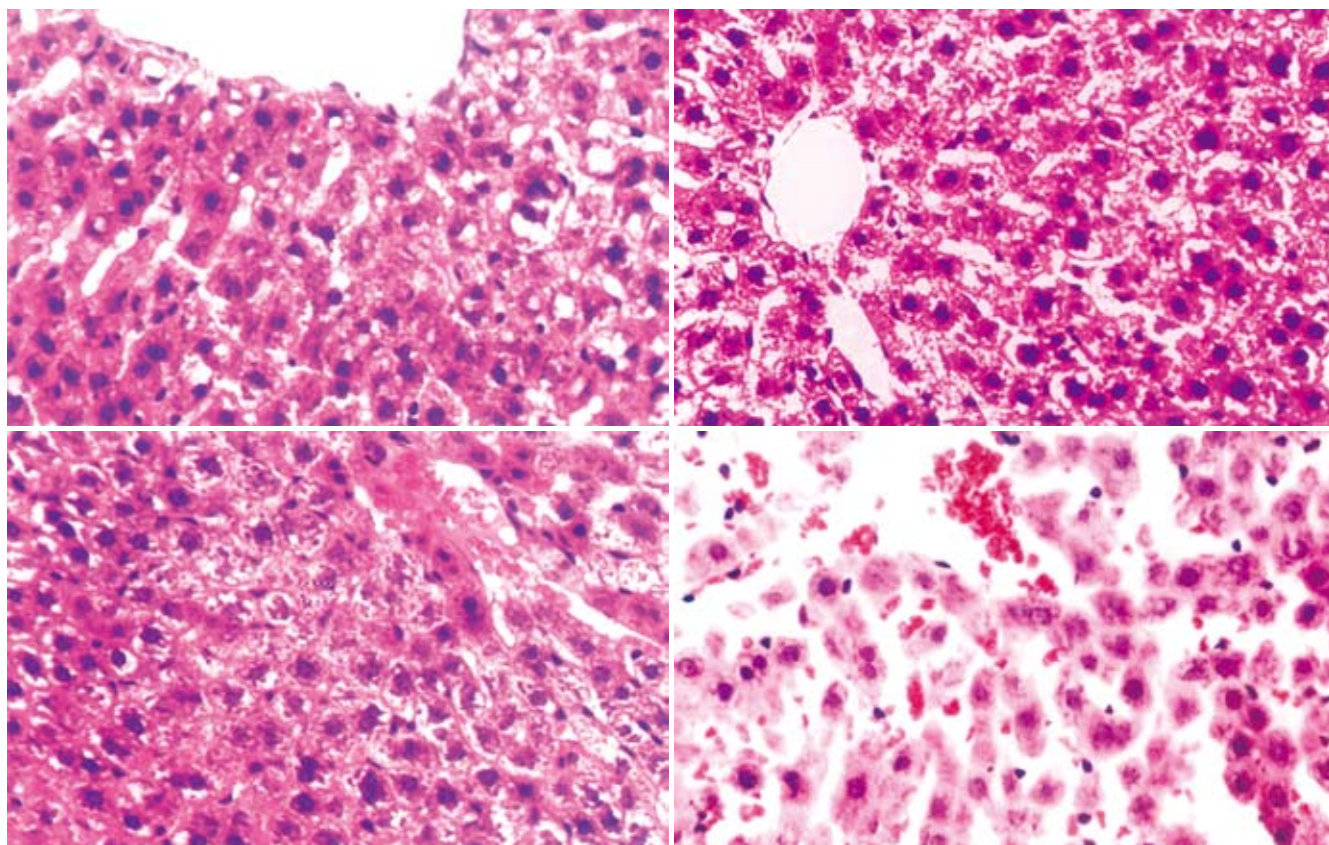


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 11 月 18 日 第 16 卷 第 32 期 (Volume 16 Number 32)



32 / 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
唐笑爱教授
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
陈凇教授
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
李加孚教授
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
李涛副主任医师
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
邱伟华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

裴正军教授
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
吴泰瑞教授
吴志勇教授
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐智教授

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

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师

秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
唐霓副研究员
唐世刚教授
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

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

消化影像学

陈克敏教授
程红岩教授
褚建国主任医师
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜学

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

消化介入治疗学

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

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授

刘鲁明教授
唐文富副主任医师
王学美研究员

消化基础研究

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

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2008 年 11 月 18 日 第 16 卷 第 32 期 (总第256期)

述 评

- 3591 重视肠易激综合症的流行病学调查
李定国, 周惠清

基础 研究

- 3594 As_2O_3 与Aspirin联合应用对人胃癌SGC-7901细胞凋亡的影响
巩玉森, 仇玮, 刘霞, 吴永平, 李琳琳, 柳红
- 3599 黄芪、莪术配伍对胃癌细胞COX-2表达的调节作用
沈天华, 沈洪, 骆殊, 朱学军, 刘丽, 李春婷, 刘亚军
- 3605 血管生成素-1对人胃癌细胞Bcl-2和Bax表达的影响
欧希龙, 颜芳, 关云艳, 孙为豪, 杨柳, 陈国胜, 产松苗, 陈宝安
- 3610 CagA对AGS细胞 Ca^{2+} 相关蛋白磷酸化的影响
肖迪, 赵飞, 宋衍燕, 孟凡亮, 何利华, 张慧芳, 张建中
- 3616 辣椒素敏感传入神经在电刺激室旁核减轻大鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用
张咏梅, 张建福, 闫长栋

临床 研究

- 3621 Ki-67和VEGF在食管腺癌中的表达及意义
卢明芳, 王蓉
- 3626 PTEN蛋白在早期胃癌和癌前病变中的表达及与临床病理特征的相关性
张斌, 曹俊, 周强, 陈洁宇, 邹晓平
- 3631 TFF3和CD147在不同胃黏膜病变中的表达及其与血管生成的关系
唐忠辉, 陈华生, 邹宗楷, 蔡韶滨, 苏海燕, 沈洪武, 吴文乔, 林莉, 王元亨
- 3637 TGF β 1和CTGF在非酒精性脂肪性肝炎肝组织中的表达及意义
但杰, 高鹏, 申力, 黄海云, 俞泽元

文 献 综 述

- 3642 染色体结构变异在胃癌发生发展中的作用
吴建林, 于颖彦
- 3648 p53基因生物学特性及其在胃肠道肿瘤中的研究进展
熊超亮, 黄缘
- 3654 肝脏缺血再灌注损伤与钙超载
岳媛媛, 冯志杰
- 3659 肝脏糖异生的分子机制研究进展
韩向晖, 季光
- 3666 消化系统肿瘤的分子靶向治疗
吴晴, 李兆申

研究 快报

- 3673 T α 1对食管癌细胞RNA转染的脐血树突状细胞诱导T细胞杀瘤活性的影响
王健, 苏安英, 柴锡庆, 门金娥, 郑海萍, 张向阳, 田珂
- 3677 射频消融联合肝动脉栓塞治疗兔肝癌的安全性
李绍钦, 倪才方, 蒋国民, 陈琬
- 3681 心脏停搏供体大鼠供肝热缺血对原位肝移植物的影响
张宝良, 刘彤

临床 经验

- 3687 E-cad- β -cat复合体表达及临床病理特征与食管癌预后的关系
林香春, 吴静, 王沧海, 魏南, 寇炜, 姬瑞, 路红
- 3692 慢性萎缩性胃炎中医药治法分类研究
王伟, 朱方石, 吴晓燕

	<p>3696 HBeAg阴性与阳性原发性肝癌临床和病毒相关因素分析 邹传鑫, 聂家艳, 戴绍军, 陈海燕, 谢明, 周东斌</p> <p>3700 锡类散与美沙拉嗪灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效比较 朱勇, 谢会忠</p>
致 谢	3704 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>3593 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>3598 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>3609 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>3615 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>3620 世界华人消化杂志名词术语标准</p> <p>3625 世界华人消化杂志被收录情况</p> <p>3630 世界华人消化杂志数字用法标准</p> <p>3636 世界华人消化杂志投稿方式</p> <p>3647 世界华人消化杂志计量单位标准</p> <p>3653 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>3665 世界华人消化杂志作者署名要求</p> <p>3672 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策</p> <p>3691 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>3695 世界华人消化杂志外文字符标准</p> <p>3699 世界华人消化杂志正文要求</p> <p>3703 世界华人消化杂志中文摘要要求</p>
封面故事	<p>张宝良, 刘彤. 心脏停搏供体大鼠供肝热缺血对原位肝移植物的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3681-3686</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3681.asp</p>
本期责任人	<p>编务 李慧; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 郭海丽; 责任编辑 史景红; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-11-18 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>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2008年版权归世界华人消化杂志所有</p>
--	---	---

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079**
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

November 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 32

EDITORIAL	3591 Emphasis on epidemiological investigation of irritable bowel syndrome <i>Li DG, Zhou HQ</i>
BASIC RESEARCH	<p>3594 As₂O₃ and Aspirin induce apoptosis of human gastric cancer cells SGC-7901 <i>Gong YS, Qiu W, Liu X, Wu YP, Li LL, Liu H</i></p> <p>3599 Regulatory effect of compatibility of Astragalus membranaceus and Rhizoma curcumae on COX-2 expression in gastric cancer MKN-45 cells <i>Shen TH, Shen H, Luo S, Zhu XJ, Liu L, Li CT, Liu YJ</i></p> <p>3605 Effect of angiopoietin-1 on expression of Bcl-2 and Bax in human gastric cancer cells <i>Ou XL, Yan F, Guan YY, Sun WH, Yang L, Chen GS, Chan SM, Chen BA</i></p> <p>3610 Influence of <i>Helicobacter pylori</i> CagA on Ca²⁺-associated phosphorylated proteins of AGS cells <i>Xiao D, Zhao F, Song YY, Meng FL, He LH, Zhang HF, Zhang JZ</i></p> <p>3616 Capsaicin-sensitive afferent fibers mediate the protective effect of electrical stimulation of paraventricular nucleus against gastric ischemia-reperfusion injury in rats <i>Zhang YM, Zhang JF, Yan CD</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3621 Roles of Ki-67 and vascular endothelial growth factor in development of esophageal adenocarcinoma <i>Lu MF, Wang R</i></p> <p>3626 Correlation between PTEN protein expression and clinicopathological features in the precancerous lesions and early gastric cancer <i>Zhang B, Cao J, Zhou Q, Chen JY, Zou XP</i></p> <p>3631 Trefoil factor 3 and CD147 expression in carcinogenesis of gastric mucosa and their correlation with angiogenesis <i>Tang ZH, Chen HS, Zou ZK, Cai SB, Su HY, Shen HW, Wu WQ, Lin L, Wang YH</i></p> <p>3637 Expression and its significance of connective tissue growth factor and transforming growth factorβ1 in hepatic tissues of non-alcoholic steatohepatitis <i>Dan J, Gao P, Shen L, Huang HY, Yu ZY</i></p>
REVIEW	<p>3642 Role of chromosome structure variation in carcinogenesis and progression of gastric cancer <i>Wu JL, Yu YY</i></p> <p>3648 Advances in biological characteristics of <i>p53</i> gene and its role in gastrointestinal tumors <i>Xiong CL, Huang Y</i></p> <p>3654 Hepatic ischemia reperfusion injury and calcium overload <i>Yue YY, Feng ZJ</i></p> <p>3659 Recent advances in molecular mechanisms of hepatic gluconeogenesis <i>Han XH, Ji G</i></p> <p>3666 Molecular targeted therapy of digestive system neoplasms <i>Wu Q, Li ZS</i></p>
RAPID COMMUNICATION	3673 Effect of T α 1 on ESCC RNA-transfected human cord blood dendritic cells induced antitumor activity of cytotoxic T lymphocytes <i>Wang J, Su AY, Chai XQ, Men JE, Zheng HP, Zhang XY, Tian K</i>

	<p>3677 Combined therapy of radiofrequency ablation with transcatheter artery embolization in rabbit model of hepatic carcinoma <i>Li SQ, Ni CF, Jiang GM, Chen L</i></p> <p>3681 Influence of warm ischemia reperfusion of the donor liver from non-heart-beating donors on the graft in rat orthotopic liver transplantation <i>Zhang BL, Liu T</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3687 E-cadherin-β-catenin complex expression and clinicopathologic properties in esophageal carcinoma patients and their relationship with the prognosis <i>Lin XC, Wu J, Wang CH, Wei N, Kou W, Ji R, Lu H</i></p> <p>3692 TCM treatment approaches to chronic atrophic gastritis <i>Wang W, Zhu FS, Wu XY</i></p> <p>3696 A correlation factor analysis of clinical and virological characteristics on HBeAg-negative and HBeAg-positive primary hepatic cancer <i>Zou CX, Nie JY, Dai SJ, Chen HY, Xie M, Zhou DB</i></p> <p>3700 Efficacy comparison of Xilei San and Mesalazine enemas for active distal ulcerative colitis <i>Zhu Y, Xie HZ</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	3704 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Zhang BL, Liu T.</i> Influence of warm ischemia reperfusion of the donor liver from non-heart-beating donors on the graft in rat orthotopic liver transplantation. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(32): 3681-3686 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3681.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Hui Li</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Hai-Li Guo</i> Editor-in-Charge: <i>Jing-Hong Shi</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 November 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@wjgnet.com

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
Director: Hai-Ning Zhang

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

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

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

重视肠易激综合征的流行病学调查

李定国, 周惠清

李定国, 周惠清, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科上海市 200092

李定国, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事肝纤维化防治及肠易激综合征的研究.

通讯作者: 李定国, 200092, 上海市, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科. dingguo_li@263.net

收稿日期: 2008-04-22 修回日期: 2008-06-05

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-18

Emphasis on epidemiological investigation of irritable bowel syndrome

Ding-Guo Li, Hui-Qing Zhou

Ding-Guo Li, Hui-Qing Zhou, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital Affiliated to Medicine College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital Affiliated to Medicine College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China. dingguo_li@263.net

Received: 2008-04-22 Revised: 2008-06-05

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-11-18

Abstract

Diagnosis of irritable bowel syndrome (IBS) mainly depends on accumulation of symptoms, which is the basis of epidemiological investigation. At present, it is far from making diagnosis by a new biological marker. In this article, we emphasizes that epidemiological methods should be used to study the distribution, epidemic characteristics and eiology of IBS; meawhile, during epidemiological investigation it is hopeful to find some clues for the basic and clinical research on IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Epidemiology; Diagnosis

Li DG, Zhou HQ. Emphasis on epidemiological investigation of irritable bowel syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(32): 3591-3593

摘要

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)

的诊断主要依赖症状的累积, 这是可进行流行病学调查的基础及依据. 目前借助于一种新的生物学标记对IBS进行简单诊断还为时甚远, 本文强调IBS的诊断应采用流行病学研究方法来研究疾病的分布、流行规律及病因, 其次也可在流行病学调查中寻找线索, 为IBS临床及基础研究提供客观依据.

关键词: 肠易激综合征; 流行病学; 诊断

李定国, 周惠清. 重视肠易激综合征的流行病学调查. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3591-3593

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3591.asp>

0 引言

对肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的认识已经有150年的历史. IBS是一种全球性疾病, 人群患病率较高, 且有逐年增高趋势, 对患者生活质量影响较大且需花费高额医疗费用, 因此IBS越来越受到有关方面专家的重视. IBS的诊断主要依赖症状的累积, 这是可进行流行病学调查的基础及依据. 目前IBS仍被认为是一种原因不明的疾病, 其发生除与胃肠动力紊乱、内脏感觉异常、肠道感染及脑肠轴功能异常有关外, 与社会背景及精神心理因素也密切相关. 在目前借助于一种新的生物学标志对IBS进行简单诊断还为时甚远, 应着重强调采用流行病学研究方法以研究疾病的分布、流行规律及病因, 其次也可在流行病学调查中寻找线索, 为IBS临床及基础研究提供客观依据, 从而使一些尚未解决的问题得以进一步阐明.

1 IBS流行病学调查中需注意的问题

1.1 调查问卷的考评 首先对IBS流行病学调查的问卷本身是否有效需进行考评. 考评应从3个方面进行, 即信度、效度及反应度^[1]. 信度是指调查表测量结果的可靠性、稳定性及一致性, 即精确度. 用于评价调查表信度的多种方法中, Cronbach's α 系数是目前最常使用的信度

■背景资料

肠易激综合征 (IBS)是一种全球性疾病, 人群患病率较高, 且有逐年增高趋势, 对患者生活质量影响较大且需花费高额医疗费用, 因此IBS越来越受到有关方面专家的重视.

■同行评议者

沈洪, 教授, 南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科; 陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第二一医院中医科

■ 研发前沿

目前IBS仍被认为是一种原因不明的疾病,其发生除与胃肠动力紊乱、内脏感觉异常、肠道感染及脑肠轴功能异常有关外,与社会背景及精神心理因素也密切相关。

系数.效度即调查表的有效性和正确性,即准确度.意指调查表确实测定了他拟测定的特征(而不是其他特征)及测定的程度.调查表的效度越高,说明调查表的结果越能显示其所测对象的真正特征.调查表的另一重要特点就是能够鉴别出不同受试者,即要求调查表具有一定的反应度.

1.2 调查员的培训 调查员应熟悉IBS诊断及治疗,基本了解被访地区的风俗习惯及文化传统,具有诚实认真、勤奋负责及谦虚耐心等特点.在开始调查前需对调查员进行培训,

其内容应包括:(1)调查研究的计划、内容、目的、方法及与调查项目有关的其他情况;(2)基本及关键的调查访问技术;(3)以某个调查员为对象,进行模拟调查;(4)讨论可能出现的问题,提出解决方法;(5)建立相互联系、监督及管理的方法和制度,以保证正式调查工作顺利开展.

1.3 调查的质量控制 现场调查的主要实施者是调查员,他们是资料收集的具体执行者.在调查实施过程中,项目管理者应抽样监督调查员的工作,观察调查员的访问过程,对每天完成的问卷都要进行检查,评价所完成问卷的质量及主要检查逻辑上的矛盾,发现问题及时采取补救措施.在资料的整理及分析阶段,应注意以下几点:(1)调查问卷的登记与编码.做到不重不漏,尽量减少差错.(2)检查资料的完整性.(3)检查填报的正确性.检查调查问卷的指标填写有无遗漏,是否符合要求.(4)数据在被计算机录入时,要严格控制录入质量,进行5%的抽查.

2 IBS流行病学调查中亟待解决的问题

2006年颁布的罗马III IBS诊断标准是以近年流行病学及临床研究为证据,基于症状学的诊断标准.他的修改依据主要来源于西方国家的研究资料,我国IBS的临床特点可能与西方国家有所不同,文化及社会生活习惯的差异可能会影响对IBS认识,应通过流行病学调查发现我国IBS特点,为今后制订适合我国应用的IBS诊断标准提供科学基础^[2].

有关患病率的调查,我国不同地区得出不同的结论,对成人调查显示在18-60岁5个年龄层患病率无显著差异,但性别及城乡之间患病率各地调查有不同结论^[3-4].对全国城市中小学生的IBS调查揭示患病率随着年龄的增长而上升,以高中生居多,且男女患病率无统计学差

异^[5].因此,年龄、性别及城乡之间与IBS患病率关系有待大规模IBS流行病学调查予以进一步证实.

目前调查表明以往经典的危险因素如吸烟、饮酒、浓茶及咖啡等与IBS无关,但胃肠道感染特别是痢疾及喜凉食是IBS的重要危险因素.最近对全国城市中小学生的IBS流行病学调查中发现一个有趣的现象即高蛋白饮食是IBS发病的保护因素,这值得进一步研究^[6].另外,目前许多研究均已证实IBS患者伴有精神心理异常如焦虑、工作和学习紧张及睡眠障碍等,但何为因果还需进一步调查证实.

与发达国家相比,我国IBS患者的就诊率明显低下,城市中小学生及成人的就诊率分别在16%和20%左右,但有关IBS患者的服药率目前在我国未进行调查.

有关IBS患者的经济学评估在国外有许多调查,主要分为直接和间接消费. IB S患者在消化疾病专科门诊中很常见,医疗卫生资源花费巨大,但我国缺乏这方面的社会经济学评估,因此在IBS流行病学调查中应予以考虑,藉以指导我国有限卫生资源的合理应用.

3 结论

我国是一个拥有13亿人口及56个民族的大国,并且幅源辽阔,各地气候条件及文化底蕴迥异,各民族生活及风俗习惯差异甚大.因此,对于IBS流行病学研究宜在多个层面展开.建议:(1)在全国范围内进行IBS流行病学调查,以掌握我国IBS地区性分布特征;(2)调查人群的年龄层面不局限于18-70岁人群,应同时对儿童、青少年及高龄人群展开IBS流行病学调查;(3)由于文化社会环境与IBS发病有明显相关性,同时我国各民族文化丰富多彩,生活环境及风俗习惯差异甚大,因此对我国少数民族也应进行IBS流行病学调查;(4)IBS病因是多因素,既有生物性又有心理及社会性,且他们在IBS发病中占有重要地位.另外,在不同社会群体中,致病因素及人群特征也是有差别的,故应在社区层面开展IBS流行病学调查.

4 参考文献

- 1 方积乾. 卫生统计学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 261-281
- 2 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 肠易激综合征诊断和治疗的共识意见(2007, 长沙). 中华消化杂志

- 2008; 28: 38-41
- 3 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 韩少梅, 郭慧平, 方秀才. 北京地区肠易激综合征的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查. 中华流行病学杂志 2000; 21: 26-29
- 4 熊守理, 陈旻湖, 陈惠新, 许岸高, 王伟岸, 胡品津. 广东省社区人群肠易激综合征的流行病学研究. 中华医学杂志 2004; 84: 278-281
- 5 李定国, 周惠清, 宋艳艳, 宗春华, 许小幸, 陆汉明. 全国城市中小学生肠易激综合征流行病学现况调查. 中华内科杂志 2007; 16: 1941-1944
- 6 周惠清, 李定国, 宋艳艳, 宗春华, 吴建新, 陆汉明. 全国城市中小学生肠易激综合征危险因素研究. 中华儿科杂志 2008; 46: 136-139

■同行评价

本文论述了在IBS调查中面临的问题和未来发展趋势, 对未来IBS流行病学研究有一定提示作用.

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、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-18)

As₂O₃与Aspirin联合应用对人胃癌SGC-7901细胞凋亡的影响

巩玉森, 仇 玮, 刘 霞, 吴永平, 李琳琳, 柳 红

■背景资料

As₂O₃治疗APL已取得了确定的疗效, 对其他血液病和实体瘤的治疗正在显示出他的应用前景, 然而其具有极强的氧化毒性和致畸作用. 本实验针对降低As₂O₃毒副作用, 提高疗效进行研究.

巩玉森, 仇玮, 刘霞, 吴永平, 李琳琳, 柳红, 徐州医学院病理学教研室 江苏省徐州市 221002

巩玉森, 医学硕士, 讲师, 主治医师, 从事肿瘤病理学、重大疾病病理学研究.

江苏省教育厅高校自然科学基金资助项目, No. 06KJB310118
作者贡献分布: 仇玮与柳红对此文所作贡献均等; 此课题由吴永平, 仇玮, 巩玉森及柳红设计; 研究过程由巩玉森, 仇玮, 刘霞及李琳琳操作完成; 数据分析由巩玉森, 仇玮及李琳琳完成; 本论文写作由巩玉森, 仇玮及柳红完成.

通讯作者: 柳红, 221002, 江苏省徐州市淮海西路84号, 徐州医学院病理学教研室. hongliu04@yahoo.com

电话: 0516-82711659

收稿日期: 2008-09-11 修回日期: 2008-10-18

接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-18

As₂O₃ and Aspirin induce apoptosis of human gastric cancer cells SGC-7901

Yu-Sen Gong, Wei Qiu, Xia Liu, Yong-Ping Wu, Lin-Lin Li, Hong Liu

Yu-Sen Gong, Wei Qiu, Xia Liu, Yong-Ping Wu, Lin-Lin Li, Hong Liu, Department of Pathology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Fund for Colleges and Universities in Jiangsu Province, No. 06KJB310118

Correspondence to: Hong Liu, Department of Pathology, Xuzhou Medical College, 84 Huaihai West Road, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China. hongliu04@yahoo.com

Received: 2008-09-11 Revised: 2008-10-18

Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of As₂O₃ and Aspirin on apoptosis of human gastric carcinoma cells SGC-7901 and to explore its possible mechanism.

METHODS: SGC-7901 cells were incubated in different concentrations of drugs, and then were divided into six groups: control group, Aspirin (2 mmol/L) group, Aspirin (1 mmol/L) group, As₂O₃ (4 μmol/L) group, As₂O₃ (2 μmol/L) group, and As₂O₃ (2 μmol/L) + Aspirin (1 mmol/L) group. 72 hours after the treatment, apoptosis rates in each group were analyzed using flow cytometry. The expressions of Bcl-2 and Bax protein were measured by immunocytochemistry assay.

RESULTS: Flow cytometry analysis revealed statistically significant difference between 2 μmol/L As₂O₃ + 1 mmol/L Aspirin group and control group, 1 mmol/L Aspirin group, 2 μmol/L As₂O₃ group ($P < 0.05$), while there was no statistically significant difference between 2 μmol/L As₂O₃ + 1 mmol/L Aspirin group and 4 μmol/L As₂O₃ group, 2 mmol/L Aspirin group. Immunocytochemistry showed that there was down-regulated expression of Bcl-2 protein and up-regulated expression of Bax protein in 2 μmol/L As₂O₃ + 1 mmol/L Aspirin group. Statistically significant difference was observed between 2 μmol/L As₂O₃ + 1 mmol/L Aspirin group and control group, 1 mmol/L Aspirin group, 2 μmol/L As₂O₃ group ($50.21\% \pm 5.94\%$ vs $91.65\% \pm 11.51\%$, $88.66\% \pm 10.53\%$, $89.27\% \pm 9.84\%$; $40.72\% \pm 9.54\%$ vs $21.03\% \pm 4.32\%$, $23.07\% \pm 6.23\%$, $22.67\% \pm 3.16\%$, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: As₂O₃ and Aspirin induce apoptosis of gastric cancer cells SGC-7901 possibly through suppressing Bcl-2 protein or enhancing Bax protein. Combination of As₂O₃ and Aspirin produces obvious synergistic effect.

Key Words: As₂O₃; Aspirin; Combination; Gastric cancer cells SGC-7901; Apoptosis

Gong YS, Qiu W, Liu X, Wu YP, Li LL, Liu H. As₂O₃ and Aspirin induce apoptosis of human gastric cancer cells SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3594-3598

摘要

目的: 观察As₂O₃与Aspirin联合应用对人胃癌SGC-7901细胞凋亡的影响并探讨其可能机制.

方法: As₂O₃和Aspirin处理SGC-7901细胞, 实验分为: 阴性对照组、2 mmol/L Aspirin组、1 mmol/L Aspirin组、4 μmol/L As₂O₃组、2 μmol/L As₂O₃组和2 μmol/L As₂O₃组+1 mmol/L Aspirin组, 流式细胞术检测As₂O₃和Aspirin单独及联合应用对SGC-7901细胞凋亡的作用, 免疫细胞化学法检测Bcl-2和Bax蛋白的表达.

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

结果: 2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃+1 mmol/L Aspirin联合应用组与4 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组、2 mmol/L Aspirin组SGC-7901细胞在细胞周期G₁期前均出现明显的亚二倍体凋亡峰, 差异无明显统计学意义, 与阴性对照组细胞、2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃及1 mmol/L Aspirin单药组相比, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$). As₂O₃与Aspirin联合应用组使Bcl-2表达下降, Bax表达增高, 与阴性对照组、2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃及1 mmol/L Aspirin单药组相比, 差异均具统计学意义(50.21% \pm 5.94% vs 91.65% \pm 11.51%, 88.66% \pm 10.53%, 89.27% \pm 9.84%; 40.72% \pm 9.54% vs 21.03% \pm 4.32%, 23.07% \pm 6.23%, 22.67% \pm 3.16%, 均 $P<0.05$).

结论: As₂O₃和Aspirin可能通过改变Bcl-2和Bax表达诱导SGC-7901细胞凋亡, 两者联合应用具有协同作用.

关键词: 三氧化二砷; 阿司匹林; 联合应用; 胃癌细胞SGC-7901; 凋亡

巩玉森, 仇玮, 刘霞, 吴永平, 李琳琳, 柳红. As₂O₃与Aspirin联合应用对人胃癌SGC-7901细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3594-3598
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3594.asp>

0 引言

三氧化二砷(As₂O₃)是中药砒霜的主要成分, 国内外使用As₂O₃治疗急性粒细胞性白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)取得了确定的疗效, 对其他的血液系统疾病和实体瘤的治疗正在显示出他的应用前景^[1-2]. 然而As₂O₃是天然存在的一种剧毒物质, 其具有极强的氧化毒性作用, 又是一种强致畸剂, 因而限制了其在临床上的应用剂量, 剂量不足又会降低他的治疗效果. 因此, As₂O₃与其他药物联合应用, 以降低As₂O₃的用量, 降低其毒副作用, 提高疗效是值得研究的问题. 本实验就As₂O₃与Aspirin联合应用对SGC-7901细胞的凋亡及其机制进行研究, 以期为临床制定有效的化疗方案提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养液为美国Gibco公司产品; 新生牛血清购自杭州四季青生物技术材料公司; 浓缩型一抗Bcl-2、Bax及即用型二抗均为北京中山生物技术有限公司产品; Aspirin粉剂由华阴市锦前程药业有限公司赠送; SGC-7901细胞株购自中国医学科学院上海细胞所; “亚砷酸注射液”(国药准字X19990191)由哈尔滨伊

达药业有限公司生产.

1.2 方法

1.2.1 分组: As₂O₃和Aspirin处理SGC-7901细胞, 实验分为: 阴性对照组、2 mmol/L Aspirin组、1 mmol/L Aspirin组、4 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组、2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组和2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组+1 mmol/L Aspirin组.

1.2.2 细胞培养: SGC-7901细胞常规培养于新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液中, 在37℃, 50 mL/L CO₂饱和湿度培养箱中贴壁培养.

1.2.3 免疫组化检测: 药物作用后72 h, 取出6孔板中贴附细胞的小玻片, 中性福尔马林固定, 采用SP法进行免疫细胞化学染色.

1.2.4 流式细胞术: 收集阴性对照组及药物作用组的细胞, PBS冲洗, 700 mL/L冷乙醇固定过夜, PBS冲洗, 使细胞终浓度 $2\times 10^9/\text{L}$, 加碘化丙啶(PI), 暗处作用30 min, 用流式细胞仪检测并分析结果.

统计学处理 各组数据均数以mean \pm SD表示, 用Stata8.0软件进行单因素方差分析及Scheffe法分析组间差异. 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P<0.05$ 为统计学有显著性差异.

2 结果

2.1 As₂O₃和Aspirin对SGC-7901细胞凋亡的影响 流式细胞术检测, 4 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组、2 mmol/L Aspirin组和2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃+1 mmol/L Aspirin联合用药组在细胞周期G₁期前均出现明显的亚二倍体凋亡峰(图1). 各组SGC-7901细胞的凋亡率AR(图2).

2.2 As₂O₃和Aspirin对SGC-7901细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的影响 2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃+1 mmol/L Aspirin联合应用组Bcl-2表达率降低, Bax蛋白表达率增加, 与阴性对照组、2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃及1 mmol/L Aspirin单药组相比, 差异均具统计学意义($P<0.05$, 表1, 图3-4).

3 讨论

As₂O₃中药名砒霜, 最初首先用于治疗急性早幼粒细胞白血病, 且取得了确定的疗效. 新近的研究发现, As₂O₃对其他多种系统肿瘤具有抑制作用, 主要机制集中在诱导肿瘤细胞凋亡^[3-4]. 但As₂O₃为一种剧毒物质和强致畸剂, 限制了其在临床上的应用剂量, 降低其治疗效果, 因此如何通过联合其他药物, 提高As₂O₃疗效, 减少其临床用量, 降低其毒副作用, 是值得研究的问题.

■研发前沿

如何降低As₂O₃毒副作用且不影响其疗效一直广受重视, 有采用局部给药、改变As₂O₃的物理性状和联合用药等方法. 选用能与As₂O₃有协同作用的药物, 而降低其用量, 值得深入研究.

■相关报道

As₂O₃与Aspirin对其他多种系统肿瘤具有抑制作用, 已检测出凋亡相关基因和蛋白表达, 但两者联合用药抗肿瘤及其机制未完全阐明. 所以探讨两者诱导肿瘤细胞凋亡机制是该领域研究的重心.

■创新盘点

Aspirin是传统临床消炎止痛药,近年来发现其具有一定的抗肿瘤作用,本实验研究As₂O₃与Aspirin联合应用对人胃癌SGC-7901细胞凋亡的影响并初步探讨其机制,相关研究尚未见报道。

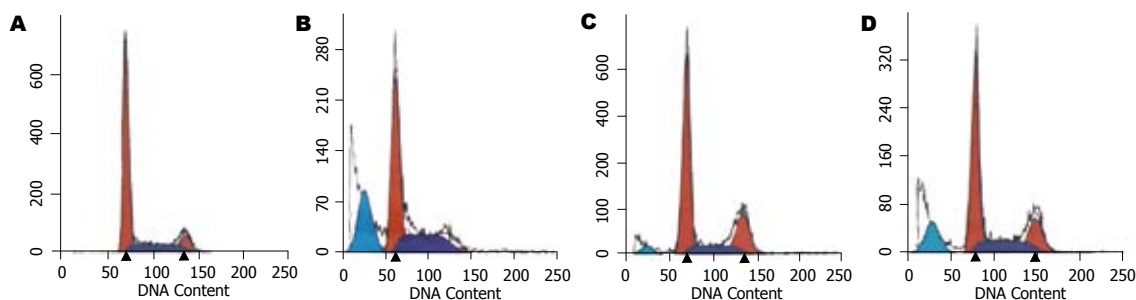


图1 流式细胞术检测SGC-7901细胞凋亡情况. A: 对照组; B: 4 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组; C: 2 mmol/L Aspirin组; D: 2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃+1 mmol/L Aspirin联合用药组.

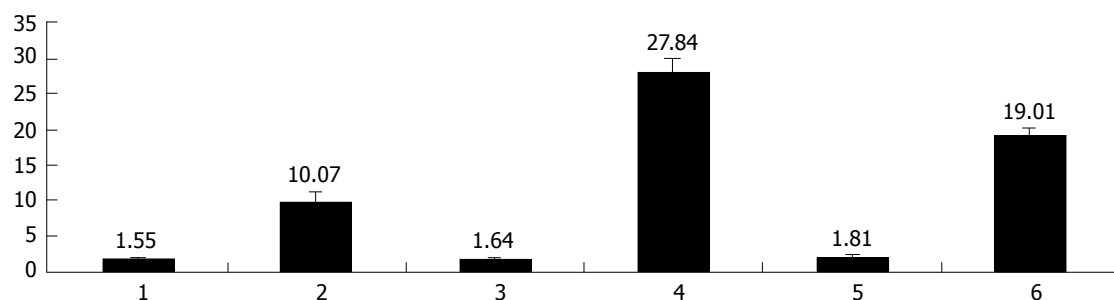


图2 As₂O₃和Aspirin单独及联合应用对SGC-7901细胞凋亡率的影响. 1: 对照组; 2: 2 mmol/L Aspirin组; 3: 1 mmol/L Aspirin组; 4: 4 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组; 5: 2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组; 6: 联合用药组.

表1 As₂O₃与Aspirin作用后SGC-7901细胞Bcl-2和Bax蛋白的表达 (mean \pm SD, %)

分组	阳性表达率		
	Bcl-2	Bax	Bax/Bcl-2
阴性对照组	91.65 \pm 11.51	21.03 \pm 4.32	22.95
Aspirin(2 mmol/L)	52.34 \pm 7.18 ^a	39.53 \pm 6.42 ^a	63.41 ^a
Aspirin(1 mmol/L)	89.27 \pm 9.84	22.67 \pm 3.16	25.40
As ₂ O ₃ (4 $\mu\text{mol/L}$)	46.50 \pm 8.83 ^a	41.29 \pm 7.47 ^a	74.40 ^a
As ₂ O ₃ (2 $\mu\text{mol/L}$)	88.66 \pm 10.53	23.07 \pm 6.23	26.02
As ₂ O ₃ (2 $\mu\text{mol/L}$) + Aspirin(1 mmol/L)	50.21 \pm 5.94 ^{abc}	40.72 \pm 9.54 ^{abc}	73.75 ^{abc}

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^b $P < 0.05$ vs 2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃组;

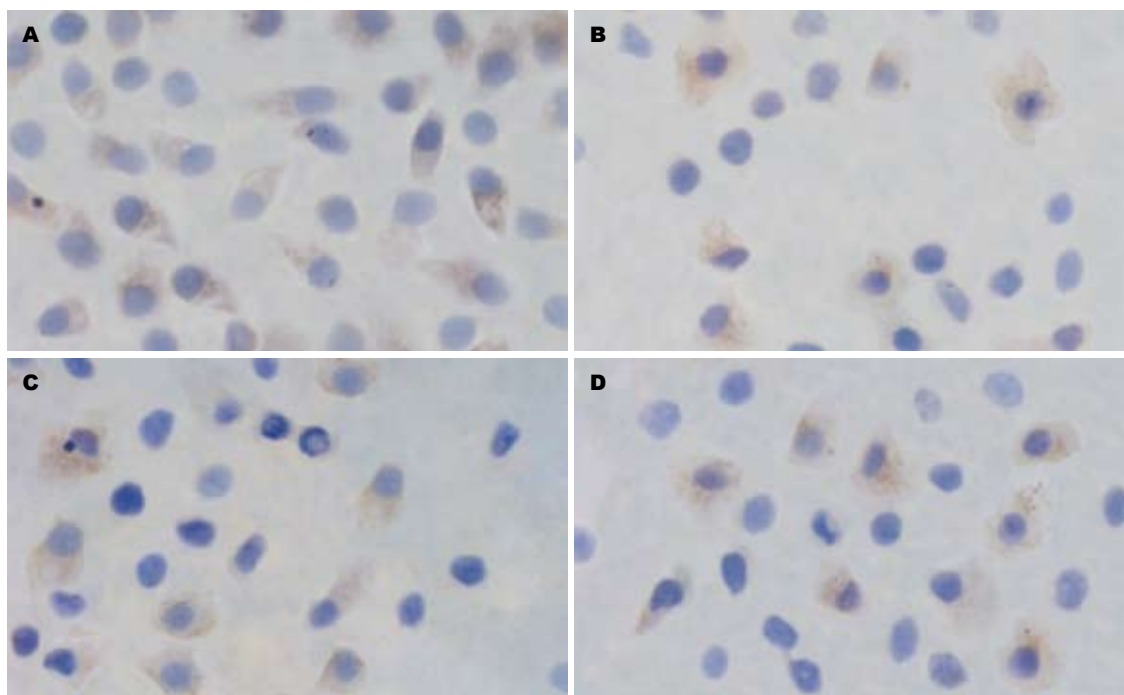
^c $P < 0.05$ vs 1 mmol/L Aspirin组.

Aspirin属于非甾体类抗炎药(non-steroids-anti-inflammatory agents, NSAIDs), 是传统临床抗炎镇痛药, 近年来也用于某些肿瘤防治及研究, 发现其对多种体内移植瘤或诱发性肿瘤具有一定的抗肿瘤作用^[5-6], 但机制尚未完全阐明. 我们的实验主要研究联合应用As₂O₃与Aspirin对人胃癌SGC-7901细胞凋亡的影响, 探讨两者联合应用诱导体外SGC-7901细胞凋亡的机制, 以期临床制定科学有效的化疗方案提供理论和实验依据.

细胞凋亡也称程序性细胞死亡, 是细胞在一系列内源性基因调控下发生的细胞主动性死亡. 凋亡相关基因众多, 其中**bax**、**p53**等基因

有促进凋亡的作用, **bcl-2**、**bcl-xl**等基因有抑制凋亡的作用. **bcl-2**与**bax**是其中最具代表性的基因, Bcl-2蛋白的生理功能主要是阻遏细胞凋亡, Bax蛋白的功能与Bcl-2蛋白相反. Bcl-2主要通过Bax形成二聚体而发挥作用, 当Bcl-2表达量较高则形成异源二聚体而发挥抗凋亡作用, 而**bax**基因表达占优势则形成同源二聚体而发挥促凋亡作用. 种种研究表明, As₂O₃可抑制肿瘤细胞生长, 与As₂O₃调控**bcl-2**、**bax**基因密切相关^[7-8]. Aspirin属于NSAIDs, 临床广泛用于消炎、解热、镇痛及抗风湿病. 研究显示NSAIDs具有较广谱的抗肿瘤作用, 尤其是作用于消化道肿瘤^[9-11], 其机制包括抑制环氧酶COX-2减少前列腺素PGE₂生成和抑制NF- κ B活性或降低NF- κ B结合活性诱导凋亡等^[12-14]. Aspirin诱导肿瘤细胞凋亡与**bax**基因的上调有关^[15-16]. Gao *et al*研究表明, Aspirin可诱导多种恶性肿瘤细胞凋亡, 发现Bcl-2蛋白表达减少, 同时Bax蛋白表达增加^[17-18].

我们通过流式细胞术检测发现, 阴性对照组SGC-7901凋亡率仅1.55%, 表明细胞处于凋亡抑制状态, 4 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃、2 mmol/L Aspirin或2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃+1 mmol/L Aspirin联合作用后72 h, SGC-7901细胞凋亡率分别上升至27.84%、10.07%和19.01%, 与阴性对照组相比, 凋亡率均显著升高($P < 0.05$), 而2 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃及1 mmol/L



■应用要点

本研究发现 As_2O_3 和Aspirin联合应用具有协同作用, 可同时降低两药的用量, 为临床制定化疗方案提供实验经验和理论依据。

图 3 SGC-7901中的Bcl-2表达(SP × 400). A: 对照组; B: 2 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 +1 mmol/L Aspirin联合用药组; C: 2 mmol/L Aspirin组; D: 4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组.

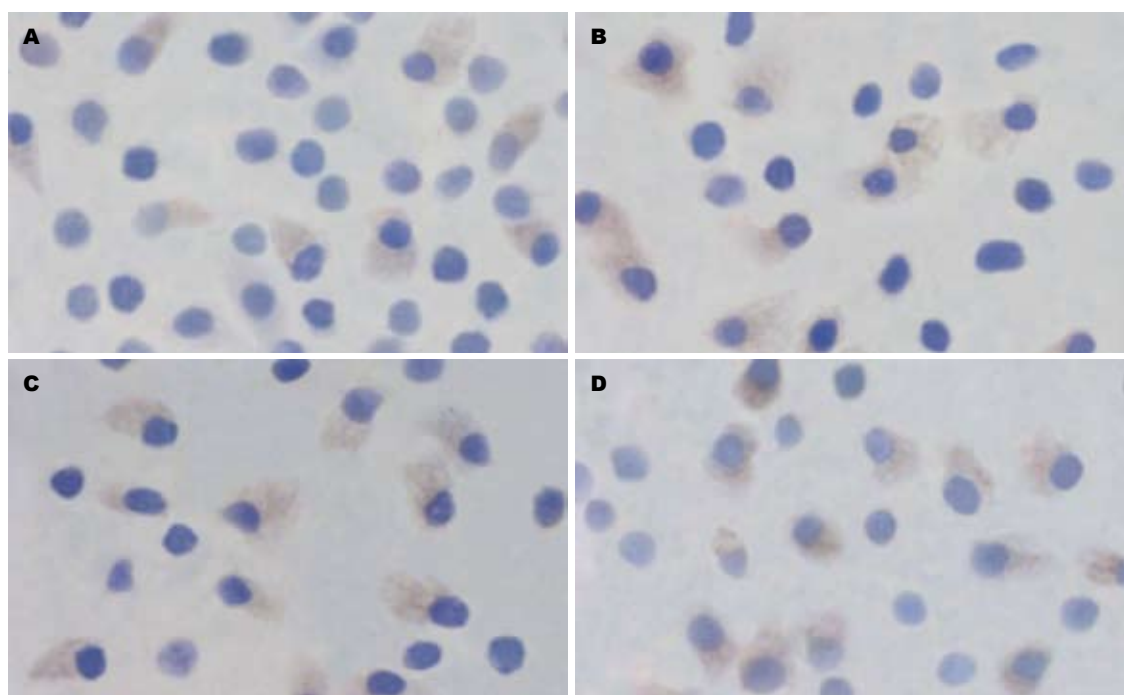


图 4 SGC-7901中的Bax表达(SP × 400). A: 对照组; B: 2 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 +1 mmol/L Aspirin联合用药组; C: 2 mmol/L Aspirin组; D: 4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组.

Aspirin单用药组无明显凋亡诱导作用, 表明联合用药组较单用同浓度药的作用强, 且2 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 +1 mmol/L Aspirin联合用药组与2 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 及1 mmol/L Aspirin单用药组的凋亡率相比, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 说明这两种药物联合应用, 在诱导SGC-7901细胞凋亡方面具有协同作用. 本实验结果还显示, As_2O_3 与

Aspirin作用于SGC-7901细胞后, Bcl-2蛋白的表达与阴性对照组相比明显降低, Bax蛋白的表达与阴性对照组相比明显增高, 说明 As_2O_3 与Aspirin联合应用可能是通过升高Bax/Bcl-2比率诱导细胞凋亡.

总之, As_2O_3 与Aspirin联合作用于人胃癌细胞株SGC-7901, 具有协同抗肿瘤作用, 同时可以

■同行评价

本研究发现As₂O₃作用于SGC-7901细胞后, Bcl-2蛋白的表达与阴性对照组相比明显降低, Bax蛋白的表达与阴性对照组相比明显增高, 说明As₂O₃与Aspirin联合应用可能是通过升高Bax/Bcl-2比率诱导细胞凋亡. 该文章有一定的科学性、创新性和可读性.

降低两药的用量. As₂O₃与Aspirin联合应用导致抑制Bcl-2蛋白表达, 增强Bax蛋白活性, 诱导细胞凋亡, 提示可能为其抑制胃癌细胞株生长的机制之一.

4 参考文献

- 1 刘晓川, 刘铁夫. 缺氧时三氧化二砷对人肝癌细胞株生长及凋亡的影响及机制. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1983-1988
- 2 Baj G, Arnulfo A, Deaglio S, Mallone R, Vigone A, De Cesaris MG, Surico N, Malavasi F, Ferrero E. Arsenic trioxide and breast cancer: analysis of the apoptotic, differentiative and immunomodulatory effects. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 73: 61-73
- 3 刘静冰, 秦叔逵, 李进. 三氧化二砷诱导胰腺癌细胞系凋亡及其抑制转移的作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1952-1955
- 4 Xiao YF, Liu SX, Wu DD, Chen X, Ren LF. Inhibitory effect of arsenic trioxide on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5780-5786
- 5 Duan L, Wu AH, Sullivan-Halley J, Bernstein L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric adenocarcinomas in Los Angeles County. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 126-134
- 6 Fan XM, Wong BC, Lin MC, Cho CH, Wang WP, Kung HF, Lam SK. Interleukin-1beta induces cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer cells by the p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1098-1104
- 7 Chen H, Qin S, Pan Q. [Antitumor effect of arsenic trioxide on mice experimental liver cancer] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2000; 8: 27-29
- 8 Ai Z, Lu W, Qin X. Arsenic trioxide induces gallbladder carcinoma cell apoptosis via downregulation of Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 1075-1081
- 9 Subbegoowda R, Frommel TO. Aspirin toxicity for human colonic tumor cells results from necrosis and is accompanied by cell cycle arrest. *Cancer Res* 1998; 58: 2772-2776
- 10 Lai MY, Huang JA, Liang ZH, Jiang HX, Tang GD. Mechanisms underlying Aspirin-mediated growth inhibition and apoptosis induction of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cell line SW480. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4227-4233
- 11 Luciani MG, Campregher C, Gasche C. Aspirin blocks proliferation in colon cells by inducing a G1 arrest and apoptosis through activation of the checkpoint kinase ATM. *Carcinogenesis* 2007; 28: 2207-2217
- 12 Qiao L, Hanif R, Sphicas E, Shiff SJ, Rigas B. Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 53-64
- 13 Gradilone A, Silvestri I, Scarpa S, Morrone S, Gandini O, Pulcinelli FM, Gianni W, Frati L, Agliano AM, Gazzaniga P. Failure of apoptosis and activation on NFkappaB by celecoxib and aspirin in lung cancer cell lines. *Oncol Rep* 2007; 17: 823-828
- 14 Stark LA, Reid K, Sansom OJ, Din FV, Guichard S, Mayer I, Jodrell DI, Clarke AR, Dunlop MG. Aspirin activates the NF-kappaB signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28: 968-976
- 15 Zhou XM, Wong BC, Fan XM, Zhang HB, Lin MC, Kung HF, Fan DM, Lam SK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1393-1397
- 16 Gu Q, Wang JD, Xia HH, Lin MC, He H, Zou B, Tu SP, Yang Y, Liu XG, Lam SK, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Kung HF, Wong BC. Activation of the caspase-8/Bid and Bax pathways in aspirin-induced apoptosis in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 541-546
- 17 Gao J, Niwa K, Sun W, Takemura M, Lian Z, Onogi K, Seishima M, Mori H, Tamaya T. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit cellular proliferation and upregulate cyclooxygenase-2 protein expression in endometrial cancer cells. *Cancer Sci* 2004; 95: 901-907
- 18 Kim KY, Seol JY, Jeon GA, Nam MJ. The combined treatment of aspirin and radiation induces apoptosis by the regulation of bcl-2 and caspase-3 in human cervical cancer cell. *Cancer Lett* 2003; 189: 157-166

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 2008-11-18)

黄芪、莪术配伍对胃癌细胞COX-2表达的调节作用

沈天华, 沈洪, 骆殊, 朱学军, 刘丽, 李春婷, 刘亚军

沈天华, 沈洪, 刘亚军, 江苏省中医院消化科 江苏省南京市 210029

骆殊, 李春婷, 南京中医药大学 江苏省南京市 210029

朱学军, 刘丽, 江苏省中医院分子细胞实验室 江苏省南京市 210029

沈天华, 主治医师, 主要研究方向为中药抗消化系统肿瘤的分子机制研究.

