碑市新航机电设备有限公司) 的应变梁上, 换能器与生物信号采集处理系统 (南京美易) 连接, 记录和处理标本收缩活动张力的变化。

实验前给予标本 0.5 g 的前负荷, 平衡 1 h 左右, 每 15 min 更换 Krebs 液一次, 使收缩活动基本稳定 (张力的基线和幅度基本不变). 实验试剂用微量加样器直接加入恒温浴槽中, 每次加药的容积为 100  $\mu$ L. 药物作用稳定后, 用 950 mL/L  $O_2$  + 50 mL/L  $CO_2$  饱和的  $37 \pm 0.5^\circ C$  Krebs 液冲洗 3 次, 要求基础张力基本恢复到加药前的水平后再进行下一项实验. 显著不能恢复的标本弃之. 需加拮抗剂时, 在加入拮抗剂孵育 15 min 后再加入激动剂. 以张力变化幅度抑制百分率为统计指标. 幅度抑制百分率 = (加药前收缩幅度 - 加药后收缩幅度) / 加药前收缩幅度  $\times 100\%$ . 加药前收缩幅度: 标本收缩稳定后加药前 10 min 内的平均收缩幅度 (药物孵育后给药为药物孵育稳定后给药前 10 min 内的平均收缩幅度); 加药后的收缩幅度: 收缩幅度稳定后 10 min 内的平均幅度; Krebs 液 (mol/L):  $Na^+$  137.4,  $K^+$  5.9,  $Mg^{2+}$  1.2,  $Cl^-$  134,  $HCO_3^-$  15.5,  $H_2PO_4^-$  1.2, Glucose 11.5. 950 mL/L  $O_2$  + 50 mL/L  $CO_2$  饱和; pH = 7.4;  $37^\circ C \pm 0.5^\circ C$ .

**统计学处理** 统计数据用 mean  $\pm$  SD, 用统计软件 SPSS11.5 进行数据处理, 用配对 *t* 检验比较加药前后的变化.  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 NO 供体 *L*-Arg 对小鼠结肠自主收缩的影响**

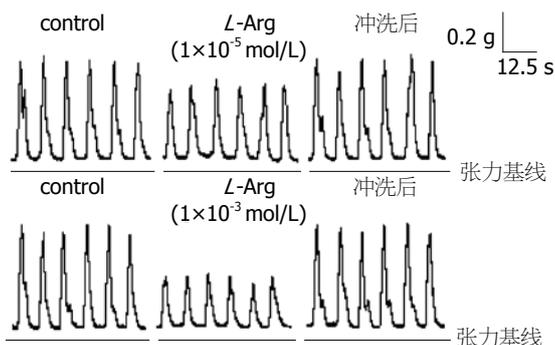


图1 L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)及L-Arg( $1 \times 10^{-3}$  mol/L)对结肠收缩活动的影响。

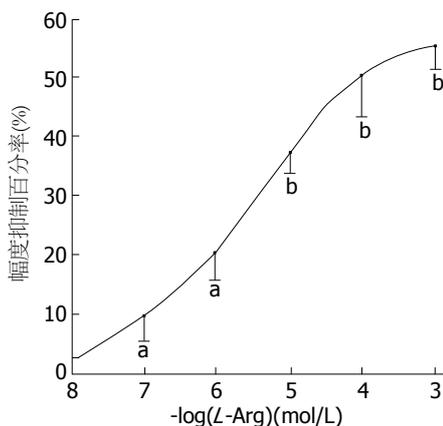


图2 NO供体L-Arg对小鼠结肠平滑肌抑制效应的量效曲线。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

依次观察 $1 \times 10^{-8}$ - $1 \times 10^{-3}$  mol/L各浓度组L-Arg对小鼠结肠肌条自主收缩幅度的影响, 每组9例。L-Arg( $1 \times 10^{-8}$  mol/L)组没有明显效应。在L-Arg( $10^{-7}$ - $10^{-3}$  mol/L)组, 给药后1-3 min左右自主收缩幅度开始下降, 10-15 min左右较稳定, 之后有回升趋势, 冲洗后收缩幅度能基本恢复到加药前的水平(图1)。其中L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)组的幅度抑制百分率为 $38.0\% \pm 4.2\%$ , L-Arg( $1 \times 10^{-3}$  mol/L)组的抑制百分率达 $(55.7\% \pm 4.4\%)$ 。其抑制效应呈浓度依赖性(图2)。

2.2 L-NNA和ODQ对L-Arg抑制小鼠结肠自主收缩幅度的影响 标本孵育稳定后, 先给予L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)作为对照, 幅度抑制百分率为 $36.9\% \pm 2.4\%$ ; 预先给予L-NNA( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)孵育15 min, 再加入L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L), 幅度抑制百分率为 $6.0\% \pm 1.8\%$ , 与单独给予L-Arg组配对比较, 差异具有极显著性( $n = 10, P < 0.01$ , 图3A)。

预先用sGC抑制剂ODQ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)孵育小鼠结肠标本15min后, 加入 $1 \times 10^{-5}$  mol/L L-Arg, 幅度抑制百分率为 $13.9\% \pm 1.5\%$ , 与同组标本单独L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)孵育后的抑制百

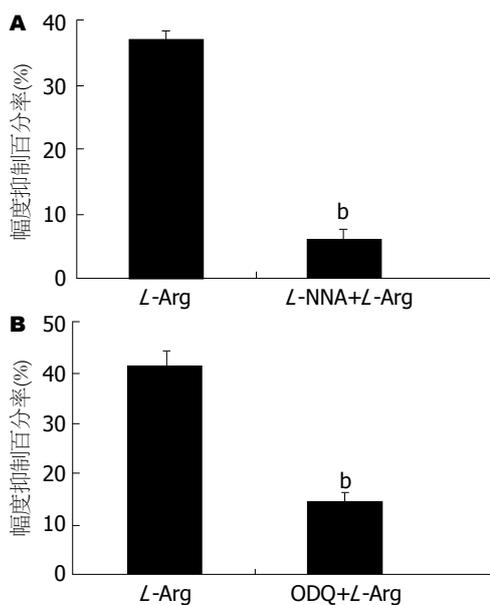


图3 L-NNA和ODQ对L-Arg作用的影响. A:  $1 \times 10^{-5}$  mol/L L-NNA; B:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L ODQ, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

分率( $40.2\% \pm 3.8\%$ )配对比较, 差别有显著意义( $n = 10, P < 0.01$ , 图3B)。

2.3 aminophylline对L-Arg抑制小鼠结肠自主收缩活动的影响 与同组标本单独经L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)作用后的抑制百分率( $39.2\% \pm 4.1\%$ )比较, 预先用aminophylline( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)孵育后加L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L), 幅度抑制百分率升高(图4A), 达 $56.2\% \pm 2.4\%$ , 差异有统计学意义( $P < 0.01, n = 11$ )。

2.4 M-受体的阻断剂、激动剂对L-Arg抑制小鼠结肠运动的影响 标本自主收缩稳定后, 用atropine( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)孵育标本15 min, 再加入 $1 \times 10^{-5}$  mol/L L-Arg, 其幅度抑制百分率为 $50.1\% \pm 5.6\%$ ( $P < 0.01, n = 10$ ), 与同组标本单独L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)作用后的幅度抑制百分率( $38.1\% \pm 4.7\%$ )相比, 幅度抑制百分率增高, 其差别具有统计学意义( $P < 0.05, n = 10$ ); 预先用ACh( $1 \times 10^{-7}$  mol/L)孵育后再加L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L), L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)的幅度抑制百分率由 $37.4\% \pm 4.3\%$ 降低到 $29.7\% \pm 1.4\%$ , 差异有显著统计学意义( $P < 0.01, n = 10$ , 图4B)。

### 3 讨论

本实验观察了NO供体L-Arg对小鼠结肠自主收缩的作用, 主要表现为浓度依赖性抑制效应。  $1 \times 10^{-3}$  mol/L的L-Arg抑制百分率达 $(55.7 \pm 4.4)\%$ ,  $1 \times 10^{-7}$  mol/L的L-Arg抑制百分率为 $10.1\% \pm 4.6\%$ ,  $1 \times 10^{-8}$  mol/L的L-Arg抑制作用不明显。在体内以L-Arg为底物, 由NOS催化而生成NO; 外

**■ 相关报道**  
有报道认为, 在小鼠、豚鼠回肠内部, 抑制性神经递质NO可能有调节兴奋性递质ACh释放的作用。

### 同行评价

本文研究方法和  
技术有特色,实验  
对照的设计合理,  
统计学处理方法  
恰当,科学性和可  
读性能反映我国  
胃肠病学基础研  
究水平.

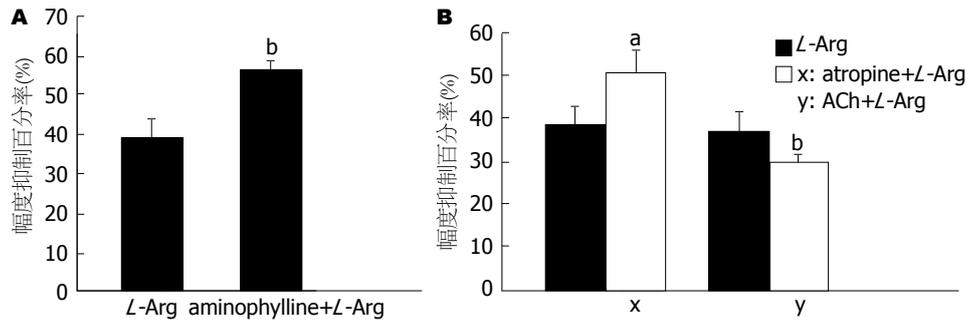


图4 aminophylline, M受体阻断剂和激动剂对L-Arg作用的影响. A: aminophylline; B: M受体阻断剂和激动剂. \* $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

源性L-Arg在消化道内以NO的形式对平滑肌收缩运动发挥抑制效应<sup>[4-6]</sup>. 本实验NOS抑制剂L-NNA( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)几乎完全阻断L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)对结肠自主收缩幅度的抑制效应, 支持上述观点. ODQ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)孵育后, L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)的幅度抑制百分率从38.0% ± 3.2%降到13.9% ± 1.5%, 证明sGC参与了NO的作用过程. 但ODQ并没有完全阻断NO的抑制效应, 提示NO除了通过NO-sGC-cGMP途径作用外, 还通过其他非cGMP依赖性途径发挥作用. cGMP的水解受cGMP-特异的磷酸二酯酶(PDE)催化, PDE抑制剂aminophylline( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)孵育后, L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)的幅度抑制百分率升高, 达到56.2% ± 2.4%. 表明NO的抑制效果与cGMP的关系密切. El-Yazbi *et al*最新报道, 小鼠小肠平滑肌膜NO依赖于cGMP介导平滑肌的舒张<sup>[13]</sup>. NO弥散进入细胞后, 激活sGC, 使胞内的cGMP含量增高, 通过cGMP依赖性蛋白激酶, 导致Ca<sup>2+</sup>通道关闭及Ca<sup>2+</sup>依赖性K<sup>+</sup>的开放<sup>[13-15]</sup>, 使肌肉收缩减弱.

atropine( $1 \times 10^{-6}$  mol/L)使L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)的幅度抑制百分率增高; ACh( $1 \times 10^{-7}$  mol/L)孵育后, L-Arg( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)的幅度抑制百分率由38.0% ± 3.2%降低到29.7% ± 1.4%. 结果提示, M-受体参与了NO抑制小鼠结肠收缩的部分作用过程. NO的这种抑制作用可能通过作用于突触前膜, 影响其他递质的释放从而抑制胃肠平滑肌运动<sup>[15-16]</sup>. 有报道认为, 在小鼠、豚鼠回肠内部, 抑制性神经递质NO可能有调节兴奋性递质ACh释放的作用<sup>[16-18]</sup>. 据此, 我们认为, NO可能一方面借助其疏水性穿过结肠平滑肌细胞膜, 直接通过NO-sGC-cGMP途径对结肠平滑肌运动起抑制作用, 另一方面, 可能作用于胆碱能神经末梢, 抑制胆碱能递质的释放, 影响结肠平滑肌的收缩. Knudsen *et al*的研究也表明, 兔肛门内

括约肌受兴奋性胆碱能神经及抑制性NANC神经支配, NANC神经侧支释放NO, 通过突触前作用抑制胆碱能神经释放ACh, 对肛门内括约肌活动进行调节<sup>[18-19]</sup>.

本研究结果表明, NO可抑制小鼠结肠平滑肌自主收缩幅度, 其作用机制除NO-sGC-cGMP途径外, 可能还与M受体途径有关.

## 4 参考文献

- Prasad P. The role of nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 1014
- Menzies JR, Corbett AD. Nociceptin inhibits tonic nitric oxide release in the mouse isolated proximal colon. *Eur J Pharmacol* 2000; 388: 183-186
- Giaroni C, Knight GE, Ruan HZ, Glass R, Bardini M, Lecchini S, Frigo G, Burnstock G. P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology* 2002; 43: 1313-1323
- 王晓敏, 胡还忠, 余承高, 马立群, 汪长东, 田琴. 去甲肾上腺素对一氧化氮在小鼠十二指肠肌条收缩中作用的影响机制. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 358-362
- 汪长东, 胡还忠, 刘子龙, 马立群, 田琴, 余承高, 王晓敏. 一氧化氮抑制大鼠空肠平滑肌收缩. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 588-591
- 马立群, 胡还忠, 汪长东, 王晓敏, 田琴.  $\beta$ -肾上腺素能受体在NO抑制小鼠回肠自主收缩中的作用. *中国应用生理学杂志* 2007; 23: 111-115
- 田琴, 胡还忠, 马立群, 汪长东, 王晓敏, 梁华敏. GABA对小鼠回肠平滑肌自主收缩活动的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1981-1984
- Allescher HD, Kurjak M, Huber A, Trudrung P, Schusdziarra V. Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: evidence for a stimulatory effect of NO. *Am J Physiol* 1996; 271: G568-G574
- Flavia Mulè F, Serio R. NANC inhibitory neurotransmission in mouse isolated stomach: involvement of nitric oxide, ATP and vasoactive intestinal polypeptide. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 431-437
- Wiklund CU, Olgart C, Wiklund NP, Gustafsson LE. Modulation of cholinergic and substance P-like neurotransmission by nitric oxide in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 833-839
- 安书成, 徐畅, 徐金会, 刘梅. NOS在棕色田鼠胃肠道各段肌间神经丛分布的比较. *中国神经科学杂志* 2003; 19: 313-317
- 吴红金, 林传友, 曹福元, 胡道松, 殷光甫, 茹立强. 大鼠肠道内NOS与AChE、VIP阳性神经元的分布关系

- 研究. 中国组织化学与细胞化学杂志 2000; 9: 187-190
- 13 El-Yazbi AF, Cho WJ, Cena J, Schulz R, Daniel EE. Smooth muscle NOS, co-localized with caveolin-1, modulates contraction in mouse small intestine. *J Cell Mol Med* 2008 Apr 8 [Epub ahead of print]
- 14 Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983; 52: 352-357
- 15 Craven PA, DeRubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem* 1978; 253: 8433-8443
- 16 Tamura K, Schemann M, Wood JD. Actions of nitric oxide-generating sodium nitroprusside in myenteric plexus of guinea pig small intestine. *Am J Physiol* 1993; 265: G887-G893
- 17 Mang CF, Truempler S, Erbeling D, Kilbinger H. Modulation by NO of acetylcholine release in the ileum of wild-type and NOS gene knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1132-G1138
- 18 Yunker AM, Galligan JJ. Endogenous NO inhibits NANC but not cholinergic neurotransmission to circular muscle of guinea pig ileum. *Am J Physiol* 1996; 271: G904-G912
- 19 Knudsen MA, Glavind EB, Tøttrup A. Transmitter interactions in rabbit internal anal sphincter. *Am J Physiol* 1995; 269: G232-G239

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 •

### 世界华人消化杂志数字用法标准

**本刊讯** 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg,  $3.5 \pm 0.5$  mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之二的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean  $\pm$  SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 $3.6 \pm 0.4$  kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4  $\pm$  0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母  $\leq$  100, 百分数到个位;  $101 \leq$  分母  $\leq$  1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-18)

# Beclin1和NF-κB p65在肝癌中的表达及其临床意义

康凯夫, 王晓蔚, 陈小伍, 石祥呈

## ■背景资料

肝细胞性肝癌是一种常见恶性肿瘤,在我国居恶性肿瘤发病率的第三位,死亡率的第二位,因此寻找敏感而特异的肿瘤标志物对肝癌的早期发现,早期诊断,早期治疗至关重要。

康凯夫, 王晓蔚, 陈小伍, 石祥呈, 南方医科大学附属顺德第一人民医院病理科 广东省佛山市 528300

康凯夫, 硕士, 硕士生导师, 主任医师, 主要从事肿瘤病理诊断及分子生物学研究。

通讯作者: 康凯夫, 528300, 广东省佛山市, 南方医科大学附属顺德第一人民医院病理科. gentleman-kang@163.com

电话: 0757-22318570

收稿日期: 2008-03-26 修回日期: 2008-04-19

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-07-18

## Expression and clinical significance of Beclin1 and NF-κB p65 protein in primary human hepatocellular carcinoma

Kai-Fu Kang, Xiao-Wei Wang, Xiao-Wu Chen, Xiang-Cheng Shi

Kai-Fu Kang, Xiao-Wei Wang, Xiao-Wu Chen, Xiang-Cheng Shi, Department of Pathology, the First People's Hospital of Shunde Affiliated to Southern Medical University, Shunde 528300, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Kai-Fu Kang, Department of Pathology, the First People's Hospital of Shunde Affiliated to Southern Medical University, Shunde 528300, Guangdong Province, China. gentleman-kang@163.com

Received: 2008-03-26 Revised: 2008-04-19

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-07-18

## Abstract

**AIM:** To explore the expression and clinic significance of Beclin1 and Nuclear factor-kappa B (NF-κB p65) protein in primary human hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** Fifty pathologically-confirmed HCC samples, 30 post-hepatitis cirrhosis samples, 30 hepatitis tissue samples and 10 normal hepatic tissue samples from January 2003 to December 2007 were collected. The expressions of Beclin1 and NF-κB p65 in liver tissues were detected using immunohistochemistry.

**RESULTS:** The expressions rates of Beclin1 protein in cancer tissues, cirrhosis tissues, hepatitis tissues, normal tissues were respectively 78.00% (39/50), 26.67% (8/30), 53.3% (16/30) and 10.00% (1/10). The differences among the four were statistically significant ( $\chi^2 = 28.31$ ,

$P < 0.05$ ). The expressions of Beclin1 protein was significantly higher in HCC tissues than in cirrhosis tissues, hepatitis tissues or normal tissues ( $\chi^2 = 20.39$ ,  $\chi^2 = 5.31$ ,  $\chi^2 = 14.41$ ,  $P < 0.05$ ). The expressions of Beclin1 protein was markedly higher in hepatitis tissues than in cirrhosis tissues and normal tissues ( $\chi^2 = 4.44$ ,  $\chi^2 = 4.12$ ,  $P < 0.05$ ). The expressions rates of NF-κB p65 protein in HCC tissues, cirrhosis tissues, hepatitis tissues and normal hepatic tissues were 74.00% (37/50), 36.67% (11/30), 30.0% (9/30) and 20.00% (2/10), respectively. The differences among the four were statistically significant ( $\chi^2 = 22.00$ ,  $P < 0.05$ ). The expression of NF-κB p65 protein was markedly higher in HCC tissues than in cirrhosis tissues, hepatitis tissues and normal hepatic tissues ( $\chi^2 = 10.89$ ,  $\chi^2 = 14.85$ ,  $\chi^2 = 8.44$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Beclin1 expression is positively correlated with NF-κB p65 expression in HCC. Aberrant expressions of Beclin1 and NF-κB p65 are closely related with HCC development. They may play important roles in HCC development.

**Key Words:** Beclin1; Nuclear factor-kappa B; Immunohistochemistry

Kang KF, Wang XW, Chen XW, Shi XC. Expression and clinical significance of Beclin1 and NF-κB p65 protein in primary human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2244-2247

## 摘要

**目的:** 分析自噬基因Beclin1和核因子NF-κB(nuclear factor-kappaB, NF-κB)在原发性肝细胞性肝癌(primary human hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达及其临床意义。

**方法:** 收集顺德第一人民医院2003-01/2007-12手术切除经病理学证实的HCC50例, 肝炎后肝硬化手术切除或活检标本30例, 肝炎患者肝脏穿刺组织30例和正常肝组织10例。应用免疫组化S-P法检测肝脏组织中Beclin1和NF-κB p65蛋白的表达。

**结果:** 原发性肝细胞性肝癌、肝硬化、肝

## ■同行评议者

王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

炎和正常肝组织的Beclin1蛋白阳性表达率分别是78.00%(39/50)、26.67%(8/30)、53.33%(16/30)、10.00%(1/10), 四者之间的差异有统计学意义( $\chi^2 = 28.31, P < 0.05$ ), 且Beclin1在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织, 肝炎组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 20.39, 5.31, 14.41, P < 0.05$ ); 在肝炎组织表达明显高于在肝硬化组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 4.44, \chi^2 = 4.12, P < 0.05$ ). 原发性肝细胞性肝癌、肝硬化、肝炎和正常肝组织的NF- $\kappa$ B p65蛋白阳性表达率分别是74.00%(37/50)、36.67%(11/30)、30.00%(9/30)、20.00%(2/10), 四者之间的差异有统计学意义( $\chi^2 = 22.00, P < 0.05$ ), 且NF- $\kappa$ B p65在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织, 肝炎组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 10.89, \chi^2 = 14.85, \chi^2 = 8.44, P < 0.05$ ).

**结论:** Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在HCC中的表达关系密切, 呈正相关; Beclin1和NF- $\kappa$ B p65异常表达与HCC的发展密切相关, 在HCC的发展过程中起重要的作用。

**关键词:** Beclin1; 核因子 $\kappa$ B; 免疫组化

康凯夫, 王晓蔚, 陈小伍, 石祥呈, Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在肝癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2244-2247

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2244.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见恶性肿瘤. 在我国恶性肿瘤发病率居第3位, 死亡率第2位. 有关肝癌的发病机制仍不完全清楚, 目前认为, 多基因、多阶段的癌基因或抑癌基因变异构成肝癌发生和发展的分子基础. Beclin1基因也称BECN1基因. 是一种分子质量为60 kU的蛋白质, 位于人染色体17q21, 与*bcl-2*基因产物相互作用能抑制Sinbis病毒的复制, 减少中枢神经系统的凋亡<sup>[1-2]</sup>. 核因子NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B)作为一种具有多向转录调节作用的核蛋白因子, 是在1986年由Rwiansen和Baltimore发现的. 当时认为NF- $\kappa$ B只在成熟的B细胞中特异表达<sup>[3]</sup>. 随后的研究发现, NF- $\kappa$ B广泛存在于各种组织细胞中, 但在不同类型和不同生存状态的组织细胞中, 其活性有所不同<sup>[4]</sup>. 迄今的研究显示NF- $\kappa$ B在多种原发肿瘤中高表达, 在恶性肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用. 本研究旨在用免疫组化的方法来检测Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在肝癌中的表

达情况, 并探讨其临床意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集顺德第一人民医院2003-01/2007-12手术切除经病理学证实的HCC 50例, 按Edmondson分级标准 I-II级24例, III-IV级26例. 其中男性47例, 女性3例, 年龄28-71(平均56.5)岁. 收集肝炎后肝硬化手术切除或活检标本30例, 其中男性22例, 女性8例, 年龄25-69(平均50.6)岁. 收集肝脏患者肝脏穿刺组织30例, 按1995年中国病毒性肝炎防治方案(试行)慢性肝炎分级分期标准, 轻, 中, 重度各10例. 其中男性28例, 女性2例, 年龄6-51(平均34.8)岁. 标本用40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 4  $\mu$ m厚连续切片. 用意外死亡(生前体健)经HE染色切片诊断证实无病变的成人肝脏标本作正常对照. 兔多抗Beclin1, 鼠单抗NF- $\kappa$ B p65购自美国Santa Crus公司.

**1.2 方法** 应用免疫组化S-P法, 实验步骤按说明书进行. 以试剂公司提供的阳性对照片作为阳性对照, 以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照. 用双盲法对染色结果进行评估, Beclin1蛋白和NF- $\kappa$ B p65主要表达于细胞质, 呈棕黄色, 背景不着色. 每例随机观察5个高倍视野( $\times 400$ ), 每高倍视野计数200个瘤细胞. 计数细胞总数及核阳性细胞数, 按阳性细胞所占的百分比计分: 阳性细胞率 $\leq 20\%$ 为1分, 阳性细胞率 $> 20\%$ 且 $\leq 50\%$ 为2分, 阳性细胞率 $> 50\%$ 且 $\leq 75\%$ 为3分, 阳性细胞率 $> 75\%$ 为4分; 同时, 将染色强度分为4级: 阴性染色1分, 弱染色2分, 中等强度染色3分, 强染色4分; 根据二者的乘积判断结果,  $\leq 4$ 分为(-);  $> 4$ 且 $\leq 8$ 为(+);  $> 8$ 且 $\leq 12$ 为(++);  $> 12$ 且 $\leq 16$ 为(+++).

**统计学处理** 用SPSS13.0统计软件对数据采用卡方检验、四格表概率法及相关分析进行统计学分析处理. 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 Beclin1蛋白的表达** Beclin1蛋白主要表达于细胞质, 呈棕黄色, 弥漫分布(图1). HCC、肝硬化, 慢性肝炎和正常肝组织的Beclin1蛋白阳性表达率分别是78.00%(39/50)、26.67%(8/30)、53.33%(16/30)、10.00%(1/10), 四者之间的差异有统计学意义( $\chi^2 = 28.31, P < 0.05$ ), 经两两比较, Beclin1在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织, 肝炎组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 20.39, \chi^2 = 5.31, \chi^2 = 14.41, P < 0.05$ ); 在肝炎组织表达明显高于在肝硬化组织, 正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 4.44, \chi^2 = 4.12, P < 0.05$ , 表1).

### ■ 研发前沿

自噬对肿瘤具有双向作用, 因而NF- $\kappa$ B p56是否通过自噬发挥作用尚需进一步研究证实.

### ■相关报道

国内外对Beclin1在肝癌发生中的作用研究得出的结论尚不统一,本文对50例原发性肝细胞肝癌中Beclin1和NF- $\kappa$ B p56的表达进行了细致的研究,发现两者在肝癌中均高表达,与Djavaheri-Mergny *et al*报道的NF- $\kappa$ B p56激活抑制了肿瘤坏死因子介导的自噬结果不完全一致。

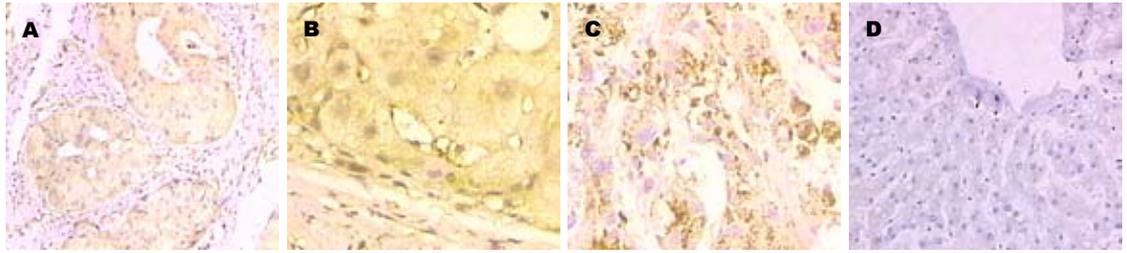


图1 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在不同肝组织中的表达(SP  $\times$  400). A: Beclin1在肝癌组织中的表达; B: Beclin1在肝炎组织中的表达; C: NF- $\kappa$ B p65在肝癌组织的表达; D: NF- $\kappa$ B p65在正常肝组织的表达。

表1 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65蛋白在各组肝组织中表达情况

	Beclin1			阳性率(%)	NF- $\kappa$ B p65			阳性率(%)
	阴性	阳性	阳性		阴性	阳性	阳性	
正常肝组织	10	9	1	10.00	8	2	20.00	
慢性肝炎	30	14	16	53.33	20	9	30.00	
肝硬化	30	22	8	26.67	19	11	36.67	
HCC	50	11	39	78.00	13	37	74.00	

表2 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65表达与肝细胞性肝癌临床病理参数的关系

	n	Beclin1		NF- $\kappa$ B p65	
		阴性	阳性	阴性	阳性
年龄(岁)					
≥60	16	4	12	3	13
<60	34	7	27	10	24
肿瘤大小(cm)					
≤5	19	8	11	9	10
>5	31	3	28	4	27
Edmondson分级					
I/II	24	3	21	2	12
III/IV	26	8	18	11	25
HBsAg					
阳性	42	7	35	12	30
阴性	8	4	4	1	7
转移					
阳性	14	3	11	2	12
阴性	36	8	28	11	25

2.2 NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达 NF- $\kappa$ B p65蛋白在癌组织中以胞质型为主,部分肝癌组织可见胞核表达,阳性细胞的分布呈弥漫性、小巢状或散在分布(图1); NF- $\kappa$ B p65蛋白阳性表达率分别是74.00%(37/50)、36.67%(11/30)、30.00%(9/30)、20.00%(2/10),四者之间的差异有统计学意义( $\chi^2 = 22.00, P < 0.05$ ),经两两比较, NF- $\kappa$ B p65在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织,肝炎组织,正常肝组织中的表达( $\chi^2 = 10.89,$

表3 50例肝细胞性肝癌组织Beclin1和NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的关系

	n	NF- $\kappa$ B p65			
		-	+	++	+++
-	11	4	1	4	2
+	9	2	3	4	0
++	26	7	10	7	2
+++	4	0	0	3	1
合计	50	13	14	18	5

$\chi^2 = 14.85, \chi^2 = 8.44, P < 0.05$ , 表1)。

2.3 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在肝癌组织的表达与相关临床病理因素的关系 Beclin1和NF- $\kappa$ B p65在HCC中的表达与年龄、性别、组织学分级、HBsAg及转移均无关,而与肿瘤的大小有关(表2)。在50例肝细胞性肝癌组织中, Beclin1和NF- $\kappa$ B p65表达强度之间存在正相关( $r = 0.794, P < 0.05$ , 表3)。

### 3 讨论

Beclin1基因也称BECN1基因,位于人染色体17q21,定位于高尔基体,参与PI3K复合物的组成和自噬体的形成<sup>[5]</sup>。据报道75%卵巢癌、50%乳腺癌以及40%前列腺癌中存在BECN1基因的缺失性突变<sup>[2]</sup>。在动物实验中观察到二乙基亚硝胺诱导的原发性肝癌和癌前结节自噬能力较正常肝细胞下降<sup>[6]</sup>。因而通常被认为是一种肿瘤抑制基因,但本研究结果显示Beclin1在肝癌组织和肝炎组织中高表达的特性,将在基因水平上为肝癌的预防和治疗提供一个新的靶点。Beclin1蛋

白表达与年龄、组织学分级、HBsAg及转移均无关, 与肿瘤直径大小有关, 有统计学意义. 该实验结果对我们进一步研究Beclin1在肝细胞性肝癌中的作用有重要意义, 有助于肝癌的诊断和治疗方案的选择.

核因子NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B)是信号传导途径的中枢的关键转录刺激因子,  $\kappa$ B位点存在于多种细胞和病毒的基因组中, 因而NF- $\kappa$ B能够调控众多基因转录<sup>[7]</sup>其信号传导途径参与了肝脏免疫炎症反应相关基因、肝炎病毒相关基因和原癌基因和抑癌基因的转录表达<sup>[8]</sup>. 在肝癌组织中异常激活, 可抑制细胞凋亡, 促进肝细胞存活, 与肝癌的发生发展密切相关<sup>[9]</sup>. 本研究亦显示NF- $\kappa$ B p65在原发性肝细胞性肝癌组织表达明显高于在肝硬化组织, 肝炎组织, 正常肝组织中的表达, 与年龄、组织学分级、HBsAg及转移均无关, 与肿瘤直径大小有关, 有统计学意义. 这提示在HCC中表达具有特异性, 这将为HCC的治疗提供新的靶点.

在分析Beclin1与NF- $\kappa$ B p65的关系时发现, Beclin1与NF- $\kappa$ B p65在肝癌的发展过程中呈明显的正相关( $r = 0.794, P < 0.05$ ). 推测二者可能在肝细胞性肝癌的发生发展中共同发挥着重要作用, 但具体调控机制尚不清楚. 推测其可能机制有下述几个方面: (1)当细胞受到各种因素(如氧化、缺血/再灌注、TNF2 $\alpha$ 、钙超载、毒性化合物)刺激下, 线粒体渗透性转运通道(MTP)开放, 线粒体肿胀, 释放cyc-c等凋亡因子. 此时, 细胞启动自噬来清除受损线粒体, 避免凋亡因子释放进入胞质, 同时提高细胞对低氧的耐受力, 对细胞起到一定保护作用. 这些外界信号同时激活了NF- $\kappa$ B信号通路, 使得Beclin1与NF- $\kappa$ B p65表达均增高. (2)Beclin1与NF- $\kappa$ B p65两者可能与凋亡相互拮抗: Liang *et al*证明Beclin1通过与***bcl-2***相互作用, 在宿主中枢神经系统抗Sindbis病毒发病机制中起作用, 推测Beclin1与***bcl-2***家族的凋亡作用有关<sup>[1]</sup>, 因为***bcl-2***基因上有 $\kappa$ B位点, 参与NF- $\kappa$ B激活后的抗细胞凋亡过程, 当肿瘤发展至晚期, 若自噬仍未活化, 则肿瘤细胞对缺血、缺氧的耐受力下降, 且不能及时清除胞内受损大分子物质和细胞器, 肿瘤细胞可能最终走向凋亡或坏死. 而自噬活化过程中因大分子物质循环和有害物质的隔离使肿瘤细胞生存. 进而保护肿瘤细胞免于凋亡和坏死的危险. 肿

瘤细胞所具有的高自噬活性对肿瘤细胞在恶劣环境中的生存起到一定的保护作用. (3)共同作用于c-Myc, ras等癌基因促进肿瘤生长. (4)肿瘤细胞的生长因子是受NF- $\kappa$ B调节的靶基因, 可以激活NF- $\kappa$ B信号通路<sup>[10]</sup>, 而生长因子结合于跨膜酪氨酸受体后, 激活1型磷脂酰肌醇三磷酸激酶(class I P13K), 使PIP被磷酸化为PIP3, PIP3结合于Akt/PKB和他的活化分子PDK1. 抑制了mTOR激酶活性, 促进自噬形成<sup>[11]</sup>. (5)均在肝脏枯否细胞有表达, 可能均参与了从肝炎, 肝硬化到肝癌的免疫炎症反应.

迄今, 研究提示自噬信号通路与NF- $\kappa$ B p65信号转导通路之间可能通过某些交叉点共同在恶性肿瘤的发生、发展中发挥作用. 但其具体机制尚不清楚. 深入研究Beclin1, NF- $\kappa$ B p65两者之间的关系对阐明肝癌的发生、发展并最终开发新的治疗手段提供理论依据.

#### 4 参考文献

- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 1998; 72: 8586-8596
- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; 59: 59-65
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928
- 史艳晖, 卢圣栋. 转录因子NF- $\kappa$ B的研究现状及其应用前景. *中国生物工程杂志* 2007; 27: 110-114
- Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2001; 2: 330-335
- 温莹浩, 殷正丰. 自噬与肿瘤. *实用肿瘤杂志* 2006; 21: 482-485
- 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩. 核转录因子Rel/NF- $\kappa$ B与乙型肝炎病毒. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 145-148
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; 431: 461-466
- 姚登福, 苏小琴. 核因子- $\kappa$ B异常激活与肝炎病毒感染关系的研究进展. *中国实用内科杂志* 2006; 23: 1862-1864
- 王文举, 李鸿钧, 孙茂盛. NF- $\kappa$ B与持久炎症及肿瘤发生关系. *生命的化学* 2007; 27: 197-199
- Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souquere S, Pierron G, Codogno P. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem* 2006; 281: 30373-30382

编辑 李军亮 电编 郭海丽

■同行评价  
本文内容全面, 具有一定的实用性, 科学性和先进性.

## hPTTG1在结直肠癌中的表达及其临床意义

吴斌文, 马东, 李友佳, 李东风, 邓罡, 曾志刚, 张凯军, 张瑛华, 耿庆山

### ■背景资料

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 手术治疗可以改善患者的预后, 但许多患者术后出现复发或转移。判断患者是否有复发或转移的倾向, 及时选择术后化疗, 对于Dukes A, B期的患者尤为重要。寻找结肠癌复发转移和预后判断的分子标志有现实的临床意义。

吴斌文, 李友佳, 邓罡, 曾志刚, 张凯军, 张瑛华, 耿庆山, 广东省人民医院东病区消化内科, 广东省老年医学研究所 广东省广州市 510080

马东, 广东省人民医院肿瘤中心肿瘤内科 广东省广州市 510080

李东风, 广东省人民医院医学实验中心 广东省广州市 510080

吴斌文, 2003年华中科技大学同济医学院博士, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤的临床和基础研究。

作者贡献分布: 吴斌文与马东对此文所作贡献均等; 此课题由耿庆山, 吴斌文, 马东及李友佳共同设计; 研究过程由吴斌文, 李友佳, 李东风, 邓罡, 曾志刚, 张凯军及张瑛华操作完成; 数据分析由吴斌文与李东风完成; 本论文写作由吴斌文完成。

通讯作者: 吴斌文, 510080, 广州市中山二路106号, 广东省人民医院东病区消化内科, 广东省老年医学研究所。

wubinwend@yahoo.com.cn

电话: 020-83827812-70511

收稿日期: 2008-04-24 修回日期: 2008-06-05

接受日期: 2008-06-12 在线出版日期: 2008-07-18

### Expression of human pituitary tumor transforming gene 1 in colorectal cancer and its clinical significance

Bin-Wen Wu, Dong Ma, You-Jia Li, Dong-Feng Li, Gang Deng, Zhi-Gang Zheng, Kai-Jun Zhang, Ying-Hua Zhang, Qing-Shan Geng

Bin-Wen Wu, You-Jia Li, Zhi-Gang Zheng, Gang Deng, Kai-Jun Zhang, Ying-Hua Zhang, Qing-Shan Geng, Department of Gastroenterology, East Section, Guangdong Provincial People's Hospital; Institute of Geriatrics, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Dong Ma, Department of Medical Oncology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Dong-Feng Li, Medical Research Center, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Bin-Wen Wu, Department of Gastroenterology, East Section, Guangdong Provincial People's Hospital; Institute of Geriatrics, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. wubinwend@yahoo.com.cn

Received: 2008-04-24 Revised: 2008-06-05

Accepted: 2008-06-12 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of human pituitary tumor transforming gene 1 (hPTTG1) protein in colorectal cancerous tissues and to analyze its relationship with clinicopathological parameters so as to gain more experimental evidence for hPTTG1's clinical value in colorectal cancer diagnosis and relapse.

**METHODS:** Sixty colorectal cancer samples and their corresponding noncancerous tissues were examined for hPTTG1 protein expression using immunohistochemical staining and Western blotting analysis. Subsequently, we also studied the relationship between seven clinicopathological parameters and hPTTG1 protein expression.

**RESULTS:** Of 60 colorectal tissue samples, 50 samples of hPTTG1 protein expression were positive (93.3%), but only 8 corresponding noncancerous tissues were positive and all weakly positive (13.3%) ( $\chi^2 = 77.13, P < 0.001$ ). There was a significant correlation between hPTTG1 mRNA expression and serum CEA level, and  $CEA \geq 5$  mg/L was significantly higher than  $CEA < 5$  mg/L ( $\chi^2 = 30.886, P < 0.001$ ); hPTTG1 gene was expressed significantly higher in Dukes C, D stages than in Dukes A, B stages ( $\chi^2 = 9.87, P < 0.001$ ), and significantly higher in colorectal cancer with the lymph node invasion, liver or other organs metastasis than no invasion ( $\chi^2 = 9.87, P < 0.001$ ). The hPTTG1 expression was not correlated with age, sex, tumor size or histologic types.

**CONCLUSION:** The hPTTG1 is overexpressed in and closely correlated with the progress of colorectal cancer, therefore hPTTG1 expression may be helpful for the judgement of the prognosis for colorectal cancer patients.

**Key Words:** Colorectal cancer; Human pituitary-tumour transforming gene 1; Immunohistochemistry

Wu BW, Ma D, Li YJ, Li DF, Deng G, Zheng ZG, Zhang KJ, Zhang YH, Geng QS. Expression of human pituitary tumor transforming gene 1 in colorectal cancer and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2248-2252

### ■同行评议者

王晓艳, 副教授, 中南大学湘雅三医院消化内科; 孙延平, 副主任医师, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院普外科

### 摘要

**目的:** 检测人垂体瘤转化基因1(hPTTG1)在结直肠癌中的表达, 分析其与临床病理参数之间的关系, 为阐明hPTTG1在结直肠癌诊断和转移复发中的临床价值提供实验依据。

**方法:** 收集我院2004-01/2006-09结直肠癌及

对应癌旁组织的手术标本60例. 采用免疫组织化学和Western blotting检测结直肠癌组织与对应癌旁组织hPTTG1蛋白的表达, 并探讨其与临床病理指标的关系.

**结果:** 60例结直肠癌组织有56例表达hPTTG1蛋白, 阳性率为93.3%, 而癌旁组织hPTTG1仅8例表达, 且均为弱阳性, 阳性率为13.3% ( $\chi^2 = 77.13, P < 0.001$ ). hPTTG1表达与血清CEA水平具有显著相关, 血清CEA大于5 mg/L较小于5 mg/L显著增高 ( $\chi^2 = 30.886, P < 0.001$ ). hPTTG1在Dukes C、D期显著高于Dukes A、B期 ( $\chi^2 = 9.87, P < 0.001$ ). 伴有淋巴转移、肝转移或其他器官转移者较无转移者显著增高 ( $\chi^2 = 9.87, P < 0.001$ ). hPTTG1与患者的性别、年龄、肿瘤直径大小和病理分型无关.

**结论:** hPTTG1在结直肠癌中高表达, 与结肠癌的疾病进展密切相关, 检测hPTTG1有助于患者预后的判断.

**关键词:** 结直肠癌; 人垂体瘤转化基因1; 转移; 免疫组化

吴斌文, 马东, 李友佳, 李东风, 邓罡, 曾志刚, 张凯军, 张瑛华, 耿庆山. hPTTG1在结直肠癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2248-2252  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2248.asp>

## 0 引言

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 手术治疗可以改善患者的预后, 但许多患者术后出现复发或转移. 判断患者是否有复发或转移的倾向, 及时选择术后化疗, 对于Dukes A、B期的患者尤为重要. 寻找结直肠癌复发转移和预后判断的分子标志有现实的临床意义. 垂体瘤转化基因(pituitary-tumour transforming gene, PTTG)是新近发现的一种癌基因, 是17种与肿瘤转移相关基因之一<sup>[1]</sup>. 人类肿瘤中主要表达hPTTG1 (human pituitary tumor transforming gene 1). 在成人大多数正常组织hPTTG1表达较弱, 甚至检测不到, 而在肿瘤组织中高表达, 尤其在垂体瘤、卵巢癌、肝癌、肾癌等内分泌器官发生的癌症中高表达<sup>[2]</sup>. hPTTG1可导致染色体不稳定性, 导致肿瘤的发生<sup>[2]</sup>; 还可调节p53基因, 导致下游癌基因的活化<sup>[3]</sup>. 在结肠癌中相关研究较少. 我们采用免疫组织化学和Western blotting, 检测结肠癌中hPTTG1表达, 同时分析hPTTG1表达与病理类型、淋巴结或肝肺等转移、CEA水平以及Dukes分期等临床病

理参数的关系, 探讨hPTTG1与结直肠癌生物学行为的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集我院2004-01/2006-09结直肠癌及对应癌旁5 cm组织的手术标本, 分别石蜡包埋和-70℃保存备用. 所有病例均有完整临床资料并随访. 男28例, 女32例, 年龄31-86岁, 平均61岁. 左半结肠癌15例, 右半结肠癌20例, 直肠癌25例, 高分化腺癌7例, 中分化腺癌47例, 低分化腺癌6例. Dukes分期: A期2例, B期27例, C期21例, D期8例. 所有病例均经病理确诊. hPTTG1兔抗人多克隆抗体为Zymed Laboratory产品; SP试剂盒购自北京中山生物公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色:** 组织切片常规脱腊至水, 置枸橼酸盐抗原修复液中用微波炉抗原修复10 min, 自然冷却至室温; 30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭20 min, 20 mL/L羊血清37℃封闭30 min, 分别滴加抗hPTTG1兔抗人多克隆抗体(1:50), 4℃冰箱过夜, PBS缓冲液冲洗, 滴加生物素标志二抗, 37℃孵育30 min, PBS缓冲液冲洗, DAB显色, 蒸馏水冲洗, 苏木素复染, 封片. 用PBS代替一抗作染色的阴性对照. hPTTG1以肿瘤细胞胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞. 结果判断: 光学显微镜下观察, 阳性细胞胞膜、胞质或者胞核出现棕黄色颗粒. 在低倍镜(40×)下观察hPTTG1表达较强的区域, 高倍镜(200×)观察3个视野, 计数阳性细胞所占的百分比. 阳性细胞超过肿瘤细胞数的10%定义为阳性, 否则为阴性. 阳性细胞率<25%者为(+); 阳性细胞率占25%-50%者为(++); 阳性细胞率>50%者为(+++). 结合临床资料, 统计60例大肠癌患者癌组织hPTTG1表达与临床病理类型、肿瘤大小、分化程度、Duke分期和淋巴结转移之间的关系.

**1.2.2 Western blotting分析:** 取适量(250-500 mg)-70℃保存的结肠癌组织, 加1 mL含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂, 匀浆后抽提总蛋白. 按BCA蛋白质定量试剂盒操作说明操作, 测定样品浓度. 不同样品取等量蛋白变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(SDS-PAGE). 按Bio-Rad蛋白转移装置说明组装滤纸凝胶纤维素夹层, 30 mA恒流条件下, 蛋白质转移到PVDF膜. 50 g/L脱脂奶粉溶液中室温孵育1 h, 立即加入稀释好的一抗, 4℃缓慢摇动孵育过夜, 洗涤液洗涤5-10 min, 共洗涤3次. 辣根过氧化物酶(HRP)标志的二抗, 4℃缓慢摇动孵育1 h. ECL显色, 适时终止反应.

## ■ 研发前沿

hPTTG1最早发现于垂体瘤, 可导致染色体不稳定性, 导致肿瘤的形成, 导致肿瘤的发生; 还可调节p53基因, 导致下游癌基因的活化; 促进肿瘤的新生血管形成, 参与肿瘤的转移复发. 在神经胶质瘤、食管癌和肝癌均有与预后相关的报道, 对其分子机制和临床应用价值的研究是目前研究的热点.

## ■ 相关报道

hPTTG1是新近发现的一种与多种肿瘤转移相关的癌基因, hPTTG1表达与肝癌、神经胶质瘤预后有关, 有可能成为预后判断的分子标志. hPTTG1可能通过促进成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达, 参与肿瘤的新生血管形成和淋巴转移, 导致肿瘤的复发和转移. 在治疗方面, 干扰RNA沉默hPTTG1基因, 有可能成为治疗肿瘤的途径之一.