江苏省中医药管理局资助项目, No. H05044

作者贡献分布: 沈天华, 沈洪, 骆殊及刘亚军对此文贡献均等; 此课题由沈天华与沈洪共同设计; 实验过程由骆殊, 沈天华及刘亚军共同完成; 数据分析由沈天华, 骆殊, 朱学军及刘丽完成; 本文撰写由沈天华, 骆殊及李春婷完成.

通讯作者: 沈洪, 210029, 江苏省南京市汉中中路155号, 江苏省中医院消化科. shenhong999@163.com

电话: 025-86617141

收稿日期: 2008-08-22 修回日期: 2008-10-17

接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-18

Regulatory effect of compatibility of Astragalus membranaceus and Rhizoma curcumae on COX-2 expression in gastric cancer MKN-45 cells

Tian-Hua Shen, Hong Shen, Shu Luo, Xue-Jun Zhu, Li Liu, Chun-Ting Li, Ya-Jun Liu

Tian-Hua Shen, Hong Shen, Ya-Jun Liu, Department of Gastroenterology, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Shu Luo, Chun-Ting Li, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Xue-Jun Zhu, Li Liu, Molecular and Cellular Laboratory, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Fund from Chinese Medicine Bureau of Jiangsu Province, No. H05044

Correspondence to: Hong Shen, Department of Gastroenterology, Jiangsu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. shenhong999@163.com

Received: 2008-08-22 Revised: 2008-10-17

Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of Astragalus membranaceus and Rhizoma curcumae's compatibility on MKN-45 cells and the regulatory action of the compatibility on expression of cyclooxygenase 2 (COX-2), peroxisome proliferators activated receptor (PPAR γ) and nuclear factor κ B (NF- κ B).

METHODS: The compatibility of Astragalus

membranaceus and Rhizoma curcumae was used on MKN-45 cells and there were five groups including Celecoxib group, Rosiglitazone group, Astragalus membranaceus group, Rhizoma curcumae group and control group. The inhibition ratio in each group was determined using MTT method, and the expressions of COX-2 mRNA, PPAR γ mRNA, NF- κ B mRNA and COX-2 protein were measured using RT-PCR and Western blot methods.

RESULTS: Both the Chinese drugs and Western medicines had suppression on NF- κ B mRNA and COX-2 mRNA. All medicines except Rhizoma curcumae promoted the expression of PPAR γ mRNA. The most obvious suppressive effect on COX-2 mRNA expression was detected in celecoxib group and compatibility group. And suppressive effect was significantly stronger in compatibility group than either in Astragalus membranaceus group or Rhizoma curcumae group. Both Rosiglitazone group and compatibility group had the best suppressive effect on NF- κ B mRNA and the best promoting effect on PPAR γ mRNA.

CONCLUSION: Astragalus membranaceus and Rhizoma curcumae's compatibility has better effect with marked suppressive effect. The compatibility group showed stronger suppressive effect on COX-2 expression than Astragalus membranaceus and Rhizoma curcumae used alone, closing to Celecoxib. Its suppressive effect on COX-2 may be produced through the signal pathway of PPAR γ /NF- κ B.

Key Words: Astragalus membranaceus; Rhizoma curcumae; Compatibility; Gastric cancer; Signal pathway; Cyclooxygenase-2; Peroxisome proliferators activated receptor; Nuclear factor κ B

Shen TH, Shen H, Luo S, Zhu XJ, Liu L, Li CT, Liu YJ. Regulatory effect of compatibility of Astragalus membranaceus and Rhizoma curcumae on COX-2 expression in gastric cancer MKN-45 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3599-3604

摘要

目的: 观察黄芪、莪术配伍对MKN-45细胞

■背景资料

本课题组的前期研究已证实黄芪、莪术对胃癌COX-2的表达有抑制作用,并以此为靶点发挥抗肿瘤作用.但临床中很少单独用于治疗肿瘤患者,多将二者配伍使用,构成益气活血的治疗方法.所以,本研究以黄芪、莪术配伍为研究对象,以证实配伍后较单位药物具有更强的抗肿瘤作用,并进一步揭示中药调节COX-2表达的信号通路机制.

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

■研究前沿

目前已经证实,在COX-2基因的5'端flanking区域存在两处NF- κ B结合位点。在各种刺激因素作用下,NF- κ B被激活后从胞质移位至细胞核内,与COX-2的NF- κ B结合位点结合,启动COX-2基因的转录,促进COX-2的表达上调,从而引起细胞凋亡与增殖的失衡及其他种种变化,最终诱发癌变。

COX-2、PPAR γ 、NF- κ B的影响。

方法:以黄芪、莪术配伍作用于MKN-45细胞,并设塞来希布组、罗格列酮组、黄芪组、莪术组和空白组相对照。用MTT法观察各组药物对胃癌细胞的抑制率,用RT-PCR以及Western blot方法检测给药后人胃癌细胞COX-2、PPAR γ 、NF- κ B基因及COX-2蛋白表达的变化。

结果:各组对COX-2和NF- κ B的mRNA表达均有抑制作用,除莪术外对PPAR γ mRNA均有促表达作用,其中以塞来希布组和配伍组对COX-2 mRNA表达的抑制作用最为明显,且配伍组作用明显强于黄芪组和莪术组,以罗格列酮组和配伍组对NF- κ B mRNA的表达抑制作用和对PPAR γ 表达的促表达作用都是最明显。

结论:黄芪、莪术配伍能起到增效作用,对细胞的抑制效应明显,对COX-2的抑制作用大于黄芪、莪术的单独效应,与塞来希布相近,其对COX-2的抑制作用可能是通过PPAR γ /NF- κ B信号途径发挥作用的。

关键词:黄芪;莪术;配伍;胃癌;信号通路;环氧化物合成酶2;过氧化物酶增殖因子激活受体 γ ;核因子 κ B

沈天华, 沈洪, 骆殊, 朱学军, 刘丽, 李春婷, 刘亚军. 黄芪、莪术配伍对胃癌细胞COX-2表达的调节作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3599-3604
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3599.asp>

0 引言

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸生物合成前列腺素的限速酶。COX-2为其中一种亚型,他的过度表达与胃癌发生、发展有关^[1]。刺激COX-2表达的因子广泛存在于细胞内外,主要包括:促肿瘤剂(如脂TPA, PMA),癌基因(如*ras*, *v-src*),内皮素(ET),一氧化氮(NO)等,这些刺激因子经过一系列信号转导途径作用于COX-2的5'旁侧区的转录调控序列,促进COX-2转录,诱导COX-2的表达。COX-2与胃癌具有密切联系,其在正常胃黏膜、浅表性胃炎、萎缩性胃炎伴肠化、不典型增生及胃癌组织中的表达呈逐渐递增趋势^[2-5],且与胃癌等消化系统肿瘤的发生、发展和转移之间具有明显相关性^[6-10]。

过氧化物酶增殖因子激活受体(peroxisome proliferators activated receptor γ , PPAR γ),是

核激素受体超家族中的一员,在脂肪形成及炎症过程中起重要作用。最近发现,PPAR γ 在多种肿瘤细胞上表达,经其配体作用后可通过其下游目的基因,如抑癌基因(PTEN)、原癌基因(*c-myc*)、*p27*、COX-2和间质金属蛋白酶9(MMP9)等,实现其抑制细胞生长以及诱导细胞凋亡和抑制肿瘤血管形成等生物学功能^[11-14]。近年来研究表明PPAR- γ 以失活状态在多种肿瘤中高表达,同时大量文献证实PPAR- γ 配体可以通过激活PPAR- γ 而发挥潜在的抗肿瘤作用^[15-17]。

NF- κ B是一种基因多显性转录因子,与多种基因的转录有关,参与多种肿瘤发生发展的过程。结构性活化的NF- κ B与肿瘤形成的几个方面有关,包括上调促细胞存活基因表达促进肿瘤细胞增殖分化、抑制促凋亡因子抑制肿瘤细胞凋亡、促进恶性转化、浸润转移和肿瘤血管形成等^[18]。NF- κ B在胃癌细胞和组织中过表达,通过使其靶基因COX-2、ICAM-1、uPA^[19], IL-8^[20-21]等的mRNA及蛋白水平上调,从而与胃癌形成,浸润转移密切相关并在某种程度上决定着患者的预后^[22]。因此,结构性活化的NF- κ B与上皮源性的肿瘤(如乳腺癌、胃癌、膀胱癌等)有关,提示其高表达或过度激活在肿瘤的发生、发展中起重要作用^[23-25]。

在益气活血法治疗胃癌的前期研究中,我们已经分别证实黄芪、莪术能调控COX-2的表达,进而抑制VEGF、PGE2的表达来发挥其抗肿瘤作用。但黄芪、莪术配伍而成的益气活血法效用如何,通过何种途径实现对COX-2的调控还不清楚,本研究旨在进一步探讨益气活血法抗肿瘤的作用,通过蛋白、基因检测技术测定黄芪、莪术配伍对胃癌细胞COX-2、PPAR γ 、NF- κ B表达的影响,从分子生物学角度揭示黄芪、莪术配伍作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 黄芪和莪术饮片由江苏省中医院制剂部提供;塞来希布胶囊(塞来昔布)(西尔大药厂波多黎各分厂生产,辉瑞制药有限公司分口包装,批号: BK070127),罗格列酮片剂(文迪雅)(天津葛兰素-史克有限公司生产,批号: 07030016)购自江苏省中医院中心药房。人胃癌细胞株MKN-45购自上海仁济医院。RPMI 1640干粉培养基、胎牛血清为Gibico公司产品,MTT、二甲基亚砜(DMSO)为Sigma公

表 1 RT-PCR引物序列

目的基因	正义序列	反义序列	片段长度(bp)
COX-2	5' TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT 3'	5' GAG TAT GAG TCT GCT GGT TTG GAA TAG TT 3'	490
PPAR γ	5' TCT GGC CCA CCA ACT TTG GG 3'	5' CTT CAC AAG CAT GAA CTC CA 3'	361
NF- κ B	5' TCA ATG GCT ACA CAG GAC 3'	5' TTG AGC AGG ATG CTG AGG ATT CTG 3'	352

公司产品. 山羊抗人COX-2的多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的抗山羊IgG抗体均购自Abcam公司. 预染蛋白Marker(Fermentas), 100 bp DNALadder(TaKaKa), Total RNA TRIzol抽提试剂盒(Invitrogen), ECL化学发光试剂为英国Amersham公司产品. 第一链cDNA合成试剂盒、PCR扩增试剂盒购自上海生工生物有限公司. 其他试剂如SDS上样缓冲液、显影液、定影液、琼脂糖等由江苏省中医院分子细胞实验室提供.

1.2 方法

1.2.1 MTT法观察药物对细胞的抑制率: 以每孔 1×10^4 个细胞的单细胞悬液接种于96孔培养板(每孔100 μ L), 分别加入黄芪(10 mg/L)、莪术(5 mg/L)、黄芪与莪术配伍(10 mg/L)、塞莱希布(100 μ mol/L)、罗格列酮(20 μ mol/L), 37 $^{\circ}$ C CO $_2$ 孵箱中分别培养24、48、72 h. 然后每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育4 h后弃上清, 加入100 μ L DMSO振荡10 min, 在酶联免疫检测分析仪测定 A_{490nm} 的值. 以只加培养液的空白对照孔调零. 根据公式: 细胞增殖抑制率 = (对照组吸光度平均值 - 实验组吸光度平均值) / 对照组吸光度平均值 $\times 100\%$, 计算各组药物对胃癌细胞的抑制率.

1.2.2 RT-PCR测COX-2、PPAR γ 、NF- κ B基因: 取对数生长期的细胞加入到6孔板中(2×10^6 个/孔), 细胞贴壁后加药, 作用24、48、72 h后收集各组细胞. 用Total RNA TRIzol试剂盒提取RNA, 并用紫外分光光度计测定 A_{260nm} 及 A_{280nm} 值, 分析其纯度, 同时定量. 于冰上混合2 μ g RNA样品及10 μ L随机六聚体引物, 70 $^{\circ}$ C退火5 min, 立即置于冰浴中, 加入5 μ L逆转录酶缓冲液, 40 mU/L rRNase抑制剂1 μ L, 10 mmol/L dNTP 1.25 μ L, 200 U/mL的M-MLV逆转录酶1 μ L, 并加水至25 μ L充分混合. 然后37 $^{\circ}$ C 1 h; 80 $^{\circ}$ C 5 min终止反应, -20 $^{\circ}$ C保存.

PCR反应体系: 10 \times reaction Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl $_2$ 18.0 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 10 mmol/L上下游引物各1 μ L(表1), cDNA

2 μ L, 及Taq酶1 μ L, 补加水至50 μ L. PCR条件: 94 $^{\circ}$ C热启动, 95 $^{\circ}$ C变性50 s, 58 $^{\circ}$ C复性50 s, 72 $^{\circ}$ C延伸50 s, 35循环, 其中NF- κ B复性的温度和时间52 $^{\circ}$ C 50 s. 最后于72 $^{\circ}$ C延伸8 min. 反应完毕后, 取扩增产物10 μ L, 于1.5 g/L的琼脂糖凝胶上进行电泳分析. 为比较各组细胞间表达水平的强弱, 应用图像分析仪对扩增条带做了扫描半定量.

1.2.3 Western blot检测COX蛋白表达: 换用含药物的RPMI 1640培养液, 分别在培养24、48、72 h后, 终止培养, 弃培养液, 用预冷的PBS洗两遍, 加100 μ L含PMSF的裂解液, 于冰上裂解. 超声(150-200 W)3 s, 10次. 离心, 分装倒0.5 mL的离心管中. 用BCA法将细胞的蛋白样品定量, 并于100 $^{\circ}$ C, 5 min煮沸变性处理. 制作100 mL/L的分离胶和40 mL/L的浓缩胶, 按每孔60 μ g蛋白上样. 电泳时电压调至最大, 电流强度浓缩胶30 mA, 分离胶40 mA(恒流). 用100 V电压转膜60-90 min. 转膜完毕后用封闭液封闭1.5 h. 再用TBST液洗3次, 每次10 min. 加入COX-2的一抗, 4 $^{\circ}$ C冰箱过夜. 一抗浓度: 均为1:500, 用含50 g/L脱脂牛奶的TBST稀释. 一抗孵育成功后用TBST液洗3次, 每次10 min. 加入二抗室温下孵育1 h. 二抗浓度为1:2000, 用含50 g/L脱脂牛奶的TBST稀释. 最后再用TBST液洗3次, 每次10 min. 每张膜加1:1的发光液1 mL, 在暗室中曝光5-7 min, 等条带清晰后将胶片取出, 扫描后用Tanon Gis 3500软件半定量分析.

2 结果

用MTT法测定各组细胞增殖活力, 可以看出, 在药物开始作用的24 h里, 塞莱希布组、黄芪组、莪术组和配伍组对细胞产生了抑制作用, 与空白组和罗格列酮组差异明显, 且塞莱希布组、黄芪组、莪术组和配伍组作用相近. 药物作用48 h时, 各组均对细胞产生了抑制作用, 与空白组对比差异明显, 且莪术组、配伍组与塞莱希布组的抑制作用相当. 药物作用48 h后, 配

■ 相关报道

湛辉 *et al* 研究发现在大鼠结肠炎的模型中, 应用PPAR γ 激动剂罗格列酮, 可以观察到大鼠组织中COX-2、PGE2、TNF- α 等炎症介质表达显著减少.

■应用要点

本研究发现黄芩、莪术配伍后可能是通过PPAR γ /NF- κ B信号途径调控胃癌COX-2的表达,进而发挥抗肿瘤作用,为进一步研究其抗肿瘤机制提供了实践经验。

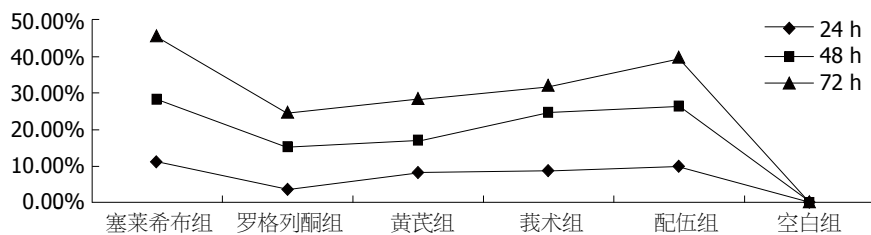


图 1 各组药物对细胞的抑制率。

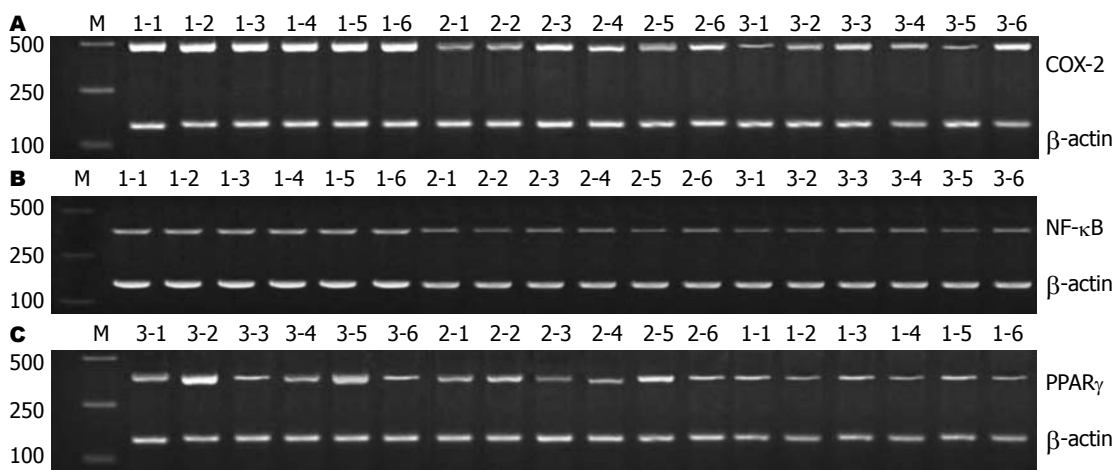


图 2 胃癌细胞中COX-2, NF- κ B及PPAR γ mRNA的表达. A: COX-2; B: NF- κ B; C: PPAR γ mRNA; 1-: 作用24 h; 2-: 作用48 h; 3-: 作用72 h; 1: 塞莱希布组; 2: 罗格列酮组; 3: 黄芪组; 4: 莪术组; 5: 配伍组; 6: 空白组。

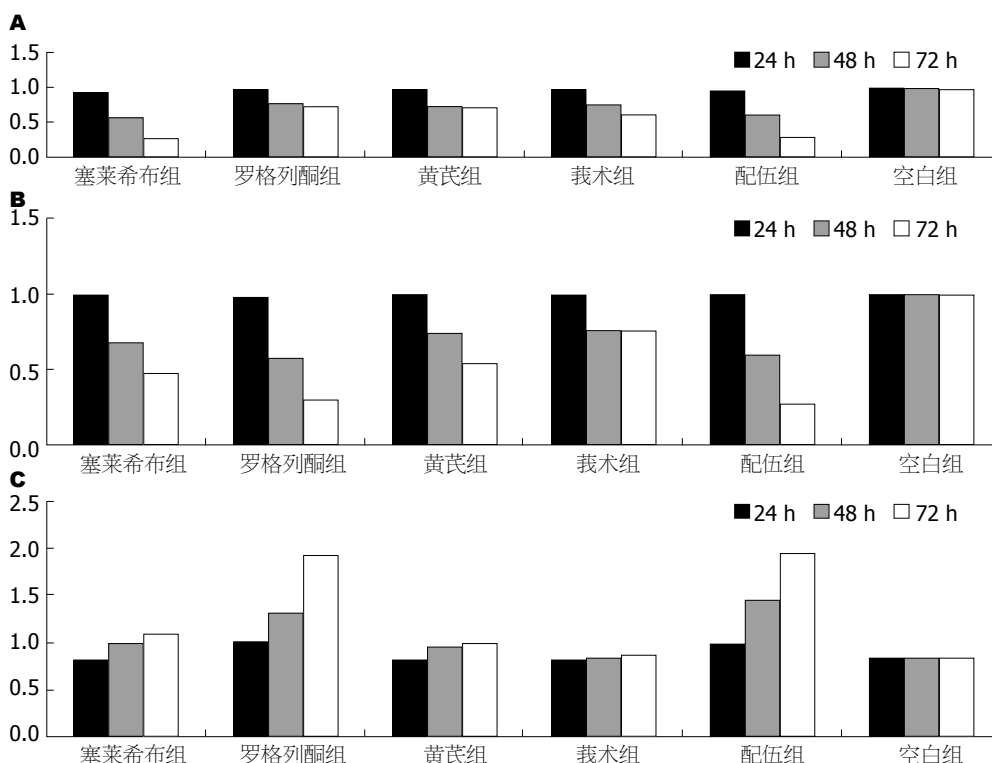


图 3 中西药对COX-2, NF- κ B及PPAR γ mRNA表达的影响. A: COX-2; B: NF- κ B; C: PPAR γ .

伍组抑制作用明显高于黄芪组和莪术组, 仅次于塞莱希布组(图1). 将RT-PCR产物经电泳分析, 加入各引物后均可在相应位置见到其扩增带, 且特异性好. 说明胃癌细胞中有COX-2

mRNA、PPAR γ mRNA、NF- κ B mRNA的表达(图2). 对各条带进行灰度分析发现, 中西药对COX-2 mRNA和NF- κ B mRNA均有抑制作用, 除莪术外, 其他中西药对PPAR γ mRNA均

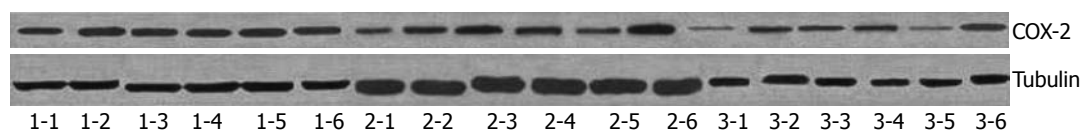


图4 COX-2蛋白表达. 1-: 作用24 h; 2-: 作用48 h; 3-: 作用72 h; 1: 塞莱希布组; 2: 罗格列酮组; 3: 黄芪组; 4: 莪术组; 5: 配伍组; 6: 空白组.

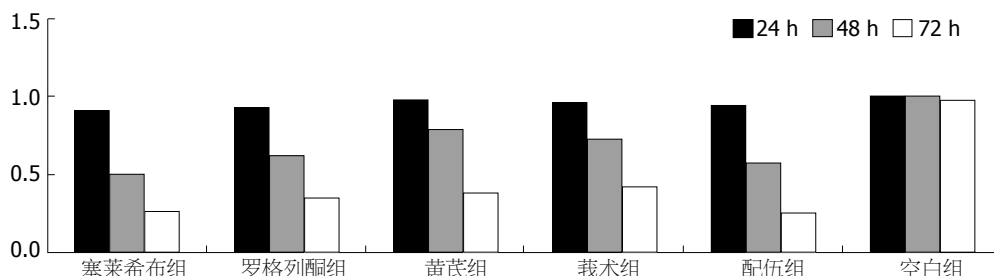


图5 COX-2蛋白灰度分析.

有促进表达的作用. 各组对COX-2的抑制作用以塞莱希布组和配伍组最明显, 且成时间依赖性. 对PPAR γ 的影响罗格列酮组和中药配伍组效果明显, 塞莱希布组和黄芪组亦有促进作用(图3). 胃癌细胞的Western blot曝光结果可见, 正常对照细胞组在72 kDa处均可见特异性的COX-2蛋白表达条带(图4), 说明MKN-45细胞中有COX-2蛋白的表达. 内参Tubulin的表达在55 kDa处. 对各条带进行灰度分析发现: 各组中西药对COX-2均有明显的抑制作用, 且成时间依赖性, 其中以中药配伍和塞莱希布的抑制作用最强(图5).

3 讨论

目前已经证实在COX-2基因的5'端flanking区域存在两处NF- κ B结合位点. 在各种刺激因素作用下, NF- κ B被激活后从胞质移位至胞核内, 与COX-2的NF- κ B结合位点结合, 启动COX-2基因的转录, 促进COX-2的表达上调, 从而引起细胞凋亡与增殖的失衡及其他种种变化, 最终诱发癌变. 而PPAR γ 可以直接与NF- κ B的亚基p65/p50结合, 发生蛋白质-蛋白质相互作用, 形成转录抑制复合物, 降低了NF- κ B与DNA结合活性, 抑制NF- κ B DNA合成^[26-27]. 从而抑制其下游相关基因的表达. PPAR γ 还可以通过与竞争结合协同活化因子p300和CBP来抑制NF- κ B的转录. 据报道, 在大鼠结肠炎的模型中, 应用PPAR γ 激动剂罗格列酮, 可以观察到大鼠组织中COX-2、PGE₂、TNF- α 等炎症介质表达显著减少, 证实了上述说法^[28-30].

从MTT结果看, 塞莱希布抑制作用最强, 说

明COX-2在胃癌细胞中有明显表达, 是抑制胃癌细胞生长的重要靶点, 罗格列酮对细胞也有一定的抑制作用, 但作用较弱. 配伍组作用与塞莱希布接近, 说明配伍组可能是以COX-2为作用靶点的. 这与COX-2 mRNA结果吻合. 通过对NF- κ B mRNA的结果分析可见, 罗格列酮的抑制作用最明显, 与其对PPAR γ 的促表达作用成明显的负相关性, 证明PPAR γ 高表达可以降低NF- κ B的水平, 与目前的观点相符. 同时罗格列酮对COX-2的抑制作用存在时间依赖性, 其抑制趋势与其对NF- κ B的抑制相关, 且塞莱希布对PPAR γ 无明显促表达作用, 说明NF- κ B、COX-2可能依次是PPAR γ 调节的下游基因, COX-2可能受PPAR γ /NF- κ B信号通路的调控. 中药的作用结果表明, 黄芪、莪术配伍后对肿瘤细胞的抑制作用要强于单用黄芪或莪术. 黄芪、莪术单用时对NF- κ B、COX-2的抑制作用及对PPAR γ 的促表达作用均分别弱于塞莱希布和罗格列酮, 但配伍后的作用均不亚于塞莱希布和罗格列酮, 即明显提高PPAR γ mRNA水平, 同时降低NF- κ B mRNA、COX-2 mRNA水平. 总之, 黄芪、莪术配伍后可能是通过PPAR γ /NF- κ B信号途径调控胃癌COX-2的表达, 进而发挥抗肿瘤作用.

4 参考文献

- 1 Tang X, Sun YJ, Half E, Kuo MT, Sinicrope F. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4903-4908
- 2 Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Soma G, Inoue M. Cyclooxygenase-2 expression correlates with

■同行评价

本文探讨中药配伍抑癌作用的机制, 选题新颖, 研究方法先进, 有较好的科学意义.

- apoptosis and angiogenesis in endometrial cancer tissue. *Anticancer Res* 2007; 27: 3765-3770
- 3 Trifan OC, Hla T. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 207-222
- 4 Ferguson HR, Wild CP, Anderson LA, Murphy SJ, Johnston BT, Murray LJ, Watson RG, McGuigan J, Reynolds JV, Hardie LJ. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of reflux esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 727-731
- 5 Fujimura T, Ohta T, Oyama K, Miyashita T, Miwa K. Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancers: a review and report of personal experience. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1336-1345
- 6 Mao XY, Wang XG, Lv XJ, Xu L, Han CB. COX-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis using tissue microarray. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3466-3471
- 7 Li M, Liu W, Zhu YF, Chen YL, Zhang BZ, Wang R. Correlation of COX-2 and K-ras expression to clinical outcome in gastric cancer. *Acta Oncol* 2006; 45: 1115-1159
- 8 Samaka RM, Abdou AG, Abd El-Wahed MM, Kandil MA, El-Kady NM. Cyclooxygenase-2 expression in chronic gastritis and gastric carcinoma, correlation with prognostic parameters. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18: 363-374
- 9 陈白莉, 曾志荣, 胡品津, 唐保东, 何瑶, 陈为. 幽门螺杆菌感染与慢性胃炎胃黏膜组织中COX-2、iNOS表达的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 902-906
- 10 周静平, 邓长生. 罗格列酮对大鼠溃疡性结肠炎肠黏膜NF- κ B, ICAM-1表达的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 104-108
- 11 Theocharis S, Margeli A, Vielh P, Kouraklis G. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 545-554
- 12 Nehlin JO, Mogensen JP, Petterson I, Jeppesen L, Fleckner J, Wulff EM, Sauerberg P. Selective PPAR agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067: 448-453
- 13 Han S, Roman J. Suppression of prostaglandin E2 receptor subtype EP2 by PPARgamma ligands inhibits human lung carcinoma cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 1093-1099
- 14 Zandbergen F, Mandard S, Escher P, Tan NS, Patsouris D, Jatke T, Rojas-Caro S, Madore S, Wahli W, Tafuri S, Muller M, Kersten S. The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene. *Biochem J* 2005; 392: 313-324
- 15 Jia Y, Guo GL, Surapureddi S, Sarkar J, Qi C, Guo D, Xia J, Kashireddi P, Yu S, Cho YW, Rao MS, Kemper B, Ge K, Gonzalez FJ, Reddy JK. Transcription coactivator peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein/mediator 1 deficiency abrogates acetaminophen hepatotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 12531-12536
- 16 Kim E, Chen F, Wang CC, Harrison LE. CDK5 is a novel regulatory protein in PPARgamma ligand-induced antiproliferation. *Int J Oncol* 2006; 28: 191-194
- 17 Shen ZN, Nishida K, Doi H, Oohashi T, Hirohata S, Ozaki T, Yoshida A, Ninomiya Y, Inoue H. Suppression of chondrosarcoma cells by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 is associated with altered expression of Bax/Bcl-xL and p21. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 375-382
- 18 Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, Yao T, Tsuneyoshi M, Noshiro H, Nakamura K, Yamanaka T, Uchiyama A, Tanaka M, Katano M. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4136-4142
- 19 Isomoto H, Miyazaki M, Mizuta Y, Takeshima F, Murase K, Inoue K, Yamasaki K, Murata I, Koji T, Kohno S. Expression of nuclear factor-kappaB in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa detected with southwestern histochemistry. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 247-254
- 20 Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gelinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 2006; 25: 6800-6816
- 21 Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 2006; 13: 852-860
- 22 Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 301-310
- 23 Pajak B, Orzechowski A. [FLIP--an enemy which might lose the battle against the specific inhibitors of translation] *Postepy Hig Med Dosw* (Online) 2005; 59: 140-149
- 24 王琼. NF- κ Bp65蛋白在甲状腺癌中的表达及其与细胞周期的关系. *中国实用医药杂志* 2007; 2: 26-28
- 25 陈远能, 陆永伟, 姜海行, 唐国都. survivin mRNA和NF- κ B mRNA在原发性肝癌中的表达及其意义. *新医学* 2007; 38: 361-363
- 26 Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4699-4707
- 27 Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by Helicobacter pylori. *Gut* 2002; 50: 771-778
- 28 湛辉, 张景辉, 刘文琪, 贺永文. 罗格列酮对日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织核因子- κ B和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 741-745
- 29 Tang X, Sun YJ, Half E, Kuo MT, Sinicrope F. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4903-4908
- 30 Shen H, Oesterling E, Stromberg A, Toborek M, MacDonald R, Hennig B. Zinc deficiency induces vascular pro-inflammatory parameters associated with NF-kappaB and PPAR signaling. *J Am Coll Nutr* 2008; 27: 577-587

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

血管生成素-1对人胃癌细胞Bcl-2和Bax表达的影响

欧希龙, 颜芳, 关云艳, 孙为豪, 杨柳, 陈国胜, 产松苗, 陈宝安

欧希龙, 颜芳, 关云艳, 杨柳, 陈国胜, 产松苗, 陈宝安, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009

孙为豪, 陈国胜, 南京医科大学附属第一医院老年医学科 江苏省南京市 210009

欧希龙, 副教授, 硕士研究生导师, 博士研究生, 现主要从事消化系统肿瘤内镜下早期发现早期治疗, 消化系统肿瘤发生, 血管生长及发展机制研究。

作者贡献分布: 欧希龙负责实验设计, 指导及论文撰写; 颜芳, 关云艳, 杨柳, 陈国胜及产松苗负责实验; 颜芳与关云艳负责论文撰写; 孙为豪与陈宝安负责实验设计。

通讯作者: 欧希龙, 210009, 江苏省南京市, 南京市东南大学附属中大医院消化科. ouxilong@126.com

收稿日期: 2008-07-04 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

Effect of angiopoietin-1 on expression of Bcl-2 and Bax in human gastric cancer cells

Xi-Long Ou, Fang Yan, Yun-Yan Guan, Wei-Hao Sun, Liu Yang, Guo-Sheng Chen, Song-Miao Chan, Bao-An Chen

Xi-Long Ou, Fang Yan, Yun-Yan Guan, Liu Yang, Guo-Sheng Chen, Song-Miao Chan, Bao-An Chen, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Wei-Hao Sun, Guo-Sheng Chen, Department of Geriatrics, the First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xi-Long Ou, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. ouxilong@126.com

Received: 2008-07-04 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To explore the possible mechanism underlying the inhibitory effect of angiopoietin-1 (Ang1) on apoptosis of human gastric cancer cells MGC-803.

METHODS: The human gastric cancer cells (MGC-803) were cultured with Ad-Ang1 and Ad-GFP at proper multiplicity of infection (MOI = 20) and the expression levels of *bcl-2* mRNA, *bax* mRNA and Bcl-2 protein, Bax protein were determined using RT-PCR and Western blot, respectively.

RESULTS: The expression levels of Bcl-2 mRNA and its protein were higher in Ad-Ang1 transfected group than in Ad-GFP transfected group

and control group (0.609 ± 0.01 vs 0.462 ± 0.02 , 0.609 ± 0.01 vs 0.475 ± 0.02 , both $P < 0.05$). There was no significant difference between Ad-GFP group and control group. However, compared with the other groups, the expression level of Bax mRNA and its protein in the MGC-803 cells treated with Ad-Ang1 were significantly down-regulated (0.313 ± 0.04 vs 0.413 ± 0.02 , 0.313 ± 0.04 vs 0.407 ± 0.03 , both $P < 0.05$). Meanwhile, the ratio of Bcl-2 to Bax increased markedly in Ad-Ang1 transfected group.

CONCLUSION: Ang1 gene can significantly up-regulate Bcl-2 expression and down-regulate Bax expression at both transcriptional and translational levels *in vitro*, which may be one of mechanisms underlying protection against serum starvation-induced apoptosis.

Key Words: Adenovirus vector; Angiopoietin-1; Gastric cancer; Apoptosis; Bcl-2; Bax

Ou XL, Yan F, Guan YY, Sun WH, Yang L, Chen GS, Chan SM, Chen BA. Effect of angiopoietin-1 on expression of Bcl-2 and Bax in human gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3605-3609

摘要

目的: 探讨人血管生成素-1(angiopoietin-1, Ang1)对体外培养的人胃癌细胞MGC-803所产生的凋亡抑制作用的可能机制。

方法: 以适当感染复数(MOI = 20)的重组腺病毒Ad-Ang1和对照病毒Ad-GFP感染人胃癌细胞, 对照组用无血清培养基培养, 并分别通过RT-PCR、Western blot方法检测Bcl-2及Bax mRNA和蛋白的表达。

结果: Bcl-2 mRNA和蛋白的表达量在Ad-Ang1组中明显高于Ad-GFP组及对照组(0.609 ± 0.01 vs 0.462 ± 0.02 , 0.609 ± 0.01 vs 0.475 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$), Ad-GFP组与对照组相比无显著性差异; 而Ad-Ang1组的Bax mRNA和蛋白的表达量则低于Ad-GFP组及对照组(0.313 ± 0.04 vs 0.413 ± 0.02 , 0.313 ± 0.04 vs 0.407 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$), 后两组相比无显著性差异; Bcl-2/Bax比值在Ad-Ang1组中也明显增高。

■背景资料

目前认为血管内皮生长因子(VEGF)和血管生成素(Ang)是调节血管生成的重要因素, 他们组成一个系统而发挥作用。Ang是继VEGF之后所发现的又一重要的血管形成促进因子, 在多种肿瘤组织如肝癌、结肠癌、胶质瘤、乳腺癌及前列腺癌等中有高表达。

■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

■研究前沿

本课题组前期实验中以腺病毒为载体,将Ang1基因导入体外培养的人胃癌细胞株MGC-803中,并已证实Ang1具有抑制血浆饥饿诱导细胞凋亡的作用。

结论: Ang1基因转染体外培养的人胃癌细胞后,不论是在转录水平还是在翻译水平均上调了细胞Bcl-2的表达,同时使Bax表达下调,Bcl-2/Bax比值增大,此途径可能为Ang1抑制血浆饥饿所诱导的肿瘤细胞凋亡的机制之一。

关键词: 腺病毒载体; 血管生成素-1; 胃癌; 凋亡; Bcl-2; Bax

欧希龙, 颜芳, 关云艳, 孙为豪, 杨柳, 陈国胜, 产松苗, 陈宝安. 血管生成素-1对人胃癌细胞Bcl-2和Bax表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3605-3609

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3605.asp>

0 引言

血管生成这一复杂过程是由很多促血管生成因子所调控的。目前认为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素(angiopoietin, Ang)是调节血管生成的重要因子,他们组成一个系统而发挥作用。Ang家族成员包括Ang1、Ang2、Ang3和Ang4,由于前两者和血管生成关系密切,因而倍受关注。资料显示在多种肿瘤组织中均有Ang1及其受体Tie-2表达增加,特别是在肿瘤边缘的血管新生区。随后研究证实在有VEGF存在的情况下,Ang1和Tie-2结合后具有抑制血管渗漏、维持血管完整性的作用^[1],并由此认为Ang1对肿瘤发生、发展的影响是通过血管机制实现的。在前期实验中为了探讨Ang1对肿瘤细胞是否有直接的作用,我们以腺病毒为载体,将Ang1基因导入体外培养的人胃癌细胞株MGC-803中,并已证实Ang1具有抑制血浆饥饿诱导细胞凋亡的作用,为进一步探讨其可能的机制,我们分别利用RT-PCR及Western blot检测Bcl-2和Bax mRNA及蛋白水平的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞株MGC-803购自中科院,复制缺陷型腺病毒重组体Ad-Ang1及对照病毒Ad-GFP由南京医科大学第一附属医院构建^[2]并赠送。焦碳酸二乙酯(DEPC)水、溴化乙锭(EB)、TRIzol试剂为美国Sigma公司产品,RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司,DNA小分子量Marker购自北京天为时代公司, β -actin鼠抗人mAb为Sigma公司生产,Bcl-2和Bax鼠抗人mAb购自Santa Cruz公司,硝酸纤维素膜和ECL发光剂分别购自美国Bio-Rad公司和GE公司,IgG-HRP二抗为北京中山金桥生物技术公司产品。

1.2 方法

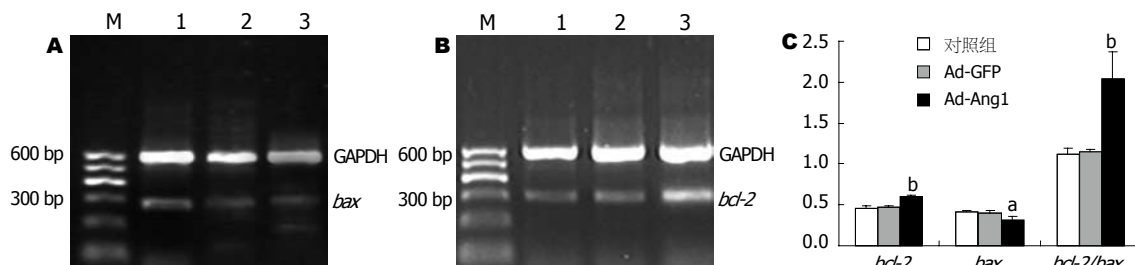
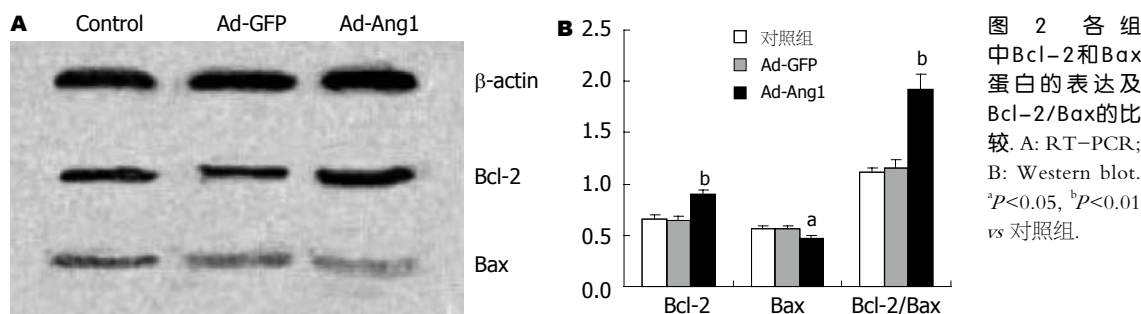
1.2.1 细胞培养: 实验分为对照组、Ad-GFP组和Ad-Ang1组,以细胞浓度为 2.0×10^8 /L,分别接种于3个培养瓶(50 mL)中,于60%-70%细胞贴壁时,对后两组予相应的无血清无抗生素培养液稀释的病毒液3 mL感染(感染复数与前期实验相同,MOI = 20),对照组用无血清培养基培养,8 h后换100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液继续培养,36 h后行下列相应检查。

1.2.2 RT-PCR检测bcl-2 mRNA和bax mRNA的表达: 以1 mL TRIzol试剂分别提取上述3组总RNA,并于完整性鉴定后进行逆转录,反应体系为20 μ L,具体如下: RNA Free H₂O 7.5 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 10 \times RT Buffer 2 μ L, dNTP 2 μ L, OligodT 1 μ L, RNA酶抑制剂0.5 μ L, AMV 1 μ L, RNA样品 2 μ L。反应参数: 45 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min, 反应产物立即扩增或-20 $^{\circ}$ C冻存。引物及其反应步骤见表1。PCR反应体系包括3 μ L cDNA,目的基因及内参的上下游引物(20 μ mol/L)各0.75 μ L, MgCl₂ 1 μ L, 5 \times PCR Buffer 5 μ L, Taq酶0.25 μ L, 灭菌蒸馏水12.75 μ L。将上述各成分加入200 μ L薄壁PCR管中,瞬时离心,上PCR仪进行扩增。然后配制20 g/L琼脂糖凝胶,加入终浓度为0.5 mg/L的溴化乙锭(EB);取5 μ L PCR终产物及DNA Marker,以0.5 \times TBE为缓冲液,电压100 V,电泳40 min;紫外检测仪下观察DNA扩增情况,用ImageMaster VDS扫描分析仪扫描凝胶图谱,用100 bp梯度的PCR Marker作分子量参照,采用Total Lab2.0分析系统(nonlinear dynamics ltd)对PCR产物进行半定量分析,测量区带密度,计算样品区带与GAPDH区带的密度比,计算两者比值作为目的基因的相对表达量。

1.2.3 Western blot检测Bcl-2和Bax蛋白的表达: 对上述3组细胞进行总蛋白的提取,然后配制10%分离胶和5%的积层胶,予十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)变性电泳,各取蛋白样品20 μ g加样,空白孔加1 \times SDS凝胶加样缓冲液补满,电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部,结束电泳,取下凝胶,做好标记。剪取与电泳凝胶大小一致的Whatman 3 MM滤纸和一张PVDF膜,将3 MM滤纸于转移缓冲液中湿润,然后从阴极面(上)到阳极面(下)依次叠放3层3 MM滤纸、凝胶、PVDF膜、3层3 MM滤纸,采用Bio-Rad公司的半干式电转移仪,参照厂家提供的程序进行(25 V \times 30 min),将蛋白印迹在PVDF膜上。最后将硝纤膜取出置一平皿中,加封闭液,室温封闭4

表 1 PCR引物序列、扩增片段长度及反应条件

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物长度(bp)	退火温度(°C)
<i>bcl-2</i>	GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA	AGGCACCCAGGGTGATGCAA	304	54
<i>bax</i>	GAGGATGATTGCCGCCGTGGACA	GGTGGGGGTGAGGAGGCTTGAGG	275	57
GAPDH	CCACCCATGGCAAATTCATGGCA	TCTAGACGGCAGGTCAGTCCAC	598	56

图 1 各组MGC-803细胞中*bcl-2* mRNA和*bax* mRNA表达及*bcl-2/bax*的比较. A: *bcl-2*; B: *bax*; A-B: RT-PCR; C: Western blot. M: Marker; 1: 对照组; 2: Ad-GFP; 3: Ad-Ang1. ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组.图 2 各组中Bcl-2和Bax蛋白的表达及Bcl-2/Bax的比较. A: RT-PCR; B: Western blot. ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组.

h后弃去封闭液, 加入1:500稀释的Bcl-2和Bax一抗(用TBST稀释), 4℃反应过夜, TBST漂洗后加入IgG-HRP(TBST稀释1:100), 室温作用2 h, 再予TBST充分漂洗, 加入ECL显色液, 置于柯达活体成像仪中观察结果, 条件设置为曝光5 min, CCD自动获取图片结果.

统计学处理 实验结果以mean±SD表示, 均数间比较采用*t*检验. 所有数据均采用SAS8.2统计软件进行分析, *P*<0.05表示有显著差异.

2 结果

2.1 RT-PCR检测的*bcl-2*和*bax*基因表达 在Ad-Ang1组中*bcl-2* mRNA的表达明显高于对照组和Ad-GFP组(0.609 ± 0.01 vs 0.462 ± 0.02 , 0.609 ± 0.01 vs 0.475 ± 0.02 , *P*<0.01), 后两组细胞中*bcl-2* mRNA的表达差异无统计学意义; 而*bax* mRNA的表达在Ad-Ang1组中则低于对照组和Ad-GFP组(0.313 ± 0.04 vs 0.413 ± 0.02 , 0.313 ± 0.04 vs 0.407 ± 0.03 , *P*<0.05), 后两组细胞中*bax* mRNA的表达差异无统计学意义; Ang1基因转染后*bcl-2* mRNA/*bax* mRNA比值上调, 和其他两组相比有统计学意义(2.046

± 0.32 vs 1.117 ± 0.07 , 2.046 ± 0.32 vs 1.143 ± 0.03 , *P*<0.01, 图1).

2.2 Western blot检测的Bcl-2和Bax蛋白表达 在Ad-Ang1组中Bcl-2蛋白的表达明显高于对照组和Ad-GFP组(0.906 ± 0.03 vs 0.656 ± 0.04 , 0.906 ± 0.03 vs 0.649 ± 0.03 , *P*<0.01), 后两组细胞中Bcl-2蛋白的表达无显著差异(*P*>0.05); 而Bax蛋白的表达在Ad-Ang1组中则低于对照组和Ad-GFP组(0.472 ± 0.03 vs 0.564 ± 0.03 , 0.472 ± 0.03 vs 0.567 ± 0.03 , *P*<0.05), 后两组细胞中Bax蛋白的表达差异无统计学意义; Ad-Ang1组中Bcl-2/Bax比值明显高于对照组和Ad-GFP组(1.922 ± 0.15 vs 1.109 ± 0.05 , 1.922 ± 0.15 vs 1.152 ± 0.08 , *P*<0.01), 说明基因转染后Bcl-2/Bax比值上调(图2).

3 讨论

Ang是继VEGF之后所发现的又一重要的血管形成促进因子, 在多种肿瘤组织如肝癌^[3]、结肠癌^[4]、胶质瘤^[5]、乳腺癌及前列腺癌^[6]等中有高表达, Wang *et al*^[7]又证实了在胃癌组织中表达也明显高于临近的正常组织, 且与肿瘤分化程

■ 相关报道

Wang *et al*证实了在胃癌组织中表达明显高于临近的正常组织, 且与肿瘤分化程度密切相关. 此外, 该研究人员还应用RT-PCR方法检测了8种胃癌细胞株上血管生成素及受体表达情况, 结果显示在所有检测的细胞株上均有Ang1、Tie-2 mRNA的表达. Harfouche *et al*的实验显示Ang1除通过PI3-K途径使Akt磷酸化以外, 还可上调内皮细胞Survivin蛋白表达, 但对细胞色素C和Bcl-2蛋白表达没有影响.