### ■创新盘点

本文应用免疫组织化学和Western blotting检测hPTTG1蛋白在结肠直肠癌中的表达及其与临床病理参数的关系。

ECL Western blotting analysis system(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)检测并成像。

**统计学处理** 结肠直肠癌临床病理参数与hPTTG1蛋白表达率之间的比较采用 $\chi^2$ 检验。实验数据采用SPSS13.0统计分析软件分析,  $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 hPTTG1蛋白的表达及与结肠直肠癌患者临床病理参数的关系** 免疫组织化学结果显示, 在结肠直肠癌中hPTTG1蛋白呈现高表达, 癌旁组织中无表达或低表达(图1)。60例结肠直肠癌患者癌组织中的hPTTG1阳性率为93.3%(56/60), 而癌旁组织hPTTG1仅8例表达, 且均为弱阳性, 阳性率为13.3%, 表达率有极显著差异( $\chi^2 = 77.13$ ,  $P < 0.001$ )。56例结肠直肠癌患者hPTTG1阳性表达患者中, (+)表达27例, (++)表达21例, (+++)表达8例。将癌组织hPTTG1低表达组(-, +)与高表达组(+++, +++)比较, 发现Dukes C、D期较Dukes A、B期显著增高, 差异有极显著性( $\chi^2 = 9.87$ ,  $P < 0.001$ ), 伴淋巴结或肝肺等转移者较无转移者显著增高, 差异有极显著性( $\chi^2 = 9.87$ ,  $P < 0.001$ ), 血清CEA大于5 mg/L较小于5 mg/L显著增高( $\chi^2 = 30.886$ ,  $P < 0.001$ )。但是hPTTG1表达强度与患者的性别、年龄以及肿瘤直径的大小和分化程度无相关性( $P > 0.05$ , 表1)。

**2.2 Western blotting检测结肠直肠癌hPTTG1蛋白的表达** 采用Western blotting检测了4例代表性结肠直肠癌组织及对应癌旁组织hPTTG1蛋白的表达。hPTTG1在癌组织中呈现高表达(图2, T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>), 而对应癌旁组织则表达量极低(图2, N<sub>1</sub>-N<sub>4</sub>),  $\beta$ -actin为内对照。

## 3 讨论

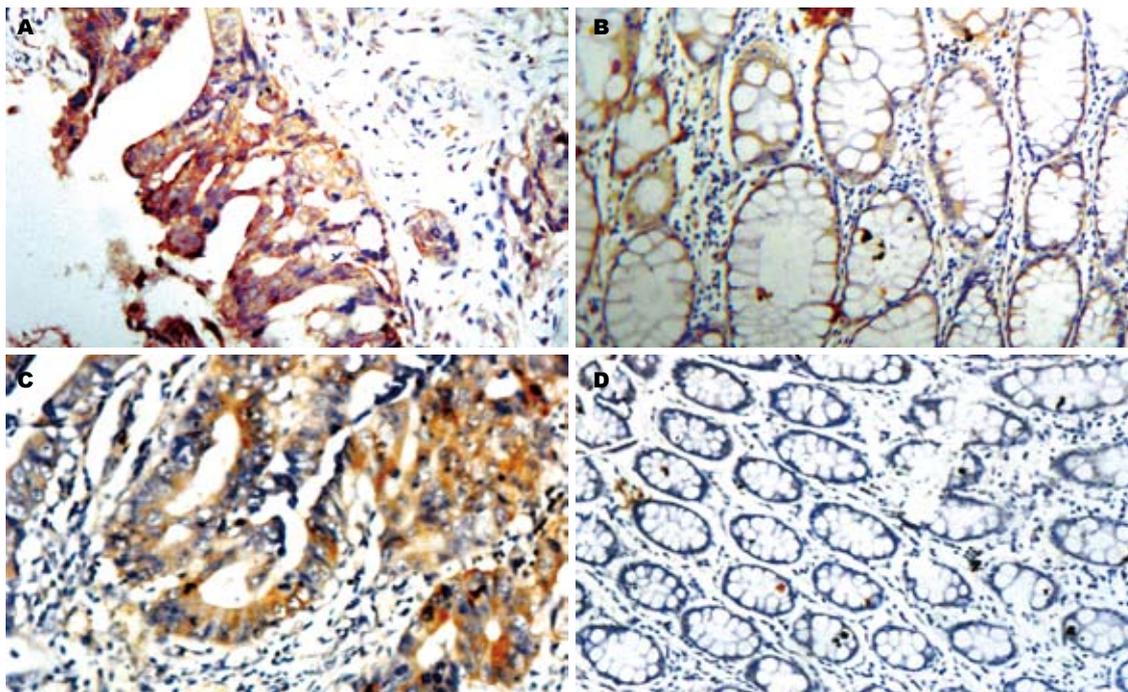
hPTTG1是新近发现的一种与多种肿瘤转移相关的癌基因。人类PTTG至少有三种亚型, 肿瘤中主要表达hPTTG1, 在成人大多数正常组织hPTTG1表达较弱, 甚至检测不到, 而在肿瘤组织中高表达。hPTTG1表达与肝癌、神经胶质瘤预后有关, 有可能成为预后判断的分子标志<sup>[4-6]</sup>。结肠直肠癌有关hPTTG1研究较少。Heaney *et al*利用RT-PCR检测到PTTG mRNA在48例结肠癌和20例结肠息肉中的19例均比正常结肠黏膜高表达, 且两者中PTTG mRNA的含量平均都是正常结肠黏膜的2.2倍, 在有周围淋巴结转移的结肠癌中其表达率较无转移的结肠癌高, Dukes C、D期较A、B期结肠癌的PTTG mRNA表达高<sup>[3]</sup>。

表1 结肠直肠癌组织hPTTG1表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	n	hPTTG1表达				$\chi^2$	P
		-	+	++	+++		
年龄(岁)							
<65	31	1	17	9	4	1.050	0.305
≥65	29	3	10	12	4		
性别							
男	28	1	14	8	5	0.076	0.782
女	32	3	13	13	3		
CEA(mg/L)							
<5	37	4	26	8	0	30.886	0.0001
>5	23	0	1	13	8		
Dukes分期							
A	2	2	0	0	0	9.870	0.002
B	25	2	16	7	0		
C	24	0	11	12	1		
D	9	0	0	2	7		
肿瘤大小(cm)							
<3.5	16	1	9	5	1	1.025	0.311
≥3.5	44	3	18	16	7		
病理分型							
高分化	7	1	5	0	1	4.197	0.120
中分化	47	2	21	18	6		
低分化	6	1	1	3	1		
肿瘤转移							
无转移	27	4	16	7	0	9.870	0.002
淋巴结转移	31	0	11	12	6		
肝转移	6	0	0	4	2		
其他部位转移	3	0	0	1	2		

近年研究发现, Wnt- $\beta$ -catenin信号通路与结肠癌的发生、发展以及浸润转移密切相关, 约80%的结肠癌发生APC基因突变, Wnt- $\beta$ -catenin信号通路与结肠癌密切相关<sup>[7]</sup>。Hlubek *et al*发现hPTTG亦为 $\beta$ -catenin的靶基因,  $\beta$ -catenin/TCF信号途径失调导致hPTTG1的过度表达, 与食管癌<sup>[8]</sup>、结肠癌<sup>[9]</sup>的发生、发展有关。本研究采用免疫组织化学和Western blotting检测了hPTTG1在结肠直肠癌中的表达。结果显示, 60例结肠直肠癌组织中有56例阳性表达, 阳性率为93.3%; 而癌旁组织hPTTG1仅8例表达, 且均为弱阳性, 阳性率为13.3%。其中有周围淋巴结转移或肝脏等器官转移者较无转移者高; Dukes C、D期较A、B期结肠癌表达高。表明hPTTG1在结肠直肠癌中不仅高水平表达, 而且与结肠直肠癌的分期、转移有关。提示hPTTG1高表达的结肠直肠癌发生转移的可能性高。相反, hPTTG1与患者的性别、年龄以及肿瘤直径的大小和分化程度无关。

血清癌胚抗原(CEA)是消化系统恶性肿瘤



**■应用要点**  
hPTTG1在结直肠癌中高表达,与结直肠癌的生物学特性密切相关,与结直肠癌的恶性程度及是否转移相关,有可能成为结直肠癌预后判断的分子标志。

图 1 hPTTG1蛋白的免疫组织化学染色(×200)。A: 低分化腺癌; B: 对应癌旁低表达; C: 中分化腺癌; D: 对应癌旁正常组织。

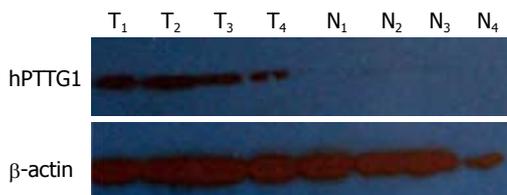


图 2 Western blotting检测结直肠癌组织和对应癌旁组织hPTTG1蛋白的表达。T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>: 结直肠癌组织; N<sub>1</sub>-N<sub>4</sub>: 对应癌旁组织。Anti-β-actin: 内参。

诊断的可靠指标之一,尤其对结肠癌意义最大。张青云 *et al*<sup>[10]</sup>分别采用时间分辨荧光免疫法与电化学发光法检测结直肠肿瘤血清CEA水平,灵敏度分别为60.0%、66.7%,特异性98.3%、100%,准确性85.6%、88.9%,阳性预测值94.7%、95.2%及阴性预测值83.1%、85.7%。而且CEA对结直肠癌的转移、复发和预后评估具有重要意义。血清CEA mRNA阳性可预测是否发生肝转移或局部复发,准确性达80%,肝转移敏感性95%,5年存活特异性84%<sup>[11]</sup>。CEA是结直肠癌的肝转移和早期复发的良好预测指标<sup>[12]</sup>。特别对于Dukes A期的结直肠癌,如果CEA增高则需慎重考虑辅助化疗以防止肿瘤复发<sup>[13]</sup>。如果术后CEA水平增高大于1 mg/L,则预示肿瘤复发或转移的可能,敏感性80%,特异性86%<sup>[14]</sup>。本研究显示,hPTTG1和CEA水平密切相关,当CEA大于5 mg/L时,结直肠癌hPTTG1高表达,较CEA小于5 mg/L显著增高,差异有极显著性。提示hPTTG1

对结直肠癌预后的评估有着良好的应用前景。由于hPTTG1可能通过促进成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达,参与肿瘤的新生血管形成,导致肿瘤的复发和转移<sup>[15-16]</sup>,因此,在癌胚抗原CEA增高之前,检测hPTTG1有可能对肿瘤的复发和转移作出早期预测。随着临床资料的随访,hPTTG1与结直肠癌存活率和无病生存期的关系有待进一步探讨。

总之,hPTTG1在结直肠癌中高表达,hPTTG1表达与结直肠癌的生物学特性密切相关,与结直肠癌的恶性程度及是否转移相关,有可能成为结直肠癌预后判断的分子标志。

#### 4 参考文献

- 1 Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003; 33: 49-54
- 2 Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* 1999; 285: 418-422
- 3 Hamid T, Kakar SS. PTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. *Mol Cancer* 2004; 3: 18
- 4 Fujii T, Nomoto S, Koshikawa K, Yatabe Y, Teshigawara O, Mori T, Inoue S, Takeda S, Nakao A. Overexpression of pituitary tumor transforming gene 1 in HCC is associated with angiogenesis and poor prognosis. *Hepatology* 2006; 43: 1267-1275
- 5 Su MC, Hsu HC, Liu YJ, Jeng YM. Overexpression of pituitary tumor-transforming gene-1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*

### ■同行评价

本文条理清楚, 语言流畅, 内容新颖, 具有较高的学术价值.

- 2006; 53: 262-265
- 6 Genkai N, Homma J, Sano M, Tanaka R, Yamanaka R. Increased expression of pituitary tumor-transforming gene (PTTG)-1 is correlated with poor prognosis in glioma patients. *Oncol Rep* 2006; 15: 1569-1574
  - 7 Behrens J. The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 672-675
  - 8 Zhou C, Liu S, Zhou X, Xue L, Quan L, Lu N, Zhang G, Bai J, Wang Y, Liu Z, Zhan Q, Zhu H, Xu N. Overexpression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG), is regulated by beta-catenin /TCF pathway in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 113: 891-898
  - 9 Hlubek F, Pfeiffer S, Budczies J, Spaderna S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Securin (hPTTG1) expression is regulated by beta-catenin/TCF in human colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94: 1672-1677
  - 10 张青云, 孙丽, 张书耕, 王琼. 时间分辨荧光免疫法与电化学发光法检测结肠肿瘤标志CEA的比较. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2799-2802
  - 11 Kanellos I, Zacharakis E, Kanellos D, Pramateftakis MG, Tsahalidis T, Altsitsiadis E, Betsis D. Prognostic significance of CEA levels and detection of CEA mRNA in draining venous blood in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2006; 94: 3-8
  - 12 Liska V, Holubec L Jr, Treska V, Skalicky T, Sutnar A, Kormunda S, Pesta M, Finek J, Rousarova M, Topolcan O. Dynamics of serum levels of tumour markers and prognosis of recurrence and survival after liver surgery for colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 2007; 27: 2861-2864
  - 13 Uehara M, Manaka D, Baba S, Oji Y, Hirata K, Shimizu M, Noguchi M. [Prognostic study of preoperative serum levels of CEA and CA 19-9 in colorectal cancer] *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34: 1413-1417
  - 14 Irvine T, Scott M, Clark CI. A small rise in CEA is sensitive for recurrence after surgery for colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9: 527-531
  - 15 McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, Mitchell R, Olliff J, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittos NJ. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58: 141-150
  - 16 Kim DS, Franklyn JA, Stratford AL, Boelaert K, Watkinson JC, Eggo MC, McCabe CJ. Pituitary tumor-transforming gene regulates multiple downstream angiogenic genes in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1119-1128

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 2008-07-18)

# 细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝病中的作用

李鹏, 李昌平

李鹏, 李昌平, 四川省泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000  
作者贡献分布: 本文的文献检索分析及撰写由李鹏完成; 选题和审校由李昌平完成。  
通讯作者: 李昌平, 646000, 四川省泸州市太平街25号, 四川省泸州医学院附属医院消化内科. lichangping1965@sina.com  
电话: 0830-3163674  
收稿日期: 2008-04-27 修回日期: 2008-05-20  
接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-07-18

## Role of hepatocyte apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease

Peng Li, Chang-Ping Li

Peng Li, Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China  
Correspondence to: Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. lichangping1965@sina.com  
Received: 2008-04-27 Revised: 2008-05-20  
Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-18

### Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) represents a clinicopathologic syndrome, characterized mainly by macrovesicular hepatic steatosis in the absence of significant alcohol ingestion and excluding other liver diseases. With the improvement of lifestyle, living habit and dietary choices, obesity and diabetes are becoming epidemic, subsequently increasing the risk for developing NAFLD. But the pathogenesis of NAFLD remains poorly understood yet. Recent research indicate that hepatocyte apoptosis and related factor such as Fas/FasL system, tumor necrosis factor (TNF) family, Bcl-2 family, Caspases, nuclear factor $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), cytochrome C, and cathepsin B are abnormally over-expressed in NAFLD. Apoptosis is one of the most important mechanisms leading to hepatocyte elimination, liver injury, inflammation and fibrosis in NAFLD. In this article, we reviewed the progress in the role of hepatocyte apoptosis in NAFLD.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver; Non-alcoholic

steatohepatitis; Apoptosis

Li P, Li CP, Role of hepatocyte apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2253-2258

### 摘要

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征。随着生活水平的提高、生活习惯、饮食结构的改变,肥胖和糖尿病的发病率增加,NAFLD的发病率呈上升趋势,严重危害人民健康。而非酒精性脂肪性肝病的发病机制仍不十分清楚,最近研究表明细胞凋亡及其相关因素Fas系统、TNF家族、Bcl-2蛋白家族、Caspases蛋白酶家族、NF- $\kappa$ B、细胞色素C及组织蛋白酶B等在NAFLD中表达异常增多,说明肝细胞凋亡在NAFLD的发生进展中扮演了至关重要角色。本文就这方面的研究进展作一综述。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 非酒精性脂肪性肝炎; 细胞凋亡

李鹏, 李昌平. 细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝病中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(20): 2253-2258  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2253.asp>

### 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征<sup>[1-2]</sup>。NAFLD包括单纯性脂肪肝及由其演变的非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)和NASH相关性肝纤维化、肝硬化,是一类与遗传-环境-代谢应激相关的肝脏疾病谱<sup>[3-4]</sup>。NAFLD的发病机制至今仍未完全阐明,近年来关于肝细胞凋亡在其发生发展中的作用取得较大进展,揭示了肝细胞凋亡在NAFLD向NASH,及肝纤维化乃至肝硬化、肝癌进展中扮演的至关重要角色<sup>[5-7]</sup>。

### ■背景资料

随着生活水平的提高、饮食结构的改变,非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的发病率呈逐年上升趋势,严重危害人民健康。NAFLD与肝功能衰竭、肝硬化、肝癌密切相关,且NAFLD患者罹患糖尿病、高血压、心脑血管事件的概率比普通人群高。因而其诊断和治疗成为肝病研究的热点,近年来研究表明肝细胞凋亡直接或间接促进了肝脏炎症与纤维化,与NAFLD的发生进展密切相关。

### ■同行评议者

李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科; 迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院消化内科

## ■ 研发前沿

肝细胞凋亡及相关调节因素在NAFLD的发病及其进展机制中的作用是目前NAFLD研究的热点之一,临床中对NAFLD患者无创及特异的诊断指标及抗凋亡治疗NAFLD的疗效和安全性的评价也成为临床研究NAFLD的热点与重点。

## 1 细胞凋亡

1.1 概述 细胞凋亡(apoptosis)是指为维持内环境稳定,由基因控制的机体正常细胞在受到生理和病理性刺激后出现的一种自发的死亡过程,是一个主动、高度有序、基因控制、信号依赖及一系列酶参与的过程。最早是1972年由Kerr根据形态学特征首先提出的<sup>[8]</sup>。细胞凋亡的形态学特征表现为:(1)细胞表面的特化结构如微绒毛的消失,细胞膜仍保持完整性;(2)核染色质断裂为大小不等的片段,与某些细胞器如线粒体一起聚集,为反折的细胞膜所包围,形成单个的凋亡小体(apoptotic bodies),核DNA被核酸酶降解为规则的DNA片段,电泳呈特殊的梯状区带(ladder);(3)凋亡小体逐渐为邻近的吞噬细胞所吞噬消化<sup>[9-10]</sup>。凋亡是一柄双刃剑,生理状况下的肝细胞凋亡参与调节正常肝细胞数量,维持肝脏正常体积,在肝脏发育和内稳态起重要作用,是肝细胞对抗感染、肿瘤及防止自身免疫反应的卫士;而病理条件下的肝细胞凋亡则是造成肝脏损伤和肝脏疾病最基本的中心环节,病毒性肝炎、酒精性肝病、NAFLD、自身免疫性肝炎、肝纤维化、移植排斥性肝炎等肝病的发病机制均与肝细胞凋亡有密切关系<sup>[11-14]</sup>。

### 1.2 肝细胞凋亡途径和相关调控机制

1.2.1 死亡受体信号转导通路:在肝脏中明确表达的死亡受体包括Fas/FasL, TNF- $\alpha$ /肿瘤坏死因子受体-1(TNFR-1),肿瘤坏死因子相关的诱导凋亡配体受体(TRAIL-R1和TRAIL-R2)<sup>[15-16]</sup>。Fas配体与Fas受体结合后聚成三聚体启动凋亡信号的转导, Fas受体在胞质中的尾部含有一个“死亡域(death domain)”序列,可与Fas相关死亡域蛋白(fas-associated death domain protein, FADD)结合使procaspase-8、细胞型Fas相关死亡域样白介素-1 $\beta$ 转换酶抑制蛋白(cellular FADD-like interleukin-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein, c-FLIP)在胞内受体区域募集,形成死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC),激活procaspase-8,引起上游启动Caspase-8释放,导致下游效应Caspase-3、-6、-7等激活,触发Caspase级联反应,导致细胞凋亡<sup>[17-18]</sup>。TRAIL-R1和TRAIL-R2诱导凋亡途径与此类似<sup>[19]</sup>。TNF-R1与TNF- $\alpha$ 结合后,其死亡域募集TNF受体形成由肿瘤坏死因子受体1相关死亡结构域(TNFR1-associated death domain, TRADD),死亡域结合受体反应蛋白(receptor inducing protein, RIP)和TNF受体相关因子-2(TRAF-2)组

成的复合物I。复合物I与TNF-R1分离并在胞质溶胶中形成包含FADD, c-FLIP, 凋亡抑制蛋白1/2(c-IAP1/2)的DISC(复合物II)使Caspase-8活化触发Caspase级联反应。然而,在肝细胞中此Caspase-8复合物的活性相当微弱,需要经过线粒体途径使凋亡得以信号放大<sup>[20-21]</sup>。细胞内没有形成足够量的DISC,激活的procaspase-8不足以引起蛋白水解酶的级联反应时, Caspase-8可以切割Bid(一种仅含BH3结构域的Bcl-2家族蛋白)形成活性片段tBid。tBid随后引起线粒体嵴重组,激活Bax及Bak相互作用引起线粒体通透性(mitochondrial permeability transition, MPT)的改变,使细胞色素C和第二个线粒体来源的胱氨酸酶激活剂/低等电点IAP直接结合蛋白(second mitochondrial-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pi, Smac/Diablo), 凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)释放<sup>[22]</sup>。因此,死亡受体能通过Caspase-8裂解Bid损伤线粒体,进入线粒体途径,使内外两条途径得以联合<sup>[23]</sup>。

1.2.2 线粒体信号通路:线粒体跨膜电位消失使MPT开放释放细胞色素C和Smac/Diablo,细胞色素C在胞质中dATP存在的条件下能与凋亡蛋白活性因子-1(Apaf-1)及procaspase-9结合成高分子量复合物,促使Caspase-9与其结合形成凋亡体(apoptosome),Caspase-9被激活再激活Caspase-3、-7级联反应<sup>[24-25]</sup>。此外,释放出来的Smac/Diablo与X-连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)结合,使其对Caspase-9和Caspase-3的抑制作用减弱,进而导致Caspase-9和Caspase-3的充分激活<sup>[26]</sup>。至此,内外两条途径最终统一于线粒体的级联放大信号,从而降解胞内成分<sup>[27]</sup>。

1.2.3 内质网途径:一般认为,肝细胞凋亡主要有胞膜上的死亡受体途径(外源性途径)和胞质内的线粒体途径(内源性途径),内质网的凋亡信号途径往往归并于线粒体途径<sup>[15,28]</sup>。近来有学者发现,内质网应激亦在肝细胞发生凋亡中占重要作用,是独立的第3条凋亡信号途径<sup>[29-30]</sup>。其信号转导涉及非折叠蛋白反应以及内质网内钙失衡,使Caspase-12活化,诱导GRP78/Bip, GRP94, GADD34, GADD45A, CHOP等分子伴侣产生增加,继而激活非细胞色素C依赖的Caspase-9,引起Caspase级联反应诱导凋亡<sup>[31-32]</sup>。

## 2 细胞凋亡与NAFLD

2.1 NAFLD发病机制 NAFLD是一类与代谢相

关的肝脏疾病谱, 脂肪变性常见因素包括肥胖症、糖尿病、高脂血症. 尽管这些因素在NAFLD起到重要作用, 但NAFLD的发病及进展至NASH的机制尚未完全阐明, 目前广泛接受的观点是Day和James提出的“二次打击”学说<sup>[33]</sup>. 第一次打击指各种原因如肥胖、胰岛素抵抗引起的肝脏脂肪蓄积和肝脂肪变性. 脂肪分解产生游离脂肪酸(free fatty acids, FFA), 促进肝内FFA的摄取与合成; 当过量的FFA超出肝脏通过线粒体氧化反应及极低密度脂蛋白(VLDL)形式排入血的代谢能力时, 将导致肝细胞脂肪变性, 使肝脏对炎症反应和各种损伤因素的敏感性增高<sup>[34-35]</sup>. 近来研究表明<sup>[36-37]</sup>, FFA的脂毒性能诱导JNK依赖线粒体途径和TNF- $\alpha$ 与蛋白酶B介导溶酶体途径导致肝细胞脂性凋亡, 产生氧化应激、炎症和纤维化反应. 第二次打击主要为氧化应激导致的脂质过氧化损伤及其异常细胞因子的作用致肝脏炎症和纤维化<sup>[38]</sup>. 反应性氧化物(reactive oxidative species, ROS)引起脂质过氧化, 损伤肝细胞膜和线粒体功能, 激活Fas/FasL系统, Bcl-2家族, 进一步引起Caspase家族成员Caspase-8活化, 进而活化下游的Caspase-3等级联反应导致肝细胞凋亡. 脂肪变性的肝细胞对肠源性内毒素的清除能力降低, 内毒素刺激脂肪产生TNF- $\alpha$ 、IL-6等炎症细胞因子, 活化中性粒细胞启动炎症反应发生<sup>[39-40]</sup>. 肝细胞凋亡后, 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)与枯否细胞(kupffer cell, KC)吞噬凋亡小体而活化, 释放大量的细胞因子, 可进一步作用于HSC, 促使其活化、增殖、转型为肌成纤维母细胞分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)导致肝纤维化<sup>[41]</sup>. 因此, 肝细胞凋亡直接、间接促进了炎症与纤维化<sup>[42]</sup>.

## 2.2 细胞凋亡与NASH及其进展

2.2.1 NASH: 是NAFLD进展的关键性的一种形式, 由1980年Ludwig *et al*<sup>[43]</sup>发现在无固定饮酒史及其他肝病的患者身上出现类似酒精性脂肪性肝炎的肝损伤表现而首先命名. NASH在组织病理学上表现为: (1)肝细胞脂肪变性(2)肝实质炎症(主要是肝细胞气球样变和点状坏死, 肝腺泡三区和门管区混合性炎症细胞浸润, 可伴Mallory小体形成)(3)各种形式的肝纤维化<sup>[44]</sup>.

2.2.2 肝细胞凋亡与炎症直接相关: Feldstein *et al*<sup>[45]</sup>对NASH患者肝组织活检标本应用TUNEL法检测肝细胞凋亡比单纯脂肪肝组或正常对照组显著增加, 并随NASH炎症与纤维化严重程度

增加而增加. Nan *et al*<sup>[46]</sup>在小鼠NASH实验模型中也证实此观点. 首先, 在病理情况下, 不受调控的持续性的凋亡破坏肝细胞的完整性, 引起线粒体功能障碍导致肝脏炎症反应, 而当凋亡的程度超过吞噬细胞清除能力时, 产生凋亡小体自发破裂释放其内含物引起组织损伤和炎症. Siebler *et al*<sup>[47]</sup>报道将Jo-2(Fas拮抗剂抗体)注射入ob/ob小鼠体内激活Fas受体, 介导凋亡产生, 观察到鼠肝功能急剧下降并进展为重症肝坏死, 伴随大量炎症、坏死. Takehara *et al*<sup>[48]</sup>证实肝细胞特异性Bcl-xL缺陷导致肝细胞持续性凋亡, 继而出现炎症与纤维化. 其次, 肝细胞凋亡趋化中性粒细胞, 将中性粒细胞募集到肝实质. TNFR-1与TNF- $\alpha$ 结合后, 作用于下游的核因子 $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)和JNK激酶信号传导通路, 转录因子NF- $\kappa$ B活化则能与其他活化的细胞因子如IL-6、IL-8及黏附分子形成炎症瀑布反应, 活化中性粒细胞引起肝脏炎症<sup>[49]</sup>. Dorman *et al*<sup>[50]</sup>报道内毒素血症引起肝损伤的鼠中, TNF- $\alpha$ 介导的肝细胞凋亡刺激CXC趋化因子诱导KC和巨噬细胞炎症蛋白-2(macrophage inflammatory protein-2, MIP-2)基因转录与蛋白合成, 趋化中性粒细胞从肝血窦转移入肝实质中. 最近的资料则显示死亡受体介导的信号除了导致凋亡并能直接造成肝脏炎症. 如FasL本身具有促炎症活动作用, Fas的促效剂能刺激肝趋化因子表达、中性粒细胞浸润导致炎症反应的发生. Altemeier *et al*<sup>[51]</sup>研究证明Fas通过MyD88通路而不依赖于Caspase活性信号诱导巨噬细胞促炎症反应趋化因子表达, 直接促进中性粒细胞浸润与炎症反应.

2.2.3 肝细胞凋亡间接促进纤维化: Canbay *et al*<sup>[52-53]</sup>研究表明肝星状细胞与枯否细胞能吞噬凋亡小体而活化, 释放大量的细胞因子如TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor receptor, PDGF)、IL-1、IL-6共同导致肝纤维化. TGF- $\beta$ 能刺激原纤维胶原和纤维连接素基因转录的细胞因子, 能抑制胶原酶和蛋白酶的产生, 减少胶原的降解; 同时TGF- $\beta$ 能通过减少HSC表面FasL基因和促凋亡因子p53的表达, 增加抑制凋亡因子NF- $\kappa$ B、bcl-xL、p21WAF1的表达, 抑制活化的HSC的凋亡, 维持其持续活化<sup>[54]</sup>. TNF- $\alpha$ 能促进HSC的增殖, 加强HSC的趋化性; 近来研究显示<sup>[55-56]</sup>, TNF- $\alpha$ 促进HSC表达间质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)参与纤维化过程. IL-6

## ■创新盘点

本文对着重对肝细胞凋亡的信号传导通路的分子机制进行阐述, 综述了病理性凋亡导致肝脏炎症、纤维化的机制及细胞凋亡应用于临床NAFLD诊断、治疗中研究成果与发展趋势.

### ■应用要点

本文阐述了肝细胞凋亡及相关调节因素在NAFLD发病机制中的深入研究成果,进一步阐明NAFLD的发病机制;为开发研制抑制肝细胞凋亡药物,从而减轻肝脏炎症与纤维化,阻断NAFLD进展提供有力的理论依据。

也可刺激HSC的增殖,并可诱导产生多种急性期蛋白,通过促进基质变性或与其黏附受体相互作用而促使ECM的沉积。PDGF通过自分泌和旁分泌作用有助于维持HSC的活化与增殖,并能与TGF- $\beta$ 发挥协同作用。HSC的活化启动一系列信号级联反应,诱导各种与成纤维相关的基因表达并分泌大量细胞外基质在细胞间质过度沉积导致肝纤维化。肝纤维化则继续发展至肝硬化乃至肝癌<sup>[57]</sup>。

### 3 细胞凋亡在临床NAFLD诊断与治疗中的应用

随着肝细胞凋亡在NAFLD发病进展机制的阐明,能给临床NAFLD患者的诊断、治疗及预后评估带来新的契机。Wieckowska *et al*<sup>[58]</sup>在可疑NAFLD患者血清中通过原位免疫组化和ELISA检测由肝细胞凋亡Caspase-3产生细胞角蛋白-18片段(CK-18)在NASH与单纯脂肪肝或正常者相比显著升高,其诊断NASH的特异性为99.9%,敏感度为85.7%与同时做肝活检判断肝组织学改变一致。肝细胞凋亡定量指标Caspase活性作为一项非侵袭性的生物标记是NASH独立而有力的预测指标,有望用来判断NAFLD患者的严重程度。Manco *et al*<sup>[59]</sup>学者检测NAFLD患儿的血清TNF- $\alpha$ 和瘦素水平,以及肝组织学损伤程度。结果显示, TNF- $\alpha$ 水平与肝脏病变程度密切相关。单独检测血清TNF- $\alpha$ 以及联合瘦素均能准确预测NAFLD患儿是否发生NASH病变,提示可用血清TNF- $\alpha$ 水平作为NASH患儿的特异性实验室指标。Cazanave *et al*<sup>[60]</sup>在小鼠爆发性肝炎模型中证实,肝脏高谷胱甘肽储备能减轻予Fas促效剂(Jo-2)诱导的肝细胞凋亡,减轻肝脏炎症与纤维化,并提出还原型谷胱甘肽的临床应用价值。Miyasou *et al*<sup>[61]</sup>发现依达拉奉可调节线粒体Bcl-xL和Bax,阻止细胞色素C释放和Caspase-3活性;减轻Fas诱导急性肝功能衰竭的小鼠的肝细胞凋亡及肝损伤,提高其成活率。Baskin-Bey *et al*<sup>[62]</sup>在对胆碱-甲硫氨酸缺乏饮食(methionine and choline deficient diet, MCD)致小鼠肝脂肪变性实验中,用组织蛋白酶B(cathepsinB)抑制剂明显减轻冷缺血/再灌注损伤致肝细胞凋亡与肝损害。Inoue *et al*<sup>[63]</sup>在胆碱缺乏饮食(choline deficient diet, CD)致大鼠肝癌模型中早期阶段用PBN(phenyl butyl nitron)处理降低了Fas的表达,抑制凋亡驱动的促炎症反应,能对抗其引发的致癌作用,并认为CD作为一种致NASH模式,早期Fas表达可作为判断NASH进展的一项很好的

指标。张莉 *et al*在大鼠非酒精性脂肪性肝炎实验模型中用己酮可可碱(PTX)可抑制TNF- $\alpha$ 在肝脏中表达,从而改善肝脏酶学,减轻肝组织炎症损伤;并能降低细胞外基质I、III型胶原的合成,减轻NASH引起的肝纤维化,对实验性NASH具有治疗作用<sup>[64-65]</sup>。李继强 *et al*<sup>[66]</sup>在大鼠肝实质损伤性肝纤维化模型中发现血管紧张素转化酶抑制剂(依那普利)能通过调节**bax**、**bcl-2**基因表达,起到调控肝细胞凋亡,防治肝纤维化的作用。

### 4 结论

肝细胞凋亡是连接肝损伤与炎症、纤维化的纽带与NAFLD的发生进展密切相关,但具体的机制及调节因素有待进一步研究阐明。随着对NAFLD中肝细胞凋亡的深入研究,能够进一步探明NAFLD的发病机制,为细胞凋亡运用于NAFLD的诊治提供有力的理论依据,给临床NAFLD的诊断、治疗、及预后判定开辟一条新的途径。

### 5 参考文献

- Björnsson E, Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1023-1030
- Duvnjak M, Leročić I, Barsić N, Tomasić V, Virović Jukić L, Velagić V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4539-4550
- Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 1-16, vii
- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99-S112
- Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, Prokopowicz D. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6198-6202
- Ramalho RM, Cortez-Pinto H, Castro RE, Solá S, Costa A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Apoptosis and Bcl-2 expression in the livers of patients with steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 21-29
- 南月敏, 乔梁, 于君, 吴文娟, 姚希贤. Fas及其配体诱导非酒精性脂肪性肝炎肝细胞凋亡. *中华消化杂志* 2006; 26: 841-842
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 2005; 84: 627-639
- Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 2003; 36: 165-175
- Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 904-911
- Jaeschke H, Gujral JS, Bajt ML. Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver Int* 2004; 24: 85-89
- Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE,

- Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708-1717
- 14 Casey CA, Lee SM, Aziz-Seible R, McVicker BL. Impaired receptor-mediated endocytosis: its role in alcohol-induced apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S46-S49
- 15 Jaeschke H, Bajt ML. Regulation of apoptotic signaling pathways in hepatocytes in vivo. *Hepatology* 2003; 37: 942-945
- 16 Kohlhaas SL, Craxton A, Sun XM, Pinkoski MJ, Cohen GM. Receptor-mediated endocytosis is not required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 12831-12841
- 17 Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 25534-25541
- 18 Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 491-508
- 19 Schinoni MI, Paraná R. [Apoptosis and progression of hepatic fibrosis in liver diseases] *Acta Gastroenterol Latinoam* 2006; 36: 211-217
- 20 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114: 181-190
- 21 Zheng L, Bidere N, Staudt D, Cubre A, Orenstein J, Chan FK, Lenardo M. Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 3505-3513
- 22 Hatano E. Tumor necrosis factor signaling in hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S43-S44
- 23 Chen X, Ding WX, Ni HM, Gao W, Shi YH, Gambotto AA, Fan J, Beg AA, Yin XM. Bid-independent mitochondrial activation in tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis and liver injury. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 541-553
- 24 Solís Herruzo JA, García Ruiz I, Pérez Carreras M, Muñoz Yagüe MT. Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 844-874
- 25 Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 2006; 311: 847-851
- 26 Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM, Jiang X. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem* 2007; 282: 30718-30727
- 27 Chen DF, Wang CH. [The relationship between the opening of mitochondrial permeability transition pores of cultured hepatocytes with their apoptoses in a non-alcoholic fatty liver disease model] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 837-839
- 28 Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312
- 29 姜山, 谢青, 张鞞, 周惠娟, 刘海防, 俞红. Caspase-12活化在小鼠原代肝细胞凋亡中的作用. *肝脏* 2006; 11: 12-14
- 30 慕永平, 刘平, 都广礼, 王磊, 龙爱华, 李风华. CCl<sub>4</sub>诱导大鼠肝硬化形成过程中Caspase-12蛋白表达与肝细胞凋亡的相关性. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 132-137
- 31 Kondo S, Saito A, Hino S, Murakami T, Ogata M, Kanemoto S, Nara S, Yamashita A, Yoshinaga K, Hara H, Imaizumi K. BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1716-1729
- 32 吴涛, 季光, 郑培永, 柳涛. 内质网应激与肝细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2507-2515
- 33 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 34 Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 2007; 165: 106-116
- 35 Ji J, Zhang L, Wang P, Mu YM, Zhu XY, Wu YY, Yu H, Zhang B, Chen SM, Sun XZ. Saturated free fatty acid, palmitic acid, induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 56: 369-376
- 36 Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Gucciardi 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
- 37 Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 12093-12101
- 38 Mitsuyoshi H, Itoh Y, Okanoue T. [Role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis] *Nippon Rinsho* 2006; 64: 1077-1082
- 39 丁效蕙, 赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 371-375
- 40 南月敏, 胡云龙, 付娜, 吴文娟. Bad、Bax和Bid蛋白表达在非酒精性脂肪性肝炎中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 81-85
- 41 Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med* 2008; 14: 72-81
- 42 Canbay A, Kip SN, Kahraman A, Gieseler RK, Nayci A, Gerken G. Apoptosis and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Turk J Gastroenterol* 2005; 16: 1-6
- 43 Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438
- 44 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. *中华肝脏病杂志* 2006; 9: 325
- 45 Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443
- 46 Nan YM, Wu WJ, Yao XX, Wang L. [The role of apoptosis and the related genes in non-alcoholic steatohepatitis] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 41-46
- 47 Siebler J, Schuchmann M, Strand S, Lehr HA,

### ■名词解释

内质网应激: 由于各种原因引起的内质网中出现错误折叠或未折叠蛋白在腔内聚集以及Ca<sup>2+</sup>平衡紊乱的状态, 称为内质网应激(ERS)。研究表明ERS是细胞的一种自我保护性机制, 适度的ERS可以恢复内质网及内环境的稳态、保持细胞活性, 但是过强或过长时间的ERS可以诱导一系列细胞因子的大量释放并最终导致细胞凋亡。ERS引起的细胞凋亡有一套自身的信号传递通路, 称为内质网相关性死亡(ERAD)途径。

### ■同行评价

本文条理清晰, 结构合理, 语言通顺, 资料完整, 具有较好的学术价值。

- Neurath MF, Galle PR. Enhanced sensitivity to CD95-induced apoptosis in ob/ob mice. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2396-2402
- 48 Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker EB 3rd, Hennighausen L, Jinushi M, Miyagi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 2004; 127: 1189-1197
- 49 Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1036-1042
- 50 Dorman RB, Gujral JS, Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Generation and functional significance of CXC chemokines for neutrophil-induced liver injury during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G880-G886
- 51 Altemeier WA, Zhu X, Berrington WR, Harlan JM, Liles WC. Fas (CD95) induces macrophage proinflammatory chemokine production via a MyD88-dependent, caspase-independent pathway. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 721-728
- 52 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
- 53 Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003; 38: 1188-1198
- 54 Saile B, Matthes N, El Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. The bcl, NFkappaB and p53/p21WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF-beta or TNF-alpha on activated hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol* 2001; 80: 554-561
- 55 Liu C, Sun M, Yan X, Han L, Zhang Y, Liu C, El-Nezami H, Liu P. Inhibition of hepatic stellate cell activation following Yinchenhao decoction administration to dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatol Res* 2008 [Epub ahead of print]
- 56 Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 163-173
- 57 Liou I, Kowdley KV. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: S11-S16
- 58 Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 27-33
- 59 Manco M, Marcellini M, Giannone G, Nobili V. Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 954-960
- 60 Cazanave S, Berson A, Haouzi D, Vadrot N, Fau D, Grodet A, Lettéron P, Feldmann G, El-Benna J, Fromenty B, Robin MA, Pessayre D. High hepatic glutathione stores alleviate Fas-induced apoptosis in mice. *J Hepatol* 2007; 46: 858-868
- 61 Miyasou T, Kwon AH, Tsuji K, Qiu Z, Okumura T, Kamiyama Y. Edarabone prevents fas-induced fulminant hepatic failure in mice by regulating mitochondrial BCL-XL and BAX. *Shock* 2007 [Epub ahead of print]
- 62 Baskin-Bey ES, Canbay A, Bronk SF, Werneburg N, Guicciardi ME, Nyberg SL, Gores GJ. Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G396-G402
- 63 Inoue Y, Asanuma T, Smith N, Saunders D, Oblander J, Kotake Y, Floyd RA, Towner RA. Modulation of Fas-FasL related apoptosis by PBN in the early phases of choline deficient diet-mediated hepatocarcinogenesis in rats. *Free Radic Res* 2007; 41: 972-980
- 64 张莉, 贾继东, 张华, 王丹, 安威. 己酮可可碱抑制非酒精性脂肪性肝炎TNF- $\alpha$ 的实验研究. *肝脏* 2007; 12: 261-264
- 65 崔焱, 张莉, 贾继东. 己酮可可碱对大鼠非酒精性脂肪性肝炎细胞外基质合成与降解的影响. *肝脏* 2007; 12: 108-111
- 66 李继强, 柳怿, 刘文忠, 马雄, 朱红音, 陈晓宇, 彭延申. 依那普利对肝组织bax和bcl-2基因表达的影响. *中华消化杂志* 2006; 26: 539-543

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 2008-07-18)

# 炎症性肠病易感基因研究进展

肖玉良, 缪应雷

肖玉良, 缪应雷, 昆明医学院第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650032

作者贡献分布: 本文写作由肖玉良完成; 缪应雷审阅。

通讯作者: 缪应雷, 650032, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院消化内科, 511121x@163.com

电话: 0871-5324888-2532

收稿日期: 2008-04-18 修回日期: 2008-05-18

接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-07-18

## Research progress in susceptibility genes of inflammatory bowel disease

Yu-Liang Xiao, Ying-Lei Miao

Yu-Liang Xiao, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. 511121x@163.com

Received: 2008-04-18 Revised: 2008-05-18

Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-18

### Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease and ulcerative colitis, is a group of non-specific chronic inflammatory conditions of the gastrointestinal tract with unknown complex etiology. Epidemiologic data indicate genetic contribution to IBD pathogenesis, which include familial aggregation, twin studies, racial and ethnic differences in disease prevalence. The most widely adopted approaches to identifying susceptibility genes in IBD include linkage studies, genome-wide association (GWA) studies and microarray. The first two technologies have confirmed NOD2, IL23R and other genes implicated in IBD pathogenesis and advances in microarray technology makes it possible to diagnose IBD at gene expression level. This article reviewed IBD related genes and introduced application of microarray to IBD research.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Crohn's disease; Ulcerative colitis; Susceptibility; Microarray

Xiao YL, Miao YL. Research progress in susceptibility genes of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2259-2266

### 摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因未明的非特异性慢性肠道炎症性疾病,包括溃疡性结肠炎和克罗恩病,发病机制复杂,其单卵双生子的高共患率、发病的家族聚集现象和种族差异,提示遗传易感性在其发病中的重要作用。对IBD易感基因研究技术包括连锁分析、全基因组关联分析和迅速发展并展现广阔应用前景的基因芯片等。运用前两项技术已在世界范围内大量人群中确认NOD2、IL23R等IBD相关基因,基因芯片技术的发展使得在基因表达水平诊断IBD成为可能。本文就此对IBD相关基因作一综述,并介绍基因芯片在IBD研究中的应用。

关键词: 炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 易感基因; 基因芯片

肖玉良, 缪应雷. 炎症性肠病易感基因研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(20): 2259-2266

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2259.asp>

### 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(crohn's disease, CD),在不同人群中其发病率变异较大,欧洲及北美地区较高,其UC和CD每年发病率约分别10-20/10<sup>5</sup>和5-10/10<sup>5</sup>患病率100-200/10<sup>5</sup>和50-100/10<sup>5</sup>[1],目前美国和欧洲分别有1.4×10<sup>6</sup>及2.2×10<sup>6</sup>人忍受着IBD的折磨[2],以往发病率较低的东方国家,近年也呈现增高趋势。我国1981-2000年间共计报道UC病例10218,近10年该病报道数上升3.1倍;2003年总住院患者中CD患者构成比为1990年的2.8倍[3]。我国目前暂缺乏大规模的流行病学调查,但粗略估计UC发病率为11.6/10<sup>5</sup>[4] CD为1.4/10<sup>5</sup>[5]。而且25%的IBD患者在青少年时期发病[6]严重影响了青少年生长发育和身心健康。为此,各国学者在阐明IBD病因、发病机制方面做着不泄努力。在对瑞典[7],丹麦[8]和英国[9]双生子流行病学调查发现,单卵双生子具有高共患病率,加之IBD的家

### ■背景资料

炎症性肠病(IBM)在我国已非少见,其发病率和患病率的上升趋势已引起国内医学界的重视,但对其病因、发病机制、诊断及治疗等的研究相比西方国家仍比较滞后。近年,欧美学者围绕IBM的遗传易感性进行了大量研究,揭示出大批致病相关基因。了解西方研究成果及现状,对认识我国IBM病因及相关研究具有指导意义。

### ■同行评议者

程斌,副教授,华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科;郭晓钟,教授,中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

## ■ 研发前沿

目前具有高通量、高集成、微型化、自动化的基因芯片能在一次试验中平行分析成千上万个基因,大大提高了检测速度.但要使基因芯片技术走出实验室成为常规检测手段,还需降低芯片成本和在世界范围内进行大量多中心研究,以发现特异性、标志性分子标志.

簇聚集现象<sup>[10]</sup>,证明基因因素在IBD发病中具有重要作用.为此各国学者展开了对IBD致病基因的研究.自1996年, Hugot *et al*<sup>[11]</sup>采用连锁分析法,首次定位IBD易感基因位点于16号染色体着丝点周围(16q12)后,对IBD易感基因的研究如雨后春笋般涌现出来,研究手段也是日新月异,从连锁分析(linkage studies)、全基因组关联分析(genome-wide association, GWA)到基因芯片(microarray)的运用,取得一系列瞩目的成绩,本文就此作一综述.

## 1 连锁分析

基于大量患病家系为基础的连锁分析,只能确定疾病相关基因于染色体10 Mb左右的范围内,要确定具体的致病基因或位点仍然需要大量后续的,如定位克隆等工作.连锁分析大都假定疾病性状只受单个基因的控制,仅能发现致病主效基因,对于受多基因控制的复杂疾病相关基因研究收效甚微,对于复杂疾病的易感基因定位已被GWA等手段取代,但通过该手段发现的CD特异性易感基因座位IBD1和共同易感基因座位IBD3中NOD2、HLA基因,至今仍在世界范围内进行大量相关性和功能研究,故本文对此两基因作一概述.

1.1 CARD15/NOD2 位于16号染色体IBD1位点的胱冬酶吸引域家族成员15(caspase recruitment domain family, member 15, CARD15)/核苷酸结合寡聚域2(nucleotide-binding oligomerization domains, NOD2)基因是第一个被发现的CD易感基因<sup>[12-13]</sup>其基本功能为介导细胞凋亡和诱导核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的活化<sup>[14-15]</sup>当NOD2突变,导致的2个氨基酸互换(Arg702Trp, Gly908Arg)和一个胞嘧啶插入导致的移码突变(3020insC)使第十个C末端富含色氨酸的重复序列构成的区域发生Leu1007Pro氨基酸改换,终止密码子提前,使其蛋白丢失最后33个氨基酸导致NF- $\kappa$ B活性的降低,机体先天性低反应,从而诱导机体对肠道细菌异常强烈的继发免疫反应而引起CD<sup>[16]</sup>虽然NOD2基因突变已证明与CD有关,但在不同人种中,其出现频率及与疾病相关程度不同.德裔和西班牙裔犹太人及荷兰CD患者中3种主要突变频率均显著增高<sup>[17-19]</sup>瑞典人群中CD发病与Arg702Trp和Gly908Arg突变有关,而与Leu1007fs无关<sup>[20]</sup>相反在丹麦人群中Leu1007fs则为主要突变型<sup>[21]</sup>对国人的研究<sup>[22-23]</sup>并未发现NOD2突变与CD的关系.目前对CARD15/NOD2基因结构、功

能及其在CD发病机制中的作用有一定了解后,其与其他细胞因子的相互作用也逐渐受到关注, Linderson *et al*<sup>[24]</sup>研究发现CARD15/NOD2与另一个重要的易感基因TNF- $\alpha$ 的基因多态性间存在相互作用,并在一定程度上影响人群易感性和CD的表现形式. Gazouli *et al*<sup>[25]</sup>认为CARD15/NOD2和TLR4或CD14之间的相互作用可增加IBD,尤其是CD的发病危险性.在今后研究中弄清CARD15/NOD2与其他因子相互作用机制,及证实与其突变相互作用的可能因子,包括环境及细菌等因素是非常重要的.

1.2 HLA 连锁分析和候选基因研究都证实位于6号染色体短臂(6p13)既IBD3区域的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)又称人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)与UC及CD均有关. HLA基因包括HLA-I、HLA-II及HLA-III,具高度多态性.近年发现位于HLA-B端粒46 kb处的非经典I类基因,如MHCI类相关基因A(MHC class I chain-related gene A, MICA)和MHCI类相关基因B(MHC class I chain-related gene B, MICB),与IBD存在关联. MICA和MICB分子与其表达于NK细胞、T细胞和巨嗜细胞上的受体NKG2D结合,共同激发上述细胞的活性,当细菌或病毒感染时表达增加.两者部分等位基因的突变,改变与受体NKG2D的结合力可能影响免疫系统的活性.在对国人的研究<sup>[26-27]</sup>已证实MICA-A51和MICB-CA18与国人UC有相关性.

与HLA-I类基因相比,HLA-II类基因与IBD关系更为密切. HLA-II属于免疫球蛋白超基因家族,对T细胞免疫应答及B细胞产生抗体均有重要作用.目前研究多提示HLA-II类基因区三个与IBD相关的位点中,UC与DR2、DR9相关而与DR4无明显相关性,CD与DR7、DQ4相关,而与DR2、DR3无明显相关性,但HLA-II类基因区DR、DP和DQ 3个与IBD相关的位点,在HLA-II类基因上紧密连锁,而非独立存在,哪个亚区为初级,哪个为次级相关尚待进一步研究.