■同行评价

本文书写规范, 实验设计合理, 方法可靠, 内容较新, 具有一定的参考价值。

度密切相关。此外, 该研究人员还应用RT-PCR方法检测了8种胃癌细胞株上血管生成素及受体表达情况, 结果显示在所有检测的细胞株上均有Ang1、Tie-2 mRNA的表达。目前认为Ang-1参与了肿瘤的发生、发展, 但其对肿瘤发展过程中的作用尚有争议。尽管如此, 人们对Ang1在血管生成中的作用已取得一致看法, 认为Ang1能抑制血管内皮细胞凋亡、介导内皮细胞与血管旁细胞间的相互作用而促进血管重塑、成熟, 维持血管的完整性。实验显示Ang1对不同的内皮细胞, 包括人脐静脉内皮细胞、动脉及微血管内皮细胞等均有抑制凋亡的作用^[8], 而对不同因素如血浆饥饿、肿瘤坏死因子^[9]、氧化应激^[10]、放射线处理和高渗透剂^[11]等所诱导的内皮细胞的凋亡也均有抑制作用。后来, 又有研究证实Ang1对其他种类细胞也有同样的作用。Valable *et al*^[12]应用Caspase-3活性测定方法证实Ang1抑制了血浆饥饿诱导的神经细胞凋亡, 是通过促进Akt的磷酸化而实现的; 应用PI3-K抑制剂后减少了Akt的磷酸化并增加了活性Caspase-3的表达。Dallabrida *et al*^[13]用同样方法检测Ang1对不表达Tie-2的心肌细胞和骨骼肌细胞凋亡的影响, 结果显示Ang1抑制了上述细胞血浆饥饿所诱导的凋亡, 这一作用是由于激活Akt和MAPK p42/44信号途径所致; 应用整合素受体可阻断这一效应, 因而认为整合素可能介导了Ang1作用的发挥。而我们在前期实验中, 利用腺病毒作为载体将外源Ang1基因导入体外培养的人胃癌细胞株MGC-803, 通过流式细胞仪检测该基因对细胞凋亡的影响, 显示Ang1基因也有抑制血浆饥饿诱导的胃癌细胞凋亡的作用^[14]。血浆饥饿所诱导的细胞凋亡是Caspase依赖性的, 而目前认为***bcl-2***为其上游调控分子, 为进一步探讨其抑制凋亡的可能机制, 我们利用RT-PCR及Western blot检测Ang1转染对胃癌细胞在mRNA及蛋白水平上表达***bcl-2***和***bax***的影响。

bcl-2基因家族是对细胞凋亡起调控作用的主要因子, 该家族继1985年首次发现***bcl-2***基因以来, 又陆续增添了很多新成员, 迄今已有近30种, 其中***bax***是通过与***bcl-2***共免疫沉淀而第一个被鉴定出具有促进细胞凋亡作用的基因。***bcl-2***和***bax***通过形成同二聚体或异二聚体对细胞凋亡进行调节。细胞中Bcl-2/Bax比值决定对细胞凋亡的调控方向, 比值低时说明***bax***过量, 形成Bax-Bax同二聚体, 诱导细胞凋亡; 而当Bcl-2蛋白表达增多时, 使Bax-Bax的同二聚体分开并形

成Bax-Bcl-2的异二聚体从而抑制细胞的凋亡。Bcl-2和Bax对凋亡的调节与线粒体有关, Bax-Bcl-2的异二聚体可使线粒体膜通透性增加, 细胞色素C释放增多, 后者通过作用于凋亡蛋白激活因子-1(Apaf-1)继而激活凋亡蛋白酶Caspases, 导致细胞的凋亡^[15]。至于***bcl-2***是否参与了Ang1对细胞的促生存作用, 目前研究较少, 且结果不一致。Harfouche *et al*^[16]的实验显示Ang1除通过PI3-K途径使Akt磷酸化以外, 还可上调内皮细胞Survivin蛋白表达, 但对细胞色素C和Bcl-2蛋白表达没有影响。但也有研究人员证实Ang1可促进Bcl-2蛋白的表达^[17]。本研究显示Ang1基因转染人胃癌细胞株MGC-803后, 在转录和翻译水平上均上调了***bcl-2***的表达, 而***bax*** mRNA和Bax蛋白的表达均下调, Bcl-2/Bax水平增高。因而, 我们认为该途径可能是Ang1基因抑制肿瘤细胞凋亡的机制之一。

4 参考文献

- 1 Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, Steinmetz MO, Ryu YS, Lee SH, Yasunaga K, Kim KT, Kim I, Choi HH, Kim W, Kim SH, Park SK, Lee GM, Koh GY. COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 5547-5552
- 2 周磊, 张馥敏, 杨志健, 陆丽, 丁兆丰, 丁必森, 哈团柱, 李传富, 高翔, 马文珠. 人血管生成素-1和血管内皮生长因子165基因克隆及复制缺陷型腺病毒载体构建. *中华心血管病杂志* 2003; 31: 699
- 3 Torimura T, Ueno T, Kin M, Harada R, Taniguchi E, Nakamura T, Sakata R, Hashimoto O, Sakamoto M, Kumashiro R, Sata M, Nakashima O, Yano H, Kojiro M. Overexpression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 40: 799-807
- 4 Nakayama T, Hatachi G, Wen CY, Yoshizaki A, Yamazumi K, Niino D, Sekine I. Expression and significance of Tie-1 and Tie-2 receptors, and angiopoietins-1, 2 and 4 in colorectal adenocarcinoma: Immunohistochemical analysis and correlation with clinicopathological factors. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 964-969
- 5 Ding H, Roncari L, Wu X, Lau N, Shannon P, Nagy A, Guha A. Expression and hypoxic regulation of angiopoietins in human astrocytomas. *Neuro Oncol* 2001; 3: 1-10
- 6 Caine GJ, Blann AD, Stonelake PS, Ryan P, Lip GY. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer: a comparison with VEGF and Flt-1. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 883-890
- 7 Wang J, Wu K, Zhang D, Tang H, Xie H, Hong L, Pan Y, Lan M, Hu S, Ning X, Fan D. Expressions and clinical significances of angiopoietin-1, -2 and Tie2 in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 386-393
- 8 Kim I, Moon SO, Han CY, Pak YK, Moon SK, Kim JJ, Koh GY. The angiopoietin-tie2 system in coronary artery endothelium prevents oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Cardiovasc Res* 2001;

- 49: 872-881
- 9 Chen JX, Chen Y, DeBusk L, Lin W, Lin PC. Dual functional roles of Tie-2/angiopoietin in TNF- α -mediated angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H187-H195
- 10 Murakami T, Takagi H, Suzuma K, Suzuma I, Ohashi H, Watanabe D, Ojima T, Suganami E, Kurimoto M, Kaneto H, Honda Y, Yoshimura N. Angiopoietin-1 attenuates H₂O₂-induced SEK1/JNK phosphorylation through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 31841-31849
- 11 Kwak HJ, Lee SJ, Lee YH, Ryu CH, Koh KN, Choi HY, Koh GY. Angiopoietin-1 inhibits irradiation- and mannitol-induced apoptosis in endothelial cells. *Circulation* 2000; 101: 2317-2324
- 12 Valable S, Bellail A, Lesne S, Liot G, Mackenzie ET, Vivien D, Bernaudin M, Petit E. Angiopoietin-1-induced PI3-kinase activation prevents neuronal apoptosis. *FASEB J* 2003; 17: 443-445
- 13 Dallabrida SM, Ismail N, Oberle JR, Himes BE, Rupnick MA. Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins. *Circ Res* 2005; 96: e8-e24
- 14 颜芳, 欧希龙, 关云艳, 产松苗, 陈国胜, 杨柳, 孙为豪. 血管生成素-1基因对人胃癌细胞增殖与凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 824-830
- 15 Sawa H, Kobayashi T, Mukai K, Zhang W, Shiku H. Bax overexpression enhances cytochrome c release from mitochondria and sensitizes KATOIII gastric cancer cells to chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Int J Oncol* 2000; 16: 745-749
- 16 Harfouche R, Hassessian HM, Guo Y, Faivre V, Srikant CB, Yancopoulos GD, Hussain SN. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells. *Microvasc Res* 2002; 64: 135-147
- 17 Shi LG, Zhang GP, Jin HM. Inhibition of microvascular endothelial cell apoptosis by angiopoietin-1 and the involvement of cytochrome C. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 725-730

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 2008-11-18)

CagA对AGS细胞Ca²⁺相关蛋白磷酸化的影响

肖迪, 赵飞, 宋衍燕, 孟凡亮, 何利华, 张慧芳, 张建中

■背景资料

H. pylori 感染与胃癌发生密切相关。细胞毒素相关蛋白A(CagA)在*H. pylori*诱导的疾病特别是胃癌的发展中起重要作用, CagA的作用机制尚未清晰。*H. pylori* 胃癌、胃炎相关株其CagA缺失株的蛋白质组学研究尚未发现其相关疾病的标志性蛋白。

肖迪, 赵飞, 宋衍燕, 孟凡亮, 何利华, 张慧芳, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 北京市 102206

肖迪, 助理研究员, 主要从事传染病蛋白质组学研究。

作者贡献分布: 此课题由肖迪与张建中设计; 细菌和细胞培养由肖迪, 宋衍燕, 孟凡亮, 何利华及张慧芳完成; 细菌和细胞相互作用由肖迪与宋衍燕完成; 蛋白提取与磷酸化蛋白富集由肖迪完成; 二维凝胶电泳由肖迪与赵飞完成; 质谱分析由肖迪完成; 数据分析由肖迪完成; 本论文写作由肖迪完成。

通讯作者: 张建中, 102206, 北京市, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所。zhangjianzhong@icdc.cn

电话: 010-61739456 传真: 010-61730233

收稿日期: 2008-09-24 修回日期: 2008-10-13

接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-18

Influence of *Helicobacter pylori* CagA on Ca²⁺-associated phosphorylated proteins of AGS cells

Di Xiao, Fei Zhao, Yan-Yan Song, Fan-Liang Meng, Li-Hua He, Hui-Fang Zhang, Jian-Zhong Zhang

Di Xiao, Fei Zhao, Yan-Yan Song, Fan-Liang Meng, Li-Hua He, Hui-Fang Zhang, Jian-Zhong Zhang, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, China, CDC, Beijing 102206, China

Correspondence to: Jian-Zhong Zhang, Department of Diagnosis, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, China, CDC, Beijing 102206, China. zhangjianzhong@icdc.cn

Received: 2008-09-24 Revised: 2008-10-13

Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To analyze the differential expression of Ca²⁺-associated protein (CagA) in human gastric adenocarcinoma epithelial cells (AGS) infected with *H. pylori* CagA and to move forward a single step for revealing CagA pathogenic mechanism.

METHODS: Proteins of AGS cells infected with *H. pylori* 26695 for 4 h, AGS cells infected with *H. pylori* 26695 Δ CagA for 4 h, and the uninfected AGS cells as a control group were extracted. Phosphorylated proteins were enriched by metal ion affinity adsorption enrichment techniques. The samples were separated by 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) technique. Computer assisted image analysis was used to analyze the differential proteomic

expression. The significantly differentially expressed proteins were unambiguously assigned identities by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF).

RESULTS: AGS cells treated with *H. pylori* Δ CagA showed the same expression as those cultured with the same period of AGS cells. However, expression of AGS cells treated with *H. pylori* Δ CagA had significant changes, indicating such a change was simply caused by CagA. Nineteen such protein spots were identified, of which, 3 protein spots were Ca²⁺-associated. Calcium-binding protein (nucleobindin-2 precursor, CAL-NUC) had almost the same expression either in AGS cells or 2-D gel under interaction of *H. pylori* Δ CagA with the AGS. However, such protein expression was markedly decreased following interaction between *H. pylori* and AGS.

CONCLUSION: CRT and CALNUC may affect the calcium homeostasis of endoplasmic reticulum, mitochondria and golgi, and then induce the apoptosis or proliferation pathway, which thus serves as a predisposing factor for gastritis, gastric ulcer and gastric cancer.

Key Words: Cytotoxin associated protein A; Phosphorylated proteins; Ca²⁺ Signaling pathway; Pathogenic mechanism

Xiao D, Zhao F, Song YY, Meng FL, He LH, Zhang HF, Zhang JZ. Influence of *Helicobacter pylori* CagA on Ca²⁺-associated phosphorylated proteins of AGS cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3610-3615

摘要

目的: 分析幽门螺杆菌(*H. pylori*)细胞毒素相关蛋白A(CagA)对人胃腺癌黏膜上皮细胞(AGS)Ca²⁺相关蛋白磷酸化的影响, 进一步揭示*H. pylori*的致病机制。

方法: 采用金属离子亲和吸附富集技术富集*H. pylori*、*H. pylori* CagA缺失株(*H. pylori* Δ CagA)与AGS细胞相互作用4 h, 以及培养相同时间的AGS细胞的磷酸化蛋白, 利用二维凝胶

■同行评议者

刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院传染科

电泳技术分离磷酸化蛋白, ImageMaster 2D分析软件识别差异蛋白, MALDI-TOF/TOF质谱鉴定确认蛋白。

结果: *H pylori* Δ CagA作用的AGS细胞, 与培养相同时间的AGS细胞比较表达量不变, 而*H pylori* Δ CagA作用的AGS细胞表达量发生了明显变化, 表明此蛋白的变化是单纯由CagA引起的; 此类蛋白点共鉴定出19个, 其中3个蛋白点与Ca²⁺相关。钙离子结合蛋白(nucleobindin-2 precursor, CALNUC)在AGS细胞以及*H pylori* Δ CagA与AGS相互作用的2-D胶中表达量接近, 而*H pylori*与AGS相互作用后该蛋白表达量明显降低。

结论: *H pylori* CagA进入AGS细胞可能会影响内质网、线粒体及高尔基体的钙稳态, 诱发内质网、线粒体、高尔基体凋亡或增殖途径, 而成为胃炎、胃溃疡、胃癌发生的诱因之一。

关键词: 细胞毒素相关蛋白A; 磷酸化蛋白质; 钙离子通道; 致病机制

肖迪, 赵飞, 宋衍燕, 孟凡亮, 何利华, 张慧芳, 张建新. CagA对AGS细胞Ca²⁺相关蛋白磷酸化的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3610-3615

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3610.asp>

0 引言

细胞毒素相关蛋白A(cytotoxin-associated protein A, CagA)是I型幽门螺杆菌(*H pylori*)的主要毒力因子, 与*H pylori*导致的疾病相关。CagA的抗体滴度在胃癌患者中比健康人高^[1], CagA阳性菌株较CagA阴性菌株导致胃炎、胃腺癌的几率大^[2]。CagA通过IV型分泌系统进入到宿主细胞中^[3], 能与多种蛋白相互作用, 激活不同的信号通路^[4-5], 影响宿主细胞增殖和凋亡^[6-7], CagA的作用机制尚未清晰。Ca²⁺离子通路在细胞中扮演着重要角色, 作为细胞内重要的第二信使, 游离钙参与了几乎所有的细胞反应, 从收缩、胞吐到基因表达、细胞死亡都是被胞质内局部或全部游离Ca²⁺浓度的变化控制的。细胞的钙稳态是细胞正常生存的基础, 在维持细胞钙稳态的过程中, 与Ca²⁺相关的蛋白起着重要作用, 而具有特定意义的蛋白大都是痕量或修饰的。磷酸化是蛋白质翻译后修饰的一种重要方式, 参与几乎所有的生命活动过程。*H pylori*与人胃腺癌黏膜上皮细胞(human gastric adenocarcinoma epithelial, AGS)细胞接触1 h即

有CagA进入细胞^[3], 我们实验室通过表达谱芯片的研究发现*H pylori*攻击AGS 4 h细胞内基因差异最大(待发表)。本文采用金属离子亲和吸附结合质谱分析的方法, 研究*H pylori*以及*H pylori* Δ CagA攻击宿主细胞4 h后, 宿主细胞Ca²⁺相关磷酸化蛋白的变化情况, 从离子通路的角度阐述CagA对宿主细胞的作用机制, 进一步揭示*H pylori*的致病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 26695国际标准株、*H pylori* 26695CagA缺失株、AGS细胞(ATCC CRL1739)由本研究室保存。磷酸化蛋白富集试剂盒FocusTM-PhosphoRichTM与蛋白纯化试剂盒Perfect-FocusTM购于G-Biosciences(G-Bio, St Louis, MO, USA)。主要设备: 4700型飞行时间质谱仪(MALDI-TOF/TOF-MS, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 等电聚焦电泳仪(EttanTM DALTwelve System, GE Healthcare, Uppsala, Sweden), Ettan DALT II垂直电泳仪(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)。

1.2 方法

1.2.1 蛋白样品的制备及磷酸化蛋白富集: AGS细胞培养: AGS细胞用100 mL/L的胎牛血清1640培养基, 在50 mL/L CO₂气体培养环境, 37℃培养48 h。*H pylori*培养: 将菌株接种于含10%绵羊全血哥伦比亚琼脂平板上, 置50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂的微需氧气体环境中37℃培养72 h。细菌攻击细胞: 刮取菌苔用PBS洗3次, 5000 r/min离心10 min, 去上清, 充分打碎菌块, 测定A₆₀₀值, 按照A₆₀₀ = 2.2 × 10⁸、细胞每皿计数按照1 × 10⁷计算, 细胞与细菌的比例按照1:300, 二者相互作用4 h, 弃去细胞培养液体, 预冷的PBS洗3次, 细胞刮刮取细胞培养皿底部的细胞, 置于10 mL PBS液中, 4000 r/min, 4℃离心10 min, 取沉淀, 重复3次。每皿细胞加入1.5 mL的裂解液, 30 kHz冰浴超声直至完全溶解; 按10 mL/L加入蛋白酶、核酸酶抑制剂; 室温孵育1 h, 12 000 r/min, 4℃离心30 min, 取上清。Bradford法定量。采用金属吸附磷酸化蛋白富集试剂盒FocusTM-PhosphoRichTM富集*H pylori* 26695、*H pylori* Δ CagA攻击后AGS细胞以及相同时间点的AGS细胞蛋白样品中的磷酸化蛋白, 用纯化试剂盒Perfect-FocusTM纯化、除盐制备2D样品, 具体操作见试剂盒说明书或参见<http://www.GBiosciences.com>。

■研发前沿

感染期长、人群传染率高、耐药性增高已使*H pylori*感染成为慢性消化系统疾病中的一个非常突出的问题。围绕CagA展开的*H pylori*相关疾病致病机制的研究一直是研究热点, 寻找可用于早期诊断及预后监测的标志性蛋白以及疫苗相关抗原都是亟待解决的课题。

■相关报道

张建新课题组表达谱芯片的研究发现*H pylori*攻击AGS 4 h细胞内基因差异最大。宋衍燕 *et al*发现*H pylori*与AGS细胞相互作用过程中, 细菌、细胞蛋白表达均存在明显时序性变化, 早期主要表现为黏附相关的蛋白表达变化, 后期向有利于细菌存活和增殖的方向发展, 并呈现出与免疫逃逸和病理损伤相关的变化。

■创新盘点

从第二信使 Ca^{2+} 的角度并结合磷酸化蛋白质组学用于*H. pylori*致癌机制的研究,从新的角度揭示CagA的致病机制. 研究*H. pylori*与AGS细胞相互作用后所有类型的磷酸化蛋白,覆盖了目前只针对酪氨酸研究(酪氨酸抗体较理想)的状态,对于完全合理地解释*H. pylori*与AGS的相互作用具有明显突破.

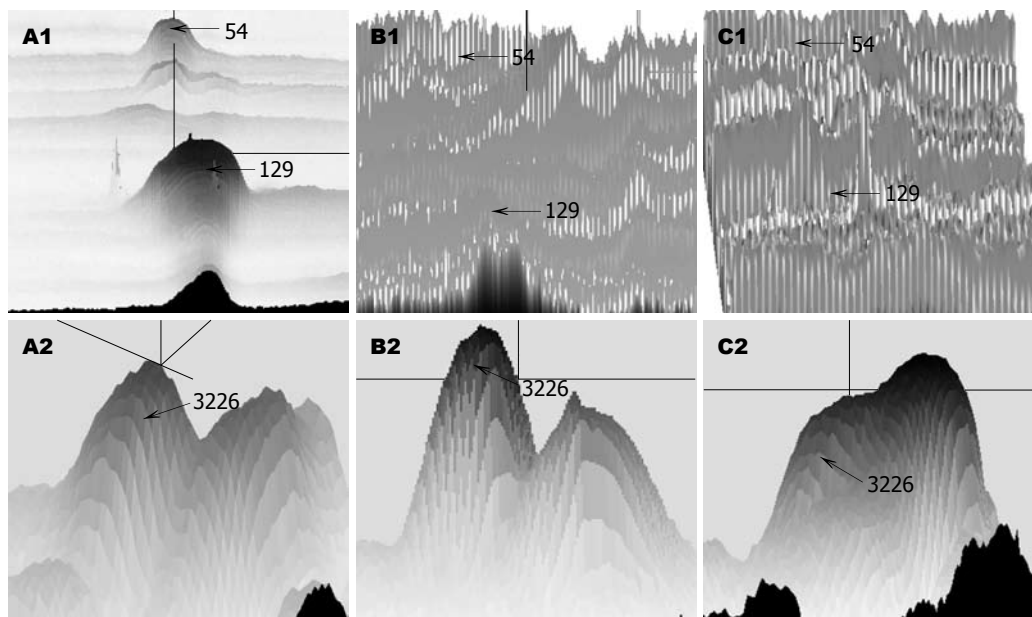


图1 Ca^{2+} 相关点3D图. A1, A2: *H. pylori*与AGS相互作用; B1, B2: *H. pylori* Δ CagA与AGS相互作用; C1, C2: AGS.

表1 Ca^{2+} 相关差异磷酸化蛋白质谱鉴定结果

蛋白序号	Swiss-Prot进入号	蛋白名称	蛋白分子质量	等电点	蛋白得分CI%	离子得分CI%
3226	P80303	核组蛋白-2 (nucleobindin-2 precursor)	50 191.4	5.03	100.000	100.000
54	P27797	钙网织蛋白 (calreticulin precursor)	48 111.8	4.29	97.157	99.759
129	P27797	钙网织蛋白 (calreticulin precursor)	48 083.8	4.29	99.799	98.597

表2 Ca^{2+} 相关差异磷酸化蛋白数据分析

蛋白序号	基因名称	蛋白功能	亚细胞定位
3226 ¹	NUCB2	钙离子结合, DNA结合	细胞膜, 细胞质
54/129 ²	CALR	钙离子结合, DNA结合, 蛋白结合	内质网腔, 细胞质, 胞质, 细胞表面

¹: 表示此点在CagA阳性*H. pylori*作用后磷酸化蛋白量下降; ²: 表示CagA阳性*H. pylori*作用后新出现的点.

1.2.2 二维凝胶电泳及胶内蛋白酶解: 每块24 cm 胶蛋白上样量均为800 μg . 等电聚焦, 使用24 cm pH3-10非线性干胶条, 设置聚焦仪程序: 20 $^{\circ}\text{C}$ 表面温度, 50 μA 电流/胶条, 30 V, 5 h; 60 V, 5 h; 100 V, 1 h; 600 V, 1 h; 1000 V, 1 h; 8000 V, 10 h; 聚焦至VhT 90 000左右. 等电聚焦结束后, 将干胶条分别在130 mmol/L的DTT和135 mmol/L的碘乙酰胺中振荡平衡15 min后转至15%的聚丙烯酰胺凝胶上; 二向电泳条件: 25 $^{\circ}\text{C}$, 自动泵, 2.5 W/胶

30 min, 18 W/胶, 4.5 h. 胶用考马斯亮兰染色, 扫描仪采集图像, ImageMasterTM 2D Platinum 5.0分析软件分析图像. 胶内酶解方法参见文献[8].

1.2.3 质谱分析及数据处理: MALDI-TOF/TOF-MS测定采用频率为200 Hz的Nd: YAG激光器, 波长为355 nm, 正离子模式采样, 默认校准(误差小于 50×10^{-6}). CID内采用空气碰撞, 2000次叠加. 利用4000 Series ExplorerTM software version 3.0软件采集样品; 从800 kDa到4000 kDa采集一级谱图, 采用interpretation从低到高采集10个母离子. 使用GPS工作站(GPS ExplorerTM v3.6, mascot v2.1)搜索NCBI的非冗余数据库以及Swiss-Prot数据库. 设置可变修饰Carboxymethyl(C)、Oxidation(M)、Phospho(ST)、Phospho(Y)、Phospho+PL(S)、Phospho+PL(T)、Phospho+PL(Y), 搜索母离子偏差设为0.3 kDa、MS/MS片段偏差设为0.3 kDa. 蛋白得分CI%高于95%, 且至少有两个肽段得分大于50或一个肽段得分大于60, 磷酸化



图 2 Ca²⁺相关点MS序列覆盖率. A: 54序列覆盖率47%; B: 129序列覆盖率34%; C: 3226序列覆盖率69%.

肽段得分至少大于10, 确认蛋白及磷酸化肽段^[9]. 根据蛋白登录号(accession number)在<http://www.expasy.org>检索蛋白对应基因、蛋白功能以及亚细胞定位.

2 结果

H. pylori Δ CagA作用的AGS细胞, 与培养相同时间的AGS细胞比较表达量不变, 而*H. pylori* Δ CagA作用的AGS细胞表达量发生了明显变化, 表明此蛋白的变化是单纯由CagA引起的; 此类蛋白点共鉴定出19个, 其中3个蛋白点与Ca²⁺相关. 图1为3个点的3D放大图, 质谱鉴定及数据处理结果见表1-2. 54、129均为钙网织蛋白(Calreticulin, CRT), 其序列匹配覆盖率分别为47%、34%(图2A-B). 他们在AGS细胞以及*H. pylori* Δ CagA与AGS相互作用的2-DE分离胶中均没有出现(图1B-C); 而在*H. pylori*与AGS作用的2-DE分离胶中有较大的相对含量(图1A). 图中3226为钙离子结合蛋白(nucleobindin-2 precursor, CALNUC), 其序列匹配覆盖率为69%(图2C). 2-DE图显示该蛋白在AGS细胞以及*H. pylori* Δ CagA与AGS相互作用的2-D胶中表达量接近, 而

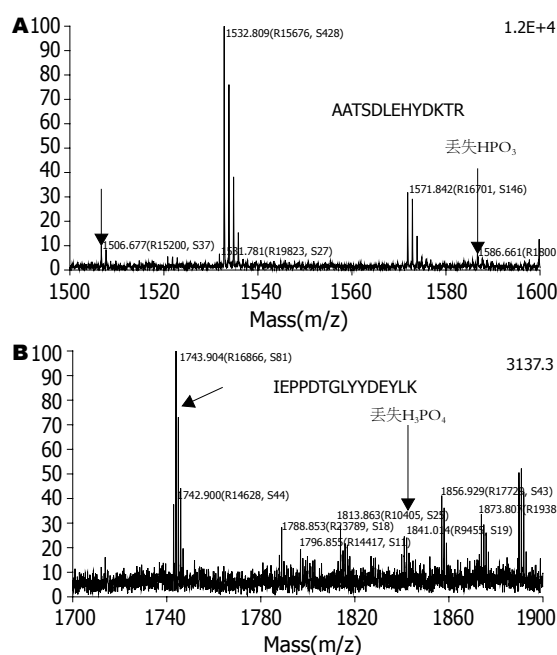


图 3 中性丢失峰质谱图. A: 中性丢失HPO₃质谱图; B: 中性丢失H₂PO₄质谱图.

*H. pylori*与AGS相互作用后该蛋白表达量明显降低. CALNUC质谱图出现明显的中性丢失峰, 54和129未见中性丢失峰出现(图3).

3 讨论

含有丝氨酸磷酸化或苏氨酸磷酸化的肽段在CID时会发生 β 消除反应, 导致中性丢失磷酸或去磷酸根, 质谱图中会有质量偏差98 kDa或80 kDa的峰出现, 而磷酸化的酪氨酸通常不发生这样的丢失^[10]. CALNUC的谱图中可见中性丢失磷酸基团的1841.9, 其对应峰为1743.8以及中性丢失磷酸根的1586.6, 其对应峰为1506.6. CRT没有出现中性丢失峰, 提示其CagA进入后通过一系列的信号转导导致了CRT磷酸化, 其位点可能发生在酪氨酸上. CRT目前还没有已知的磷酸化位点, 其位点的确定还需进一步研究确定.

*H. pylori*黏附于AGS表面, CagA通过IV型分泌系统进入细胞, 导致胞内CRT发生磷酸化. CRT是重要的内质网中与Ca²⁺有关的分子伴侣蛋白, 他通过调节IP3R以及SERCA的功能而影响内质网的储钙能力^[11-12]. CRT的磷酸化可能会降低或失去了调节IP3R以及SERCA的能力, 破坏了钙稳态, 出现钙剥夺或钙超载, 影响内质网的功能, 从而破坏蛋白质合成、翻译和折叠, 因此会产生未叠和错叠蛋白而产生内质网应激, 过渡的应激会激活相应的凋亡分子, 促进或导致细胞凋亡^[13-14]. 内质网和线粒体在细胞内空间结构上接近, 内质网通过其表面的IP3R或RyR释

应用要点

该研究所发现Ca²⁺相关蛋白为潜在的生物标记蛋白, 为*H. pylori*相关疾病的早期诊断、治疗以及预后监测提供有价值的线索.

同行评价

本研究的内容有一定的重要性和新颖性,为本领域的研究提供了一些有意义的信息。

放 Ca^{2+} 进入细胞质的同时,线粒体内的 Ca^{2+} 也升高超载,导致线粒体结构裂解,亦会引起细胞凋亡^[15]。实验结果提示,*H. pylori* CagA进入AGS细胞导致CRT发生磷酸化,破坏内质网、线粒体的钙稳态,通过影响钙离子通路,促进细胞凋亡。

有研究表明CRT亦可通过影响p53的降解、核定位、改变 Ca^{2+} 稳态影响内质网与线粒体之间的联系而促进细胞的凋亡^[16-17]。c-Src也是细胞增殖、存活和转移等多种信号通路的重要成分^[18],其活性依赖于胞内CRT的丰度。CRT的磷酸化导致AGS细胞内质网内钙水平的变化,会刺激c-Src的活性,激活其调节通路。CRT表达异常与多种类型肿瘤的形成有关^[18-19]。本实验结果提示,CagA导致CRT磷酸化,从而改变与其相互作用蛋白的活性,可能会诱导肿瘤的形成。

CALNUC是在高尔基体和细胞质中发现的EF手 Ca^{2+} 结合蛋白,CALNUC在G蛋白与 Ca^{2+} 调节信号转导中起重要作用,CALNUC与SERCA钙泵以及IP3R一起在高尔基体膜构成一个细胞钙池,共同维持高尔基体钙存储池的稳态^[20]。CagA进入导致CALNUC磷酸化蛋白表达量下调,这表明细胞中的CALNUC总体表达量降低了,或者表达量没变但该磷酸化蛋白发生了去磷酸化。磷酸化CALNUC的变化会导致高尔基体内 Ca^{2+} 稳态受到影响。有研究表明,CALNUC过表达会导致高尔基体内钙离子浓度高出存储量的2-3倍。可见,CagA导致的CALNUC磷酸化水平异常会破坏高尔基体的钙稳态,影响细胞的钙离子通路调节。CALNUC磷酸化水平的变化是否会通过调节钙离子通路而成为胃癌发生的因素还没有定论,需要进一步研究,但有研究发现在多种癌症组织中CALNUC过表达^[21]。

CagA阳性*H. pylori*感染AGS细胞后,可导致两种与胞内 Ca^{2+} 密切相关的磷酸化微量蛋白CRT、CALNUC发生变化,此变化可能会影响内质网、线粒体及高尔基体的钙稳态,诱发内质网、线粒体、高尔基体凋亡或增殖途径。哪种途径占优势临床上则会表现不同的结局,如果细胞倾向于凋亡则临床上表现为胃炎、胃溃疡;如果细胞倾向于增殖则临床上将可能演变成胃癌^[6-7]。本实验的研究结果从一个新的角度解释了这种倾向,为*H. pylori*致病机制的早日明示奠定基础。

参考文献

- 1 Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Yamaji Y, Ikenoue T, Mitsushima T, Tagawa H, Kawaguchi R, Mori

- K, Mafune K, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. Assessment of gastric carcinoma risk associated with *Helicobacter pylori* may vary depending on the antigen used: CagA specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus commercially available *H. pylori* ELISAs. *Cancer* 2000; 88: 1530-1535
- 2 Nobuta A, Asaka M, Sugiyama T, Kato M, Hige S, Takeda H, Kato T, Ogoshi K, Keida Y, Shinomura J. *Helicobacter pylori* infection in two areas in Japan with different risks for gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 1-6
- 3 Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287: 1497-1500
- 4 Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 261-276
- 5 Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* 2002; 10: 745-755
- 6 Shiotani A, Iishi H, Ishiguro S, Tatsuta M, Nakae Y, Merchant JL. Epithelial cell turnover in relation to ongoing damage of the gastric mucosa in patients with early gastric cancer: increase of cell proliferation in paramalignant lesions. *J Gastroenterol* 2005; 40: 337-344
- 7 Xia HH, Wong BC, Zhang GS, Yang Y, Wyatt JM, Adams S, Cheung K, Lam SK, Talley NJ. Antralization of gastric incisura is topographically associated with increased gastric epithelial apoptosis and proliferation, but not with CagA seropositivity. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1257-1263
- 8 Guedes Sde M, Vitorino R, Tomer K, Domingues MR, Correia AJ, Amado F, Domingues P. *Drosophila melanogaster* larval hemolymph protein mapping. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 545-554
- 9 Nousiainen M, Sillje HH, Sauer G, Nigg EA, Korner R. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5391-5396
- 10 Delom F, Chevet E. Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes. *Proteome Sci* 2006; 4: 15
- 11 Verkhatsky A, Toescu EC. Endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis and neuronal death. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 351-361
- 12 Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol Rev* 2007; 87: 593-658
- 13 Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115: 2656-2664
- 14 Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 2006; 66: S102-S109
- 15 Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Di Virgilio F, Pozzan T. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 2003; 22: 8619-8627
- 16 Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, Castelbou C, Michalak M, Demareux N. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J*

- Biol Chem* 2002; 277: 46696-46705
- 17 Holaska JM, Black BE, Rastinejad F, Paschal BM. Ca²⁺-dependent nuclear export mediated by calreticulin. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6286-6297
- 18 Ishizawar R, Parsons SJ. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 2004; 6: 209-214
- 19 Papp S, Fadel MP, Kim H, McCulloch CA, Opas M. Calreticulin affects fibronectin-based cell-substratum adhesion via the regulation of c-Src activity. *J Biol Chem* 2007; 282: 16585-16598
- 20 Lin P, Yao Y, Hofmeister R, Tsien RY, Farquhar MG. Overexpression of CALNUC (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca²⁺ storage in the Golgi. *J Cell Biol* 1999; 145: 279-289
- 21 Chen Y, Lin P, Qiu S, Peng XX, Looi K, Farquhar MG, Zhang JY. Autoantibodies to Ca²⁺ binding protein Calnuc is a potential marker in colon cancer detection. *Int J Oncol* 2007; 30: 1137-1144

编辑 史景红 电编 郭海丽

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

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-18)

辣椒素敏感传入神经在电刺激室旁核减轻大鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用

张咏梅, 张建福, 闫长栋

■背景资料

下丘脑室旁核是调节内脏活动的一个关键核团, 参与了对胃的各种生理机能如胃酸分泌、胃运动及胃电活动的调节。室旁核内神经元兴奋后可以通过神经传导或神经-内分泌通路, 影响胃黏膜的攻击因子和防御因子, 从而参与多种胃黏膜损伤的调控; 而胃内的伤害性刺激也可以引起室旁核等核团的激活, 表现为c-fos的大量表达。

张咏梅, 张建福, 闫长栋, 徐州医学院生理学教研室 江苏省徐州市 221002

张咏梅, 医学博士, 副教授, 主要进行中枢神经系统对大鼠胃肠道损伤调控机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30570671

徐州医学院课题基金资助项目, No. 07KJ58

作者贡献分布: 张咏梅与张建福对此文所作贡献均等; 此课题由张咏梅与张建福设计; 研究过程由张咏梅操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由闫长栋提供; 数据分析由张咏梅完成; 本论文写作由张咏梅完成。

通讯作者: 张咏梅, 221002, 江苏省徐州市, 徐州医学院生理学教研室. zhangym700@sohu.com

电话: 0516-83262105

收稿日期: 2008-09-14 修回日期: 2008-10-16

接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-18

Capsaicin-sensitive afferent fibers mediate the protective effect of electrical stimulation of paraventricular nucleus against gastric ischemia-reperfusion injury in rats

Yong-Mei Zhang, Jian-Fu Zhang, Chang-Dong Yan

Yong-Mei Zhang, Jian-Fu Zhang, Chang-Dong Yan, Department of Physiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570671; and the Research Foundation of Xuzhou Medical College, No. 07KJ58

Correspondence to: Yong-Mei Zhang, Department of Physiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China. zhangym700@sohu.com

Received: 2008-09-14 Revised: 2008-10-16

Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To elucidate the role of capsaicin-sensitive afferent fibers in mediating the effect of electrical stimulation (ES) of paraventricular nucleus (PVN) against rat gastric ischemia-reperfusion (GI-R) injury.

METHODS: GI-R injury was induced in rats by clamping the celiac artery for 30 min and then reperfusion for 1 h. The methods of nuclear electric stimulation to excite the PVN and pretreatment with a high dose of capsaicin to ablate the capsaicin-sensitive afferent fibers were used to

explore the role of capsaicin-sensitive afferent fibers in the regulation of PVN on GI-R injury.

RESULTS: Pretreatment with a high dose of capsaicin to ablate afferent fibers partly abolished the protective effect of PVN against GI-R injury and the injury was increased by 54.85% as compared with that in the PVN stimulation group ($P < 0.01$); Pretreatment with L-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) significantly abolished the protective effect of PVN against GI-R injury and the injury was increased by 72.98% as compared with that in the PVN stimulation group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Capsaicin-sensitive afferent fibers and endogenous NO are involved in the protective effect of PVN stimulation against GI-R injury.

Key Words: Gastric ischemia-reperfusion; Paraventricular nucleus; Nitric oxide; Capsaicin-sensitive afferent fiber

Zhang YM, Zhang JF, Yan CD. Capsaicin-sensitive afferent fibers mediate the protective effect of electrical stimulation of paraventricular nucleus against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3616-3620

摘要

目的: 观察辣椒素敏感传入神经及内源性一氧化氮(NO)在电刺激PVN减轻大鼠GI-R损伤中的作用。

方法: 将SD大鼠随机分为6组: GI-R组, 假电刺激PVN组, 电刺激PVN组, 溶剂组, 辣椒素预处理组及L-NAME组。采用夹闭大鼠腹腔动脉30 min去除动脉夹再灌注1 h的GI-R损伤模型。采用核团内电刺激PVN以兴奋其内神经元及大剂量辣椒素预处理使辣椒素敏感传入神经失去功能等方法, 研究辣椒素敏感传入神经在PVN对GI-R损伤调控中的作用。

结果: 用大剂量辣椒素消除辣椒素敏感传入神

■同行评议者

梅林, 教授, 北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

经作用后, 可以部分阻断电刺激PVN引起的保护效应, 损伤较电刺激组加重54.85%, 与对照组比较差异显著($P < 0.05$); 给予NO合酶阻断剂L-NAME后, 能够阻断电刺激PVN的保护效应, 损伤较电刺激组加重72.98%, 与对照组比较差异显著($P < 0.05$).

结论: 辣椒素敏感传入神经及内源性NO参与了电刺激PVN对GI-R损伤的保护效应.

关键词: 胃缺血-再灌注; 室旁核; 一氧化氮; 辣椒素敏感传入神经

张咏梅, 张建福, 闫长栋. 辣椒素敏感传入神经在电刺激室旁核减轻大鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3616-3620
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3616.asp>

0 引言

下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)不仅参与对胃的各种生理机能, 如胃酸分泌、胃运动及胃电活动的调节, 并且参与了胃黏膜损伤的调控^[1]. 我们以前的研究表明电刺激下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)通过迷走和交感神经的介导, 可明显减轻大鼠胃缺血-再灌注(gastric ischemia-reperfusion, GI-R)损伤^[2-3]. 但是, 刺激PVN对GI-R的损伤的调控, 是通过什么传入神经, 尚不清楚. 胃肠道的传入神经元有许多属于辣椒素敏感的传入神经元, 大剂量辣椒素可选择性地使其失去功能, 从而可独立研究传入神经在胃功能活动中的作用^[4-5]. 目前研究认为辣椒素敏感的传入神经对胃黏膜有保护作用, 并且是通过非肾上腺素能、非胆碱能递质介导的, 许多资料表明, 降钙素基因相关肽(CGRP)通过CGRP1受体, 速激肽通过NK2受体, 共同作为传入神经的递质, 参与对胃黏膜的保护作用, 一氧化氮(NO)是他们共同的第二信使^[6-7]. 因此, 本研究通过建立GI-R模型, 以大剂量辣椒素使传入神经失去功能并应用NO合成抑制剂L-NAME, 观察辣椒素敏感传入神经及内源性NO在电刺激PVN对GI-R损伤保护效应中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 辣椒素和L-NAME购自美国Sigma公司, 药品和试剂均临用前新鲜配制. 成年健康的SD大鼠(220-240 g), ♂, 由徐州医学院实验动物中心(使用许可号: SYXK[su] 2002-0038)提供. 实验前禁食24 h、自由饮水.

1.2 方法

1.2.1 分组: 将SD大鼠随机分为6组: (1)GI-R组($n = 10$). (2)假电刺激PVN后进行GI-R组(假电刺激PVN组, $n = 8$). (3)以0.4 mA电刺激PVN后进行GI-R组(电刺激PVN组, $n = 8$). (4)大鼠注射溶剂(100 mL/L乙醇、10%吐温80和80%生理盐水)后, 再以0.4 mA电刺激PVN, 然后行GI-R组(溶剂组). (5)药物处理组: 用大剂量辣椒素sc使传入神经“失去功能”(denervation)后, 再以0.4 mA电刺激PVN, 然后行GI-R组(辣椒素预处理组); 股静脉注射L-NAME(3 mg/kg)10 min后, 再以0.4 mA电刺激PVN, 然后行GI-R组(L-NAME组).

1.2.2 辣椒素敏感传入神经“失功能”法: 12.5 g/L辣椒素溶于100 mL/L乙醇、100 mL/L吐温80和800 mL/L生理盐水中, 分3 d sc, 剂量分别为25、50、50 mg/(kg·d), 每天1次, 总剂量为125 mg/kg. 另一组大鼠注射等容积的溶剂作为对照(溶剂组). 2 wk后以0.1 mL/L辣椒素溶液滴入每只大鼠眼内. 在检验去神经成功(对照组大鼠均出现显著的前肢擦抹眼部的反应, 而“去神经”组大鼠则无此反应^[8])后, 进行核团埋藏电极.

1.2.3 核团埋藏电极: 大鼠在麻醉下(100 g/L水合氯醛400 mg/kg ip)固定于立体定位仪上, 按照Paxinos和Watson脑图谱^[9]及我们以前的方法^[3]将外径0.4 mm、内芯尖端裸露0.5 mm的同心圆刺激电极插入右侧PVN(坐标: AP 1.5 mm, R 0.4 mm, H 7.7-7.8 mm, 门齿瓣低于耳间连线3.3 mm), 用502胶及自凝牙托粉固定. 刺激PVN的参数为单相方波, 波宽0.2 ms, 强度0.4 mA, 频率50 Hz, 持续1 min. 刺激脉冲由刺激器产生并通过隔离器恒流恒压输出, 每间隔10 min刺激1次, 共5次, 假电刺激组只插电极不进行电刺激. 刺激完毕立即行胃缺血-再灌注.

1.2.4 GI-R动物模型的制备: 按Wada *et al*^[10]法进行. 实验大鼠水合氯醛麻醉后, 仔细分离腹腔动脉与周围组织, 用小动脉夹夹闭腹腔动脉30 min后去除动脉夹恢复血流再灌注60 min. 实验结束后取胃计数胃黏膜损伤指数.

1.2.5 胃黏膜损伤指数测定: 参照Guth *et al*^[11]法加以改进. 以腺胃区局限于胃上皮的点状糜烂、溃疡、出血灶的长度累积计分: 正常为0分; 损伤小于1 mm计1分; 1-2 mm计2分; 2-3 mm计3分; 余类推. 损伤宽度超过1 mm时, 分数加倍. 每组大鼠损伤分数的平均值为损伤指数.

统计学处理 采用SPSS13.0软件包对结果进

■ 研发前沿

如何减轻各种伤害性刺激所致胃黏膜损伤是多年来消化生理研究的热点, 其中脑肠轴(brain-gut axis)的作用已引起人们的广泛关注. 辣椒素敏感传入神经元参与了多种保护因子对胃黏膜损伤保护作用.

■创新盘点

本研究首次报道辣椒素敏感传入神经及内源性NO参与了电刺激室旁核对胃缺血-再灌注损伤的保护效应,初步探讨了可能参与室旁核对胃黏膜损伤调控的传入神经通路。

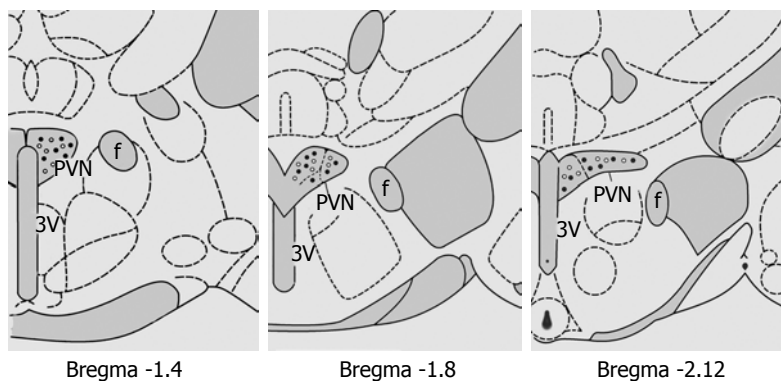


图1 大鼠室旁核刺激电极部位。

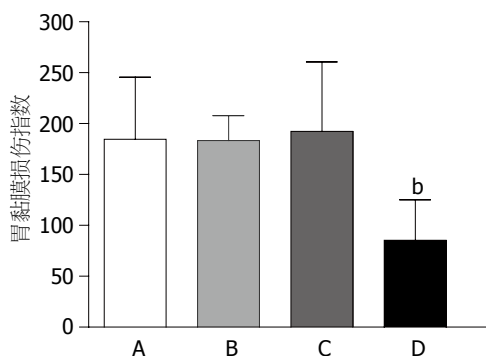


图2 电刺激PVN对大鼠GI-R损伤的影响。A: 单纯GI-R组; B: 假电刺激PVN+GI-R组; C: sc溶剂2 wk+GI-R组; D: 0.4 mA电刺激PVN+GI-R组。^b $P<0.01$ vs A组。

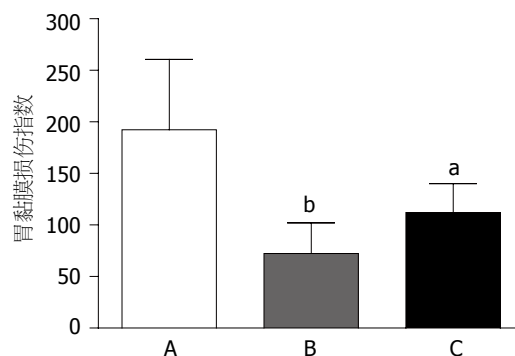


图3 辣椒素敏感传入神经在电刺激室旁核减轻大鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用。A: sc溶剂2 wk+GI-R组; B: sc溶剂2 wk+0.4 mA电刺激PVN+GI-R组; C: 辣椒素预处理+0.4 mA电刺激PVN+GI-R组。^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs A组。

行分析,应用方差分析,数据以mean±SD表示, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

根据Paxinos和Watson脑图谱^[9],对实验中PVN的刺激部位进行了组织学鉴定,组织学图片见图1。2.1 辣椒素敏感传入神经在电刺激室旁核减轻大鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用 我们重复GI-R动物模型。GI-R 1 h可引起胃黏膜明显损伤,其胃黏膜损伤指数为 184.7 ± 60.9 ,假电刺激PVN组胃黏膜损伤与单纯GI-R组无明显差异,其胃黏膜损伤指数为: 183.3 ± 24.6 ; sc溶剂2 wk后进行GI-R组亦与单纯GI-R组无明显差异,其胃黏膜损伤溃疡指数为: 192.4 ± 68.3 ; 0.4 mA电刺激PVN后进行GI-R组,其胃黏膜损伤指数为: 85.4 ± 39.8 ,较GI-R组明显减轻($P<0.01$)。因此,提示电刺激PVN可明显减轻胃黏膜损伤,而手术操作和溶剂对胃黏膜损伤无明显影响(图2)。

在成功重复了GI-R动物模型基础上,我们观察辣椒素预处理对电刺激室旁核减轻大鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用。以sc溶剂2 wk后进行GI-R组作为对照,sc溶剂2 wk后行电刺激PVN+GI-R组,其胃黏膜损伤指数为 72.3 ± 29.8 ,与溶剂对照组比较具有显著差别($P<0.01$),辣椒

素预处理组胃黏膜损伤指数为 112.0 ± 28.6 ,说明部分翻转了电刺激PVN对胃黏膜的保护作用,损伤较电刺激组加重54.9%,统计学上无显著差异,与对照组比较差异显著($P<0.05$,图3)。

2.2 NO在电刺激室旁核减轻大鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用 以iv溶剂10 min后进行GI-R组为对照组,其胃黏膜损伤指数为 178.2 ± 50.1 ; iv溶剂10 min后,0.4 mA电刺激PVN+GI-R组损伤明显减轻,其胃黏膜损伤指数 84.0 ± 20.0 ; 腹腔给予L-NAME 12.5 mg/kg阻断内源性NO释放后,再用0.4 mA的电流刺激PVN+GI-R,可完全消除电刺激PVN的保护作用,损伤较电刺激组加重73.0%,其胃黏膜损伤指数为 147.7 ± 35.9 ,与电刺激组相比具有显著性差异($P<0.05$,图4)。

3 讨论

我们前期的研究已经发现电刺激PVN后,通过迷走和交感神经的介导,能够明显减轻GI-R损伤^[2-3]。但在此过程中传入神经的作用尚难确定。研究发现:传入神经对辣椒素敏感,辣椒素是一种兴奋性毒素,小剂量时对传入神经元有强烈的刺激作用,大剂量时可引起传入神经元长期失功能,即产生“去神经”作用,因此辣椒素可

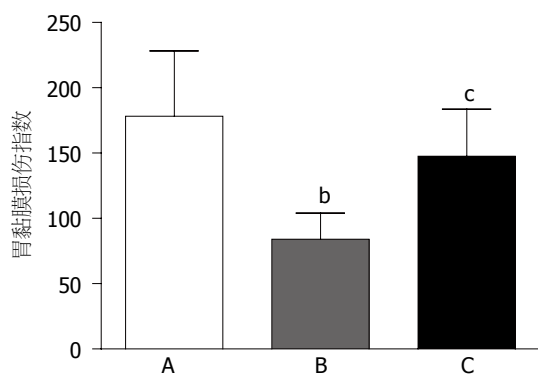


图4 NO在电刺激室旁核减轻大鼠胃缺血-再灌注损伤中的作用。A: iv溶剂+GI-R组; B: iv溶剂+0.4 mA电刺激PVN+GI-R组; C: L-NAME+0.4 mA电刺激PVN+GI-R组。^a $P<0.01$ vs A组; ^b $P<0.05$ vs B组。

作为研究传入神经的工具药。

辣椒素敏感传入神经能增强胃黏膜对外来损伤因子的抵抗力, 近几年研究显示胃内灌注适量的辣椒素对胃黏膜具有保护作用, 并能促进溃疡愈合^[12]。小剂量辣椒素(1-10 mg/kg)可预防或明显减轻由盐酸、乙醇、酸化阿司匹林和出血性休克等引起的大鼠胃黏膜损伤, 而用神经毒剂量的辣椒素预处理后, 则加重各种损伤因子如浸水应激、盐酸、牛磺胆酸盐、血小板活性因子、内皮素-1、醋酸、乙酰水杨酸、消盐痛和酒精引起的胃黏膜损伤的形成^[13-15], 一些对胃黏膜具有保护性的物质如: 胃泌素17、抗溃疡药ecabat、抗酸药hydrotalcit、质子泵抑制剂lansoprazole、前列腺素E2等, 他们对胃黏膜的保护作用可被辣椒素预处理减弱或消除^[15-19]。GI-R损伤的发生与胃黏膜内氧自由基生成过多、内皮素水平升高、胃微循环障碍、白细胞浸润、一氧化氮释放、胃酸分泌增多、前列腺素合成减少等有关^[2-3,20], 辣椒素敏感的传入神经参与Ghrelin、leptin、胆囊收缩素(cholecystokinin)等脑肠肽以及缺血预处理对GI-R损伤的保护作用^[21-23]。

本研究发现辣椒素预处理后, 电刺激PVN组GI-R损伤较溶剂对照组加重54.85%, 说明辣椒素敏感传入神经可能部分参与了电刺激PVN对GI-R损伤的保护作用, 但还有其他保护机制。由于辣椒素敏感的传入神经对胃黏膜的保护作用是由CGRP等非肾上腺素、非胆碱能递质所介导的, NO是他们共同的第二信使, 对多种损伤因子所致的胃黏膜损伤具有保护作用。Masuda *et al*^[24]的研究表明应用NO合酶抑制剂L-NNA抑制内源性NO的形成, 可明显增加酒精所至胃黏膜损伤, NO供体L-Arg能完全抑制

L-NNA的作用, 使黏膜损伤减轻。Andrews *et al*和Naito *et al*报道给予外源性NO及刺激内源性NO的合成均能减轻GI-R损伤, 应用NO合酶抑制剂明显增加GI-R损伤^[25-26]。为此, 我们进一步观察了NO在电刺激PVN减轻GI-R损伤中的作用, 发现给予L-NAME阻断内源性NO后能完全取消电刺激PVN对GI-R损伤的保护作用, 其胃黏膜损伤指数较未给药电刺激PVN组加重72.98%, 本结果也支持NO作为一种保护因子, 参与PVN对GI-R调控作用, 其可能机制为电刺激PVN后, 通过外周神经影响内源性NO的释放, 从而参与PVN对GI-R损伤的保护作用。

总之, 辣椒素敏感传入神经及内源性NO参与了电刺激PVN对GI-R损伤的保护效应, 这将为临床治疗胃黏膜损伤提供理论依据。

4 参考文献

- 1 张咏梅, 张建福, 魏尔清. 下丘脑室旁核对胃的调控. 国际麻醉学与复苏杂志 2006; 27: 373-376
- 2 Zhang JF, Zhang YM, Yan CD, Zhou XP. Neuroregulative mechanism of hypothalamic paraventricular nucleus on gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci* 2002; 71: 1501-1510
- 3 Zhang YM, Wei EQ, Li L, Qiao WL, Wang L, Zhang JF. Extracellular signal-regulated kinase pathways may mediate the protective effect of electrical stimulation of the paraventricular nucleus against ischaemia-reperfusion injury of the gastric mucosa. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 742-752
- 4 Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek PC, Pawlik MW, Pawlik WW, Kwiecień N, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species and capsaicin-sensitive sensory nerves in the pathomechanisms of gastric ulcers induced by stress. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 423-437
- 5 Evangelista S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2977-2984
- 6 Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56 Suppl 5: 33-55
- 7 Szolcsányi J, Barthó L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. *J Physiol Paris* 2001; 95: 181-188
- 8 Holzer P. Neural emergency system in the stomach. *Gastroenterology* 1998; 114: 823-839
- 9 Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. Orlando FLA, USA: Academic Press, 1996; F23-F26
- 10 Wada K, Kamisaki Y, Kitano M, Kishimoto Y, Nakamoto K, Itoh T. A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach. *Life Sci* 1996; 59: PL295-PL301
- 11 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93
- 12 Satyanarayana MN. Capsaicin and gastric ulcers.

■应用要点

研究表明胃内灌注辣椒素对多种伤害性刺激引起的大鼠胃黏膜损伤及人胃黏膜具有明显的保护作用。因此, 辣椒素对胃肠黏膜损伤的治疗具有潜在的应用价值。

■同行评价

本文实验对照的设计尚合理可靠,统计学处理方法使用恰当,为临床研究提供了一定的依据。

- Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46: 275-328
- 13 王锦, 彭燕. 辣椒素对胃黏膜的作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1947-1951
- 14 Sobue M, Joh T, Oshima T, Suzuki H, Seno K, Kasugai K, Nomura T, Ohara H, Yokoyama Y, Itoh M. Contribution of capsaicin-sensitive afferent nerves to rapid recovery from ethanol-induced gastric epithelial damage in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1188-1195
- 15 Fukushima K, Aoi Y, Kato S, Takeuchi K. Gastro-protective action of lafutidine mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons without interaction with TRPV1 and involvement of endogenous prostaglandins. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3031-3037
- 16 Stroff T, Plate S, Respondek M, Müller KM, Peskar BM. Protection by gastrin in the rat stomach involves afferent neurons, calcitonin gene-related peptide, and nitric oxide. *Gastroenterology* 1995; 109: 89-97
- 17 Kinoshita M, Kume E, Tamaki H. Roles of prostaglandins, nitric oxide and the capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection produced by ecabet sodium. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 494-501
- 18 Murakami I, Satoh H, Asano S, Maeda R. Role of capsaicin-sensitive sensory neurons and nitric oxide in the protective effect of lansoprazole, a proton pump inhibitor, on the gastric mucosa in rats. *Jpn J Pharmacol* 1996; 72: 137-147
- 19 Vongthavaravat V, Mesiya S, Saymeh L, Xia Y, Ward A, Harty RF. Transforming growth factor alpha-mediated gastroprotection against stress ulceration in the rat: involvement of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Life Sci* 2003; 72: 1803-1811
- 20 张咏梅, 张建福, 阎长栋. 胃缺血再灌注损伤的模型与机制. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 675-678
- 21 Konturek PC, Brzozowski T, Walter B, Burnat G, Hess T, Hahn EG, Konturek SJ. Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 2006; 536: 171-181
- 22 Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, Kwiecień S, Ptak A, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Pawlik M, Konturek SJ, Hahn EG. Brain-gut axis in gastroprotection by leptin and cholecystokinin against ischemia-reperfusion induced gastric lesions. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52: 583-602
- 23 Pajdo R, Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecień S, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pawlik M, Ptak A, Drozdowicz D, Hahn EG. Ischemic preconditioning, the most effective gastroprotective intervention: involvement of prostaglandins, nitric oxide, adenosine and sensory nerves. *Eur J Pharmacol* 2001; 427: 263-276
- 24 Masuda E, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Takei Y, Tsujii M, Oshita M, Michida T, Kobayashi I, Nakama A. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 58-64
- 25 Andrews FJ, Malcontenti-Wilson C, O'Brien PE. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 366-373
- 26 Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Yagi N, Arai M, Nakamura Y, Kaneko T, Yoshida N, Kondo M. Neutrophils, lipid peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 494-502

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 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误,外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者,直接采用原有英语词,如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词,如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者,宜用汉语拼音,如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写,如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(常务副总编辑: 张海宁 2008-11-18)

Ki-67和VEGF在食管腺癌中的表达及意义

卢明芳, 王 蓉

卢明芳, 中国人民解放军南京军区福州总医院干部病房二科 福建省福州市 350025

王蓉, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化内科 福建省福州市 350025

卢明芳, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事老年消化疾病的基础与临床研究。

作者贡献分布: 此课题由卢明芳与王蓉共同设计, 完成并撰写。

通讯作者: 卢明芳, 350025, 福建省福州市西环北路156号, 南京军区福州总医院干部病房二科. lumingfangdoc@163.com
电话: 0591-22859354

收稿日期: 2008-10-05 修回日期: 2008-10-25

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

Roles of Ki-67 and vascular endothelial growth factor in development of esophageal adenocarcinoma

Ming-Fang Lu, Rong Wang

Ming-Fang Lu, Department of Gerontology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Rong Wang, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Ming-Fang Lu, Department of Gerontology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 Xihuan North Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. lumingfangdoc@163.com
Received: 2008-10-05 Revised: 2008-10-25

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To detect the expression of Ki-67 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in esophageal adenocarcinoma (EA), and to reveal their roles in EA occurrence and development as well as their influences on EA prognosis.

METHODS: The expression levels of Ki-67 and VEGF protein were investigated in normal esophageal squamous epithelium ($n = 50$) and EA specimens ($n = 50$) using immunohistochemical staining respectively. The differences between groups was compared and correlation analysis was performed.

RESULTS: Ki-67 was hardly expressed in normal esophageal squamous epithelium, but was strongly expressed in the cell nucleus of EA

specimens. There was a significant difference in Ki-67 staining ($\chi^2 = 85.463$, $P < 0.01$) between them. Moreover, there were significant correlations between the expression of Ki-67 and cell differentiation or pathologic stages of EA ($\chi^2 = 13.11$, 17.78 , both $P < 0.01$). Similarly, there was a significant difference in VEGF staining between normal esophageal squamous epithelium and EA specimens ($\chi^2 = 80.60$, $P < 0.01$), and VEGF expression was correlated with tumor differentiation degree, invasion depth and pathologic stages ($\chi^2 = 16.378$, 15.50 , 15.882 ; all $P < 0.05$); VEGF was strongly expressed in the cytoplasm of EA specimens. Ki-67 and VEGF expression were up-regulated synergically in EA ($\chi^2 = 74.678$, $P = 0.00$).

CONCLUSION: Up-regulation of Ki-67 and VEGF may play an important role in the development of in EA progression.

Key Words: Esophageal adenocarcinoma; Ki-67; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry

Lu MF, Wang R. Roles of Ki-67 and vascular endothelial growth factor in development of esophageal adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3621-3625

摘要

目的: 通过对人食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EA)标本进行Ki-67和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的检测, 揭示上述两者在EA发生发展中的作用及对预后的影响。

方法: 经病理确诊的EA患者50例, 取其术后切除标本作为EA组, 另取正常食管鳞状上皮50例作为正常对照组。采用免疫组化染色法检测EA标本中Ki-67蛋白和VEGF蛋白的表达情况, 并进行组间比较和相关性分析。

结果: Ki-67蛋白在正常鳞状上皮中几乎不表达, 而在EA中呈中强阳性表达, 广泛表达于腺癌细胞胞核, 与正常食管鳞状上皮比较, 差异均有显著性($\chi^2 = 85.463$, $P < 0.01$), 且癌细胞分

■背景资料

食管腺癌是近期发病率上升最快的恶性肿瘤之一, 东西方国家皆然。其恶性程度高、病变进展快。因而, 临床需要有更多更好的检测手段来评价预后、指导治疗。

■同行评议者

王健生, 副教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

■相关报道

近年关于Ki-67及VEGF的研究很多,广泛涉及机体各不同系统,例如在肺、皮肤、胃与食管、前列腺、肾脏及卵巢等诸多疾病领域的应用。上述文章分别探讨了这两个指标在肿瘤组织中的表达及其与生物学表现的关系,为肿瘤的临临床分期、预后判断及综合治疗提供了实验依据。

化程度和肿瘤病理学分期与Ki-67蛋白表达相关($\chi^2 = 13.11$, $\chi^2 = 17.78$, 均 $P < 0.01$); VEGF蛋白在正常鳞状上皮中不表达,在EA细胞胞质中呈强表达,与正常食管比较,差异均有显著性($\chi^2 = 80.60$, $P < 0.01$)。且癌细胞分化程度、肿瘤的浸润程度及肿瘤病理学分期与VEGF蛋白表达相关($\chi^2 = 16.378$, $\chi^2 = 15.50$, $\chi^2 = 15.882$, 均 $P < 0.05$)。Ki-67和VEGF在EA中表达升高,呈正协同关系($\chi^2 = 74.678$, $P = 0.00$)。

结论: Ki-67和VEGF在EA中表达均升高,说明两者的表达上调在EA的增殖及转移中起了重要作用,对肿瘤的预后起较好的高效能预测作用。

关键词: 食管腺癌; Ki-67; 血管内皮生长因子; 免疫组化

卢明芳, 王蓉. Ki-67和VEGF在食管腺癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3621-3625

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3621.asp>

0 引言

流行病学和临床研究结果表明,食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EA)是近期发病率上升最快的恶性肿瘤之一,自20世纪70年代以来,EA的发病率在西方国家上升了350%以上^[1-2]。在我国,EA的发病率也呈上升趋势。大体上,恶性肿瘤的形成及发展可以分两个阶段,即肿瘤细胞的克隆性增殖阶段和肿瘤的血管形成阶段^[3]。细胞核增殖抗原Ki-67是一种与细胞增殖密切相关的核内蛋白,因其只表达于增殖细胞各期中,静止期细胞阴性,而被作为评价细胞生长分数的自效指标,广泛应用于临床及基础研究^[4-8]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异的血管生成因子,与人类多种肿瘤生长和转移有关^[3]。本文采用免疫组织化学法检测了50例EA组织中Ki-67、VEGF蛋白的表达,并分析了两者的相互关系,以探讨两者在EA发生发展及浸润、转移中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 共收集2005-07/2007-07在中国人民解放军南京军区福州总医院诊治的EA患者50例为EA组,其中男42例,女8例,男女比例为5.25:1,年龄35-85(平均60.93±12.31)岁。所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。均经病理组织学证实为EA,其中EA平均病变长度为5 cm,中位发病年龄为61.5岁。发现时多为II期、III期患

者,无I期患者,其中II期16例,占32%,III期28例,占56%,IV期6例,占12%;淋巴转移多见,占72%,其中高分化8例,占16%,中分化8例,占16%,低分化例34例,占68%。未发现仅侵及黏膜层及黏膜下层的病例,侵及肌层、浆膜下者10例,占20%;穿透浆膜层者34例,占68%;远处转移者6例,占12%。另取食管正常的非肿瘤患者距胃食管连接处约5 cm处的食管黏膜50例作为对照组,其中男42例,女8例,男女比例为5.25:1,年龄33-86(平均61.21±10.28)岁。

EA诊断标准: 根据Siewert^[9]分类方法,如果肿瘤中心或超过66%的肿瘤组织位于解剖学上的食管胃连接处之上超过1 cm,为I型,食管腺癌;如果肿瘤中心或肿块位于解剖学上的胃食管连接部口侧1 cm内至远端2 cm内,为II型胃食管连接部腺癌;如果肿瘤中心或超过66%的肿瘤组织位于解剖学上的胃食管连接部远端2 cm以外,则为III型胃食管连接部腺癌。2000年这种分类有些细微改变,肿瘤中心位于解剖上贲门近端至远端5 cm内被定为胃食管连接部腺癌。这包括I型腺癌,可能从上浸润胃食管连接部;II型,起源于胃食管连接部;III型腺癌或贲门下癌,从下向上浸润胃食管连接部。本文仍以I型腺癌作为取材标准。肿瘤病理分期参照食管癌TNM分期第6版(2002版)。

1.2 方法

1.2.1 HE染色及免疫组化检测: 常规固定、包埋、切片、HE染色。应用免疫组化二步法(ElivisionTM plus)参照说明书对各组标本进行染色。均滴加即用型一抗(鼠抗人Ki-67单抗,鼠抗人VEGF单抗,均为美国Santa Cruze公司生产),室温孵育3 h, DAB显色。阳性对照以公司提供的阳性片作对照,阴性对照以PBS代替一抗。

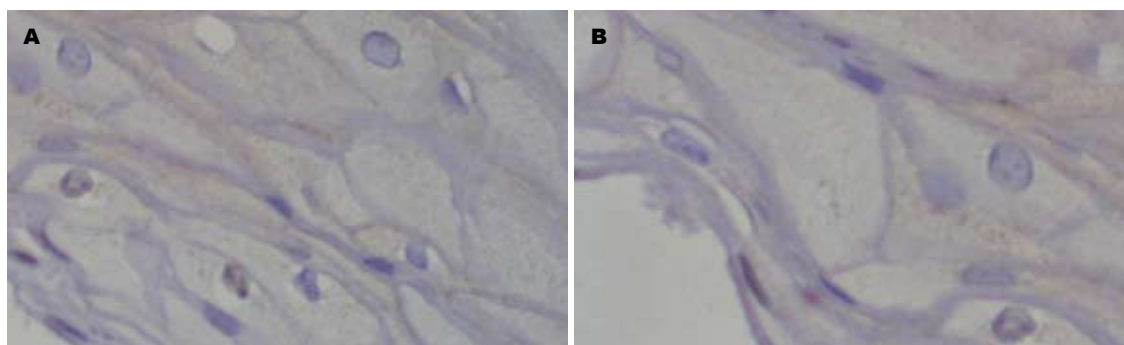
1.2.2 病理结果的判定标准: Ki-67表达于胞核,VEGF表达于胞质,呈现棕黄色颗粒为阳性,每个高倍视野下观察并计算阳性的腺上皮细胞/总的腺上皮细胞的百分率,每例随机观察20个高倍视野,求出平均值。参照Kawasaki *et al*^[10]半定量积分法判断结果。

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行等级资料的秩和检验及相关分析。

2 结果

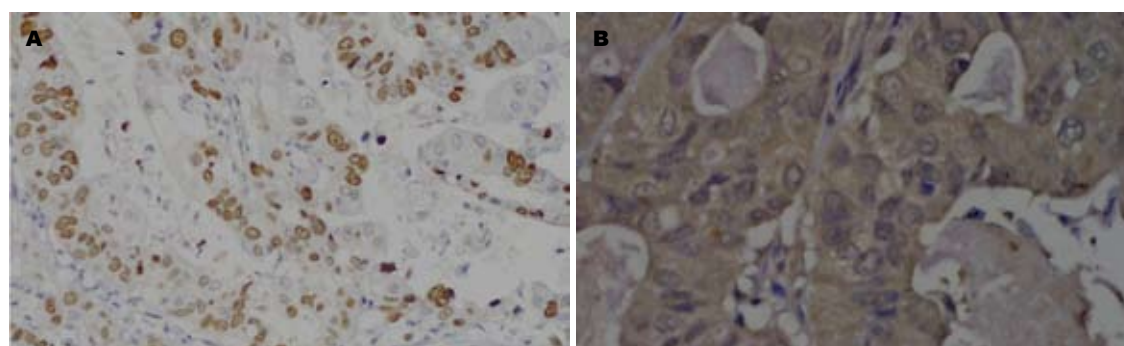
2.1 Ki-67的蛋白表达检测结果

2.1.1 Ki-67的蛋白表达: Ki-67表达的细胞定位为细胞核,棕黄色颗粒为阳性染色。Ki-67在正常鳞

图1 食管鳞状上皮免疫组化染色($\times 400$). A: Ki-67; B: VEGF.

■应用要点

本文着重研究这两个指标在食管腺癌中的表达,结果显示,二者在食管腺癌的生长及转移过程中起了重要作用,联合检测可用于评价食管腺癌的预后、指导治疗。

图2 EA的免疫组化染色. A: Ki-67($\times 200$); B: VEGF($\times 400$).表1 食管正常鳞状上皮、EA上皮中Ki-67和VEGF表达的比较($n=50$)

蛋白	分组	-	+	++	+++	平均等级
Ki-67	对照组 ^b	48	2	0	0	26.78
	EA组	2	12	12	24	74.22
VEGF	对照组 ^b	46	3	1	0	27.02
	EA组	2	6	14	28	73.98

^b $P<0.01$ vs EA组.

状上皮组染色为阴性(图1A),而在EA细胞均呈弥漫强阳性表达(图2A).两组之间比较,差异均有统计学意义($\chi^2=85.463$, $P<0.01$,表1).

2.1.2 Ki-67的蛋白表达与临床病理因素的关系:从表2可见,不同分化程度EA Ki-67蛋白的表达不同($\chi^2=13.11$, $P=0.001$),且随着分化程度降低, Ki-67的表达升高;不同的病理学分期, EA Ki-67蛋白的表达不同($\chi^2=17.78$, $P=0.007$);而是否有淋巴结转移、不同的浸润程度及是否有远处转移与Ki-67蛋白表达的强弱无关(表2).

2.1.3 VEGF的蛋白表达检测结果: VEGF表达的细胞定位于胞质,棕黄色颗粒为阳性染色. VEGF在正常鳞状上皮组染色为阴性(图1B),而在EA细胞均呈弥漫强阳性表达(图2B).两组之间比较,差异均有统计学意义($\chi^2=80.60$, $P=$

0.000,表1).

2.1.4 VEGF的蛋白表达与临床病理因素的关系:从表2可见不同分化程度EA VEGF蛋白的表达不同($\chi^2=16.378$, $P=0.012$),且随着分化程度降低, VEGF的表达升高;不同的浸润程度, EA VEGF蛋白的表达不同($\chi^2=15.50$, $P=0.017$);不同的病理学分期, EA VEGF蛋白的表达不同($\chi^2=15.882$, $P=0.014$),而是否有淋巴结转移及是否有远处转移与VEGF蛋白表达的强弱无关(表2).

2.1.5 EA中Ki-67蛋白与VEGF蛋白表达的相关性: EA中Ki-67蛋白与VEGF蛋白表达呈正相关($\chi^2=74.678$, $P=0.00$,表3).

3 讨论

EA尽管临床表现与食管鳞癌类似,但与食管鳞癌相比,具有转移早、恶性程度高、可向胸部淋巴结及腹部淋巴结转移等生物学特性.目前国内对EA的研究报道的较少. Ki-67是目前临床上反映肿瘤增殖水平的最好指标之一^[3,11-14].本研究发现,在EA中, Ki-67蛋白呈高表达,与常英、Kerkhot、Jin *et al*的研究一致^[11,15-16].且Ki-67蛋白表达与癌细胞的分化程度及病理学分期相关,即随着分化程度降低, Ki-67的表达升高;随病理分期越晚,则Ki-67蛋白表达越高.说明Ki-67蛋白在EA的表达与肿瘤的生物学行为

■同行评价

本文主要研究Ki-67和VEGF在食管腺瘤的表达情况,设计合理,层次分明,具有一定创新性。

表 2 EA中Ki-67和VEGF表达与临床病理因素的关系

分组		Ki-67					VEGF				
		-	+	++	+++	平均等级	-	+	++	+++	平均等级
分化程度	高分化	2	4	2	0	9.75	1	3	2	2	15.25
	中分化	0	2	2	4	26.50	1	2	3	2	16.50
	低分化	0	6	8	20	28.97	0	1	9	24	30.03
淋巴结转移	有	2	8	10	16	24.78	2	4	10	20	25.28
	无	0	4	2	8	27.36	0	2	4	8	26.07
浸润程度	黏膜及黏膜下	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00
	肌层、浆膜下	0	2	4	4	25.30	1	2	5	2	16.30
	穿透浆膜层	2	8	6	18	26.09	0	3	6	25	30.06
	侵及邻近处	0	2	2	2	22.50	1	1	3	1	15.00
病理分期	I期	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0.00
	II期	2	8	4	2	14.38	1	3	9	3	16.69
	III期	0	4	6	18	30.36	1	2	3	22	30.79
	IV期	0	0	2	4	32.50	0	1	2	3	24.33
远处转移	有	0	2	2	2	22.50	1	3	10	22	27.11
	无	2	10	10	22	25.91	1	3	4	6	21.36

表 3 EA中Ki-67蛋白表达与VEGF蛋白表达的关系

分组		VEGF				平均等级
		-	+	++	+++	
Ki-67	-	2	0	0	14.83	1.50
	+	0	5	5	23.42	14.83
	++	0	1	6	33.88	23.42
	+++	0	0	3	1.50	33.88

密切相关。

实体肿瘤的生长和代谢需要持续的血管生长,如果肿瘤没有新生的血管供应,在其直径达到1-2 mm时即停止生长。VEGF属于PDGF家族,是血管生成的主要调控因子,与人类多种肿瘤生长和转移有关,不仅可促进内皮细胞移动,有利于血管生成,诱导血管通透性增加,而且有利于肿瘤细胞脱落进入血管,诱导肿瘤血管形成,从而促进肿瘤的生长和繁殖,或向邻近纤维蛋白和结缔组织基质扩散,为肿瘤的浸润转移创造条件^[17-19]。本研究发现,在EA中,VEGF蛋白呈高表达,并与癌细胞的分化程度、肿瘤的浸润程度及病理学分期相关,即随着分化程度降低、浸润程度加深、病理学分期越晚,VEGF蛋白表达越高。说明VEGF蛋白在EA的表达,促进了肿瘤的浸润生长及转移。VEGF和Ki-67从血管生成和增殖活性两个不同的侧面反映了肿瘤细胞的生长能力。

本组研究结果显示,Ki-67随着VEGF增高而增高,即两者呈正相关性。说明肿瘤血管的生长

越丰富,肿瘤细胞的增殖能力越强,呈现正协同作用。两者在EA的生长及转移过程中起了重要作用。联合检测两者的表达对EA的预后可起较好的预测作用。

4 参考文献

- 姚汉清, 王贵齐. Barrett食管和食管腺癌: 东西方的差异. 胃肠病学 2006; 11: 513-515
- Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83: 2049-2053
- 张桂蓉, 梅同华, 马英. VEGF及Ki67与NSCLC生物学行为的相关性研究. 四川医学 2003; 23: 445-447
- 杜洁, 岑琪. pKi67及其临床应用现状. 华西医学 2004; 19: 322-323
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1705
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20
- Lababede O, Meziane MA, Rice TW. TNM staging of lung cancer: a quick reference chart. *Chest* 1999; 115: 233-235
- Soini Y, Kamel D, Paakko P, Lehto VP, Oikarinen A, Vahakangas KV. Aberrant accumulation of p53 associates with Ki67 and mitotic count in benign skin lesions. *Br J Dermatol* 1994; 131: 514-520
- Siewert JR, Stein HJ, Feith M. Adenocarcinoma of the esophago-gastric junction. *Scand J Surg* 2006; 95: 260-269
- Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer.

- Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074
- 11 常英, 刘贵生, 张军, 龚均. 组织芯片研究胃食管黏膜病变中Ki67和C-erbB-2的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1184-1189
- 12 Inoue T, Segawa T, Shiraishi T, Yoshida T, Toda Y, Yamada T, Kinukawa N, Kinoshita H, Kamoto T, Ogawa O. Androgen receptor, Ki67, and p53 expression in radical prostatectomy specimens predict treatment failure in Japanese population. *Urology* 2005; 66: 332-337
- 13 Visapaa H, Seligson D, Huang Y, Rao JY, Beldegrun A, Horvath S, Palotie A. Ki67, gelsolin and PTEN expression in sarcomatoid renal tumors. *Urol Res* 2003; 30: 387-389
- 14 Czyzewska J, Guzinska-Ustymowicz K, Lebelt A, Zalewski B, Kemona A. Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004; 49 Suppl 1: 64-66
- 15 Kerkhof M, Steyerberg EW, Kusters JG, van Dekken H, van Vuuren AJ, Kuipers EJ, Siersema PD. Aneuploidy and high expression of p53 and Ki67 is associated with neoplastic progression in Barrett esophagus. *Cancer Biomark* 2008; 4: 1-10
- 16 Jin Y, Zhang W, Liu B. [Abnormal expression of p53, Ki67 and iNOS in human esophageal carcinoma in situ and pre-malignant lesions] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001; 23: 129-131
- 17 张娜, 高玉彤, 李向红, 潘彦珩. VEGF及PCNA在卵巢上皮性肿瘤中的表达. *诊断病理学杂志* 2004; 11: 340-342
- 18 Vallbohmer D, Peters JH, Kuramochi H, Oh D, Yang D, Shimizu D, DeMeester SR, Hagen JA, Chandrasoma PT, Danenberg KD, Danenberg PV, DeMeester TR. Molecular determinants in targeted therapy for esophageal adenocarcinoma. *Arch Surg* 2006; 141: 476-481; discussion 481-482
- 19 郭敏, Ivan Ding, 王立东. FGF2和VEGF对食管鳞癌、腺癌荷瘤裸鼠肿瘤组织结构血管、灌注血管及缺氧程度的影响分析. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003; 12: 124-129

编辑 史景红 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(科技部列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 2008-11-18)

PTEN蛋白在早期胃癌和癌前病变中的表达及与临床病理特征的相关性

张斌, 曹俊, 周强, 陈洁宇, 邹晓平

■背景资料

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 抑癌基因的失活是胃癌常见的遗传学改变, 可能是胃癌发生的早期分子事件。近年来的研究发现, PTEN在许多肿瘤组织、肿瘤细胞株以及多种肿瘤相关综合征中均存在突变, 与肿瘤的浸润及转移关系密切。

张斌, 曹俊, 邹晓平, 南京大学医学院附属鼓楼医院消化科 江苏省南京市 210008

周强, 陈洁宇, 南京大学医学院附属鼓楼医院病理科 江苏省南京市 210008

张斌, 南京大学医学院在读硕士生, 主要从事消化系统肿瘤的表现遗传研究。

江苏省卫生厅科教兴卫工程重点人才资助项目, No. RC2007003

作者贡献分布: 此课题由邹晓平, 曹俊及张斌设计; 研究过程由张斌, 周强及陈洁宇操作完成; 研究所用试剂及分析工具由邹晓平提供; 数据分析由张斌与曹俊完成; 本论文写作由张斌与邹晓平完成。

通讯作者: 邹晓平, 210008, 江苏省南京市中央路321号, 南京大学医学院附属鼓楼医院消化科。zouxiaoping795@hotmail.com

电话: 025-83106666-20602

收稿日期: 2008-09-24 修回日期: 2008-10-24

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

Correlation between PTEN protein expression and clinicopathological features in the precancerous lesions and early gastric cancer

Bin Zhang, Jun Cao, Qiang Zhou, Jie-Yu Chen, Xiao-Ping Zou

Bin Zhang, Jun Cao, Xiao-Ping Zou, Department of Gastroenterology, the Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Qiang Zhou, Jie-Yu Chen, Department of Pathology, the Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Supported by: the Health Department Foundation of Jiangsu Province for Key Talents, No. RC2007003

Correspondence to: Dr. Xiao-ping Zou, Department of Gastroenterology, the Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. zouxiaoping795@hotmail.com

Received: 2008-09-24 Revised: 2008-10-24

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate the correlation of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) protein expression and clinicopathological features in the precancerous lesions and early gastric cancer, and to explore its clinical implication in early development of gastric cancer.

METHODS: A series of 20 normal gastric mu-

cosal samples, 14 intestinal metaplasia (IM), 27 dysplasia and 16 early gastric carcinomas were examined for the expression of PTEN using En-Vision immunohistochemistry. Correlation between PTEN expression and clinicopathological features was analyzed.

RESULTS: The positive rates of PTEN protein were 100% (20/20), 100% (14/14), 92.6% (25/27) and 75.0% (12/16) in normal gastric mucosa, IM, dysplasia and early gastric carcinoma, respectively. The positive rate of PTEN protein expression was significantly lower in early gastric carcinoma than the other three groups ($P < 0.05$). PTEN protein expression level was negatively correlated with the pathological severity ($r = -0.488$, $P < 0.01$). The expression of PTEN was markedly associated with the serum CEA level ($P = 0.001$), but not with age, sex, *H. pylori* infection or with location of lesions ($P > 0.05$).

CONCLUSION: PTEN, a tumor suppressor gene with phosphatase activity, plays an important role in the early carcinogenesis of gastric carcinoma owe to its reduced expression.

Key Words: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten protein; Early gastric cancer; Precancerous lesions

Zhang B, Cao J, Zhou Q, Chen JY, Zou XP. Correlation between PTEN protein expression and clinicopathological features in the precancerous lesions and early gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3626-3630

摘要

目的: 观察正常胃黏膜、肠上皮化生、异型增生和早期胃癌中抑癌基因PTEN的蛋白表达, 探讨PTEN表达在胃癌早期发生过程中的作用。

方法: 共收集57例病变, 按病理级别分为慢性胃炎伴肠上皮化生14例, 异型增生27例, 早期胃癌16例, 另取20例正常胃黏膜作为对照。

■同行评议者

杜雅莉, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

采用EnVision免疫组化方法检测各组黏膜中PTEN蛋白表达情况, 并分析其与临床病理特征的关系。

结果: PTEN在正常胃黏膜和肠上皮化生中全部表达, 在异型增生和早期胃癌中的阳性率分别为92.6%(25/27)、75.0%(12/16)。PTEN在正常胃黏膜、肠上皮化生和异型增生三组间的表达无显著差异, 在早期胃癌中的表达较前三组明显降低($P<0.05$)。PTEN表达强度与病理级别呈明显的负相关($r = -0.488$, $P<0.01$)。PTEN蛋白表达与患者年龄、性别、病变部位及*H pylori*感染无关($P>0.05$), 但与血清CEA水平显著相关($P = 0.001$)。

结论: 作为一种具有磷酸酶活性的抑癌基因, PTEN蛋白低表达在胃癌早期发生过程中发挥着重要的作用。

关键词: PTEN蛋白; 早期胃癌; 癌前病变

张斌, 曹俊, 周强, 陈洁宇, 邹晓平. PTEN蛋白在早期胃癌和癌前病变中的表达及与临床病理特征的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3626–3630

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3626.asp>

0 引言

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 位居恶性肿瘤死因的第2位, 在我国则占恶性肿瘤死亡率的第1位。随着人们对胃癌发病机制和生物学行为不断深入的研究, 发现胃癌的发生进展常伴有癌基因的激活和抑癌基因的失活。PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)是1997年Li和Steck *et al*几乎同时报道的位于染色体10q23.3上的基因^[1-2], 是迄今为止发现的第1个具有磷酸酶活性的抑癌基因, 不仅参与细胞周期调控, 而且控制细胞正常发育, 在许多肿瘤组织、肿瘤细胞株以及多种肿瘤相关综合征中都存在该基因的突变^[3-6]。目前对胃癌组织尤其是早期胃癌和癌前病变组织中PTEN蛋白表达研究较少, 且结论尚不一致。本研究利用免疫组化方法检测57例早期胃癌和癌前病变组织及20例正常胃黏膜中PTEN蛋白表达的情况, 旨在探讨其在胃癌临床病理中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集南京大学医学院附属鼓楼医院消化科2005-06/2008-01内镜黏膜切除术(endoscopic

mucosal resection, EMR)切除标本和常规胃镜活检蜡块存档: 活检证实为慢性胃炎伴肠上皮化生14例, 另有43例患者经透明帽法进行黏膜切除^[7], 为排除药物及内镜操作对蛋白表达可能产生的影响, 仅取首次切除的43例病变纳入本研究, 按术后病理级别分为: 异型增生27例, 早期胃癌16例。57例患者分为: 男40例, 女17例, 年龄42-80(平均 65.2 ± 9.2)岁, 所有患者均未接受放化疗及免疫治疗。40例患者经快速尿素酶法检测*H pylori*, 阳性12例, 阴性28例。35例患者检测了血清CEA, 9例超过正常范围, 余26例均正常。20例正常胃黏膜组织取自20名来自门诊的健康志愿者。本实验获所有患者知情同意。即用型小鼠抗人PTEN mAb购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 免疫组化试剂盒及DAB显色试剂盒均购自福州迈新(Maixin)生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测: 采用EnVision染色方法, 4 μm 厚切片常规脱蜡至水, 高压抗原热修复(1 mmol/L EDTA, pH8.0), 山羊血清封闭后依次滴加一抗4℃过夜, 生物素化二抗室温孵育30 min, DAB显色, 苏木素衬染后封片。用PBS代替一抗平行操作染色做阴性对照, 用经反复验证的已知阳性片做阳性对照。

1.2.2 结果判定标准: 以细胞质出现棕黄色颗粒为PTEN阳性表达细胞。每张切片随机观察10个高倍视野($\times 400$), 计数阳性细胞与总细胞的比值。阳性细胞数 $<5\%$ 为阴性(-), $5\%-25\%$ 为弱阳性(+), $25\%-50\%$ 为阳性(++), $>50\%$ 为强阳性(+++)。

统计学处理 采用非参数检验(Kruskal-Wallis Test和Mann-Whitney U Test)对各组病变PTEN表达的差异进行检验; 采用Spearman等级相关分析蛋白表达与病理级别间的相关性; 对性别、年龄等的组间差异用 χ^2 检验和Fisher确切概率法进行检验; 应用Logistic回归进行多因素分析。所有数据均在SPSS13.0软件包中进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组织中PTEN蛋白的表达 PTEN免疫组化阳性产物呈棕黄色细颗粒状, 主要定位于细胞质中(图1), 细胞核和细胞膜几乎不着色。PTEN在正常胃黏膜和肠上皮化生中全部表达, 在异型增生和早期胃癌中的表达呈递减趋势(表1), 分别为92.6%(25/27)、75.0%(12/16)。PTEN在正常胃黏膜、肠上皮化生和异型增生三组间的表

■研发前沿

近年来对胃癌尤其是早期胃癌和癌前病变中PTEN基因突变情况研究较少, 且结论尚不一致, 有待于进一步研究。

■相关报道

国内外多项研究报道均提示PTEN蛋白的失表达与胃癌的发生、发展及预后密切相关, 提示PTEN蛋白表达水平可作为判定胃癌病理生物学行为的客观指标。但另一些研究却表明PTEN基因的突变、缺失在胃癌的发生、发展中并不起主要作用, PTEN基因并未作为一种抑癌基因参与胃癌的形成和进展。

■创新盘点

本研究采用EnVision免疫组化方法检测经内镜活检和黏膜切除并经严格病理组织学诊断的正常胃黏膜、肠上皮化生、异型增生和早期胃癌中PTEN蛋白表达情况,并分析其与临床病理特征的关系。结果表明PTEN蛋白低表达在胃癌早期发生过程中起着重要作用。

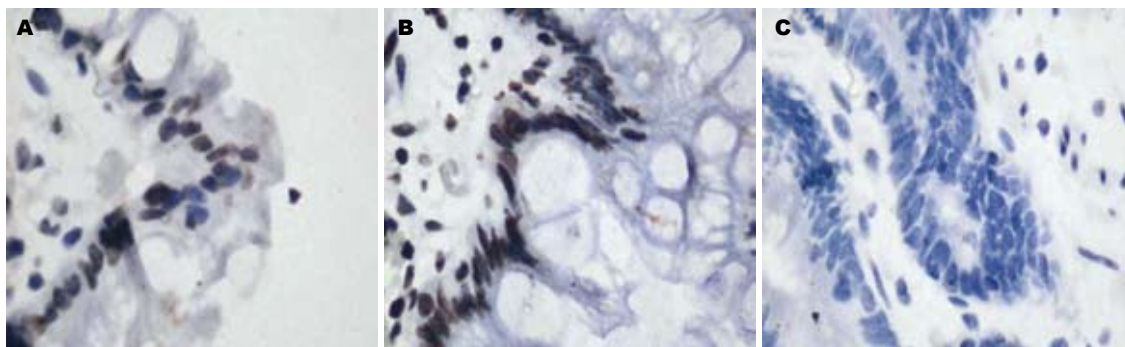


图1 PTEN蛋白在各种黏膜中的表达情况(EnVision法×400)。A: 正常胃黏膜中阳性表达; B: 异型增生黏膜中阳性表达; C: 早期胃癌中无表达。

表1 不同组织中PTEN的表达情况

分组	n	PTEN表达情况				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
正常黏膜	20	0	7	8	5	100.0 ^a
肠上皮化生	14	0	3	5	6	100.0 ^a
异型增生	27	2	7	14	4	92.6 ^a
早期胃癌	16	4	9	2	1	75.0

^a $P < 0.05$ vs 早期胃癌。

达无显著差异,在早期胃癌中的表达则显著降低,与前三组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。PTEN表达强度与病理分级的关系采用Spearman等级相关分析,结果两者呈明显的负相关($r = -0.488$, $P < 0.01$)。

2.2 PTEN基因表达与临床病理因素的关系
PTEN蛋白表达与患者的年龄、性别、*H. pylori*感染均无显著相关,与患者血清CEA水平和病变部位有密切联系($P < 0.05$, 表2)。应用Logistic逐步回归分析方法筛选相关因素,血清CEA水平和病变部位最终进入Logistic回归模型。Wald检验结果表明,血清CEA水平对PTEN蛋白表达有意义($P = 0.003$),血清CEA水平正常患者的病变PTEN蛋白表达较CEA升高者高,OR值为 $e^{2.835} = 17.030$ 。经过分析表明病变部位对PTEN蛋白表达并无意义($P = 0.179$, 表3)。

3 讨论

胃癌的发生发展是一个多阶段、连续性的过程,一般而言,要经历慢性胃炎→胃黏膜萎缩肠化→异型增生→胃癌这一动态过程,常伴有癌基因的激活和抑癌基因的失活。抑癌基因PTEN编码的蛋白具有双特异性磷酸酶活性,能使PIP3去磷酸化而抑制(PI3K)/Akt(pAkt)信号传导途

表2 PTEN基因表达与临床病理因素的关系

分组	n	PTEN表达情况				P
		-	+	++	+++	
年龄						0.601
<60	18	2	4	9	3	
≥60	39	4	15	12	8	
性别						0.288
男	40	4	16	13	7	
女	17	2	3	8	4	
<i>H. pylori</i>						0.538
+	12	3	1	7	1	
-	28	3	9	8	8	
CEA水平						0.001
正常	26	1	7	8	10	
升高	9	3	5	1	0	
病变部位						0.044 ^a
胃角	15	2	2	7	4	
胃体	20	4	10	3	3	
胃窦	22	0	7	11	4	

^a $P < 0.05$ vs 胃窦和胃体。

表3 进入Logistic回归方程中的自变量及有关参数的估计值

进入变量	Estimate	Std. Error	Wald	ν	P
病变部位	1.099	0.818	1.804	1	0.179
CEA水平	2.835	0.940	9.097	1	0.003

径,在调控细胞生长及维持细胞的增殖、分化和凋亡平衡中起重要作用^[8]。PTEN基因突变则导致其磷酸酶活性下降,细胞恶性增殖能力和迁移能力增强,并抑制细胞凋亡。Kang *et al*^[9]对310例胃癌组织进行免疫组织化学分析,发现有62例(20%)PTEN失表达,而且瘤体越大、浸润越深、有淋巴结转移及预后不良者PTEN蛋白

表达的阳性率越低,提示PTEN蛋白的失表达与胃癌的发生、发展及预后密切相关.国内Zheng *et al*^[10]检测了胃癌及癌旁黏膜、肠上皮化生和异型增生中的PTEN蛋白表达,结果PTEN蛋白在异型增生和胃癌中的阳性表达率(66.7%和47.8%)显著低于癌旁黏膜和肠上皮化生(100%和98.5%)($P<0.01$),进展期胃癌PTEN表达显著低于早期胃癌(42.9% vs 67.6%, $P<0.01$),表明PTEN在胃癌发生发展不同阶段的表达呈递减趋势,李异玲 *et al*^[11-12]的研究也得出相似结论,提示PTEN蛋白表达水平可作为判定胃癌病理生物学行为的客观指标.但另一些研究却提出相反的观点:Sato *et al*^[13]检测58例原发性胃癌中仅1例(1.7%)在内含子7区有5个碱基对缺失,但无mRNA序列的改变,因此认为PTEN基因的突变、缺失在胃癌的发生、发展中并不起主要作用.另一项研究也表明PTEN基因的突变率在进展期胃癌中并没有显著性的提高,提示PTEN基因并没有作为一种抑癌基因而参与胃癌的形成和进展^[14].本研究采用免疫组化方法检测正常黏膜、肠上皮化生、异型增生和早期胃癌4个阶段的黏膜中PTEN蛋白的表达情况,发现PTEN蛋白的表达随病理级别增加也呈递减趋势,两者呈显著的负相关.PTEN蛋白在正常黏膜和肠上皮化生中全部表达,在异型增生中也仅有轻度缺失,三组间无明显差异($P>0.05$);在早期胃癌中的表达明显降低,仅75.0%,显著低于前三组黏膜中的阳性率($P<0.05$),结果表明PTEN基因失表达是胃癌发生的早期分子事件,在胃癌前病变进展至胃癌的过程中起着重要的作用.

国内Deng *et al*^[15]的研究表明PTEN蛋白在胃癌组织中的表达与患者的年龄、性别及病变大小无关,但与病变浸润深度和分化程度相关($P=0.02$).我们的研究也表明在胃癌前病变和早期胃癌阶段中PTEN表达与患者的年龄、性别及病变部位无关,与患者是否感染*H pylori*也无明显相关性.Colakoglu *et al*^[16]的研究表明结肠癌组织中pAkt蛋白的表达与患者术前的血清CEA水平密切相关,既然PTEN基因的突变可以导致pAkt信号通路的失活,那么PTEN蛋白表达是否也与血清CEA水平存在相关性便值得进一步探讨.本研究中我们采用Logistic逐步回归分析方法分析,结果表明血清CEA水平对PTEN蛋白表达有意义($P=0.003$),血清CEA水平正常患者的病变中PTEN蛋白表达阳性率较CEA升高者高.

总之,PTEN作为一种具有磷酸酶活性的抑

癌基因,在胃癌早期发生过程中发挥着重要的作用.不过由于内镜取材的特殊性和局限性,本研究未能探讨PTEN蛋白表达与胃癌淋巴结转移、TNM分期等因素之间的关系.已有报道表明PTEN低表达是结直肠癌复发的独立危险因素^[16],但是在胃癌中情况如何还无从知晓.另外,PTEN基因在早期胃癌及癌前病变阶段中是如何起作用的?其失活机制又如何?是否可以使人工调节PTEN基因表达水平及体外干涉PTEN作用通路成为逆转癌前病变从而限制其向胃癌转化的新靶点?此类问题还有待于继续积累资料进行更深入的研究.

4 参考文献

- 1 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- 2 Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-362
- 3 Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2954-2963
- 4 Butler MG, Dasouki MJ, Zhou XP, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, Miles JH, Wang CH, Stratton R, Pilarski R, Eng C. Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet* 2005; 42: 318-321
- 5 Tate G, Suzuki T, Endo Y, Mitsuya T. A novel mutation of the PTEN gene in a Japanese patient with Cowden syndrome and bilateral breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 184: 67-71
- 6 Pezzolesi MG, Li Y, Zhou XP, Pilarski R, Shen L, Eng C. Mutation-positive and mutation-negative patients with Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes associated with distinct 10q haplotypes. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 923-934
- 7 邹晓平, 张斌, 李雯, 曹俊, 吴毓麟. 内镜黏膜切除术在胃食管癌前病变治疗中的应用. *中华消化内镜杂志* 2008; 25: 69-72
- 8 Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 4240-4245
- 9 Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 285-291
- 10 Zheng HC, Chen Y, Kuang LG, Yang L, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. [Expression of

■应用要点

通过检测PTEN蛋白表达水平,可以早期诊断胃癌,判断预后;同时也通过人工调节PTEN基因表达水平及体外干涉PTEN作用通路来逆转癌前病变并限制其向胃癌转化提供了理论基础.