HLA-III区域编码肿瘤坏死因子TNF- $\alpha$ 而受到广泛关注, TNF- $\alpha$ 是一种具有多种生物活性的促炎细胞因子和免疫调节剂. TNF基因启动区域的6个单核苷酸多态性(TNF-1031T/C, -863C/A, -857C/T, -380G/A, -308G/A, -238G/A)与IBD遗传易感性在不同人群中报道不一. Cucchiara *et al*<sup>[28]</sup>在意大利IBD患者中发现TNF-308A与CD及UC均显著相关,而与TNF-C857T

无相关性. 捷克人群研究<sup>[29]</sup>揭示TNF-308A与CD表现型有关, 而部分人群, 如土耳其<sup>[30]</sup>及印度人群<sup>[31]</sup>中研究提示TNF- $\alpha$ 基因多态性与IBD并无明确关联. 姒健敏 *et al*<sup>[32]</sup>对国人的研究发现TNF2308A等位基因频率在UC患者中为14.6%, 而在健康对照者中为8.9%, 两者之间有显著差异, 提示TNF-308A可能与国人UC遗传易感性相关.

## 2 全基因组关联分析

关联分析是比较病例组与对照组个体在某个遗传标记位点等位基因出现的频率, 即如果一种疾病的易感变异体位于基因组中的某个地方, 通过他们与基因型芯片中标签单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP), 之间的连锁不平衡关系可以对其进行检测. 该方法无需采集家系资料, 样本较易获得. 近年迅速发展的SNP芯片, 可扫描个体DNA样本的上百万个单基突变. 较之连锁分析在IBD等多基因疾病易感基因的研究中展现强大的优势. 至目前, 运用GWA技术不仅肯定了前有的部分基因(如NOD2、IBD5)与IBD的关联性, 而且还发现了如白介素-23受体(interleukin-23 receptor, IL23R)基因、ATG16L1等新的致病基因.

2.1 IL23R 美国的IBD多中心协作研究组<sup>[35]</sup>, 在2006年运用GWA技术检测IBD易感基因时, 不但再次肯定了NOD2基因与IBD关联的同时, 而且还在1号染色体(1q31)区域新发现了此后得到大量验证实验所支持的IL23R基因. IL23R基因与IBD关系密切的是氨基酸Arg381Gln的多态性, 该等位基因在非犹太裔欧洲CD患者和健康对照人群中出现频率分别为1.9%和7.0%<sup>[35]</sup>, 提示Arg381Gln基因对IBD易感性具保护作用. IL23R基因区除Arg381Gln外, 介于IL23R基因和其紧靠着丝粒的同源基因IL2RB2基因之间的5-11个编码序列多态性也证明与IBD显著相关<sup>[33]</sup>. 最近, 世界各研究中心进行的验证实验中, 在欧洲儿童<sup>[34-36]</sup>和成人CD<sup>[37-38]</sup>及UC<sup>[39]</sup>患者中均验证了IL23R与IBD的相关性. IL23是一个由亚单位p19和白介素12(IL12)的p40通过二硫键形成的异源二聚体分子, 是IL12细胞因子家族的新成员. IL23除了与IL12共用受体亚单位白介素12R $\beta$ 1外, 还有一个自身特有的受体亚单位即IL23R. IL23是辅助性T细胞(helper T cells, Th)分化, 尤其是分化为Th17时的关键因子, 能通过

因子, 致使Th17在不需要任何抗原刺激的情况下增强组织炎症反应和适应性免疫应答. 动物实验<sup>[40]</sup>已证明Th17在调节慢性自发性炎症反应时的关键作用也就是说IL23间接的增强组织炎症反应. 鉴于IL23在炎症反应中的重要作用, 有学者在运用阻断其和IL12共同亚单位p40作位治疗靶点时, 发现具有一定作用<sup>[41]</sup>, 但IL23R在IBD中的作用可能不仅是功能缺失突变, 今后的研究中, 应在阐明Arg381Gln发挥保护作用的机制方面进一步研究以指导临床治疗.

2.2 ATG16L1 自噬相关16样1(芽殖酵母)(autophagy-related 16-like-1, ATG16L1)基因位于2号染色体长臂(2q37.1), ATG16L1蛋白包括N末端的APG16卷曲螺旋和C末端的8个色氨酸-天冬氨酸重复序列(W-D repeats), 主要表达于肠上皮细胞和CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>淋巴细胞, 是一种涉及处理细胞内细菌的自噬小体代谢途径的蛋白. 在处理细胞内细菌感染, 如抑制巨噬细胞内结核分支杆菌发挥重要作用. 敲除ATG16L1基因会降低HeLa细胞对沙门氏菌吞噬作用<sup>[42]</sup>. Hampe *et al*<sup>[43]</sup>研究发现, 位于ATG16L1蛋白N末端WD重复结构域的Ala197Thr氨基酸多态性与CD显著相关, 而与UC无相关性. 该结果随后被英国的病例对照研究所证实. 此后进行的验证实验<sup>[44-46]</sup>也支持了ATG16L1与CD的相关性. 由此可见, 宿主细胞对胞内细菌反应在CD发病中可能发挥作用.

## 3 基因芯片在IBD中的应用

尽管易感基因的染色体定位, 对在染色体水平上鉴定IBD的易感位点是十分重要的, 但是这些基因都是通过其编码的蛋白质或转录因子行使功能的, 因此从基因的表达水平进行候选基因的分析同等重要. 运用基因芯片在基因组范围内筛查可发现疾病特异性的功能和表达改变, 发现疾病治疗靶点和早期标志. 基因芯片技术是近年来出现的一种高通量的分子生物学技术, 他能够在同一时间内分析大量的基因, 实现生物基因信息的大规模检测. 通过比较正常和疾病状态下的基因转录及其表达的差异, 寻找和发现该疾病相关的候选基因, 为疾病的诊断和治疗提供分子生物学方面的依据. 其工作原理是: 经过标记的待测样本DNA通过与芯片上特定位置的探针杂交, 可根据碱基互补配对的原则确定靶DNA序列, 经激光共聚焦显微镜扫描, 以计算机系统对荧光信号进行比较和检测, 并

### ■ 相关报道

由于基因芯片高昂的价格, 目前运用基因芯片在基因表达水平上寻找IBD相关基因的报道不多, 多数为针对既往的如NOD2、HLA等连锁分析发现的IBD相关基因多态性与IBD相关性展开的研究.

### ■创新盘点

本文就近年来NOD2、HLA基因多态性与IBD关系研究进展综述的同时,介绍了迅速发展的全基因组关联分析和基因芯片技术在IBD易感基因研究的最新成果,并且从不同技术角度总结了研究成果。

迅速得出所需的信息. 他最显著的特点是高通量、高集成、微型化、多样化和自动化, 比常规方法效率高几十到几千倍, 可在一次试验中间平行分析成千上万个基因, 是一种进行DNA序列分析及基因表达信息分析的强有力工具自1995年问世以来, 短短十年间得到了迅速的发展和运用, 展现了广阔的应用前景。

基因芯片技术最初运用于IBD领域始于1996年Heller *et al*<sup>[47]</sup>运用基因芯片检测重度类风湿关节炎患者滑液组织和接受手术治疗的CD患者切除病变组织基因表达, 尽管该小组所运用的cDNA芯片仅能检测96个基因, 但仍在两者中检测出共同表达的炎症疾病诱导基因, 如IL-1, IL8, TNF和粒细胞集落刺激因子等, 并首次报道了以前未发现的基因如HME和黑色素瘤生长刺激因子. 该研究受检测基因数量的限制未发现CD特异性相关基因, 但推动了基因芯片在IBD等多基因疾病中的运用. 此后研究人员分别采用手术切除标本、内镜下钳取黏膜标本, 和外周血等提取RNA对IBD患者肠道病变及正常组织和健康对照人群分别比较, 以期发现在疾病发生、发展中潜在或致病的基因. 但因为运用芯片类型、标本选择的不同, 以及人群自然差异等, 目前为止未发现被多数基因芯片实验共同支持的基因, 本文就此介绍其中几项典型研究。

**3.1 组织标本** 在早期进行的实验中, 由于芯片高昂的价格, 在使用芯片数目较少的情况下, 一些研究者倾向于把经过同一种处理的多个个体的RNA进行混合<sup>[48-51]</sup>, 希望能消除个体差异, 如Lawrance *et al*<sup>[48]</sup>将分别取自UC, CD和正常对照各6例的结肠切除标本提取的RNA分别按UC, CD和正常对照组分别混合. 结果和健康对照人群相比在UC和CD各自有108个和29个不同表达的基因, 值得注意的是在IBD2区域发现ATPase2B1和CRADD在CD、UC均表达下调, 以及此后被证实的MDR1在CD和UC中表达下调和HLA在UC中的表达上调, 可能受检测基因数量的限制在其他IBD位点未发现IBD相关基因. 在UC中表达异常基因中最值得注意的为DD96基因, DD96为正常上皮中低表达而在肺癌、乳腺癌和结肠癌中大量表达的肿瘤相关基因, 其在UC中表达, 在基因层面揭示了临床中UC具有癌变倾向的分子机制. 该研究结果显示CD与UC相比最大的区别是自然的抗微生物防御素DEFA5和DEFA6的高表达, 抗菌肽在CD中的高表达, 提示了细菌感染在CD发病中可能具

有重要作用. Dieckgraefe *et al*<sup>[52]</sup>运用相同的芯片报道的UC表达上调的74个基因中, 21个被该研究所验证. 在这两项试验都同时明显表达上调的UC相关基因有REG家族、MMPs、钙结合蛋白S100.

随着人类基因芯片技术的不断进步, 一次检测基因数量大大增加. Langmann *et al*<sup>[51]</sup>运用IBD患者和结肠和直肠的非病变部位提取标本后按UC、CD各自结、直肠组分别混合RNA. 在检测22283个基因中, 最显著的是MDR1和PXR在UC中的表达下调. 证实了基因组扫描和定位克隆发现的MDR1在UC中的表达下调. PXR作为核受体在解毒作用的转录调节中具有重要作用, PXR能被糖皮质激素, 如地塞米松; 抗菌素, 如利福平等激活, 从而激发编码解毒酶基因的表达发挥对结肠上皮细胞的保护作用<sup>[53]</sup>. PXR在UC患者中的表达下调甚至却失, 可能为结肠上皮损伤的机制之一. 但该研究报道的UC和CD患者在结肠和直肠不同取材部位异常表达基因数量不同的结果, 被后续实验<sup>[54-55]</sup>和动物实验<sup>[56]</sup>所否定。

上述早期试验中具有两个明显缺陷, 其一采用的手术切除组织做标本, 只有少部分到疾病末期, 病情严重患者才需要接受手术治疗, 这样不仅限制了研究对象的范围, 且疾病不同阶段基因表达可能具有差异, 采用手术患者为研究对象可能会掩盖影响疾病早期发生发展的基因. 另外一个重要缺陷是, 混合患者RNA在一定程度上掩盖了疾病多样性, 对发现IBD患者基因亚型不利. Costello *et al*<sup>[54]</sup>和Wu *et al*<sup>[55]</sup>在此后以内镜下取材, 分别对UC、CD的RNA非混合与健康对照人群比较, 前者在UC和CD中分别发现272个和500个异常表达的基因, 而后者发现131和77个异常表达基因. 遗憾的是前者报道的异常表达基因中, 仅有4个基因与后者重复(在UC表达上调基因中的BF, NOS2A, TIMP1, 和表达下调基因SLC26A2)Costello *et al*报道表达异常基因于其他试验重复率也低, 其原因可能为其试验采用cDNA芯片的缘故, 而其他研究多采用高密度寡核苷酸芯片. 在Feng *et al*的研究中, 与其研究小组早期报道相比, 该研究发现CD表达上调基因大大增加, 这可能证实了手术切除标本为疾病末期, 部分基因已不表达, 而内镜取材标本病变于早期, 参与调节基因较多. 此两项研究与其他相比, 重复率较高的基因有UC中PXR、MDR的表达下调, CD中HLA、LCN2表

达上调. 另外Feng *et al*报道的在CD中表达上调的基因IFITM1, IFITM3, STST1, STAT3是IL23参与调节的TH1通道激活的标志. 而IL23如前所述具有间接增强组织炎症反应的作用, 基因芯片研究支持了关联分析成果, IL23可作为IBD患者一个重要的治疗靶点.

**3.2 外周血标本** 与通过手术或内镜获取肠道组织相比, 外周血是一个更容易获取的检查标本, 这种无创性的检查可以得以在大量人群中展开. 外周血中单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)负责全身的免疫监视和作为感染等疾病的标志, 因此可以用其代替肠道组织标本作为发现疾病导致的基因表达标志和评价疾病状态、严重性等<sup>[57]</sup>. Maas *et al*<sup>[58]</sup>首先运用基因芯片检测自身免疫性关节炎, 系统性红斑狼疮, 多发性硬化, 和 I 型糖尿病患者 PBMCs 基因表达. 目前IBD领域运用PBMCs提取RNA进行芯片检测的两项试验都在美国人群中展开. Mannick *et al*<sup>[59]</sup>运用cDNA芯片检测7名CD患者和5名UC患者和10名非IBD肠道炎症患者及6名健康对照人群PBMCs基因表达差异, 结果在检测的2400个基因中CD与其他炎症性肠道疾病相比分别有24个基因表达上调和28个表达下调, 而UC则分别有12个表达上调和7个表达下调. 因为目前研究显示IBD患者在治疗前后基因芯片检测具有明显基因表达差异<sup>[60-61]</sup>所以该研究纳入新发未接受治疗IBD患者, 对发现具有早期诊断意义的基因标志更具合理性. Burczynski *et al*<sup>[61]</sup>开展了迄今为止最大规模研究, 纳入了59名CD和26名UC患者及42名健康对照. 所采用的寡核苷酸芯片能一次检测22000个基因序列. 结果发现, 在CD与正常人相比异常表达的220个基因中, 67个在UC中与正常人比较无明显差异, 而在UC中表达差异的120个基因中, 20个在CD中无异常表达, 可能这分别仅在CD和UC中表达的部分基因因其各自特异性标志. 与Mannick *et al*的研究比较, 两者报道CD表达上调的基因几乎没有重复. 唯一具有相似性的是Mannick *et al*发现的CD表达上调基因多为TGF- $\beta$ 激发的转录产物, 而本研究中报告的TSC-22即为典型的TGF- $\beta$ 激发的转录产物, 这两项研究提示, TGF- $\beta$ 表达上调在CD发病的免疫反应中具有一定的作用. CD特异性表达上调的多为前列腺素代谢酶, 趋化激素, 转录调节因子等致炎症基因, 例如: 环加氧酶在CD中表达明显上调, 而前列腺素D2合酶却表达下调. 这可能会导致花生四西酸选择

性的合成某些前列腺素增加. UC中特异性明显表达上调的为编码免疫球蛋白序列, 如IgHG3. 这与UC患者血清检测出免疫球蛋白升高所吻合<sup>[62]</sup>. IBD中都明显表达上调的是2型纤维蛋白溶酶原活化抑制因子. PAI-2对u-PA和t-TA激活具有酶特异性, 此前在风湿性关节炎患者滑液中检测出PAI-2增高<sup>[63]</sup>, 这个研究表面, 血液纤溶和凝血系统的改变, 在IBD患者肠道出血作用中具有一定作用.

尽管该研究研究为目前为止最大样本量的研究, 但要确认出具有分子诊断意义的特异性基因表达, 还需要更大人群的研究. 随着芯片技术的不断进步和成本下降, 在不久的将来采用外周血对IBD患者迅速作出分子学诊断已成为可能. 如最近生物科技公司Progenika日前研制开发一种新型DNA基因芯片EBDChip, 这种芯片被用来提高IBD包括CD和UC的诊断、判断预后以及治疗. EBDChip能够分析与IBD相关的46种突变, 计划不久就开始临床试验. IBDChip分析多种基因多态性以帮助确定IBD的危险、判断疾病预后以及患者对治疗出现的反应. 这种芯片不仅可以帮助临床选择最合适的治疗方法, 还能够帮助确定受测试家庭成员易感性程度.

#### 4 结论

目前, 对IBD的治疗包括糖皮质激素, 氨基水杨酸制剂和免疫抑制剂等. 这些药物能控制许多患者疾病的严重性, 但是副作用严重以及一些症状用药无效也显著降低了这些患者的生活质量. 因此, 急需相应的特异性治疗如生物制剂的免疫调节, 基因治疗等. 但这些治疗措施是必须建立在明确该疾病的病因和发病机理基础之上的. 因此, 在基因水平上进行IBD发病机理的研究是十分迫切需要的. 随着基因芯片技术的不断进步, 这已成为可能. 但尽管基因芯片技术取得了长足的发展, 但仍主要应用于实验室的基础研究中. 要想作为一种常规的快速、准确的方法应用到临床IBD的诊断、疗效观察和预后判断中, 还有很多的问题需要解决. 首先是成本的问题, 由于芯片制作的工艺复杂, 信号检测也需专门的仪器设备, 一般实验室难以承担其高昂的费用, 其次在芯片实验技术上还有多个环节尚待提高, 如在探针合成方面, 如何进一步提高合成效率及芯片的集成程度是研究的焦点. 而样品制备的简单化与标准化则芯片应用进一步普及的前提. 再者, 在研究对象选择上应该建

#### ■应用要点

随着芯片技术的不断进步和成本下降, 运用该先进手段在基因表达水平上寻找IBD等多基因疾病的特异性、标志性分子标志, 可能会成为致病基因研究的高效手段.

## ■名词解释

**1 连锁分析:** 基本原理是通过分析两个遗传位点在家系中的共分离性来确定控制疾病表型变异的基因位点, 主要有参数和非参数两类方法. 参数方法需要假定性状的遗传模式以及有关参数的值, 如外显值、重组率等, 然而对大多数疾病, 很难估计其孟德尔遗传的有关参数. 非参数方法不需要假设性状遗传的模式, 但完全依赖于已知标记的遗传模式. 连锁分析的功效又与个体疾病表型的正确诊断有关. 因此, 特别适用于受单基因控制和表型存在明显差异的简单孟德尔疾病.

**2 全基因组关联分析:** GWA的设计基本原理同经典的病例对照研究相同, 即假设某个SNP与疾病发生关联, 则理论上病例(患有该疾病)中该SNP的等位基因频率应当高于对照组(未患有该疾病). 然后通过假设检验来检验该假设. GWA研究的特点是不再选择候选基因或者候选染色体区域, 而是针对基因组所有的SNPs.

立规范纳入标准, 在IBD不同疾病阶段, 治疗与否及治疗前后都会造成基因表达的差异. 在今后的研究中应分别采用大样本的, 处于疾病各阶段的病人, 以期发现在疾病个阶段发生发展都发挥作用的共同基因标志, 为在基因诊断、治疗、药物筛选上发现共同的靶点.

## 5 参考文献

- 1 Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53 Suppl 5: V1-V16
- 2 Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-1517
- 3 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 4 中国炎症性肠病协作组, 王玉芳, 欧阳钦. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. *中华消化杂志* 2006; 26: 368-372
- 5 Retrospective analysis of 515 cases of Crohn's disease hospitalization in China: nationwide study from 1990 to 2003. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1009-1015
- 6 Rubin GP, Hungin AP, Kelly PJ, Ling J. Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1553-1559
- 7 Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003; 124: 1767-1773
- 8 Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1075-1081
- 9 Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996; 312: 95-96
- 10 Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3668-3672
- 11 Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-823
- 12 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603
- 13 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas

- R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606
- 14 Eckmann L, Karin M. NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? *Immunity* 2005; 22: 661-667
- 15 Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, Cantley LC. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* 2004; 14: 2217-2227
- 16 Zhou Z, Lin XY, Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Levine J, Katz S, Silver J. Variation at NOD2/CARD15 in familial and sporadic cases of Crohn's disease in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 3095-3101
- 17 Karban A, Waterman M, Panhuysen CI, Pollak RD, Nesher S, Datta L, Weiss B, Suissa A, Shamir R, Brant SR, Eliakim R. NOD2/CARD15 genotype and phenotype differences between Ashkenazi and Sephardic Jews with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1134-1140
- 18 Tukel T, Shalata A, Present D, Rachmilewitz D, Mayer L, Grant D, Risch N, Desnick RJ. Crohn disease: frequency and nature of CARD15 mutations in Ashkenazi and Sephardi/Oriental Jewish families. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 623-636
- 19 van der Linde K, Boor PP, Houwing-Duistermaat JJ, Crusius BJ, Wilson PJ, Kuipers EJ, de Rooij FW. CARD15 mutations in Dutch familial and sporadic inflammatory bowel disease and an overview of European studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 449-459
- 20 Törkvist L, Noble CL, Lördal M, Sjöqvist U, Lindfors U, Nimmo ER, Russell RK, Löfberg R, Satsangi J. Contribution of CARD15 variants in determining susceptibility to Crohn's disease in Sweden. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 700-705
- 21 Ernst A, Jacobsen B, Ostergaard M, Okkels H, Andersen V, Daglieni E, Pedersen IS, Thorsgaard N, Drewes AM, Krarup HB. Mutations in CARD15 and smoking confer susceptibility to Crohn's disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1445-1451
- 22 Gao M, Cao Q, Luo LH, Wu ML, Hu WL, Si JM. [NOD2/CARD15 gene polymorphisms and susceptibility to Crohn's disease in Chinese Han population] *Zhonghua Neike Zazhi* 2005; 44: 210-212
- 23 Guo QS, Xia B, Jiang Y, Qu Y, Li J. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1069-1071
- 24 Linderson Y, Bresso F, Buentke E, Pettersson S, D'Amato M. Functional interaction of CARD15/NOD2 and Crohn's disease-associated TNFalpha polymorphisms. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 305-311
- 25 Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 681-685
- 26 Ding Y, Xia B, Lü M, Zhang Y, Li J, Ye M, Luo H, Yu J, Zhang X, Tan J. MHC class I chain-related gene A-A5.1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Exp Immunol* 2005; 142:

- 193-198
- 27 Lu M, Xia B, Li J, Ye M, Zhang X, Tan Q. MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Immunol* 2006; 120: 199-204
- 28 Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Canani RB, D'Inca R, Guariso G, Vieni G, De Venuto D, Riegler G, De'Angelis GL, Guagnozzi D, Bascietto C, Miele E, Valvano MR, Bossa F, Annese V. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44: 171-179
- 29 Sýkora J, Subrt I, Didek P, Siala K, Schwarz J, Machalová V, Varvarovská J, Pazdiora P, Pozler O, Stozický F. Cytokine tumor necrosis factor-alpha A promoter gene polymorphism at position -308 G->A and pediatric inflammatory bowel disease: implications in ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 479-487
- 30 Celik Y, Dagli U, Kiliç MY, Törtüner M, Ozen SC, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 559-565
- 31 Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK, Ghoshal UC. Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 920-924
- 32 姒健敏, 朱琴. 炎症性肠病的遗传学研究若干进展. 国际消化病杂志 2006; 26: 75-77
- 33 Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhardt AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JL, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461-1463
- 34 Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL, Smith RM, Eckert AW, Robinson LJ, Onyiah CC, Abrams DJ, Chiavacci RM, Skraban R, Devoto M, Grant SF, Hakonarson H. Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 972-976
- 35 Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R, Mengesha E, Targan SR, Taylor KD, Rotter JI. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 511-515
- 36 Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Drummond HE, Smith L, Davies G, Anderson NH, Gillett PM, McGrogan P, Hassan K, Weaver L, Bisset WM, Mahdi G, Wilson DC, Satsangi J. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut* 2007; 56: 1173-1174
- 37 Roberts RL, Gearry RB, Hollis-Moffatt JE, Miller AL, Reid J, Abkevich V, Timms KM, Gutin A, Lanchbury JS, Merriman TR, Barclay ML, Kennedy MA. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2754-2761
- 38 Cummings JR, Ahmad T, Geremia A, Beckly J, Cooney R, Hancock L, Pathan S, Guo C, Cardon LR, Jewell DP. Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1063-1068
- 39 Büning C, Schmidt HH, Molnar T, De Jong DJ, Fiedler T, Bühner S, Sturm A, Baumgart DC, Nagy F, Lonovics J, Drenth JP, Landt O, Nickel R, Büttner J, Lochs H, Witt H. Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers a protective effect not only against Crohn's disease but also ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1025-1033
- 40 Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; 203: 2473-2783
- 41 Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2069-2079
- 42 Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 596-604
- 43 Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, DeLa Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; 39: 207-211
- 44 Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL, Smith RM, Eckert AW, Robinson LJ, Onyiah CC, Abrams DJ, Chiavacci RM, Skraban R, Devoto M, Grant SF, Hakonarson H. Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease. *Gut* 2007; 56: 1171-1173
- 45 Cummings JR, Cooney R, Pathan S, Anderson CA, Barrett JC, Beckly J, Geremia A, Hancock L, Guo C, Ahmad T, Cardon LR, Jewell DP. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 941-946
- 46 Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, Bagnall R, Mirza MM, Sanderson J, Forbes A, Mansfield JC, Lewis CM, Schreiber S, Mathew CG. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007; 132: 1665-1671
- 47 Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*

#### ■同行评价

本文选题较新颖, 表述清晰, 逻辑性强, 对IBD临床及科研工作均具有指导意义。

- 1997; 94: 2150-2155
- 48 Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 445-456
- 49 Uthoff SM, Eichenberger MR, Lewis RK, Fox MP, Hamilton CJ, McAuliffe TL, Grimes HL, Galandiuk S. Identification of candidate genes in ulcerative colitis and Crohn's disease using cDNA array technology. *Int J Oncol* 2001; 19: 803-810
- 50 Dooley TP, Curto EV, Reddy SP, Davis RL, Lambert GW, Wilborn TW, Elson CO. Regulation of gene expression in inflammatory bowel disease and correlation with IBD drugs: screening by DNA microarrays. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 1-14
- 51 Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebisch G, Zahn A, Stremmel W, Schmitz G. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* 2004; 127: 26-40
- 52 Dieckgraefe BK, Stenson WF, Korzenik JR, Swanson PE, Harrington CA. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics* 2000; 4: 1-11
- 53 Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619: 243-253
- 54 Costello CM, Mah N, Häsler R, Rosenstiel P, Waetzig GH, Hahn A, Lu T, Gurbuz Y, Nikolaus S, Albrecht M, Hampe J, Lucius R, Klöppel G, Eickhoff H, Lehrach H, Lengauer T, Schreiber S. Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays. *PLoS Med* 2005; 2: e199
- 55 Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, Bayless TM, Parmigiani G, Chakravarti S. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 807-821
- 56 Bates MD, Erwin CR, Sanford LP, Wiginton D, Bezerra JA, Schatzman LC, Jegga AG, Ley-Ebert C, Williams SS, Steinbrecher KA, Warner BW, Cohen MB, Aronow BJ. Novel genes and functional relationships in the adult mouse gastrointestinal tract identified by microarray analysis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1467-1482
- 57 Rockett JC, Burczynski ME, Fornace AJ, Herrmann PC, Krawetz SA, Dix DJ. Surrogate tissue analysis: monitoring toxicant exposure and health status of inaccessible tissues through the analysis of accessible tissues and cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 194: 189-199
- 58 Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, Aune TM. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol* 2002; 169: 5-9
- 59 Mannick EE, Bonomolo JC, Horswell R, Lentz JJ, Serrano MS, Zapata-Velandia A, Gastanaduy M, Himel JL, Rose SL, Udall JN Jr, Hornick CA, Liu Z. Gene expression in mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2004; 112: 247-257
- 60 Yagi Y, Andoh A, Ogawa A, Bamba S, Tsujikawa T, Sasaki M, Mitsuyama K, Fujiyama Y. Microarray analysis of leukocytapheresis-induced changes in gene expression patterns of peripheral blood mononuclear cells in patients with ulcerative colitis. *Ther Apher Dial* 2007; 11: 331-336
- 61 Burczynski ME, Peterson RL, Twine NC, Zuberek KA, Brodeur BJ, Casciotti L, Maganti V, Reddy PS, Strahs A, Immermann F, Spinelli W, Schwertschlag U, Slager AM, Cotreau MM, Dorner AJ. Molecular classification of Crohn's disease and ulcerative colitis patients using transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Diagn* 2006; 8: 51-61
- 62 Winther KV, Føgh P, Thomsen OØ, Brynkskov J. Inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease): diagnostic criteria and differential diagnosis. *Drugs Today (Barc)* 1998; 34: 935-942
- 63 Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 1995; 86: 4007-4024

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 2008-07-18)

# 三叶因子3研究进展

陈美娅, 张靖, 任建林

陈美娅, 任建林, 福建医科大学教学医院, 厦门大学附属中山医院消化内科; 厦门大学消化疾病研究所; 厦门市消化疾病诊治中心 福建省厦门市 361004  
张靖, 厦门大学附属中山医院博士后工作站 福建省厦门市 361004

国家自然科学基金资助项目, No. 30750013

作者贡献分布: 此课题由任建林设计, 文献收集、论文写作由陈美娅完成; 论文由张靖及任建林审校。

通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科; 厦门大学消化疾病研究所; 厦门市消化疾病诊治中心. jianlinr@msn.com

电话: 0592-2993170 传真: 0592-2993170

收稿日期: 2008-05-05 修回日期: 2008-06-05

接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-18

## Advances in research of trefoil factor 3

Mei-Ya Chen, Jing Zhang, Jian-Lin Ren

Mei-Ya Chen, Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, Teaching Hospital of Fujian Medical University, Zhongshan Hospital Xiamen University; Xiamen University Digestive Diseases Institute; Digestive Disease Center of Xiamen City, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Jing Zhang, Postdoctoral Station, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China. No. 30750013

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

Received: 2008-05-05 Revised: 2008-06-05

Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-18

### Abstract

As one of important defensive factors, trefoil factor 3 (TFF3) has considerable relation to the lesion, recovery, proliferation and malignancy of gastrointestinal mucosa. Furthermore, the correlation between TFF3 and tumor, including its pathogenesis, progress and prognosis, has been reported remarkably. However, the binding proteins of TFF3 remains to be confirmed and the research of TFF3 on the mechanism of action and signal transduction pathway is just initial. This article reviewed the progress in TFF3 research.

Key Words: Trefoil factor 3; Tumor; Signal transduction

Chen MY, Zhang J, Ren JL. Advances in trefoil factor 3 research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2267-2273

### 摘要

TFF3作为胃肠黏膜中一个重要的黏膜保护因子,与胃肠黏膜的损伤、修复、增殖、恶变都有着重要的关系。TFF3与肿瘤的发生、发展、预后有一定的关系,但TFF3的结合蛋白尚未明确,其细胞内作用机制、具体信号转导途径的相关研究尚处于起始阶段。本文对TFF3的研究进展作一综述。

关键词: 三叶因子3; 肿瘤; 信号转导

陈美娅, 张靖, 任建林. 三叶因子3研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(20): 2267-2273

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2267.asp>

### 0 引言

三叶因子家族是近年来研究较多的一群小分子多肽,又称三叶肽(trefoil peptide)。在哺乳动物体内他们具有黏膜保护、修复、肿瘤抑制或促肿瘤发生、信号转导、调节细胞凋亡等功能。目前在哺乳动物体内发现的三叶肽有3种,即乳腺癌相关肽(the breast cancer-associated pS2 peptide, pS2/TFF1)、解痉多肽(spasmolytic polypeptide, SP/TFF2)和肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF/TFF3)。其中TFF3于1991年由Suemori *et al*首次在大鼠空肠发现<sup>[1]</sup>。三叶因子家族都至少含有一个特殊的P结构域,后者由38-39个氨基酸组成,通过6个高度保守的半胱氨酸残基经由3个分子内的二硫键相互联接使整个肽链扭曲折叠形成三叶状结构<sup>[2]</sup>,三叶肽由此而得名。

### 1 分子结构及表达定位

TFF3分子由59个氨基酸组成,含有1个P结构域,质谱分析表明TFF3存在单聚体及二聚体两种形式。单聚体分子质量为6692 kDa,二聚体分子质量为13 146.8 kDa,其同源二聚体是由2个Cys58形成的分子间二硫键连接而成<sup>[3]</sup>。TFF3主要在小

### ■背景资料

TFF3作为胃肠黏膜中一个重要的保护因子,与胃肠黏膜的损伤、修复、增殖、恶变都有着重要的关系,但TFF3的结合蛋白尚未明确,其细胞内作用机制、具体信号转导途径的相关研究尚处于起始阶段。

### ■同行评议者

张筱茵,副教授,中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所;刘占举,教授,郑州大学第二附属医院消化内科

### ■创新盘点

本文从TFF3的生理功能、TFF3在病变组织中的表达、TFF3表达的调节、TFF3与细胞信号转导及TFF3与肿瘤等多个方面对TFF3的研究进展作一综述。

肠及结肠杯状细胞、胃窦黏膜<sup>[4]</sup>中表达;人食管黏膜下腺(主要在Z线和胃贲门之间)可见TFF3较高量表达;胃体黏膜下腺可见TFF3少量表达<sup>[4]</sup>。此外,研究表明TFF3在人胰腺<sup>[5]</sup>、唾液腺<sup>[6]</sup>、泪腺<sup>[7]</sup>、前列腺<sup>[8]</sup>、鼻黏膜<sup>[9]</sup>、十二指肠乳头<sup>[10]</sup>、子宫<sup>[11]</sup>、乳腺<sup>[12]</sup>、下丘脑<sup>[13]</sup>、垂体<sup>[14]</sup>、肺<sup>[15]</sup>等组织中也有低水平表达,而在病理条件下,TFF3的表达发生了明显改变。

## 2 生理功能

**2.1 黏膜保护及修复** 与黏液中的糖蛋白结合形成稳定的凝胶复合物加强黏液凝胶层,减少胃肠道表面有害物质及机械应力等因素对黏膜的损伤。研究表明在应用TFF3后,可明显增加胃肠道黏膜可溶性黏液的分泌量并增加其黏度<sup>[6]</sup>。给小鼠*po*重组人类解痉多肽、小鼠肠三叶因子,均能明显减轻非甾体类抗炎药物、酒精导致的胃黏膜损伤<sup>[17]</sup>。Kjellerv *et al*人检测DSS(丁二酸二辛酯磺酸钠)引发的小鼠结肠炎中TFF3的含量,发现当结肠炎发生时,TFF3表达明显增高;此外,通过外源性TFF3全身用药(静脉、腹腔、皮下),发现结肠炎部位TFF3结合明显增多,并能减轻炎症的程度,说明TFF3对于结肠黏膜的完整性具有非常重要的作用<sup>[18]</sup>。但TFF3表达增加出现于黏膜修复期,在黏膜损伤早期,TFF3含量是下降的。

三叶肽参与损伤组织的修复过程。三叶因子是一种运动因子能与表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)协同作用参与损伤组织的上皮重建过程,即促进受损黏膜周围完好的上皮细胞向损伤黏膜表面迁移,覆盖并促进损伤黏膜的修复,但并不促使细胞分裂。TFF3促进细胞迁徙的作用机制可能和EGF不同,通过IEC-18细胞刮伤及迁徙实验,发现加入TFF3后细胞呈片状迁徙,细胞间隙很小,而EGF引起的细胞迁徙则呈网络状,细胞彼此之间间隙很大,只通过一些接触进行联系。相比之下,TFF3较EGF更能精密修复黏膜损伤部位,且减少间隙的产生<sup>[19]</sup>。TFF3对于黏膜的修复作用,推测是通过下调E-钙黏蛋白、加强细胞间连接、促进细胞迁徙来实现的;此外,TFF3亦可上调上皮细胞中tightening claudin-1的含量、下调tightening claudin-2的含量,增强表层细胞的抵抗力、降低上皮的渗透性来达到黏膜修复的目的<sup>[20]</sup>。另有研究表明,TFF3可能通过增加Vangl1基因的表达,

进而减少E-钙黏蛋白来达到促进黏膜修复的作用,此外,当IEC-18细胞被敲除了Vangl1基因后,细胞对TFF3的促迁徙反应也明显下降,这说明Vangl1蛋白可能是TFF3的效应蛋白之一<sup>[21]</sup>。

**2.2 细胞保护、分化和凋亡** 往IEC-18细胞培养基中添加TFF3,能促进IEC-18细胞中环氧化酶-2的产生,进而减少氧自由基对细胞的损伤,且环氧化酶-2特异性阻断剂NS-398能够阻断这种作用,由此推论,TFF3可能通过促进环氧化酶-2合成,继而促进前列腺素-2生成,来发挥细胞保护作用<sup>[22]</sup>。

TFF3可促进黏膜干细胞如胃窦黏膜干细胞、支气管纤毛细胞的分化,这种作用,部分是通过EGF-R受体途径来实现的<sup>[23]</sup>。

HT29细胞系中存在结肠腺瘤性息肉病(APC)相关的基因突变,但能表达正常的上皮细胞钙黏蛋白-链蛋白复合物。Efstathiou *et al*发现rTFF3可引起HT29细胞钙黏蛋白下调,减弱细胞与细胞、细胞与基底膜之间的黏附作用,下调APC及钙黏蛋白-链蛋白的表达,使APC从细胞质移位到细胞核中并诱导细胞凋亡<sup>[24]</sup>。

**2.3 神经递质** 大鼠及人类的视上核及室旁核的大细胞性催产素神经元细胞能合成TFF3。Derbyshire *et al*研究发现,TFF3的释放并不能促进催产素神经元释放催产素,但却能促进Fos蛋白质的合成,而Fos蛋白质是催产素神经元中主要发挥作用的蛋白质,这说明TFF3有可能作为一种神经递质在催产素神经元发挥功能的过程中起到重要作用<sup>[13]</sup>。此外,有报道报道将TFF3注入小鼠脑扁桃体中,可具有一定的抗焦虑作用,进一步提示TFF3在神经系统内可能是一种调节情绪的神经递质<sup>[25]</sup>。

## 3 TFF3在病变组织中的表达

**3.1 TFF3在炎症病变中的表达** 胃黏膜、结肠黏膜炎症可导致TFF3表达水平增高。Taupin *et al*通过制造大鼠胃黏膜炎症模型,继而采用放射免疫测定、免疫印迹及免疫组化方法检测大鼠胃黏膜中TFF3的含量,发现4 d时胃黏膜中TFF3表达水平即明显增高,而40 d时,TFF3的表达水平已成百倍增高,同时,在非病变组织中也可见TFF3表达水平增高;几个月后,当出现胃黏膜萎缩、肠化生和重度异常增生等病理变化时,仍可见TFF3表达水平增高<sup>[26]</sup>。在反流性食管炎患者中,食管胃移行部、小肠炎症病灶中也可检测到TFF3表达水平增高<sup>[27-28]</sup>。此外,药物性肠炎

时, 疾病初始期TFF3表达水平降低, 修复期表达水平增高, 说明TFF3对大肠黏膜的修复有一定的作用<sup>[29]</sup>.

研究发现, 硬化性胆管炎患者的小胆管中, 均存在TFF3表达缺失, 这说明TFF3表达缺失在胆管损伤发生机制中可能占有重要地位<sup>[30]</sup>.

**3.2 TFF3在溃疡病变中的表达** 慢性溃疡附近区域存在一个特有的解剖结构, 即溃疡相关细胞体系(ulcer-associated cell lineage, UACL). 消化性溃疡、溃疡性结肠炎及Crohn病时均可出现UACL. UACL是一种腺样结构, 起源于胰腺隐窝基部的干细胞群. UACL腺体可以不断地产生新的细胞, 后者迁移到溃疡表面, 以促进溃疡修复. UACL表达表皮生长因子、转化生长因子 $\alpha$ <sup>[31]</sup>、三种已知的三叶因子(PS2、hSP和TFF3)以及一些相关的黏蛋白(MUC5AC、MUC6), 其中, TFF3和MUC2共同表达<sup>[32]</sup>. TFF3在消化道慢性溃疡病变中多见表达升高, 但当溃疡处于活动期时, TFF3表达下降. Longman *et al*人通过检测活动期溃疡性结肠炎患者中TFF3, 发现其表达下降, 提示TFF3的表达下降可能与结肠黏膜的损伤有关<sup>[33]</sup>.

## 4 TFF3表达的调节

**4.1 TFF3表达的生理调节** TFF3的表达受发育控制, 其基因调控在胎儿期和出生后不同. Mashimo *et al*发现TFF3在成年小鼠的胃肠道存在表达, 而幼年或胚胎期小鼠的胃肠道无表达<sup>[34]</sup>. Otto *et al*对胎儿胃TFF3的表达进行了动态观察, 发现TFF3于胚胎第13天开始在胃表达, 15、16 d时表达部位不明确, 17 d起TFF3仅局限表达于小肠及末端胃<sup>[35]</sup>. 此外, 研究表明大鼠妊娠第20天后TFF3蛋白表达明显增高, 而在胚胎早期表达相对较低<sup>[36]</sup>.

**4.2 TFF3表达的病理调节** (1)幽门螺杆菌: Matsuda *et al*检测了感染幽门螺杆菌ATCC 43504的AGS、MKN45和KATOIII细胞中三叶因子家族含量的变化, 结果发现, 三种三叶因子家族成员分泌表达均增高, 这提示幽门螺杆菌有可能为调节TFF3表达的因素之一<sup>[37]</sup>. (2)肠道细菌感染、寄生虫感染均可引起肠黏膜中TFF3表达水平增高<sup>[23,38]</sup>. (3)雌激素: Walker *et al*采用荧光定量PCR检测发现, 增加17- $\beta$ 雌二醇可刺激TFF3表达增高, 而三苯氧胺(雌二醇抑制剂)能够阻断这种调节作用, 提示雌激素可能是TFF3的调节因子之一<sup>[39]</sup>. (4)酒精、胃肠道高渗透压、

丁酸钠和5-氨基水杨酸等化学药物造成的肠道炎症均能引起TFF3的合成增加<sup>[40-41]</sup>. (5)同源结构域蛋白CDX2: Shimada *et al*发现, 在CDX2高表达的COS-7和AGS细胞系中, TFF3的转录水平明显增高; 进一步通过电泳迁移率变动分析发现, 在人TFF3基因启动子中, 至少存在2个以上的CDX2结合位点; 通过向AGS细胞转染CDX2表达载体, 可导致TFF3高表达<sup>[42]</sup>. (6)DNA结合蛋白A: 检测DNA结合蛋白A转基因小鼠发现, 其TFF3的表达明显增高, 说明DNA结合蛋白A可能与调节TFF3表达密切相关<sup>[43]</sup>. (7)白介素: IL-4、IL-13可能通过STAT6途径促进杯状细胞中TFF3的合成<sup>[44]</sup>, 而IL-1 $\beta$ 通过NF-kappaB途径、IL-6通过C/EBP $\beta$ 途径降低TFF3的合成<sup>[45]</sup>. (8)三叶因子各成员之间也可相互调节: 研究发现, 在TFF3基因敲除的小鼠体内, 其结肠损伤修复功能受到了致命性的损害, 此外, 三叶因子家族其他成员如TFF1、TFF2的转录也明显降低<sup>[46]</sup>, 而在TFF2敲除小鼠胃黏膜中, TFF3的表达量明显升高<sup>[47]</sup>, 这说明三叶因子家族中的各成员有可能作为独立的因素影响其他三叶因子的转录. (9)氨甲酰甲胆碱、蛙皮素、P物质、16, 16-二甲基PGE2和IL-1 $\beta$ 可促进TFF3的表达, 其中氨甲酰甲胆碱、蛙皮素的促表达作用呈剂量依赖性<sup>[48]</sup>.

## 5 TFF3与细胞信号转导

**5.1 STAT途径** TFF3在结肠癌中的作用机制, 有可能通过启动促癌信号途径STAT3来进行, 研究发现, TFF3和VEGF均能促进STAT3- $\alpha$ 和STAT3- $\beta$ 的磷酸化, 相反的, 当通过RNA干扰的方法阻断STAT3的表达, 均能减少TFF3及VEGF介导的细胞迁徙, 降低接种在裸鼠身上HCT8/S11肿瘤的生长速度<sup>[49]</sup>. Tebbutt *et al*发现敲除STAT1/3和IL-6介导的gp130信号转导途径的小鼠, 其结肠黏膜损害程度与敲除TFF3基因的小鼠极其相似, 提示TFF3与STAT1/3、gp130信号转导途径有着密切联系<sup>[50]</sup>.

**5.2 EGF受体途径** 在人类呼吸道细胞未分化前, 加入重组人类TFF3, 能促进FOXJ1阳性细胞和 $\beta$ -微管蛋白纤毛细胞的增殖, 且这种增殖作用能被EGF特异性受体阻滞剂所阻断, 说明TFF3能促进纤毛发生, 且能促进呼吸道上皮纤毛细胞的分化, 而这种作用可能部分通过EGF受体信号转导途径实现<sup>[51]</sup>. Rodrigues *et al*研究发现, TFF3虽然和TFF1、TFF2同属于三叶因子家族, 但他

### ■应用要点

目前对于TFF3的研究主要局限于结肠, TFF3在其他部位的研究报道较少. TFF3与肿瘤的发生、发展、预后有一定的关系, 其能否作为肿瘤检测及预后判定的一个重要指标, 能否作为胃肠道疾病治疗的一个新的作用靶点, 都需要深入探讨.

### ■同行评价

本文内容全面,层次分明,对研究TFF3的生物学活性提出了重要的理论依据,具有指导意义。

们促进细胞迁徙的细胞内信号转导途径不同,当缺失EGF受体或加入EGF酪氨酸激酶受体阻断剂-ZD1839均可阻断TFF2诱导的细胞侵袭效应,但却对TFF3诱导的细胞侵袭效应无作用<sup>[52]</sup>。

5.3 PI3-K途径 研究发现,在HT-29、CL.16E和MTX细胞中,细胞的早期增殖和晚期汇合阶段,TFF3 mRNA表达增加了30倍,细胞内TFF3含量增加了10倍,采用LY294002(一种特异性PI3-K细胞阻断剂)进行阻断,发现TFF3和MUC2的表达明显下降;进一步通过基因敲除HT-29和CL.16E细胞中STAT6序列,对TFF3的表达量并无影响,因此推论,TFF3的表达有可能通过PI3-K途径,而非STAT6途径<sup>[53]</sup>。

5.4 Ras/MEK/ERK途径 前已述及,缺乏TFF3的小鼠结肠的修复严重受损,TFF1、TFF2的表达严重下降,这提示三叶因子家族中的成员能独立影响整个家族其他因子的合成,而这些因子可能是通过既能自分泌也能交叉诱导的早期快反应基因的顺式作用调节区来发挥作用的。进一步研究发现,三叶因子家族诱导的转录调节作用需要Ras/MEK/MAPK信号转导途径的激活<sup>[54]</sup>。

5.5 NF-kappaB途径 TFF3能促进IEC-18细胞中NF-kappaB p50/p65异源二聚体的活性,且能增强IEC-18细胞的抗凋亡能力,此外,NF-kappaB阻断剂能显著降低TFF3诱导的IEC-18细胞的抗凋亡能力,由此推测TFF3能够增强IEC-18的抗凋亡能力,而这种能力可能是通过NF-kappaB途径来实现的<sup>[55]</sup>。

5.6 PLC/PKC、RhoA、COX-2、TXA2-R途径 有研究发现,TFF3促进癌细胞侵袭和转移的作用可能通过src、Rho-A信号转导途径介导,此外,也有可能通过PI3磷酸激酶、磷脂酶C、蛋白激酶C和雷帕霉素靶蛋白TOR等相关途径来执行他的促癌细胞侵袭和转移功能<sup>[56]</sup>。Rodrigues *et al*在研究中发现,Rho小乌苷三磷酸酶抑制剂(C3胞外酶),磷脂酶C抑制剂(U-73122),环氧合酶抑制剂(SC-560、NS-398)和血栓素A2受体对抗物SQ-295能够完全阻断TFF3,pS2和src诱导的MDCKts.src和PCmsrc细胞的侵袭作用,且细胞的侵袭作用能被血栓素A2受体类似物U-46619诱导,也能被血栓素A2受体信号转导下游分子-异源三聚体的G蛋白部分引发,此外,当细胞转染src后,细胞培养基中COX-2蛋白和PGH2/TXA2代谢物TXB2稳定增加,故而提示,TFF3可能通过COX-2、TXA2-R、PLC/PKC途径促进细胞侵袭<sup>[57]</sup>。

## 6 TFF3与肿瘤

Kirikoshi *et al*发现,在胃癌细胞及胃癌组织中,三叶因子表达量发生明显改变,TFF1在OKA-JIMA、TMK1、MKN45、KATO-III细胞中表达,TFF2在KATO-III细胞中表达,而TFF3在MKN45、KATO-III细胞中表达;在早期胃癌组织标本中,58.3%的标本TFF1表达下降,83.3%的标本TFF2表达下降,16.7%的标本TFF3表达下降,而41.7%的标本中TFF3表达增高<sup>[58]</sup>。Leung *et al*发现,TFF3在25%的非癌组织和24%的癌旁组织中能被检测得到,在胃癌组织中TFF3的表达率较正常组织明显升高,达到了62%<sup>[59]</sup>,这说明三叶因子的表达量变化可能与胃癌的发生有着密切关系。在结肠肿瘤中,TFF3的含量也发生了变化,通过免疫组织化学的方法发现在结肠增生型息肉、无蒂锯齿状腺瘤、传统的锯齿状腺瘤中,TFF3表达下降<sup>[60]</sup>。John *et al*研究结肠癌演变过程时发现,在结肠腺瘤性息肉中,TFF3表达明显降低,在腺瘤中表达量和正常黏膜基本相同,而在黏液癌和腺癌中,TFF3呈高表达状态<sup>[61]</sup>。Uchino *et al*发现,当向不表达TFF3的LoVo和SW837结肠癌细胞中转染表达人类TFF3载体后,细胞的增长率明显下降,提示TFF3有可能抑制结肠癌的生长<sup>[62]</sup>。此外,在滤泡性甲状腺癌<sup>[63]</sup>、肝细胞性肝癌、小细胞性肺癌均发现TFF3高度表达。

TFF3可以诱导HT29细胞的 $\beta$ -连结素( $\beta$ -catenin)和EGF受体的酪氨酸磷酸化,导致细胞间粘连的破坏,细胞间失去粘连将使上皮细胞互相分离,从而增加HT29结肠癌细胞的迁移力,表明TFF3与细胞迁移有关<sup>[64]</sup>。Chan *et al*研究发现,在胃癌组织中TFF3呈现过表达,并上调Rat-2细胞 $\beta$ -连接素、MMP-9的mRNA表达,下调E-钙粘蛋白和TIMP-1的表达,可能通过上述因素最终影响到细胞的转移和侵袭过程<sup>[65]</sup>。有报道TFF3能使胃癌细胞系对无血清培养及神经酰胺所致凋亡的抵抗性增加,这意味着TFF3可能拮抗化疗药物的作用<sup>[66]</sup>。通过绒毛膜尿囊膜实验及研究涂抹有人类脐静脉细胞的基质胶的管状重构现象发现,三叶因子家族可能是一种促血管生成因子,而且他们的这种促血管生成作用有可能与血管内皮生长因子、转化生长因子 $\alpha$ 相当<sup>[67]</sup>。

TFF3表达与结肠肿瘤的分期有关,Dukes A期结肠癌中TFF3的表达明显高于Dukes B、C、D期。已经证实TFF3过度表达可抑制结肠癌细

胞株LoVo和SW837在体外的生长<sup>[62]</sup>. Yamachika通过对209例原发性胃腺癌患者进行统计学分析,发现TFF3在女性胃癌患者中的表达率较高,占到了一半以上(55%);但在男性胃癌患者中,TFF3的表达多见于晚期、浸润型、淋巴结转移阳性胃癌患者,提示在男性胃癌患者中TFF3可作为评价预后的一个指标<sup>[68]</sup>.通过比较胆管癌患者中染色体21q22-qter区域及TFF3基因的扩增情况,发现D21S1893、D21S1890和TFF3有扩增的胆管癌患者,预后均比较差,相反的,该部位缺失的患者预后相对较为理想<sup>[69]</sup>.Khoury *et al*通过运用免疫组织化学的方法检测1998-2003年30例肝细胞癌中TFF3的表达,发现在93.3%标本中出现TFF3表达,且TFF3的表达与肿瘤分期、肿瘤细胞分化程度有关,但未能显示TFF3与患者预后有一定的相关性<sup>[70]</sup>.在进展期前列腺癌的患者中,TFF3的含量较原位癌患者明显增高,这种显著增高尤其见于骨转移情况下,如果以200 pmol/L为界限,TFF3在区别原发性和转移性前列腺癌的敏感性为74%,特异性为81%<sup>[71]</sup>.