■同行评价

本研究发现作为一种具有磷酸酶活性的抑癌基因PTEN在胃癌早期发生过程中发挥着重要的作用,为胃癌早期诊断提供了依据。

- PTEN-encoding product in different stages of carcinogenesis and progression of gastric carcinoma] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003; 25: 13-16
- 11 李异玲, 何向民, 郑华川, 吴东瑛, 杨雪飞, 辛彦, 傅宝玉. 胃黏膜癌变过程中PTEN基因编码产物的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1294-1296
- 12 李异玲, 田忠, 傅宝玉. 胃癌及癌前病变中PTEN及微卫星不稳定的变化及二者的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2470-2475
- 13 Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, Endoh Y, Sakata K, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Terashima M, Nishizuka S, Zou T, Meltzer SJ. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer. *Virchows Arch* 2002; 440: 160-165
- 14 Wang JY, Huang TJ, Chen FM, Hsieh MC, Lin SR, Hou MF, Hsieh JS. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in advanced gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2003; 442: 437-443
- 15 Deng H, Wu RL, Zhou HY, Huang X, Chen Y, Liu LJ. Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1013-1017
- 16 Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Ezer A, Noyan T, Karakayali H, Haberal M. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? *Am J Surg* 2008; 195: 719-725

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 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-18)

TFF3和CD147在不同胃黏膜病变中的表达及其与血管生成的关系

唐忠辉, 陈华生, 邹宗楷, 蔡韶滨, 苏海燕, 沈洪武, 吴文乔, 林莉, 王元亨

唐忠辉, 陈华生, 蔡韶滨, 林莉, 王元亨, 福建省漳州卫生职业学院 福建省漳州市 363000

邹宗楷, 苏海燕, 沈洪武, 吴文乔, 福建省漳州市医院病理科 福建省漳州市 363000

唐忠辉, 教授, 1987年福建医科大学本科毕业, 主要从事消化系统疾病的病理研究。

福建省漳州市科技局资助项目, No. Z07020

作者贡献分布: 唐忠辉与陈华生对此文所作贡献均等; 此课题由唐忠辉, 陈华生, 邹宗楷, 苏海燕及蔡韶滨设计; 研究过程由邹宗楷, 蔡韶滨, 苏海燕, 沈洪武, 吴文乔, 林莉及王元亨操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由唐忠辉, 蔡韶滨及沈洪武提供; 数据分析由唐忠辉, 邹宗楷及苏海燕完成; 本论文写作由唐忠辉, 陈华生及邹宗楷完成。

通讯作者: 唐忠辉, 363000, 福建省漳州市, 漳州卫生职业学院基础医学部病理教研室. tzh6409@126.com

电话: 0596-2559526

收稿日期: 2008-10-05 修回日期: 2008-10-20

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

Trefoil factor 3 and CD147 expression in carcinogenesis of gastric mucosa and their correlation with angiogenesis

Zhong-Hui Tang, Hua-Sheng Chen, Zong-Kai Zou, Shao-Bin Cai, Hai-Yan Su, Hong-Wu Shen, Wen-Qiao Wu, Li Lin, Yuan-Heng Wang

Zhong-Hui Tang, Hua-Sheng Chen, Shao-Bin Cai, Li Lin, Yuan-Heng Wang, Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China

Zong-Kai Zou, Hai-Yan Su, Hong-Wu Shen, Wen-Qiao Wu, Department of Pathology, Hospital of Zhangzhou, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China

Supported by: the Foundation from Science and Technology Bureau of Zhangzhou City, No. Z07020

Correspondence to: Zhong-Hui Tang, Department of Pathology, Faculty of Preclinical Medicine of Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China. tzh6409@126.com

Received: 2008-10-05 Revised: 2008-10-20

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate expression of trefoil factor 3 (TFF3) and CD147 in gastric mucosa, and their correlation with microvessel density (MVD) in carcinogenesis of gastric mucosa.

METHODS: Three hundred and two sample tissues were prepared using tissue microarray. At the same time, S-P immunohistochemical meth-

ods were applied to detect expression of TFF3, CD147 and CD34.

RESULTS: TFF3 expression was significantly higher in atrophic gastritis, atypical hyperplasia and gastric carcinoma than in normal controls or in superficial gastritis (48.3%, 51.9%, 41.7% vs 13.3%; 48.3%, 51.9%, 41.7% vs 3.6%, all $P < 0.01$). CD147 expression and MVD were higher in gastric carcinoma than in normal controls, superficial gastritis, atrophic gastritis or in atypical hyperplasia (78.9% vs 14.3%, 43.3%, 51.2%, 59.3%; 31.86 ± 9.92 vs 26.10 ± 6.82 , 24.74 ± 5.49 , 20.77 ± 6.87 , 14.95 ± 6.28 , all $P < 0.05$). There was significant difference in CD147 expression and MVD between superficial gastritis and normal controls (43.3% vs 14.3%; 20.77 ± 6.87 vs 14.95 ± 6.28 , all $P < 0.05$). TFF3 and CD147 expression and MVD were correlated with lymph node metastasis and TNM staging (all $P < 0.05$). TFF3 expression was correlated with histological type ($P < 0.05$), CD147 expression was correlated with tumor differentiation ($P < 0.01$). CD147 expression and MVD were correlated to depth of invasion ($P < 0.05$). MVD with positive expressions of TFF3, survivin and CD147 was higher than that with negative expression (35.47 ± 9.41 vs 29.27 ± 9.50 ; 33.33 ± 9.62 vs 26.40 ± 9.17 , all $P < 0.01$). The expression of TFF and CD147 and MVD were positively correlated ($r = 0.323$, $r = 0.279$). Rate of the deeper tumor invasion (T_{3-4}), TNM categories (TNM_{III-IV}), lymph node metastasis and MVD reached the highest in TFF3(+)/CD147(+) and were markedly higher in TFF3(+)/CD147(+) than TFF3(-)/CD147(-) ($P < 0.05$).

CONCLUSION: TFF3, CD147 and CD34 may play important roles in carcinogenesis and gastric carcinoma development of gastric mucosa. They can be used as important markers for early diagnosis and reflecting metastasis in gastric carcinoma.

Key Words: Stomach neoplasms; Tissue microarray; Immunohistochemistry; Trefoil factor 3; CD147;

■背景资料

现代分子生物学研究表明, 人类基因组由10万左右的不同基因组成, 这些基因的选择性表达决定了机体整个生命过程, 基因表达的变化处于控制生物学调节机制的中心位置。因此, 研究胃癌不同发展阶段的基因表达变化, 不仅有助于阐明胃癌的发病机制, 而且还能为进一步开展胃癌的基因诊断和基因治疗提供重要的理论依据。

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院

■研究前沿

随着分子生物学技术的发展, TFF3和CD147对肿瘤的发生、增殖、浸润和转移的作用逐渐被人们所重视, 有关TFF3和CD147与血管形成在肿瘤发生、发展和转移过程中的相互联系、信号转导及表达调控机制将会成为当今肿瘤研究中的新热点之一。

Microvessel density; Angiogenesis

Tang ZH, Chen HS, Zou ZK, Cai SB, Su HY, Shen HW, Wu WQ, Lin L, Wang YH. Trefoil factor 3 and CD147 expression in carcinogenesis of gastric mucosa and their correlation with angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3631-3636

摘要

目的: 探讨三叶因子3(trefoil factor 3, TFF3)和CD147在不同胃黏膜病变中的表达与间质微血管(microvessel density, MVD)值的关系。

方法: 利用组织芯片技术制作302例的组织芯片, 同时采用S-P免疫组化方法检测TFF3、CD147和CD34表达。

结果: 萎缩性胃炎、不典型增生和胃癌各组TFF3表达均高于浅表性胃炎和正常组(48.3%, 51.9%, 41.7% vs 13.3%; 48.3%, 51.9%, 41.7% vs 3.6%, 均 $P<0.01$); 胃癌CD147表达和MVD高于正常胃黏膜、浅表性胃炎、萎缩性胃炎和不典型增生(78.9% vs 14.3%, 43.3%, 51.2%, 59.3%; 31.86 ± 9.92 vs 26.10 ± 6.82 , 24.74 ± 5.49 , 20.77 ± 6.87 , 14.95 ± 6.28 , 均 $P<0.05$), 浅表性胃炎CD147表达和MVD与正常胃黏膜之间差异显著(43.3% vs 14.3%; 20.77 ± 6.87 vs 14.95 ± 6.28 , 均 $P<0.05$)。TFF3、CD147表达和MVD与胃癌淋巴结转移和TNM分期有关($P<0.05$), TFF3表达与胃癌组织学类型有关($P<0.05$), CD147表达与胃癌分化程度和胃癌浸润深度有关($P<0.01$), MVD与胃癌浸润深度有关($P<0.05$)。TFF3、CD147阳性表达的MVD高于阴性的(35.47 ± 9.41 vs 29.27 ± 9.50 ; 33.33 ± 9.62 vs 26.40 ± 9.17 , $P<0.01$)。TFF3和CD147表达与MVD呈显著正相关($r = 0.323$, $r = 0.279$)。TFF3(+)/CD147(+)者在深度浸润(T₃₋₄)、临床分期TNM_{III-IV}、淋巴结转移的比率和MVD最高, 且明显高于TFF3(-)/CD147(-)者($P<0.05$)。

结论: TFF3、CD147和CD34在胃黏膜癌变和癌变后的恶性演进过程中起重要作用, 可作为胃癌的早期诊断和预测胃癌发生转移的重要指标。

关键词: 胃肿瘤; 组织芯片; 免疫组化; 三叶因子3; CD147; 微血管密度; 血管形成

唐忠辉, 陈华生, 邹宗楷, 蔡韶滨, 苏海燕, 沈洪武, 吴文乔, 林莉, 王元亨. TFF3和CD147在不同胃黏膜病变中的表达及其与血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16(32): 3631-3636
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3631.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 目前早期胃癌的发现仍比较困难, 早期胃癌的预后较好, 5年生存率可达90%以上, 因而提高早期胃癌的检出率非常重要。本实验采用组织芯片技术构建含30例正常胃黏膜和272例患者(包括浅表性胃炎30例、萎缩性胃炎30例、不典型增生30例及胃癌182例)的组织芯片, 用免疫组化SP法检测三叶因子3(trefoil factor 3, TFF3)、CD147和间质微血管密(microvessel density, MVD)在组织芯片中的表达, 旨在探讨TFF3和CD147在不同胃黏膜病变中的表达与MVD值的关系及对胃黏膜保护作用 and 胃癌发生发展、浸润转移、血管生成的影响, 为胃癌早期诊断及预后判断提供客观指标。

1 材料和方法

1.1 材料 选取漳州市医院病理科2001-01/2002-12随访资料完整的原发性胃癌手术切除标本的蜡块182例。温习全部病例的临床资料, 按新编常见恶性肿瘤诊治规范^[1]进行组织分型、区域淋巴结转移分站及TNM分期。另胃镜活检选取正常胃黏膜、浅表性胃炎、萎缩性胃炎及中、重度不典型增生的蜡块各30例, 所有患者术前未经过任何抗癌治疗。实验用兔抗人TFF3多克隆抗体(工作浓度为1:100)、兔抗人CD147多克隆抗体(即用型)和鼠抗人CD34 mAb(即用型)及SP免疫组化试剂盒及DAB显示试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组情况: 胃癌组($n = 182$)、浅表性胃炎组($n = 30$)、萎缩性胃炎组($n = 30$)、不典型增生组($n = 30$)。正常胃黏膜为正常组。胃癌根据患者的性别、年龄、组织学类型、分化程度、浸润深度、淋巴结是否转移和TNM分期进行分组。

1.2.2 组织芯片制作: (1)HE染色切片形态学观察, 确定目标组织, 如胃癌等组织。(2)选择目标组织并分别在组织切片和相应石蜡组织上标记。(3)依次制作组织芯片制孔器、取材针和受体蜡块^[2], 制成7×6点列阵的组织芯片受体模块; 用已制作取材针从已定位的石蜡上取目标组织到组织芯片受体蜡块的相应孔内, 构建含有30例正常胃黏膜和272例患者(包括浅表性胃炎30例、萎缩性胃炎30例、不典型增生30例及胃癌182例)的不同胃黏膜病变的组织阵列蜡块8块。(4)将组织阵列蜡块行连续切片, 切片厚度为4

表 1 TFF3、CD147和MVD在不同胃黏膜病变中的表达

分组	n	TFF3表达		CD147表达		CD34表达	
		阳性n(%)	P值	阳性n(%)	P值	MVD(mean ± SD)	P值
正常组	28	1(3.6)		4(14.3)		14.95 ± 6.28	
浅表性胃炎组	30	4(13.3)		13(43.3)		20.77 ± 6.87	
萎缩性胃炎组	29	14(48.3)		15(51.2)		24.74 ± 5.49	
不典型增生组	27	14(51.9)		16(59.3)		26.10 ± 6.82	
胃癌组	175	102(41.7)	0.000	138(78.9)	0.000	31.86 ± 9.92	0.000

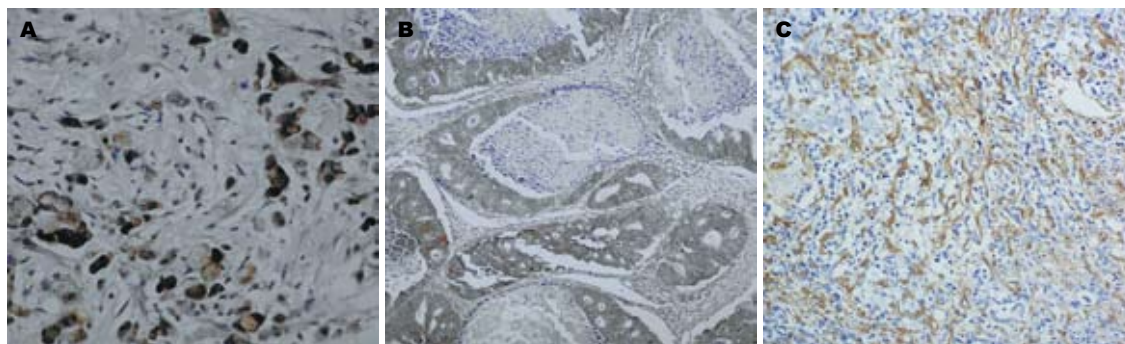


图 1 蛋白在胃癌中呈阳性表达. A: TFF3, 定位于胞质(SP法×400); B: CD147, 定位于胞膜和胞质(SP法×400); C: C34, 定位于胞膜(SP法×200).

μm, 与常规组织制片基本相似.

1.2.3 免疫组化: 采用SP方法对组织芯片切片进行免疫组化染色, DAB显色, 苏木精复染, 封片, 具体操作按照SP试剂盒说明书进行. 以PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性组织切片作阳性对照.

1.2.4 染色结果判断: 采用双盲法, 由两位病理医师独立观察, 若计数相差10%以上重新计数. TFF3以细胞胞质内出现淡黄色至棕黄色颗粒为阳性细胞. CD147以细胞胞膜及胞质内出现淡黄色至棕黄色颗粒为阳性细胞. 采用半定量积分法: 根据阳性细胞数和着色深度计分, 每例均随机观察计数5个高倍视野(×400), 确定其每个视野的阳性率, 取平均数, 按下列计分: 阳性细胞≤5%为0分, 6%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分; 阳性细胞表达的着色深度: 基本不着色为0分, 黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分. 将两项积分相乘: 0分为阴性(-), 1-4分为弱阳性(+), 5-8分为中度阳性(++), 9-12分为强阳性(+++). MVD计数: CD34以细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性, 每一个染成棕黄色的、可与周围血管、肿瘤细胞和其他结缔组织区分开来的内皮细胞或内皮细胞簇, 不论管腔和红细胞出现与否, 均作为1个单一的, 可作为1个微血管. 但肌层较厚及管腔面积大于8个红细

胞直径的血管不计数. 在低倍镜下观察整张切片的血管分布情况后, 选择癌灶周围间质血管密集区, 在400×视野内计数上述5个不同区域的微血管数, 取其平均值为MVD.

统计学处理 MVD用mean±SD表示. 所有统计数据应用SPSS10.0软件包处理. 采用 χ^2 检验、Independent-Samples *t*检验、One-way ANOVA过程和Spearman等级相关性检验判断各组之间TFF3、CD147表达和MVD的差异, 取 $P<0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 组织芯片的质量 构建含30例正常胃黏膜和272例患者(包括浅表性胃炎30例、萎缩性胃炎30例、不典型增生30例及胃癌182例)的组织芯片, 蜡块组织阵列的排列整齐, 常规切片组织形态良好. 在302例组织芯片中有13例发生皱折和掉片现象, 其中胃癌7例、正常胃组织2例、萎缩性胃炎1例、不典型增生3例.

2.2 不同胃黏膜组织中TFF3、CD147表达和MVD 在胃癌组织中, TFF3阳性染色主要定位于癌细胞胞质(图1A), 其阳性表达率为41.7%; CD147主要定位于癌细胞胞膜及胞质(图1B), 其阳性表达率为78.9%. CD34主要表达于细胞膜, 微血管染色呈棕黄色, 分布不均呈异质性(图1C).

■相关报道

相关研究表明, TFF3影响了上皮细胞钙黏素的表达和定位, 以及诱导连环素的酪氨酸磷酸化, 从而降低细胞间的紧密连接, 促进上皮细胞移行. 通过抑制细胞黏附、促进细胞侵袭、抑制凋亡, 在胃肿瘤中发挥作用. CD147不仅参与细胞与细胞或细胞与基质的黏附, 而且作为细胞外基质金属蛋白酶刺激物, CD147还具有刺激肿瘤细胞周围间质成纤维细胞分泌MMPs的能力, 从而促进肿瘤细胞的浸润转移.

■应用要点

本课题采用组织芯片技术对TFF3、CD147和CD34在胃不同病变中的表达进行了分析,结果提示TFF3、CD147和CD34在胃黏膜癌变和癌变后的恶性演进过程中起重要作用,可作为胃癌的早期诊断和预测胃癌发生转移的重要指标。

表 2 TFF3、CD147表达和MVD与胃癌临床病理特征的关系

项目	n	TFF3表达		CD147表达		CD34表达	
		阳性n(%)	P值	阳性n(%)	P值	MVD(mean ± SD)	P值
性别			0.863		0.627		0.800
男	133	55(41.4)		106(79.7)		31.75 ± 10.20	
女	42	18(42.9)		32(72.6)		32.20 ± 9.10	
年龄			0.518		0.486		0.861
<60	67	30(44.8)		51(76.1)		31.69 ± 9.12	
≥60	109	43(39.8)		87(80.6)		31.97 ± 10.43	
组织学类型			0.040		0.189		0.090
乳头状腺癌	20	8(40.0)		12(60.0)		31.99 ± 11.20	
管状腺癌	92	32(34.8)		72(78.3)		30.25 ± 9.80	
低分化腺癌	28	11(39.3)		24(85.7)		32.91 ± 10.35	
印戒细胞癌	9	4(44.4)		8(88.9)		38.51 ± 9.09	
黏液腺癌	26	18(69.2)		22(84.6)		34.01 ± 8.16	
分化程度			0.131		0.004		0.082
高分化	30	9(30.0)		17(56.7)		29.98 ± 10.55	
中分化	73	28(38.4)		60(82.2)		31.31 ± 9.42	
低未分化	72	36(50.0)		61(84.7)		33.62 ± 9.94	
浸润深度			0.779		0.029		0.000
T ₁	14	4(28.6)		8(57.1)		23.49 ± 5.58	
T ₂	23	10(43.5)		16(69.6)		27.50 ± 6.91	
T ₃	94	40(42.5)		74(78.7)		31.13 ± 9.10	
T ₄	44	19(43.2)		40(90.9)		38.36 ± 10.40	
淋巴结转移			0.037		0.019		0.000
无	26	6(23.1)		16(61.5)		25.00 ± 7.66	
有	149	66(44.5)		122(81.9)		33.06 ± 9.80	
TNM分期			0.008		0.001		0.000
I期	14	4(28.6)		8(57.1)		23.49 ± 5.58	
II期	67	22(32.8)		46(68.7)		25.72 ± 7.09	
III期	72	31(43.1)		62(86.1)		35.84 ± 8.23	
IV期	22	16(72.7)		22(100.0)		42.86 ± 7.85	

表 3 胃癌中TFF3、CD147表达与MVD的关系

项目	n	MVD(mean ± SD)	F	P值	t	u	P值
TFF3表达							
阴性	102	29.27 ± 9.50					
阳性	73	35.47 ± 9.41	0.018	0.894	4.274	174	0.000
CD147表达							
阴性	37	26.40 ± 9.17					
阳性	138	33.33 ± 9.62	0.035	0.851	-3.920	173	0.000

从表1中可见, TFF3、CD147表达和MVD值随着浅表性胃炎→萎缩性胃炎→不典型增生而逐渐升高, 但胃癌TFF3表达反而低于萎缩性胃炎、不典型增生, 萎缩性胃炎、不典型增生和胃癌间差异不显著, 三组均显著高于浅表性胃炎和正常胃黏膜($P = 0.003$, $P = 0.000$, $P < 0.01$);

胃癌CD147表达和MVD依次高于正常胃黏膜、浅表性胃炎、萎缩性胃炎和不典型增生($P = 0.000$, $P = 0.000$, $P < 0.01$); 浅表性胃炎组CD147表达和MVD明显高于正常胃黏膜($P = 0.015$, $P = 0.001$, $P < 0.05$).

2.3 TFF3、CD147表达和MVD与胃癌临床病理

表 4 胃癌TFF3、CD147共同表达与胃癌浸润转移和MVD的关系 $n(\%)$

TFF3表达	CD147表达	<i>n</i>	MVD(mean ± SD)	T ₃ +T ₄	TNM _{II} +TNM _{IV}	淋巴结转移
+	+	60	36.65 ± 8.94	50(83.3)	43(71.7)	56(93.3)
+	-	13	30.05 ± 10.0	19(69.2)	4(30.8)	11(84.6)
-	+	78	30.76 ± 9.41	64(82.1)	41(52.6)	66(84.6)
-	-	24	24.43 ± 8.23	15(63.5)	6(25.0)	16(66.8)
			$F = 11.324, P = 0.000$	$P = 0.123$	$P = 0.000$	$P = 0.022$

学特征 TFF3、CD147表达和MVD与胃癌淋巴结转移和TNM分期有关($P < 0.05$, 表2), 与性别、年龄无关; TFF3表达与胃癌组织学类型有关($P < 0.05$, 表2), CD147表达与胃癌分化程度有关($P < 0.01$, 表2), CD147表达和MVD与胃癌浸润深度有关($P < 0.05$, 表2)。

2.4 TFF3、CD147表达与MVD的关系 TFF3、CD147阳性表达的MVD高于阴性表达的MVD($P < 0.01$, 表3)。TFF3与MVD的之间关系($r = 0.323, P = 0.000$), CD147表达与MVD的之间关系($r = 0.279, P = 0.000$)。

2.5 TFF3、CD147在胃癌组织中共同表达情况与胃癌浸润转移的关系 在175例胃癌中TFF3与CD147表达的之间不存在明显相关性($r = 0.069, P = 0.364$)。表4中可见, TFF3(+)/CD147(+)者在深度浸润(T₃+T₄)、临床分期(TNM_{III}+TNM_{IV})、淋巴结转移的比率和MVD最高, 且明显高于TFF3(-)/CD147(-)者($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来的大量研究已证实胃癌的发生、发展和预后是多基因改变的结果, 其演变过程包括: 正常胃组织→浅表性胃炎→萎缩性胃炎→不典型增生→胃癌。

TFF3也称肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)为三叶肽家族一员, 是一种新肽, 主要是由杯状细胞分泌的特异分布于肠黏膜表面的多肽物质, 对胃黏膜有保护作用^[3], 在胃肠黏膜发生炎症、溃疡等病变时, 其表达上调, 诱导细胞迁移, 参与黏膜保护及受损黏膜的修复过程。然而, 其在肿瘤中的作用日益受到重视, 通过抑制细胞黏附、促进细胞侵袭、抑制凋亡及新生血管形成等, 在肿瘤中发挥作用。Yamachika *et al*^[4]研究认为TFF3有抑制细胞黏附, 促进癌细胞侵袭, 阻断细胞凋亡的作用。在胃黏膜发生肠化、不典型增生到胃癌的发生过程中表达逐步增高^[5], 研究发现TFF3在胃癌中的表达与性别、

淋巴结转移有关^[4,6]。本研究结果显示, TFF3表达随着浅表性胃炎、萎缩性胃炎、不典型增生而逐渐升高, 胃癌TFF3表达反而低于萎缩性胃炎、不典型增生, 三组之间差异不显著, 却显著高于正常胃组织和浅表性胃炎。提示TFF3高表达参与了胃黏膜肠上皮化生、不典型增生和恶性转化的过程, 其可能是胃黏膜癌变的早期分子事件。本研究显示, TFF3表达与胃癌组织学类型、淋巴结转移和TNM分期有关, 却与性别、分化程度和浸润深度无关, 说明TFF3在胃黏膜癌变和癌变后的恶性演进过程中起重要作用, 可作为胃癌早期发现的一个有用的标志物。

CD147最初被命名为细胞外基质金属蛋白酶刺激物(EMMPRIN), 属于免疫球蛋白超家族(IgSF)的成员之一^[7], 广泛存在于细胞表面的糖蛋白。他是一种新的细胞表面黏附分子, 介导细胞与细胞、细胞与间质的黏附作用^[8]。CD147参与人体的多种生理活动, 如胚胎着床、子宫复旧及伤口愈合^[9]等, 在多种肿瘤细胞和组织中高表达, 通过诱导基质金属蛋白酶(MMP)的分泌促进了肿瘤的浸润、转移^[10-11]。本研究结果显示, CD147表达随着炎症、肠上皮化生、癌变逐渐上调, 正常胃黏膜与浅表性胃炎、不典型增生与胃癌各组之间差异显著, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎和不典型增生三者之间差异不显著。提示CD147可能在胃黏膜炎症和肠化生中扮演了某种角色, CD147在胃黏膜癌变过程中已被激活。关于CD147与胃黏膜防御、修复和肠化等过程的关系及其作用机制, 目前尚无定论, 需进一步研究明确。本研究还发现, CD147表达与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移和TNM分期有关, 说明CD147与胃癌的侵袭、转移有关, 有助于判断胃癌的病理分级。

肿瘤血管新生在恶性肿瘤的生长及转移中起重要作用, MVD是判定血管生成的一个良好指标。实验性肿瘤模型和人类癌前病变血管生成研究发现: 在肿瘤发生的早期即显示血管表

■同行评价

本文采用组织微阵列技术对TFF3和CD147在胃不同病变中的表达进行了分析, 总体试验设计合理规范, 全文书写层次清楚, 逻辑性较好。

型,随着早期癌向浸润癌的进展MVD显著增加,至浸润癌期微血管密度最高、肿瘤体积增大更明显、转移的概率也增多。本研究结果表明MVD在正常的胃黏膜、浅表性胃炎、萎缩性胃炎、不典型增生、胃癌组织均有表达,表达呈依次增高,正常胃黏膜与浅表性胃炎、浅表性胃炎与萎缩性胃炎、不典型增生与胃癌各组之间差异显著,萎缩性胃炎与不典型增生之间差异不显著。提示随着胃黏膜炎症和肠上皮化生的发生,微血管生成也增加,可有利于病变的修复。但微血管密度越高,已癌变细胞进入血循环及淋巴循环的机会越多,淋巴结及邻近脏器转移机率也越大,其预后可能越差。肿瘤在生长过程中确有异常血管形成。这些异常血管的形成,又为肿瘤的生长提供了适合的基础,促进了肿瘤的生长。此理论与本研究结果相符,即在胃癌组织中MVD与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移及TNM分期有关。

肿瘤的发生发展是一复杂的过程:肿瘤细胞的无限增殖、细胞凋亡及新生血管形成等。其过程涉及相关基因的激活、失活、突变等;细胞间的黏附、信号传递、酶解、渗透与移动等;肿瘤细胞进出血管和对靶组织的侵袭等。已研究证明^[6,12-13]TFF3和CD147参与肿瘤血管形成过程。本实验研究发现,TFF3和CD147阳性组中的MVD高于阴性组,TFF3和CD147表达与MVD呈正相关。说明TFF3和CD147极有可能共同参与了肿瘤血管的生成来促进肿瘤的生长及转移。

4 参考文献

- 1 中国抗癌协会. 新编常见恶性肿瘤诊治规范. 第1版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 1-58
- 2 沈洪武, 叶莉, 吴文乔, 邹宗楷. 组织芯片制孔器和受

- 3 体蜡块的制作. 中华病理学杂志 2007; 36: 624
- 4 聂时南, 李兆中, 许国铭, 屠振兴. 三叶肽与胃黏膜保护研究进展. 中华消化杂志 2002; 22: 108-110
- 5 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
- 6 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
- 7 张秋宁, 马力. 三叶因子3在胃癌组织中的表达及与血管形成的关系. 现代肿瘤医学 2005; 13: 42-44
- 8 Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 1995; 55: 434-439
- 9 Suzuki S, Sato M, Senoo H, Ishikawa K. Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP. *Exp Cell Res* 2004; 293: 259-266
- 10 Guo H, Li R, Zucker S, Toole BP. EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface. *Cancer Res* 2000; 60: 888-891
- 11 Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 2001; 61: 2276-2281
- 12 Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 24-27
- 13 Dhar DK, Wang TC, Tabara H, Tonomoto Y, Maruyama R, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N. Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6472-6478
- 14 Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B, Cao J, Toole BP, Zucker S, Birembaut P. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 697-702

编辑 史景红 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail,印刷版。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/submission@wjgnet.com>, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d。来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑:张海宁 2008-11-18)

TGF β 1和CTGF在非酒精性脂肪性肝炎肝组织中的表达及意义

但杰, 高鹏, 申力, 黄海云, 俞泽元

但杰, 俞泽元, 兰州大学临床医学院 甘肃省兰州市 730000
高鹏, 申力, 黄海云, 甘肃省人民医院普外科 甘肃省兰州市 730000

但杰, 兰州大学临床医学院2006级硕士, 医师, 主要从事肝胆外科相关研究。

作者贡献分布: 此课题在高鹏的指导下由但杰设计; 高鹏与黄海云提供了肝组织的取材; 申力给予了技术指导及提供了分析工具; 研究过程由但杰与俞泽元操作完成; 数据分析由但杰, 俞泽元及申力完成; 本论文写作由但杰完成; 高鹏对文章进行批评性审阅。

通讯作者: 高鹏, 730000, 甘肃省兰州市, 甘肃省人民医院普外科. gaopeng12@yahoo.com.cn

电话: 0931-8281965

收稿日期: 2008-08-26 修回日期: 2008-10-16

接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-18

Expression and its significance of connective tissue growth factor and transforming growth factor β 1 in hepatic tissues of non-alcoholic steatohepatitis

Jie Dan, Peng Gao, Li Shen, Hai-Yun Huang, Ze-Yuan Yu

Jie Dan, Ze-Yuan Yu, Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Peng Gao, Li Shen, Hai-Yun Huang, Department of General Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Peng Gao, Department of Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. gaopeng12@yahoo.com.cn

Received: 2008-08-26 Revised: 2008-10-16

Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in non-alcoholic steatohepatitis hepatic tissue and to explore correlation between them during hepatic fibrosis.

METHODS: HE staining, RT-PCR and immunohistochemistry methods were used to measure TGF β 1 and CTGF mRNA expression levels in liver tissue of 21 patients with non-alcoholic steatohepatitis and 10 normal controls meanwhile hepatic histopathological changes were evaluated.

RESULTS: The optical microscopic analysis indicated that liver inflammation and fibrosis were apparently present in non-alcoholic steatohepatitis group (NASH group). And immunohistochemistry analysis revealed that the expressions of TGF β 1 and CTGF in hepatic tissue were significantly higher in NASH group than in normal control group (109.52 ± 4.50 vs 114.47 ± 2.00 , 117.07 ± 3.60 vs 125.05 ± 3.37 , both $P < 0.01$). TGF β 1 mRNA and CTGF mRNA expression were enhanced significantly in NASH group, compared with the control group (0.66 ± 0.07 vs 0.46 ± 0.04 , 0.59 ± 0.08 vs 0.41 ± 0.05 , both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The enhanced expressions of TGF β 1 and CTGF in hepatic liver tissue of non-alcoholic steatohepatitis patients might be involved in fatty fibrosis. CTGF plays an important role in diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease.

Key Words: Non-alcoholic steatohepatitis; Hepatic fibrosis; Transforming growth factor β 1; Connective tissue growth factor

Dan J, Gao P, Shen L, Huang HY, Yu ZY. Expression and its significance of connective tissue growth factor and transforming growth factor β 1 in hepatic tissues of non-alcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3637-3641

摘要

目的: 探讨非酒精性脂肪性肝炎(NASH)患者肝脏转化生长因子 β 1(TGF β 1)和结缔组织生长因子(CTGF)的表达及二者在脂肪性纤维化发展过程中的相关性。

方法: 采用HE染色, 光镜下观察21例非酒精性脂肪性肝炎组(NASH组)肝组织和10例正常肝组织组标本肝组织的病理改变; RT-PCR及免疫组织化学技术分别检测以上两组标本中TGF β 1和CTGF的表达情况。

结果: 光镜下非酒精性脂肪性肝炎组出现明显炎症反应和纤维化。免疫组化结果显示非

■背景资料

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的发病与脂质代谢、胰岛素抵抗、氧化反应等因素密切相关。部分NASH患者最终可发展成为肝纤维化或肝硬化。随着对其发病机制的深入研究, 人们渴望能在分子水平上找到阻断NASH进一步发展的方法。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■ 研究前沿

脂肪肝发展为肝纤维化的发病机制尚未完全搞清,各条途径的多种细胞因子扮演的角色都是研究的热点,但目前还未找到合适细胞因子能安全高效的运用临床实际中。

酒精性脂肪性肝炎组肝脏TGF β 1和CTGF的表达显著高于正常肝脏组(109.52 ± 4.50 vs 114.47 ± 2.00 , 117.07 ± 3.60 vs 125.05 ± 3.37 , 均 $P < 0.01$)。NASH组TGF β 1和CTGF mRNA的表达水平升高明显,与对照组比较差异有统计学意义(0.66 ± 0.07 vs 0.46 ± 0.04 , 0.59 ± 0.08 vs 0.41 ± 0.05 , 均 $P < 0.05$)。

结论: TGF β 1和CTGF在非酒精性脂肪性肝炎中的表达升高可能参与了脂肪性肝炎向肝纤维化转变, CTGF可能在诊断和治疗非酒精性脂肪性肝炎中扮演重要的作用。

关键词: 非酒精性脂肪性肝炎; 肝纤维化; 转化生长因子 β 1; 结缔组织生长因子

但杰, 高鹏, 申力, 黄海云, 俞泽元. TGF β 1和CTGF在非酒精性脂肪性肝炎肝组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3637-3641

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3637.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是无过度饮酒史,与脂质及糖代谢紊乱有关的肝脏疾病。有报道证实12%-25%的NASH患者可发展为肝纤维化或肝硬化。而转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)是目前已知最强的促肝纤维化的细胞因子及纤维化形成过程中重要的始动刺激因子之一^[1]。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)作为TGF β 1的下游效应递质,介导了TGF β 1的促细胞外基质(ECM)积聚效应^[2],由于ECM合成和降解的失衡最终导致纤维化的发生。本文通过检测NASH肝组织和正常肝脏组织中TGF β 1和CTGF的表达情况来对其在NASH向肝纤维化发生、发展的关系进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 研究对象均来自2007-07/2008-04在甘肃省人民医院普外科术前检查时发现符合非酒精性脂肪肝诊断标准^[3],经患者本人同意并签字,并经医学伦理委员会同意,行腹部手术时取得的标本21例,其中男19例,女12例,年龄29-60(平均 42 ± 10)岁。因外伤或良性肝肿瘤手术切除的正常肝组织10例。其中男6例,女4例,年龄27-57(平均 38 ± 9)岁。标本取得后迅速冰冻于-80℃的超低温冰箱中保存。主要试剂: TGF β 1多抗(美国Santa Cruz产品)、CTGF多抗(北京博奥

森生物技术有限公司)、逆转录试剂及PCR引物(上海生工生物工程技术有限公司)、PCR试剂(四川天泽基因工程有限公司),其他PCR试剂为Promega产品。

1.2 方法

1.2.1 病理组织学检查: 常规HE染色,光镜下观察病理学变化。脂肪肝病理组织学诊断参考中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学会“非酒精性脂肪肝诊断标准”^[3]。根据肝小叶内脂肪变的肝细胞数将脂肪肝程度量化: 0分(肝细胞内无脂滴沉积); 1分(肝小叶内<30%的肝细胞有脂肪变); 2分(肝小叶内30%-50%的肝细胞有脂肪变); 3分(50%-75%的肝细胞有脂肪变); 4分(75%以上的肝细胞有脂肪变)。另外对肝组织炎症活动度和纤维化程度进行评分^[4]。

1.2.2 免疫组化染色: 采用SP法,染色、操作按试剂盒说明书进行。阴性对照用0.01 mmol/L的PBS代替一抗,分别用试剂盒指定标本作阳性对照。免疫组织化学结果判定标准: 用全自动医学图像彩色分析系统进行图像半定量分析,测定肝组织中棕黄色阳性表达颗粒的灰度值,该值越低表达越强。

1.2.3 RT-PCR检测TGF β 1与CTGF mRNA表达: (1)总RNA提取: 从-80℃冰箱中取出300 mg肝组织,加入TRIzol 1 mL,并转移到匀浆器中,将匀浆器置冰水上研磨,转移研磨好的液体到无RNA酶和无DNA酶的1.5 mL离心管中。然后加入0.2 mL氯仿,温和震荡后,4℃低温离心12 000 r/min; 吸取上层水相溶液并转移至另一新鲜的1.5 mL离心管,加入等体积异丙醇(0.5 mL)颠倒混匀后室温静置15 min,再次4℃低温离心12 000 r/min, 10 min,弃上清,然后加入700 mL/L乙醇1 mL洗涤并干燥,最后用DEPC处理水溶解RNA。提取的总RNA经紫外分光光度计测定提取物的浓度,各样本 $A_{260/280}$ 比值在1.8-2.0之间。(2)合成相关引物: 从相关资料获得所需引物^[5-7],并从基因库(GenBank)中进行核对,引物序列如下: TGF β 1: 5'-CAGAAATACAGCAACAATTCCTGG-3'(sense); 5'-CAGTGTGTTATCCCTGCTGTC-3'(antisense); CTGF: 5'-CGACTGGAAGACACGTTTGG-3'(sense); 5'-AGGCTTGAGATTTTGGGAG-3'(antisense); GAPDH: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'(sense); 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'(antisense)。(3)反转录反应: 取上面组织提取的总RNA约2 μ g在下述反应体系中反转录成cDNA,反应体系如

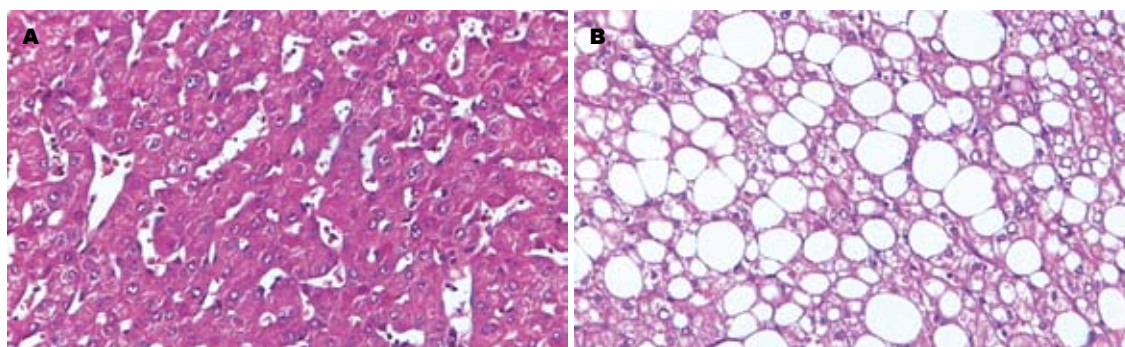


图1 肝组织病理学观(HE × 100). A: 正常肝; B: 脂肪肝.

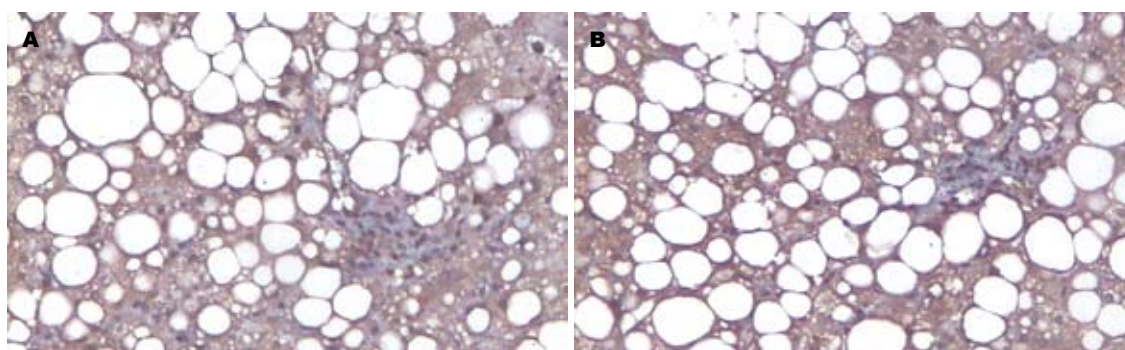


图2 NASH肝组织中CTGF和TGFβ1的表达(免疫组化 × 100). A: CTGF; B: TGFβ1.

■应用要点

在正常状态下CTGF表达低, 作用范围较TGFβ1窄, 多只作用于结缔组织. 如果阻断CTGF的表达将会有效的阻断脂肪肝的发展进程而不会出现阻断TGFβ1所带来的严重后果.

表1 两组肝组织脂肪变性程度、炎症及肝纤维化程度比较 (mean ± SD)

分组	n	脂肪变性程度积分	炎症积分	纤维化积分
NASH组	21	2.43 ± 0.98 ^b	2.71 ± 0.72 ^b	1.20 ± 0.37 ^b
正常组	10	0	1.20 ± 0.42	0

^bP<0.01 vs 正常组.

下: 2.5 μmol/L oligd(t) 1 μL, 双蒸水9.5 μL 70℃预变性5 min后加入5×RT-Buffer 4 μL, 5 mmol/L dNTPs 2 μL, 20 U/μL RNAasin 1 μL, 然后加入M-MLV反转录酶200 U, 再42℃孵育1 h, 72℃加热10 min灭活反转录酶. (4)PCR扩增: 模板3 μL引物1 μL、双蒸水11 μL、绵阳天泽基因工程有限公司即用型PCR Magicmi×2.0 15 μL, 按说明书条件扩增. TGFβ1: 94℃变性1 min, 60℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共30个循环反应; CTGF: 95℃变性30 s, 58℃退火20 s, 72℃延伸30 s, 共40个循环反应. (5)PCR反应产物10 μL在琼脂糖凝胶上电泳30 min(120 V), 图像分析仪采集图像, 以内参GAPDH为基准, 作半定量分析, 即以扩增目的片段/GAPDH的光密度比值代表所扩增目的基因片段的相对表达水平, 值越大表示TGFβ和CTGF表达水平越高.

统计学处理 数据用mean±SD表示, 两均数

比较采用t检验. 所有统计采用SPSS10.0软件进行. P<0.05表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肝组织病理学观察 NASH组肝组织学观察显示 肝腺泡3区呈以大泡为主, 大小泡混合性脂肪变性、窦周纤维化、脂肪变性、周围肝细胞胞质疏松、气球样变性; 窦壁细胞增生较活跃, 窦腔内炎细胞浸润以单个核细胞为主, 随肝小叶内炎症程度的加重而重; 肝小叶内可见大核、双核肝细胞, 汇管区周围可见空泡核肝细胞, 凋亡小体偶见; 汇管区无明显炎细胞浸润及纤维化, 部分病例见纤维间隔及轻度界面炎(图1). NASH组在脂肪变性程度积分、炎症积分、纤维化积分与正常组相比都有显著差异(P<0.01, 表1).

2.2 细胞因子在NASH肝组织的表达 NASH肝组织TGF-β1染色阳性物质呈棕黄色, 在肝腺泡3带脂肪变性肝细胞附近、病变肝组织的炎症区、中央静脉周围、纤维化较明显的门管区及肝窦周Disse间隙的细胞外基质(ECM)沉积处及纤维间隔, 均可见明显的TGF-β1阳性染色. 肝组织内CTGF主要表达于汇管区和纤维间隔周围以及肝非实质细胞中, 偶见胆管上皮细胞呈阳性反应, 炎症明显的区域肝细胞胞质可见阳性染色(图2).

■同行评价

本文用免疫组化和RT-PCR分别在蛋白和mRNA水平研究21例非酒精性肝炎穿刺肝组织中TGF- β 1和CTGF表达的变化,有一定参考价值。

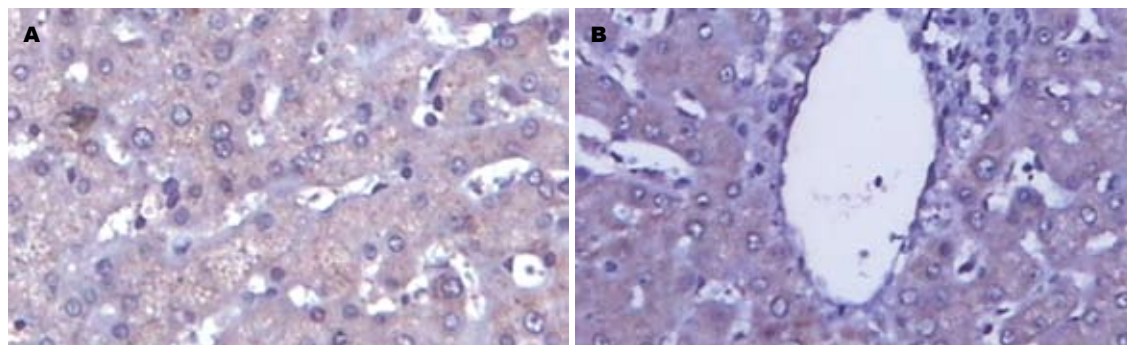


图3 正常肝组织中CTGF和TGF β 1的表达(免疫组化 $\times 100$). A: TGF β 1; B: CTGF;

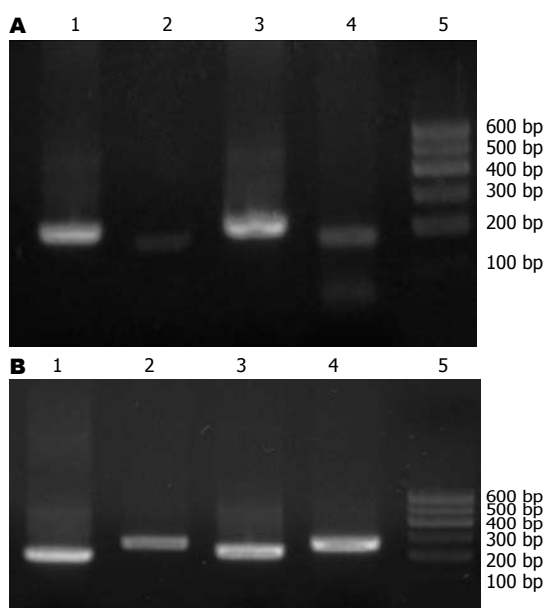


图4 肝脏组织中CTGF mRNA和TGF β 1 mRNA的表达. A: TGF β 1 mRNA; B: CTGF mRNA. 1, 3: GAPDH; 2: 正常组; 4: NASH组; 5: Marker.

正常肝组织内无或仅有极少量表达(图3). 统计学分析表明, 两组间TGF β 1及CTGF表达差异有统计学意义($P < 0.01$, 表2).

2.3 肝组织中TGF β 1和CTGF mRNA的表达
TGF β 1和CTGF的RT-PCR产物电泳结果示扩增片段分别为186 bp和250 bp, 与预期设计的目的片段相同, 正常组肝组织TGF β 1和CTGF mRNA的表达量较低(图4); NASH组TGF β 1和CTGF mRNA的表达水平升高明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表3).

3 讨论

NASH是非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)中的一种类型, 也是NAFLD出现重要病理损害, 启动向NASH相关性肝硬化进展的关键环节, 随着生活方式的改变, NASH在人群中的发病率也已经达到

表2 两组肝脏组织中CTGF和TGF β 1免疫组化灰度值比较 (mean \pm SD)

分组	n	CTGF	TGF β 1
NASH组	21	117.07 \pm 3.60 ^b	109.52 \pm 4.50 ^b
正常组	10	125.05 \pm 3.37	114.47 \pm 2.00

^b $P < 0.01$ vs 正常组.

表3 两组肝脏组织中CTGF和TGF β 1 mRNA表达 (mean \pm SD)

分组	n	CTGF mRNA	TGF β 1 mRNA
NASH组	21	0.59 \pm 0.08 ^a	0.66 \pm 0.07 ^a
正常组	10	0.41 \pm 0.05	0.46 \pm 0.04

^a $P < 0.05$ vs 正常组.

2%-3%^[8]. 但其发病机制至今尚未完全明确, 目前认为与脂质代谢异常、氧应激及脂质过氧化反应等因素密切相关.

肝纤维化是以胶原为主的细胞外基质(ECM)合成增多, 而降解相对减少, 两者失去动态平衡而引起, 故过多ECM沉积于肝内时而引起, 是各种慢性肝病向肝硬化发展所共有的病理改变和必经途径. 而TGF β 1是调控肝纤维化发生、发展的核心物质^[9].