## 7 结论

TFF3作为胃肠黏膜中一个重要的细胞因子,与胃肠黏膜的损伤、修复、增殖、恶变都有着重要的关系.目前对于TFF3的研究主要局限于结肠,TFF3在其他部位的研究报道较少.TFF3与肿瘤(如胃癌、结肠癌、胆管癌等)的发生、发展、预后有一定的关系,但TFF3的结合蛋白尚未明确,其细胞内作用机制、具体信号转导途径的相关研究尚处于起始阶段.TFF3能否作为肿瘤检测及预后判定的一个重要指标,能否作为胃肠道疾病治疗的一个新的作用靶点,都需要深入研究来证实.

## 8 参考文献

- Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 11017-11021
- Williams GR, Wright NA. Trefoil factor family domain peptides. *Virchows Arch* 1997; 431: 299-304
- Thim L, Wöldike HF, Nielsen PF, Christensen M, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochemistry* 1995; 34: 4757-4764
- Kouznetsova I, Kalinski T, Peitz U, Mönkemüller KE, Kalbacher H, Vieth M, Meyer F, Roessner A, Malfertheiner P, Lippert H, Hoffmann W. Localization of TFF3 peptide in human esophageal submucosal glands and gastric cardia: differentiation of two types of gastric pit cells along the rostro-caudal axis. *Cell Tissue Res* 2007; 328: 365-374
- Jackerott M, Lee YC, Møllgård K, Kofod H, Jensen J, Rohleder S, Neubauer N, Gaarn LW, Lykke J, Dodge R, Dalgaard LT, Søstrup B, Jensen DB, Thim L, Nexø E, Thams P, Bisgaard HC, Nielsen JH. Trefoil factors are expressed in human and rat endocrine pancreas: differential regulation by growth hormone. *Endocrinology* 2006; 147: 5752-5759
- Devine DA, High AS, Owen PJ, Poulsom R, Bonass WA. Trefoil factor expression in normal and diseased human salivary glands. *Hum Pathol* 2000; 31: 509-515
- Paulsen FP, Hinz M, Schaudig U, Thale AB, Hoffmann W. TFF peptides in the human efferent tear ducts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 3359-3364
- Faith DA, Isaacs WB, Morgan JD, Fedor HL, Hicks JL, Mangold LA, Walsh PC, Partin AW, Platz EA, Luo J, De Marzo AM. Trefoil factor 3 overexpression in prostatic carcinoma: prognostic importance using tissue microarrays. *Prostate* 2004; 61: 215-227
- Lee SH, Lee SH, Oh BH, Lee HM, Choi JO, Jung KY. Expression of mRNA of trefoil factor peptides in human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* 2001; 121: 849-853
- Paulsen F, Varoga D, Paulsen A, Tsokos M. Trefoil factor family (TFF) peptides of normal human Vater's ampulla. *Cell Tissue Res* 2005; 321: 67-74
- Wiede A, Hinz M, Canzler E, Franke K, Quednow C, Hoffmann W. Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res* 2001; 303: 109-115
- Balcer-Kubiczek EK, Harrison GH, Xu JF, Gutierrez PL. Coordinate late expression of trefoil peptide genes (pS2/TFF1 and ITF/TFF3) in human breast, colon, and gastric tumor cells exposed to X-rays. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 405-415
- Derbyshire A, Ludwig M. TFF3 induced Fos protein expression in the magnocellular oxytocin neurons of the hypothalamus. *Peptides* 2004; 25: 833-838
- Hinz M, Schwegler H, Chwieralski CE, Laube G, Linke R, Pohle W, Hoffmann W. Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. *Peptides* 2004; 25: 827-832
- Wiede A, Jagla W, Welte T, Köhnlein T, Busk H, Hoffmann W. Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1330-1335
- Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 519-527
- Babyatsky MW, deBeaumont M, Thim L, Podolsky DK. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* 1996; 110: 489-497
- Kjellef S, Thim L, Pyke C, Poulsen SS. Cellular localization, binding sites, and pharmacologic effects of TFF3 in experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1050-1059
- Dürer U, Hartig R, Bang S, Thim L, Hoffmann W. TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin. *Cell Physiol*

- Biochem* 2007; 20: 329-346
- 20 Meyer zum Büschenfelde D, Tauber R, Huber O. TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. *Peptides* 2006; 27: 3383-3390
  - 21 Kalabis J, Rosenberg I, Podolsky DK. Vangl1 protein acts as a downstream effector of intestinal trefoil factor (ITF)/TFF3 signaling and regulates wound healing of intestinal epithelium. *J Biol Chem* 2006; 281: 6434-6441
  - 22 Tan XD, Chen YH, Liu QP, Gonzalez-Crussi F, Liu XL. Prostanoids mediate the protective effect of trefoil factor 3 in oxidant-induced intestinal epithelial cell injury: role of cyclooxygenase-2. *J Cell Sci* 2000; 113 ( Pt 12): 2149-2155
  - 23 Yamauchi J, Kawai Y, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Arizono N. Altered expression of goblet cell- and mucin glycosylation-related genes in the intestinal epithelium during infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rat. *APMIS* 2006; 114: 270-278
  - 24 Efstathiou JA, Noda M, Rowan A, Dixon C, Chinery R, Jawhari A, Hattori T, Wright NA, Bodmer WF, Pignatelli M. Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3122-3127
  - 25 Schwarzberg H, Kalbacher H, Hoffmann W. Differential behavioral effects of TFF peptides: injections of synthetic TFF3 into the rat amygdala. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 62: 173-178
  - 26 Taupin D, Pedersen J, Familiari M, Cook G, Yeomans N, Giraud AS. Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of p52 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. *Lab Invest* 2001; 81: 397-408
  - 27 Peitz U, Kouznetsova I, Wex T, Gebert I, Vieth M, Roessner A, Hoffmann W, Malfertheiner P. TFF3 expression at the esophagogastric junction is increased in gastro-esophageal reflux disease (GERD). *Peptides* 2004; 25: 771-777
  - 28 Verburg M, Renes IB, Van Nispen DJ, Ferdinandusse S, Jorritsma M, Büller HA, Einerhand AW, Dekker J. Specific responses in rat small intestinal epithelial mRNA expression and protein levels during chemotherapeutic damage and regeneration. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 1525-1536
  - 29 Hoebler C, Gaudier E, De Coppet P, Rival M, Cherbut C. MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 381-389
  - 30 Kimura Y, Leung PS, Kenny TP, Van De Water J, Nishioka M, Giraud AS, Neuberger J, Benson G, Kaul R, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Differential expression of intestinal trefoil factor in biliary epithelial cells of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2002; 36: 1227-1235
  - 31 Pera M, Heppell J, Poulson R, Teixeira FV, Williams J. Ulcer associated cell lineage glands expressing trefoil peptide genes are induced by chronic ulceration in ileal pouch mucosa. *Gut* 2001; 48: 792-796
  - 32 Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulson R, Corfield AP, Thomas MG, Wright NA. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000; 47: 792-800
  - 33 Longman RJ, Poulson R, Corfield AP, Warren BF, Wright NA, Thomas MG. Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 1335-1348
  - 34 Mashimo H, Podolsky DK, Fishman MC. Structure and expression of murine intestinal trefoil factor: high evolutionary conservation and postnatal expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 31-37
  - 35 Otto WR, Patel K. Trefoil factor family (TFF)-domain peptides in the mouse: embryonic gastrointestinal expression and wounding response. *Anat Embryol (Berl)* 1999; 199: 499-508
  - 36 Lin J, Holzman IR, Jiang P, Babyatsky MW. Expression of intestinal trefoil factor in developing rat intestine. *Biol Neonate* 1999; 76: 92-97
  - 37 Matsuda K, Yamauchi K, Matsumoto T, Sano K, Yamaoka Y, Ota H. Quantitative analysis of the effect of *Helicobacter pylori* on the expressions of SOX2, CDX2, MUC2, MUC5AC, MUC6, TFF1, TFF2, and TFF3 mRNAs in human gastric carcinoma cells. *Scand J Gastroenterol* 2007; 1-9
  - 38 Bergstrom KS, Guttman JA, Rumi M, Ma C, Bouzari S, Khan MA, Gibson DL, Vogl AW, Vallance BA. Modulation of intestinal goblet cell function during infection by an attaching and effacing bacterial pathogen. *Infect Immun* 2008; 76: 796-811
  - 39 Walker G, MacLeod K, Williams AR, Cameron DA, Smyth JF, Langdon SP. Estrogen-regulated gene expression predicts response to endocrine therapy in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 106: 461-468
  - 40 Lüdeking A, Fegert P, Blin N, Gött P. Osmotic changes and ethanol modify TFF gene expression in gastrointestinal cell lines. *FEBS Lett* 1998; 439: 180-184
  - 41 Song M, Xia B, Li J. Effects of topical treatment of sodium butyrate and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1beta, and nuclear factor kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Postgrad Med J* 2006; 82: 130-135
  - 42 Shimada T, Koike T, Yamagata M, Yoneda M, Hiraishi H. Regulation of TFF3 expression by homeodomain protein CDX2. *Regul Pept* 2007; 140: 81-87
  - 43 Tobita H, Kajino K, Inami K, Kano S, Yasen M, Imamura O, Kinoshita Y, Hino O. Gene expression profile of DNA binding protein A transgenic mice. *Int J Oncol* 2006; 29: 673-679
  - 44 Blanchard C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim MH, Blin N, Cuber JC. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol* 2004; 172: 3775-3783
  - 45 Dossinger V, Kayadmir T, Blin N, Gött P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem* 2002; 12: 197-206
  - 46 Taupin D, Podolsky DK. Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* 1999; 116: 1072-1080
  - 47 Baus-Loncar M, Schmid J, Lalani el-N, Rosewell I, Goodlad RA, Stamp GW, Blin N, Kayadmir T. Trefoil factor 2 (TFF2) deficiency in murine

- digestive tract influences the immune system. *Cell Physiol Biochem* 2005; 16: 31-42
- 48 Moro F, Levenez F, Durual S, Plaisancié P, Thim L, Giraud AS, Cuber JC. Secretion of the trefoil factor TFF3 from the isolated vascularly perfused rat colon. *Regul Pept* 2001; 101: 35-41
- 49 Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, Piétu G, Robert A, Redeuilh G, Bracke M, Gespach C, Attoub S. Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) -- and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res* 2005; 65: 195-202
- 50 Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, Jenkins B, Waring P, Clay FJ, Malki S, Alderman BM, Grail D, Hollande F, Heath JK, Ernst M. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. *Nat Med* 2002; 8: 1089-1097
- 51 LeSimple P, van Seuning I, Buisine MP, Copin MC, Hinz M, Hoffmann W, Hajj R, Brody SL, Coraux C, Puchelle E. Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 296-303
- 52 Rodrigues S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Rodrigue CM, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Emami S, Gespach C. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmyolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 4488-4497
- 53 Durual S, Blanchard C, Estienne M, Jacquier MF, Cuber JC, Perrot V, Laboisie C, Cuber JC. Expression of human TFF3 in relation to growth of HT-29 cell subpopulations: involvement of PI3-K but not STAT6. *Differentiation* 2005; 73: 36-44
- 54 Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* 1999; 103: R31-R38
- 55 Chen YH, Lu Y, De Plaen IG, Wang LY, Tan XD. Transcription factor NF-kappaB signals antianoinic function of trefoil factor 3 on intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 576-582
- 56 Emami S, Le Floch N, Bruyneel E, Thim L, May F, Westley B, Rio M, Mareel M, Gespach C. Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *FASEB J* 2001; 15: 351-361
- 57 Rodrigues S, Nguyen QD, Faivre S, Bruyneel E, Thim L, Westley B, May F, Flatau G, Mareel M, Gespach C, Emami S. Activation of cellular invasion by trefoil peptides and src is mediated by cyclooxygenase- and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways. *FASEB J* 2001; 15: 1517-1528
- 58 Kirikoshi H, Katoh M. Expression of TFF1, TFF2 and TFF3 in gastric cancer. *Int J Oncol* 2002; 21: 655-659
- 59 Leung WK, Yu J, Chan FK, To KF, Chan MW, Ebert MP, Ng EK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol* 2002; 197: 582-588
- 60 Mochizuka A, Uehara T, Nakamura T, Kobayashi Y, Ota H. Hyperplastic polyps and sessile serrated 'adenomas' of the colon and rectum display gastric pyloric differentiation. *Histochem Cell Biol* 2007; 128: 445-455
- 61 John R, El-Rouby NM, Tomasetto C, Rio MC, Karam SM. Expression of TFF3 during multistep colon carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2007; 22: 743-751
- 62 Uchino H, Kataoka H, Itoh H, Hamasuna R, Koono M. Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth in vitro and in vivo. *Gastroenterology* 2000; 118: 60-69
- 63 Foukakis T, Gusnanto A, Au AY, Höög A, Lui WO, Larsson C, Wallin G, Zedenius J. A PCR-based expression signature of malignancy in follicular thyroid tumors. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14: 381-391
- 64 Meyer zum Büschenfelde D, Hoschützky H, Tauber R, Huber O. Molecular mechanisms involved in TFF3 peptide-mediated modulation of the E-cadherin/catenin cell adhesion complex. *Peptides* 2004; 25: 873-883
- 65 Chan VY, Chan MW, Leung WK, Leung PS, Sung JJ, Chan FK. Intestinal trefoil factor promotes invasion in non-tumorigenic Rat-2 fibroblast cell. *Regul Pept* 2005; 127: 87-94
- 66 Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 799-804
- 67 Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Gespach C, Emami S. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J* 2003; 17: 7-16
- 68 Yamachika T, Werther JL, Bodian C, Babyatsky M, Tatematsu M, Yamamura Y, Chen A, Itzkowitz S. Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1092-1099
- 69 Muenphon K, Limpai boon T, Jearanaikoon P, Pairojkul C, Sripan B, Bhudhisawasdi V. Amplification of chromosome 21q22.3 harboring trefoil factor family genes in liver fluke related cholangiocarcinoma is associated with poor prognosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4143-4148
- 70 Khoury T, Chadha K, Javle M, Donohue K, Levea C, Iyer R, Okada H, Nagase H, Tan D. Expression of intestinal trefoil factor (TFF-3) in hepatocellular carcinoma. *Int J Gastrointest Cancer* 2005; 35: 171-177
- 71 Vestergaard EM, Borre M, Poulsen SS, Nexø E, Tørring N. Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 807-812

编辑 李军亮 电编 何基才

## P53-MDM2负反馈在幽门螺杆菌致病中的作用

杨 桢, 吕农华

### ■背景资料

幽门螺杆菌(*H pylori*)在人群中感染率极高, 现已证实*H pylori*与慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤和胃癌的发病密切相关。*H pylori*感染已对人类健康构成了严重的危害, 但其确切的致病、致癌机制尚不清楚。

杨桢, 吕农华, 南昌大学第一附属医院消化内科; 南昌大学消化系病研究所 江西省南昌市 330006  
国家自然科学基金资助课题, No. 30660067  
作者贡献分布: 本论文写作由杨桢完成; 吕农华审校。  
通讯作者: 吕农华, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科, lunonghua@163.com  
电话: 0791-8692705 传真: 0791-8623153  
收稿日期: 2008-04-20 修回日期: 2008-05-22  
接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-07-18

### Role of P53-MDM2 negative-feedback in the pathopoiesis of *Helicobacter pylori*

Zhen Yang, Nong-Hua Lv

Zhen Yang, Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University; Gastroenterology Institute of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30660067  
Correspondence to: Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, 17 Yongwaiheng Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. lunonghua@163.com  
Received: 2008-04-20 Revised: 2008-05-22  
Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-18

### Abstract

Murine double minute-2 (*mdm2*), one of downstream genes of P53, forms a negative feedback loop with P53 to maintain P53 at a low level under normal circumstances. On one hand, P53 activates transcription of *mdm2*. On the other hand, MDM2 suppresses activity of P53. The negative feedback, which plays an important role in tumor development, is regulated by a variety of factors. At present, *Helicobacter pylori* (*H pylori*) is considered as a key gastrointestinal disease pathogenic factor. Its pathogenic or carcinogenic mechanism has become a hot research issue in recent years, and there have been substantial research on the role of *p53* gene networks in *H pylori* pathogenic process. And the P53-MDM2 negative feedback may play an important role in this process.

Key Words: P53-MDM2 negative feedback; *Helicobacter pylori*; Pathogenic mechanism

Yang Z, Lv NH. Role of P53-MDM2 negative-feedback in the pathopoiesis of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2274-2279

### 摘要

鼠双微体-2基因(Murine double minute-2, *mdm2*)是P53的下游调节基因之一, P53启动*mdm2*转录, MDM2反过来又抑制P53活性, 二者形成一个负反馈环, 以保持正常情况下P53处于低水平状态。该负反馈受多种因素调节, 在肿瘤发生、发展中有重要作用。目前幽门螺杆菌(*H pylori*)被认为是许多胃肠疾病致病的关键因素, 其致病、致癌机制也成为近年研究的热点, 其中大量的研究探讨了*p53*基因网络在*H pylori*致病中的作用。而P53-MDM2负反馈调控机制可能在*H pylori*致病、致癌过程中发挥重要作用。

关键词: P53-MDM2负反馈; 幽门螺杆菌; 致病机制

杨桢, 吕农华. P53-MDM2负反馈在幽门螺杆菌致病中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2274-2279  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2274.asp>

### 0 引言

*p53*基因是一种重要的抑癌基因, 其通过活化或抑制大量下游基因发挥细胞周期阻滞、促凋亡和DNA修复的作用。而其下游基因之一的鼠双微体-2基因(murine double minute-2, *mdm2*)却是一种癌基因。一方面P53活化启动*mdm2*转录, MDM2反过来又抑制P53活性, 二者形成一个负反馈环<sup>[1]</sup>, 以保持正常情况下P53处于低水平状态。该负反馈受多种因素调节, 在细胞增殖与凋亡调控, 肿瘤发生、发展中发挥重要作用。幽门螺杆菌(*H pylori*)-国际癌症研究机构认定的I类致癌因子<sup>[2]</sup>, 在慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤和胃癌中的致病作用已不容置疑, 在可归于各种感染导致的癌症中, 由*H pylori*致癌者数量最多<sup>[3]</sup>, 其致病、致癌机制也成为近年研究的热点, 其中大量的研究探讨了*p53*基因网络在*H pylori*致病中的作用。本文拟

### ■同行评议者

白爱平, 副教授,  
南昌大学第一附  
属医院消化病研  
究所

就P53-MDM2负反馈及其在*H pylori*相关疾病中的作用的研究进展作一综述。

## 1 P53和MDM2

P53蛋白在1979年被首次报道<sup>[4-5]</sup>, 其基因位于人类染色体17q13.1, 含有11个外显子. 其编码的野生型P53蛋白由393个氨基酸残基组成, 内含多个功能域, 分别发挥转录启动、信息传递、核定位的作用<sup>[6-7]</sup>. P53蛋白寡聚化为其活性所必需, 并参与P53在细胞内的定位过程. 此外, P53还通过内含的DNA结合位点与DNA形成复合物, 发挥其DNA保护功能. 同时P53还含有多个蛋白质结合位点, 其中F19、W23和L26是与MDM2相互作用所必需的. P53的细胞内活性是介导DNA损伤后的细胞应激反应, 避免受损DNA的堆积, 保持遗传的稳定性, 这主要表现在对细胞周期的阻滞、促进细胞凋亡和DNA修复<sup>[8-9]</sup>. 此外, P53还参与细胞分化、衰老的调节, 以及抑制血管生成, 这些功能的完成均依赖于P53与DNA相互作用. 在DNA受损后, P53蛋白水平升高, 发挥转录活性因子的功能, 启动其下游靶基因的表达, 同时减少另一些基因转录. 常见的靶基因有: *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>*、*puma*、*bax*、*mdm2*、*c-myc*、*killer/dr5*、*fas/apo1*、*noxa*、*ei24/pig8*等<sup>[10-13]</sup>. 其次, P53还通过其脯氨酸控制区作为直接信号而具有非转录依赖性活性<sup>[14]</sup>.

*mdm2*基因是1991年由Fakharzadeh *et al*<sup>[15]</sup>首次从3T3DM细胞中分离出来的一种癌基因. Oliner *et al*<sup>[16]</sup>对人*mdm2*基因克隆并定位于12q13-14上, 其表达的调节相当复杂, 且有不同的mRNA剪切形式. 目前至少已发现7种不同的*mdm2* mRNA和5种MDM2蛋白P90, P85, P76, P74, P57<sup>[17]</sup>, 但仅有P90可促进P53水解<sup>[18]</sup>. *mdm2*内含两个启动子P1和P2. 在P53绝对缺乏的条件下, P1保持基本的必需水平的启动, 此时P2静止. 只有在P53表达启动的细胞中P2才被强烈开放, P2被野生型P53触发后, 可导致新的*mdm2*转录物产生, 更有效的指导全长MDM2蛋白的合成<sup>[19]</sup>. 同时人MDM2蛋白序列具有I-IV区4个保守区<sup>[20]</sup>, 可以分别与P53、核糖体L5蛋白及5SrRNA结合, 或介导蛋白质-蛋白质相互作用, 也能与DNA或RNA作用. MDM2体内最重要的作用是抑制野生型P53的启动转录功能和抗肿瘤活性. MDM2通过结合并抑制P53功能发挥致癌作用包括两种形式: 即介导P53降解和抑制P53转录活性. 但还存在着非P53依赖的作用机制: MDM2通过抑制Rb活性直接发挥抑制抑癌基因的作用, 还可与Rb相

关的E2F1蛋白以及E2F1相关的DP1蛋白结合, 加快细胞的分裂与增殖<sup>[21]</sup>. 此外, MDM2本身具有DNA结合能力, 可直接作用于靶DNA, 促进DNA的合成和细胞的生长, 以拮抗P53的效应, 即具有不依赖于P53而促进肿瘤生长的作用<sup>[22]</sup>, 推测此作用可能和与核糖体L5蛋白及5SrRNA结合有关<sup>[23]</sup>.

## 2 P53-MDM2负反馈

细胞中野生型P53浓度取决于其降解的速度而不是生成的速度. MDM2是细胞内调节P53浓度及活性的重要蛋白质. 在正常细胞中, P53启动可使MDM2增加, MDM2反过来抑制P53的活性, 接着又引起MDM2下调. P53和MDM2因此形成了一个自动调节回馈环, 该回馈环使细胞内的P53/MDM2比率保持恒定且保持在低水平, 以保证细胞正常生长<sup>[24]</sup>. 鼠胚胎期*mdm2*基因敲除实验亦证实保持P53-MDM2回馈环的恒定在细胞和胚胎发育过程中极其重要<sup>[25]</sup>. 而在各种损伤因素刺激下, P53蛋白急剧增加, 并表现出转录启动特性, 诱导*mdm2*的转录和表达. MDM2表达过强则可封闭P53介导的反式启动作用, 使P53功能丧失, 导致基因的不稳定及细胞增生, 表现出癌基因蛋白的作用, 参与肿瘤形成<sup>[26-27]</sup>. 在P53-MDM2负反馈中MDM2以两种形式实现对P53功能的调节, 即介导P53降解和抑制转录活性.

### 2.1 MDM2介导P53穿过核膜进入胞质降解

P53蛋白是一种动态的分子, 正确的亚细胞定位对于P53的活性十分重要, 在核与胞质的分布状态是决定其稳定性的关键因素<sup>[28]</sup>. 研究表明, P53只有在核内发挥作用. 人类MDM2含有的核输出序列(NES), 可以介导MDM2或一个融入该序列的异源性运输因子从细胞核进入胞质. P53可被MDM2俘获, 并在MDM2介导下穿过核膜进入胞质. 同时刺激多个特异性的泛素分子标记在P53的C-末端上, 从而使P53能被胞质中的蛋白水解酶识别并降解. 有研究认为<sup>[29]</sup>, MDM2需与CBP/p300转录共同启动因子/组蛋白甲基化酶结合方能介导P53降解. 另有报道认为, P53输出不依赖MDM2, 而依靠自身构象改变暴露其分子内的NES来完成.

### 2.2 MDM2对P53转录活性的直接抑制作用

*mdm2*是P53的转录靶基因, 可在野生型P53的诱导下转录增强, 而MDM2又通过多种分子机制抑制P53活性. MDM2的N端由疏水和芳香氨基酸形成深沟, 直接与P53蛋白N端形成的双歧 $\alpha$ -

## ■ 研发前沿

*H pylori*相关性疾病普遍存在细胞增殖和凋亡的失衡. 而在细胞凋亡的调控中, *p53*发挥了重要作用. 这是当前研究的一个热点.

### ■相关报道

目前大量研究证实, *H pylori* 感染能影响胃上皮细胞P53的表达, 提示*H pylori*可能通过调节P53的表达及功能, 影响胃上皮细胞的生物学功能。

螺旋结合, 由于阻断了P53的转录控制区而抑制P53的转录活性, 同时MDM2与转录因子TFIID中由P53形成的部分结合, 从而抑制了P53转录启动其靶基因的能力。

**2.3 P53-MDM2负反馈的调节** 目前认为至少有两途径可以调节P53-MDM2的相互作用, 一为其他生物分子调节两者的结合, 一为蛋白质共价修饰。

在正常细胞中, 除了MDM2, JNK也介导对P53的连接反应和降解<sup>[30]</sup>。JNK可以独立于MDM2和P53的结合, 而直接与P53结合。当DNA受损后, JNK启动, 则在正常细胞中由JNK介导的对P53的泛素连接和分解反应消失。同时磷酸化P53 Ser37位点, 导致P53和MDM2相互作用的下降; 同时, 当DNA受损后, 由DNA链的断裂所启动的蛋白激酶(DNA-PK), 可直接磷酸化MDM2的丝氨酸Ser17位点, 导致MDM2与P53相互结合的能力下降; 另一个下调MDM2介导P53降解的蛋白是酪氨酸激酶c-Abl, 但其具体机制不清, 可能涉及到对MDM2介导的P53核外移的阻滞或直接干扰P53的降解过程<sup>[31]</sup>; 此外, MDM2与P53结合而发挥连接酶作用也可被肿瘤抑制因子P19<sup>APF</sup>/P14<sup>APF</sup>的表达所消除<sup>[32]</sup>, P14<sup>APF</sup>是P19<sup>APF</sup>在人类的同源基因, 可与MDM2相互作用从而干扰MDM2作为P53泛素连接酶的能力。

另一个重要的打断P53-MDM2反馈环的机制是P53与MDM2结合区域的修饰<sup>[33]</sup>, 离子放射和UV照射等引起DNA损伤的因素, 会引起P53丝氨酸多个位点的磷酸化, 这些修饰会导致P53-MDM2相互作用的消失而引起P53蛋白的稳定和活性升高。在DNA受损后, P53水平升高、活性增加, 显然P53-MDM2负反馈被打破。因为不同的细胞系在受损后具有大致相同水平的P53蛋白, MDM2降解P53和在核内与P53结合阻止其转录活性的能力似乎完全消失, 说明MDM2-P53反馈环在DNA受损后会改变而使P53对DNA损伤有合适的反应<sup>[34]</sup>。这可能由于P53蛋白的自身改变, MDM2不能再与他结合, 或者包括在泛素连接和降解P53过程中的MDM2或其他蛋白的改变以至于其不能再与P53相互作用。证据表明这两方面在细胞受损后的P53累积都发挥作用<sup>[35]</sup>。

### 3 P53-MDM2负反馈在*H pylori*致病中的作用

#### 3.1 P53在*H pylori*相关疾病中的表达 野生型*p53*

作为抑癌基因, 在DNA损伤时发挥细胞周期阻滞、促进细胞凋亡和DNA修复的作用, 而突变后的*p53*不仅失去了抑癌基因的功能, 而且可能获得原癌基因的特性<sup>[36]</sup>。由于野生型*p53*基因蛋白半衰期极短, 易水解, 难以检测。而突变型*p53*基因蛋白半衰期较长, 不易水解, 免疫组化技术检测出的P53即为突变型P53蛋白<sup>[37]</sup>, 可直接反映*p53*基因突变情况。现已证实*H pylori*与慢性胃炎<sup>[38-39]</sup>、消化性溃疡<sup>[40-41]</sup>、胃黏膜相关淋巴瘤<sup>[42]</sup>和胃癌的致病密切相关, 其中*H pylori*与胃溃疡、胃癌发病的关系最引人注目, 大量研究也探讨了P53在这些疾病中的表达情况。

研究发现, 胃溃疡患者有很高的*H pylori*感染率<sup>[43-44]</sup>, 而胃溃疡组织P53蛋白不表达或表达率极低, 与正常胃黏膜或慢性浅表性胃炎无明显差异<sup>[45]</sup>。Teh *et al*<sup>[46]</sup>报道, 在这些非肿瘤上皮中可观察到野生型P53蛋白的积聚, 提示在胃溃疡中*p53*基因未突变, 主要由野生型P53蛋白发挥作用。

Correa提出的肠型胃癌发生、发展模式: “慢性浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→不典型增生→胃癌”已得到公认。大量研究证实, 从慢性浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→不典型增生→胃癌*H pylori*感染率逐步升高<sup>[47-48]</sup>, P53蛋白表达率亦逐步升高<sup>[47-49]</sup>, 胃癌及其癌前病变的*H pylori*感染阳性组的P53蛋白表达率较阴性组明显升高<sup>[47-50]</sup>, 而P53表达率在根除*H pylori*治疗后显著下降<sup>[51]</sup>。说明*H pylori*感染与这一模式进展有着密切的关系; *p53*基因突变在其中可能发挥重要作用, 是胃癌发病过程的早期事件。也有报道P53的过度表达为胃癌发生的晚期事件, 且主要与胃癌的进展有关, 而与*H pylori*感染似乎没有关系<sup>[52]</sup>。

**3.2 MDM2在*H pylori*相关疾病中的表达** *mdm2*作为一种癌基因, 在许多人类肿瘤中高度扩增和/或过表达<sup>[53]</sup>。有研究发现<sup>[54]</sup>, 胃癌组织中*mdm2* mRNA表达明显高于正常胃组织。另有研究发现<sup>[55-56]</sup>, 胃癌组织较正常胃黏膜、癌前病变或癌旁组织MDM2阳性表达率明显升高, 并与P53表达呈显著相关性<sup>[55]</sup>。在根除*H pylori*治疗后MDM2表达率亦显著下降<sup>[51]</sup>, 说明*mdm2*作为*p53*基因下游基因, 可能通过间接或直接的方式在胃癌的发生、发展中起着重要的作用。还有学者认为*mdm2*与胃癌的发生、发展无关<sup>[57]</sup>。

此外, 可能由于*mdm2*基因发现较晚, 国内外关于该基因与慢性胃炎、消化性溃疡等

*H pylori*相关疾病的研究较少, 关于这方面的研究仍有待进一步深入.

3.3 P53-MDM2负反馈在*H pylori*致病中的作用在正常胃黏膜中, 上皮细胞增殖和凋亡保持动态平衡, 从而维持胃黏膜的完整性. 研究发现*H pylori*感染能打破这一平衡<sup>[58]</sup>, 而在不同胃黏膜病变阶段, *H pylori*既可促进细胞凋亡, 也可促进细胞增殖<sup>[59]</sup>. 目前认为, 萎缩性胃炎、消化性溃疡的发病过程中可能存在细胞凋亡的增加, 而不伴有相应的增殖加速; 在胃癌的发生过程中, 则可能出现细胞增殖的加速, 而不伴有平行的凋亡的增加<sup>[60]</sup>. *p53*基因所编码的P53蛋白有野生型、突变型之分. 野生型有抑癌作用; 突变型功能则完全相反, 有促癌作用. 因此, *p53*基因会因其类型不同产生不同的作用. 在*H pylori*感染后, *p53*基因也可能因其类型不同而导致不同疾病的发生. P53-MDM2负反馈是体内调节P53水平的重要途径之一, 可能在不同疾病的发生、发展过程中发挥不同的作用.

目前较为人们所接受的一种理论是: 急性*H pylori*感染后, 引起细胞内应激、DNA损伤可能导致野生型P53表达上调、活性增强, 通过调节下游基因, 引起细胞周期的阻滞, 对损伤DNA进行修复, 如修复失败则促进细胞凋亡, 从而导致消化性溃疡. 我们前期研究, 也观察到胃溃疡凋亡指数明显升高<sup>[43]</sup>. 同时, 体外实验也证实, 急性*H pylori*感染使*p53* mRNA上调, 诱导细胞凋亡, 细胞对急性感染的反应首先是启动凋亡性自杀机制<sup>[61-62]</sup>.

如果为慢性*H pylori*感染, 可导致胃黏膜一氧化氮合成酶增多、氧自由基释放, 进而引起DNA损伤, *p53*基因突变<sup>[63-64]</sup>. 随着*p53*基因突变量和表达量的积累以及其他致癌因素的共同作用, 细胞可以无限生长, 细胞凋亡减少或不凋亡<sup>[65]</sup>, 最终导致胃癌发生. 同时, 在肿瘤细胞中, 由于MDM2的过度表达, 即使不存在*p53*的点突变, 但由于野生型P53蛋白过多的被灭活, 就会产生类似基因突变失活的结局, 使细胞失去正常的负性调节, 更易发生转化和恶变<sup>[66]</sup>, 这也解释了相当一部分保持野生型*p53*基因肿瘤细胞的癌变机制<sup>[67-70]</sup>.

#### 4 结论

在正常细胞, 低水平无活性P53由MDM2维持, 在核内阻止P53转录活性和转运P53至胞质由胞质蛋白酶所降解, 这是目前P53-MDM2负反

馈中被描述最完整的部分. 虽然很多研究致力于了解在DNA损伤后MDM2活性受抑使P53水平增加和活性增高的机制, 但目前, 几乎不知道对MDM2蛋白稳定性的调节或*mdm2*基因转录的机制. 同时在DNA修复后, P53-MDM2负反馈如何重新建立亦了解甚少, 而且MDM2和P53的相互作用也仅仅是复杂的P53作用中的一部分, MDM2非P53依赖性的致癌作用的靶点究竟是什么? 哪些激酶是真正调节MDM2和P53相互作用的? 是否还有其他的生物大分子能直接干扰MDM2和P53的相互作用? 这些问题都有待于进一步研究.

*H pylori*在慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴瘤和胃癌中的致病作用已不容置疑, 但*H pylori*的致病、致癌机制, 目前仍不清楚. 虽然*p53*基因变化在*H pylori*致病致癌中的作用已受到人们的关注, 但现有的*H pylori*感染与*p53*关系的研究, 多局限在*p53*基因和蛋白表达异常这一阶段. *p53*基因网络在调控细胞凋亡过程中发挥重要的作用, 而P53-MDM2负反馈又是调节P53功能的重要途径, P53-MDM2负反馈在*H pylori*相关性疾病发生、发展过程中的具体作用及其机制仍不清楚. 因此, 深入研究在*H pylori*感染过程中*p53*基因网络, 尤其是P53-MDM2负反馈调控机制的变化及作用, 对探讨*H pylori*感染引起细胞增殖与凋亡的异常, 从而导致疾病发生的机制有着重要的意义, 也为*H pylori*感染相关性疾病预防策略的制定, 进一步开发基于P53-MDM2负反馈的治疗*H pylori*感染相关性药物提供新的理论和实验依据.

#### 5 参考文献

- 1 Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* 2002; 23: 541-547
- 2 Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1-241
- 3 Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118: 3030-3044
- 4 Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263
- 5 Linzer DJ, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17: 43-52
- 6 Chao C, Saito S, Anderson CW, Appella E, Xu Y. Phosphorylation of murine p53 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11936-11941
- 7 Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E,

#### ■创新盘点

P53-MDM2负反馈是体内调节P53的重要途径之一, 推测*H pylori*感染可能对该负反馈产生不同影响, 从而导致不同疾病的发生, 但其具体作用及机制仍不清楚.

## ■应用要点

- 如能深入研究 *H pylori* 感染过程中 p53 基因网络, 尤其是 P53-MDM2 负反馈调控机制的变化及作用, 对探讨 *H pylori* 感染引起细胞增殖与凋亡的异常, 从而导致疾病发生的机制有着重要的意义, 也为 *H pylori* 感染相关性疾病预防策略的制定, 进一步开发基于 P53-MDM2 负反馈的治疗 *H pylori* 感染相关性疾病的药物提供理论和实验依据.
- Bracco L, Debussche L. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J* 1998; 17: 4668-4679
- 8 Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; 187: 112-126
- 9 Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ Jr. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 1999; 18: 2892-2900
- 10 Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288: 1053-1058
- 11 Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-694
- 12 Gu Z, Flemington C, Chittenden T, Zambetti GP. ei24, a p53 response gene involved in growth suppression and apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 233-241
- 13 Baudino TA, Cleveland JL. The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 691-702
- 14 Rambhatla L, Bohn SA, Stadler PB, Boyd JT, Coss RA, Sherley JL. Cellular Senescence: Ex Vivo p53-Dependent Asymmetric Cell Kinetics. *J Biomed Biotechnol* 2001; 1: 28-37
- 15 Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 1991; 10: 1565-1569
- 16 Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-83
- 17 Bueso-Ramos CE, Manshoury T, Haidar MA, Huh YO, Keating MJ, Albitar M. Multiple patterns of MDM-2 deregulation in human leukemias: implications in leukemogenesis and prognosis. *Leuk Lymphoma* 1995; 17: 13-18
- 18 Cheng TH, Cohen SN. Human MDM2 isoforms translated differentially on constitutive versus p53-regulated transcripts have distinct functions in the p53/MDM2 and TSG101/MDM2 feedback control loops. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 111-119
- 19 Mendrysa SM, Perry ME. The p53 tumor suppressor protein does not regulate expression of its own inhibitor, MDM2, except under conditions of stress. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2023-2030
- 20 Piette J, Neel H, Maréchal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997; 15: 1001-1010
- 21 Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 1995; 375: 694-698
- 22 Peng Y, Chen L, Li C, Lu W, Agrawal S, Chen J. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by mutant p53. *J Biol Chem* 2001; 276: 6874-6878
- 23 Camus S, Higgins M, Lane DP, Lain S. Differences in the ubiquitination of p53 by Mdm2 and the HPV protein E6. *FEBS Lett* 2003; 536: 220-224
- 24 Zhou BP, Hung MC. Novel targets of Akt, p21(Cipl/WAF1), and MDM2. *Semin Oncol* 2002; 29: 62-70
- 25 Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 1995; 378: 206-208
- 26 Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, Ronai Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 2000; 101: 753-762
- 27 Lev Bar-Or R, Maya R, Segel LA, Alon U, Levine AJ, Oren M. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11250-11255
- 28 Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 973-982
- 29 Grossman SR, Perez M, Kung AL, Joseph M, Mansur C, Xiao ZX, Kumar S, Howley PM, Livingston DM. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* 1998; 2: 405-415
- 30 Xue Y, Ramaswamy NT, Hong X, Pelling JC. Association of JNK1 with p21waf1 and p53: modulation of JNK1 activity. *Mol Carcinog* 2003; 36: 38-44
- 31 Goldberg Z, Vogt Sionov R, Berger M, Zwang Y, Perets R, Van Etten RA, Oren M, Taya Y, Haupt Y. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J* 2002; 21: 3715-3727
- 32 Clark PA, Llanos S, Peters G. Multiple interacting domains contribute to p14ARF mediated inhibition of MDM2. *Oncogene* 2002; 21: 4498-4507
- 33 Bean LJ, Stark GR. Regulation of the accumulation and function of p53 by phosphorylation of two residues within the domain that binds to Mdm2. *J Biol Chem* 2002; 277: 1864-1871
- 34 Blattner C, Hay T, Meek DW, Lane DP. Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6170-6182
- 35 Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 49-58
- 36 Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; 60: 6788-6793
- 37 Levi E, Stryker SJ, Rao MS. p53 Protein overexpression in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis: is it an early or late event? *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 11-14
- 38 Fujioka T, Kubota T, Shuto R, Kodama R, Murakami K, Perparim K, Nasu M. Establishment of an animal model for chronic gastritis with *Helicobacter pylori*: potential model for long-term observations. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6 Suppl 1: S73-S78
- 39 Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Peña AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HP, Meuwissen SG. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 1995; 345: 1525-1528
- 40 Schubert TT, Bologna SD, Nensey Y, Schubert AB, Mascha EJ, Ma CK. Ulcer risk factors: interactions between *Helicobacter pylori* infection, nonsteroidal use, and age. *Am J Med* 1993; 94: 413-418
- 41 Maaroos HI, Kekki M, Vorobjova T, Salupere V, Sipponen P. Risk of recurrence of gastric ulcer, chronic gastritis, and grade of *Helicobacter pylori* colonization. A long-term follow-up study of 25 patients. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 532-536
- 42 Wotherspoon AC, Dogliani C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. Regression

- of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993; 342: 575-577
- 43 汤建华, 吕农华, 晏楠, 谢勇, 陈江, 徐萍, 王崇文. HP和细胞凋亡在胃粘膜病变中作用关系的研究. *江西医学院学报* 2000; 40: 5-7
- 44 Zhang C, Yamada N, Wu YL, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. Comparison of *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal histological features of gastric ulcer patients with chronic gastritis patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 976-981
- 45 迟青, 滕红, 尹鲁皖, 马明立. p73、p53蛋白在胃癌中的表达及相关性研究. *实用全科医学* 2007; 5: 317-318
- 46 Teh M, Tan KB, Seet BL, Yeoh KG. Study of p53 immunostaining in the gastric epithelium of cagA-positive and cagA-negative *Helicobacter pylori* gastritis. *Cancer* 2002; 95: 499-505
- 47 崔轶霞, 王海军, 惠起源. 胃癌高危人群胃粘膜组织中突变型P53蛋白、Runx3蛋白的表达及HP感染的研究. *陕西医学杂志* 2008; 37: 291-293
- 48 郭晓林, 姜雅秋, 王丹. 幽门螺杆菌感染与C-myc基因和P53基因表达与胃癌的相关性研究. *中国老年学杂志* 2007; 27: 56-58
- 49 赵松, 付英梅, 赵柏, 刘连新. 慢性萎缩性胃炎黏膜上皮中P53和C-erbB-2表达的临床意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2943-2947
- 50 Li JH, Shi XZ, Lv S, Liu M, Xu GW. Effect of *Helicobacter pylori* infection on p53 expression of gastric mucosa and adenocarcinoma with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4363-4366
- 51 Kodama M, Fujioka T, Murakami K, Okimoto T, Sato R, Watanabe K, Nasu M. Eradication of *Helicobacter pylori* reduced the immunohistochemical detection of p53 and MDM2 in gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 941-946
- 52 郜恒骏, 白剑峰, 彭延申, 孙谷, 赵翰林, 缪锟, 吕秀珍, 赵志泉, 萧树东. 幽门螺杆菌感染胃黏膜病变基因表达和细胞生物学行为. *中华消化杂志* 2001; 21: 18-20
- 53 Schon O, Friedler A, Bycroft M, Freund SM, Fersht AR. Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol* 2002; 323: 491-501
- 54 孙利平, 姜乃佳, 付伟, 薛一雪, 赵逸松. mdm2、p14基因的扩增与胃癌的关系. *癌症* 2004; 23: 36-39
- 55 孙迎娟, 时飞, 孙坚萍, 黄葆华, 罗兵. 胃癌组织中p53基因突变及p53和mdm2蛋白表达的研究. *肿瘤防治杂志* 2005; 12: 974-978
- 56 杨海霞, 米建强, 徐继业, 钱婀娜. 胃癌组织中mdm2和Rb基因表达及临床意义. *第四军医大学学报* 2007; 28: 2122-2125
- 57 Blok P, Craanen ME, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat GN. No evidence for functional inactivation of wild-type p53 protein by MDM2 overexpression in gastric carcinogenesis. *J Pathol* 1998; 186: 36-40
- 58 Correa P. *Helicobacter pylori* and the cell cycle. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 836-837
- 59 Zhang Z, Yuan Y, Gao H, Dong M, Wang L, Gong YH. Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of *H. pylori* associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 779-782
- 60 韩静, 文嘉陵. 幽门螺杆菌致胃上皮细胞凋亡和增殖研究. *医学综述* 2004; 10: 762-765
- 61 李淑萍, 严杰. 幽门螺杆菌对AGS细胞p53、p21WAF1/CIP1和p27KIP1基因转录的影响. *中华微生物学和免疫学杂志* 2005; 25: 141
- 62 姜海行, 聂海明, 邓德海, 覃山羽, 陶霖, 黄振宁. 幽门螺杆菌体外诱导大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2838-2841
- 63 Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996; 38: 498-501
- 64 Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3030-3034
- 65 Marx J. How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993; 262: 1644-1645
- 66 陈芝丹, 杨玉珍, 宋娟. Cyclin G1、Mdm2和P53在胃癌组织中的表达及相关性研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2007; 16: 127-129
- 67 Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387: 296-299
- 68 Liang H, Atkins H, Abdel-Fattah R, Jones SN, Lunec J. Genomic organisation of the human MDM2 oncogene and relationship to its alternatively spliced mRNAs. *Gene* 2004; 338: 217-223
- 69 Sengupta S, Wasyluk B. Physiological and pathological consequences of the interactions of the p53 tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1024: 54-71
- 70 Xie HL, Su Q, He XS, Liang XQ, Zhou JG, Song Y, Li YQ. Expression of p21(WAF1) and p53 and polymorphism of p21(WAF1) gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1125-1131

#### ■同行评价

本文选题准确, 引用文献合理, 结论可靠, 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 2008-07-18)

## 胆囊收缩素对胆固醇结石豚鼠离体胆囊肌条的影响

肖勇, 余保平, 吴志轩, 余志

### ■背景资料

胆囊结石是消化系统的常见病, 而胆固醇结石在其中占较大比例。胆囊动力减弱是胆石发生发展过程中的重要病理生理学特点。

肖勇, 余保平, 吴志轩, 余志, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2006AA412c  
作者贡献分布: 肖勇与余保平对此文所作贡献均等; 此课题由肖勇, 余保平, 吴志轩及余志共同设计; 研究过程中技术指导余保平, 操作由肖勇, 吴志轩及余志完成; 数据分析由肖勇, 吴志轩及余志完成; 本论文写作由肖勇完成。  
通讯作者: 余保平, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科, yubp62@163.com  
收稿日期: 2008-04-02 修回日期: 2008-05-01  
接受日期: 2008-05-12 在线出版日期: 2008-07-18

### Effects of cholecystokinin on gallbladder muscle stripes of guinea pigs with cholesterol gallstone *in vitro*

Yong Xiao, Bao-Ping Yu, Zhi-Xuan Wu, Zhi Yu

Yong Xiao, Bao-Ping Yu, Zhi-Xuan Wu, Zhi Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Supported by: the Natural Science Foundation of Hubei province, No. 2006AA412c  
Correspondence to: Bao-Ping Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yubp62@163.com  
Received: 2008-04-02 Revised: 2008-05-01  
Accepted: 2008-05-12 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To establish an animal model of cholesterol stone and to explore the effects of cholecystokinin (CCK) on gallbladder muscle stripes of guinea pigs with cholesterol stone *in vitro* as well as to investigate the role of biliary kinetics in cholesterol stone formation.

**METHODS:** The animal model of cholesterol stone was established by feeding guinea pig with stone-leading forage. The guinea pigs were assigned to four groups: group A (the normal guinea pigs), group B (stone-leading forage for 4 wk), group C (stone-leading forage for 8 wk), and group D (the normal guinea pigs with injury of interstitial cell of cajal (ICC)). Effects of  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-7}$  mol/L cholecystokinin (CCK) on gallbladder muscle stripes of guinea pigs *in vitro* among the four groups were recorded and analyzed.

### ■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院 消化内科

**RESULTS:** No cholesterol stone was observed in group A, and a total of 13 cases of cholesterol stone were observed in group B and C. The amplitude of contraction showed a dose-independent relationship with CCK-8 in groups A, B and C. Compared with group A, there was statistically significant difference in group B and group C ( $P < 0.05$ ). The contraction of smooth muscle was nearly abolished when interstitial cells of Cajal were destroyed using methylene blue incubation and intensive illumination. Although CCK was administered, there was no significant difference in the amplitude of the contraction of smooth muscle strip in group D ( $10^{-9}$  mol/L:  $0.461 \pm 0.071$  vs  $1.461 \pm 0.252$ ;  $10^{-8}$  mol/L:  $0.608 \pm 0.118$  vs  $2.484 \pm 0.283$ ;  $10^{-7}$  mol/L:  $0.641 \pm 0.129$  vs  $3.312 \pm 0.311$ , all  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Muscular tension is significantly inhibited following injury of interstitial cells of Cajal. The damage of interstitial cells of Cajal may be an important factor related to cholelithiasis.

**Key Words:** Cholesterol calculus; Cholecystokinin; Interstitial cell of cajal

Xiao Y, Yu BP, Wu ZX, Yu Z. Effects of cholecystokinin on gallbladder muscle stripes of guinea pigs with cholesterol gallstone *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2280-2284

### 摘要

**目的:** 建立胆固醇结石实验动物模型, 探讨胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)对胆固醇结石豚鼠离体胆囊肌条收缩的影响, 并研究胆道动力因素在胆固醇结石形成中的作用。

**方法:** 喂养致石饲料构建豚鼠胆固醇结石模型。采用灌流法加药, 利用张力换能器记录豚鼠离体胆囊肌条张力的变化, 观察 $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$  mol/L的CCK-8对正常豚鼠离体胆囊肌条(A组)、喂养致石饲料4 wk(B组)、8 wk(C组)豚鼠离体胆囊肌条及正常豚鼠损伤Cajal间质细胞(interstitial cell of cajal, ICC)后离体胆囊肌条(D组)的影响。

**结果:** A组无结石发生, B组及C组共有13例结石发生; A组、B组及C组加入CCK后收缩振幅均增加, 呈浓度依赖性; B、C两组振幅加入CCK后的效应值同A组相比变小, 起作用时间慢( $P<0.05$ ); 损伤胆囊ICC后, 收缩幅度增加不明显, 与CCK浓度无显著差异, 而与A组相比效应值有显著性差异( $10^{-9}$  mol/L:  $0.461\pm 0.071$  vs  $1.461\pm 0.252$ ;  $10^{-8}$  mol/L:  $0.608\pm 0.118$  vs  $2.484\pm 0.283$ ;  $10^{-7}$  mol/L:  $0.641\pm 0.129$  vs  $3.312\pm 0.311$ , 均 $P<0.01$ ).

**结论:** 离体胆囊肌条肌张力降低及对CCK的效应性降低在胆囊结石病的发生发展中有重要作用; 而损伤ICC后, 胆囊离体肌条对CCK的效应性明显降低, ICC可能在胆囊结石等胆囊动力性疾病中发生作用。

**关键词:** 胆固醇结石; 胆囊收缩素; Cajal间质细胞

肖勇, 余保平, 吴志轩, 余志. 胆囊收缩素对胆固醇结石豚鼠离体胆囊肌条的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2280-2284

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2280.asp>

## 0 引言

胆囊动力障碍在胆石症等疾病中有着重要的作用<sup>[1]</sup>, 贯穿胆囊结石形成的全过程. 现已证实, Cajal间质细胞(interstitial cell of Cajal, ICC)在胆囊中存在<sup>[2-3]</sup>, 但是关于ICC及胆囊动力障碍与胆囊动力疾病间的作用机制尚不清楚. 本研究通过构造胆固醇结石模型, 观察胆固醇结石豚鼠胆囊平滑肌肌条及去ICC胆囊平滑肌肌条对胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)的反应, 并初步探讨其在胆石症的发生发展中的作用. 现报告如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年豚鼠40只, 体质量250-350 g, ♂, 由武汉大学人民医院动物中心提供. 实验用胆固醇购自武汉亚法生物技术有限公司, 鱼肝油及白糖购自武汉老百姓大药房. 8肽胆囊收缩素购自Sigma(Fisher Scientific)公司. Tyrode液成分包括(mmol/L): NaCl 147.0, KCl 4.0, CaCl<sub>2</sub> 2.0, MgCl<sub>2</sub> 1.05, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.81, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.42, 葡萄糖5.5, 用NaOH调pH至7.35-7.45. 50 mmol/L的亚甲蓝用Tyrode液配置. 张力换能器, RM6240多道生理信号采集处理系统购自成都仪器厂.

**1.2 方法** 将40只豚鼠随机分为I、II两个组; I组为正常豚鼠饲养组(20只), 喂养正常豚鼠饲料;

II组为胆固醇结石模型构造组(20只), 喂养致石饲料. 致石饲料参照卫志明 *et al*<sup>[4]</sup>方法喂养高胆固醇饲料. 其中I组随机均分为两组; 正常豚鼠胆囊平滑肌组(A组)和损伤ICC胆囊平滑肌组(D组); II组同样随机均分为喂养致石饲料4 wk(B组)、8 wk(C组). 豚鼠分笼饲养, 每笼2-3只, 豚鼠可随意获取饲料和水, 每2-3 d补充一次青菜; 饲养环境为: 温度20-25℃, 湿度40%-60%.

离体胆囊肌条的制备方法参照周吕 *et al*<sup>[5]</sup>的方法, 沿胆囊纵轴将胆囊制备成长8 mm, 宽3 mm肌条, 每条胆囊取3条肌条, 将肌条与张力换能器相连, 浸没于 $37\pm 0.5$ ℃ Tyrode液中, 给胆囊肌条1.0 g前负荷, 待肌条出现规律的自发节律性收缩并稳定60 min后记录机械收缩信号. 将1.0 g前负荷规定为0 g. 用化学药物亚甲蓝50 mmol/L+光照50 mW/cm<sup>2</sup>选择性破坏ICC. 光源采用可调聚光灯, 为可见光, 光波长532.0 nm, 照射在距光源3-5 cm的组织表面, 照射时间为5 min, 光照强度用数字测光表测出. 该方法只破坏ICC结构而不破坏肌间神经网络及平滑肌细胞<sup>[6]</sup>.

胆固醇结石模型的鉴定: 豚鼠致石饲料喂养时间到后进行标本采集. 肉眼观察胆囊、胆管内有无结石存在. 细针抽净胆囊胆汁, 观察胆汁性状及有无沉淀物. 取两滴胆汁偏振光显微镜下观察胆汁有无胆固醇结晶.

**CCK-8干预方法:** 观察胆囊肌条对CCK-8( $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$  mol/L)的反应. 使用微量进样器添加, 每种单一浓度CCK-8作用后, Tyrode液冲洗肌条3次.

**统计学处理** 以给药前2 min胆囊肌条的张力和收缩波平均振幅作为对照值, 每次给药后2 min的数值为效应值(CCK-8作用前后的变化程度). 实验结果均以mean±SD表示, A组、B组、C组三组间的比较采用单因素方差分析, A、D两组采用配对t检验, 多通道生物信号采集分析系统数据软件和统计软件SPSS13.0进行统计学分析.  $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 豚鼠胆囊结石的成石率** 豚鼠胆囊结石的发生情况; I组正常豚鼠饲养组有1例发生胆囊结石, 无死亡状况发生; II组结石模型构造组中共死亡1例, 为致石饲料8 wk组; 胆囊结石发生情况共有13例, 其中致石饲料4 wk 5例(5/10), 致石饲料8 wk 8例(8/10), 结石成石率显著高于对照组( $P<0.01$ , 表1).

### ■ 研发前沿

胆道系统动力减弱, 胆汁淤滞是胆石症重要的病理生理特点, 胆囊中ICC是存在的, 二者之间的关系仍需大量研究.

### ■ 相关报道

近年来, 胆固醇结石模型的构造已成熟; 亚甲蓝+光照破坏ICC的方法也已证实可行.

### ■ 创新盘点

在研究离体肌条收缩对胆石形成的影响的基础上,进一步探讨ICC在其中的作用。

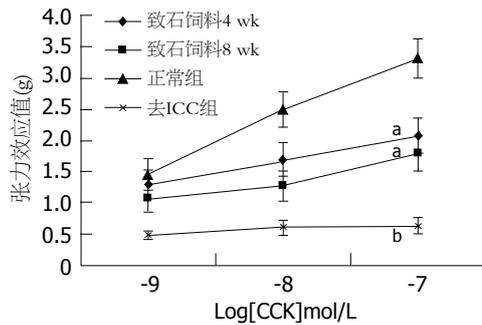


图1 各浓度CCK对豚鼠离体胆囊肌条收缩的影响。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组。

2.2 豚鼠离体胆囊肌条对各浓度CCK-8的反应 正常组(A组)、致石饲料喂养4 wk(B组)及致石饲料喂养8 wk(C组)加入 $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$  mol/L各浓度CCK-8后振幅明显增加。正常组(A)中加入各浓度CCK-8后离体胆囊肌条收缩振幅分别增加 $1.461 \pm 0.252$  g、 $2.484 \pm 0.283$  g、 $3.312 \pm 0.311$  g; B组分别增加 $1.292 \pm 0.239$  g、 $1.685 \pm 0.272$  g、 $2.081 \pm 0.288$  g; C组分别增加 $1.071 \pm 0.208$  g、 $1.263 \pm 0.238$  g、 $1.782 \pm 0.263$  g。B、C两组同A组相比,效应值有显著性差异( $P < 0.05$ , 表2, 图1)。

2.3 损伤ICC前后豚鼠离体胆囊肌条对各浓度CCK-8的反应 损伤ICC后加 $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$  mol/L各浓度CCK-8后离体胆囊肌条收缩振幅增加不明显,分别是 $0.461 \pm 0.071$  g、 $0.608 \pm 0.118$  g和 $0.641 \pm 0.129$  g,同正常组(A组)相比有显著性差异( $P < 0.01$ , 表2, 图1)。

### 3 讨论

胆石症(cholelithiasis or gallstone disease)是由存在于胆道系统(包括肝内、外胆管及胆囊)内的结石所引起的一组疾病。其发病机制尚未完全明了,除了“胆汁内胆固醇过饱和、成核理论”和“胆固醇磷脂泡理论”外,胆囊自身的因素(如胆囊运动功能障碍)也很重要。本实验中II组成石率明显高于I组,同时饲养8 wk也高于饲养致石饲料4 wk,表明高胆固醇饮食是构造胆固醇结石模型的有效途径。高胆固醇饮食可增加肠黏膜胆固醇的合成,并且增加胆固醇的摄取和分泌。喂养胆固醇饲料后,胆囊上皮分泌大量蛋白,增加胆汁糖蛋白的含量,胆固醇和胆红素含量升高及总蛋白质质量的增加促进成核。

由于离体胆囊已去神经支配,不受高位神经中枢影响,并且Brotschi *et al*<sup>[7]</sup>发现采用胆囊肌条研究可以部分乃至完全消除肠神经系统(enteric nervous system, ENS)对胆囊运动的影响。

表1 豚鼠胆囊成石情况

组别	饲养组	n	死亡	成石
I组	正常豚鼠饲养组	20	0	1
II组	致石饲料4 wk(B组 <sup>a</sup> )	10	0	5
	致石饲料8 wk(C组 <sup>b</sup> )	10	1	8

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常豚鼠饲养组。

响。CCK是促进胆囊收缩的主要激素。传统观点认为,CCK可以通过神经机制来调节胆囊收缩,其作用于突触前神经元,增加乙酰胆碱的释放,影响平滑肌的收缩。CCK还可直接收缩胆囊平滑肌,其信号通路主要为与胆囊平滑肌上的CCK-A受体特异性结合,通过G-蛋白耦联激活磷脂酶C(PLC),PLC水解PIP<sub>2</sub>并产生IP<sub>3</sub>和DAG,IP<sub>3</sub>能引起细胞内钙的释放并活化钙调蛋白,DAG能激活蛋白激酶C,最终均引起胆囊平滑肌收缩<sup>[8]</sup>。

我们实验显示,在离体胆囊平滑肌肌条对CCK-8反应的实验中,与正常对照组相比,喂养致石饲料4 wk和8 wk两个胆囊结石模型组明显降低(效应值变小),模型组中肌条对CCK-8的效应性降低;同时喂养致石饲料4 wk和8 wk两个胆囊结石模型组之间胆囊肌条对CCK-8反应(效应值)也有差异,说明随致石饲料的喂养时间增长,肌条对CCK-8的效应性降低,结石的发生率增高。有研究显示胆固醇孵育肌条后,肌条的静息肌张力和对CCK的反应性均降低,胆囊平滑肌自发性动作电位的幅度和频率也都明显减弱<sup>[9]</sup>。这说明在喂养高胆固醇致石饲料后,胆汁内先有胆固醇的增高,之后出现肌条对CCK的敏感性下降,导致胆囊运动功能障碍,促进胆囊结石的形成。Sato *et al*<sup>[10]</sup>对CCK-8受体基因敲除小鼠的研究也发现,CCK-A受体缺乏和效应性的降低与胆结石的形成相关。

ICC是胃肠运动的起搏细胞,是胃肠道平滑肌慢波电位的起搏者和传导者,并最终调节平滑肌的收缩活动<sup>[11]</sup>,在胃肠电及动力障碍机制上具有重要的作用。近来关于胆囊动力的电生理研究表明,胆囊有类似肠道慢波电位的节律性变化,电活动与机械活动一致,并略先于机械活动。胆囊平滑肌具有自发性动作电位,胆囊的节律性兴奋是多位点的,能被兴奋性激动剂同步化<sup>[12]</sup>。Lavoie *et al*<sup>[13]</sup>研究还发现,缝隙连接阻断剂和c-kit抑制剂能减少ICC的钙峰和动作电位。这些都提示胆囊ICC在胆囊自发性节律的产生和

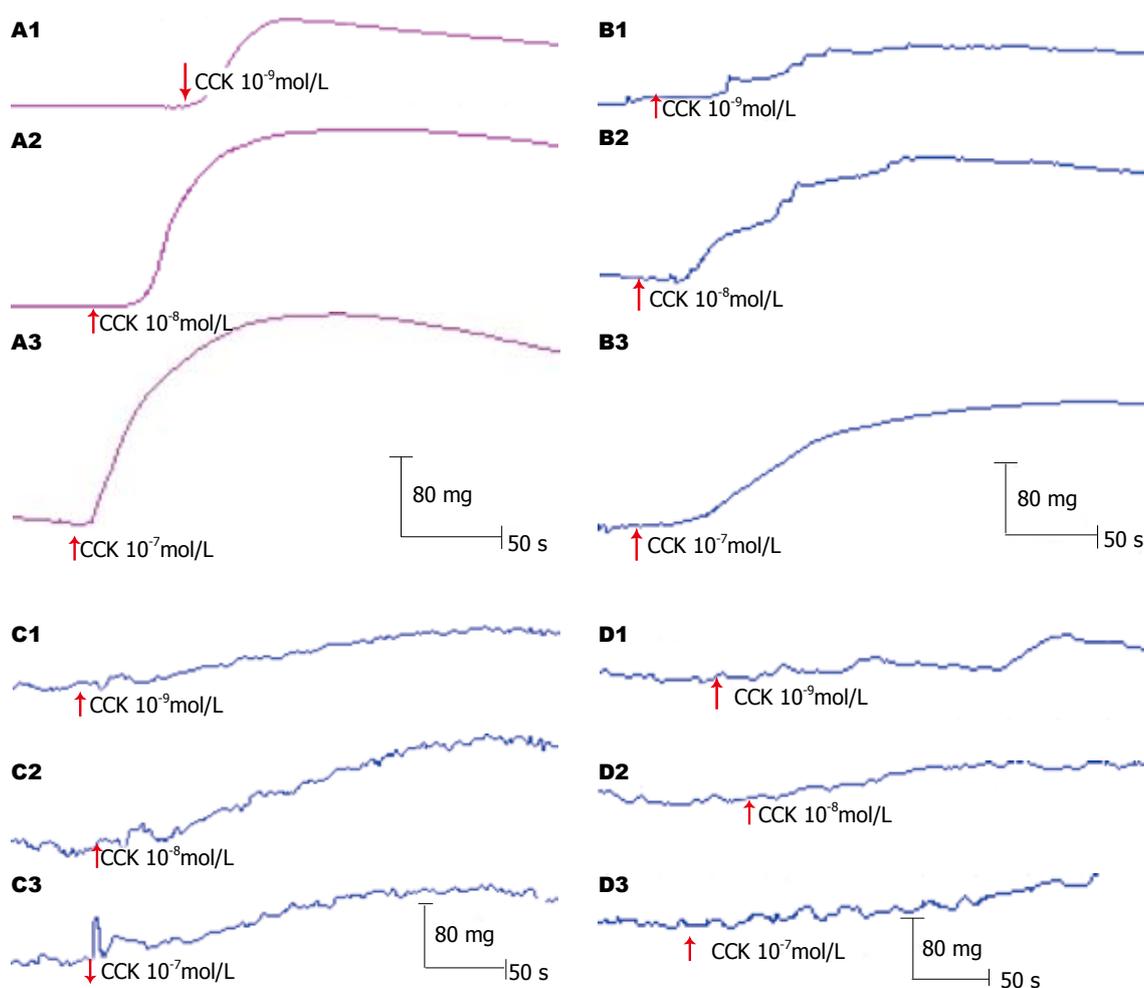


图 2 豚鼠离体胆囊肌条收缩波形. A1: 正常+CCK  $10^{-9}$  mol/L; A2: 正常+CCK  $10^{-8}$  mol/L; A3: 正常+CCK  $10^{-7}$  mol/L; B1: 4 wk+CCK  $10^{-9}$  mol/L; B2: 4 wk+CCK  $10^{-8}$  mol/L; B3: 4 wk+CCK  $10^{-7}$  mol/L; C1: 8 wk+CCK  $10^{-9}$  mol/L; C2: 8 wk+CCK  $10^{-8}$  mol/L; C3: 8 wk+CCK  $10^{-7}$  mol/L; D1: 正常豚鼠损伤ICC+CCK  $10^{-9}$  mol/L; D2: 损伤ICC+CCK  $10^{-8}$  mol/L; D3: 损伤ICC+CCK  $10^{-7}$  mol/L.

#### 应用要点

目前研究发现胆结石中胆石的形成常常伴有动力异常、胆汁淤滞, 因此探讨胆囊收缩素对胆囊动力的影响对于阐明胆结石可能的病理生理机制具有现实意义.

表 2 豚鼠离体肌条对CCK反应的张力效应值 (g)

CCK浓度(mol/L)	A组	B组	C组	D组
$10^{-9}$	$1.461 \pm 0.252$	$1.292 \pm 0.239^a$	$1.071 \pm 0.208^a$	$0.461 \pm 0.071^b$
$10^{-8}$	$2.484 \pm 0.283$	$1.685 \pm 0.272^a$	$1.263 \pm 0.238^a$	$0.608 \pm 0.118^b$
$10^{-7}$	$3.312 \pm 0.311$	$2.081 \pm 0.288^a$	$1.782 \pm 0.263^a$	$0.641 \pm 0.129^b$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs A组.

传播中可能具有重要的作用. 我们发现, CCK对ICC遭特异性破坏的豚鼠离体胆囊肌条的兴奋作用几乎消失, 也证实了ICC可能是CCK对胆囊平滑肌的兴奋途径中的一个中间环节, CCK可能通过ICC来影响胆囊的收缩功能.

总之, 本实验可以证实豚鼠离体胆囊肌条肌张力降低及对CCK-8敏感性的降低等胆囊动力学障碍在胆结石病的发生发展中有重要作用; 而损伤ICC后, CCK对离体胆囊肌条几无作

用, CCK可能是通过ICC来引起胆囊离体肌条的收缩, ICC可能在胆囊结石等胆囊动力性疾病中发生作用.

#### 4 参考文献

- Portincasa P, Di Ciaula A, vanBerge-Henegouwen GP. Smooth muscle function and dysfunction in gallbladder disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 151-162
- Sun X, Yu B, Xu L, Dong W, Luo H. Interstitial cells of Cajal in the murine gallbladder. *Scand J*

### ■同行评价

本研究证实胆固醇结石豚鼠离体胆囊肌条收缩对胆囊收缩素的敏感性下降,但未能证明胆道动力因素在胆固醇结石形成中的作用,建议进一步研究。

- Gastroenterol* 2006; 41: 1218-1226
- 3 Lavoie B, Balemba OB, Nelson MT, Ward SM, Mawe GM. Morphological and physiological evidence for interstitial cell of Cajal-like cells in the guinea pig gallbladder. *J Physiol* 2007; 579: 487-501
  - 4 卫志明, 方玉梅, 杨幼明, 周文江. 豚鼠胆胆固醇结石模型的建立. *中国实验动物学杂志* 1999; 9: 198-200
  - 5 周吕, 柯美云. 胃肠动力学. 第1版. 北京: 科学出版社, 1999: 293-303
  - 6 Liu LW, Thuneberg L, Huizinga JD. Selective lesioning of interstitial cells of Cajal by methylene blue and light leads to loss of slow waves. *Am J Physiol* 1994; 266: G485-G496
  - 7 Brotschi EA, Pattavino J, Williams LF Jr. Intrinsic nerves affect gallbladder contraction in the guinea pig. *Gastroenterology* 1990; 99: 826-830
  - 8 Shaffer EA. Review article: control of gall-bladder motor function. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14 Suppl 2: 2-8
  - 9 Jennings LJ, Xu QW, Firth TA, Nelson MT, Mawe GM. Cholesterol inhibits spontaneous action potentials and calcium currents in guinea pig gallbladder smooth muscle. *Am J Physiol* 1999; 277: G1017-G1026
  - 10 Sato N, Miyasaka K, Suzuki S, Kanai S, Ohta M, Kawanami T, Yoshida Y, Takiguchi S, Noda T, Takata Y, Funakoshi A. Lack of cholecystokinin-A receptor enhanced gallstone formation: a study in CCK-A receptor gene knockout mice. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1944-1947
  - 11 Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 307-343
  - 12 Balemba OB, Salter MJ, Heppner TJ, Bonev AD, Nelson MT, Mawe GM. Spontaneous electrical rhythmicity and the role of the sarcoplasmic reticulum in the excitability of guinea pig gallbladder smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G655-G664

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, 并考入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小  $7.5 \text{ cm} \times 4.5 \text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-18)

# RNAi抑制结肠癌细胞系DcR3的表达及对癌细胞生长的影响

王鲁平, 杨善明, 徐学明, 陈健, 杨光之, 张鲁榕

王鲁平, 陈健, 杨光之, 中国人民解放军北京军区总医院病理科 北京市 100700  
杨善明, 徐学明, 张鲁榕, Department of Oncology, Lombardi Cancer Center, Georgetown University, 20007 Washington DC, USA  
国家自然科学基金资助项目, No. 30340064  
作者贡献分布: 课题由王鲁平, 杨善明及张鲁榕设计; 王鲁平与杨善明贡献均等; 王鲁平, 杨善明及徐学明完成实验操作; 陈健与杨光之完成资料及图片整理; 论文写作由王鲁平完成。  
通讯作者: 王鲁平, 100700, 北京市, 中国人民解放军北京军区总医院病理科. bzwlp@yahoo.com  
电话: 010-66721576 传真: 010-88551277  
收稿日期: 2007-11-29 修回日期: 2008-07-02  
接受日期: 2008-07-10 在线出版日期: 2008-07-18

## Depressed DcR3 expression induced by RNA interference and its effect on growth of colonic cancer cells

Lu-Ping Wang, Shan-Ming Yang, Xue-Ming Xu, Jian Chen, Guang-Zhi Yang, Lu-Rong Zhang

Lu-Ping Wang, Jian Chen, Guang-Zhi Yang, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Military Area, Beijing 100700, China  
Shan-Ming Yang, Xue-Ming Xu, Lu-Rong Zhang, Department of Oncology, Lombardi Cancer Center, Georgetown University, 20007 Washington DC, USA  
Supported by: National Nature Science Foundation, No. 30340064  
Correspondence to: Lu-Ping Wang, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Military Area, Beijing 100700, China. bzwlp@yahoo.com  
Received: 2007-11-29 Revised: 2008-07-02  
Accepted: 2008-07-10 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To study relationship between depressed DcR3 gene expression and changes of malignant phenotype on SW480 colonic carcinoma cells line.

**METHODS:** Using RNAi method, we constructed a small interfering double-strand DcR3-RNA, then cloned it into vector "pSilencer 2.1 Hygro", and finally transfected the vector into SW480 colonic cancer cells expressing a high level of DcR3. The small double-strand RNA was recognized and the DcR3 mRNA was reduced. The DcR3 low-expression cancer cells were screened and their growth and apoptosis were measured.

**RESULTS:** In comparison with that in the con-

trol group, the expression of DcR3 mRNA was down-regulated remarkably in the cells transfected with DcR3-RNAi (F1R1). Group comparison results showed that the quantity of SW480 cells was markedly decreased in the DcR3-RNAi (F1R1)-transfected group than that in the DcR3 group or control group ( $P < 0.001$ ). The expression levels of Caspase3 and PARP product were increased in the DcR3-RNAi-transfected group as compared with those in the control group.

**CONCLUSION:** DcR3-RNAi down-regulates the expression of DcR3 mRNA in SW480 colonic carcinoma cells, which leads to inhibition of cell growth and enhancement of cell apoptosis.

**Key Words:** DcR3; RNA interference; SW480 colonic cells line

Wang LP, Yang SM, Xu XM, Chen J, Yang GZ, Zhang LR. Depressed DcR3 expression induced by RNA interference and its effect on growth of colonic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2285-2288

### 摘要

**目的:** 观察抑制DcR3基因表达的人SW480结肠癌细胞其恶性表型的改变。

**方法:** 应用RNA干扰(RNAi)技术, 构建小双链DNA, 克隆入表达载体, 转染进入SW480结肠癌细胞系(DcR3高表达细胞), 在细胞内形成小干扰双链RNA; 识别并降解DcR3 mRNA. 筛选DcR3低表达转染癌细胞, 观测其体外DcR3-SW480-RNAi转染细胞的增殖率及凋亡表达。

**结果:** 与对照组相比, 转染DcR3-RNAi(F1R1)的SW480细胞, DcR3 mRNA的表达明显降低, 各组相比, 加入DcR3-RNAi(F1R1)组的SW480细胞数量明显减少, 而仅加入DcR3及对照组细胞数量明显增加. 统计学处理差异显著( $P < 0.001$ ). 与对照组相比, 经DcR3-RNAi处理组凋亡抗体Caspase3及PARP产物表达增加。

**结论:** 经转染的DcR3-RNAi-SW480结肠癌细胞其DcR3 mRNA表达降低. 肿瘤细胞的生长数量减少, 凋亡增加, 有一定可探索性抗癌前景。

### 背景资料

DcR3基因位于染色体20q13.3, 成熟DcR3分子质量为35 kDa, cDNA编码为约1 kb核苷酸, 为分泌性、可溶性多肽. 目前认为是一个具有拮抗凋亡, 促进细胞生长, 调节免疫功能的新基因, 对肿瘤的生长分化有较大影响。

**同行评议者**  
姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

## ■相关报道

本课题组前期研究发现通过阻断外源性及内源性FasL, DcR3可保护乳腺癌细胞生长;伴有淋巴结转移的癌DcR3表达明显增高。

## 关键词: DcR3; RNA干扰技术; SW480结肠癌细胞系

王鲁平, 杨善明, 徐学明, 陈健, 杨光之, 张鲁榕. RNAi抑制结肠癌细胞系DcR3的表达及对癌细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2285-2288

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2285.asp>

## 0 引言

DcR3(又称TR6)属肿瘤坏死因子受体家族,被认为是阻断细胞凋亡,保护肿瘤细胞生长的新基因<sup>[1-3]</sup>.一些恶性肿瘤中DcR3 mRNA表达明显升高<sup>[4-8]</sup>.我们的前期研究发现通过阻断外源性及内源性FasL, DcR3可保护乳腺癌细胞生长;伴有淋巴结转移的癌DcR3表达明显增高<sup>[4]</sup>.在上述研究的基础上,我们应用RNA干扰(RNAi)技术,阻断DcR3基因表达,探讨阻断DcR3基因表达的人SW480结肠癌细胞是否降低其恶性表型,是否有治疗肿瘤的前景。

## 1 材料和方法

1.1 材料 pSilencer 2.1-U6nHygro-DcR3-dsDNA质粒(含沉默DcR3基因片段)由王鲁平医师在美国Gerogetown1大学Lombardi癌症研究中心构建,并经测序与GenBank中的序列一致. Silencer siRNA Cocktail试剂盒购自美国Ambion公司;胎牛血清、DMEM细胞培养液和G418购自Gibco公司; TRIzol试剂购自Life Technologies公司; RT-PCR试剂盒购自Promega公司;鼠抗DcR3一抗由Sunghee Kim和张鲁榕教授惠赠; Caspase 3和PARP一抗购自Dako公司; BCA蛋白检测试剂盒购自Pierce, Rockford IL公司; Western印记化学发光物购自Amersham公司. 结肠癌细胞系SW480来自美国Gerogetown大学Lombardi癌症研究中心细胞库;培养基为含有100 mL/L胎牛血清的DMEM细胞培养液. 转染后的SW480细胞培养条件为在上述培养基中加入G418(800 mg/L).

### 1.2 方法

1.2.1 DcR3-RNA基因克隆,质粒构建及SW480细胞转染、鉴定、筛选:使用“Silencer siRNA Cocktail试剂盒”选择2个siRNA靶位点,靶位点1(F1R1)核苷酸95-123,靶位点2(F2R2)核苷酸247-265.使用online BLAST软件与GenBank中其他基因进行比较,排除所选择靶序列与其他基因有显著性同源. F1R1 ACACCCACCTACCCTGGC(95-123), F2R2 CTACCTGGAGCGCTGCCGC(247-265).每一个包括正义和反义靶序列,中间以9个核苷酸的环状区,末端有一RNA

多聚酶III的中止信号序列.其正向、反向两链被合成,以形成一个双链DNA,其末端有BamH I和HindIII位点.经基因测序证实片段序列无误.将双链DNA分别克隆进入载体,具体步骤: F1R1和F2R2双链DNA, pSilencer 2.1-U6nHygro各2-3 g/L,加入50  $\mu$ L competent细胞(大肠杆菌),4 $^{\circ}$ C 30 min,42 $^{\circ}$ C 15 s,放置冰上1-2 min,加入9倍体积SOC,37 $^{\circ}$ C震荡1 h,铺于Agarose+LB培养板上,震荡37 $^{\circ}$ C过夜.次日挑选1个克隆加入100 mL LB及卡那霉素30 mg/L,震荡37 $^{\circ}$ C过夜.将上清弃之,应用试剂盒纯化沉淀物中DNA,琼脂糖凝胶电泳检测纯化物.限制性内切酶切上述质粒,(BamH I+HindIII),纯化酶切产物.连接酶连接载体及DcR3-DNA片段.碱裂解法大量提取纯化该质粒DNA. A测量DNA浓度. pSilencer 2.1-U6nHygro-DcR3-dsDNA稳定转染进入SW480结肠癌细胞系.转染前16-20 h用胰酶消化对数生长期细胞,将细胞移置100 mm培养皿中,细胞数 $1 \times 10^6$ 在100 mL/L的胎牛血清DMEM中.转染前4 h,再次换培养液.配置转染液:依次加入H<sub>2</sub>O, DNA, CaCl<sub>2</sub>,及2 $\times$ BBS,缓慢小心混合,静置45 min,缓慢加入细胞内,30 mL/L CO<sub>2</sub>孵育箱中培养.第3天加入G418(800 mg/L FBS-DMEM),培养筛选.挑选可在G418环境下生长的转染SW480细胞集落,行RT-PCR分析:应用TRIzol试剂提取转染后SW480细胞的RNA,琼脂糖凝胶电泳检测RNA产物.应用RT-PCR试剂盒反转录、扩增检测其cDNA含量.从人DcR3基因序列中选择合成两段引物: F1正义: 5-CCTGGCGGGACGAGACA-3, R1反义: 5-TGGCACTGCGAGTTCTGGCT-3; F2正义: 5-TGCCAGGCTCTTCCTCCCAT-3, R2反义: 5-TCACGGACGCTCCGCTCCAG-3;经RT-PCR后,不同组DNA经琼脂糖电泳检测,紫外光下显示并摄影。

1.2.2 DcR3-SW480-RNAi转染细胞:检测DcR3-SW480-RNAi转染细胞对体外肿瘤细胞生长的作用.  $1.5-2 \times 10^4$ /孔SW480细胞系培养于96孔板,分为不同组分加入不同物质48 h后,加入<sup>3</sup>H TdR(0, 3  $\mu$ Ci/well)过夜. EDTA消化液收获细胞.应用 $\beta$ -counter计算<sup>3</sup>H TdR掺入结合率.统计学处理比较各组细胞的掺入结合率。

1.2.3 Western印记检测凋亡活性:应用细胞裂解液对6孔板培养DcR3-SW480-RNAi培养细胞及对照组细胞进行收获. BCA蛋白检测试剂盒检测其蛋白浓度.每孔加30  $\mu$ g蛋白入SDS聚丙烯酰

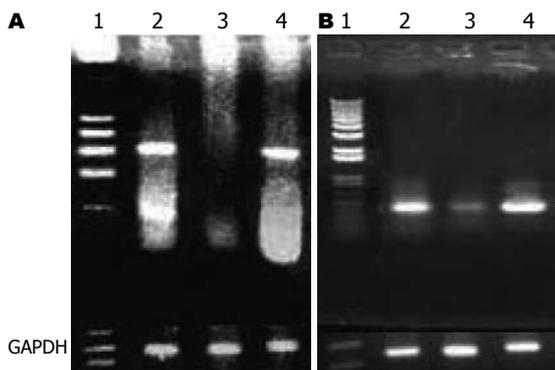


图 1 应用RT-PCR观察DcR3-siRNA-SW480对DcR3 mRNA的表达. A: 转染后48 h; B: 转染后72 h. 1: marker; 2, 4: 空白质粒对照组; 3: DcR3-RNAi处理组.

胺凝胶, 电泳之后, 4℃、50 V下湿式电转移仪将蛋白质转入PVDF膜. 50 g/L脱脂奶粉封闭PVDF膜2 h, 一抗包括鼠抗人活性Caspase3, PARP (1:5000)孵育PVDF膜4℃过夜, PBS-T充分洗涤, HRP-抗鼠二抗(1:10 000)1 h, PBS-T充分洗涤后化学发光底物孵育1 min, 暗室中将膜贴于增色胶片曝光、显影、洗相. 直至出现条带.

**统计学处理** 应用SPSS12.0统计学软件进行资料处理, 定量结果以mean±SD表示, 应用t检验分析,  $P<0.05$ 具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 转染后的DcR3-RNAi-SW480细胞中DcR3 mRNA的表达** 应用RT-PCR观察DcR3-siRNA-SW480对DcR3 mRNA的表达(图1). 与对照组相比, 转染DcR3-RNAi(F1R1)的WS480细胞, DcR3 mRNA的表达明显降低.

**2.2 DcR3-RNAi-SW480细胞对体外肿瘤细胞生长的影响** <sup>3</sup>H掺入法检测经不同处理各组SW480细胞数量的变化(图2), 各组相比, 加入DcR3 RNAiF1R1组其SW480细胞数量明显减少, 而仅加入DcR3及对对照组细胞数量明显增加. 统计学处理差异显著( $P<0.001$ ).

**2.3 Western印记检测** 应用活性Caspase3及PARP的免疫印记法, 与对照组相比, 经DcR3-RNAi处理组的活性Caspase3表达凋亡条带增强(图3A), 同样与对照组相比, 经DcR3-RNAi处理组PARP产物表达明显增强(图3B).

## 3 讨论

DcR3基因位于染色体20q13.3, 成熟DcR3分子质量为35 kDa, cDNA编码为约1 kb核苷酸, 为分泌性、可溶性多肽<sup>[6]</sup>. 目前认为是一个具有拮抗凋亡, 促进细胞生长, 调节免疫功能的新基因, 对

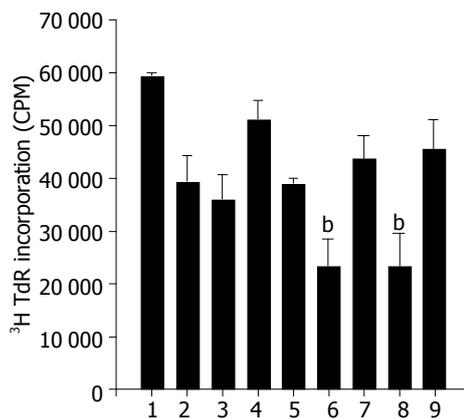


图 2 DcR3-RNAi对SW480细胞生长的影响. 1: 空白质粒组; 2-3: 空白质粒组+转染液; 4: DcR3组; 5: DcR3组+DcR3-RNAiF2R2; 6, 8: DcR3-RNAiF1R1; 7, 9: 空白质粒+DcR3(煮沸). <sup>b</sup> $P<0.001$  vs 其他组.

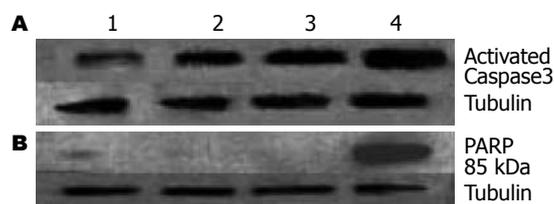


图 3 Western印记法检测Caspase3、PARP. A: Caspase3检测; B: PARP检测; 1-2: 单纯SW480细胞; 3: DcR3SW480细胞; 4: DcR3-RNAi-SW480SW480细胞.

肿瘤的生长分化有较大影响. 研究表明DcR3发挥其重要生物学功能, 是因其可结合3个重要的凋亡配基: FasL, LIGHT, TLIA, 与其竞争死亡受体, 阻断其诱导凋亡的作用<sup>[1-2]</sup>. 研究发现, 正常人体组织中胃、脊髓、淋巴结、气管、脾、结肠和肺有低水平DcR3 mRNA表达<sup>[3-4]</sup>. 胃肠道癌、结肠癌<sup>[3]</sup>、肺癌<sup>[5]</sup>、肝癌<sup>[6]</sup>. EBV/HTLV-1阳性的淋巴瘤均伴有DcR3基因扩增或蛋白水平高表达<sup>[7]</sup>. 对146例肿瘤, 19例急性感染和29例正常健康人的血清DcR3检测结果显示, 56%、2%的肿瘤患者血清DcR3阳性, 其中98%、8%为恶性肿瘤患者, 当肿瘤被切除后, 血清DcR3浓度下降. 97%的急性感染和正常健康人(47/48)血清DcR3阴性. 22/31(71%)例胃癌患者血清DcR3阳性, 其阳性率与胃癌TNM分期有关. 提示血清DcR3的检测将成为恶性病变的有意义的诊断、治疗、预后参数<sup>[6-8]</sup>. 我们的研究结果提示DcR3在乳腺癌中的表达率为62%, 而乳腺良性病变无表达, 伴有淋巴结转移的乳腺癌DcR3表达率明显升高达80%<sup>[14]</sup>. 上述结果提示DcR3对肿瘤发生、发展起着上调作用, 恶性肿瘤显示DcR3 mRNA及蛋白水平过表达.

**应用要点**  
本研究应用RNAi技术, 抑制SW480结肠癌细胞中mRNA的表达, 其结果发现DcR3 mRNA表达下降后, 人结肠癌SW480细胞数量减少, 凋亡表达增加. DcR3-RNAi技术可能有一定抗癌前景.

### ■同行评价

本研究内容较先进, 实验设计合理, 研究方法适当, 具有重要的参考价值。

基于上述发现, 本研究应用RNA干扰(RNAi)技术, 阻断DcR3基因表达, 观察阻断DcR3基因表达的人SW480结肠癌细胞恶性表型的影响。双链RNA介导的基因阻断机制是1998年发现的<sup>[9]</sup>。他通过双链RNA的介导特异性地降解相应序列的mRNA, 从而导致转录后水平的基因沉默。抑制基因表达的效率至少比传统反义技术高2个数量级。RNA降解过程涉及两个步骤: 双链RNA被名为Dicer的RNaseIII样蛋白加工成21-25 nt长度的小干扰RNA(siRNA); 反义链RNA引导核酸内切酶复合体(RISC)去除单链的同源mRNA。RISC在小干扰RNA的引导下, 切断序列特异的mRNA, mRNA进一步降解<sup>[10-11]</sup>。已有证据表明siRNA介导的RNAi能特异性抵御病毒的入侵, 拮抗植物肿瘤发生。同时也为抗癌治疗提供了新的基因研究策略。

我们应用双链RNAi技术特异性降解DcR3 mRNA, 从而阻断DcR3基因的表达。首先在DcR3基因序列中选择小干扰RNA(siRNA)靶位点, 每一个包括正义和反义靶序列片段, 中间间以9个核苷酸的环状区, 末端有一RNA多聚酶III的中止信号序列, 合成一个有环状结构的双链DNA, 其末端有BamH I和HindIII位点。克隆入载体pSilencer 2.1-U6 Hygro; 转染进入SW480人结肠癌细胞(DcR3高表达细胞)<sup>[12]</sup>, 在细胞内形成小干扰双链RNA; 识别并降解DcR3 mRNA; 筛选DcR3 mRNA及蛋白低表达转染癌细胞, 并以空质粒转染SW480细胞作为对照, 观测其体外细胞增殖率, 各组增殖细胞的蛋白表达率, 探讨抑制DcR3基因表达的的人SW480结肠癌细胞是否可降低其生长速度及恶性表型。结果表明, 转染的DcR3-RNAi-SW480-F1R1细胞DcR3 mRNA表达明显降低。与对照组相比, 转染的DcR3-RNAi-F1R1 SW480肿瘤细胞数量明显减少。肿瘤细胞中DcR3蛋白含量明显减少。经统计学处理差异显著( $P < 0.05$ )。经DcR3-RNAi(DcR3-siRNA)处理的细胞, PARP及Caspase3的表达增强。PARP是细胞程序死亡的一个早期分子标志, Caspase被认为是凋亡的中心实施者, 细胞经多因子多途径的相互作用, Caspase活化降解其作用底物, 引起其特征性形态学生物化学改变, 完成细胞的凋亡过程。PARP作为基因组监测和DNA修复酶, 是第一个在凋亡中由Caspase3和其他系列Caspase降解的底物, 被称为细胞凋亡的死亡底物<sup>[13]</sup>。应用DcR3-RNAi技术, 阻断了DcR3的基因表达, 使其不能与3个重要的凋亡配基

Fas-l, LIGHT, TLIA结合, 由此介导肿瘤细胞产生凋亡, 肿瘤细胞的生长数量减少, 有一定可探索性抗癌基因治疗前景, 尚有待于动物体内实验的证实。

### 4 参考文献

- 1 Connolly K, Cho YH, Duan R, Fikes J, Gregorio T, LaFleur DW, Okoye Z, Salcedo TW, Santiago G, Ullrich S, Wei P, Windle K, Wong E, Yao XT, Zhang YQ, Zheng G, Moore PA. In vivo inhibition of Fas ligand-mediated killing by TR6, a Fas ligand decoy receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 25-33
- 2 Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol* 2002; 196: 125-134
- 3 Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Ebner R, Kwon BS. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 13733-13736
- 4 Bai C, Connolly B, Metzker ML, Hilliard CA, Liu X, Sandig V, Soderman A, Galloway SM, Liu Q, Austin CP, Caskey CT. Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1230-1235
- 5 Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998; 396: 699-703
- 6 Wu Y, Han B, Sheng H, Lin M, Moore PA, Zhang J, Wu J. Clinical significance of detecting elevated serum DcR3/TR6/M68 in malignant tumor patients. *Int J Cancer* 2003; 105: 724-732
- 7 Ohshima K, Haraoka S, Sugihara M, Suzumiya J, Kawasaki C, Kanda M, Kikuchi M. Amplification and expression of a decoy receptor for fas ligand (DcR3) in virus (EBV or HTLV-I) associated lymphomas. *Cancer Lett* 2000; 160: 89-97
- 8 Wu YL, Yu JX, Shen HW, Han B, Gao SL. [Clinical significance and correlation between elevated serum TR6 and lympho-metastasis in gastric cancer] *Zhonghua Waikexue Zazhi* 2003; 41: 928-931
- 9 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
- 10 Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002; 296: 1263-1265
- 11 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251
- 12 Zhang J, Salcedo TW, Wan X, Ullrich S, Hu B, Gregorio T, Feng P, Qi S, Chen H, Cho YH, Li Y, Moore PA, Wu J. Modulation of T-cell responses to alloantigens by TR6/DcR3. *J Clin Invest* 2001; 107: 1459-1468
- 13 Goyeneche AA, Harmon JM, Telleria CM. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis. *Reproduction* 2006; 131: 103-111
- 14 王鲁平, 陈键, 宁浩勇, 刘光, 丁华野, 虞积耀, Charles B, Underhill, 张鲁榕. TR6在人乳腺癌中的功能、表达和意义. *诊断病理学杂志* 2005; 12: 133-136

# 氧化苦参碱对实验性结肠炎大鼠肠黏膜细胞因子和核因子- $\kappa$ B p65表达的影响

吕建芳, 范恒, 沈霖, 寿折星, 庄雄

吕建芳, 范恒, 沈霖, 寿折星, 庄雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科 湖北省武汉市 430022  
中国博士后科学基金资助项目, No. 2005037679  
作者贡献分布: 此课题由范恒设计; 范恒与沈霖指导; 研究过程由吕建芳, 寿折星与庄雄操作完成; 数据分析及论文写作由吕建芳完成。  
通讯作者: 范恒, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科. fanheng009@yahoo.com.cn  
电话: 027-63889899  
收稿日期: 2008-04-08 修回日期: 2008-05-22  
接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-07-18

## Effects of Oxymatrine injection on expression of cytokines and nuclear factor- $\kappa$ B p65 in colonic intestinal mucosa of rats with experimental colitis

Jian-Fang Lv, Heng Fan, Lin Shen, Zhe-Xing Shou, Xiong Zhuang

Jian-Fang Lv, Heng Fan, Lin Shen, Zhe-Xing Shou, Xiong Zhuang, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China  
Supported by: the Postdoctoral Science Foundation of China, No. 2005037679  
Correspondence to: Dr. Heng Fan, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. fanheng009@yahoo.com.cn  
Received: 2008-04-08 Revised: 2008-05-22  
Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and investigate the anti-inflammatory mechanism of Oxymatrine (OMT) injection for the treatment of experimental colitis in rats.

**METHODS:** Forty male rats were randomly assigned to the following groups ( $n = 10$ ): normal control, model group, mesalazine group, and OMT treatment group. Acute colitis was induced using TNBS in each group except the normal control. The rats in model group received normal saline in an equal volume as OMT treat-

ment for 15 days. The rats in Mesalazine group were lavaged by Mesalazine for 15 days, and the rats in OMT treatment were intramuscularly injected with OMT for 15 days. The rats in normal control drank water and feed food normally. Diarrhea and bloody stool as well as colonic histology were noted. The levels of IL-2 and IL-10 were determined by ELISA, and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B p65 activity was detected using immunohistochemistry method.

**RESULTS:** The inflammatory symptoms (diarrhea, bloody purulent stool) and histological damages of colonic mucosa in OMT treatment group were significantly alleviated. Compared with experimental colitis, the level of IL-2 was significantly decreased ( $102.93 \pm 21.10$  ng/L *vs*  $231.48 \pm 40.78$  ng/L,  $P < 0.05$ ), the level of IL-10 was significantly increased ( $50.13 \pm 1.40$  ng/L *vs*  $18.64 \pm 0.65$  ng/L,  $P < 0.05$ ) and the expression of NF- $\kappa$ B p65 was significantly reduced ( $16.02\% \pm 7.27\%$  *vs*  $43.05\% \pm 13.80\%$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the normal control, there was elevated expression of NF- $\kappa$ B p65 and IL-2 ( $16.02\% \pm 7.27\%$  *vs*  $9.57\% \pm 4.31\%$ ,  $102.93 \pm 21.10$  ng/L *vs*  $30.44 \pm 12.03$  ng/L, both  $P < 0.01$ ), and decreased expression of IL-10 ( $50.13 \pm 1.40$  ng/L *vs*  $58.92 \pm 3.70$  ng/L,  $P < 0.01$ ) in colonic mucosa of experimental colitis rats. And the expression of NF- $\kappa$ B p65, IL-2 and IL-10 in the OMT treatment group was similar (no statistically significant difference) to Mesalazine treatment group.

**CONCLUSION:** Oxymatrine injection is effective for experimental colitis in rats. Inhibiting the expression of NF- $\kappa$ B p65, IL-2 and promoting the expression of IL-10 may be the anti-inflammatory mechanism of Oxymatrine Injection.