TGF β 1是一组具有多种生物学功能的蛋白多肽, 对细胞的生长、分化和多种生理、病理过程起重要的调节作用. 他参与细胞周期的调控, 血管及胚胎的形成, 诱导细胞凋亡以及免疫调节等过程. 肝脏中多种细胞均可产生TGF β 1^[10]. CTGF是最近分离出的一种生长因子, 具有与血小板衍生生长因子类似的生物学活性, 如促进趋化和有丝分裂, 其在许多组织器官纤维化时表达明显增高^[11-13]. 实验研究认为, 星状细胞(HSC)是其主要来源, 而CTGF表达上调, 也是星状细胞活化的中心通道. 体外研究表

明, TGF β 1可以特异性地诱导成纤维细胞产生CTGF, 并由后者作为下游效应介质作用于结缔组织, 刺激成纤维细胞增生和细胞外基质合成; 用反义技术抑制CTGF表达能明显降低TGF β 1诱导的细胞外基质的合成, 提示CTGF在TGF β 1导致的肝纤维化中起关键作用。

本研究应用免疫组化方法, 对NASH中TGF β 1的表达进行研究, 结果显示TGF β 1在NASH肝组织中的表达与炎症分级及纤维化程度明显相关, 随着肝脏炎症活动度及纤维化程度的加重而表达增强。在肝窦壁及其周围, 可见较多带分支突起的梭形细胞内有阳性表达, 提示肝窦内皮细胞、星状细胞、枯否氏细胞是产生TGF β 1的主要细胞。随着病变分级、分期上升, 其阳性部位主要是纤维间隔、炎症坏死区等纤维化发生的前沿部位, 偶见邻近肝细胞TGF β 1表达。这种表达情况与慢性肝病由炎症发展为纤维化的进程相吻合, 即肝细胞损伤后炎症细胞浸润, 浸润细胞分泌TGF β 1等细胞因子介导损伤部位修复, 导致纤维组织和纤维间隔形成, 证明TGF β 1有明显促肝脏纤维化形成的作用。

我们经免疫组化检测发现, CTGF在纤维化0期仅见于汇管区少量梭状间质细胞内, 表达水平很低, 随肝纤维化程度的增加, 表达的部位和范围呈增加趋势。与TGF β 1的表达分布部位比较接近, 均以汇管区及纤维间隔等纤维形成的区域最明显。说明CTGF确实同TGF β 1一样, 参与了肝纤维化的形成过程。

同时我们用RT-PCR方法检测了NASH组肝组织中TGF β 1和CTGF基因表达水平, 发现其表达较正常组显著增高。且随纤维化程度加重, 与病理学分级呈正相关关系, 表明TGF β 1和CTGF表达与肝纤维化形成、发展密切相关。

目前普遍认为TGF β 1是导致组织纤维化形成的最重要的细胞因子之一, 但其作用广泛、效应复杂, 正面效应的存在限制了抗TGF β 1抗体的应用, 单纯抑制其活性可能引起许多难以预料的副作用^[14]例如去除TGF β 1基因的小鼠因失去对炎症过程的抑制, 而在出生后很快死于全身性炎症^[15]。在正常状态下CTGF表达水平很低, 而且主要在间质细胞中表达, 其作用亦限于结缔组织, 是一个更具特异性的靶位。本实验证明非酒精性脂肪性肝炎中的二者的表达和正常组比较有显著差异, 而且CTGF随TGF β 1的升高而升高, 故推测CTGF在非酒精性脂肪性肝炎早期

检测及在阻断向纤维化的进一步发展方面具有重要的作用。

4 参考文献

- 1 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 2 陆翠华, 华国平, 王华, 顾美珍, 倪润洲, 黄介飞. 结缔组织生长因子与转化生长因子 β 1在肝纤维化组织中的表达. *南通大学学报(医学版)* 2006; 26: 91-93
- 3 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断标准. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 71
- 4 王泰龄, 刘霞, 周元平, 何静雯, 张晶, 李宁章, 段钟平, 王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及肝纤维化程度计分方案. *中华肝脏病杂志* 1998; 6: 195-197
- 5 Deng YZ, Chen PP, Wang Y, Yin D, Koeffler HP, Li B, Tong XJ, Xie D. Connective tissue growth factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenicity through beta-catenin-T-cell factor/Lef signaling. *J Biol Chem* 2007; 282: 36571-36581
- 6 Higashi T, Sasagawa T, Inoue M, Oka R, Shuangying L, Saijoh K. Overexpression of latent transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) binding protein 1 (LTBP-1) in association with TGF-beta 1 in ovarian carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 506-515
- 7 龚洵, 王少帅, 刘海意, 乔福元, 吴媛媛. Caspase-3 mRNA在子痫前期患者胎盘中的表达及其意义. *中国优生与遗传杂志* 2008; 16: 20-21
- 8 Yu AS, Keeffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2002; 2: 11-19
- 9 Roberts AB, Piek E, Bottinger EP, Ashcroft G, Mitchell JB, Flanders KC. Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* 2001; 120: 43S-47S
- 10 Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316: 701-705
- 11 Kasaragod AB, Lucia MS, Cabirac G, Grotendorst GR, Stenmark KR. Connective tissue growth factor expression in pediatric myofibroblastic tumors. *Pediatr Dev Pathol* 2001; 4: 37-45
- 12 Ito Y, Goldschmeding R, Bende R, Claessen N, Chand M, Kleij L, Rabelink T, Weening J, Aten J. Kinetics of connective tissue growth factor expression during experimental proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 472-484
- 13 Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, Hoyle GW, Corti M, Athas G, Lungarella G, Brody A, Friedman M. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol* 1998; 275: L365-L371
- 14 赵丽娟, 李红, 杨世杰. 黄芪注射液对D-半乳糖胺所致小鼠急性肝损伤的保护作用. *吉林大学学报(医学版)* 2003; 29: 280-282
- 15 Letterio JJ, Bottinger EP. TGF-beta knockout and dominant-negative receptor transgenic mice. *Miner Electrolyte Metab* 1998; 24: 161-167

编辑 李军亮 电编 郭海丽

染色体结构变异在胃癌发生发展中的作用

吴建林, 于颖彦

■背景资料

染色体结构变异主要包括染色体某些部位的缺失、重复、倒位和易位。其中研究最多的是缺失和重复。染色体特定部位的缺失和重复会导致定位于该部位的基因表达降低和增强, 这是导致肿瘤发生的重要机制之一。

吴建林, 于颖彦, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 上海消化外科研究所 上海市 200025
国家科技部“十一五”“863”重大专项资助项目, No. 2006AA02A402, No. 2006AA02A301
国家自然科学基金资助项目, No. 30572127, No. 30770961
上海市浦江人才计划资助项目, No. PJ200700367
上海市科委重点基础研究资助项目, No. 05JC14013
作者贡献分布: 吴建林论文撰写; 于颖彦论文审核。
通讯作者: 于颖彦, 200025, 上海市, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科. yingyan3y@yahoo.com.cn
电话: 021-64370045 传真: 021-64373909
收稿日期: 2008-09-15 修回日期: 2008-10-20
接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-18

Role of chromosome structure variation in carcinogenesis and progression of gastric cancer

Jian-Lin Wu, Ying-Yan Yu

Jian-Lin Wu, Ying-Yan Yu, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to School of Medicine of Shanghai Jiaotong University; Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China

Supported by: the Chinese National High-Tech Program, No. 863-2006AA02A402, No. 863-2006AA02A301; National Natural Science Foundation of China, No. 30572127, No. 30770961; the Key Basic Research Foundation from Shanghai Commission of Science and Technology, No. 05JC14013; and the Pujiang Talent Project of Shanghai Municipality, No. PJ200700367

Correspondence to: Ying-Yan Yu, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to School of Medicine of Shanghai Jiaotong University; Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China. yingyan3y@yahoo.com.cn
Received: 2008-09-15 Revised: 2008-10-20
Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-18

Abstract

The carcinogenesis of gastric cancer is a multifactor process with many steps, of which, both the losing activity of tumor suppressor genes resulting from the abnormal structure of the chromosomes, and the activation of the oncogenes play important roles in these process. Therefore, identification of the tumor suppressor gene and oncogene through researching on the structural chromosomal abnormality has become an important means for the research of gastric cancer and oncology. This paper reviews the researches on current progresses on structural

chromosomal abnormality in gastric cancer, especially on the aspect of methodology, and explained the application of various molecular genetics and molecular biology means used in structural chromosomal abnormality research. This paper aimed at providing references for the choice of researching methods for the readers.

Key Words: Gastric cancer; Chromosome; Structural variation; Molecular genetics

Wu JL, Yu YY. Role of chromosome structure variation in carcinogenesis and progression of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3642-3647

摘要

胃癌的发生是一个多因素多步骤过程, 其中染色体结构异常而导致的抑癌基因的失活和癌基因的激活在这个过程中起了重要作用。因此, 通过对染色体结构变异的研究寻找肿瘤相关的抑癌基因或癌基因成为胃癌及肿瘤学研究中的重要手段。本文将综述目前胃癌染色体结构异常研究进展, 并从方法学上阐述几种分子遗传学及分子生物学常用手段在研究胃癌染色体结构变异中的作用, 旨在为读者的实验研究提供有价值的参考。

关键词: 胃癌; 染色体; 结构变异; 分子遗传学

吴建林, 于颖彦. 染色体结构变异在胃癌发生发展中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(32): 3642-3647

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3642.asp>

0 引言

胃癌是消化系常见的恶性肿瘤, 日本、韩国及我国均属于胃癌高发国家。胃癌的发生发展机制涉及多因素、多步骤, 其中染色体结构变异在胃癌的发生和演变过程中担当重要角色。深入开展对胃癌染色体结构变异的研究, 不但有助于阐明胃癌发生发展的分子机制, 还将为胃癌的分子分型、分子分期以及与胃癌生物学性状关系研究提供有价值的参考。对胃癌染色体的研究, 除了传统的染色体核型分析技术外, 近

■同行评议者

熊斌, 教授, 武汉大学中南医院肿瘤科; 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

年来还发展了多种分子遗传学与分子生物学新技术.

1 染色体结构变异概念

Boveri早在1914年就提出染色质含量不平衡是癌变过程中最原始的变化, 该观点虽然是基于当时科学技术发展水平的粗浅提法, 但之后的科学发展证实, 染色体畸变在肿瘤发生发展过程中确实起了很重要的作用. 染色体畸变可分为染色体数目改变和染色体结构变异两大类. 染色体数目改变包括整个染色体组成倍的增加, 成对染色体数目的增减, 单个染色体某个节段的增减. 而染色体结构变异是指染色体发生断裂, 并以异常的组合方式重新连接. 主要形式有片段缺失、重复、倒位和易位. 其中染色体结构变异是染色体畸变的主要形式. 近10年来, 有关胃癌染色体结构变异的报道逐渐增多, 且已发现了不少有价值的染色体扩增与缺失区域.

2 胃癌染色体结构变异研究中的方法学

2.1 传统的细胞遗传学方法 该方法首先需要制备良好的中期染色体涂片, 该方法以往主要用于造血系统肿瘤的诊断、判断预后和治疗效果评价^[1], 其在实体瘤研究中有一定局限性^[2], 原因可能是实体瘤在组织细胞培养、染色体涂片制备等方面均较血液系统肿瘤困难有关. 此外, 实体瘤常常存在继发性染色体变化, 分析起来也有一定难度. 由于实体瘤是一个包含多种细胞成分的多细胞混合体, 即使在肿瘤标本核型分析中见到正常核分裂相, 也很难确定这些正常的核型是否来源于肿瘤细胞^[3]. 张建华 *et al*曾利用制备实体瘤染色体涂片G显带方法对10例原代胃癌细胞进行了研究, 发现其中2例具有染色体数目变化, 另外8例具有染色体结构变化, 最常见的结构异常为7q-, 3p-和1p-^[4]. 虽然染色体G显带技术能从全基因组层面分析染色体变异, 但此技术主要适用于核型分析, 很难鉴别较为复杂的染色体结构变异.

2.2 荧光原位杂交技术 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)创建于1986年, 是利用荧光标记的DNA探针与肿瘤间期细胞核或中期染色体涂片进行原位杂交. 该方法具有探针性能稳定、便于开展、能够平行开展不同探针的多色检测等优点. 根据所使用的探针类型不同, 可以将FISH技术分为着丝粒FISH、端粒FISH、染色体涂染FISH、区带特异性FISH以及结合显微切割技术发展起来的反义涂染

FISH等. 其中着丝粒FISH适用于分析分裂中期细胞核染色体数目的变化; 端粒FISH适用于确定特定染色体数目和末端变化; 涂染FISH适用于识别整条染色体或部分染色体(染色体臂或条带)的变化; 区带特异性FISH适用于检测特定位点的染色体变化. 近十多年来, 荧光原位杂交技术发展较快, 在此基础上又衍生出一些新技术, 如多色荧光原位杂交、组合比率荧光原位杂交、着丝粒多元荧光原位杂交及交叉物种彩色显带等. 其中多色荧光原位杂交主要是利用不同颜色的荧光素标记不同的探针, 同时对一张染色体涂片进行杂交, 达到对不同的靶DNA片段同时定位目的^[5]. 目前, FISH技术已广泛应用于肿瘤生物学、基因定位、基因扩增或基因丢失等研究^[6-9]. 最近, Bernasconi *et al*曾利用FISH技术研究了203例胃黏膜相关淋巴瘤的染色体变异, 发现1, 3, 12, 18号染色体三倍体出现的频率较高, 并且首次发现了高频率的X染色体数目增加现象^[10].

2.3 比较基因组杂交技术 FISH虽然具有诸多优点, 但是在实际研究中很多组织标本很难获得高质量的染色体涂片, 这就大大限制了其应用的范围. 由Kallioniemi *et al*^[11]于1992年创建的比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)则突破了FISH技术的局限性. 研究者只需抽提肿瘤组织和正常组织少量的基因组DNA, 分别用不同荧光染料进行标记后与正常人中期染色体涂片进行杂交即可全面迅速地获得全基因组DNA的拷贝数变化的信息. 因此, 既可用于新鲜组织研究, 也可以用于石蜡包埋组织标本内的DNA分析, 特别适合实体瘤或淋巴瘤等不易获得高质量染色体涂片标本的基因组变异检测. 近年来, 有多个国家的不同研究者运用CGH技术检测过数百例原发胃癌标本的基因组变异, 揭示出胃癌中的DNA序列拷贝数异常^[12-15]. 较为常见的缺失区有4q、13p、5q、9p、17p和19p等; 常见的扩增区有3q、7q、8q、13q和20q. 而这些非随机的染色体增加或缺失区内可能存在胃癌相关癌基因或肿瘤抑制基因, 如c-Myc定位于8q24.1, TP53定位于17p13.1, AIB1定位于20q12. 由此可见, CGH方法可用于发现胃癌候选癌基因和肿瘤抑制基因.

2.4 微阵列CGH技术 微阵列CGH(array CGH)技术是基于微阵列的比较基因组杂交技术. 其主要原理是通过在一张芯片上用标记不同荧光素的样本(肿瘤样本和正常样本)同时进行杂交, 可

■研发前沿

近年来各种高通量检测染色体结构变异的分子生物学方法不断涌现并被广泛应用, 已经发现许多重要染色体结构变异的部位, 并提出多个潜在的癌基因和抑癌基因. 对染色体结构变异的研究有望成为肿瘤研究中的重要手段.

■相关报道

近几年已有不少胃癌染色体结构变异的研究报道,发现不同的染色体结构变异与肿瘤的分期、分型、淋巴结和血液转移等存在一定相关性。

以检测样本基因组和对照样本基因组间DNA拷贝数变化(CNV)。该技术常用于肿瘤或遗传性疾病全基因组CNV检测^[16]。由于传统的CGH技术分辨率较低,无法检测小于2 Mb的扩增和缺失,因此,难以确定扩增或缺失的基因。另外,CGH并不能检测出没有基因组拷贝数明显变化的染色体平衡易位、倒位及全基因组的整倍体改变。而array CGH技术则将杂交靶点用DNA克隆代替CGH中的中期染色体,这就大大改善了传统CGH分辨率低的问题,兼备了芯片和CGH的双重优点,近年来在肿瘤的研究中得到了广泛的应用^[17-21]。Buffart *et al*应用array CGH分析了22例胃癌,发现9, 11q, 20号染色体的获得发生频率分别达到29%, 29%和33%,而13q, 6, 5, 10号染色体的缺失频率分别达到48%, 48%, 43%和33%^[22]。

2.5 单核苷酸多态性芯片分析 CGH作为一种高效高通量的方法,已经成为研究者研究基因组DNA拷贝数变化的主要手段。array CGH的发展则改善了CGH分辨率不高的问题。而单核苷酸多态性(SNP)芯片技术则是近年来出现的一种可用于检测DNA拷贝数变化的更高分辨率的DNA生物芯片技术。美国昂飞(Affymetrix)公司推出的人类基因组图谱SNP芯片500K和SNP 5.0芯片的标记间距离中位数为2.5 kb,而最近推出的SNP 6.0的中位数则少于700个碱基对。这类高分辨率DNA生物芯片的出现使研究者在更高精确度水平上对全基因组DNA拷贝数变化进行检测成为可能。目前尚未见该技术在胃癌的应用报道,但是在其他肿瘤的研究方面报道逐渐增多^[23-27],展现出良好的应用前景。

2.6 多重连接依赖的探针扩增技术 多重连接依赖的探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)是由荷兰学者Schouten *et al*^[28]于2002年建立。他是利用简单的杂交、连接、PCR扩增反应,于单一反应管内同时检测最多40个不同的核苷酸序列的拷贝数变化。MLPA方法原理是针对不同检测序列设计多组专一的探针组,然后对探针组进行扩增。每组探针组长度不同,可与目标序列杂交黏合。所有探针的5'端都有通用引物结合区PBS(primer binding sites),3'端都有与待扩增目标序列结合区,在PBS区与目标序列结合区之间插入不同长度的寡核苷酸,由此形成长度不一的探针组。如果目标序列缺失、突变,则这组探针无法成功连接,也没有相应的扩增反应。如果某组探针可

与目标序列完全黏合,则连接酶会将这组探针连接成为一个片段,并通过标记的通用引物对此连接在一起的探针组进行扩增。最终经过毛细管电泳和激光诱导的荧光标志物来检测扩增产物。MLPA属于一种高通量DNA拷贝数检测技术。在欧洲,已有多家遗传医学中心及实验室利用此技术协助进行基因序列的检测。近年来应用该技术进行CNV检测的报道也越来越多^[29-33]。

2.7 染色体杂合性缺失分析 如前所述,CGH技术适合检测大于2 Mb的染色体片段缺失,主要适用于基因组变异的初步筛查研究^[34-35]。染色体杂合性缺失(LOH)分析是一种可以发现更小范围染色体缺失的研究手段,通过在染色体上密集设定一系列的微卫星探针,可将染色体杂合性缺失范围锁定至几百bp之内,是肿瘤研究中发现抑癌基因的重要方法。聚丙烯酰胺凝胶电泳-银染法是LOH研究中的主要方法,在凝胶上某位点的基因型表现为两个大小不同片段时定义为杂合子,为有信息病例;若某位点的基因型表现为单个片段时定义为纯合子,为无信息病例。肿瘤的某一等位基因条带与正常相比,出现消失或相应密度减少50%以上,定义为LOH。LOH检测所用试剂都是常规试剂,对实验室条件要求低,有利于开展。但LOH检测存在费时、费力、通量较低且操作复杂等不足^[36],不适合做大样本研究。变性高效液相色谱(DHPLC)也是LOH分析中常用的一种方法^[37-39]。众多研究者通过对比认为,DHPLC的灵敏度和特异性较传统方法相比更好^[40-43]。DHPLC的结果以峰值形式显示,更加直观且便于分析。国内外已有不少利用LOH方法探索胃癌相关抑癌基因的报道,发现了一些候选抑癌基因。Yu *et al*用此方法对胃癌标本分析发现,5号染色体5p15.3位点存在较高频率杂合性缺失,提出该位点潜伏的IRX1基因可能为胃癌相关抑癌基因^[40-41]。李锦添 *et al*^[42]用分布于人类7q上的9对微卫星引物对70例胃癌患者7q精细作图,引物间的平均距离精确到了10 cm,发现70例胃癌患者7q的缺失频率达到34.3%,其中以D7S486和D7S798缺失率最高,其中发现D7S486的缺失率和患者淋巴结转移相关,提出该位点附近应潜在有抑癌基因。

3 已发现的胃癌染色体结构变异及其潜在意义

近几年已有不少胃癌染色体结构变异的研究报道,有些学者还对染色体结构变异与胃癌的生物学特性之间的关系做了相关分析,发现不同

的染色体结构变异与肿瘤的分期、分型、淋巴结和血液转移等存在一定相关性。Kang *et al*^[43]应用array CGH对28例胃癌组织进行了研究,发现1p, 5p, 7q, 8q, 11p, 16p, 20p, 20q拷贝数增加频率较高,而2q, 4q, 5q, 9p, 14q, 18q则存在高频率的缺失,进一步的统计发现9q23, 14q31.1的杂合性缺失与淋巴结转移相关,而20q12的扩增及4q23, 9q23, 14q31.1, 18q21的缺失与胃癌的TNM分期存在相关性; Kimura *et al*^[44]应用CGH技术对更大样本量的102例胃癌进行了研究,发现20q, 8q, 20p, 7q, 17q, 5p, 13q存在较高频率的拷贝数增加, 19p, 18q, 5q, 21q, 4p, 4q, 15q, 17p杂合性缺失的频率很高,并指出这些部位扩增和缺失很有可能导致了位于该部位的重要基因的过表达或失活;中国学者Yu *et al*^[40]通过对80例胃癌5号染色体进行精细作图,发现肠型胃癌的缺失频率明显高于弥漫型胃癌,并首次提出IRX1, IRX2, CEI可能为潜在的抑癌基因;此外,中外多个中心的学者应用不同分子生物学技术对胃癌染色体结构变异进行了类似研究,发现胃癌染色体不同部位的扩增和缺失与胃癌的浸润深度、肿瘤微血管的浸润、TNM分期等均存在不同程度的相关性,提示这些部位可能潜伏与胃癌特定生物学性状相关的基因^[45-47]。

4 结论

在对胃癌染色体的研究中,已经认识到一些复杂的结构变异。从细胞遗传学角度来说,高频率丢失的部位很可能存在与胃癌密切相关的抑癌基因,而高频率的扩增则提示该部位存在相关癌基因,而染色体结构变异所导致的抑癌基因的失活和癌基因的过表达很可能对胃癌的发生具有启动作用。从胃癌染色体研究的方法学来看,传统的显带技术, FISH等均可以在单细胞水平上对染色体畸变进行直观地分析,但是由于实体瘤体外培养难度较高,这就大大限制了其应用的范围。而CGH、MLPA、LOH分析等新的分子生物学方法的出现从多个方面克服了传统细胞遗传学方法的不足。因此,传统细胞遗传学技术和一些新技术联合应用就显得尤为重要^[48]。多种研究方法的联合应用可以相互取长补短,更深入地探寻胃癌染色体架构变异的规律,从而为胃癌的早期诊断、治疗和预后判断提供新的依据。

5 参考文献

- 1 Terpos E, Eleutherakis-Papaikovou V, Dimopoulos
- 2 Varella-Garcia M. Molecular cytogenetics in solid tumors: laboratorial tool for diagnosis, prognosis, and therapy. *Oncologist* 2003; 8: 45-58
- 3 Mitelman F, Johansson B, Mandahl N, Mertens F. Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 95: 1-8
- 4 张建华, 夏建川. 原发性胃癌的直接染色体分析. 赣南医学院学报 1997; 17: 1-4
- 5 Doak SH, Saidely D, Jenkins GJ, Parry EM, Griffiths AP, Baxter JN, Parry JM. Generation of locus-specific probes for interphase fluorescence in situ hybridisation--application in Barrett's esophagus. *Exp Mol Pathol* 2004; 77: 26-33
- 6 Murthy SK, Demetrick DJ. New approaches to fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 2006; 319: 237-259
- 7 Oliveira AM, French CA. Applications of fluorescence in situ hybridization in cytopathology: a review. *Acta Cytol* 2005; 49: 587-594
- 8 van Hattem WA, Carvalho R, Li A, Offerhaus GJ, Goggins M. Amplification of EMSY Gene in a Subset of Sporadic Pancreatic Adenocarcinomas. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 343-351
- 9 Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology* 2008; 52: 738-746
- 10 Bernasconi B, Karamitopoulou-Diamantis E, Tornillo L, Lugli A, Di Vizio D, Dirnhofer S, Wengmann S, Glatz-Krieger K, Fend F, Capella C, Insabato L, Terracciano LM. Chromosomal instability in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas: a fluorescent in situ hybridization study using a tissue microarray approach. *Hum Pathol* 2008; 39: 536-542
- 11 Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821
- 12 Sakakura C, Mori T, Sakabe T, Ariyama Y, Shinomiya T, Date K, Hagiwara A, Yamaguchi T, Takahashi T, Nakamura Y, Abe T, Inazawa J. Gains, losses, and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 24: 299-305
- 13 Guan XY, Fu SB, Xia JC, Fang Y, Sham JS, Du BD, Zhou H, Lu S, Wang BQ, Lin YZ, Liang Q, Li XM, Du B, Ning XM, Du JR, Li P, Trent JM. Recurrent chromosome changes in 62 primary gastric carcinomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 123: 27-34
- 14 Wang LD, Qin YR, Fan ZM, Kwong D, Guan XY, Tsao GS, Sham J, Li JL, Feng XS. Comparative genomic hybridization: comparison between esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardia adenocarcinoma from a high-incidence area for both cancers in Henan, northern China. *Dis Esophagus* 2006; 19: 459-467
- 15 Furuya T, Uchiyama T, Adachi A, Chochi Y, Oga A, Kawauchi S, Ishiglo K, Sasaki K. Relation of DNA ploidy to genetic aberrations detected by chromosomal CGH and FISH in gastric adenocarcinomas. *Oncol Rep* 2006; 15: 1491-1496
- 16 van Dekken H, Vissers K, Tilanus HW, Kuo WL,

■应用要点

本文对染色体结构变异的方法和研究现状进行总结,为其他研究者研究肿瘤染色体结构变异提供方法学上的参考。

■同行评价

该文系统的阐述了染色体结构变异在胃癌发生发展中的作用,反映了目前国内外这方面的研究进展,对科研工作有一定的指导作用。

- Tanke HJ, Rosenberg C, Ijszenga M, Szuhai K. Genomic array and expression analysis of frequent high-level amplifications in adenocarcinomas of the gastro-esophageal junction. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 166: 157-162
- 17 Lee JJ, Au AY, Foukakis T, Barbaro M, Kiss N, Clifton-Bligh R, Staaf J, Borg A, Delbridge L, Robinson BG, Wallin G, Höög A, Larsson C. Array-CGH identifies cyclin D1 and UBC10 amplicons in anaplastic thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 801-815
- 18 Sun B, Wu J, Zhang T, Wang C. High-resolution analysis of genomic profiles of hepatocellular carcinoma cells with differential osteopontin expression. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 387-391
- 19 Hwang KT, Han W, Cho J, Lee JW, Ko E, Kim EK, Jung SY, Jeong EM, Bae JY, Kang JJ, Yang SJ, Kim SW, Noh DY. Genomic copy number alterations as predictive markers of systemic recurrence in breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 123: 1807-1815
- 20 Wilting SM, de Wilde J, Meijer CJ, Berkhof J, Yi Y, van Wieringen WN, Braakhuis BJ, Meijer GA, Ylstra B, Snijders PJ, Steenbergen RD. Integrated genomic and transcriptional profiling identifies chromosomal loci with altered gene expression in cervical cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 890-905
- 21 Fix A, Lucchesi C, Ribeiro A, Lequin D, Pierron G, Schleiermacher G, Delattre O, Janoueix-Lerosey I. Characterization of amplicons in neuroblastoma: high-resolution mapping using DNA microarrays, relationship with outcome, and identification of overexpressed genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 819-834
- 22 Buffart TE, Carvalho B, Mons T, Reis RM, Moutinho C, Silva P, van Grieken NC, Vieth M, Stolte M, van de Velde CJ, Schrock E, Matthaei A, Ylstra B, Carneiro F, Meijer GA. DNA copy number profiles of gastric cancer precursor lesions. *BMC Genomics* 2007; 8: 345
- 23 Toma MI, Grosser M, Herr A, Aust DE, Meye A, Hoefling C, Fuessel S, Wuttig D, Wirth MP, Baretton GB. Loss of heterozygosity and copy number abnormality in clear cell renal cell carcinoma discovered by high-density affymetrix 10K single nucleotide polymorphism mapping array. *Neoplasia* 2008; 10: 634-642
- 24 Carén H, Erichsen J, Olsson L, Enerbäck C, Sjöberg RM, Abrahamsson J, Kogner P, Martinsson T. High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: four cases of homozygous deletions of the CDKN2A gene. *BMC Genomics* 2008; 9: 353
- 25 Lin LJ, Asaoka Y, Tada M, Sanada M, Nannya Y, Tanaka Y, Tateishi K, Ohta M, Seto M, Sasahira N, Tada M, Kawabe T, Zheng CQ, Kanai F, Ogawa S, Omata M. Integrated analysis of copy number alterations and loss of heterozygosity in human pancreatic cancer using a high-resolution, single nucleotide polymorphism array. *Oncology* 2008; 75: 102-112
- 26 Argos M, Kibriya MG, Jasmine F, Olopade OI, Su T, Hibshoosh H, Ahsan H. Genomewide scan for loss of heterozygosity and chromosomal amplification in breast carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 182: 69-74
- 27 Krupp W, Holland H, Koschny R, Bauer M, Schober R, Kirsten H, Livrea M, Meixensberger J, Ahnert P. Genome-wide genetic characterization of an atypical meningioma by single-nucleotide polymorphism array-based mapping and classical cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 184: 87-93
- 28 Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57
- 29 Bremmer JF, Braakhuis BJ, Brink A, Broeckaert MA, Beliën JA, Meijer GA, Kuik DJ, René Leemans C, Bloemena E, van der Waal I, Brakenhoff RH. Comparative evaluation of genetic assays to identify oral pre-cancerous fields. *J Oral Pathol Med* 2008 Aug 14. [Epub ahead of print]
- 30 Pylkäs K, Erkkö H, Nikkilä J, Sölyom S, Winqvist R. Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families. *BMC Cancer* 2008; 8: 146
- 31 Llorente JL, Aldama P, Alvarez-Marcos C, Escudero J, Alonso-Guervós M, Fresno F, Suárez C, Hermesen M. [Nasosinusal adenocarcinoma: molecular and genetic analysis by MLPA] *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008; 59: 151-158
- 32 Wang TT, Chen SQ, Zhang XM. [Germline mutation of adenomatous polyposis coli gene in Chinese patients with familial adenomatous polyposis] *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2008; 25: 199-202
- 33 Mensink HW, Kiliç E, Vaarwater J, Douben H, Paridaens D, de Klein A. Molecular cytogenetic analysis of archival uveal melanoma with known clinical outcome. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 181: 108-111
- 34 Wessendorf S, Fritz B, Wrobel G, Nessling M, Lampel S, Göttel D, Kuepper M, Joos S, Hopman T, Kokocinski F, Döhner H, Bentz M, Schwäenen C, Lichter P. Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 2002; 82: 47-60
- 35 Heiskanen MA, Bittner ML, Chen Y, Khan J, Adler KE, Trent JM, Meltzer PS. Detection of gene amplification by genomic hybridization to cDNA microarrays. *Cancer Res* 2000; 60: 799-802
- 36 吕炳建, 来茂德, 程蕾, 张宇伟. DHPLC检测胃癌微卫星不稳定性. *遗传* 2004; 26: 574-578
- 37 Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Kiechle M. A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat* 1999; 14: 333-339
- 38 Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001; 17: 439-474
- 39 Heinsohn S, Evermann U, Zur Stadt U, Bielack S, Kabisch H. Determination of the prognostic value of loss of heterozygosity at the retinoblastoma gene in osteosarcoma. *Int J Oncol* 2007; 30: 1205-1214
- 40 Lu Y, Yu Y, Zhu Z, Xu H, Ji J, Bu L, Liu B, Jiang H, Lin Y, Kong X, Hu L. Identification of a new target region by loss of heterozygosity at 5p15.33 in sporadic gastric carcinomas: genotype and phenotype related. *Cancer Lett* 2005; 224: 329-337
- 41 Yu YY, Ji J, Lu Y, Bu L, Liu BY, Zhu ZG, Lin YZ. [High-resolution analysis of chromosome 5 and identification of candidate genes in gastric cancer] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2006; 28: 84-87
- 42 李锦添, 买世娟, 冯炳建, 冯启胜, 黄丽惜, 余杏娟, 潘

- 志忠, 詹友庆, 夏建川. 胃癌7号染色体长臂的杂合性缺失分析. *中华肿瘤临床* 2004; 31: 4
- 43 Kang JU, Kang JJ, Kwon KC, Park JW, Jeong TE, Noh SM, Koo SH. Genetic alterations in primary gastric carcinomas correlated with clinicopathological variables by array comparative genomic hybridization. *J Korean Med Sci* 2006; 21: 656-665
- 44 Kimura Y, Noguchi T, Kawahara K, Kashima K, Daa T, Yokoyama S. Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression. *Mod Pathol* 2004; 17: 1328-1337
- 45 Wang Q, Wang B, Guan X, Gao H, Cheng H, Zhang Q, Huang C, Li P, Fu S. Analysis of comparative genomic hybridization and loss of heterozygosity in 43 primary gastric carcinomas. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 517-523
- 46 Mori Y, Matsunaga M, Abe T, Fukushige S, Miura K, Sunamura M, Shiiba K, Sato M, Nukiwa T, Horii A. Chromosome band 16q24 is frequently deleted in human gastric cancer. *Br J Cancer* 1999; 80: 556-562
- 47 朱亚青, 尹浩然, 朱正纲, 刘炳亚, 张奕, 陈雪华, 于颖彦, 林言箴. 胃癌SMAD4/DPC4杂合性丢失的研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 522-525
- 48 Siffroi JP, Chantot-Bastaraud S. [The future of cytogenetics after the sequencing of the human genome] *Morphologie* 2004; 88: 19-23

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 kDa改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm \times 6 cm \times 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-18)

*p53*基因生物学特性及其在胃肠道肿瘤中的研究进展

熊超亮, 黄缘

■背景资料

目前对*p53*基因的研究以相当深入, 他是我们人类最普遍最重要的抑癌基因之一。但从相关文献来看, *p53*在胃肠道肿瘤中的研究尚少, 且目前仍存在很多问题需要探讨, 有些观点还需统一。

熊超亮, 黄缘, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 此课题由黄缘设计; 文献收集与论文写作由熊超亮完成, 并由黄缘审校。

通讯作者: 黄缘, 330006, 江西省南昌市, 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

收稿日期: 2008-10-06 修回日期: 2008-10-19

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

Advances in biological characteristics of *p53* gene and its role in gastrointestinal tumors

Chao-Liang Xiong, Yuan Huang

Chao-Liang Xiong, Yuan Huang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Yuan Huang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huang9815@yahoo.com

Received: 2008-10-06 Revised: 2008-10-19

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

Abstract

With the progression of current genetic research, tumor-specific gene detection has become an important method to identify tumor patients; meanwhile, gene therapy or gene-targeted therapy, which is becoming a novel approach of tumor treatment, has brought a new hope for the final cure of malignant tumors. In this article, we review the characteristics of tumor-associated gene *p53* and its role in gastrointestinal tumors.

Key Words: *p53* gene; Gene mutation; Gastrointestinal tumor

Xiong CL, Huang Y. Advances in biological characteristics of *p53* gene and its role in gastrointestinal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3648-3653

摘要

目前随着基因水平研究的进展, 肿瘤基因特异性检测成为了早期发现肿瘤的一个新的重要

手段, 基因治疗及基因靶向治疗已成为肿瘤治疗的一条新途径, 并给肿瘤治疗的最终解决带来了新的希望。本文就肿瘤比较相关的基因*p53*生物学特性及其在胃肠道肿瘤中的相关研究作一综述。

关键词: *p53*基因; 基因突变; 胃肠道肿瘤

熊超亮, 黄缘. *p53*基因生物学特性及其在胃肠道肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3648-3653

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3648.asp>

0 引言

肿瘤的发生是一个复杂的生物学过程, 有许多癌基因和抑癌基因参与了这个过程。*p53*基因是存在于人体内最重要最普遍的抑癌基因之一, 他所编码的P53蛋白(野生型)作为细胞生长的监控器, 监控着体内基因组的稳定性, 若体内DNA发生损伤, 他能识别损伤的DNA, 让细胞停留于G₁期, 通过足够的修理或凋亡, 从而消除可能致癌的异常细胞。但是, 当*p53*基因突变以后, 就失去对细胞的监视作用, 便在细胞恶变中起着癌基因的作用。

1 *p53*基因的特征

1.1 *p53*基因的结构 人类*p53*基因定位于染色体17号染色体短臂(17q1311), 约20 kb长, 由11个外显子和10个内含子组成, 其中第1个外显子不编码, 其上游400 bp处有启动子p1, 下游1 kb处有启动子p2, 二者为转录起始点。*p53*基因分为野生型(*wt-p53*)和突变型(*mt-p53*)。*wt-p53*其功能的改变或缺失与大量不同种类的人类肿瘤细胞有密切关系, 同时还被认为是细胞应激的关键性调控分子之一, 能整合各种不同的细胞危急事件的信号, 通过转录或非转录途径对这些信号做出包括细胞生长抑制或凋亡在内的不同反应, 监视细胞基因组的完整性; 突变型*p53*半衰期长, 稳定性强, 在肿瘤组织中可检测其表达。

1.2 *p53*编码的蛋白质 *p53*编码的蛋白质又称为P53蛋白是由393个氨基酸组成的、与细胞分

■同行评议者

葛海燕, 教授, 同济大学附属第十人民医院普通外科; 高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

裂周期相关的蛋白质, 分子质量53 kDa. 同时也是一种半衰期较短的核内磷酸化蛋白, 含有3个主要功能区: (1)N端酸性转录激活区, 含转录激活域(1-70)和含5个PXXP重复序列的富脯氨酸(60-97). *p53*作为转录因子的转录激活功能依赖于转录激活域. PXXP重复序列区为SH3结合域, 参与信号传导, *p53*的某些非转录激活活性功能与此有关. PXXP重复序列的缺失还可使 $wt-p53$ 的转录激活功能减弱, 从而使其诱导细胞生长抑制和凋亡的功能下降. (2)序列特异性结合区(中央保守区), 即是*p53*与DNA相结合的区域, *p53*与DNA序列特异性地结合是*p53*行使抑癌功能的中心环节. P53蛋白有5个进化高度保守区, 其中4个(III-V)位于中央保守区内, 并且是肿瘤细胞最常发生突变的区域, 含有6个突变热点, 占已知*p53*错义突变的40%. (3)C端既是独立的功能区域, 是一段能控制*p53*与特异序列DNA结合的调控区域. P53蛋白的C端存在一个四聚化功能域, 由 β 片层和 α 螺旋共同形成二聚体, 完整的四聚体即是该二聚体的二聚体, 四聚体是*p53*与DNA结合效率最高的形式, 许多*p53*下游基因的表达依赖于野生型*p53*的四聚化. C端被磷酸化、与抗体或短片段的单链DNA结合以及缺失等, 可以使*p53*DNA结合区域与DNA的结合大为增强. 由于C端的共价和非共价修饰均可激活*p53*特异结合DNA, 因此, 未经修饰的C端被认为是中央DNA结合域的负调控因子.

2 *p53*生物学特性

*p53*抑癌作用的产生依赖于其健全的生物学功能的表达, 主要从以下方面得以实现: (1)参与细胞周期调节、促成损伤修复 $wt-p53$ 可以通过其下游靶基因表达产物与各种Cyclin(细胞周期素)和CDK(细胞周期素依赖性激酶)相互作用, 来阻滞肿瘤细胞已失去控制的细胞周期. 有研究表明*p53*基因可以上调hCDC4b的表达来负性调节Cyclin E, 将细胞周期进程阻滞在 G_0/G_1 期^[1]; 上调细胞周期素抑制子*p21*的表达, 并间接下调Cyclin D1的表达, 协同作用, 将细胞周期阻滞在 G_1/S 期^[2-3]; 上调GADD45的表达, 下调Cyclin B1和MAD1的表达, 协同作用, 将细胞周期阻滞在 G_2/M 期^[4-5]. 而 $mt-p53$ 则丧失了这种生物学功能. (2)诱导肿瘤细胞发生凋亡 凋亡被认为是某些类型的细胞对DNA损伤做出的应激反应, 并且该过程依赖于 $wt-p53$ 的存在^[6]. 将外源性*p53*基因导入某些肿瘤细胞中能够激活细胞凋亡过程

的事实, 更突出表明了*p53*在DNA受损诱导凋亡过程中的重要作用. *p53*引起肿瘤细胞发生凋亡的机制包括: 通过与*Bcl-2*基因结合, 抑制抗凋亡蛋白*Bcl-2*的表达从而诱导细胞发生凋亡. *p53*基因蛋白诱导产生ROS的线粒体酶的表达. *p53*诱导*p53*AIP1的表达, 甚至死亡受体Fas、PIDD和胞质蛋白Apaf-1的表达. 最新发现的*p53*诱导细胞凋亡机制: 通过对TIGAR(TP53诱导糖酵解和凋亡调节因子)的表达负性调节, 使细胞中果糖-2, 6-磷酸盐(fructose-2, 6-bisphosphate)的水平上升, 以至糖酵解过多细胞内活性氧总体水平上升发生*p53*诱导的死亡^[7]; 通过诱导自我吞噬调节基因DRAM的表达 编码产生一种诱导细胞死亡吞噬(*p53*介导的一种细胞死亡机制)的溶酶体蛋白引发细胞凋亡^[8]. (3)抑制肿瘤细胞的黏附及浸润转移 有研究表明通过抑制Wnt- β -catenin信号途径的激活, P53蛋白抑制介导细胞黏附的Cadherin分子的表达, 并降解参与这一黏附过程的 β -catenin, 从而抑制肿瘤细胞与周围其他细胞之间的黏附和相互通讯, 使其生存环境恶化^[9]. P53蛋白转录抑制基质金属蛋白酶mmp-1^[10]、mmp-2^[11]、mmp-13^[12]的表达, 从而抑制肿瘤的早期浸润转移. (4)抑制肿瘤血管生成而阻断其营养来源 大量的实验及临床资料表明, *p53*基因具有抑制肿瘤转移及肿瘤血管再生的功能, *p53*基因突变的肿瘤容易转移、预后较差. Fujiwara *et al*^[13]的研究表明, 用腺病毒介导的*p53*基因(Ad-p53)治疗肺癌及其他肿瘤以增加P53表达, 可明显抑制肿瘤血管生成, 并抑制肿瘤转移. Holmgren *et al*^[14]研究认为*p53*阻止肿瘤血管生成的作用机制可能包括: 非依赖性抗肿瘤细胞增殖; 直接导致诱导血管生成的肿瘤细胞发生凋亡; 改变肿瘤血管形成过程, 使肿瘤细胞回到休眠状态. 而Teodoro *et al*^[15-16]的研究表明, *p53*主要是通过激活胶原蛋白的脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase, PHDs), 该酶有抗血管生成特性, 以抑制血管再生. 又根据肿瘤血管再生所需要的调控因子等方面研究, 认为*p53*阻止肿瘤血管生成的作用机制至少有三种途径: 通过抑制缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)的形成; 通过抑制血管生成前因子的合成, 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor bFGF)等; 通过增加内源性血管再生抑制因子的量或激活一些抑制血管再生的酶(如PHDs). (5)*p53*基因可以抑制多重耐药基因

■ 相关报道

Doak *et al*报道了*p53*阳性表达在食管黏膜从慢性炎症发展到不典型增生时呈现一个质的飞跃, 发生在食管鳞癌形成的早期阶段. Teh *et al*研究认为胃幽门螺杆菌感染可诱导*p53*基因突变导致胃癌形成. Park *et al*研究揭示了大肠癌的发生是一个多基因、多阶段、多因素参与的过程, 涉及多种癌基因的激活和抑癌基因的失活.

■应用要点

本文从一个新的角度深度剖析了 *p53* 的生物学功能及与胃肠道肿瘤的关系, 利于胃肠道肿瘤的早期检测, 也为基因治疗及其他治疗提供了一定的理论依据。

(MDR)的转录, 为抑癌创建更积极的治疗平台多种肿瘤的耐药细胞中有多重耐药基因的表达增高, *p53*、*ras*等癌基因也参与调控MDR基因的表达, 他能促进MDR启动子的转录, 调控MDR基因表达, 使肿瘤产生耐药^[17-18]。

3 *p53*基因与胃肠道肿瘤

*p53*基因自身的结构改变是*p53*基因抑癌功能丧失的主要机制, 突变型*p53*基因不仅失去了抑制肿瘤形成的生物学特性, 反而极大的促进了细胞的恶性转化^[19]。目前大多研究报道*p53*基因表达的异常与胃肠道肿瘤形成关系密切。

3.1 *p53*与食管癌 现在大多研究^[20-21]证实*p53*基因的突变, 缺失及过度表达与食管癌发生、发展有密切关系, 并且与食管上皮的早期癌变相关。靳玉兰 *et al*^[22]研究表明, *p53*异常表达的阳性率在正常黏膜、轻度、中度、重度不典型增生及原位癌组织中分别为4%、39.1%、57.5%、52.9%和67.9%, 其中异常表达程度在中度以上者分别占0%、10.1%、24.5%、39.2%和48.7%。*p53*在正常黏膜中的表达与其在不典型增生及原位癌组织中的表达均有显著性差异($P<0.001$)。Doak *et al*^[23]研究也认为*p53*阳性表达在食管黏膜从慢性炎症发展到不典型增生时呈现一个质的飞跃, 这也提示*p53*基因的突变可能先于肿瘤的浸润和机体组织形态学的改变, 发生在食管鳞癌形成的早期阶段。由于食管黏膜内*p53*基因的异常表达导致P53蛋白的沉积诱发体内P53抗体的产生, 因此通过放射免疫的方法检测患者血清中P53抗体的水平有助于食管癌的早期诊断^[24-26]。越来越多的资料表明食管癌的发生与多种癌基因的激活和抑癌基因的失活有关, 癌基因和抑癌基因之间的协同作用是不可少的^[27-29]。目前研究认为*p53*基因抑制肿瘤的一般生物学机制在抑制食管癌形成过程中同样有效, 当然也可能还包含其他机制, 但*mt-p53*却丧失了正常*p53*这种抑癌生物学功能。有学者研究认为在食管癌形成过程中*p53*可以通过对*p16*表达负调节作用, 促使*p16*基因杂合子丢失从而导致细胞的调控机制紊乱, 使细胞进入恶变的状态^[30]。也有学者研究发现*mt-p53*丧失了对*bcl-2*基因、Survivin等凋亡抑制基因表达的下调功能, 从而抑制了食管鳞状上皮细胞发生的凋亡, 对食管癌的发生及增殖有重要意义^[31-32]。*mt-p53*还可以诱导Cox-2基因的表达来影响细胞的增生凋亡、血管的生成、局部的浸润和免疫功能的抑

制, 从而参与食管癌的发生发展过程^[33-34]。虽然如此, 但由于目前对*p53*基因究竟如何影响到肿瘤细胞的生长和分化还了解甚少, *p53*的表达与食管癌的分化程度、淋巴结有无转移及浸润深度关系上还没有一致意见, 大多研究认为他们之间存在一定的关联, 但也可见到不少他们之间没有关联的报道, 其原因可能是因为肿瘤受多基因控制, 目前还有待进一步探讨。而*p53*异常阳性表达的高低对食管癌预后的影响较大, *p53*阳性病例5年生存率明显高于阴性表达者, 大多数学者认为*p53*可以作为判断食管癌预后一个独立的指标。

3.2 *p53*与胃癌 胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤, 其发病机制较为复杂, 涉及一系列遗传学改变, 包括癌基因的激活和抑癌基因的失活^[35-36]。有研究表明*p53*基因是胃癌中最常突变的抑癌基因^[37-41], 其点突变和过表达不仅存在于胃癌各临床分期, 而且可发生于癌变前的不同阶段, 在肠化生, 特别是不完全性结肠化生和异型增生阶段也有较高的检出率^[42-46]。但不同类型及不同病因所致的胃癌患者的*p53*基因突变率不同。临床研究表明, 弥散型胃癌的*p53*基因突变率低于肠型胃癌; 早期和进展期分化型胃癌与进展期的未分化型胃癌的*p53*基因突变率相似均约40%, 但早期未分化型胃癌的*p53*基因突变率则非常低^[47]。有萎缩性胃炎病史的胃癌患者的*p53*基因突变率显著高于无萎缩性胃炎病理过程的胃癌, 尤以经萎缩性胃炎转化所致肠型胃癌的*p53*基因突变率最高^[48]。Oguri *et al*^[49]研究发现由增生性胃炎转化所致胃癌的*p53*基因突变率低于其他类型胃癌。幽门螺旋杆菌感染是胃癌发生发展的一个危险因素, 有研究报道胃幽门螺杆菌感染可诱导*p53*基因突变导致胃癌形成^[50-51], 但另有研究也表明, *p53*突变是不依赖*H pylori*的事件, *H pylori*感染不会引起*p53*突变^[52-53]; 还有学者认为仅毒素相关蛋白(CagA)阳性*H pylori*感染在胃癌*p53*突变中起重要作用^[54]。而Lee *et al*^[55]研究认为P53过表达与胃癌的预后密切相关, 其阳性率越高则肿瘤的恶性程度越高, 分化程度越低。

3.3 *p53*与大肠癌 大肠癌发病率在我国占消化系癌的第2位, 且随着我国人口老龄化、生活习惯、饮食结构以及环境的改变, 发病率渐呈上升趋势。现代分子生物学的大量研究揭示大肠癌的发生是一个多基因、多阶段、多因素参与的过程, 涉及到癌基因(K-*ras*等)的激活和抑癌

基因(APC, *p53*, DCC等)的失活^[56-59]. *p53*基因在结直肠癌的突变率占50%左右, 且突变位点多、分布广泛. *p53*基因发生突变, 使DNA受损的细胞无限增殖, 同时突变的*p53*基因可直接或间接地影响其他基因的表达如*bcl-2*基因, 从而抑制细胞凋亡的发生, 有利于细胞的异型增殖. 有研究^[60]认为, 正常大肠黏膜上皮及轻度不典型增生腺瘤P53表达阴性, 随着不典型增生加重出现P53阳性表达, 腺瘤癌变及早期大肠癌表达最高, 即*p53*基因突变主要发生在腺瘤-癌序列的晚期, 是大肠癌发生的早期事件, 而与腺瘤及腺癌的组织学类型无关. 因此, 检测*p53*表达状况有利于预测腺瘤癌变倾向, *p53*基因蛋白产物的检测已成为大肠癌早期诊断的重要手段之一. 也有研究^[61]认为*p53*基因突变与患者性别、肿瘤大体类型、组织学分类、细胞分化、病理分期等均无明显关系. 而对于*p53*基因在大肠癌发生淋巴道转移过程中是否起作用, 各方观点不一. 但是在肿瘤浸润过程中, 随着浸润深度的增加, P53的阳性表达率逐渐增高人们的研究结果是基本一致的. *p53*基因突变和高表达对大肠癌预后的影响和意义与文献报道不一致, 可能是因为影响大肠癌预后的因素较复杂, *p53*基因突变或高表达也许只是其中的一个方面, 且*p53*基因突变又是突变位点多, 范围广, 因此有关*p53*基因变化及高表达等对于大肠癌预后的影响有待更深入的研究.