**Key Words:** Colitis; Oxymatrine injection; Cytokines; Nuclear factor- $\kappa$ B p65

Lv JF, Fan H, Shen L, Shou ZX, Zhuang X. Effects of Oxymatrine injection on expression of cytokines and nuclear factor- $\kappa$ B p65 in colonic intestinal mucosa of rats with experimental colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2289-2294

### 背景资料

炎症性肠病(IBD) 在我国的发生率成上升趋势, 其病因与发病机制尚不明确, 目前临床上亦无特异性的根治措施, 寻找有效的治疗药物是目前研究的重点。

### 同行评议者

张声生, 教授, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心; 徐列明, 教授, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

## ■研发前沿

免疫因素是IBD的主要发病因素,已知肠道黏膜免疫系统异常反应所导致的炎症反应在IBD发病中起重要作用。促炎细胞因子和抑炎细胞因子的平衡失调被认为是IBD的一个重要发病机制,NF- $\kappa$ B在细胞因子的转录和释放中可能起调控作用。

## 摘要

**目的:** 观察氧化苦参碱注射液对大鼠实验性结肠炎的治疗效果,探讨其作用机制。

**方法:** 将40只SD大鼠随机分为4组:正常对照组、模型组、美沙拉嗪组和氧化苦参碱(OMT)组,每组10只。正常对照组未行造模,其余3组大鼠均采用TNBS造模。模型组给予生理盐水肌注,美沙拉嗪组给予美沙拉嗪混悬液灌胃,氧化苦参碱组给予氧化苦参碱注射液肌注。治疗15 d后观察大鼠的腹泻、便血症状和结肠病理组织学改变,用ELISA法检测结肠黏膜组织IL-2、IL-10的变化,并用免疫组化技术检测大鼠结肠黏膜核因子(NF)- $\kappa$ B p65的表达。

**结果:** OMT组大鼠腹泻、黏液脓血便症状得到较快控制,大鼠黏膜组织损伤显著改善。与模型组比较,OMT组IL-2减少( $102.93 \pm 21.10$  ng/L vs  $231.48 \pm 40.78$  ng/L,  $P < 0.05$ ), IL-10增多( $50.13 \pm 1.40$  ng/L vs  $18.64 \pm 0.65$  ng/L,  $P < 0.05$ ), NF- $\kappa$ B p65显著降低( $16.02\% \pm 7.27\%$  vs  $43.05\% \pm 13.80\%$ ,  $P < 0.01$ )。与正常组相比,模型组结肠黏膜IL-2升高,IL-10减少,NF- $\kappa$ B p65表达增多,差异均有显著性意义( $102.93 \pm 21.10$  ng/L vs  $30.44 \pm 12.03$  ng/L,  $50.13 \pm 1.40$  ng/L vs  $58.92 \pm 3.70$  ng/L,  $16.02\% \pm 7.27\%$  vs  $9.57\% \pm 4.31\%$ , 均 $P < 0.01$ )。OMT组与美沙拉嗪组比较,IL-2、IL-10和NF- $\kappa$ B p65的表达无显著性差异。

**结论:** 氧化苦参碱注射液治疗大鼠实验性结肠炎有明显效果,其作用机制可能是通过减少IL-2的生成、促进IL-10分泌和抑制NF- $\kappa$ B p65的激活发挥治疗作用。

**关键词:** 结肠炎; 氧化苦参碱; 细胞因子; 核因子- $\kappa$ B p65

吕建芳, 范恒, 沈霖, 寿折星, 庄雄. 氧化苦参碱对实验性结肠炎大鼠肠黏膜细胞因子和核因子- $\kappa$ B p65表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2289-2294  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2289.asp>

## ■相关报道

氧化苦参碱(OMT)肌肉注射时,胆囊、肾、肝、肠中浓度最高,大部分在肠中吸收,生物转化部位在胃肠道和肝。有实验研究证明OMT对结肠炎有保护作用。

## 0 引言

随着人们生活水平的提高、饮食结构的改变,我国炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发病率越来越高。据研究,IBD的病因和发病机制与遗传、环境和免疫因素有关,尤其是与肠黏膜局部免疫反应的紊乱有关。NF- $\kappa$ B、IL-2和IL-10在调节肠道免疫中起到重要作用。

中药苦参具有清热、燥湿、杀虫之效,主治热毒下痢、肠风下血和痔漏等。临床上有多种含苦参的中成药治疗溃疡性结肠炎有效<sup>[1]</sup>。氧化苦参碱(oxyamatrine, OMT)是中药苦参的主要有效成份,具有抗炎、镇痛、免疫调节作用。有实验证明,氧化苦参碱治疗溃疡性结肠炎效果较好<sup>[2]</sup>。我们建立TNBS实验性结肠炎模型大鼠,应用OMT治疗后,检测大鼠肠黏膜细胞因子IL-2和IL-10的变化,以及NF- $\kappa$ B p65的表达。为OMT治疗炎症性肠病提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $\delta$  SD大鼠40只,SPF级,体质量180-225 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,实验动物生产许可证SCKY(鄂)2004-0007,实验动物使用许可证SYXK(鄂)2004-0028。2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitro-benzene-sulfonic acid, TNBS)购自Sigma公司。NF- $\kappa$ B p65多克隆抗体购自Santa Cruz公司(lot: D0907)。SP-9000免疫组化染色试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。大鼠IL-2 ELISA试剂盒和IL-10 ELISA试剂盒购自晶美生物工程有限公司。美沙拉嗪由法国爱的发制药集团生产,规格500 mg  $\times$  10袋/盒。苦参素注射液由天津市生物化学制药厂生产,OMT纯度达98%以上,规格:0.2 g: 2 mL  $\times$  10支/盒。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 对照组10只,从实验开始至实验结束正常饮水、喂食;其他3组各10只,用TNBS造模后24 h,模型组开始肌注与OMT组等体积生理盐水15 d;美沙拉嗪组用美沙拉嗪0.42 g/(kg·d)的蒸馏水溶液1-2 mL ig 15 d;OMT组用OMT注射液肌肉注射15 d,注射剂量63 mg/(kg·d)<sup>[3]</sup>。第16天开始禁食24 h后处死大鼠。

**1.2.2 造模:** 根据文献[4-5],采用TNBS造模法。SD大鼠饲养1 wk适应实验室环境。开始禁食不禁水24 h,20 g/L戊巴比妥钠40-50 mg/kg, ip麻醉,将一直径2.0 mm长约15 cm的橡胶输液管由肛门轻缓插入8 cm,将100 mg/kg TNBS溶于500 mL/L乙醇0.25 mL中,用注射器推入橡胶输液管,注入后将大鼠尾巴提起,持续倒置30 s。结束后使动物平躺,自然清醒,自由饮食。

**1.2.3 标本制备:** 将各组大鼠以20 g/L的戊巴比妥钠ip麻醉后,仰位固定于手术台上,剖腹暴露全结肠。取全结肠沿纵轴切开,用生理盐水冲洗干净,将结肠黏膜平铺于白纸上,观察肠黏膜的病

表 1 OMT治疗后大鼠结肠黏膜NF- $\kappa$ B p65和IL-2, IL-10的变化 (mean  $\pm$  SD)

分组	n	NF- $\kappa$ B(%)	IL-2(ng/L)	IL-10(ng/L)
正常组	10	9.57 $\pm$ 4.31 <sup>b</sup>	30.44 $\pm$ 12.03 <sup>b</sup>	58.92 $\pm$ 3.70 <sup>b</sup>
模型组	8	43.05 $\pm$ 13.80	231.48 $\pm$ 40.78	18.64 $\pm$ 0.65
美沙拉嗪组	10	17.20 $\pm$ 6.54 <sup>b</sup>	110.44 $\pm$ 49.59 <sup>a</sup>	53.05 $\pm$ 1.85 <sup>a</sup>
氧化苦参碱组	10	16.02 $\pm$ 7.27 <sup>b</sup>	102.93 $\pm$ 21.10 <sup>a</sup>	50.13 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组.

变损伤程度. 然后立即用40 g/L的多聚甲醛溶液固定, 然后送武汉市协和医院病理室, 石蜡包埋, 每份蜡块制成厚度6  $\mu$ m的切片HE染色, 镜下评估黏膜损伤程度.

1.2.4 观察指标和检测方法: (1)观察大鼠的体重、大便、毛发光泽度、食欲、活动度、精神状态等, 以及有无死亡情况, 并做记录; (2)结肠大体病理及组织学改变: 用50倍放大镜观察大鼠结肠黏膜的色泽、溃疡、糜烂、出血点、充血等情况. 以病变肠段的病理组织学检查为依据, 观察黏膜有无水肿、充血、糜烂、溃疡、隐窝脓肿, 有无中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞浸润, 以及腺体坏死、杯状细胞减少等改变; (3)IL-2和IL-10的检测: 取新鲜病变结肠组织剪碎, 加上生理盐水, 用匀浆器制成200 g/L匀浆, 用离心机4000 r/min离心20 min, 取上清液, 即为待测标本. 检测方法严格按照大鼠IL-2和IL-10 ELISA试剂盒说明书进行操作. 获得各检测标本的A值. 根据cvxpt32统计软件画出标准曲线, 计算出各标本的浓度; (4)NF- $\kappa$ B p65表达的检测: 用免疫组化S-P法检测NF- $\kappa$ B p65, 组织切片脱蜡; 将玻片置柠檬酸缓冲液中用微波炉进行抗原修复, 水洗; 30 g/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>去离子水孵育10 min, 消去内源性过氧化物酶活性; 滴加100 g/L山羊血清室温下孵育15 min; 滴加1:100浓度的羊抗大鼠NF- $\kappa$ B p65多克隆抗体4 $^{\circ}$ C过夜, PBS液冲洗; 滴加生物素化羊抗大鼠IgG抗体室温孵育15 min, PBS液冲洗; 滴加辣根酶标记的链酶亲和素室温孵育15 min, PBS液冲洗; DAB显色, 苏木素复染后, 封片观察. 显微镜下, 细胞质和细胞核内出现棕黄色或褐色颗粒为阳性反应物, 弥漫分布于黏膜固有层及部分上皮内. 在40倍高倍镜下选取典型视野计数100个细胞, 其中阳性细胞数NF- $\kappa$ B p65计数值, 并以百分率表示.

**统计学处理** 采用SPSS13.0软件进行统计学分析. 实验数据以mean  $\pm$  SD表示, 采用单因素方差分析和最小显著差异 $t$ 检验(LSD-检验), 以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 一般情况 对照组大鼠体重、大便、饮食、活动正常. 其余3组大鼠在TNBS造模后3 d内均出现腹泻、黏液脓血便、肛周大量糊状稀便黏附, 伴进食量减少、体质量下降、毛发干枯、喜静, 可见成堆现象. OMT组大鼠, 经过OMT治疗后第4天体重即恢复到造模前的体质量, 且进食逐渐增多, 1 wk后, 肛周稀便减少, 大便成形, 15 d治疗结束后, 大鼠毛发逐渐恢复光泽, 未见黏液脓血便和稀便. 模型组大鼠稀便未缓解, 量多, 形体消瘦、毛发干枯, 于第9天、第11天各死亡1只, 解剖尸体可见远端结肠粘连、狭窄, 近端结肠扩张、结肠壁增厚.

2.2 结肠大体病理及组织学改变 TBNS诱导的结肠炎病变主要集中在距肛门3 cm以上至8 cm之间, 其中有4只大鼠病变直至回肠末端. 可见结肠黏膜充血、水肿、糜烂、溃疡, 以及瘢痕形成, 结肠扩张、黏膜皱襞变浅. 以模型组最为严重, 可见多发小溃疡、纵径大于0.5 cm溃疡以及肠壁粘连. 美沙拉嗪组和OMT组病变明显减轻可见充血、水肿、糜烂和红色瘢痕. 将病变组织切片HE染色后, 镜下可见模型组: 溃疡浸润深度达黏膜肌层、腺体破坏、杯状细胞减少(图1A). 美沙拉嗪组: 黏膜糜烂, 黏膜下层水肿、充血, 固有层大量中性粒细胞、浆细胞浸润, 黏膜下层水肿、充血(图1B). OMT组: 杯状细胞增多, 黏膜固有层可见淋巴细胞、单核细胞浸润(图1C). 正常组: 正常大鼠结肠病理切片, 黏膜上皮细胞排列整齐, 无炎性细胞浸润和溃疡形成(图1D).

2.3 IL-2和IL-10的检测评分 模型组大鼠结肠黏膜IL-2水平较正常组高, IL-10减少, 正常组与模型组比较差异有显著性( $P < 0.01$ ). 经过OMT治疗后IL-2降低, IL-10增加, OMT组与模型组比较有显著差异性( $P < 0.05$ ). 美沙拉嗪组和OMT组比较, IL-2和IL-10的表达水平均无显著性差异

## ■创新盘点

OMT能减轻IBD大鼠结肠黏膜损伤程度、病理炎症程度, 促进结肠黏膜IL-10的分泌、减少IL-2的生成、阻滞NF- $\kappa$ B p65在细胞核内表达.

### 应用要点

本文从促炎细胞因子和抑炎细胞因子的失衡以及NF- $\kappa$ B激活的角度研究OMT治疗IBD的作用机制,为阐明IBD的发病机制和治疗提供新的线索。

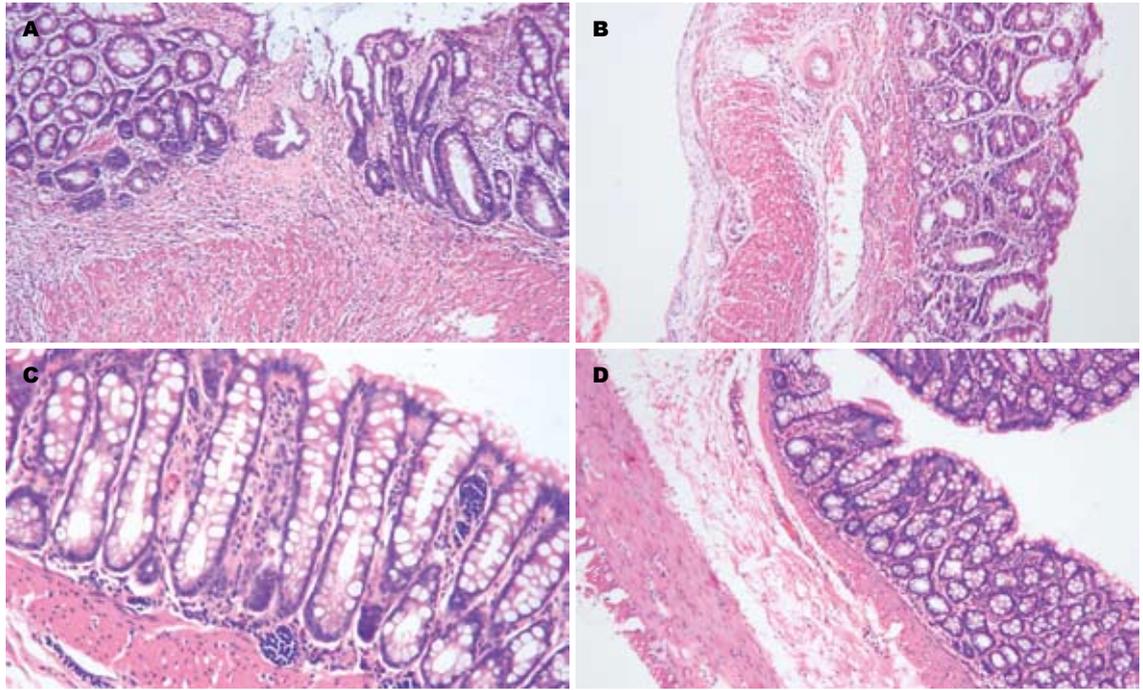


图1 大鼠结肠病理(HE  $\times$  100). A: 模型组; B: 美沙拉嗪组; C: 氧化苦参碱组; D: 正常组.

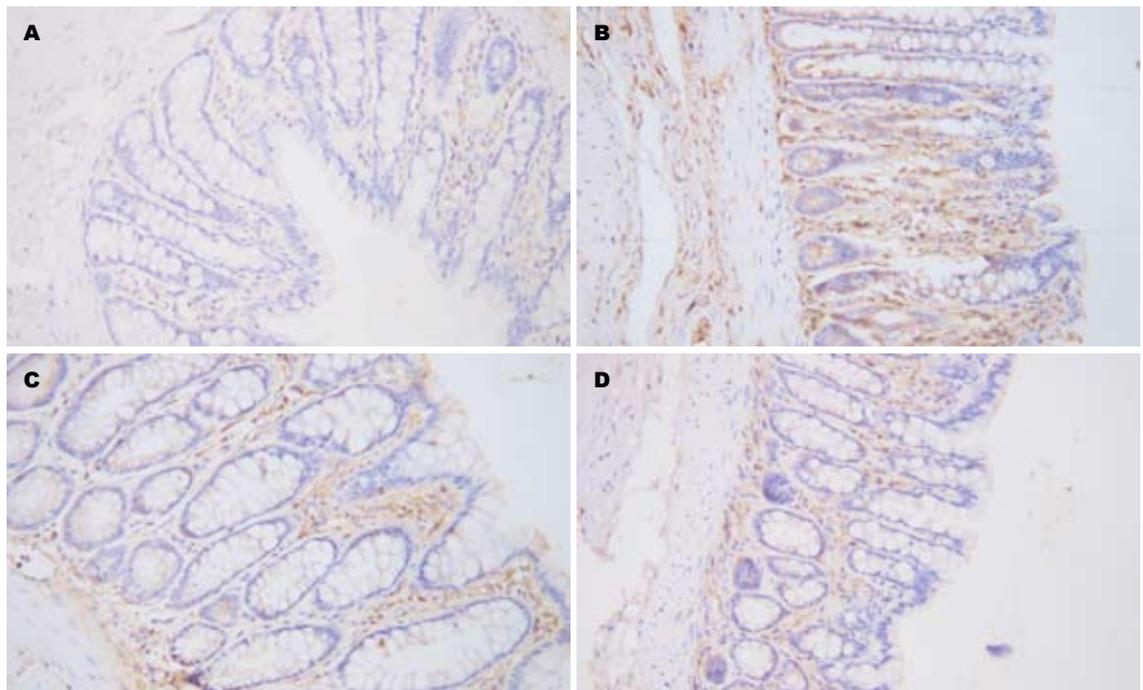


图2 NF- $\kappa$ B p65表达(S-P法  $\times$  200). A: 正常组; B: 模型组; C: 美沙拉嗪组; D: 氧化苦参碱组.

( $P > 0.05$ , 表1).

2.4 NF- $\kappa$ B p65的表达 主要在上皮细胞和巨噬细胞内. 正常组在少量细胞胞质内可见棕黄色颗粒(图2A), 模型组胞质胞核内均见棕黄色和褐色颗粒(图2B), 美沙拉嗪组和OMT组胞质内为棕黄色而胞核内颜色为浅黄色(图2C-D). 评分显示模型组较正常组表达升高, 有显著性差异( $P < 0.01$ ), OMT组与模型组比较NF- $\kappa$ B p65的表

达降低, 差异有显著性( $P < 0.01$ , 表1).

### 3 讨论

目前认为TNBS主要致炎机理是乙醇破坏肠黏膜屏障, TNBS渗入结肠黏膜组织与大分子物质结合, 形成全抗原, 引起肠壁一系列免疫应答和炎症反应. 本实验用TNBS造模后均出现腹泻、黏液脓血便、体质量下降、活动减少等症

状. 病变侵犯全黏膜层, 表现为水肿、充血、糜烂、溃疡, 镜下可见大量中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞浸润. 在病理学和免疫学特征上与活动期炎症性肠病患者相似.

炎症性肠病包括溃疡性结肠炎和克罗恩病, 是多因素、多机制作用的结果<sup>[6]</sup>. 研究发现, 各种细胞因子相互作用形成复杂的, 甚至有自身放大作用的细胞因子网络, 促进炎症反应, 导致黏膜损伤, 在IBD的发生发展中起着十分重要的作用<sup>[7]</sup>. 尤其是促炎细胞因子和抑炎细胞因子的平衡失调被认为是IBD的一个重要发病机制<sup>[8-10]</sup>. IL-2和IL-10与IBD的发病关系密切, 采用基因剔除技术, 仅剔除某一个基因如IL-2或IL-10, 即能导致炎症性肠病. IL-2是由Th1细胞分泌的细胞因子, 是引起T细胞增殖的主要细胞因子, 使T细胞激活并进入细胞分裂, 还可刺激NK细胞的生长和增强杀伤能力, 激发B细胞生长和抗体产生引起细胞免疫反应, 介导炎症的发生发展. IL-10是由单核巨噬细胞产生, 能抑制NK细胞、Th1细胞反应和巨噬细胞因子合成, 是一种抑制性细胞因子. 其能抑制前炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 的分泌, 对抗IFN- $\gamma$ 的多种生物学作用发挥抗炎作用. 另外IL-10可以保护对IBD有抑制作用的淋巴细胞. 动物实验表明, IL-10对IL-10基因缺陷小鼠结肠炎有预防作用<sup>[11]</sup>. 本次实验中, 模型组与正常组比较, 促炎因子IL-2水平异常升高( $P<0.01$ ), 抑炎因子IL-10水平异常降低( $P<0.01$ ), 引起体内免疫反应过强, 持续时间过长, 造成结肠黏膜损坏. 经过OMT治疗后IL-2水平降低, IL-10表达增加, 与模型组比较均有显著性差异( $P<0.05$ ). 与美沙拉嗪组比较无显著性差异( $P>0.05$ ). IL-10增多抑制Th1细胞反应, IL-2水平下降下调细胞免疫反应, 减少促炎细胞因子的分泌, 从而阻止了炎症的发展. 这也许是OMT治疗IBD的作用机制之一.

NF- $\kappa$ B是在进化学上高度保守的一种转录因子, 广泛存在于各种组织中. 位于细胞质中无活性的NF- $\kappa$ B可被多种细胞因子活化, 如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2等<sup>[12]</sup>. 活化的NF- $\kappa$ B进入细胞核内, 与相应靶基因中的启动子或增强子 $\kappa$ B位点结合, 诱导靶基因的转录, 从而直接参与机体对炎症及免疫反应的调控, 这是NF- $\kappa$ B的主要生物学特征. RelA(p65)是NF- $\kappa$ B家族5个成员之一, 是IBD中最重要的促炎单位<sup>[13]</sup>. 溃疡性结肠炎患者结肠黏膜组织的表面上皮细胞、隐窝上皮细胞、血管内皮细胞、单核细胞, 及

巨噬细胞内NF- $\kappa$ B p65的表达是增加的<sup>[14]</sup>. Gan *et al*<sup>[15]</sup>从溃疡性结肠炎患者肠黏膜活检标本中分离到的黏膜固有层单核细胞用NF- $\kappa$ B p65反义寡核苷酸进行培养, 其结果显示NF- $\kappa$ B p65的下调, 阻滞了IL-1 $\beta$  mRNA和IL-8 mRNA的表达, 并且显著的减少了IL-1 $\beta$ 和IL-8的水平. NF- $\kappa$ B在细胞因子的转录和释放中可能起调控作用. 因此, 阻断NF- $\kappa$ B的激活非常重要. 黄秀梅的研究显示OMT对体外培养细胞上清液和体内炎症局部渗出液中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-8具有一定的抑制作用<sup>[16]</sup>. 本实验经OMT治疗处理组大鼠结肠NF- $\kappa$ B的表达显著降低( $P<0.01$ ), 可能是OMT一方面直接阻断NF- $\kappa$ B的激活, 另一方面通过减少NF- $\kappa$ B的活化诱导因素降低了NF- $\kappa$ B p65的表达, 从而快速起到抗炎和黏膜修复作用.

总之, 细胞因子 IL-2、IL-10和NF- $\kappa$ B在IBD的发生发展过程中起着非常重要的作用. OMT通过阻断NF- $\kappa$ B的激活, 减少IL-2的生成, 促进IL-10的分泌, 使大鼠结肠黏膜组织中促炎因子和抑炎因子达到平衡, 发挥抗炎, 保护肠道黏膜的作用. 因而对炎症性肠病起到一定的防治作用.

#### 4 参考文献

- 1 范恒, 寿折星, 吕建芳, 沈霖, 杨胜兰, 陈瑞. 复方苦参结肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎11例. 中国中西医结合消化杂志 2007; 15: 60-61
- 2 郑萍, 牛凤丽, 刘文忠, 施尧. 氧化苦参碱对葡聚糖硫酸钠诱导大鼠结肠炎的抗炎作用机制研究. 中华消化杂志 2003; 23: 207-210
- 3 苗明三. 实验动物和动物实验技术. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 142-150
- 4 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szwczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- 5 朱峰, 钱家鸣, 潘国宗. 细胞免疫反应性炎症性肠病动物模型的建立. 中国医学科学院学报 1998; 20: 271
- 6 邓长生, 夏冰. 炎症性肠病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 4
- 7 Neurath MF, Meyer zum Boschenfelde KH. Protective and pathogenic roles of cytokines in inflammatory bowel diseases. *J Investig Med* 1996; 44: 516-521
- 8 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51: 2-9
- 9 Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000; 51: 289-298
- 10 Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002; 252: 475-496
- 11 褚行琦, 郑家驹, 史肖华. 炎症性肠病的治疗进展. 中华消化杂志 2002; 22: 624
- 12 Miyamoto S, Verma IM. Rel/NF-kappa B/I kappa

#### ■同行评价

本研究内容充实, 文笔流畅, 有一定的可读性, 部分内容表述若能完善则更好.

- B story. *Adv Cancer Res* 1995; 66: 255-292
- 13 Thiele K, Bierhaus A, Autschbach F, Hofmann M, Stremmel W, Thiele H, Ziegler R, Nawroth PP. Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaB/p65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* 1999; 45: 693-704
- 14 刘一品, 李炎清. 核因子- $\kappa$ B的表达在溃疡性结肠炎发病机制中的意义. *胃肠病学* 2006; 11: 103-106
- 15 Gan H, Ouyang Q, Chen Y, Liang F. [The effects of nuclear factor-kappa B p65 antisense oligonucleotides on expression of proinflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis] *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 2003; 20: 268-272
- 16 黄秀梅, 李波. 氧化苦参碱对TNF $\alpha$ , IL-6和IL-8的影响. *中成药* 2001; 25: 903-906

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 •

## 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; 消化系良性疾病(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

## 食管鳞癌survivin表达与放化疗近期疗效的关系

黄伟钊, 刘孟忠, 胡祎, 杨弘, 郑斌, 王耿, 罗孔嘉, 文静, 傅剑华

黄伟钊, 中山大学附属肿瘤医院胸外科, 中山大学附属中山  
医院心胸外科 广东省中山市 528400

刘孟忠, 中山大学附属肿瘤医院放疗科 广东省广州市  
510089

胡祎, 杨弘, 郑斌, 王耿, 罗孔嘉, 文静, 傅剑华, 华南肿瘤  
学实验室, 中山大学附属肿瘤医院胸外科 广东省广州市  
510089

作者贡献分布: 此课题由黄伟钊, 傅剑华及刘孟忠设计; 研究过  
程由黄伟钊, 胡祎, 杨弘, 郑斌, 王耿, 罗孔嘉及文静操作完成;  
研究所用新试剂及分析工具由黄伟钊, 胡祎及杨弘提供; 数据分  
析由黄伟钊, 郑斌, 王耿, 罗孔嘉及文静完成; 本论文写作由黄伟  
钊与傅剑华完成。

通讯作者: 傅剑华, 510089, 广州市东风东路651号, 中山大学附  
属肿瘤医院胸外科. fjh@medmail.com.cn

电话: 020-87343450

收稿日期: 2008-04-07 修回日期: 2008-05-22

接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-07-18

### Relationship between survivin expression and chemoradiotherapy response in esophageal squamous cell carcinoma

Wei-Zhao Huang, Meng-Zhong Liu, Yi Hu, Hong Yang,  
Bin Zheng, Geng Wang, Kong-Jia Luo, Jing Wen,  
Jian-Hua Fu

Wei-Zhao Huang, Department of Thoracic Surgery, Cancer  
Hospital of Sun Yat-Sen University; Department of  
Cardiothoracic Surgery, Zhongshan Hospital of Sun Yat-  
Sen University, Zhongshan 528400, Guangdong Province,  
China

Meng-zhong Liu, Department of Radiology, Cancer  
Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089,  
Guangdong Province, China

Yi Hu, Hong Yang, Bin Zheng, Geng Wang, Kong-jia  
Luo, Jing Wen, Jian-hua Fu, Laboratory of Oncology in  
Southern China, Department of Thoracic Surgery, Cancer  
Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089,  
Guangdong Province, China

Correspondence to: Jian-hua Fu, Department of Thoracic  
Surgery, Cancer Center of Sun Yat-Sen University, 651  
Dongfeng Eastern Road, Guangzhou 510089, Guangdong  
Province, China. fjh@medmail.com.cn

Received: 2008-04-07 Revised: 2008-05-22

Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between  
survivin expression and the chemoradiotherapy  
(CRT) response in esophageal squamous cell  
carcinoma (ESCC).

**METHODS:** The expression of survivin in 112

cases of ESCC tissues were detected using im-  
munohistochemistry (IHC). Relation between  
survivin expression (including nucleus and cy-  
toplasm expression) and short-term response as  
well as its relationship with downstage rate of  
CRT were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** Survivin expression was noted in  
ESCC cytoplasm and nucleus with 65.2% and  
67.8% expression rates respectively. Survivin  
expressed in cytoplasm was not correlated to  
short-term response, but the response of patients  
with nuclear survivin expression was signifi-  
cantly lower than that with nuclear negative  
expression (46.1% vs 80.6%,  $P = 0.026$ ). In neoad-  
juvant CRT group, downstage rates of patients  
with positive and negative nuclear survivin  
were 7/17 and 4/4 respectively.

**CONCLUSION:** Assessment of nuclear survivin  
could provide additional information to identify  
ESCC patients with poor chances of response  
to CRT and candidates for more individualized  
treatment.

**Key Words:** Esophageal neoplasm; Survivin; Chem-  
oradiotherapy; Prognosis

Huang WZ, Liu MZ, Hu Y, Yang H, Zheng B, Wang G,  
Luo KJ, Wen J, Fu JH. Relationship between survivin  
expression and chemoradiotherapy response in  
esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren  
Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2295-2299

### 摘要

**目的:** 探讨survivin表达情况与食管鳞癌原发  
灶的放化疗反应的关系。

**方法:** 用免疫组化法检测112例食管鳞癌中  
survivin的表达情况, 回顾性分析胞质和胞核  
的survivin表达与放化疗近期疗效及放化疗后  
降期情况的关系。

**结果:** survivin的表达可见于肿瘤细胞的胞质或  
/和胞核内, 其中胞核表达率为67.8%, 胞质表  
达率为65.2%; 胞质survivin表达与近期疗效无  
明显关系, 而胞核survivin阴性者放化疗的中

### ■背景资料

目前新辅助性和  
根治性的同期放  
化疗都已经成为  
食管癌标准治疗  
中的重要组成部  
分。但食管癌对放  
化疗的反应存在  
明显的异质性, 仅  
是对放化疗有反  
应的患者才能真  
正获益。故寻找分  
子生物学指标预  
测放化疗反应, 作  
为个体化治疗的  
依据, 至关重要。  
survivin是近年发  
现的一种新的凋  
亡抑制蛋白, 与多  
种肿瘤的预后及  
放化疗敏感性有  
关, 可能成为肿瘤  
诊断和治疗的新  
靶点。

### ■同行评议者

谭群友, 副教授,  
中国人民解放军  
第三军医大学大  
坪医院全军胸外  
科中心

## ■研发前沿

目前survivin与食管癌放疗敏感性研究主要是来源于实验室的研究以及个别小样本的临床研究,有一定提示作用,但临床意义仍不明确,需更多的临床研究去深入探讨。survivin在食管癌和正常食管黏膜中的表达存在明显差异,可能成为有效预测食管癌放疗敏感性的分子生物学指标。

期有效率明显高于阳性者(80.6% vs 46.1%,  $P = 0.026$ )。术前放疗化疗组中,核survivin阳性者与阴性者放疗化疗后降期的比例分别为7/17和4/4。

**结论:** 检测核survivin的表达情况可能作为预测食管鳞癌对放疗化疗疗效的有效参考指标。

**关键词:** 食管癌; Survivin; 放疗; 预后

黄伟钊, 刘孟忠, 胡伟, 杨弘, 郑斌, 王耿, 罗孔嘉, 文静, 傅剑华. 食管鳞癌survivin表达与放疗化疗近期疗效的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2295-2299

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2295.asp>

## 0 引言

食管鳞癌是我国常见的恶性肿瘤之一。新辅助性和根治性的同期放疗化疗都已经成为食管鳞癌标准治疗中的重要组成部分。但不同的患者对放疗化疗的敏感性也不同,仅对放疗化疗有反应的患者才能从中获益,所以,寻找分子生物学指标作为个体化治疗的依据,至关重要。survivin是近年发现的一种新的凋亡抑制蛋白,与多种肿瘤的预后相关<sup>[1-3]</sup>,还与肿瘤的放疗化疗敏感性有关,可能成为肿瘤诊断和治疗的新靶点<sup>[4]</sup>。本研究旨在通过对接受同期放疗化疗的一组食管鳞癌病例进行回顾性研究,从临床疗效和病理学改变两个层面探讨survivin表达情况与食管鳞癌原发灶的放疗化疗反应之间的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集中山大学肿瘤医院2001-01/2006-06连续收治的接受同期放疗化疗的食管鳞癌病例,入选病例共112例,其中接受根治性放疗化疗91例,术前放疗化疗+手术21例。其中男性98例,女性14例,男:女为7:1;年龄37-76(平均年龄为56.6±9.1)岁;肿瘤位于颈段15例,胸上段34例,胸中段51例,胸下段7例,多发病灶5例;高分化16例,中分化58例,低分化38例;治疗前临床分期IIa期24例,IIb期2例,III期64例,IV期22例(其中IVa期7例,IVb期15例,均为非区域淋巴结转移)。病例选择标准:A:经病理学确诊为食管鳞癌的初治患者;B:无远处器官转移(包括非区域淋巴结转移者);C:治疗前均行食管镜活检,标本符合实验检测的要求;D:按既定方案完成治疗计划,并可评价疗效;E:既往无使用放疗化疗增敏剂。

**1.2 方法** 全组病例均行两程化疗,同期放疗,常规分割,连续放疗。其中根治性同期放疗化疗91例,

化疗均采用PF方案(DDP 20 mg/(m<sup>2</sup>·d), D1-D5, D22-D26; 5-FU 800 mg/(m<sup>2</sup>·d) D1-D3, D22-D24)。原发灶实际放疗剂量54-70 Gy,平均63.5±4.3 Gy。术前放疗化疗并手术21例,化疗采用PF方案(同根治性放疗化疗组);原发灶实际放疗剂量均为40 Gy。放疗化疗结束后4 wk进行手术,手术均采用经右胸、上腹食管大部分切除、食管胃左颈吻合术(三切口),并常规行二野淋巴结清扫,均为根治性切除(图1)。

**1.2.1 疗效评估:** 于放疗剂量达到40 Gy及完成两程化疗后进行疗效评价,本研究中称为中期疗效,此时两组患者接受的放疗化疗剂量相等,故予以合并分析。通过检查食管吞钡、CT检查,采用RECIST(response evaluation criteria in solid tumors, RECIST)标准<sup>[5]</sup>进行评价。具体标准如下:完全缓解(CR):食管吞钡示原发灶消失,食管壁柔软,钡剂通过顺利,胸部CT扫描食管壁厚度<5 mm,原肿大淋巴结消失,无新病灶出现;部分缓解(PR):根据食管吞钡、胸部CT扫描测得食管原发灶基线最长径减少≥30%;疾病稳定(SD):根据食管吞钡、胸部CT扫描测得食管原发灶基线减少未达PR,或增大未达PD;疾病进展(PD):根据食管吞钡、胸部CT扫描测得食管原发灶基线最长径总和增大≥20%,或出现一个或多个新病灶。

**1.2.2 免疫组化方法:** 取治疗前肿瘤原发灶的活检标本;一抗采用survivin兔抗人mAb,购自北京中杉公司编号:ZA-0458。通用型SP系列工作液试剂盒(北京中杉生物技术公司,编号:SP-9000)。采用SP免疫组化方法,主要步骤:石蜡切片,常规脱蜡水化,微波修复抗原15 min,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸泡10 min,3%正常羊血清孵育20 min,依次加一抗4℃过夜,二抗(生物素标记)37℃ 30 min,三抗(辣根酶标记链霉卵白素)30 min, DAB显色,苏木精复染,脱水封片。病理玻片由有经验的病理科医师负责,并在不清楚患者临床资料的情况下阅片。用PBS代替第I抗体作为阴性对照。由于survivin蛋白在肿瘤细胞的胞质和胞核均有表达,为研究需要,阅片时分别对胞质和胞核的表达情况做单独记录,survivin表达的肿瘤细胞数超过5%者,视为阳性表达。

**统计学处理** 统计学分析采用SPSS13.0 for Windows软件包。不同组间的疗效情况比较采用 $\chi^2$ 检验或Fisher's精确检验;分析影响食管鳞癌放疗化疗反应的相关因素采用Logistic回归分析; $P < 0.05$ 时认为有统计学差异。

## ■相关报道

目前有关细胞学的研究已报道,采用RNA干扰技术,沉默survivin蛋白的表达,能有效提高包括肺大细胞癌、腺癌以及直肠癌等细胞株的放疗、化疗敏感性。在食管癌中,为数不多的研究表明核survivin的表达是食管鳞癌预后的不良因素,胞质survivin表达则与预后无明显相关性。至于survivin表达与食管癌放疗化疗敏感性关系的研究则鲜有报道。

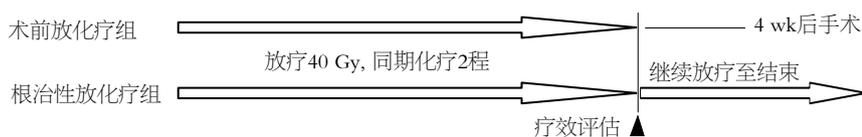


图 1 治疗方案及疗效评估时间示意图。

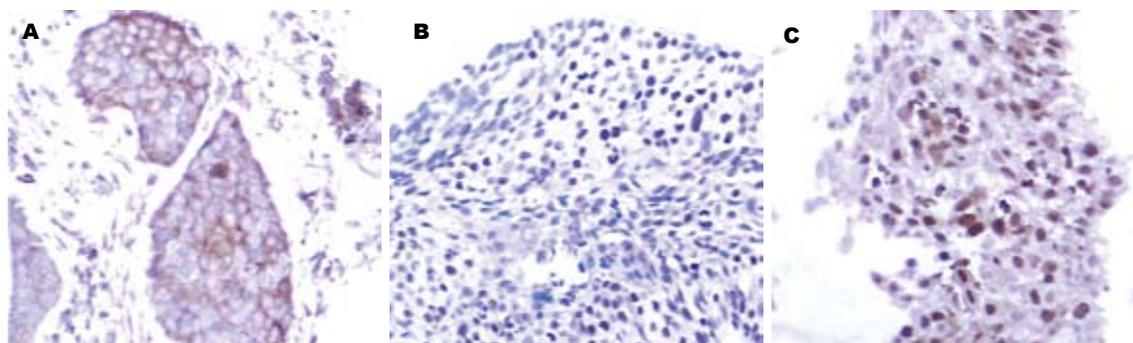


图 2 survivin的表达( $\times 200$ )。A: 胞质; B: 胞核; C: 胞质和胞核均见survivin表达。

**■创新盘点**  
本研究采用免疫组化的方法检测survivin蛋白的表达情况,虽然不能明确区分三种异构体,但从细胞定位上发现核survivin表达对食管鳞癌的放化疗更具临床意义,可能与三种异构体的不同细胞定位有关;另外,本研究分别从放化疗的临床疗效和病理学改变两个层面上探讨survivin表达与食管鳞癌放化疗反应的关系,对survivin的价值有更全面的评价。

表 1 survivin在胞质和胞核中的表达(n)

		胞核		合计
		阳性	阴性	
胞质	阳性	46	27	73(65.2%)
	阴性	30	9	39
合计		76(67.8%)	36	112

表 3 胞质survivin表达与食管鳞癌放化疗反应的关系

胞质survivin	中期疗效		合计	有效率(%)
	CR/PR	SD/PD		
阴性	23	16	39	58.9
阳性	41	32	73	56.2
合计	64	48	112	57.1

表 2 胞核survivin表达与食管鳞癌放化疗反应的关系(n)

胞核survivin	中期疗效		合计	有效率(%)
	CR/PR	SD/PD		
阴性	26/29	10/7	36	80.6
阳性	38/35	38/41	76	46.1
合计	64	48	112	57.1

2 结果

2.1 疗效 中期临床疗效评估CR 8例, PR 56例, SD 45例, PD 3例, 总有效率(CR+PR)为57.1%。

2.2 survivin免疫组化的表达 survivin的表达可见于肿瘤细胞的胞质或/和胞核内(图2), 其中胞核内表达阳性73例(67.8%), 胞质表达阳性76例(65.2%, 表1)。

2.3 survivin表达与食管鳞癌放化疗反应的关系 胞核survivin阴性者对放化疗的有效率明显较阳性者高( $P = 0.026$ , 表2); 胞质survivin表达阴性者和阳性者的放化疗有效率无统计学差异( $P > 0.05$ , 表3)。

2.4 Logistic回归分析 以中期疗效作为应变量, 把年龄、性别、肿瘤长度、肿瘤部位、分化程度、治疗前T、N、M状态、临床分期、sur-

vivin的核表达及胞质表达等参数作为Logistic回归分析. 结果显示, 与食管鳞癌放化疗反应相关的独立因素为肿瘤的分化程度和核survivin表达情况(表4)。

2.5 survivin表达与食管鳞癌放化疗后降期的关系 对21例接受术前放化疗并手术的病例, 对手术标本作常规病理检查, 进行术后病理分期. 0期(pCR)5例, I期1例, II a期6例, II b期3例, III期6例. 对照治疗前分期, 放化疗后得到降期者11例, 无降期者10例. 核survivin表达与放化疗后降期的关系(表5)。

3 讨论

survivin可以单独或同时表达于肿瘤细胞的胞质和胞核内. 目前认为, survivin表达在不同的部位, 可能有不同的临床意义, 故本研究把胞质和胞核的survivin表达情况分别记录和研究. 本研究中, survivin在胞质的表达率为65.2%, 在胞核的表达率为67.8%, 与文献[6-9]报道基本相符。

survivin的3个异构体的不同细胞定位, 可能是造成其核内表达与胞质内表达的临床意义存在差别的原因之一. 本研究结果表明, survivin对放化疗的影响作用与他在细胞内的不同定位

**■应用要点**  
本研究结果表明, survivin对放化疗的影响作用与他在细胞内的不同定位有关, 核内的survivin表达, 提示食管鳞癌可能对放化疗反应较差. 临床上, 检测核survivin的表达情况可能作为预测食管鳞癌对放化疗疗效的有效参考指标, 有助于对患者治疗的正确选择和预后的准确评估。

### ■名词解释

RECIST(response evaluation criteria in solid tumors)标准: 1998年欧洲癌症研究与治疗协会(EORTC)、美国国立癌症研究所(NCI)及加拿大国立癌症研究所(NCIC)提出抗肿瘤药对实体肿瘤客观疗效评定新标准(RECIST), RECIST采用单径测量的原则, 即仅以肿瘤的最大长径评价肿瘤的变化, 最大长径缩小30%以上为PR, 增加30%以上(多个靶病变最大径之和增加20%以上)为PD.

表 4 与食管鳞癌放化疗疗效相关的多因素分析

变量	P值	风险比	95% CI
性别	0.189	2.803	0.603-13.032
年龄	0.556	2.046	0.213-19.691
肿瘤部位	0.594	0.876	0.539-1.424
肿瘤长度	0.512	0.936	0.769-1.140
分化程度	0.046	0.243	0.061-0.972
T分期	0.774	1.356	0.170-10.802
N分期	0.530	0.643	0.162-2.554
M分期	0.911	0.874	0.083-9.188
临床分期	0.758	1.312	0.233-7.380
胞质survivin	0.774	1.356	0.170-10.802
胞核survivin	0.000	6.589	2.306-18.821
常数	0.399	0.098	

有关, 核内survivin阳性表达者放化疗有效率较低, 而胞质survivin表达与否对放化疗的疗效无明显影响. 由于人类survivin基因的不同转录方式, 可能产生3种survivin的异构体<sup>[10]</sup>, 包括全长survivin、survivin-2B和survivin-ΔEx-3, 前二者主要定位于细胞内, 后者存在于胞核内, 但目前对于三种异构体各自的功能和定位的认识仍然是非常有限. 本研究采用免疫组化的方法检测survivin蛋白的表达情况, 虽然不能明确区分三种异构体, 但从细胞定位上发现核survivin表达对食管癌的放化疗更具临床意义, 可能与三种异构体的不同细胞定位有关, 有必要采取更精确的方法对三种异构体进行深入的研究, 以便明确其细微作用.

survivin表达与多种肿瘤的放化疗的敏感性有密切关系. 本研究组的一项研究<sup>[11]</sup>表明: 靶向survivin siRNA可以有效抑制人大细胞肺癌多药耐药株H460/cDDP的survivin表达, 并使其Taxol IC<sub>50</sub>值减少35.70%(8.51±0.935 mg/L,  $P=0.006$ ), 有效提高H460/cDDP对Taxol的敏感性. Rödel *et al*<sup>[12]</sup>研究两个放疗抵抗的直肠癌细胞株SW480和HCT-15, 干扰其survivin mRNA的表达后, 两个细胞株的放疗后的凋亡指数显著升高. 而食管癌中则尚无相关研究. 本研究分别从放化疗的临床疗效和病理学改变两个层面上探讨survivin表达与食管癌放化疗反应的关系, 发现核survivin的表达是影响食管鳞癌放化疗反应的因素之一. 核survivin阴性者放化疗的中期有效率为80.6%, 而阳性者有效率仅为46.1%, 差异有统计学意义; 术前放化疗组中, 4例核survivin阴性者放化疗后肿瘤的分期均有所下降, 且其中3例为pCR, 而17例核survivin阳性者中, 得到降期

表 5 核survivin表达情况与食管鳞癌放化疗后降期的关系<sup>(n)</sup>

核survivin	降期情况		合计
	有降期(病理完全缓解)	无降期	
阴性	4(3)	0	4
阳性	7(2)	10	17
合计	11(5)	10	

者仅占41.2%(7/17), 由于该组病例数较少, 未能得出统计学差异( $P=0.09$ ), 但已显示一定趋势. 这提示核survivin阳性者可能对放化疗的敏感性较低. 理论上, survivin具有抑制细胞凋亡和调节细胞周期及细胞分裂的双重功能, 当其过度表达时, 肿瘤细胞出现异常增殖, 对正常凋亡信号的刺激不敏感, 肿瘤细胞局部浸润和远处转移的能力增强. 核survivin表达, 可能使肿瘤细胞对放疗和化疗所诱导的凋亡信号不敏感, 以致放化疗的疗效下降.

Urschel *et al*<sup>[13]</sup>及Fiorica *et al*<sup>[14]</sup>两个Meta分析的结果表明, 同期放化疗并手术的治疗模式较单纯手术能有效提高食管癌的远期生存率. Brücher *et al*<sup>[15]</sup>报道一组接受术前同期放化疗并手术的食管鳞癌病例, 预后分析结果表明, 放化疗后的组织学反应是影响食管鳞癌预后的独立因素, 组织学反应明显者, 预后较好. 临床上, 检测survivin的表达情况有助于对患者治疗的正确选择和预后的准确评估. 对局部晚期的食管鳞癌病例, 核survivin阴性者的放化疗有效率明显较高, 从术前放化疗中获益的机会较大, 可考虑接受术前放化疗后再行手术治疗; 反之, 提示对放化疗的反应率低, 从术前放化疗中获益的机会较小, 应更倾向于争取根治性的手术治疗.

总之, survivin对放化疗的影响作用与他在细胞内的不同定位有关, 核内的survivin表达, 提示食管鳞癌可能对放化疗反应较差. 检测核survivin的表达情况可能作为预测食管鳞癌对放化疗疗效的有效参考指标.

## 4 参考文献

- Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001; 163: 109-116
- Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 1077-1083
- Lehner R, Lucia MS, Jarboe EA, Orlicky

D, Shroyer AL, McGregor JA, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10: 134-138

4 陆才德, 戴德坚, 孟化. survivin-值得关注的抗癌治疗靶. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 701-705

5 Therasse P, Arbusk SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 205-216

6 Mega S, Miyamoto M, Li L, Kadoya M, Takahashi R, Hase R, Kaneko H, Shichinohe T, Kawarada Y, Itoh T, Morikawa T, Kondo S. Immunohistochemical analysis of nuclear survivin expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2006; 19: 355-359

7 Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Höpfner M, Germer CT, Schertübl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88: 115-119

8 Rosato A, Pivetta M, Parenti A, Iaderosa GA, Zoso A, Milan G, Mandruzzato S, Del Bianco P, Ruol A, Zaninotto G, Zanovello P. Survivin in esophageal cancer: An accurate prognostic marker for squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 1717-1722

9 高思海, 赵金平, 潘铁成, 李军. 凋亡抑制基因survivin在食管鳞癌中的表达及其与p53基因表达相关性研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1468-1470

10 Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 1999; 59: 6097-6102

11 Yang H, Fu JH, Hu Y, Huang WZ, Zheng B, Wang G. [Relationship between survivin expression and chemosensitivity of human lung cancer cells] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 1934-1937

12 Rödel F, Hoffmann J, Distel L, Herrmann M, Noisternig T, Papadopoulos T, Sauer R, Rödel C. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 4881-4887

13 Urschel JD, Vasan H. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. *Am J Surg* 2003; 185: 538-543

14 Fiorica F, Di Bona D, Schepis F, Licata A, Shahied L, Venturi A, Falchi AM, Craxi A, Cammà C. Preoperative chemoradiotherapy for oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2004; 53: 925-930

15 Brücher BL, Becker K, Lordick F, Fink U, Sarbia M, Stein H, Busch R, Zimmermann F, Molls M, Höfler H, Siewert JR. The clinical impact of histopathologic response assessment by residual tumor cell quantification in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 2006; 106: 2119-2127

■同行评价  
本研究统计学处理与结果可靠, 讨论较充分, 结论明确, 具有一定的临床指导意义。

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 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-18)

## 伊立替康联合顺铂治疗晚期食管癌27例

梅齐, 汪勇, 李睿, 陈元

### ■背景资料

食管癌是常见的恶性肿瘤之一, 预后极差, 50%的患者在诊断时已为晚期, 治疗目前以DF方案最为常用。近年来, 随着抗癌新药的上市, CPT-11、泰索帝、奥沙利铂等广泛应用于食管癌的治疗, 尤其是难治性晚期食管癌。

梅齐, 汪勇, 李睿, 陈元, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心 湖北省武汉市 430030

作者贡献分布: 此课题由陈元及梅齐设计; 研究过程由梅齐, 汪勇及李睿操作完成; 研究所用分析工具由梅齐提供; 数据分析由梅齐及汪勇完成; 本论文写作由梅齐, 汪勇及陈元完成。

通讯作者: 陈元, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心, chenyan008@163.com

电话: 027-83663502

收稿日期: 2008-03-18 修回日期: 2008-04-24

接受日期: 2008-05-05 在线出版日期: 2008-07-18

### Irinotecan in combination with cisplatin in treatment of advanced esophageal cancer: an analysis of 27 cases

Qi Mei, Yong Wang, Rui Li, Yuan Chen

Qi Mei, Yong Wang, Rui Li, Yuan Chen, Cancer Center, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Yuan Chen, Cancer Center, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. chenyan008@163.com

Received: 2008-03-18 Revised: 2008-04-24

Accepted: 2008-05-05 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To compare short-term effects of treatments of cisplatin (IP) either in combination with irinotecan or with 5-fluorouracil (DF) as well as its adverse effects in advanced esophageal cancer patients.

**METHODS:** Fifty-nine esophageal cancer patients were allotted from July 2006 to November 2007 either to treatment group (IP group) or control group (DF group). In IP group ( $n = 27$ ), patients received cisplatin plus Irinotecan treatment while the control group ( $n = 32$ ) received 5-fluorouracil (DF) plus cisplatin treatment. Treatment was recycled every 21 days. Chemotherapy response was evaluated after 2 cycles according to RECIST standard and adverse effects were evaluated by WHO standard.

**RESULTS:** The differences in response rate (44.4% vs 28.1%,  $P < 0.05$ ) and control rate (81.5%

vs 53.1%,  $P < 0.05$ ) between the IP group and the DF group were statistically significant. The most common adverse effects included nausea and vomiting (88.8% vs 90.6%,  $P > 0.05$ ) without statistically significant difference detected; the second most was myelosuppression with statistically significant difference detected (77.7% vs 46.8%,  $P < 0.05$ ) and the third most was diarrhea (33.3% vs 9.4%,  $P < 0.05$ ) with statistically significant difference detected.

**CONCLUSION:** For advanced esophageal cancer patients, IP treatment achieves better therapeutic effects than DF treatment. It is effective and its toxicity is tolerable, which should be recommended for wide application.

**Key Words:** Irinotecan; Advanced esophageal cancer; Adverse effects

Mei Q, Wang Y, Li R, Chen Y. Irinotecan in combination with cisplatin in treatment of advanced esophageal cancer: an analysis of 27 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2300-2303

### 摘要

**目的:** 观察伊立替康联合顺铂方案(IP)和顺铂联合氟尿嘧啶(DF)方案治疗晚期食管癌的近期疗效及毒副作用。

**方法:** 收集我科2006-07/2007-11晚期食管癌患者59例病例资料, 比较在疗效和副反应间的差异。其中治疗组27例, 采用IP方案, 对照组32例, 采用DF方案, 21 d为1周期。在化疗期间均常规水化利尿, 完成至少2周期化疗后进行评价疗效。

**结果:** IP方案组与DF方案组间有效率(44.4% vs 28.1%,  $P < 0.05$ )及控制率(81.5% vs 53.1%,  $P < 0.05$ )差异有显著性。主要的毒副作用为恶心呕吐, IP方案组发生率为88.8%, DF方案组发生率为90.6%, 无统计学差异; 其次为骨髓抑制, IP方案组发生率为77.7%, DF方案组为46.8%, 差异有显著性( $P < 0.05$ ); 再次为腹泻, IP方案组发生率为33.3%, DF方案组为9.4%, 差异有显著性( $P < 0.05$ )。

### ■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

**结论:** IP方案较DF方案治疗晚期食管癌增加疗效, 同时也增加了血液系统毒性和腹泻的发生率, 但副反应临床上患者尚可以耐受, 值得推广应用。

**关键词:** 伊立替康; 晚期食管癌; 副反应

梅齐, 汪勇, 李睿, 陈元. 伊立替康联合顺铂治疗晚期食管癌27例. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2300-2303  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2300.asp

## 0 引言

食管癌是常见的恶性肿瘤之一, 病理类型以鳞癌和腺癌为多见. 在亚洲食管鳞癌是主要的病理类型, 占90%以上. 食管癌的预后极差, 50%的患者在诊断时已为晚期, 自然病程仅6-8 mo, 5年生存率5%-7%<sup>[1-2]</sup>, 即使是分期很早的患者, 仍有近50%在5年内复发. 因此, 近年来各国学者不断研究探讨其有效的治疗方法, 以期改善食管癌患者的生活质量和延长生存期. 2007年美国NCCN指南推荐对于晚期食管癌采用以顺铂(cisplatin, DDP)、多西紫杉醇(DTX)、伊立替康(irinotecan, CPT-11)、奥沙利铂(OXA)为基础的联合化疗方案. CPT-11也是近年来应用于食管癌治疗的新药之一, 其单药疗效为14%<sup>[3]</sup>, 与DDP联合方案有效率为57%左右<sup>[4,12]</sup>, IV度中性粒细胞下降和呕吐发生率仅为9%和11%. 我科自06年以来便尝试应用伊立替康联合顺铂(IP)方案治疗晚期食管癌, 取得较好的临床反响. 本文收集我科自2006-07/2007-11共59例晚期食管癌患者病例资料, 其中27例应用IP方案化疗, 比较该方案与同期32例应用顺铂联合氟尿嘧啶(DF)方案的患者在疗效和副反应间的差异.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 59例患者均经病理学或细胞学检查确诊为晚期食管癌, 入组之前未经化疗. 并有可观察测量的临床病灶(体表病灶、X线、CT、MRI)等. 其中, IP组27例, DF组32例. 鳞癌51例(其中IP方案组23例, DF方案组28例), 腺癌6例(IP2例, DF4例), 其他病理类型2例(鳞癌占86.4%). 纵隔淋巴结转移24例(IP组11例, DF组13例), 肝脏转移20例(IP组8例, DF组12例), 肺转移15例(IP组8例, DF组7例), 腹膜后淋巴结转移14例(IP组5例, DF组9例), 颈淋巴结转移11例(IP组6例, DF组5例), 骨转移8例(两组各4例), 甲状腺转移8例(IP组3例, DF组5例); 男性46例(IP组22

例, DF组24例), 女性13例(IP组5例, DF组8例), 男女比3.5:1; 年龄在41-71岁之间, 中位年龄58.4岁(IP组中位年龄58.2岁, DF组58.5岁); 临床分期均为IV期; ECOG评分0-2分; 预计生存时间大于2 mo以上. 查血常规、肝肾功能、电解质及心电图无化疗禁忌, 无危及生命的并发症.

**1.2 方法** IP方案组: CPT-11: 65 mg/m<sup>2</sup> ivgtt第1、8天; DDP: 30 mg/m<sup>2</sup> ivgtt第1、8天; 每21 d为一周期, 每二周期评价疗效. DF方案组: DDP 75 mg/m<sup>2</sup> ivgtt第1天; 5-FU 1000 mg/m<sup>2</sup> ivgtt第1-5天, 每21 d为一周期, 每二周期评价疗效. 化疗期间按常规予以水化利尿. 采用实体瘤疗效评价标准(RECIST)疗效分为: 完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)、进展(PD), 其中完全缓解与部分缓解病例在4 wk后复查相关指标予以确证. 毒副反应评价标准: 按WHO抗癌药物毒性反应分度分为0-IV度.

## 2 结果

**2.1 疗效** IP方案组1人达CR(3.7%), 11人达PR(40.7%), 10人SD(37.0%), 有效率病例数12人, 有效率(CR+PR)44.4%, 控制率(CR+PR+SD)81.5%; DF方案组无人达CR, 9人达PR(28.1%), 8人SD(25.0%), 有效病例数9人, 有效率(CR+PR)28.1%, 控制率(CR+PR+SD)53.1%, IP方案组与DF方案组间有效率(44.4% vs 28.1%;  $P < 0.05$ )及控制率(81.5% vs 53.1%;  $P < 0.05$ ), 经 $\chi^2$ 检验差异有显著性(表1).

**2.2 副反应** 治疗期间监测患者血常规、肝功能, 以及恶心呕吐、腹泻等毒副反应发生情况(表2). 研究发现: 主要的毒副反应为恶心呕吐, IP方案组发生率为88.8%, DF方案组发生率为90.6%, 经 $\chi^2$ 检验无差异(88.8% vs 90.6%,  $P > 0.05$ ); 其次为骨髓抑制, IP方案组发生率为77.7%, DF方案组为46.8%, 经 $\chi^2$ 检验差异有显著性(77.7% vs 46.8%,  $P < 0.05$ ); 再次为腹泻, IP方案组发生率为33.3%, DF方案组为9.4%, 经 $\chi^2$ 检验差异有显著性(33.3% vs 9.4%,  $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

食管癌的治疗目前以DF方案最为常用, 临床研究最为广泛, 文献报道其有效率20%-50%间, 对腺癌和鳞癌同样有效. 其主要不良反应为恶心呕吐及骨髓抑制. 近年来, 随着抗癌新药的上市, CPT-11、泰索帝、奥沙利铂等广泛应用于食管癌的治疗, 尤其是难治性晚期食管癌<sup>[5]</sup>.

## ■ 相关报道

Ilson *et al*用CPT-11 65 mg/m<sup>2</sup>联合DDP 30 mg/m<sup>2</sup>, 第1、8、15、22天静滴, 每6周重复, 治疗36例初治的晚期食管癌患者, 总有效率(CR+PR)达57%. Ajani *et al*采用同样的方案获得相似的结果, 有效率58%, 中位生存时间9 mo.

## ■ 创新盘点

国内较少有伊立替康联合顺铂治疗食管癌的报道, 本研究进一步证实了伊立替康联合顺铂(IP)方案较顺铂联合氟尿嘧啶(DF)方案治疗晚期食管癌增加了疗效, 同时也增加了血液系统毒性和腹泻的发生率, 但副反应临床上患者尚可以耐受, 值得推广应用.

### 应用要点

对晚期食管癌采用IP方案(CPT-11: 65 mg/m<sup>2</sup> ivgtt第1、8天, DDP: 30 mg/m<sup>2</sup> ivgtt第1、8天, 每21 d为一周期), 较DF方案增加了疗效, 但同时应用中需注意血液系统毒性和迟发性腹泻的发生和及时处理。

表 1 疗效评价

	IP方案组(n = 27, %)		DF方案组(n = 32, %)	
	I - II	III - IV	I - II	III - IV
CR	1(3.7)	0(0.0)		
PR	11(40.7)	9(28.1)		
SD	10(37.0)	8(25.0)		
PD	5(18.5)	15(46.8)		
有效率	(44.4 <sup>a</sup> )	(28.1)		
控制率	(81.5 <sup>a</sup> )	(53.1)		

<sup>a</sup>P<0.05 vs DF.

CPT-11为半合成水溶性喜树碱衍生物, 于20世纪80年代初期由日本人Yokokura *et al*合成, 是DNA拓扑异构酶I(TOP I)抑制剂. 其与TOP I-DNA形成稳定的复合物, 从而使断裂的DNA单链不能重新结合, 阻止DNA复制及RNA合成, 从而起到抗肿瘤增殖作用, 其作用为细胞周期S期特异性. 目前CPT-11广泛应用于晚期大肠癌、肺癌、宫颈癌、卵巢癌等. 付剑江等研究表明Celecoxib与喜树碱类衍生物合用可以有效抑制小鼠体内肿瘤生长<sup>[6]</sup>; 郝学志 *et al*用CPT-11联合DDP一线治疗晚期非小细胞肺癌有效率23%<sup>[7]</sup>. 随着研究的深入, 国外学者尝试将其应用于晚期食管癌, 初步研究表明其对晚期食管癌也有效, 尤其对DDP治疗失败的食管癌仍然有较好的有效率<sup>[8]</sup>. Shah *et al*<sup>[9]</sup>研究表明CPT-11联合DDP及贝伐单抗对胃食管连接部腺癌的有效率高达65%, 中位生存期为12.3 mo. Nagahama *et al*<sup>[10]</sup>及Endo *et al*<sup>[11]</sup>报道CPT-11对小细胞食管癌亦有效.

Ilson *et al*<sup>[12]</sup>用CPT-11 65 mg/m<sup>2</sup>联合DDP 30 mg/m<sup>2</sup>, 第1、8、15、22天, 静滴, 每6周重复, 治疗36例初治的晚期食管癌患者, 总有效率(CR+PR)达57%. Ajani *et al*<sup>[13]</sup>采用同样的方案获得相似的结果, 有效率58%, 中位生存时间9 mo. 2004年Ilson *et al*<sup>[14]</sup>在美国完成了一项相似的II期临床研究, 使用相同的药物和剂量, 只是更改给药方式为第1、8天重复(连用2 wk, 休1 wk). 结果有效率偏低36%. 由此认为CPT-11 65 mg/m<sup>2</sup>, 和DDP 30 mg/m<sup>2</sup>, 静滴, 连用4 wk休2 wk方案较连用2 wk休1 wk方案似乎能获得更高的有效率, 但后者的血液学毒性明显低于前者, III-IV度中性粒细胞下降分别为49%和22%, 这有待进一步大型随机对照研究来证实<sup>[15]</sup>. 考虑到亚洲人群的身体状况普遍较西方瘦弱, 毒副反应耐受程度较西方人群差; 经济状况多难以承受长达6 wk的化

表 2 副反应评价

	IP方案组		DF方案组	
	I - II	III - IV	I - II	III - IV
骨髓抑制	17 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	12	3
恶心呕吐	18	6	21	8
腹泻	8 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	3	0
肝功能异常	7	0	6	0

<sup>a</sup>P<0.05 vs DF.

疗方案, 我科在实际应用中采用了3 wk方案.

在病例资料分析中我们观察到, IP方案组27人中有1人达CR(3.7%), 11人达PR(40.7%), 总的临床有效率为44.4%, 与国内外报道的有效率在30%-50%间相吻合. 在化疗的毒副反应方面, 通过对比发现, IP方案增加了骨髓抑制和腹泻的发生率<sup>[16]</sup>, 但经过临床积极支持治疗, 并无严重不良事件发生, 患者尚能耐受.

总之, 晚期食管癌发病以50-70岁多见, 中位发病年龄58岁; 病理类型以鳞癌为主(占85%以上); 患者以男性居多(男女比3.5:1); 受累部位以纵隔淋巴结、肝脏和肺最为常见. 对于晚期食管癌的化疗, IP方案可提高晚期食管癌的化疗有效率和控制率, 对各种病理类型包括鳞癌、腺癌、小细胞癌等均有效; 相对DF方案虽然增加了骨髓抑制和腹泻的发生率, 但临床上尚能接受, 不失为晚期食管癌患者的一种选择.

### 4 参考文献

- Ilson DH. Oesophageal cancer: new developments in systemic therapy. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 525-532
- Anderson SE, Minsky BD, Bains M, Kelsen DP, Ilson DH. Combined modality therapy in esophageal cancer: the Memorial experience. *Semin Surg Oncol* 2003; 21: 228-232
- Enzinger PC, Kulke MH, Clark JW, Ryan DP, Kim H, Earle CC, Vincitore MM, Michelini AL, Mayer RJ, Fuchs CS. A phase II trial of irinotecan in patients with previously untreated advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 2218-2223
- Ajani JA, Baker J, Pisters PW, Ho L, Feig B, Mansfield PF. Irinotecan plus cisplatin in advanced gastric or gastroesophageal junction carcinoma. *Oncology (Williston Park)* 2001; 15: 52-54
- Assersohn L, Brown G, Cunningham D, Ward C, Oates J, Waters JS, Hill ME, Norman AR. Phase II study of irinotecan and 5-fluorouracil/leucovorin in patients with primary refractory or relapsed advanced oesophageal and gastric carcinoma. *Ann Oncol* 2004; 15: 64-69
- 付剑江, 李燕, 李洪燕, 刘悦, 陈晓光. 氧合酶-2抑制剂 celecoxib与喜树碱类衍生物联合用药的实验研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1985-1991
- 郝学志, 李峻岭, 崔成旭, 许建萍, 刘雨桃, 张湘茹. 伊

- 立替康联合顺铂一线治疗晚期非小细胞肺癌. 中国癌症杂志 2005; 15: 250-251
- 8 Burkart C, Bokemeyer C, Klump B, Pereira P, Teichmann R, Hartmann JT. A phase II trial of weekly irinotecan in cisplatin-refractory esophageal cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 2845-2848
  - 9 Shah MA, Ramanathan RK, Ilson DH, Levnor A, D'Adamo D, O'Reilly E, Tse A, Trocola R, Schwartz L, Capanu M, Schwartz GK, Kelsen DP. Multicenter phase II study of irinotecan, cisplatin, and bevacizumab in patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5201-5206
  - 10 Nagahama T, Ando M, Ohbu M, Ami K, Ganno H, Taira M, Ito T. A case report of small cell carcinoma of the esophagus successfully treated by irinotecan and cisplatin. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33: 1869-1871
  - 11 Endo K, Kohnoe S, Toh Y, Haraguchi M, Nishiyama K, Okamura T, Baba H, Maehara Y. A case of esophageal small cell carcinoma with multiple liver metastases responding to chemotherapy with irinotecan plus cisplatin. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 647-650
  - 12 Ilson DH, Saltz L, Enzinger P, Huang Y, Kornblith A, Gollub M, O'Reilly E, Schwartz G, DeGroff J, Gonzalez G, Kelsen DP. Phase II trial of weekly irinotecan plus cisplatin in advanced esophageal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3270-3275
  - 13 Ajani JA, Baker J, Pisters PW, Ho L, Mansfield PF, Feig BW, Charnsangavej C. CPT-11 plus cisplatin in patients with advanced, untreated gastric or gastroesophageal junction carcinoma: results of a phase II study. *Cancer* 2002; 94: 641-646
  - 14 Ilson DH. Phase II trial of weekly irinotecan/cisplatin in advanced esophageal cancer. *Oncology (Williston Park)* 2004; 18: 22-25
  - 15 Lee DH, Kim HT, Han JY, Lee SY, Yoon SJ, Kim HY, Lee JS. A phase II trial of modified weekly irinotecan and cisplatin for chemotherapy-naive patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61: 83-88
  - 16 Michel P, Adenis A, Di Fiore F, Boucher E, Galais MP, Dahan L, Mirabel X, Hamidou H, Raoul JL, Jacob JH, Hellot MF, Prod'homme S, Paillot B. Induction cisplatin-irinotecan followed by concurrent cisplatin-irinotecan and radiotherapy without surgery in oesophageal cancer: multicenter phase II FFCD trial. *Br J Cancer* 2006; 95: 705-709

#### ■同行评价

伊立替康联合顺铂方案治疗晚期食管癌为近年使用的方法, 本研究将该方案与传统的顺铂联合氟尿嘧啶方案作对照观察了其疗效及毒副作用, 结果较为满意, 有一定临床价值。

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 •

### 世界华人消化杂志参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码号. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-18)

## 多烯紫杉醇联合顺铂腹腔化疗治疗进展期胃癌45例

郭花, 朱金水, 张强, 达炜, 孙群, 陈尼维

### ■背景资料

腹腔内化疗是近年新出现的一种高选择性局部化疗方法, 作为进展期胃癌的辅助治疗手段已逐渐应用于临床。

郭花, 朱金水, 张强, 达炜, 孙群, 陈尼维, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科 上海市 200233

作者贡献分布: 本课题由朱金水设计; 临床观察及数据采集由张强, 达炜, 孙群, 郭花及陈尼维完成; 数据分析及文章撰写由郭花完成。

通讯作者: 朱金水, 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内科, zhujs1803@hotmail.com

电话: 021-64369181-8970 传真: 021-64837019

收稿日期: 2008-03-26 修回日期: 2008-04-16

接受日期: 2008-04-21 在线出版日期: 2008-07-18

### Treatment of peritoneal chemotherapy in combination with tocetaxel and cisplatin for advanced gastric cancer: an analysis of 45 cases

Hua Guo, Jin-Shui Zhu, Qiang Zhang, Wei Da, Qun Sun, Ni-Wei Chen

Hua Guo, Jin-Shui Zhu, Qiang Zhang, Wei Da, Qun Sun, Ni-Wei Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Dr. Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com

Received: 2008-03-26 Revised: 2008-04-16

Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the therapeutic efficacy of peritoneal chemotherapy in combination with tocetaxel and cisplatin for advanced gastric cancer.

**METHODS:** Forty-five cases of advanced gastric cancer were treated with tocetaxel in combination with cisplatin by peritoneal chemotherapy. The tumor size, blood routine examination, hepatic and renal function were compared before and after peritoneal chemotherapy. The side effects were observed. All patients were followed-up and their survival time was recorded.

**RESULTS:** The tumor sizes of gastric cancer were decreased dramatically ( $72.4 \pm 22.4 \text{ cm}^3$  vs  $7.23 \pm 2.4 \text{ cm}^3$ ,  $t = 2.946$ ,  $P < 0.01$ ). The average survival time was  $14.0 \pm 1.4$  months, and the short-term therapeutic efficacy was 59%. The peritoneal chemotherapy affected some indexes

in blood routine examination, hepatic and renal function. The main side effects included hair loss, stomatitis, constipation and blood urine.

**CONCLUSION:** Peritoneal chemotherapy in combination with tocetaxel and cisplatin reduces the tumor size effectively, prolongs the survival period, and alleviates the tumor ascites in patients with advanced gastric cancer. It's convenient and safe for advanced gastric cancer treatment.

Key Words: Peritoneal chemotherapy; Gastric cancer; Tocetaxel

Guo H, Zhu JS, Zhang Q, Da W, Sun Q, Chen NW. Treatment of peritoneal chemotherapy in combination with tocetaxel and cisplatin for advanced gastric cancer: an analysis of 45 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2304-2307

### 摘要

**目的:** 探讨多烯紫杉醇及顺铂联合腹腔化疗治疗进展期胃癌的疗效。

**方法:** 对45例进展期胃癌患者进行多烯紫杉醇及顺铂联合腹腔化疗, 比较腹腔化疗前后两组肿瘤体积大小、血常规、肝肾功的变化, 观察腹腔化疗术后的不良反应, 并对所有患者进行随访观察其生存时间。

**结果:** 腹腔化疗后胃癌体积明显缩小( $72.4 \pm 22.4 \text{ cm}^3$  vs  $7.23 \pm 2.4 \text{ cm}^3$ ,  $t = 2.946$ ,  $P < 0.01$ ), 患者中位生存期为 $14.0 \pm 1.4$  mo, 对癌性腹水近期有效率为59%。腹腔化疗对患者血常规、肾功能中部分指标有一定影响, 主要不良反应为脱发、口腔炎、便秘及血尿。

**结论:** 多烯紫杉醇及顺铂联合腹腔化疗治疗胃癌疗效好, 能明显缩小肿瘤体积, 延长患者生存期, 减少癌性腹水, 且操作方便, 不良反应少。

**关键词:** 腹腔化疗; 胃癌; 多烯紫杉醇

郭花, 朱金水, 张强, 达炜, 孙群, 陈尼维. 多烯紫杉醇联合顺铂腹腔化疗治疗进展期胃癌45例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(20): 2304-2307

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2304.asp>

### ■同行评议者

唐晓鹏, 教授, 中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院感染科

## 0 引言

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤, 确诊时大多数已进入胃癌进展期, 手术切除仍是胃癌的主要治疗手段, 尽管能进行广泛淋巴结清除的胃癌根治术, 但术后复发率高达50%-70%, 术后5年生存率仅20%-50%<sup>[1]</sup>. 侵袭和转移是导致胃癌患者死亡的最主要原因, 而导致根治术失败的主要原因是手术时腹腔已存在微小转移灶<sup>[2]</sup>, 因此, 消灭腹腔游离癌细胞成为治疗进展期胃癌的关键问题<sup>[3]</sup>. 腹腔内化疗(intraperitoneal chemotherapy, IPC)是近年新出现的一种高选择性局部化疗方法, 已作为进展期胃癌的辅助治疗手段逐渐应用于临床<sup>[4-5]</sup>, 腹腔内化疗能提高肿瘤局部药物浓度、减轻化疗药物毒性作用. 传统静脉化疗毒副作用较大, 多数晚期胃癌患者体质差, 免疫功能低下, 难以耐受<sup>[6]</sup>. 与传统周围静脉化疗法相比, 具有明显的药代动力学优势.

## 1 材料和方法

1.1 材料 1998-03/2006-02我院消化内科收治进展期胃癌患者45例, 行多烯紫杉醇及顺铂联合腹腔化疗, 其中男性30例, 女性15例, 年龄32-75(平均年龄 $56.2 \pm 1.7$ )岁, 所有患者均经病理学证实为低分化腺癌、管状腺癌或未分化腺癌, 影像学检查未发现肝、肺、脑等转移, 且原发肿瘤无法手术切除或拒绝手术者. 所有病例Karnofsky评分大于50分, 且不伴有严重的心、肝、肺、肾等重要脏器疾病. 所有患者进行多烯紫杉醇及顺铂联合腹腔化疗, 进行腹腔化疗前后比较.

1.2 方法 患者排空膀胱后取仰卧位, 取左髂前上棘与脐连线中外1/3处为穿刺点, 常规消毒铺巾后, 20 g/L利多卡因逐层麻醉, 依次注入化疗药物多烯紫杉醇200 mg及顺铂40 mg. 结束后嘱患者不断变换体位, 使化疗药物在腹腔内均匀分布. 1 mo后进行第二次腹腔化疗, 共行2次腹腔化疗. 第1次腹腔化疗前及第2次腹腔化疗后查患者血常规、肝肾功, 并采用超声胃镜测定肿瘤大小, 肿瘤体积 =  $a \times b^2 \times 0.5$  (a: 肿瘤最大径, b: 前者垂直径). 根据B超结果估计腹水量, 并参照WHO实体肿瘤近期疗效的分级标准进行评定, 完全缓解(CR): 治疗后腹水完全消失, 并维持30 d以上; 部分缓解(PR): 腹水减少50%以上, 并维持4 wk以上; 轻度缓解(MR): 腹水减少在25%-50%之间; 稳定(SD): 腹水无明显增加或减少不超过25%. 以CR+PR为有效. 每次腹腔化疗

结束后监测患者血压、心率、呼吸等, 观察腹胀腹泻、便秘、口腔炎、皮肤、头发、周围神经炎、神志等发生情况. 对所有患者进行随访, 观察其存活时间.

**统计学处理** 采用SPSS11.5统计软件包进行t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 用Kaplan-Meier法计算患者生存率及中位生存期.

## 2 结果

2.1 肿瘤体积 给予腹腔化疗后患者原发病灶肿瘤体积明显缩小, 由治疗前的 $72.4 \pm 22.4 \text{ cm}^3$ 缩小到化疗后的 $7.23 \pm 2.4 \text{ cm}^3$ , 两组间比较有统计学差异( $t = 2.946, P < 0.01$ ).

2.2 生存率及生存曲线 本组患者存活时间为2-72 mo, 中位生存期为 $14.0 \pm 1.4 \text{ mo}$ , 其半年生存率为86.7%(39/45), 1年生存率为62.2%(28/45), 2年生存率为31.1%(14/45), 生存曲线见图1.

2.3 腹水的近期疗效 本组45例患者中, 治疗前有腹水者27例, 腹腔化疗后腹水消退情况: 完全缓解3例, 部分缓解13例, 轻度缓解4人, 稳定7人, 近期有效率为59%.

2.4 血常规 化疗后组患者白细胞、中性粒细胞、血小板较化疗前有所下降, 各组间差异有统计学意义. 但腹腔化疗对患者血红蛋白没有影响, 化疗前组与化疗后组血红蛋白差异无统计学意义.

2.5 肝肾功能 将腹腔化疗前肝功能中AST/ALT比值与化疗后AST/ALT比值进行比较, 两组间无统计学差异( $P > 0.05$ ). 化疗后血清TBIL有所升高, 与化疗前相比其差异有统计学意义( $P < 0.01$ ). 腹腔化疗后患者血清BUN及Cr较化疗前略有升高, 其差异有统计学意义( $P < 0.05$ ).

2.6 不良反应 腹腔化疗后的主要不良反应为脱发30例(67%)、口腔炎32例(71%), 便秘9例(20%), 血尿7例(16%), 周围神经炎1例(2%), 腹腔化疗前后两组患者心功能、肺毒性症状、蛋白尿、腹胀、腹泻、神志改变、皮肤等方面比较没有统计学差异( $P > 0.05$ ).

## 3 讨论

腹腔化疗常用于胃癌、结肠癌术后的辅助治疗, 术中或术后早期应用腹腔化疗能有效防止肿瘤切除术后肿瘤细胞在腹腔脏器表面或腹膜表面种植, 杀灭已存在的微小转移灶, 控制癌性腹水增长, 延缓病情进展<sup>[7]</sup>. 有学者对胃癌腹腔化疗方法进行连续性、多中心、随机、双盲的Meta

### ■ 相关报道

Xu *et al*通过连续、多中心、随机、双盲的Meta分析后得出以下结论: 对胃癌术后患者进行腹腔化疗是有益的.

### ■应用要点

腹腔化疗操作简单安全,全身毒性作用小,并发症少,联合应用多烯紫杉醇及顺铂在预防和减少胃癌术后腹腔内复发和转移、控制癌性腹水和提高患者生存率方面有一定价值。

表 1 腹腔化疗前后两组血常规

分组	白细胞 ( $\times 10^9$ )	粒细胞 ( $\times 10^9$ )	血红蛋白 (g/L)	血小板 ( $\times 10^9$ )
化疗前	5.9 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.1	109.6 $\pm$ 1.5	139.1 $\pm$ 5.3
化疗后	4.6 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	105.0 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	103.7 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 化疗前。

表 2 腹腔化疗前后两组肝肾功能

分组	AST/ALT	TBIL ( $\mu\text{mol/L}$ )	BUN ( $\mu\text{mol/L}$ )	Cr ( $\mu\text{mol/L}$ )
化疗前组	1.22 $\pm$ 0.2	17.0 $\pm$ 1.1	6.2 $\pm$ 0.2	129.8 $\pm$ 4.9
化疗后组	1.23 $\pm$ 0.1	20.8 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	7.9 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	155.3 $\pm$ 9.3 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 化疗前。

分析后得出以下结论:对胃癌术后患者进行腹腔化疗是有益的<sup>[8]</sup>。

本实验发现胃癌腹腔化疗后患者胃癌肿瘤体积明显缩小、腹水明显消退,这与腹腔化疗独特的药代动力学有直接关系,系由于存在血浆-腹膜屏障,腹腔内化疗药物高浓度、长时间存在,能更好的抑制腹腔内胃癌肿瘤的生长。Marchettini研究发现通过ip给予多烯紫杉醇(Docetaxel)90 min后,腹水中多烯紫杉醇的药物浓度是静脉给药时药物浓度的2500倍,腹水中药物时间曲线下面积(AUC)是血浆AUC的976倍,腹腔给药后腹壁、胃、结肠组织中的药物浓度也明显高于静脉给药时的浓度<sup>[9]</sup>。Miyagi *et al*<sup>[10]</sup>实验发现用ip和静脉注射两种不同的方式给予卡铂后,24 h时腹腔给药的AUC值比静脉给药的AUC高17倍。此外,化疗药物经毛细血管和淋巴管吸收后,通过门静脉进入肝脏,增加门静脉内药物浓度,作用于门脉系统中癌细胞和肝实质内的微小转移灶,抑制肿瘤生长<sup>[11]</sup>。

本实验中应用的多西紫杉醇被认为是胃癌的治疗药物中最有希望的药物之一,其单独用药或联合用药均有较好疗效。Yonemura *et al*<sup>[12]</sup>研究表明给裸鼠种植具有高腹膜转移性的MKN-45细胞后,再ip多西紫杉醇能明显延长小鼠的生存期。II期临床试验表明多西紫杉醇与顺铂联合应用能提高反应率<sup>[13]</sup>。目前DCF方案(多西紫杉醇、顺铂、氟尿嘧啶)是美国FDA及欧洲批准的进展期胃癌的一线治疗方案<sup>[14]</sup>。Cntosem *et al*将CF方案与现有治疗胃癌的标准DCF方案进行III期临床试验比较,结果发现DCF方案能显著提高

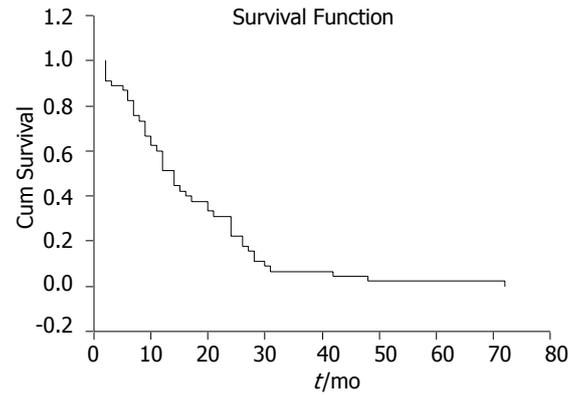


图 1 胃癌患者腹腔化疗后生存曲线。

反应率,明显延长中期生存时间<sup>[15]</sup>。

本实验中多烯紫杉醇和顺铂联合腹腔化疗的主要不良反应包括骨髓抑制、白细胞减少、口腔炎、脱发等。骨髓抑制一般较轻,可通过给予集落细胞刺激因子提高白细胞水平。实验还发现,胃癌患者腹腔化疗前后一过性心、肺、肾功能、腹胀、腹泻、便秘、神志改变、周围神经炎、皮肤等不良反应发生率低,且两组间差异没有统计学意义,这可能与化疗药物通过肝脏的首过消除效应后,代谢成为无毒或低毒形式再进入体循环,能减轻全身不良反应、提高机体耐受能力有关。经笔者多年研究发现,为了预防化疗后的不良反应,在载体液中加入适量利多卡因能起到局部麻醉作用,加入地塞米松能减少化疗药对腹膜的刺激、预防肠黏连、减轻胃肠道反应。

腹腔化疗作为胃癌一种新辅助治疗手段越来越受到人们的重视,其药代动力学方面的优势特点显示了其独特的优越性。该方法操作简单安全,全身毒性作用小,并发症少,联合应用多烯紫杉醇及顺铂对预防和减少胃癌术后腹腔内复发和转移、有效控制癌性腹水和提高患者生存率方面有一定价值。

## 4 参考文献

- 1 Ajani JA. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer. *Oncologist* 2005; 10 Suppl 3: 49-58
- 2 Zhu JS, Song MQ, Chen GQ, Li Q, Sun Q, Zhang Q. Molecular mechanisms of paclitaxel and NM-3 on human gastric cancer in a severe combined immune deficiency mice orthotopic implantation model. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4131-4135
- 3 Sugarbaker PH. Adjuvant intraperitoneal chemotherapy for advanced primary gastric cancer. *Scand J Surg* 2006; 95: 270-273
- 4 Sastre J, Garcia-Saenz JA, Diaz-Rubio E. Chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 204-213
- 5 Allal AS, Zwahlen D, Brundler MA, de Peyer R, Morel P, Huber O, Roth AD. Neoadjuvant

- radiochemotherapy for locally advanced gastric cancer: long-term results of a phase I trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63: 1286-1289
- 6 Chan DC, Liu YC, Chen CJ, Yu JC, Chu HC, Chen FC, Chen TW, Hsieh HF, Chang TM, Shen KL. Preventing prolonged post-operative ileus in gastric cancer patients undergoing gastrectomy and intraperitoneal chemotherapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4776-4781
  - 7 Sugarbaker PH, Yu W, Yonemura Y. Gastrectomy, peritonectomy, and perioperative intraperitoneal chemotherapy: the evolution of treatment strategies for advanced gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 2003; 21: 233-248
  - 8 Xu DZ, Zhan YQ, Sun XW, Cao SM, Geng QR. Meta-analysis of intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2727-2730
  - 9 Marchettini P, Stuart OA, Mohamed F, Yoo D, Sugarbaker PH. Docetaxel: pharmacokinetics and tissue levels after intraperitoneal and intravenous administration in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49: 499-503
  - 10 Miyagi Y, Fujiwara K, Kigawa J, Itamochi H, Nagao S, Aotani E, Terakawa N, Kohno I. Intraperitoneal carboplatin infusion may be a pharmacologically more reasonable route than intravenous administration as a systemic chemotherapy. A comparative pharmacokinetic analysis of platinum using a new mathematical model after intraperitoneal vs. intravenous infusion of carboplatin--a Sankai Gynecology Study Group (SGSG) study. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 591-596
  - 11 Newman E, Potmesil M, Ryan T, Marcus S, Hiottis S, Yee H, Norwood B, Wendell M, Muggia F, Hochster H. Neoadjuvant chemotherapy, surgery, and adjuvant intraperitoneal chemotherapy in patients with locally advanced gastric or gastroesophageal junction carcinoma: a phase II study. *Semin Oncol* 2005; 32: S97-S100
  - 12 Yonemura Y, Endou Y, Bando E, Kuno K, Kawamura T, Kimura M, Shimada T, Miyamoto K, Sasaki T, Sugarbaker PH. Effect of intraperitoneal administration of docetaxel on peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Lett* 2004; 210: 189-196
  - 13 Roth AD, Ajani J. Docetaxel-based chemotherapy in the treatment of gastric cancer. *Ann Oncol* 2003; 14 Suppl 2: ii41-ii44
  - 14 Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Risse ML, Ajani JA. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4991-4997
  - 15 Ajani JA, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Marabotti C, Van Cutsem E. Clinical benefit with docetaxel plus fluorouracil and cisplatin compared with cisplatin and fluorouracil in a phase III trial of advanced gastric or gastroesophageal cancer adenocarcinoma: the V-325 Study Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3205-3209

#### ■同行评价

本研究内容立足临床, 实用性较强, 立题新颖, 有一定的学术价值。

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 •

### 世界华人消化杂志中文摘要要求

**本刊讯** 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-18)

# APE表达与胃癌患者预后的关系

徐世平, 黄海力, 吴本俨, 王孟薇, 尤纬缔

## ■背景资料

无嘌呤无嘧啶核酸内切酶(APE)是人体内一种重要的多功能蛋白,与多种肿瘤的发生、发展和预后相关,国内对此研究不多,胃癌组织中APE表达状况更是未见报道。本文对胃癌患者胃癌组织、正常胃黏膜组织和转移淋巴结APE表达状况进行初步研究,并结合临床资料进行了临床病理因素、生存状况的相关性分析,以期对胃癌的临床研究有所帮助。

徐世平, 黄海力, 吴本俨, 王孟薇, 尤纬缔, 中国人民解放军总医院老年消化科 北京市 100853  
国家自然科学基金资助项目, No. 30370635  
作者贡献分布: 徐世平和黄海力对此文所作贡献均等; 此课题由徐世平, 黄海力, 吴本俨及王孟薇设计; 研究过程由徐世平, 黄海力及尤纬缔操作完成; 临床病例资料的收集和构建由黄海力完成; 免疫组化的研究由徐世平完成; 研究用新试剂由吴本俨与王孟薇提供; 数据分析由徐世平与黄海力完成; 本文写作由徐世平与吴本俨完成。

通讯作者: 吴本俨, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院老年消化科. benyanwu@vip.sina.com

电话: 010-66876265/66876225

收稿日期: 2007-12-25 修回日期: 2008-03-23

接受日期: 2008-04-02 在线出版日期: 2008-07-18

## Relation of APE/Ref-1 expression with gastric cancer prognosis

Shi-Ping Xu, Hai-Li Huang, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Wei-Di You

Shi-Ping Xu, Hai-Li Huang, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Wei-Di You, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30370635

Correspondence to: Dr. Ben-Yan Wu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. benyanwu@vip.sina.com  
Received: 2007-12-25 Revised: 2008-03-23  
Accepted: 2008-04-02 Published online: 2008-07-18

## Abstract

**AIM:** To determine apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/Ref-1) expression and to investigate relationship between its expression changes and prognosis in patients with gastric cancer.

**METHODS:** Two hundred and eight tissue chips of gastric tumor lesions, nonneoplastic mucosa and metastatic lymph nodes were accessed and their APE/Ref-1 protein expression was detected using immunohistochemistry. All patients were followed-up for an average of 48 months. Relationship between APE/Ref-1 expression changes with prognosis was analyzed in detail.

**RESULTS:** Forty-eight-month-follow-up showed 64 deaths, 139 survival and 5 patients missing. The positive ratio of nucleus, cytoplasm

and quality of both positive rates were 96.6%, 71.8%, 71.4%, 97.1%, 21.4%, 21.4% and 98.9%, 10.0%, 10.0% in nonneoplastic mucosa, tumor lesion and metastatic lymph node groups, respectively. In nonneoplastic mucosa, tumor lesion and metastatic lymph nodes groups, APE/Ref-1 expression level and expression changes were not statistically correlated with survival rates.

**CONCLUSION:** Our data indicate that the expression level or the expression changes in different mucosa are of no statistical significance to prognosis.

**Key Words:** APE/Ref-1; Gastric cancer; Immunohistochemistry; Tissue array; Prognosis

Xu SP, Huang HL, Wu BY, Wang MW, You WD. Relation of APE/Ref-1 expression with gastric cancer prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2308-2311

## 摘要

**目的:** 研究胃癌患者不同胃黏膜组织无嘌呤无嘧啶核酸内切酶(APE)的表达水平及其变化与预后的相关性。

**方法:** 利用已构建好的包含208例胃癌患者胃癌、正常胃黏膜和转移淋巴结的组织芯片,用免疫组化方法检测不同组织APE表达水平,结合患者的生存资料分析APE表达水平和表达水平的变化与预后的关系。

**结果:** 患者平均随访时间为48 mo, 死亡64例, 存活139例, 失访5例。在正常胃组织、肿瘤组织和转移淋巴结中, 胞核, 胞质阳性率以及质核均阳性率分别为96.6%、71.8%、71.4%、97.1%、21.4%、21.4%和98.9%、10.0%、10.0%。正常胃组织、肿瘤组织和转移淋巴结中APE的表达水平以及肿瘤组织和正常组织比较表达水平的变化与患者预后也未显示统计学相关。

**结论:** 目前资料未显示APE在不同胃黏膜组织的表达水平和表达水平的变化与胃癌患者预后相关。

## ■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

**关键词:** 无嘌呤无嘧啶核酸内切酶; 胃癌; 组织芯片; 免疫组化; 预后

徐世平, 黄海力, 吴本严, 王孟薇, 尤纬缔. APE表达与胃癌患者预后的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2308-2311  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2308.asp>

## 0 引言

无嘌呤无嘧啶核酸内切酶(apurinic/aprimidinic endonuclease, APE)是人体内一种重要的多功能蛋白, 与多种肿瘤的发生、发展和预后相关. 我们研究了胃癌患者胃癌组织和正常胃黏膜组织 APE表达状况<sup>[1]</sup>, 结果表明: 胃癌组织同正常组织比较, APE胞质和胞核的表达水平均降低, 胞质降低水平更明显. 为了进一步分析 APE表达水平及表达水平的变化是否与患者预后相关, 我们对患者的生存资料进行了分析.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** APE抗体购自R&D Systems Inc., PV-9000二步法免疫组化试剂盒和辣根酶标记羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 组织芯片的构建和免疫组化检测:** 选择208例术后有完整临床资料的胃癌患者, 其中114例无淋巴结转移患者的石蜡标本肿瘤病灶选择两个区域打孔, 对应的切缘作为正常配对黏膜选择两个区域打孔; 94例有淋巴结转移病灶患者再选择两个淋巴结转移灶打孔. 总共点数为 $114 \times 4 + 94 \times 6 = 1020$ 点, 每个点直径1 mm, 点与点之间的间隔为0.4 mm. 免疫组化检测按照PV-9000二步法免疫组化染色试剂盒说明操作.

**1.2.2 图像分析及结果判断:** 胞质或胞核淡黄色至棕褐色为阳性细胞标志, 光学显微镜下分析细胞阳性着色范围和程度. 阳性程度的判别: (1)按细胞免疫组化染色着色深浅打分: 无显色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分; 高倍镜下计数500个肿瘤细胞或者正常胃上皮细胞, 每两个点不足500个细胞者, 计算每2个点包含的全部有效细胞, 有效细胞不足50个者为无效点; (2)按阳性细胞率打分: 阴性为0分, 阳性细胞率 $\leq 10\%$ 为1分,  $11\% - 50\%$ 为2分,  $> 50\%$ 为3分; (3)染色强度与阳性细胞率的乘积: 0分为阴性(-), 1-2分为弱阳性(+), 3-4分为阳性(++), 6-9分为强阳性(+++).

表达变化的判别: 在胃癌和转移淋巴结组织中, APE表达水平同正常组织比较, 如果在同

一级别则视为表达无变化, 相差1个级别视为表达轻度增强或减弱, 相差2个级别以上视为表达明显增强或减弱.

**统计学处理** 采用SPSS10.0统计软件, APE在不同表达状态下生存率曲线的绘制用Kaplan-Meier法, 对生存率影响的单因素分析用Log-rank检验.  $P \leq 0.05$ 为差异具有显著性.

## 2 结果

**2.1 组织芯片中208例患者的背景资料** 208例患者均为首次发现胃癌, 均行胃癌根治性切除, 术前没有经过放化疗或免疫治疗, 影像学检查均未发现有远隔脏器转移; 手术切除彻底, 手术标本残端及切缘均未见有残留癌细胞. 患者平均随访时间为48 mo, 所有患者中死亡64例, 存活139例, 失访5例, 最长生存时间为153 mo. 患者一般情况见表1(其中肿瘤部位: 上-肿瘤位于贲门或胃底, 中-肿瘤位于胃体, 下-肿瘤位于胃窦或幽门; 肿瘤浸润深度: I-肿瘤浸至黏膜或黏膜下层, II-肿瘤浸至肌层或浆膜层). 按照UICC1997年胃癌TNM分期, 患者分期情况见表2.

**2.2 组织芯片免疫组化染色结果** 组织芯片免疫组化封片后观察, 部分组织有脱片, 以每个病灶的两个点至少有一个满足研究需求为标准, 否则剔除. 208例患者有2例由于组织脱落不能进行分析, 其余患者均能进行有效分析. 在胃正常组织中, 胞核阳性率为96.6%, 胞质阳性率为71.8%, 质核均阳性率为71.4%; 在胃癌组织中, 胞核阳性率为97.1%, 胞质阳性率为21.4%, 质核均阳性为21.4%; 在转移淋巴结中, 胞核阳性率为98.9%, 胞质阳性率为10.0%, 质核均阳性为10.0%. 胃癌组织同正常组织比较阳性程度明显较正常组织低, 有35.9%(74/206)患者核表达轻度减弱, 11.2%(23/206)患者核表达明显减弱; 胞质表达在胃癌组织也明显较正常组织弱, 有42.4%(87/206)患者质表达轻度减弱, 21.4%(44/206)患者质表达明显减弱.