4 结论

*p53*作为一个重要的抑癌基因, 对肿瘤细胞的发生、发展及预后有着重要的作用. 在众多胃肠道肿瘤的标志物中, 对*p53*的研究和认识较为深入, 而*p53*对于胃肠道肿瘤的早期诊断也具有好的特异性, 因此选取*p53*作为胃肠道肿瘤早期诊断的标志物应该是可行的, 且针对*mt-p53*基因转录的靶向治疗也为临床治疗胃肠道肿瘤患者开辟了一条新的途径, 利用分子生物学转导技术的*p53*基因治疗更为胃肠道肿瘤治疗乃至其他肿瘤治疗带来了新的希望. 所以我们对*p53*基因的生物学功能及在胃肠道肿瘤中的作用、相关机制进行详细深入研究有着重要意义. 但目前也必须看到虽然在基因研究和治疗方面取得了可喜的发展, 但仍有很多问题需要进一步研究和解决. 如何进一步了解*p53*基因与多种肿瘤的相关性, 寻找更为有效的载体, 提高转染效率, 研究其与化疗、放疗及免疫治疗的相互关系以

及与其他基因治疗的协同作用, 都是我们当前更好服务于临床治疗必须着力解决的重点.

5 参考文献

- 1 Kimura T, Gotoh M, Nakamura Y, Arakawa H. hCDC4b, a regulator of cyclin E, as a direct transcriptional target of p53. *Cancer Sci* 2003; 94: 431-436
- 2 Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 639-649
- 3 Rocha S, Martin AM, Meek DW, Perkins ND. p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4713-4727
- 4 Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2147-2152
- 5 Chun AC, Jin DY. Transcriptional regulation of mitotic checkpoint gene MAD1 by p53. *J Biol Chem* 2003; 278: 37439-37450
- 6 Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 2000; 102: 849-862
- 7 Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Voutsden KH. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 2006; 126: 107-120
- 8 Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; 126: 121-134
- 9 Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 2001; 7: 915-926
- 10 Sun Y, Zeng XR, Wenger L, Firestein GS, Cheung HS. P53 down-regulates matrix metalloproteinase-1 by targeting the communications between AP-1 and the basal transcription complex. *J Cell Biochem* 2004; 92: 258-269
- 11 Toschi E, Rota R, Antonini A, Melillo G, Capogrossi MC. Wild-type p53 gene transfer inhibits invasion and reduces matrix metalloproteinase-2 levels in p53-mutated human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 1188-1194
- 12 Ala-aho R, Grénman R, Seth P, Kähäri VM. Adenoviral delivery of p53 gene suppresses expression of collagenase-3 (MMP-13) in squamous carcinoma cells. *Oncogene* 2002; 21: 1187-1195
- 13 Fujiwara T, Kataoka M, Tanaka N. Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human cancer. *Mol Urol* 2000; 4: 51-54
- 14 Holmgren L, Jackson G, Arbiser J. p53 induces angiogenesis-restricted dormancy in a mouse fibrosarcoma. *Oncogene* 1998; 17: 819-824
- 15 Teodoro JG, Parker AE, Zhu X, Green MR. p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. *Science* 2006; 313: 968-971
- 16 Teodoro JG, Evans SK, Green MR. Inhibition of

■同行评价

本文文笔流畅, 引用参考文献亦较新, 值得临床医生和基础研究者学习参考.

- tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *J Mol Med* 2007; 85: 1175-1186
- 17 Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11: 265-283
- 18 Johnson RA, Ince TA, Scotto KW. Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *J Biol Chem* 2001; 276: 27716-27720
- 19 Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003; 302: 1036-1038
- 20 Robert V, Michel P, Flaman JM, Chiron A, Martin C, Charbonnier F, Paillot B, Frebourg T. High frequency in esophageal cancers of p53 alterations inactivating the regulation of genes involved in cell cycle and apoptosis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 563-565
- 21 Fujiki T, Haraoka S, Yoshioka S, Ohshima K, Iwashita A, Kikuchi M. p53 Gene mutation and genetic instability in superficial multifocal esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 669-679
- 22 靳玉兰, 张伟, 刘伯齐, 王洪平, 韩志楷, 韩双廷, 曲平, 李莱, 丁镇伟, 林培中. 食管癌前病变及原位癌组织中 Ki67、P53、iNOS 的异常表达. *中华肿瘤杂志* 2001; 23: 129-131
- 23 Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, Griffiths AP, Shah V, Baxter JN, Parry JM. Characterisation of p53 status at the gene, chromosomal and protein levels in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89: 1729-1735
- 24 毛友生, 赵晓航, 张德超, 汪良俊. 食管癌肿瘤标志物研究进展. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1321-1323
- 25 Shimada H, Okazumi S, Takeda A, Nabeya Y, Matsubara H, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Ochiai T. Presence of serum p53 antibodies is associated with decreased in vitro chemosensitivity in patients with esophageal cancer. *Surg Today* 2001; 31: 591-596
- 26 Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T. Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1677-1683
- 27 Zhang L, Lu W, Miao X, Xing D, Tan W, Lin D. Inactivation of DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relation to p53 mutations in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1039-1044
- 28 Casson AG, Evans SC, Gillis A, Porter GA, Veugelers P, Darnton SJ, Guernsey DL, Hainaut P. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of a ten-year prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1121-1131
- 29 Sur M, Sur RK, Cooper K, Bizos D. Preliminary report on the effect of brachytherapy on expression of p53, bcl-2 and apoptosis in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *S Afr J Surg* 2003; 41: 14-20
- 30 Nakamura T, Ide H, Eguchi R, Hayashi K, Takasaki K. Concomitant analysis of p16/INK4, cyclin D1, and retinoblastoma protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1321-1326
- 31 Kaur P, Kallakury BS, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS. Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 39-43
- 32 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
- 33 Tanière P, Martel-Planche G, Saurin JC, Lombard-Bohas C, Berger F, Scoazec JY, Hainaut P. TP53 mutations, amplification of P63 and expression of cell cycle proteins in squamous cell carcinoma of the oesophagus from a low incidence area in Western Europe. *Br J Cancer* 2001; 85: 721-726
- 34 Biramijamal F, Allameh A, Mirbod P, Groene HJ, Koomagi R, Hollstein M. Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. *Cancer Res* 2001; 61: 3119-3123
- 35 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- 36 Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004; 327-349
- 37 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 526-530
- 38 Volm M, Koomagi R, Mattern J, Efferth T. Expression profile of genes in non-small cell lung carcinomas from long-term surviving patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1843-1848
- 39 Höfler H, Becker KF. Molecular mechanisms of carcinogenesis in gastric cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; 162: 65-72
- 40 Fricke E, Keller G, Becker I, Rosivatz E, Schott C, Plaschke S, Rudelius M, Hermannstädter C, Busch R, Höfler H, Becker KF, Luber B. Relationship between E-cadherin gene mutation and p53 gene mutation, p53 accumulation, Bcl-2 expression and Ki-67 staining in diffuse-type gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 104: 60-65
- 41 Chakroborty D, Sarkar C, Mitra RB, Banerjee S, Dasgupta PS, Basu S. Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4349-4356
- 42 Testino G, Gada D, De Iaco F, Cornaggia M. p53 and Ki-67 expression in epithelial gastric dysplasia and in gastric cancer. *Panminerva Med* 2002; 44: 369-371
- 43 Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer* 2002; 2: 8
- 44 李晓清, 郝丽萍, 张小丽, 龚飞跃, 郭惠学, 伍尤皇. 胃黏膜不典型增生 P53 基因表达及其癌变率的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1216-1217
- 45 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. Helicobacter pylori infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 107-113
- 46 Morgan C, Jenkins GJ, Ashton T, Griffiths AP, Baxter JN, Parry EM, Parry JM. Detection of p53 mutations in precancerous gastric tissue. *Br J Cancer*

- 2003; 89: 1314-1319
- 47 Tamura G, Sato K, Akiyama S, Tsuchiya T, Endoh Y, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Motoyama T. Molecular characterization of undifferentiated-type gastric carcinoma. *Lab Invest* 2001; 81: 593-598
- 48 Taguchi A, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Mori N, Goto H. Severity of atrophic gastritis related to antiparietal cell antibody and gastric carcinogenesis, including p53 mutations. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 545-551
- 49 Oguri A, Ohmiya N, Taguchi A, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Maeda O, Ando T, Goto H. Rugal hyperplastic gastritis increases the risk of gastric carcinoma, especially diffuse and p53-independent subtypes. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 561-566
- 50 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, L XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: H.pylori infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 848-854
- 51 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
- 52 田素芳, 熊永炎, 余少平, 蓝菁. 胃癌及其有关病变的幽门螺杆菌感染与抑癌基因表达的相关性研究. *癌症* 2002; 21: 970-973
- 53 杨桂彬, 胡伏莲, 吕有勇. 胃黏膜病变演化过程中幽门螺杆菌感染与p53变异和MG-7抗原及核仁组成区相关蛋白表达的关系. *中华医学杂志* 2003; 83: 1332-1335
- 54 Shibata A, Parsonnet J, Longacre TA, Garcia MI, Puligandla B, Davis RE, Vogelmann JH, Orentreich N, Habel LA. CagA status of *Helicobacter pylori* infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23: 419-424
- 55 Lee HS, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kim WH. Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. *J Pathol* 2003; 200: 39-46
- 56 Park JH, Kim IJ, Kang HC, Shin Y, Park HW, Jang SG, Ku JL, Lim SB, Jeong SY, Park JG. Oligonucleotide microarray-based mutation detection of the K-ras gene in colorectal cancers with use of competitive DNA hybridization. *Clin Chem* 2004; 50: 1688-1691
- 57 Choi J, Park SY, Costantini F, Jho EH, Joo CK. Adenomatous polyposis coli is down-regulated by the ubiquitin-proteasome pathway in a process facilitated by Axin. *J Biol Chem* 2004; 279: 49188-49198
- 58 Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3420-3428
- 59 Samowitz WS, Slattery ML, Sweeney C, Herrick J, Wolff RK, Albertsen H. APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 165-170
- 60 董崇海, 曲玲, 赵清喜, 李杰, 郭春霞, 刁春艳, 王德仙. 散发性结直肠癌、腺瘤组织中hMLH1和突变型p53表达. *中国肿瘤* 2007; 16: 123-126
- 61 何震宇, 史传兵, 闻浩, 李方龙, 史家宁, 张建平, 汪宝林. CEA、p53、Ki-67、GST- π 在大肠癌组织表达及其相关性研究. *肿瘤学杂志* 2008; 14: 575-577

编辑 史景红 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 2008-11-18)

肝脏缺血再灌注损伤与钙超载

岳媛媛, 冯志杰

■背景资料

肝脏缺血再灌注损伤是临床上常见的病理过程, 各种原因导致肝脏血流中断或不足使肝脏缺血, 当恢复血供再灌注后, 肝细胞功能障碍及结构破坏反而加重, 严重影响着肝移植及消化系大出血的预后。

岳媛媛, 冯志杰, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 岳媛媛与冯志杰对此文贡献均等; 本综述写作由岳媛媛完成; 文章的修改由冯志杰完成。

通讯作者: 冯志杰, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化内科. zhijiefeng2005@163.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2008-05-18 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

Hepatic ischemia reperfusion injury and calcium overload

Yuan-Yuan Yue, Zhi-Jie Feng

Yuan-Yuan Yue, Zhi-Jie Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Correspondence to: Zhi-Jie Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhijiefeng2005@163.com

Received: 2008-05-18 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

Abstract

Hepatic ischemia reperfusion injury is a common pathophysiologic process, whose basic mechanism is related to intracellular calcium overload. Calcium overload is related to cell membrane cranny, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, the decreased activity of Ca^{2+} -ATPase, mitochondrial dysfunction and oxygen free radicals. The prophylaxis and treatment options of calcium overload include: ATP-sensitive K^+ channel openers, anesthesia, calcium channel entry blockers, mitochondrial permeability transition inhibitors, heme oxygenase 1 and so on.

Key Words: Ischemia reperfusion injury; Liver; Calcium overload

Yue YY, Feng ZJ. Hepatic ischemia reperfusion injury and calcium overload. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3654-3658

摘要

肝脏缺血再灌注损伤是临床上常见的病理过程, 其发生机制与细胞内钙超载有关。钙超载

的发生与胞质膜裂隙作用、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换、 Ca^{2+} -ATP酶活性下降、线粒体功能障碍以及氧自由基有关。钙超载防治措施包括: 线粒体ATP敏感的K通道开放剂、麻醉剂、钙离子拮抗剂、线粒体通透性转换孔抑制剂和血红素氧合酶等。

关键词: 缺血再灌注; 肝脏; 钙超载

岳媛媛, 冯志杰. 肝脏缺血再灌注损伤与钙超载. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3654-3658

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3654.asp>

0 引言

肝脏缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤是指各种原因导致肝脏血流中断或不足使肝脏缺血, 当恢复血供再灌注后, 肝细胞功能障碍及结构破坏反而加重, 为临床上常见的病理过程。肝移植手术造成的IR损伤, 可使得术后8%-20%的肝脏功能不全或无功能^[1]。肝脏功能不全所致的发病率和死亡率日益增高, 约有30%的肝功能不全患者需要在肝移植术后3 mo内进行再移植^[2]。

肝脏IR损伤的发病机制十分复杂, 其中钙离子超载是一个重要的原因。在生理状态下, Ca^{2+} 作为细胞内第2信使, 在维持细胞增殖、分裂、能量代谢、氧代谢发挥着重要作用。肝细胞内液 Ca^{2+} 浓度约为0.2 $\mu\text{mol/L}$, 细胞外液 Ca^{2+} 浓度为1.3 mmol/L 左右, 即肝细胞始终处于胞内外1万倍浓度梯度的内环境中。肝脏IR时, 细胞内钙浓度增加, 形成钙超载。细胞内 Ca^{2+} 稳定的维持对于生命活动是至关重要的。胞质中 Ca^{2+} 浓度平衡和稳定是跨细胞膜 Ca^{2+} 转运和细胞内“钙库”摄取和释放 Ca^{2+} 等过程动态平衡的结果, 在心肌细胞的研究表明, 这一平衡过程中90%依赖于 Ca^{2+} -ATP酶。维持细胞内外钙梯度相对稳定的机制: (1)细胞膜上 Ca^{2+} -ATP酶的外排作用。(2)细胞膜上 $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ 的交换, 有赖于 $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -ATP酶所造成的细胞内高 Na^+ 梯度。(3)内质网对 Ca^{2+} 的储存。(4)线粒体对 Ca^{2+} 的储存。肝脏IR时, 细胞内钙

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

浓度增加, 形成钙超载。

1 IR钙超载的机制

1.1 胞质膜裂隙的作用 电镜下观察到, 缺血后细胞质膜存在细小裂隙。镧(La^{3+})探针方法发现大量 La^{3+} 可以通过缺血心肌细胞间隙进入受损细胞及线粒体内。由于 La^{3+} 具有与 Ca^{2+} 相似的离子直径, 因此 La^{3+} 颗粒的出现可能是过量 Ca^{2+} 可以进入质膜裂隙细胞的证据。再灌注后, 在电镜下也可见胞质膜出现裂隙, 但 Ca^{2+} 超负荷可被小分子物质如镍所抑制, 提示胞质膜裂隙可能是再灌注后 Ca^{2+} 超载的一个原因。

1.2 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换的作用 Na^+/H^+ 交换被激活: 哺乳动物 Na^+/H^+ 通道^[3]有7种亚型, Na^+/H^+ 每排出一个 H^+ 就有一个 Na^+ 进入细胞。 Na^+ 渗入的一个重要途径是 Na^+/H^+ 交换。当组织细胞缺血时, 糖酵解增加, 细胞内产生大量 H^+ , 细胞内酸度提高, Na^+/H^+ 被激活; 再灌注时, 血液复流使细胞外液 H^+ 浓度迅速下降, 造成细胞内外 H^+ 浓度梯度增大, 这会再度激活 Na^+/H^+ 通道。 Na^+/H^+ 激活后, 大量 Na^+ 流入细胞内, $[\text{pH}]_i$ 迅速恢复; 与之伴随的是细胞内 Na^+ 浓度升高及细胞肿胀, Na^+ 跨质膜梯度降低和 $[\text{pH}]_i$ 的升高又迅速使 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶和 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 通道激活, 以便更好地清出细胞内过高的 Na^+ ^[3-4]; 由于肝细胞缺血时ATP合成减少, $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性降低, 无法通过正常的 Na^+/K^+ 交换将过多的 Na^+ 排出细胞外, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换便活跃起来^[4]。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白(NCX)是一非ATP依赖的双向转运蛋白, 包括3个亚型, 以3个 Na^+ 交换1个 Ca^{2+} 的方式进行, 具有双向性, 抑制NCX可明显改善缺血再灌注损伤^[5]。

研究结果表明^[6], Na^+/H^+ 抑制剂HOE642可以降低钙超载, 同时保持 Na^+ 平衡减轻细胞肿胀和组织水肿, 从而减少40%-50%由氧化应激诱导的细胞死亡, 起到抗IR损伤的作用。选择性 Na^+/H^+ 抑制剂benzamide(BIIB 513)^[7]可以减轻代谢性酸中毒, 增加组织氧供, 同时较对照组心激酶水平和肌钙蛋白-1水平均显著下降, 从而改善再灌注后的心脏功能, 提高了生存率。由此说明 Na^+/H^+ 交换蛋白(NHE)的活性在IR钙超载中扮演着重要的角色, 而NHE的抑制剂KR-32570可以通过抑制细胞内 Ca^{2+} 超载, 阻断线粒体死亡, 明显减轻细胞死亡和细胞凋亡, 减轻再灌注损伤, 提高生存率^[8]。大量的资料支持 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换在再灌注损伤中起着一定作用^[9], 在大鼠心脏IR模型组, 给予KB-R7943(KBR)选择性 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换抑制剂, 可以减轻缺血缺氧导致的钙超载, 改善心脏收缩

和舒张功能。

1.3 Ca^{2+} -ATP酶数量及活性下降 肝细胞膜 Ca^{2+} -ATP酶定位于细胞膜基底外侧区, 是非肌肉细胞维持胞内钙稳态的关键之一。肝脏缺血时, 随着ATP含量的下降, 细胞膜 Ca^{2+} -ATP酶活力及钙摄取能力下降; 再灌注60 min后进一步下降^[10]。IR过程严重影响了肝细胞 Ca^{2+} -ATP酶蛋白及其基因的表达, 其变化状态与肝功能改变一致。造成 Ca^{2+} -ATP酶这种变化的原因在于, 缺血和再灌注后不断产生的氧自由基损伤了细胞膜和线粒体膜, 使 Ca^{2+} -ATP酶活性不断降低, 不能将胞内的 Ca^{2+} 泵出胞外, 从而导致细胞内的 Ca^{2+} 浓度明显增加。此外, 钙泵活性的发挥还依赖于巯基, 并与细胞内巯基池状态密切相关。谷胱甘肽(GSH)是肝细胞最丰富的巯基来源, 参与过氧化物酶清除过氧化氢和脂质过氧化物, 抑制氧自由基生成, 还原型GSH可防止巯基氧化。IR损伤产生氧自由基, 引起GSH氧化从而导致巯基氧化, 破坏了 Ca^{2+} -ATP酶的结构, 抑制了 Ca^{2+} -ATP酶的活性^[11]。

1.4 线粒体结构和功能障碍 线粒体通过多种钙转运机制, 从内膜摄取和释放钙, 调节细胞内局部和整个细胞的 Ca^{2+} 浓度。线粒体的变化比较复杂。肝脏缺血后线粒体 Ca^{2+} -ATP酶活性减弱, 且伴相应程度的结构异常, 如水肿、基质颗粒丧失、嵴紊乱、断裂、基质密度减小甚至消失。在正常生理条件下, 线粒体内膜只对少数可选择性的代谢产物和离子具有通透性。在缺血期氧的缺乏, 干扰了细胞内氧化能量的产生, 导致ATP水平的下降。与大量胞质钙结合耗损了ATP并最终导致线粒体钙通道的开放, 允许大量的钙被摄入线粒体。再灌注可使线粒体迅速水肿, 胞质 Ca^{2+} 增加引起磷脂酶触发的膜损伤, 大量 Ca^{2+} 通过损伤的线粒体膜进入线粒体内, 以磷酸钙形式形成多形致密小体而沉积于线粒体基质, 钙颗粒的出现, 尤以再灌注后为重。再灌注时, 胞质 Na^+ 超载可以导致线粒体中 Ca^{2+} 释放, 从而使胞质 Ca^{2+} 浓度增高。

细胞内钙离子和ATP的变化都将干扰线粒体内膜的静息电位, 胞质中钙离子的浓度增高即可使得高电导性通道-通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)开放, 大量的钙离子进入线粒体, 线粒体也将出现钙超载^[12]。另有研究表明, 高浓度的线粒体 Ca^{2+} 、氧自由基能使PTP开放, 允许线粒体 Ca^{2+} 外流, 减少ATP形成, 并导致触发凋亡的膜间蛋白释放入胞质。在IR损伤中, PTP的开放导致了氧化磷酸化的崩解, 加重了钙超载、氧化应激和ATP的耗损^[13]。导致PTP开放的

■研究前沿

肝脏缺血再灌注损伤的发病机制及防治措施是目前研究的热点, 但仍不十分明确。钙超载是其的重要发病机制之一, 目前多集中于动物实验方面, 其临床应用尚需进一步研究。

■应用要点

本文详细论述了钙超载的防治措施,并取得了较好的疗效,对肝脏缺血再灌注损伤的临床应用具有一定指导价值。

关键因素就是线粒体钙超载,尤其是同时伴有氧化应激^[14]。PTP开放时许多大分子非选择性地由胞质向线粒体扩散,导致线粒体膜电位的破坏和功能障碍,细胞内钙超载时, Ca^{2+} 也可与PTP相结合,导致线粒体肿胀,功能失调,均能引起细胞死亡^[15]。而PTP的开放可以引起凋亡前体蛋白、化学毒物及细胞色素C的释放。特定蛋白酶的级联瀑布式反应可诱导凋亡,如天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspases)系统。Caspases-9前体是由他的激活酶和凋亡激活因子-1(Apaf-1)组成。细胞色素C在脱氧ATP的存在下,激活Apaf-1,从而使前体Caspases-9成为有活性的Caspases-9,进而激活Caspases-3^[16]。Caspases-3是凋亡的执行者,其作用主要是消化破坏细胞内多种蛋白酶复合体,激活核内核酸酶,造成DNA裂解破坏形成DNA片段;破坏细胞的 Ca^{2+} -ATP酶功能,造成细胞内钙超载^[17]。研究结果提示,Caspases-3的激活依赖于胞质游离钙的参与,因此细胞内钙超载是发生Caspases-3激活之前的一个重要早期分子事件,并且是促进Caspases-3激活的重要条件之一。

1.5 氧自由基 肝脏再灌注时产生的氧自由基对钙超载有很大影响。大量氧自由基由于其极高的化学活性,可攻击大分子诸如核酸、蛋白质、脂质和细胞膜,造成膜脂质过氧化损害,从而加重肝脏损害^[18]。氧自由基对质膜产生的脂质过氧化反应,使膜的渗透性发生改变并可使质膜形成新的钙通道,促使 Ca^{2+} 大量内流。同时,氧自由基破坏线粒体结构、干扰氧化磷酸化功能、加速ATP等高能磷酸化合物的耗竭,使依赖能量的离子泵活性降低,这些均使细胞内 Ca^{2+} 增加。超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)可使 Ca^{2+} -ATP酶活性增高, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换下降;而黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶使 Ca^{2+} -ATP酶活性受明显抑制,胞质 Ca^{2+} 明显增高。氧自由基能直接作用于 Ca^{2+} -ATP酶和 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换载体蛋白,促使钙超载。

钙池操纵的钙通道(store-operated Ca^{2+} channels, SOC)几乎存在所有非兴奋细胞上^[19],研究发现肝细胞存在SOC,且对钙离子具有高度选择性,该离子通道本质是瞬时受体电位通道蛋白家族^[20],大鼠肝脏IR后产生大量的氧自由基,进而与肝细胞膜上的受体结合引起膜磷脂酶C的激活,然后激活细胞膜上的SOC通道,使大量 Ca^{2+} 内流,导致肝细胞内钙超载,从而引起肝细胞损伤。

2 钙超载的防治

2.1 线粒体ATP敏感的K通道(mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, mitoKATP)开放剂

mitoKATP存在于线粒体内膜,并与浆膜mitoKATP有一些共同属性。mitoKATP在IR损伤中扮演着重要的角色,被认为是细胞保护信号转导机制的终末效应因子之一。mitoKATP被认为是钙超载保护作用的靶点,对减轻钙超载起着一定的作用。mitoKATP通道激活使钾内流引起膜电位变化,基质容量增加,激活氧化呼吸链式能量增加,阻止释放过量 Ca^{2+} ,使得线粒体钙超载减弱^[21]。Holmuhamedov *et al*^[22]证实,mitoKATP的开放剂二氮嗪可以减轻线粒体和细胞内的钙超载,更重要的是二氮嗪的这种作用可以被mitoKATP阻断剂5HD所阻断。Jahangir *et al*^[23]认为二氮嗪还可以抑制钙超载所诱导的氧化磷酸化,抑制氧化应激引起的凋亡,从而起到保护组织、细胞的作用。

2.2 麻醉剂 麻醉剂是现在研究较多的应用于预处理的药物。挥发性麻醉药具有阻断电压依从性慢钙通道的作用。Novaliija *et al*^[24]应用七氟醚对缺血的心脏进行预处理后发现再灌注后线粒体ATP酶活性较处理组增高,氧自由基生成降低,再灌注心肌细胞内钙超载减轻,可能是阻断了电压依从性慢钙通道的作用。七氟醚明显减少了氧自由基的生成,间接保护了线粒体的氧化磷酸化,减轻了再灌注损伤。研究表明^[25]异氟烷可以提高线粒体膜的流动性,减轻PTP的开放抑制钙内流,同时可以抑制蛋白激酶,从而改善再灌注后的组织和细胞功能。挥发性麻醉药^[26]可能通过抑制Kupffer细胞和中性粒细胞产生肝细胞外的氧自由基,减轻中性粒细胞和肝细胞内钙超载,提高肝细胞缺血再灌注期间的能量储备,对肝脏缺血再灌注损伤有保护作用。

2.3 钙离子拮抗剂 Nauta *et al*^[27]在大鼠肝脏缺血前给予钙拮抗剂维拉帕米可阻滞肝细胞的钙内流,减轻钙超载,从而抑制黄嘌呤脱氢酶向黄嘌呤氧化酶的转化,减少再灌注时氧自由基的产生;阻止缺血期细胞内 Ca^{2+} 的有害再分配,是线粒体不释放 Ca^{2+} 入胞质;扩张血管,改善微循环,可明显减轻肝脏的缺血再灌注损伤。钙拮抗剂的应用,不仅有助于保持细胞内稳态平衡、保护细胞的能量代谢以及拮抗依赖有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)家族激活的细胞凋亡^[28],而且还有实验证明可以抑制Caspases-3的激活,从而阻断细胞凋亡。因此钙离子拮抗剂可抑制Caspases-3的激活和拮抗细胞钙超载措施的联合应用,将可能在防治缺血性肝脏损伤的临床实践中有重要的

应用价值。

2.4 线粒体通透性转换孔(PTP)抑制剂 PTP是近年来发现的, 它是一种位于线粒体膜上的复合物, 结构非常复杂, 他含有环亲和素cyclophilin D(Cyp D), 也可能包括肌酸酐激酶、线粒体外膜蛋白以及己糖激酶。PTP在组织再灌注的前几分钟时开放时间延长, 是导致细胞死亡的关键因素, 从药理学抑制PTP的开放具有保护意义^[29]。Cyp D缺乏的大鼠具有显著的抗I/R的作用, 从而揭示了Cyp D是非常有用的药物靶点^[30-31]。Gomez *et al*通过动物试验发现, 抑制PTP的开放可以加快缺血再灌注损伤造成的功能恢复, 同时减少死亡率^[32]。环孢素A(CsA)是常用的免疫抑制剂, 他可以通过黏合Cyp D, 从而抑制PTP的开放, 同时具有修补线粒体内膜的功能, 减轻钙超载。Plin *et al*^[33]实验证实, 在大鼠肝脏再灌注损伤的模型中, 给予CsA的实验组较对照组有明显的保护线粒体功能的作用, 从而有效的保护了呼吸链的完整性, 限制了细胞色素C的释放, 减少了肝细胞的凋亡和坏死。CsA的类似物NIM811不具有免疫抑制作用, 具有比较广阔的治疗前景。

2.5 血红素氧合酶(heme oxygenase, HO) HO-1在体内可催化血红素降解, 其主要产物是一氧化碳、胆红素和铁。他们均是重要的生物效应分子。其中一氧化碳和胆红素单独应用均可以明显减轻肝脏缺血再灌注损伤^[34]。有研究表明^[35], 对大鼠肝脏的缺氧预处理后发现, HO-1 mRNA和蛋白水平明显升高, 而再灌注后肝脏损伤的生化指标普遍下降, 两者具有相关性, 可能通过HO的活化来减轻肝脏的缺血缺氧后的再灌注损伤。在肝移植手术中, HO-1基因表达的强弱与手术成功率关系密切。在大鼠肝移植术前, 以重组腺病毒为载体基因植入HO-1, 可增加细胞凋亡相关基因(Bcl-2)的水平, 减少CD95/Fas介导的凋亡, 从而对肝脏功能的恢复起到显著的作用^[36]。HO基因水平的上调对大鼠肝脏IR损伤起到明显的保护作用, 这种保护作用同样也存在于肺、心、肾、胰腺等组织的IR损伤^[37]。HO的保护作用可能归因于一氧化碳和胆红素的抗氧化作用。也有可能是可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的激活, 导致环磷酸鸟苷(cGMP)水平的增高和钙超载的降低^[38]。

3 结论

肝脏IR损伤是临床上常见的病理过程, 严重威胁着患者的生命安全, 钙超载是其发病的主要

机制之一, 应用mitoKATP通道激活剂、麻醉剂的预处理、钙离子拮抗剂、线粒体通透性转换孔抑制剂以及血红素氧合酶等均可减轻钙超载, 从而减轻肝脏IR损伤, 这些多为动物实验方面的结果, 若将其应用于临床还需要进行大量的研究。

4 参考文献

- Porte RJ, Ploeg RJ, Hansen B, van Bockel JH, Thorogood J, Persijn GG, Hermans J, Terpstra OT. Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. *European Multicentre Study Group. Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1: S164-S167
- Schnitzler MA, Woodward RS, Brennan DC, Whiting JF, Tesi RJ, Lowell JA. The economic impact of preservation time in cadaveric liver transplantation. *Am J Transplant* 2001; 1: 360-365
- Baetz D, Bernard M, Pinet C, Tamareille S, Chattou S, El Banani H, Coulombe A, Feuvray D. Different pathways for sodium entry in cardiac cells during ischemia and early reperfusion. *Mol Cell Biochem* 2003; 242: 115-120
- Schäfer C, Ladilov Y, Inserre J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 241-250
- Luo J, Wang Y, Chen H, Kintner DB, Cramer SW, Gerdtz JK, Chen X, Shull GE, Philipson KD, Sun D. A concerted role of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter and Na⁺/Ca²⁺ exchanger in ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 737-746
- Luo J, Chen H, Kintner DB, Shull GE, Sun D. Decreased neuronal death in Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1-null mice after in vitro and in vivo ischemia. *J Neurosci* 2005; 25: 11256-11268
- Wu D, Bassuk J, Arias J, Doods H, Adams JA. Cardiovascular effects of Na⁺/H⁺ exchanger inhibition with BIIB513 following hypovolemic circulatory shock. *Shock* 2005; 23: 269-274
- Kim MJ, Moon CH, Kim MY, Lee S, Yi KY, Yoo SE, Lee SH, Baik EJ, Jung YS. KR-32570, a novel Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor, attenuates hypoxia-induced cell death through inhibition of intracellular Ca²⁺ overload and mitochondrial death pathway in H9c2 cells. *Eur J Pharmacol* 2005; 525: 1-7
- Seki S, Taniguchi M, Takeda H, Nagai M, Taniguchi I, Mochizuki S. Inhibition by KB-r7943 of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger reduces Ca²⁺ overload in ischemic-reperfused rat hearts. *Circ J* 2002; 66: 390-396
- Ruiz-Stewart I, Tiyyagura SR, Lin JE, Kazerounian S, Pitari GM, Schulz S, Martin E, Murad F, Waldman SA. Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 37-42
- Muriel P, Sandoval G. Hepatic basolateral plasma high-affinity Ca²⁺-ATPase is inhibited by nitric oxide and peroxyxynitrite anion. *J Appl Toxicol* 2000; 20: 435-439
- Belous A, Knox C, Nicoud IB, Pierce J, Anderson C, Pinson CW, Chari RS. Altered ATP-dependent mitochondrial Ca²⁺ uptake in cold ischemia is

■名词解释

通透性转换孔(PTP): 一种位于线粒体膜上的复合物, 结构复杂, 高浓度的线粒体Ca²⁺、氧自由基能使PTP开放, 在IR损伤中, PTP的开放导致了氧化磷酸化的崩解, 加重了钙超载、氧化应激和ATP的耗损。

■同行评价

本文有一定的科学性和可读性,能较好地反映国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

- attenuated by ruthenium red. *J Surg Res* 2003; 111: 284-289
- 13 Tang XH, Gao J, Fang F, Chen J, Xu LZ, Zhao XN, Xu Q. Hepatoprotection of oleanolic acid is related to its inhibition on mitochondrial permeability transition. *Am J Chin Med* 2005; 33: 627-637
- 14 Gomez L, Chavanis N, Argaud L, Chalabreysse L, Gateau-Roesch O, Ninet J, Ovize M. Fas-independent mitochondrial damage triggers cardiomyocyte death after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H2153-H2158
- 15 Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ, Russell JT. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 2000; 32: 35-46
- 16 Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410: 549-554
- 17 Hénaff M, Antoine S, Mercadier JJ, Coulombe A, Hatem SN. The voltage-independent B-type Ca²⁺ channel modulates apoptosis of cardiac myocytes. *FASEB J* 2002; 16: 99-101
- 18 Shimono H, Goromaru T, Kadota Y, Tsurumaru T, Kanmura Y. Propofol displays no protective effect against hypoxia/reoxygenation injury in rat liver slices. *Anesth Analg* 2003; 97: 442-448, table of contents
- 19 Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney JW Jr. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1742: 21-36
- 20 Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 387-396
- 21 Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marbán E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 2001; 89: 891-898
- 22 Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol* 1999; 519 Pt 2: 347-360
- 23 Jahangir A, Ozcan C, Holmuhamedov EL, Terzic A. Increased calcium vulnerability of senescent cardiac mitochondria: protective role for a mitochondrial potassium channel opener. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 1073-1086
- 24 Novalija E, Kevin LG, Eells JT, Henry MM, Stowe DF. Anesthetic preconditioning improves adenosine triphosphate synthesis and reduces reactive oxygen species formation in mitochondria after ischemia by a redox dependent mechanism. *Anesthesiology* 2003; 98: 1155-1163
- 25 Hashiguchi H, Morooka H, Miyoshi H, Matsumoto M, Koji T, Sumikawa K. Isoflurane protects renal function against ischemia and reperfusion through inhibition of protein kinases, JNK and ERK. *Anesth Analg* 2005; 101: 1584-1589
- 26 Djurberg H, Pothmann Facharzt W, Joseph D, Tjan D, Zuleika M, Ferns S, Rasheed A, Evans DA, Bassas A. Anesthesia care for living-related liver transplantation for infants and children with end-stage liver disease: report of our initial experience. *J Clin Anesth* 2002; 14: 564-570
- 27 Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991; 213: 137-142
- 28 Fauvel H, Marchetti P, Chopin C, Formstecher P, Nevière R. Differential effects of caspase inhibitors on endotoxin-induced myocardial dysfunction and heart apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1608-H1614
- 29 Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 372-385
- 30 Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005; 434: 658-662
- 31 Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434: 652-658
- 32 Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H1654-H1661
- 33 Plin C, Haddad PS, Tillement JP, Elimadi A, Morin D. Protection by cyclosporin A of mitochondrial and cellular functions during a cold preservation-warm reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2004; 495: 111-118
- 34 Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD, Tiegs G. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003; 38: 909-918
- 35 Lai IR, Ma MC, Chen CF, Chang KJ. The protective role of heme oxygenase-1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats. *Transplantation* 2004; 77: 1004-1008
- 36 Ke B, Buelow R, Shen XD, Melinek J, Amersi F, Gao F, Ritter T, Volk HD, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1189-1199
- 37 Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattani P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes* 2001; 50: 1983-1991
- 38 Masini E, Vannacci A, Marzocca C, Pierpaoli S, Giannini L, Fantappiè O, Mazzanti R, Mannaioni PF. Heme oxygenase-1 and the ischemia-reperfusion injury in the rat heart. *Exp Biol Med* (Maywood) 2003; 228: 546-549

编辑 李军亮 电编 何基才

肝脏糖异生的分子机制研究进展

韩向晖, 季光

韩向晖, 季光, 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032
国家自然科学基金资助项目, No. 30873260
教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目, No. NCET07-0563
上海市教委重点学科资助项目, No. J50305
作者贡献分布: 韩向晖与季光对此文所作贡献均等.
通讯作者: 季光, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学脾胃病研究所. jiliver@vip.sina.com
电话: 021-64286261 传真: 021-64286261
收稿日期: 2008-09-10 修回日期: 2008-10-17
接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-18

Recent advances in molecular mechanisms of hepatic gluconeogenesis

Xiang-Hui Han, Guang Ji

Xiang-Hui Han, Guang Ji, Institute of Gastroenterology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Supported by: National Science Foundation of China, No. 30873260; the Project for Elitists in New Century of the Ministry of Education, No. NCET07-0563; and the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. J50305
Correspondence to: Guang Ji, Institute of Gastroenterology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping South Road, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com
Received: 2008-09-10 Revised: 2008-10-17
Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-18

Abstract

As an important part of glucose metabolism in liver, hepatic gluconeogenesis is regulated by a series of transcription factors. FoxO1, CREB and PGC-1 α cross talk with insulin- or glucagon-responsive transcription genes encoding the rate-limiting enzymes such as glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), which stimulate hepatic gluconeogenesis. In addition, many regulators such as orphan nuclear receptor Nur77 and TR4, cytokines resistin and adiponectin, free fatty acids, directly bound to transcription factors, repress or enhance their activity, hence affect the transcription. In insulin-resistance diseases, high blood glucose is often induced by the disturbed hepatic gluconeogenesis, and the transcription factors in gluconeogenic signal pathways are potential therapeutic target.

So controlling these transcription factors can decrease hepatic glucose production and effectively treat insulin-resistance syndrome.

Key Words: Hepatic gluconeogenesis; Transcription factors; Glucose-6-phosphatase; Phosphoenolpyruvate carboxykinase

Han XH, Ji G. Recent advances in molecular mechanisms of hepatic gluconeogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3659-3665

摘要

肝脏糖异生是肝糖代谢的重要组成部分, 受一系列转录因子的调控, 其中FoxO1、CREB、PGC-1 α 与激素和糖异生限速酶葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCK)编码基因的串话是决定糖异生启动的关键环节. 另外诸多因素, 如孤儿核受体Nur77和TR4、细胞因子抵抗素和脂联素、游离脂肪酸直接与转录因子结合, 通过多种信号转导通路抑制或增强转录因子的活性, 从而影响糖异生限速酶编码基因的转录. 肝脏糖异生紊乱导致的肝糖输出增多是机体肝脏胰岛素抵抗发生的重要诱因, 因此通过干预肝脏糖异生信号通路的不同环节, 减少肝糖生成, 将为治疗肝脏胰岛素抵抗综合征及新药研发提供广阔的前景.

关键词: 肝脏糖异生; 转录因子; 葡萄糖-6-磷酸酶; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶

韩向晖, 季光. 肝脏糖异生的分子机制研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3659-3665
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3659.asp>

0 引言

肝脏是机体能量平衡尤其是糖脂代谢的主要器官, 当机体处于空腹或饥饿状态下, 肝脏通过增强糖异生和糖原分解作用来维持恒定的血糖水平^[1]. 肝糖代谢异常是糖尿病、肥胖、非酒精性脂肪肝等代谢综合征的主要病理要素, 肝脏胰岛素抵抗则是这类疾病发病机制的主要环节, 其最明显的病理生理特点就是糖异生和糖原分

■背景资料

肝脏糖异生是肝糖代谢的重要组成部分, 体内近一半葡萄糖的消耗及重要器官的能量供应都依赖于糖异生作用. 越来越多的证据表明, 肝脏糖异生紊乱与糖尿病、肥胖、非酒精性脂肪肝等胰岛素抵抗类疾病密切相关. 肝脏糖异生信号转导通路中转录因子的研究, 将有助于进一步阐明肝脏糖异生分子机制, 并为治疗此类疾病和研制新药提供重要的靶标.

■同行评议者

汪思应, 教授, 安徽医科大学实验动物中心

■ 研发前沿

葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCK)是肝脏糖异生的限速酶,在机体中存在多种转录因子参与肝脏糖异生功能及关键酶表达的调控。这些信号分子在肝脏糖异生转导通路中的串话及调控G-6-Pase和PEPCK编码基因的潜在机制是近年的研究热点。目前,研究重点在于进一步探求肝脏糖异生的分子机制以及寻找抑制肝脏过度糖异生的有效靶点,从而使肝脏胰岛素抵抗患者的血糖得到更好控制。

解功能发生紊乱导致肝糖输出增多,其中糖异生的作用尤为显著^[2-3]。因此,有效抑制肝脏过度糖异生,减少内源性葡萄糖生成,将是治疗这些疾病的重要靶标之一。

1 肝脏糖异生信号转导通路

糖异生(gluconeogenesis)是指非糖前体,如乳酸、烯丙醇、糖氨基酸和甘油转变为葡萄糖或糖原的过程。体内近一半葡萄糖的消耗及重要器官的能量供应都是依赖于糖异生作用,进行糖异生的器官,首推肝脏。肝脏糖异生作用主要受胰岛素和胰高血糖素的调节,进食或饥饿状态时,这两种激素在血循环中的浓度会发生变化,通过相互拮抗来维持正常的血糖水平。这些变化与编码糖异生途径限速酶的基因表达有关。葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-Pase)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)是糖异生途径的关键酶,其转录的多少,决定着糖异生的速度^[4]。已有的研究证实了胰高血糖素和胰岛素分别通过不同的信号转导通路来发挥调控糖异生的作用: (1)胰高血糖素刺激蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)活化,激活转录因子cAMP效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)并使其磷酸化,磷酸化CREB结合并启动G-6-Pase及PEPCK编码基因,从而上调糖异生作用,增加肝糖输出^[5-6]。(2)胰高血糖素激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1, PGC-1 α),活化的PGC-1 α 与肝细胞核因子4 α (hepatic nuclear receptor 4 α , HNF4 α)结合形成复合物,使之活化,从而启动G-6-Pase和PEPCK编码基因转录^[6-7]。(3)胰岛素通过激活磷脂酰肌醇3激酶/Akt信号转导通路(phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway),使FoxO1转录因子(forkhead transcription factor 1, FoxO1)磷酸化,导致FoxO1从细胞核内排出到细胞质而失去转录活性,抑制G-6-Pase及PEPCK基因表达。当胰岛素水平下降时, FoxO1转录因子与胰岛素受体底物-2(insulin response sequence-2, IRS2)结合,再次活化G-6-Pase及PEPCK编码基因,产生相应的生理作用^[8-9]。

2 肝脏糖异生的关键调控基因

近年来随着对肝脏糖异生调控基因研究的不断深入,人们对肝脏糖异生的分子机制有了进一

步的认识,在其相关信号转导的诸多环节中多种转录因子都参与肝脏糖异生功能及关键酶表达的调控。

2.1 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因PCK1 PEPCK是调控糖异生及甘油新生(glycerogenesis, 参与脂质新生过程)的关键酶, PEPCK有两种同工酶(isozymes),一种是位于线粒体的PEPCK-M; 另一种是位于细胞质的PEPCK-C^[10]。PEPCK-C是催化糖异生第一步关键反应的酶, PCK1作为PEPCK-C的编码基因,是与糖尿病等代谢性疾病相关联的众多基因之一,其基因突变会导致过度糖异生作用,引起肝糖输出增加。大量证据表明PEPCK-C活力与血糖控制有直接的相关性。糖尿病db/db小鼠转染表达PCK1 RNAi腺病毒后,动物体内PEPCK-C mRNA和蛋白水平降低,极大改善高血糖和高胰岛素血症、降低甘油三酯及升高总胆固醇、HDL水平;增强肝脏、肌肉及脂肪组织的胰岛素信号转导水平;下调肝脏糖异生通路中关键基因FoxO1、HNF4 α 、PGC-1 α 表达及限速酶G6Pase的转录,并消除Sirt1(氧化还原态敏感元件)调控肝脏糖异生的作用。这些结果为PEPCK-C及其编码基因成为治疗代谢综合征疾病新靶点提供了有利的证据^[11]。与之相反,正常小鼠整体或组织特异性敲除PCK1基因后, PEPCK-C发生过度表达,引起糖尿病、肥胖、脂肪营养障碍、脂肪肝甚至死亡。肝脏PCK1基因敲除小鼠,肝脏出现高于正常大约7倍的PEPCK-C水平,导致肝脏糖异生显著增强,肝糖输出增加,而Krebs循环中草酰乙酸盐代谢能力的丧失,导致脂肪肝;当脂肪组织PCK1基因敲除后,甘油新生能力丧失和脂肪酸酯化降低,导致肥胖或脂肪营养障碍; PCK1基因整体敲除小鼠通常在出生2-3 d内会死亡,其原因并不是由于低血糖,而是由于Krebs循环减慢约为正常水平的10%^[12]。研究还发现PEPCK同工酶异常表达有两种PEPCK基因编码,即PCK1和PCK2,这两种基因在人类可能产生相似的结果^[13]。

2.2 FoxO1和Foxa2 FoxO1和Foxa2是叉头框/翼螺旋转录因子家族(forkhead transcription factor)的两个成员,是肝脏用来监测脂质和葡萄糖代谢与循环胰岛素水平的传感器(sensor)^[14]。作为Akt的直接作用靶点,这两个转录因子控制着胰岛素的糖脂代谢作用。Foxa2是调节机体肝脂代谢的关键开关且能增加肝脏对胰岛素的敏感性,减少葡萄糖产生,而FoxO1主要作用是促进空腹时肝脏糖异生,增加肝糖输出^[15-16]。

Stoffel *et al*研究证实, (1)正常情况下, 胰岛素信号转导途径调节FoxO1和Foxa2, 形成正常糖代谢及肝脏脂肪存贮及氧化的平衡. (2)轻度胰岛素抵抗时, 活性降低的胰岛素信号途径使FoxO1激活, 导致葡萄糖异生增加和高血糖; 然而Foxa2对胰岛素更敏感, 因而仍然能被抑制, 导致脂质氧化降低和脂肪肝. (3)严重胰岛素抵抗时, 胰岛素信号转导途径几乎不能被激活, 使FoxO1和Foxa2都被激活, 导致葡萄糖异生增加及高血糖, 脂肪酸氧化增加, 并导致酮症酸中毒^[17]. FoxO1转录因子是胰岛素活性的重要靶点. 通过腺病毒介导和转基因研究发现, FoxO1过度表达小鼠表现出糖耐量损伤, 肝脏糖原水平和脂肪沉积降低; 而FoxO1功能缺失小鼠则表现出肝脏糖异生抑制, 葡萄糖利用增强和胰岛素敏感性增加. 高脂喂饲的肥胖小鼠和糖尿病db/db小鼠肝脏中FoxO1转录活性明显增加, 从而导致PGC-1 β , 脂肪酸合成酶及乙酰CoA羧化酶表达的上调. 这些结果表明了FoxO1表达紊乱可以损伤胰岛素调节肝脏糖脂代谢的能力^[18]. 应用基因矩阵分析发现FoxO1能通过调控多种代谢通路增加肝糖输出. 与野生型小鼠比较, FoxO1转基因小鼠肝脏糖异生、甘油转运、氨基酸分解代谢相关基因表达水平升高, 而糖酵解、脂肪合成、甾醇合成等糖利用通路相关基因表达被抑制. 而肝细胞腺病毒转染研究也发现, FoxO1刺激肝脏糖异生基因表达而抑制糖酵解和脂肪合成相关基因表达包括葡萄糖激酶和固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c)^[19].