**2.3 APE表达与胃癌预后之间的关系** 生存分析显示: APE在正常胃组织、肿瘤组织和转移淋巴结中的表达状况与患者预后未显示统计学相关(图1). 肿瘤组织和正常组织比较APE表达程度的变化与患者预后亦未显示统计学相关(图2).

## 3 讨论

APE是人类细胞中唯一修复DNA上无嘌呤无嘧啶(apurinic/aprimidinic, AP)位点的双功能

**■ 研发前沿**  
APE在不同肿瘤中表达变化的不一致性原因目前尚不清楚.

■相关报道

国内吕嘉春 *et al* 对肺癌的研究未发现肺癌患者的性别、年龄、吸烟和肿瘤家族史等因素与 APE/Ref-1 细胞定位之间有联系。

表 1 胃癌患者的一般情况

	性别		年龄(岁)		部位			浸润深度		淋巴结转移	
	男	女	< 60	≥60	上	中	下	I	II	有	无
<i>n</i>	171	37	93	115	58	40	110	58	150	94	114
%	82.2	17.8	44.7	55.3	27.9	19.2	52.9	27.9	72.1	45.2	54.8

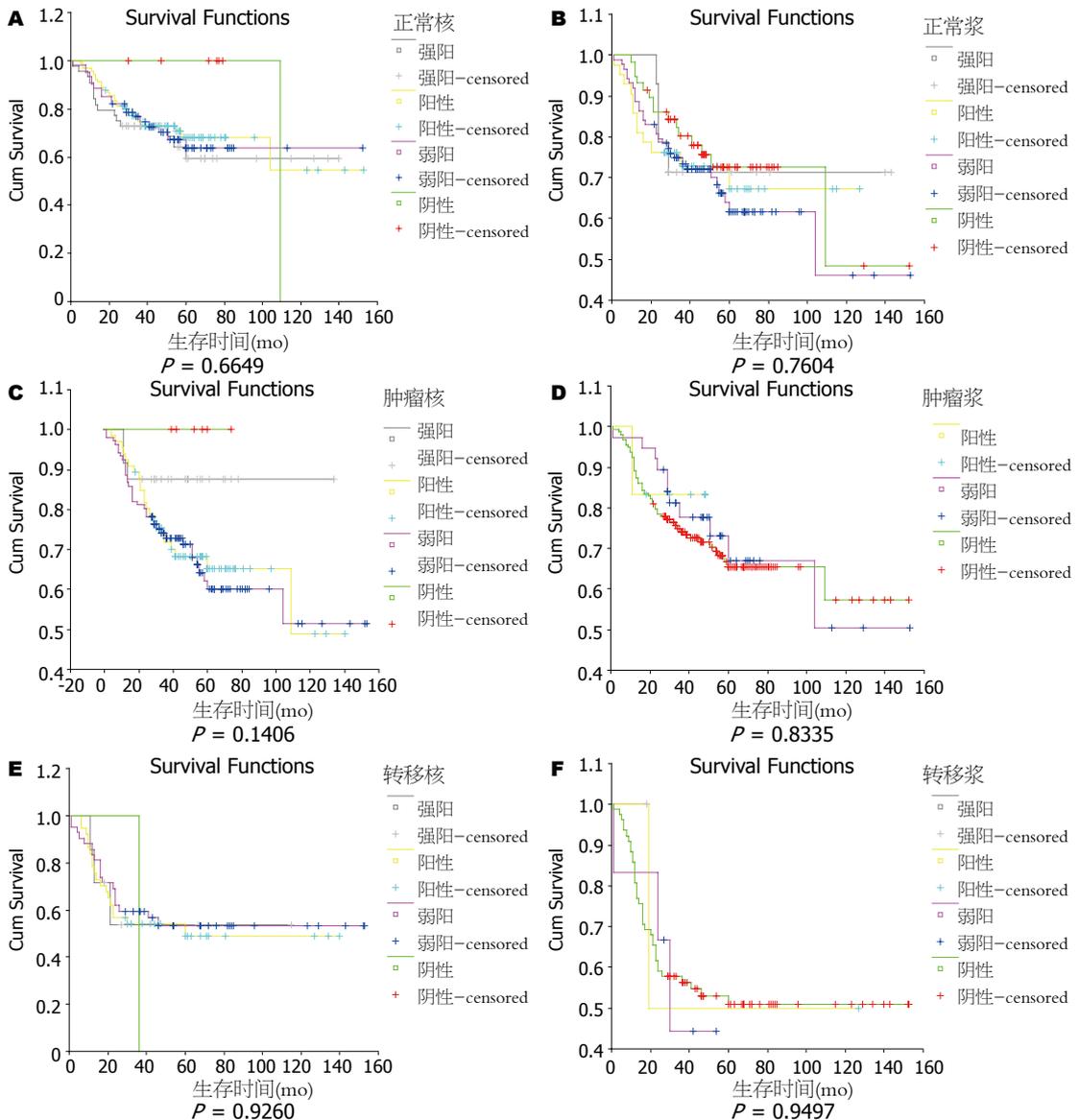
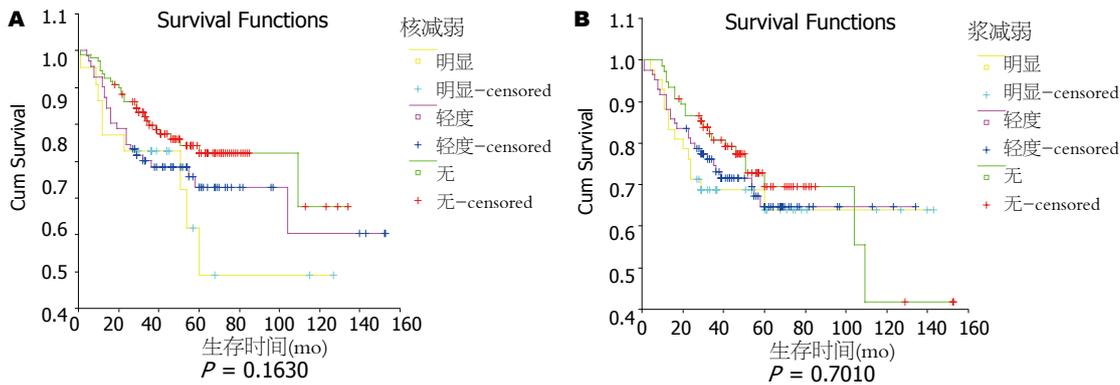


图 1 三种组织中 APE 表达与胃癌患者预后的关系。A: 正常核; B: 正常浆; C: 肿瘤核; D: 肿瘤浆; E: 转移核; F: 转移浆。

酶, APE 蛋白的不正常表达、分布及功能改变与细胞凋亡、肿瘤发生和老年化等病理过程密切相关<sup>[2-4]</sup>。Tanner *et al*<sup>[5]</sup> 为了检测 APE/Ref-1 表达是否和卵巢癌组织病理学和存活相关, 对 141 患者用 APE/Ref-1 单抗检测, 结果表明核表达明显和肿瘤进展相关, III、IV 期患者核表达明显比 I、II 期强, 核 APE/Ref-1 表达也明显与组织学分级相关, 而胞质和间质表达与病情

进展无关, 单变量比率危险模型分析 APE/Ref-1 阳性率、核染色强度或两者联合均与患者预后相关, 但多变量分析则提示 APE/Ref-1 不是一个独立的典型的预后因素, APE/Ref-1 的核表达和质表达呈反变关系, 胞质强阳性的肿瘤核阴性的比率明显高于胞质阴性或弱阳性肿瘤, 表明在卵巢癌形成过程中 APE/Ref-1 核转位削弱。但 Freitas *et al*<sup>[6]</sup> 用 mAb 免疫组化检测卵巢癌上皮,



**同行评价**  
本文选题较新, 研究目的明确, 实验方法科学, 实验数据客观, 有一定的学术价值, 为APE与胃癌预后相关性的研究提供了一定的实验数据。

图2 胃癌组织同正常组织比较核、浆表达减弱程度与患者预后的关系. A: 核表达; B: 浆表达.

表2 肿瘤患者TNM分期

分期	n	%
0	27	13.0
I	74	35.6
II	61	29.3
III	46	22.1
合计	208	100.0

结果发现所有卵巢癌上皮均表达APE/Ref-1, 在原发肿瘤早期和进展期肿瘤、原发部位和转移灶表达阳性率和核染色强度均无差异, 对化疗药物铂类敏感和抵抗的肿瘤表达也无明显差异. Koukourakis *et al*<sup>[3]</sup>对头颈部鳞癌研究发现, APE/Ref-1在正常上皮和基细胞中为核表达, 在肿瘤细胞中无核表达非常常见, 核表达阳性率高(阳性细胞比率超过平均值11%)的肿瘤分化较好, 但常常伴有进展的结节病灶, 且对放化疗反应差, 局部无复发时间短, 生存时间短. Kakolyris *et al*<sup>[4]</sup>对乳腺肿瘤研究发现, 在乳腺腺癌中, 单纯核表达的肿瘤组织, 血管增生活力低下, 无淋巴结肿大, 预后较好, 在胞质表达的病例中血管增生显著, 淋巴结肿大明显, 预后不好, 认为单纯核表达提示组织分化好, 预后好, 而胞质表达预示代谢活跃及高蛋白合成, 病变预后差. 国内吕嘉春 *et al*<sup>[7]</sup>对肺癌研究未发现肺癌患者的性别、年龄、吸烟和肿瘤家族史等因素与APE/Ref-1细胞定位之间有联系. APE在不同肿瘤中表达变化的不一致性的原因目前尚不清楚.

我们的研究提示胃癌组织中APE表达水平和表达减弱的程度与肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移、TNM分期有明显相关<sup>[8]</sup>, 但APE表达与胃癌患者的预后关系研究显示: 在正常胃组

织、肿瘤组织和转移淋巴结中的表达状况与患者预后未显示统计学相关, 肿瘤组织和正常组织比较表达程度的变化与患者预后亦未显示统计学相关. 该结果提示APE表达可能与胃癌患者的预后没有直接的关系, 但由于统计资料中不完全数据(至随访结束时仍存活或失访的患者)较多, 在一定程度上可能影响了结果的分析.

#### 4 参考文献

- 徐世平, 黄海力, 吴本俨. 胃癌组织中APE的表达特征. 解放军医学杂志 2006; 10: 951-953
- Kakolyris S, Kaklamanis L, Engels K, Turley H, Hickson ID, Gatter KC, Harris AL. Human apurinic endonuclease 1 expression in a colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Res* 1997; 57: 1794-1797
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Kakolyris S, Sivridis E, Georgoulas V, Funtzilias G, Hickson ID, Gatter KC, Harris AL. Nuclear expression of human apurinic/aprimidinic endonuclease (HAP1/Ref-1) in head-and-neck cancer is associated with resistance to chemoradiotherapy and poor outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 27-36
- Kakolyris S, Kaklamanis L, Engels K, Fox SB, Taylor M, Hickson ID, Gatter KC, Harris AL. Human AP endonuclease 1 (HAP1) protein expression in breast cancer correlates with lymph node status and angiogenesis. *Br J Cancer* 1998; 77: 1169-1173
- Tanner B, Grimme S, Schiffer I, Heimerdinger C, Schmidt M, Dutkowski P, Neubert S, Oesch F, Franzen A, Kilbl H, Fritz G, Kaina B, Hengstler JG. Nuclear expression of apurinic/aprimidinic endonuclease increases with progression of ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 568-577
- Freitas S, Moore DH, Michael H, Kelley MR. Studies of apurinic/aprimidinic endonuclease/ref-1 expression in epithelial ovarian cancer: correlations with tumor progression and platinum resistance. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4689-4694
- 吕嘉春, 何敏, 廖永德, 王孝养, 黎银燕, 曾波航, 陈家堃, 吴中亮, 施倡元. 氧化/还原因子ref-1在肺癌组织中的细胞定位表达与8-OH-dG的关系. *肿瘤* 2004; 24: 35-37
- 徐世平, 黄海力, 吴本俨, 王孟薇, 王卫华, 尤纬缔. APE表达水平与胃癌临床病理因素的相关性分析. *中华肿瘤防治杂志* 2007; 14: 584-586

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

## 幽门螺杆菌iceA基因型与胃黏膜病变的相关性

张彩凤, 夏永华, 韩宇, 常廷民

### ■背景资料

iceA基因是*H pylori*与胃黏膜细胞接触后诱导表达的基因, 包括iceA1、iceA2两个等位基因, 分别存在于不同的*H pylori*菌株中, 被认为是*H pylori*的又一致病因子。目前国内外关于iceA基因与胃黏膜病变相关性的研究较少。

张彩凤, 韩宇, 常廷民, 新乡医学院第一附属医院消化科 河南省卫辉市 453100

夏永华, 新乡医学院第一附属医院皮肤科 河南省卫辉市 453100

作者贡献分布: 张彩凤对文章的贡献最大, 其他作者贡献率按排序依次递减。此课题由张彩凤、夏永华设计; 研究过程由张彩凤、常廷民、韩宇操作完成; 数据分析由张彩凤、夏永华完成; 本论文写作由张彩凤、夏永华、韩宇完成。

通讯作者: 张彩凤, 453100, 河南省卫辉市, 新乡医学院第一附属医院消化科。zhangcaifeng666@163.com

电话: 0373-4404195

收稿日期: 2008-03-08 修回日期: 2008-04-18

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-07-18

### Correlation between iceA genotypes of *Helicobacter pylori* and gastric mucosal lesion

Cai-Feng Zhang, Yong-Hua Xia, Yu Han, Ting-Min Chang

Cai-Feng Zhang, Yu Han, Ting-Min Chang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, He'nan Province, China

Yong-Hua Xia, Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, He'nan Province, China

Correspondence to: Cai-Feng Zhang, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, He'nan Province, China. zhangcaifeng666@163.com

Received: 2008-03-08 Revised: 2008-04-18

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-07-18

### Abstract

**AIM:** To determine the correlation between iceA genotypes of *H pylori* and gastric mucosal lesion.

**METHODS:** *H pylori* strains were isolated from 552 patients with chronic gastritis. The iceA gene was amplified using PCR. The correlation between iceA genotypes and gastric mucosal lesion was analyzed.

**RESULTS:** Single iceA1 detected was 67.21%, single iceA2 detected was 21.74%, double infection of iceA1 and iceA2 detected was 7.61%, and iceA1 and iceA2 absent was 3.44%. There was significant difference between the positive rate of iceA1 and that of other genotypes, the positive rate of iceA1 was higher in severe inflamma-

tory cases than in moderate inflammatory cases (83.1% vs 10.8%, 85.5% vs 10.5%, 75.6% vs 13.0%, 75.6% vs 13.0%, all  $P < 0.05$ ). The positive rate of iceA1 in gland analysis, intestinal metaplasia was higher than that of other groups ( $P < 0.05$ ). The iceA1 in gastric mucosal lesion was significantly different from those uninfected ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The iceA1 is the dominant genotype of *H pylori* in He'nan Province, China. The positive rate of iceA1 increases as inflammation degree becomes severe. The positive of iceA1 has close relationship with hyperphlogosis, especially in gland analysis and intestinal metaplasia.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; iceA Genotypes; Gastric mucosal lesion; Polymerase chain reaction

Zhang CF, Xia YH, Han Y, Chang TM. Correlation between iceA genotypes of *Helicobacter pylori* and gastric mucosal lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2312-2315

### 摘要

**目的:** 研究幽门螺杆菌(*H pylori*)iceA基因型与胃黏膜病变的相关性。

**方法:** 用PCR方法检测552例慢性胃炎患者胃黏膜活检标本中*H pylori*的iceA基因在慢性炎症、活动性炎症、腺体萎缩和肠上皮化生中的存在情况。

**结果:** 在552例样本中, iceA1和iceA2亚型菌株单独检出率分别为67.2%, 21.7%, iceA1和iceA2亚型均阳性的检出率7.6%, iceA1和iceA2亚型均阴性的比率3.4%。在*H pylori*感染的慢性炎症、活动性炎症、腺体萎缩、肠上皮化生的重度炎症iceA1的阳性率明显高于中度炎症, 两者比较差异有统计学意义(83.1% vs 10.8%, 85.5% vs 10.5%, 75.6% vs 13.0%, 75.6% vs 13.0%, 均 $P < 0.05$ )。腺体萎缩和肠上皮化生iceA1的阳性率明显高于其他组( $P < 0.05$ )。感染iceA1亚型菌株与未感染iceA1亚型的胃黏膜病变程度差异有显著性( $P < 0.05$ )。

### ■同行评议者

沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科; 白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化病研究所

**结论:** iceA1是河南地区的优势基因亚型, iceA1阳性率随炎症程度加重逐渐升高. iceA1亚型菌株与重度炎症特别是腺体萎缩和肠上皮化生关系密切.

**关键词:** 幽门螺杆菌; iceA; 胃黏膜病变; 聚合酶链反应

张彩凤, 夏永华, 韩宇, 常廷民. 幽门螺杆菌iceA基因型与胃黏膜病变的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(20):2312-2315  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2312.asp

## 0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染是慢性胃炎的主要病因已得到国内外大多数学者的认可, 被世界卫生组织定义为 I 类致癌因子, 有关*H pylori*感染与不同类型胃黏膜病变相关性研究也有较多报道. iceA基因是*H pylori*与胃黏膜细胞接触后诱导表达的基因, 包括iceA1、iceA2两个等位基因, 分别存在于不同的*H pylori*菌株中, 被认为是*H pylori*的又一致病因子<sup>[15]</sup>. 目前国内外关于iceA基因与胃黏膜病变相关性的研究较少. 我们采用病理组织切片、Giemsa染色检测*H pylori*, 按照2006年全国慢性胃炎研讨会病理诊断分级标准定义胃黏膜病变<sup>[1]</sup>, 分析我院临床分离的*H pylori*菌株的iceA基因类型, 探讨其与胃黏膜病变相关性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院2003-07/2007-12期间慢性胃炎患者的胃黏膜活检标本共552例, 均分离培养出*H pylori*菌株. 男283例, 女269例, 年龄13-85(平均47.6±15.7)岁. 其中慢性炎症组148例, 活动性炎症组136例, 腺体萎缩组130例, 肠上皮化生组138例, 疾病的诊断依据胃镜和胃黏膜活检组织学检查<sup>[1]</sup>.

**1.2 方法** 取胃黏膜活检组织4块(胃窦大、小弯侧、胃角和胃体各1块), 经常规切片厚约5 μm, 进行Giemsa染色, 病理检查按照2006年全国慢性胃炎研讨会病理诊断分级标准, 将胃黏膜炎症分为*H pylori*感染合并慢性炎症、活动性、萎缩和肠化, 分为轻度、中度和重度4级<sup>[1]</sup>.

*H pylori*菌株的培养与鉴定<sup>[2,8]</sup>胃窦黏膜活检标本接种于选择性琼脂培养基上(含7.5%羊血及抗生素), 于37℃微需氧环境中培养3-5 d, 分离菌落, 经菌落形态、涂片染色以及生化反应(尿素酶、过氧化氢酶、氧化酶)证实, 冻存于-70℃备用. 模板DNA的制备<sup>[2,8]</sup>用1次性DNA抽提试

表 1 iceA基因PCR引物序列

目的基因	引物序列	产物的大小(bp)
iceA1F	5'-GTGTTTTTAACCAAAGTATC-3'	246
iceA1R	5'-CTATAGCCAGTCTCTTTGCA-3'	
iceA2F	5'-GTTGGGTATATCACAATTTAT-3'	
iceA2R	5'-TTGCCCTATTTCTAGTAGGT-3'	229 334
F1	5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG-3'	349
B1	5'CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA3'	

表 2 在各种胃黏膜病变中iceA的检出情况

基因型	慢性炎症	活动性炎症	腺体萎缩	肠上皮化生	总计
iceA1	80	73	106	112	371
iceA2	23	25	33	39	120
iceA1+iceA2	3	3	17	19	42
总计	106	101	156	170	533

剂盒提取冻存*H pylori*菌株的基因组DNA, 保存于-70℃备用. iceA基因PCR引物设计(表1)<sup>[2,8]</sup>, 由傅亚生物有限公司合成. PCR反应<sup>[2,8]</sup>: 总体积为25 μL. iceA、cagA的反应条件为10\*反应缓冲液2.5 μL, dNTP 0.5 μL, 引物1、引物2各0.5 μL, TaqE 1 U, 模板DNA 4 μL. iceA、cagA的扩增条件为94℃ 40 s、54℃ 40 s、72℃ 1 min, 共35个循环. PCR扩增产物均在傅亚生物有限公司进行测序, 并经20 g/L的琼脂糖凝胶电泳分析, 电脑图像分析仪观察、分析和摄像记录结果.

**统计学处理** 采用SPSS10.0软件包进行数据处理, 各组间比较用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ .

## 2 结果

iceA1亚型菌株单独检出率67.2%(371/552), iceA2亚型菌株单独检出率21.7%(120/552), iceA1和iceA2亚型均阳性的检出率7.6%(42/552), iceA1和iceA2亚型均阴性的比率3.4%(19/552), iceA1亚型阳性率与其他基因亚型相比较, 差异有显著性( $P < 0.05$ ); iceA1亚型是河南地区感染*H pylori*的优势基因亚型(表2). 图1-2为iceA1、iceA2基因片段扩增结果. 在*H pylori*感染的慢性炎症组、活动性炎症组、腺体萎缩组和肠上皮化生组iceA1的阳性率分别为56.1%(83/148), 55.9%(76/136), 94.6%(123/130)和94.9%(131/138), 其中重度炎症组明显高于轻度和中度炎症组, 两者比较差异

## ■应用要点

本文从*H pylori*致病基因iceA着手, 研究其与胃黏膜病变的相关性, 可以进一步了解*H pylori*对慢性胃炎的致病机制并指导临床合理抗*H pylori*治疗.

### 同行评价

本文选题准确, 相关研究报道不多见, 有一定新意及科学价值.

表 3 在各种胃黏膜病变中iceA1检出率比较  $n(\%)$

程度	慢性炎症	活动性炎症	腺体萎缩	肠上皮化生	总计
轻度	5(6.0)	3(4.0)	14(11.4)	15(11.5)	37(9.0)
中度	9(10.8)	8(10.5)	16(13.0)	17(13.0)	50(12.1)
重度	69(83.1) <sup>a</sup>	65(85.5) <sup>a</sup>	93(75.6) <sup>a</sup>	99(75.6) <sup>a</sup>	326(79.0)
总计	83(56.1)	76(55.9)	123(94.6) <sup>c</sup>	131(94.9) <sup>c</sup>	413

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 中度; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 慢性炎症、活动性炎症.

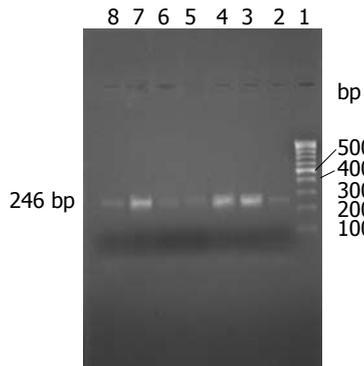


图 1 iceA1. 1: Marker; 2-8: iceA1(246 bp)阳性.

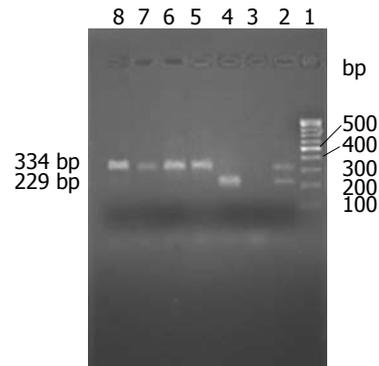


图 2 iceA2. 1: Marker; 2: iceA2(229 bp和334 bp); 3: iceA2阴性; 4: iceA2(229 bp); 5-8: iceA2(334 bp).

有统计学意义( $P < 0.05$ ). 腺体萎缩组和肠上皮化生组iceA1的阳性率明显高于其他组( $P < 0.05$ ). 表明随着炎症程度加重, 其iceA1的阳性率逐渐升高, 其感染程度也明显加重. 感染iceA1亚型菌株与未感染iceA1亚型的胃黏膜病变程度差异有显著性(67.2% vs 21.7%, 67.2% vs 7.6%, 67.2% vs 3.4%,  $P < 0.05$ , 表3).

### 3 讨论

*H pylori*感染是造成胃黏膜炎症的明确病因, 感染越重, 其炎症程度也越重, 病理检查时如发现胃黏膜炎症程度较重时, 应警惕*H pylori*感染的存在. 有研究资料表明, 清除*H pylori*后胃黏膜炎症得到明显减轻<sup>[4]</sup>. iceA基因是*H pylori*与胃黏膜细胞接触后诱导表达的基因, 包括iceA1、iceA2两个等位基因, 分别存在于不同的*H pylori*菌株中. 其中iceA2基因变异较大, 229、334、549 bp都可检测到. iceA1在大部*H pylori*菌株中并不是编码一个功能蛋白, 而是在转录水平调节其下游HpyIM基因的表达, 通过DNA甲基化水平的改变来调控相关毒力基因的表达, 从而间接参与*H pylori*的致病作用<sup>[10]</sup>. 在不同地区有不同的优势菌株<sup>[10-12]</sup>, iceA1亚型的菌株被认为与十二指肠球部溃疡的发生密切相关, Wu *et al*<sup>[9]</sup>认为, iceA1与慢性胃炎相关, iceA2亚型的菌株与慢性胃炎的发生相关, 被认为是*H pylori*的又一致病因子, 而且和细胞毒素相关蛋白基因cagA, 空泡

细胞毒素基因vacA关系密切<sup>[2,13-14]</sup>. 但国内关于iceA基因型与各种胃黏膜病变的研究较少.

胃黏膜病变中慢性萎缩性胃炎和肠上皮化生的出现一直为众多学者所关注. Correa提出了胃癌发病的过程, 即慢性胃炎→萎缩→肠化生→异型增生→胃癌. 感染*H pylori*后, 可引起胃黏膜长期慢性炎症反应, 产生氧自由基, 胃黏膜上皮细胞增殖和凋亡程度也发生改变, 且易于导致腺体萎缩和肠化生, 诱导DNA发生突变, 最终发生癌变. 阻断胃黏膜萎缩和肠化生的进一步发展可预防胃癌的发生. 根除*H pylori*后胃黏膜腺体萎缩和肠化生可以得到不同程度改善<sup>[16]</sup>. 周丽雅 *et al*<sup>[5]</sup>的为期8年的随访研究中, *H pylori*阴性组胃体萎缩较阳性组显著减轻, 胃癌发生率显著降低, 提示根除*H pylori*能降低发生胃癌的风险. 吕宾 *et al*<sup>[7]</sup>对胃窦部萎缩患者随访3年, 根除*H pylori*后萎缩评分明显下降, 而未行*H pylori*根除的治疗组萎缩评分无明显变化. 何家敏 *et al*<sup>[6]</sup>认为对于慢性胃炎患者, 若合并胃黏膜萎缩和肠化生, 同时*H pylori*阳性, 根除*H pylori*治疗后, 胃黏膜萎缩和肠化生的程度明显改善, 部分逆转到正常. 李志义 *et al*<sup>[3]</sup>研究发现伴淋巴滤泡形成或伴肠上皮化生病例中, 重度炎症的*H pylori*感染率均比中度炎症高, 和本试验持相同观点. 提示*H pylori*感染与胃黏膜萎缩和肠上皮化生关系密切, 根除*H pylori*可以改善预后.

我们的结果显示, iceA1亚型菌株是河南

地区感染*H pylori*的优势菌株, 炎症程度越重, iceA1亚型菌株的感染率越高。在腺体萎缩组和肠上皮化生组iceA1的阳性率明显高于慢性炎症组和活动性炎症组。而iceA被认为是*H pylori*的致病因子, 表明iceA1亚型菌株的感染是导致炎症程度较重的指标之一。此外, 我们观察到, 腺体萎缩组和肠上皮化生组中, 重度炎症的iceA1亚型菌株的感染率均明显较轻、中度炎症高, 提示iceA1亚型菌株与炎症程度、腺体萎缩和肠上皮化生密切相关, 在胃黏膜病变程度中容易引起较严重的慢性胃炎。

总之, iceA1亚型菌株与中重度炎症特别是腺体萎缩和肠上皮化生关系密切, 根除*H pylori*可以阻断胃黏膜萎缩和肠化生的进一步发展, 从而改善预后, 特别是根除iceA1亚型菌株可能有重要的临床意义。

#### 4 参考文献

- 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见. 现代消化及介入诊疗 2007; 12: 55-61
- 张彩凤, 林志辉. 幽门螺杆菌iceA、cagA相关性研究. 胃肠病学和肝病杂志 2006; 15: 584-586
- 李志义, 刘斌, 吴启峰. 幽门螺杆菌感染与胃黏膜病变的相关性研究. 中华消化杂志 2007; 27: 52-54
- 潭水港, 陈冷艳. 幽门螺杆菌根除治疗前后胃粘膜病变特点分析. 广东药学院学报 2001; 17: 229-230
- 周丽雅, 林三仁, 丁士刚, 黄雪彪, 郭长吉, 张莉, 崔荣丽, 金珠, 孟灵梅, 张静. 根除幽门螺杆菌对胃癌患病率及胃黏膜组织学变化的八年随访研究. 中华消化杂志 2005; 25: 324-327
- 何家敏, 姚忆蓉, 袁如华. 根除幽门螺杆菌对慢性胃炎胃黏膜萎缩、肠化生的影响. 中国临床实用医学 2007; 1: 50-51
- 吕宾, 王慧萍, 陈明涛, 范一宏, 孟立娜. 根除幽门螺杆菌对胃黏膜萎缩和肠化影响的随访研究. 中华内科杂志 2004; 43: 299-301
- 张彩凤, 林志辉, 吴芳, 陈明红, 王辛, 付丹, 潘秀珍, 彭孝纬. *H pylori* iceA基因与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13: 685-687
- Wu CC, Chou PY, Hu CT, Liu ZC, Lin CY, Tseng YH, Lin NT. Clinical Relevance of the vacA, iceA, cagA, and flaA genes of *Helicobacter pylori* strains isolated in Eastern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2913-2915
- 庄坤, 张军, 张玲霞, 张沥, 张建中. 西安地区幽门螺杆菌iceA1、iceA2和babA2基因型与致病性的研究. 细胞与分子免疫学杂志 2007; 23: 520-522
- Nimri LF, Matalka I, Bani Hani K, Ibrahim M. *Helicobacter pylori* genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 27
- Smith SI, Kirsch C, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Coker AO, Bayerdöffer E, Miehlike S. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J Med Microbiol* 2002; 51: 851-854
- Caner V, Yilmaz M, Yonetci N, Zencir S, Karagenc N, Kaleli I, Bagci H. *H pylori* iceA alleles are disease-specific virulence factors. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2581-2585
- Lin YF, Gong ST, Ou WJ, Pan RF, Huang H, He WE, Liu LY, Huo XH, Chen BX. [Genotypic study on the *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genes in the infected children in Guangzhou area] *Zhonghua Erke Zazhi* 2007; 45: 703-707
- Wu CC, Chou PY, Hu CT, Liu ZC, Lin CY, Tseng YH, Lin NT. Clinical Relevance of the vacA, iceA, cagA, and flaA genes of *Helicobacter pylori* strains isolated in Eastern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2913-2915
- Lin HJ, Perng CL, Lo WC, Wu CW, Tseng GY, Li AF, Sun IC, Ou YH. *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2493-2497

编辑 潘伯荣 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 2008-07-18)

# 慢性丙型肝炎患者血清HCV RNA含量与抗核抗体的相关性

陈志刚, 杨军, 周婷, 周迪, 李宏

## ■背景资料

研究HCV感染与自身免疫的关系, 将有助于探讨HCV发病机制, 对于CHC的临床治疗具有重要的意义。目前对不同HCV RNA含量时ANA变化还鲜有报道, 本实验通过对慢性丙型肝炎患者血清中ANA检测, 比较其与HCV RNA含量的关系, 并进一步分析了其特征, 评价其在丙型肝炎诊断及治疗中的作用。

陈志刚, 杨军, 周婷, 周迪, 李宏, 新疆石河子大学医学院一附院医学实验室 新疆维吾尔自治区石河子市 832000  
石河子大学医学院基础与临床医学联合科研基金资助项目, No. LHJJ200609  
作者贡献分布: 此课题由陈志刚设计; 研究过程由陈志刚, 杨军, 周婷, 周迪及李宏操作完成; 研究所用试剂及分析工具由陈志刚提供; 数据分析及论文写作由陈志刚完成。  
通讯作者: 陈志刚, 832000, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆石河子大学医学院一附院医学实验室, czg113126@163.com  
收稿日期: 2008-04-14 修回日期: 2008-05-13  
接受日期: 2008-05-20 在线出版日期: 2008-07-18

## Relationship between serum HCV RNA and anti-nuclear antibody in chronic HCV-infected patients

Zhi-Gang Chen, Jun Yang, Ting Zhou, Di Zhou, Hong Li

Zhi-Gang Chen, Jun Yang, Ting Zhou, Di Zhou, Hong Li, Department of Medical Lab Research, the First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: the Basic and Clinical Medicine Joint Research Fund Innovation Program of Shihezi Medical University, No. LHJJ200609

Correspondence to: Zhi-Gang Chen, Department of Medical Lab Research, the First Affiliated Hospital of the Medical College, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. czg113126@163.com  
Received: 2008-04-14 Revised: 2008-05-13  
Accepted: 2008-05-20 Published online: 2008-07-18

## Abstract

**AIM:** To retrospectively analyze relationship between serum HCVRNA and anti-nuclear antibody (ANA) thereby to elucidate significance of autoimmunology in hepatitis C virus (HCV)-infected patients.

**METHODS:** Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) was performed to determine HCVRNA content in 60 serum samples of HCV-infected patients and in 30 healthy controls. Indirect immunofluorescence assay (IIF) was performed to determine anti-nuclear antibody in serum.

**RESULTS:** Compared with the normal control

group, ANA positive rate was significantly higher in HCV-infected patients ( $\chi^2 = 13.45, P < 0.01$ ). With the elevated serum HCVRNA, ANA positive rate gradually increased ( $\chi^2 = 22.5, P < 0.01$ ). Granular pattern was primary in ANA three groups, but with HCV RNA content increased, the positive proportion of ANA was gradually elevated. Low titer was mainly present in anti-nuclear antibody of HCV-infected patients. With the increased virus concentration, high titer of anti-nuclear antibody had a increasing trend.

**CONCLUSION:** There is a certain degree of auto-immune phenomena in HCV-infected patients, which is strengthened with increasing viral load. Determination of relationship between HCV infection and autoimmunology will be helpful to understanding of HCV pathogenesis and of great significance to CHC clinical diagnosis and treatment.

**Key Words:** Chronic hepatitis C; Anti-nuclear antibody

Chen ZG, Yang J, Zhou T, Zhou D, Li H. Relationship between serum HCV RNA and anti-nuclear antibody in chronic HCV-infected patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(20): 2316-2319

## 摘要

**目的:** 回顾性分析慢性丙型肝炎(CHC)患者血清HCV RNA含量与抗核抗体(ANA)的变化规律, 探讨自身免疫在丙型肝炎病毒(HCV)感染中的意义。

**方法:** 荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测60例CHC患者及30例健康者血清中HCV RNA含量。间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence, IIF)检测血清中抗核抗体。

**结果:** CHC患者与正常对照组比较, ANA阳性率显著增高( $\chi^2 = 13.45, P < 0.01$ )。随着血清中HCV RNA含量升高, ANA阳性率逐渐增高( $\chi^2$

## ■同行评议者

杨林, 副研究员, 中山大学附属第三医院感染病科; 王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

= 22.5,  $P < 0.01$ ). 三组ANA核型均以颗粒型为主, 但抗核仁抗体随着HCV RNA含量升高, 阳性比例逐渐升高. CHC患者的抗核抗体以低滴度为主, 随着病毒含量的增高, 高滴度的抗核抗体有增多的趋势.

**结论:** CHC患者存在一定程度自身免疫现象, 随着病毒载量增高而加重. 明确HCV感染与自身免疫的关系, 将有助于探讨HCV发病机理, 对于CHC的临床诊断、治疗具有重要的意义.

**关键词:** 慢性丙型肝炎; 抗核抗体

陈志刚, 杨军, 周婷, 周迪, 李宏. 慢性丙型肝炎患者血清HCV-RNA含量与抗核抗体的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(20): 2316-2319  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2316.asp

## 0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染严重威胁人类健康, 特别是与自身免疫的关系, 已越来越受到人们广泛关注<sup>[1-3]</sup>. 研究HCV感染与自身免疫的关系, 将有助于探讨HCV发病机制, 对于慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)的临床治疗具有重要的意义. 对CHC患者自身抗体检测以往多有报告<sup>[4-8]</sup>, 但对不同HCV RNA含量时抗核抗体的(anti nuclear antibodies, ANA)产生规律、核型和滴度的描述及其与临床相关性的研究还鲜有报道. 本实验通过对CHC患者血清中ANA的检测, 比较其与HCV RNA含量的关系, 并进一步分析其特征, 评价其在CHC诊断及治疗中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2006-01/07我院门诊及住院CHC患者60例, 男37例, 女23例, 年龄22-67(平均44.16)岁. 诊断符合2000年(北京)第十次全国病毒性肝炎及感染病学术会议所修订诊断标准. 所有病例近3 mo内未使用过干扰素, 均排除HBV感染、其他病毒感染、自身免疫性疾病及其他引起免疫功能改变的疾病. 献血员30例为正常对照, 男17例, 女13例, 年龄20-66(平均42.62)岁(肝功能正常, 肝炎病毒标志物阴性, 排除其他自身免疫性疾病). 两组年龄、性别差异无显著性.

**1.2 方法** HCV RNA的检测, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR). 用PE5700荧光PCR仪(美国Perkin Elmer公司)自动检测, 试剂由广州中山医科大学达安基因诊断中心提供, 检测值用

表1 血清HCV RNA含量与抗核抗体检出率的关系

分组	n	阳性数	阳性率(%)
对照组	30	2	6.7
低载量组	20	6	30.0 <sup>a</sup>
中载量组	20	7	35.0 <sup>a</sup>
高载量组	20	14	70.0 <sup>bce</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 4.9$ ,  $\chi^2 = 6.5$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 19.4$  vs 对照组;  
<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 6.4$  vs 低载量组; <sup>e</sup> $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 4.9$  vs 中载量组.

拷贝/L表示. 我们把HCV RNA按病毒载量分为3组: HCV RNA  $\geq 10^8$ /L为高病毒载量组,  $10^8$ - $10^5$ /L为中载量组,  $10^5$ -80 000/L为低载量组, 献血员为正常对照组(<80 000/L). IIF检测自身抗体试剂盒购自德国欧盟公司, 试剂盒联合使用为已固定在载玻片上的人类上皮细胞(Hep-2)和灵长类肝脏组织切片这两种基质. 荧光二抗为FITC标记的羊抗人IgG. 标本集中用同批试剂一批检测, 实验步骤按试剂盒所附说明书进行, 待测血清自1:100起稀释, 检测阳性血清分别进行1:320、1:1000稀释以确定最终滴度. 结果判定在石河子大学医学院一附院医学实验室进行, 同时, 由石河子大学医学院病理教研室的专家对结果进行确定, 一致率达到90%以上.

**统计学处理** 阳性率间比较均采用 $\chi^2$ 检验.

## 2 结果

**2.1 CHC患者及正常人血清ANA检测结果分析** 60例CHC患者血清共检出27例ANA阳性, 阳性率为45.00%, 而30健康对照组检出2例ANA阳性, 阳性率为6.67%, 两组阳性率比较, 差异非常显著( $\chi^2 = 13.45$ ,  $P < 0.01$ ).

**2.2 血清HCV RNA含量与ANA检出率的关系** 根据血清中HCV RNA含量将其分为4组, 结果发现: 随着HCV RNA含量升高, 自身抗体阳性率逐渐增高, 4组间抗核抗体的比例经行 $\chi^2$ 检验差异有统计学意义( $\chi^2 = 22.5$ ,  $P < 0.01$ ), 3组患者ANA阳性率都高于正常对照组( $P < 0.05$ ), 随着病毒载量的增高有逐渐增高的趋势, 而且高载量组ANA阳性率显著高于低载量组和中载量组( $P < 0.05$ , 表1).

**2.3 血清HCV RNA含量与抗核抗体的荧光图型变化** ANA的核型有多种, 均以颗粒型为主, 但低、中、高病毒载量组的抗核仁型抗体的比例数逐渐升高(表2).

**2.4 血清HCV RNA含量与ANA阳性的滴度分布情况** CHC患者的抗核抗体以低滴度为主, 但随

## ■创新盘点

对CHC患者自身抗体检测以往多有报告, 但对不同HCV RNA含量时抗核抗体的产生规律、核型和滴度的描述及其与临床相关性的研究还鲜有报道.

### ■应用要点

本研究通过对慢性丙型肝炎患者不同HCV RNA含量时抗核抗体的变化及其与临床相关性的研究,评价其在丙型肝炎诊断及治疗中的作用,这对于实施个体化治疗具有临床价值。

表 2 血清HCV RNA含量与抗核抗体的荧光图型变化

分组	n	抗核抗体						
		阳性数	H	SP	Md	N	MSA	Centro
对照组	30	2	0	2	0	0	0	0
低载量组	20	6	1	3	0	1	0	1
中载量组	20	7	1	2	1	2	1	0
高载量组	20	14	1	4	2	5	1	1

H: 均质型; Sp: 斑点型; Md: 抗核点型; Centro: 抗着丝点抗体; N: 核仁型; MSA: 纺锤体抗体。

随着病毒含量的增高,高滴度的抗核抗体有增高的趋势(表3)。

### 3 讨论

许多病毒感染可诱发自身免疫反应,其中以HCV诱导的自身免疫最为常见<sup>[7]</sup>。HCV感染可通过分子模拟现象激活自身免疫反应性CD8<sup>+</sup> T细胞,从而导致自身免疫<sup>[9-10]</sup>,因此HCV感染患者存在明显的自身免疫现象。已有研究表明,自身免疫是HCV损伤机体的一个重要因素<sup>[11]</sup>。

本研究结果表明,在HCV RNA<sup>+</sup>血清中ANA的阳性率为45.00%,显著高于健康对照组6.67%( $P < 0.01$ ),提示HCV感染可伴有明显的自身免疫现象。HCV感染者体内出现自身抗体是丙型肝炎病变发展过程中的一种特征性表现,并可能是肝炎病毒造成肝组织损伤的机制之一。

对于ANA阳性率是否与病毒复制水平有关有不同报道<sup>[12-14]</sup>。本研究发现ANA的阳性率随着病毒含量的增高而显著增高( $P < 0.01$ ),说明ANA阳性率与病毒复制水平有关。在我们以往的研究中已经证明HCV感染可导致免疫调节功能紊乱即随着血清中HCV RNA含量升高CHC患者存在一定程度Th1/Th2型细胞的失衡,以Th2型细胞因子表达占优势,并随着病毒载量增高而加重<sup>[15]</sup>。由此可见Th1细胞功能低下,而Th2细胞功能亢进,导致CD8<sup>+</sup>细胞(Tc)不能有效地清除病毒和不能有效抑制病毒的复制,出现持续感染,而可能引起一些慢性炎症反应因子持续分泌,可促进机体自身免疫的发生和发展,使慢性HCV感染者肝细胞慢性损伤和纤维化。

我们的研究发现ANA的核型有多种,均以颗粒型为主,但随着病毒含量的增高,荧光模式更加多样,抗核仁型抗体的比例数逐渐升高。提示病毒复制水平影响患者自身免疫。而自身免疫的变化可能多集中在与细胞增殖、分裂有关的核仁成分上。

表 3 血清HCV RNA含量与ANA阳性的滴度分布情况

分组	n	1 : 100	1 : 320	1 : 1000
对照组	2	2	0	0
低载量组	6	5	1	0
中载量组	7	4	2	1
高载量组	14	7	5	2

有报道显示丙型肝炎患者出现自身抗体以低滴度为主<sup>[7,16]</sup>,我们的研究发现,CHC患者的抗核抗体以低滴度为主,但随着病毒含量的增高,高滴度的抗核抗体有增高的趋势,这表明ANA的滴度与HCV RNA的复制水平有密切关系。高滴度的自身抗体的出现通常被认为是自身免疫性肝脏疾病的标志性抗体。这11例高滴度抗体的产生可能是病毒感染过程中的自身免疫反应所导致的,亦可能是HCV患者同时合并有自身免疫性肝病,确切机制有待于进一步研究。但一般认为,多数自身抗体在低滴度时,是自身免疫反应或疾病的标志,不直接影响免疫系统功能,在高滴度时才与自身免疫性疾病密切相关。对于丙型肝炎患者的治疗,干扰素已被公认为抗病毒治疗的有效药物,但干扰素抗病毒治疗可诱导或增强自身免疫,若存在高滴度自身抗体时,用干扰素治疗就会使病情恶化。而激素类可治疗自身免疫性疾病,但使病毒复制增强,因此有HCV感染及有自身免疫现象特别是存在较高滴度自身抗体的患者,如何选择治疗方案成为关键问题。临床医师在对HCV感染患者进行治疗过程中,进行自身抗体的检测以及滴度的监测,这对于患者实施个体化治疗具有重要临床价值。

### 4 参考文献

- 1 韩咏梅,陈静. 丙型肝炎病毒感染血清中自身抗体的检测及临床意义. 实用医药杂志 2005; 22: 607
- 2 Giordano N, Amendola A, Papakostas P, Cipolli F, Agate VM, Battisti E, Marchi B, Nuti R. Immune and autoimmune disorders in HCV chronic liver disease: personal experience and commentary on literature. *New Microbiol* 2005; 28: 311-317
- 3 张春明,牛广华,钱铸山. 丙型肝炎病毒感染血清中自身抗体检测结果分析. 临床肝胆病杂志 2006; 22: 107-108
- 4 Squadrito G, Previti M, Lenzi M, Le Rose EP, Caccamo G, Restuccia T, Di Cesare E, Pollicino T, Raimondo G. High prevalence of non-organ-specific autoantibodies in hepatitis C virus-infected cirrhotic patients from southern Italy. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 349-353
- 5 Zusinaite E, Metskula K, Salupere R. Autoantibodies and hepatitis C virus genotypes in chronic hepatitis C patients in Estonia. *World J Gastroenterol* 2005; 11:

- 488-491
- 6 Mahrous S, Mangoud A, Eissa M, Sabee E, Amin I, Ismail A, Morsy T, Afefy A, el-Shorbagy E, Nour Eldin E, Mostafa Y, Abouel-Magd Y, el-Sadawy M, Ragab H, Hassan M, Lakouz K, Abdel-Aziz K, Saber M, el-Hady G. Autoantibodies in HCV infected patients at Sharkia Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 2004; 34: 429-446
- 7 吴赤红, 徐小元, 田庚善, 于岩岩. 慢性丙型肝炎患者血清自身抗体检测的研究. *中华医学杂志* 2006; 86: 390-393
- 8 许顺姬, 韩学吉, 朴红心. 延边地区慢性丙型肝炎患者血清中自身抗体的检测及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2889-2891
- 9 Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 2004; 103: 1026-1029
- 10 张悦, 朱玉琨, 王惠莹, 郑勤, 吕耀. 慢性丙型肝炎患者自身抗体检测的临床分析. *西南国防医药* 2004; 14: 166-167
- 11 齐名, 熊华, 邵海枫, 刘新钰, 宗永兰, 吴引伟, 李保全, 李鹤林. 不同基因型丙型肝炎病毒感染者的自身免疫表现. *临床检验杂志* 2002; 20: 8-10
- 12 陈琳, 王峰, 倪丽萍, 吴月平. 丙型肝炎75例血清自身抗体水平测定. *南通大学学报(医学版)* 2007; 27: 129-130
- 13 梁仲城. 丙型肝炎患者自身抗体检测的临床意义. *右江民族医学院学报* 2005; 27: 647-649
- 14 李颖, 徐鑫, 刘沛, 王雪莲, 王贵新. 慢性丙型肝炎患者自身抗体检测的临床意义. *肝脏* 2007; 12: 17-19
- 15 陈志刚, 杨军, 周婷, 周迪, 李红. 慢性丙型肝炎患者血清HCV RNA含量与IFN- $\gamma$ 及IL-4的变化关系. *临床检验杂志* 2007; 32: 146
- 16 王宵伟, 王江滨, 孟祥伟. 自身免疫性肝炎与丙型肝炎伴自身免疫现象者抗体水平的比较与临床分析. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 176-177

■同行评价  
本文对不同HCV RNA含量时抗核抗体的产生规律、核型和滴度的描述及其与临床相关性的研究, 可能对HCV的发病机制和治疗提供实验基础, 具有一定的实际意义。

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 •

### 世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成t<sub>1/2</sub>或T, Vmax不能写Vmax,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\phi$ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, Vd, T<sub>1/2</sub> CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-18)

## 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!

白爱平 副教授

南昌大学第一附属医院消化病研究所

仇毓东 副教授

南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科

党双锁 副教授

西安交通大学第二医院感染科

丁士刚 主任医师

北京大学第三医院消化科

董蕾 教授

西安交通大学第二附属医院消化内科

高英堂 研究员

天津市第三中心医院, 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

黄文林 教授

中山大学附属肿瘤医院, 中山大学肿瘤防治中心

黄裕新 教授

陕西省西安市第四军医大学唐都医院消化内科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

李杰 副教授

北京大学医学部基础医学院病原生物学系

李瑜元 教授

广州市第一人民医院内科

李玉明 教授

江苏省南通市第一人民医院消化内科

刘绍能 主任医师

中国中医科学院广安门医院消化科

刘占举 教授

郑州大学第二附属医院消化内科

吕宾 教授

浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

倪润洲 教授

南通大学附属医院消化内科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化研究室

朴云峰 教授

吉林大学第一附属医院消化科

秦环龙 教授

上海交通大学附属第六人民医院外科

沈薇 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

孙诚谊 教授

贵阳医学院附属医院院长办

汤恢焕 教授

湖南省长沙市中南大学湘雅医院普外科

王承党 副教授

福建医科大学附属第一医院消化内科

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

王晓艳 副教授

湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

王志刚 副主任医师

上海市第六人民医院普外科

吴金术 教授

湖南省人民医院肝胆科

叶红军 主任医师

广东省北京大学深圳医院消化内科

张占卿 主任医师

上海市(复旦大学)公共卫生中心(肝脏病学、传染病学)

庄林 主任医师

昆明市第三人民医院肝病科