2.3 转录辅助激活因子PGC-1 在饥饿状态下, 肝糖输出和脂肪酸氧化是维持体内能量代谢平衡的基本条件, 肝脏中葡萄糖生成和脂肪酸氧化是通过复杂的转录调节因子网络来调控, 其中转录辅助激活因子过氧化物酶增殖体激活受体 γ 共激活蛋白1家族(peroxisome proliferators-activated receptor- γ coactivator-1, PGC-1)在肝脏糖脂代谢中发挥重要作用. 已有研究证实, PGC-1家族对细胞能量代谢有多方面的调控作用包括线粒体生化功能、肝脏糖异生及脂肪酸 β 氧化等^[20]. PGC-1家族有两种亚型: PGC-1 α 和PGC-1 β , 两者是具有序列和组织分布相似性的同系物. 两种亚型通过氨基端的LXXLL保守序列与核受体发生交互作用, 保守肽序列的缺失将会降低PGC-1对磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶和肉毒

碱棕榈酰基转移酶的诱导水平^[21]. 研究发现, 大鼠肝脏和肝细胞的PGC-1 α 和PGC-1 β 对氧化代谢中线粒体基因表达具有类似的诱导作用, 但这两种辅激活因子对肝脏糖代谢作用截然不同, PGC-1 α 能够激活大鼠肝脏和肝细胞糖异生相关基因的表达, 而PGC-1 β 却几乎没有作用. 在1型和2型糖尿病患者肝脏中, PGC-1 α mRNA水平升高, PGC-1 α 激活肝脏糖异生相关基因HNF4 α 和FoxO1的表达, 导致肝糖输出增加^[22]. 对3种胰岛素缺陷小鼠的研究也发现, PGC-1 α 在胰岛素缺陷小鼠肝细胞中强烈诱导, 从而启动肝脏糖异生关键酶PEPCK和G-6-Pase的完整程序, 导致肝糖输出增加. 在此过程中, PEPCK启动因子的活化需要糖皮质激素受体和肝脏转录因子HNF-4 α 的共同作用, 后两者则由PGC-1诱导活化^[23]. 以上结果表明PGC-1 α 作为肝脏胰岛素/CAMP轴的中心靶点是肝脏糖异生的关键调控基因. 通过对野生型和PGC-1 α 缺陷小鼠肝脏代谢功能的研究发现, PGC-1 α 不仅与调控肝脏糖异生功能有关, 还能影响肝脏中其他代谢途径. 慢性PGC-1 α 缺陷小鼠, 首先出现肝脏糖异生功能下降, 肝糖输出减少, 随之引起三羧酸循环和线粒体脂肪酸氧化代谢的下降, 且编码三羧酸循环和脂肪酸氧化相关酶基因的表达下调; 而野生型小鼠由于PGC-1 α 高度表达, 三羧酸循环和线粒体脂肪酸氧化代谢被激活. 但令人惊奇的是, 无论在进食或空腹状态下, 这种PGC-1 α 缺陷小鼠的PGC-1 α 目的基因表达水平与野生型小鼠比较并无改变^[24]. 最新的研究报道, 肝脏中存在一种糖脂代谢重要的调节因子沉默调节蛋白1(SIRT-1), 在机体在营养失衡的情况下, 他通过PGC-1 α 脱乙酰作用调控肝脏糖异生功能. SIRT1敲除能够引起温和的低血糖, 增加机体葡萄糖和胰岛素敏感性, 降低葡萄糖输出, 还能降低血清胆固醇及肝脏游离脂肪酸和胆固醇水平, 而SIRT1过度表达将会逆转这种现象. 因此SIRT1可能成为控制某些代谢性疾病高血糖和高胆固醇重要的治疗靶点^[25].

2.4 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白CREB及其辅激活物TORC2 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白CREB是一种重要的核转录因子, 为碱性亮氨酸拉链(bZIP)家族成员之一, 其蛋白单体主要包括激酶诱导域(KID)、碱性域和亮氨酸拉链模序. 早期研究认为, CREB是启动糖异生的关键调控因子, 当CREB与CREB结合蛋白(CBP)结合

■ 相关报道

研究发现, 在1型和2型糖尿病患者肝脏或胰岛素缺陷小鼠的肝细胞中, PGC-1 α mRNA水平明显升高, PGC-1 α 诱导激活肝脏糖异生相关基因HNF4 α 和FoxO1的表达, 从而启动肝脏糖异生关键酶PEPCK和G-6-Pase的完整程序, 导致肝糖输出增加. 以上结果说明PGC-1 α 作为肝脏胰岛素/CAMP轴的中心靶点是肝脏糖异生的关键调控基因, 可能成为糖尿病等代谢综合征理想的治疗靶标.

■创新盘点

本文系统全面地介绍了肝脏糖异生信号转导通路及一些重要的转录因子如关键调控基因(PCK1、FoxO1、CREB、PGC-1 α)、孤儿核受体(Nur77和TR4)、脂肪细胞因子(抵抗素和脂联素)、游离脂肪酸等在肝脏糖异生信号调节中的作用及分子机制的最新研究进展。

成复合物后,激活G-6-Pase及PEPCK基因,启动糖异生^[26-27]。最新的研究发现,CREB辅激活物雷帕霉素靶蛋白复合物2(TORC2)是控制糖异生的“分子开关”。空腹状态下,胰高血糖素刺激TORC2去磷酸化,进入核内与CREB结合启动糖异生相关基因的转录^[28]。正常的小鼠转染表达TORC2的重组腺病毒,几天后小鼠空腹血糖升高,而同时转染表达TORC2 RNAi腺病毒的小鼠出现了低血糖症,并监测到空腹时糖异生受到抑制^[29]。Koo *et al*认为, TORC2主要在肝细胞中表达,当肝细胞内cAMP增加使TORC2表达增加,导致其下游PEPCK、G-6-Pase、PGC-1基因的表达式增加,而这种效应能够被CREB抑制剂减弱,说明TORC2的表达式依赖于CREB, TORC2只有与CREB结合才能启动糖异生^[30]。因此,抑制TORC2的脱磷酸或进入核内,可以减少肝糖生成,从而有望成为治疗代谢性疾病的有效靶点。

3 孤儿核受体家族(orphan nuclear receptor)

孤儿核受体是核受体超家族中较独特的成员,他参与了糖类、脂类及胆固醇和类固醇激素的代谢,可能是体内细胞基本功能的重要调节因子^[31]。作为即刻早期基因的产物,孤儿受体NR4A核受体家族是肝糖异生激素转导通路下游cAMP活化的调控基因。NR4A核受体家族包括Nur77(NR4A1)、Nurr1(NR4A2)、NOR1(NR4A3)3个转录因子蛋白,他们结构中的一个序列具有高度同源性,他们或以同二聚体形式,或以家族内部成员之间结合形成的异二聚体形式,与NGFI-B的应答元件(responsive element, NBRE)调节元件结合,发挥转录调节作用。作为即刻早期基因的产物, NR4A核受体家族是肝糖异生激素转导通路下游cAMP活化的调控基因,当机体在空腹状态时,肝脏中Nur77、Nurr1和NOR1的表达式由胰高血糖素反应性cAMP轴诱导产生^[32-33]。通过转染表达Nur77腺病毒发现,肝脏糖异生相关基因表达上调,从而刺激体内外肝糖生成及升高血糖水平;相反, Nur77受体抑制剂则能对抗糖尿病db/db小鼠肝脏糖异生相关基因的异常表达并降低血糖水平。这些结果提示,孤儿核受体家族对维持血糖稳态具有转录调控作用^[34]。睾丸孤儿核受体4(testicular orphan nuclear receptor 4, TR4)是核受体超家族成员,研究证实他能够通过特殊的转导机制调控肝脏糖异生,即TR4通过TR4反应元件(TR4RE)与肝糖异生关键酶PEPCK基因结合,从

而启动PEPCK基因。应用TR4基因敲除和RNA干扰技术发现,肝细胞内PEPCK基因表达和肝糖输出明显下降;而与此相反, TR4异位表达则能上调小鼠和人肝癌细胞PEPCK基因表达和肝糖输出。体内和体外实验结果表明, TR4调控肝细胞PEPCK基因表达可能是一种新的肝脏糖异生调控通路,对维持机体恒定的血糖水平发挥重要作用^[35]。

4 脂肪细胞因子

脂肪组织被视为人体内最大的内分泌器官,能分泌多种细胞因子如瘦素、脂联素、抵抗素、白细胞介素-6和肿瘤坏死因子- α 等,通过各种机制作用于胰岛素信号转导通路参与机体胰岛素抵抗的发生^[36]。脂联素(adiponectin)被认为是一种抗糖尿病的脂肪细胞因子,他通过抑制肝脏糖异生和刺激肝脏和骨骼肌中脂肪酸氧化,对肝脏糖脂代谢起重要的调控作用。脂联素通过激活肝脏腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)抑制G-6-Pase和PEPCK的表达式,从而抑制肝糖生成^[37]。已有研究显示脂联素差异表达能够调控肝细胞中糖异生,且这种作用是不依赖于胰岛素而独立存在的。通过对肝癌H4IIE细胞腺病毒转染脂联素表达的研究发现,在胰岛素缺乏状态下,脂联素能够抑制肝脏糖异生限速酶G-6-Pase和PEPCK基因的表达式,从而抑制肝糖输出。纯化重组人脂联素也能在胰岛素缺乏状态下降低H4IIE细胞和大鼠原代细胞中肝糖输出量^[38]。通过对脂联素基因剔除小鼠研究发现,基因剔除小鼠出现严重的肝脏胰岛素抵抗,同时伴有胰岛素刺激IRS1和IRS2磷酸化功能受损,肝脏中IRS1蛋白水平降低,另外Akt磷酸化水平也下降,提示脂联素还可能直接或间接通过促进肝糖异生胰岛素信号转导通路,来调控肝糖输出^[39-40]。抵抗素(resistin)是2001年Steppan *et al*首次报道的一种导致胰岛素抵抗的脂肪细胞因子。研究发现正常小鼠敲除抵抗素基因后,肝脏糖异生受损并导致空腹血糖降低,而对这些基因敲除小鼠给予抵抗素治疗则逆转这种情况,使内源性葡萄糖生成增加^[41]。Rangwala *et al*构建抵抗素高表达的转基因动物模型,通过高胰岛素正葡萄糖钳夹试验显示转基因小鼠的肝糖输出较野生型升高8倍,肝脏PEPCK mRNA和G-6-Pase表达式水平明显增加^[42]。Satoh *et al*将携带抵抗素基因的腺病毒转染Wistar大鼠发现,抵抗素高表达可引起糖耐量减退和高胰岛素血症,肝

细胞胰岛素信号转导减弱, 肝糖输出增加, 肝细胞、骨骼肌和脂肪细胞的AMPK磷酸化作用都减弱, 提示抵抗素高表达可抑制AMPK磷酸化^[43]. Banerjee *et al*对抵抗素基因敲除小鼠进行钳夹实验发现, 基因敲除组小鼠的空腹血糖水平明显降低, 葡萄糖输注率减少, 肝细胞内G-6-Pase、PEPCK mRNA水平下降, 说明低水平抵抗素能减少肝糖输出, 改善AMPK活性^[44]. 由此可见, 高抵抗素水平可诱导肝脏胰岛素抵抗发生, 其机制可能是抑制AMPK磷酸化, 上调糖异生关键酶PEPCK和G-6-Pase的表达促进糖异生, 从而使肝糖输出增多.

5 游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)

游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)被认为是与肥胖和糖尿病相关联的重要因子. 人类和动物体内研究已证实FFA是肝糖代谢的重要调节因子, 他能够刺激肝脏糖异生功能, 提高G-6-Pase等肝脏糖异生关键酶的水平, 增加肝糖输出. 研究发现血浆FFA和内源性葡萄糖输出存在密切的相关性, 而FFA的变化伴随糖异生和糖原分解的改变, 当胰岛素分泌受损时FFA对内源性葡萄糖输出的影响更加明显^[45]. 至今FFA的细胞内作用及在调控肝脏糖异生基因转录的相关信号通路仍不十分清楚. 最新的研究发现, p38细胞分裂素(丝裂原)活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, p38)是FFA诱导肝脏糖异生基因转录极其重要的信号因子, FFA能够通过p38降低肝细胞内糖异生功能. 在油酸诱导原代肝细胞胰岛素抵抗实验中发现, p38对肝细胞内糖异生功能具有抑制作用, 且剂量依赖性地降低胰岛素诱导的Akt磷酸化. 而在p38抑制的条件下, 用油酸处理肝细胞, 将不能降低胰岛素诱导Akt磷酸化, p38 α RNA干扰能够阻止油酸降低胰岛素诱导Akt磷酸化的作用. 另外油酸延长处理肝细胞还会降低胰岛素诱导的IRS1/2酪氨酸磷酸化, 但轻度升高IRS1丝氨酸磷酸化及PTEN蛋白水平, PTEN基因敲除能够阻止油酸减少胰岛素诱导Akt磷酸化及抑制肝脏糖异生的作用^[46]. 研究还发现, 肝细胞中中链或长链脂肪酸都能激活p38, 导致PEPCK、G-6-Pase、PGC-1 α 基因转录水平上调. 而FFA诱导的PEPCK和PGC-1 α 基因表达以及肝细胞内糖异生功能都可能因p38抑制被阻断. 另外游离脂肪酸也能通过p38刺激cAMP反应元件结合蛋白磷酸化, 反之未磷酸化CREB过度表达则会阻止游离脂肪酸诱导PEPCK基因活化, 而游离脂肪酸激活p38需要蛋白激酶C- δ

的参与. 这些结果提示p38在FFA调控肝脏糖异生基因转录中具有重要的作用, 他与已知的糖异生调控基因PGC-1 α 和CREB共同组成游离脂肪酸调控肝脏糖异生转导通路中重要的信号分子^[47].

6 结论

肝脏糖异生作为肝脏糖代谢重要的组成部分, 受一系列被称为转录因子开关的调控. 在肝脏糖异生复杂的信号传导通路中, FoxO1、CREB及其辅激活物TORC2、PGC-1 α 是调控糖异生的关键转录基因, 他们与激素和糖异生限速酶基因的串话及磷酸化或脱磷酸是决定糖异生启动的关键环节. 另外一些孤儿核受体如Nur77和TR4、脂肪细胞因子如抵抗素和脂联素、FFA均参与肝脏糖异生信号调节, 这些调节因子直接与转录因子结合, 通过多种信号转导通路抑制或增强转录因子的活性, 从而影响糖异生关键酶编码基因转录. 肝脏胰岛素抵抗是肥胖、非酒精性脂肪肝、2型糖尿病等胰岛素抵抗综合征发生发展中的主要机制, 肝胰岛素抵抗类疾病已成为最活跃的研究领域之一, 肝脏糖异生素乱导致的肝糖输出增多是机体肝脏胰岛素抵抗发生的重要诱因. 近年来, 随着转基因和基因敲除技术不断发展, 肝脏糖异生通路中许多新的信号分子被发现, 如最新的研究发现, 脂质磷酸酯酶SHIP2是胰岛素信号转导途径至关重要的负调节蛋白, SHIP2基因发生突变与糖尿病密切相关. 研究表明, 一种肝脏中特异性表达的SHIP2显性负性突变体能够提高高糖和高胰岛素KKA(y)小鼠胰岛素诱导的Akt磷酸化水平, 导致PEPCK和G-6-Pase蛋白水平显著下降, 随之糖异生作用降低, 肝糖输出减少^[48]. 美国阿拉巴马大学(UAB)研究人员也鉴定出与胰岛素抵抗相关两基因NR4A3和NR4A1, 从而为2型糖尿病和其他代谢综合征的治疗提供了一条新途径^[33]. 新的发现提示研究人员可以通过促进或抑制这些信号分子表达或活性进行药物研发及分子筛选, 有针对性的干预肝脏糖异生信号通路的不同环节, 纠正异常的糖异生功能, 从而为治疗和预防肝脏代谢性疾病提供广阔的前景. 而揭示肝脏糖异生信号分子之间交互作用的潜在机制, 逐步完善肝脏糖异生途径的转录体系, 则是未来重要的研究方向.

7 参考文献

- 1 Staehr P, Hother-Nielsen O, Beck-Nielsen H. The

■同行评价

本文较全面的叙述了肝糖异生的分子生物学机制, 基本整合了目前糖异生研究的进展, 尤其是对近年来研究的热点调控基因FoxO1、CREB、PGC-1 α 等作了较深入的介绍, 目前国内尚未见相关报道.

- role of the liver in type 2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2004; 5: 105-110
- 2 Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 2001; 414: 821-827
- 3 赵惠中, 萧建中, 杨文英, 王娜, 王昕, 陈晓平, 卜石. 肝脏胰岛素抵抗与肝糖输出调控基因表达的关系. *中华肝病杂志* 2006; 14: 45-48
- 4 Goto M, Yoshioka T, Battelino T, Ravindranath T, Zeller WP. TNF α decreases gluconeogenesis in hepatocytes isolated from 10-day-old rats. *Pediatr Res* 2001; 49: 552-557
- 5 Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 2001; 413: 179-183
- 6 Kurukulasuriya R, Link JT, Madar DJ, Pei Z, Richards SJ, Rohde JJ, Souers AJ, Szczepankiewicz BG. Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of hepatic glucose production. *Curr Med Chem* 2003; 10: 123-153
- 7 Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 2001; 108: 1359-1367
- 8 Kodama S, Moore R, Yamamoto Y, Negishi M. Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene. *Biochem J* 2007; 407: 373-381
- 9 Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 11285-11290
- 10 Gomez-Valades AG, Vidal-Alabro A, Molas M, Boada J, Bermudez J, Bartrons R, Perales JC. Overcoming diabetes-induced hyperglycemia through inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) with RNAi. *Mol Ther* 2006; 13: 401-410
- 11 Gomez-Valades AG, Mendez-Lucas A, Vidal-Alabro A, Blasco FX, Chillon M, Bartrons R, Bermudez J, Perales JC. Pck1 gene silencing in the liver improves glycemia control, insulin sensitivity, and dyslipidemia in db/db mice. *Diabetes* 2008; 57: 2199-2210
- 12 Beale EG, Harvey BJ, Forest C. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. *Cell Biochem Biophys* 2007; 48: 89-95
- 13 Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C. Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 129-135
- 14 曹冬梅, 卢建. 叉头框(Fox)转录因子家族的结构与功能. *生命科学* 2006; 18: 491-495
- 15 Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 2004; 432: 1027-1032
- 16 Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH. Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest* 2004; 114: 512-520
- 17 杨奎奎. Foxa2与2型糖尿病肝脏胰岛素抵抗的分子病因学-解读2006年美国糖尿病学会(ADA)“杰出科学成就奖”演讲报告. *国际内分泌代谢杂志* 2006; 26: 317-319
- 18 Qu S, Altomonte J, Perdomo G, He J, Fan Y, Kamagate A, Meseck M, Dong HH. Aberrant Forkhead box O1 function is associated with impaired hepatic metabolism. *Endocrinology* 2006; 147: 5641-5652
- 19 Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, Klotsas A, Matika R, Xiao X, Franks R, Heidenreich KA, Sajan MP, Farese RV, Stolz DB, Tso P, Koo SH, Montminy M, Unterman TG. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2006; 281: 10105-10117
- 20 Miao J, Fang S, Bae Y, Kemper JK. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 α . *J Biol Chem* 2006; 281: 14537-14546
- 21 Sadana P, Park EA. Characterization of the transactivation domain in the peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator (PGC-1). *Biochem J* 2007; 403: 511-518
- 22 Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB, Spiegelman BM. PGC-1 β in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem* 2003; 278: 30843-30848
- 23 Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 2001; 413: 131-138
- 24 Burgess SC, Leone TC, Wende AR, Croce MA, Chen Z, Sherry AD, Malloy CR, Finck BN. Diminished hepatic gluconeogenesis via defects in tricarboxylic acid cycle flux in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α)-deficient mice. *J Biol Chem* 2006; 281: 19000-19008
- 25 Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 12861-12866
- 26 Montminy M, Koo SH, Zhang X. The CREB family: key regulators of hepatic metabolism. *Ann Endocrinol (Paris)* 2004; 65: 73-75
- 27 Konno Y, Negishi M, Kodama S. The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008; 23: 8-13
- 28 Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Sreanion RA, Jeffries S, Hedrick S, Xu W, Boussouar F, Brindle P, Takemori H, Montminy M. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 2005; 437: 1109-1111
- 29 Canettieri G, Koo SH, Berdeaux R, Heredia J, Hedrick S, Zhang X, Montminy M. Dual role of the coactivator TORC2 in modulating hepatic glucose output and insulin signaling. *Cell Metab* 2005; 2: 331-338
- 30 Ravnskjaer K, Kester H, Liu Y, Zhang X, Lee D, Yates JR 3rd, Montminy M. Cooperative interactions between CBP and TORC2 confer selectivity to CREB target gene expression. *EMBO J* 2007; 26: 2880-2889
- 31 Pols TW, Ottenhoff R, Vos M, Levels JH, Quax PH, Meijers JC, Pannekoek H, Groen AK, de Vries CJ. Nur77 modulates hepatic lipid metabolism through suppression of SREBP1c activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 910-916
- 32 Chao LC, Zhang Z, Pei L, Saito T, Tontonoz P,

- Pilch PF. Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2152-2163
- 33 Fu Y, Luo L, Luo N, Zhu X, Garvey WT. NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance. *J Biol Chem* 2007; 282: 31525-31533
- 34 Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, Tontonoz P. NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat Med* 2006; 12: 1048-1055
- 35 Liu NC, Lin WJ, Kim E, Collins LL, Lin HY, Yu IC, Sparks JD, Chen LM, Lee YF, Chang C. Loss of TR4 orphan nuclear receptor reduces phosphoenolpyruvate carboxykinase-mediated gluconeogenesis. *Diabetes* 2007; 56: 2901-2909
- 36 祝炼, 袁莉. 胰岛素信号转导与肝胰岛素抵抗. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2420-2423
- 37 Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288-1295
- 38 Zhou H, Song X, Briggs M, Violland B, Salsgiver W, Gulve EA, Luo Y. Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 793-799
- 39 Maeda N, Funahashi T. [Adiponectin knockout mice] *Nippon Rinsho* 2004; 62: 1067-1076
- 40 Yano W, Kubota N, Itoh S, Kubota T, Awazawa M, Moroi M, Sugi K, Takamoto I, Ogata H, Tokuyama K, Noda T, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Molecular mechanism of moderate insulin resistance in adiponectin-knockout mice. *Endocr J* 2008; 55: 515-522
- 41 Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 2003; 111: 225-230
- 42 Rangwala SM, Rich AS, Rhoades B, Shapiro JS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes* 2004; 53: 1937-1941
- 43 Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 2004; 114: 224-231
- 44 Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Pocai A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004; 303: 1195-1198
- 45 Shah P, Basu A, Rizza R. Fat-induced liver insulin resistance. *Curr Diab Rep* 2003; 3: 214-218
- 46 Liu HY, Collins QF, Xiong Y, Moukdar F, Lupo EG Jr, Liu Z, Cao W. Prolonged treatment of primary hepatocytes with oleate induces insulin resistance through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2007; 282: 14205-14212
- 47 Collins QF, Xiong Y, Lupo EG Jr, Liu HY, Cao W. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes. *J Biol Chem* 2006; 281: 24336-24344
- 48 Grempler R, Zibrova D, Schoelch C, van Marle A, Rippmann JF, Redemann N. Normalization of prandial blood glucose and improvement of glucose tolerance by liver-specific inhibition of SH2 domain containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) in diabetic KKAY mice: SHIP2 inhibition causes insulin-mimetic effects on glycogen metabolism, gluconeogenesis, and glycolysis. *Diabetes* 2007; 56: 2235-2241

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》要求所有署名人员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 2008-11-18)

消化系统肿瘤的分子靶向治疗

吴 晴, 李兆申

■背景资料

胃肠道肿瘤发病率在全球范围内位于恶性肿瘤首位,亦是全球癌症导致死亡的主要原因。综合治疗可使消化系统肿瘤疗效有所改善,但目前总体仍处于姑息治疗水平。随着肿瘤分子生物学深入研究和认识,分子靶向药物在消化系统肿瘤治疗中取得了实质性疗效,成为肿瘤治疗的发展方向。

吴晴, 上海交通大学附属第一人民医院肿瘤科 上海市 200080

李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化科 上海市 200433

作者贡献分布: 吴晴与李兆申贡献分布均等; 吴晴与李兆申共同收集分析资料, 完成本课题; 本文由吴晴综述, 李兆申审校。

通讯作者: 李兆申, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院。zhsl@81890.net

电话: 021-25070552

收稿日期: 2007-06-16 修回日期: 2008-10-30

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-18

Molecular targeted therapy of digestive system neoplasms

Qing Wu, Zhao-Shen Li

Qing Wu, Department of Oncology, the First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Professor Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China. zhsl@81890.net

Received: 2007-06-16 Revised: 2008-10-30

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-11-18

Abstract

Malignancies in digestive system (MIDS) are most common and they are major causes of tumor death in the world. Despite recent advances, patients with MIDS still have very poor prognosis. With the development of tumor molecular biology, especially clarification of the mechanism underlying molecular signaling pathway for tumor cell proliferation and growth, researchers have started a new field and direction of clinical tumor therapy, *i.e.*, molecular targeted therapy, which was essentially effective in tumor treatment. This article elucidates the current status, latest advances and developing trends of molecular targeted therapy for MIDS.

Key Words: Molecular targeted therapy; Malignancies in digestive system; Advance

Wu Q, Li ZS. Molecular targeted therapy of digestive system neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3666-3672

摘要

消化系统肿瘤发病率在全球范围内位于恶性肿瘤首位,亦是全球癌症导致死亡的主要原因,且其总体仍处于姑息治疗水平。随着肿瘤分子生物学深入研究和认识,尤其阐明了分子信号通路对肿瘤细胞增殖和生长的作用机制,继而为其特异性靶点而设计的分子靶向药物的开发,开创了临床肿瘤治疗的新领域,在消化系统肿瘤治疗中取得了实质性疗效,成为肿瘤治疗的发展方向。本文对消化系统肿瘤分子靶向治疗药物的最新研究进展作一综述。

关键词: 分子靶向治疗; 消化系统肿瘤; 进展

吴晴, 李兆申. 消化系统肿瘤的分子靶向治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3666-3672

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3666.asp>

0 引言

随着对肿瘤分子生物学研究的深入,尤其随着对分子信号通路调控肿瘤细胞增殖等生物学行为的不断了解,针对特异性靶点而设计的分子靶向药物的应用使消化系统肿瘤治疗取得了令人瞩目的进展^[1]。以下对消化系统肿瘤分子靶向治疗作一综述。

1 靶向治疗现状

分子靶向治疗是一类针对受体、基因和特殊激酶的mAb或小分子化合物。这些药物的共同特点是对正常细胞影响较小,毒性轻微,起效慢,其通过特异性针对肿瘤细胞中的一个或几个靶点从而抑制肿瘤细胞的恶性生物学行为。

1.1 胃肠间质肉瘤(GIST) 伊马替尼(格列卫)治疗高度化放疗抗拒的胃肠间质肉瘤(GIST)成为靶向治疗成功的范例。格列卫是Bcr-Abl酪氨酸激酶的选择性抑制剂,可以特异性抑制c-Abl、Bcr-Abl、PDGFR(血小板源性生长因子受体)以及KIT受体。Demetri *et al*^[2]的多中心研究显示147例晚期GIST经治疗后,PR(部分缓解)53.7%,SD(稳定)27.9%,临床受益81.6%,88%的患者存活1年以上。B2222研究也证实了格列卫治疗进

■同行评议者

曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

展期GIST的有效性,并且提示只要肿瘤可控制,就应坚持服用格列卫,生存方面的结果显示,格列卫在对软组织肉瘤的治疗史上取得了从未达到的效果^[3].鉴于格列卫对GIST具有持久和有效的抗肿瘤作用,在术前新辅助治疗方面也有广阔的应用前景.术前给予格列卫治疗,可以缩小肿瘤体积,减少肿瘤内新生血管,降低手术风险,增加根治手术的可能性,新辅助治疗的时间应持续到格列卫治疗达到最大反应时,目前格列卫新辅助治疗的时间多推荐在6-12 mo^[4].

SU11248是一种口服的,以多个激酶为靶点的靶向治疗药物,涉及到血管内皮细胞生长因子受体(vascular epidermal growth factor receptor, VEGFR)、PDGFR、KIT和FLT-3的作用途径,具有抗血管形成和抗肿瘤增殖的疗效.最新的研究发现, SU11248对于格列卫耐药(IM)的GIST有较好的疗效.因此,临床上SU11248可以用于IM耐药或无法耐受IM的GIST患者的二线治疗^[5].

1.2 胃癌及食管癌 西妥昔单抗(C225)是抗EGFR的人/鼠嵌合的mAb,可特异结合表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的胞外结构域,阻断EGF和TGF- α 诱导的TPK系统活化,从而抑制肿瘤细胞的增殖和转移.研究显示, C225在胃癌及食管癌患者中能够增强传统放疗或化疗的抗肿瘤效果.两个新一代的EGFR mAb-matuzumab(EMD72000)与ABX-EGF(panitumumab),高亲和性的、完全人源化的针对EGFR的mAb,其作用机制和C225相似,但由于其是完全的人源化抗体,防止了HAMA的产生对患者疗效的不良影响.目前EMD72000联合ECX(Epi/DDP/Xel,表阿霉素/顺铂/希罗达)化疗的II/III期临床试验也在进行中^[6-7].

表皮生长因子受体-酪氨酸激酶(EGFR-TK)系统抑制剂OSI-774-埃罗替尼(erlotinib, tarceva)是作用于EGFR-TK系统的小分子化合物,可以自由穿越细胞膜,通过在细胞内与三磷酸腺苷竞争结合受体酪氨酸激酶的胞内区催化部分,抑制磷酸化反应,阻滞向下游增殖信号传导,达到抑制肿瘤细胞增殖的作用. Dragovich *et al*^[8]报道Tarceva治疗胃食管交接部腺癌/胃腺癌的II期临床研究SWOG0127结果,初治的无法手术切除或转移性胃食管交接部/胃腺癌患者给予Tarceva单药 po , PR为9%, PR患者均为胃食管交接部腺癌,胃腺癌无PR患者.胃食管交接部腺癌与胃腺癌的中位生存期(median survival time, MST)分别为6.7 mo与3.5 mo.提示该方案对胃食管交接

部腺癌患者有效,而胃腺癌疗效不佳.

血管形成是实体肿瘤生长必不可少的环节, VEGF是最有效的刺激肿瘤血管形成的因子,他在大部分人类肿瘤中均有过表达,并且VEGF及其受体的表达与肿瘤预后有着密切的关联.贝伐单抗(avastin)是作用于VEGF的人源化mAb.通过和VEGFR特异性结合,阻断VEGFR的活化,从而抑制肿瘤区域血管的形成.

Shah *et al*^[9]采用CPT-11/DDP及avastin治疗47例复治的转移性胃癌/胃食管腺癌患者,治疗进展时间(time to progression, TTP)是8.3 mo. RR(respons rate, $RR = CR + PR$, 缓解率 = 完全缓解+部分缓解)65%, MST 12.6 mo, 研究认为, CPT-11/顺铂/avastin治疗转移性胃癌/胃食管腺癌为有效且治疗毒性可以接受的方案.

bortezomib是一种26S蛋白酶体抑制剂,抑制细胞凋亡. Ocean *et al*^[10]联合bortezomib与CPT-11(125 mg/w)治疗胃癌,其中7例以往未治疗过的患者RR为28%,无进展生存(progression-free survival, PFS)3.5 mo, 中位总生存期(overall survival, OS)10.5 mo. 7例以往治疗过的患者RR为0%, PFS 1.4 mo, OS 9.9 mo. Jatoi *et al*^[11]将化疗Tax/CBP与bortezomib用于胃癌治疗, RR 23%, MST 8.9 mo.

细胞基质金属蛋白酶抑制剂(MMPis, marimastat, BB2516, TA2516),前驱研究未显示RR,但约三成患者在系列切片中发现肿瘤表面的纤维化现象增加而出血现象减少^[12]. Bramhall *et al*^[13]报道有安慰剂对照的III期临床研究结果, marimastat组2年整体存活率较佳(9% vs 3%).

总之,关于胃癌及食管癌靶向治疗的临床试验还远远不够,但2008年美国临床肿瘤年会(ASCO)发布的胃食管癌靶向治疗摘要由2007年的4篇升至17篇.基于多项II期/III期临床研究结果发现,靶向EGFR的小分子TKI对胃癌疗效甚微,对食管癌也仅有中毒的疗效,单抗EGFR抗体却显示良好的疗效^[14],推测TKI治疗前后和抗EGFR抗体治疗前后肿瘤基因谱改变有明显的不同,两类药物治疗后上调或下调的基因并不相同,提示生物学效应亦不同.

1.3 胰腺癌 Xiong *et al*^[15]报道一项用吉西他滨(Gem)联合C225治疗进展期胰腺癌的II期临床研究结果, PR 5例(12.2%), SD 26例(63.4%), TTP 3.8 mo, MST 7.1 mo, 1年PFS率12%, 1年生存率31.7%, 毒性反应可以耐受.与Gem单药相比, MST延长.

Moore *et al*^[16]报道随机对照的III期临床研

■ 相关报道

近年来随着分子生物学及其他基础科学的发展,肿瘤分子靶向治疗的新靶点不断被报道,为消化系统肿瘤分子靶向治疗提供了广阔前景. Gasali *et al*的研究表明格列卫对胃肠间质肉瘤(GIST)无论是辅助还是新辅助治疗均具有显著疗效,格列卫新辅助治疗与手术结合为GIST提供了新的治疗手段.

■创新盘点

本文收集国内外近期文献,尤其是2008年美国ASCO年会最新研究成果,对消化系统肿瘤分子靶向治疗现状、存在的问题及今后多靶点联合阻断的发展方向、治疗策略的运用、亟待解决的问题及研发趋势多个方面作了全面、系统地总结。

究分为Gem+Tarceva和Gem+安慰剂。前组OS 6.24 mo, 1年生存率23%, 生活质量明显改善, 后组OS 5.91 mo, 1年生存率17%, 差异有统计学意义。Kindler *et al*^[17]报道了一项II期临床研究结果, Gem+avastin, RR 19%, MST 8.7 mo, 1年生存率29%, TTP 5.8 mo。Virulizin是一种免疫抑制剂, 可刺激细胞释放TNF和提高机体免疫力。Wright *et al*^[18]报道Gem+Virulizin与Gem+安慰剂的随机对照III期临床研究结果, TTP分别为6.3 mo和6.0 mo, 亚组分析, 在一般状况(performance status, PS)0-1及转移患者中, 生存时间延长, 对这部分人群的获益情况还需进一步确认。

1.4 肝癌 Siegel *et al*^[19]报道的II期临床试验结果显示, 46例晚期肝癌患者接受avastin治疗, RR13%, PFS 6.9 mo, 1年、2年、3年的OS分别为53%、28%、23%。SD大于6 mo者63%, TTP为6.4 mo。Zhu *et al*^[20]报道GEMOX-B方案治疗无法手术切除或转移性肝细胞肝癌II期临床研究结果, 30例可评价疗效患者RR 20%, SD 27%, OS 9.6 mo, PFS 5.3 mo, 3 mo和6 mo的PFS率分别为70%和48%。与治疗相关的III/IV度毒性反应主要为白细胞减少症、一过性转氨酶升高、高血压和疲劳。研究结果提示GEMOX-B方案治疗肝细胞肝癌是安全有效的, PFS结果令人鼓舞, 此方案值得进一步研究。

索拉非尼(BAY43-9006, sorafenib)是多靶点阻断剂, 可阻断Raf/MEK/ERK及VEGFR-2、VEGFR-3等。Abou-Alfa *et al*^[21]的一项II期临床试验, 采用索拉非尼治疗137例无法手术切除的进展期肝细胞癌患者。PR/MR(部分/轻微缓解)2.2%/5.8%; 33.6%的患者SD \geq 16 wk; TTP/OS为4.2 mo/9.2 mo; II/III度不良反应主要包括疲乏(9.5%)、腹泻(8.0%)与手足综合征(5.1%)。治疗前肿瘤表达高水平pERK者的TTP较长。鉴于上述II期临床试验的结果, 目前已展开了数项III期随机临床试验。一项国际多中心研究(SHARP)纳入602例晚期肝细胞癌患者并随机给予入组患者安慰剂或sorafenib以验证疗效, 显示出sorafenib单药组的MST(10.7 mo)显著优越于安慰剂组(7.9 mo)^[22]。另一项旨在研究sorafenib安全性与OS的亚洲多中心随机临床试验正在进行。

Philip *et al*^[23]的II期临床试验中, 38例无法手术的晚期原发性肝细胞癌患者po埃罗替尼(150 mg/d), 结果显示PR 8%, 32%病例随访6 mo肿瘤无进展。Thomas *et al*^[24]报道的II期临床试验中, 40例无法手术的晚期肝细胞癌患者给予Tarceva,

43%治疗结束后4 mo肿瘤无进展, MST 10.75 mo, 因此靶向治疗对于晚期肝癌的治疗前景广阔。

1.5 大肠癌 靶向抑制VEGF的Avastin是FDA批准上市的治疗大肠癌的mAb药物。Hurwitz *et al*^[25]的研究证实Avastin将晚期大肠癌治疗迈向新纪元。在2005-2008年ASCO会议上Hochster *et al*^[26]连续报道了TREE临床试验的结果, 确立了avastin在晚期大肠癌一线治疗中的地位。TREE试验由TREE-1和TREE-2两个试验组成。TREE-1试验比较FOLFOX方案(持续静脉滴注5-FU)、bFOL方案(静脉推注5-FU)和CapeOx方案(po卡培他滨)一线治疗晚期大肠癌的疗效。TREE-2试验则比较上述化疗方案+avastin的疗效。结果显示, FOLFOX方案、bFOL方案和CapeOx方案+avastin与单用化疗相比不但提高了有效率, 还延长了中位无病生存期(disease-free survival, DFS)和OS。最重要的是, TREE试验显示如果合理的使用化疗和靶向治疗可以使晚期大肠癌患者的MST超过2年(FOLFOX+avastin的MST为26.1 mo, CapeOx+avastin的MST为24.6 mo)。

avastin在晚期大肠癌的二线治疗中也取得良好疗效。TRC-301研究显示, avastin+5-FU/CF治疗CPT-11或草酸铂治疗失败的转移性大肠癌患者, RR达4%, PFS 3.5 mo, OS 9.0 mo 5%的患者发生3/4度的出血, 其中3.8%发生消化道出血^[27]。提示avastin+5-FU/CF用于标准治疗失败的患者可能会获得比较满意的客观缓解。avastin在大肠癌辅助治疗方面, 目前有多项临床试验正在进行。NSABP C08试验比较II期或III期大肠癌患者接受FOLFOX6 \pm avastin辅助治疗的疗效。AVANT试验比较FOLFOX4、FOLFOX4+avastin和XELOX+avastin辅助治疗II期或III期大肠癌患者的疗效, 而ECOG5202试验则比较FOLFOX6 \pm avastin和观察在高危II期大肠癌辅助治疗中的作用。这几个临床试验将为avastin在大肠癌辅助治疗中的作用提供进一步的证据。

C225应用于晚期大肠癌的二线治疗显示良好疗效^[28-30], 其在一线治疗中的作用尚在研究。目前多项II期临床试验的初步结果显示C225无论联合以Cap-11还是联合以Oxa为基础的化疗方案一线治疗晚期大肠癌均有较高的有效率, 并且C225与化疗方案的合理组合, 为不可手术的晚期大肠癌转变成可手术的大肠癌、提高治愈率提供了一条新的途径。目前, C225用于大肠癌辅助治疗的两个III期临床试验NCCTG-NO147试验和PETACC-8试验正在进行中。这几

个临床试验将为C225在大肠癌辅助治疗中的作用提供循证医学的证据。

III期临床研究显示ABX-EGF(panitumumab)单药治疗既往治疗失败的转移性结直肠癌可以降低46%的肿瘤进展风险, PR达到8%, 90%的患者发生皮疹, 而皮疹的发生率与患者的中位生存期密切相关。ABX-EGF与化疗联合应用治疗进展期结直肠癌和作为一线辅助化疗的临床研究尚在进行之中。在另一项II期临床研究中, 选择一线治疗失败、EGFR阳性的大肠癌患者148例, 给予ABX-EGF周方案治疗。试验结果显示, 共有15例患者获得PR, 54例获得SD, 其中EGFR表达水平与疗效呈正相关。这两项研究均证实, ABX-EGF对于标准一线治疗失败的转移性大肠癌患者有明显的抗瘤活性。Van Cutsem *et al*^[31]报道了一项III期临床研究的结果。463例既往化疗(包括5-FU、Oxa和Cpt-11)失败的晚期大肠癌患者随机分成两组, 分别接受支持治疗联合panitumumab治疗和单纯支持治疗。结果显示两组的PFS分别为8 wk和7.3 wk, RR在panitumumab组为10%, 对照组0%。在第32周时, panitumumab组存活患者数是对照组的2倍。因此, 美国FDA于2006-09批准panitumumab上市治疗既往化疗(包括5-FU、Oxa和Cpt-11)失败的晚期大肠癌患者。

治疗前可否预测抗EGFR抗体治疗效果? 除EGFR表达水平外, EGFR的状态可能更重要。2008年的ASCO年会中, 多位学者^[32-35]报道了CRYSTAL、OPUS、EVEREST、PRECEPT等II期或III期试验的中期结果, 采用C225与FOLFIRI或FOLFOX联合治疗以及panitumumab单药治疗的结果, 结论是kras是预测治疗缓解情况的生物标志物。kras基因突变的转移性结直肠癌患者不应接受C225单药或联合FOLFIRI/FOLFOX, 或者panitumumab单抗单药作为补救治疗。kras野生型患者缓解率高, MST、PFS延长, 而kras突变者, 连用抗EGFR单抗的缓解率、PFS比单用化疗更低、更短, 但无显著性差异。而且增加抗EGFR单剂量未能克服kras突变, kras和皮肤毒性反应是独立的预后预测因子, 因此, kras是第一个用来选择靶向治疗联合标准化疗作为转移性结直肠癌一线治疗的分子标志物。

PTK787/ZK222584(vatalanib)为抑制VEGF受体以抗血管和淋巴管生成的新型酞嗪类的小分子po化合物, 855例既往接受过CPT-11治疗的晚期大肠癌患者接受FOLFOX4方案±vatalanib二

线治疗, 结果发现, vatalanib可提高患者的PFS(5.5 mo vs 4.1 mo), 到目前为止OS无差别(12.1 mo vs 11.8 mo), 而最终结果有待于进一步随访。

SU5416是一种小分子化合物, 作用于VEGFR的酪氨酸激酶系统, 研究显示SU5416能抑制肿瘤转移、微血管形成和细胞增殖。Lockhart *et al*^[36]报道的I期研究显示, SU5416联合标准IFL方案治疗转移性结直肠癌, 研究纳入患者11例, 确认的PR达27%, 未确认PR达18%, SD为36%。彩色多普勒超声检测出肿瘤灌注的变化与治疗效果之间存在相关性: 肿瘤局部灌注降低与临床疗效相关, 肿瘤灌注增加者病情呈现进展, 其疗效有待进一步的临床研究。

法呢基转移酶(FT)是在蛋白质的翻译后修饰过程中起作用的, 他将法呢基加到蛋白质上, 使之具有更好的脂溶性, 易于在细胞膜上的定位。因此法呢基转移酶抑制剂(FTI)类药物可以作用于TK系统的各级定位于细胞膜上的酶类, 抑制其翻译后修饰, 阻断其在细胞膜上的定位。但目前由于其作用于肿瘤细胞的同时也作用于正常细胞, 而且对于FTI作用的确切机制尚不完全明了, 使其应用受到限制。较有前景的药物有flavopiridol, 细胞周期CDK抑制剂, 作用于细胞周期依赖性激酶。研究发现flavopiridol能增强许多化疗药物的疗效。Aklilu *et al*^[37]报道的I期临床研究显示flavopiridol治疗20位未化疗的转移性大肠癌患者, 8例SD并维持7 wk, TTP 8 wk, MST 65 wk。III/IV度的主要不良反应有腹泻、疲劳和高糖血症, 分别为21%, 11%和11%。其他该类物质, 如R115777、SCH66336在研究中也显出一定效果, 但对于患者有效率和生存时间无明显改善。

近年来人们发现逐渐发现celecoxib有抗血管生成和阻断肿瘤细胞生长的作用。基于以上发现, 人们开始了celecoxib联合标准化疗方案治疗晚期结直肠癌的研究。但最近的一项II期临床研究联合celecoxib与IFL方案治疗晚期结直肠癌患者, 结果并未显示加用celecoxib能提高疗效, 目前celecoxib更多地用于预防家族性非腺瘤性息肉病恶变为大肠癌。大肠癌靶向治疗虽然显示了一定的治疗效果, 但是如何将靶向治疗和传统治疗相结合, 如何进行用药的个体化以及如何降低耐药的发生这些问题仍然有待解决。

2 多靶点联合阻断的发展方向

目前证实, 针对肿瘤多靶点进行抑制可取得

■名词解释

HAMA反应: 鼠源性单抗产生人抗鼠抗体反应。

■同行评价

本文反映了当前消化系统肿瘤分子靶向治疗进展, 比较系统全面, 对于指导临床工作有一定的价值。

相对单靶点抑制更大的疗效, 其原因大多数实体肿瘤都是多靶点多环节的调控过程。各种靶向治疗的联合应用已开始进行临床试验。Baselga *et al*^[38]报道的Ⅱ期临床研究应用C225联合gefitinib治疗9例大肠癌患者, 其中5例PR。此结果支持对双重抑制EGFR信号传导通路的进一步研究。Saltz *et al*^[39]设计的BOND-2试验将83例既往CPT-11治疗失败的晚期大肠癌患者随机分成两组, 分别接受CPT-11+avastin+C225或avastin+C225治疗, 两组的RR为37%和20%, TTP分别为7.3 mo和4.9 mo, OR分别为14.5 mo和11.4 mo。两组患者副反应相似。作者认为这两种方案是有效的、可以耐受的, 值得进一步研究, 所以多靶点联合治疗前景广阔。

3 结论

随着肿瘤靶向药物的开发及应用, 越来越多的靶向药物涌入临床, 为临床肿瘤专家提出了一些新的问题^[40]。肿瘤发生发展往往存在多靶点、多环节调控过程, 因此抑制的靶点越多也就意味着治疗越有效^[41-42]。发现新的靶点、开发多靶点的靶向治疗药物已经成为肿瘤靶向治疗的重要发展方向^[43]。如何选择适合不同靶向治疗的患者^[1-4,32-35,44]、如何合理的使用靶向治疗药物^[45]、怎样克服靶向药物的耐药性, 提高剂量对哪些肿瘤有效^[2,35,46]、靶向治疗药物与化疗药物怎样组合才能达到最佳疗效^[47]、怎样有效判断靶病灶被抑制的程度及准确评价临床治疗的效果^[1,22,48-49]、如何利用临床和分子指标选择患者和预测疗效^[32-35,41-42,50]、如何研究利用肿瘤的基因表型从而在循证医学基础上指导更高阶段的个体化治疗^[1,43-46]、如何在深入发展细胞毒性药物的基础上进一步开发分子靶向性药物, 均需要我们在临床与基础实验紧密结合前途下不断探索^[51]。随着对人类基因组中功能性基因组和支配肿瘤的基因组的深入了解并结合高新技术如高通量药物筛选等手段的有效运用, 肿瘤的治疗必将跨入一个全新的时代。

4 参考文献

- Ohtsu A. Chemotherapy for metastatic gastric cancer: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2008; 43: 256-264
- Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H. Efficacy and safety of

- imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347: 472-480
- Blanke CD, Demetri GD, von Mehren M, Heinrich MC, Eisenberg B, Fletcher JA, Corless CL, Fletcher CD, Roberts PJ, Heinz D, Wehre E, Nikolova Z, Joensuu H. Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT. *J Clin Oncol* 2008; 26: 620-625
- Casali PG, Jost L, Reichardt P, Schlemmer M, Blay JY. Gastrointestinal stromal tumors: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2008; 19 Suppl 2: ii35-ii38
- Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 368: 1329-1338
- Vanhoefer U, Tewes M, Rojo F, Dirsch O, Schleucher N, Rosen O, Tillner J, Kovar A, Braun AH, Trarbach T, Seeber S, Harstrick A, Baselga J. Phase I study of the humanized antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody EMD72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 175-184
- Kim T. Technology evaluation: Matuzumab, Merck KGaA. *Curr Opin Mol Ther* 2004; 6: 96-103
- Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Benedetti JK, Baker AF, Hackett CB, Urba SG, Zaner KS, Blanke CD, Abbruzzese JL. Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4922-4927
- 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
- Ocean AJ, Schnoll-Sussman F, Chen X, Holloway S, Wright J, Wadler S. Phase II study of PS-341 (VELCADE, bortezomib) with or without irinotecan in patients (pts) with advanced gastric adenocarcinomas (AGA). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; 98 [abstr 31]
- Jatoi A, Dakhil SR, Foster NR, Ma C, Rowland KM Jr, Moore DF Jr, Jaslowksi AJ, Thomas SP, Hauge MD, Flynn PJ, Stella PJ, Alberts SR. Bortezomib, paclitaxel, and carboplatin as a first-line regimen for patients with metastatic esophageal, gastric, and gastroesophageal cancer: phase II results from the North Central Cancer Treatment Group (N044B). *J Thorac Oncol* 2008; 3: 516-520
- Tierney GM, Griffin NR, Stuart RC, Kasem H, Lynch KP, Lury JT, Brown PD, Millar AW, Steele RJ, Parsons SL. A pilot study of the safety and effects of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat in gastric cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 563-568
- Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients

- with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer* 2002; 86: 1864-1870
- 14 Dy GK, Adjei AA. Systemic cancer therapy: evolution over the last 60 years. *Cancer* 2008; 113: 1857-1887
 - 15 Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff RA, Deutsch J, Needle M, Abbruzzese JL. Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2610-2616
 - 16 Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960-1966
 - 17 Kindler HL, Friberg G, Singh DA, Locker G, Nattam S, Kozloff M, Taber DA, Karrison T, Dachman A, Stadler WM, Vokes EE. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8033-8040
 - 18 Wright JA, Osterlee J, Fekete S, Lee Y, Young AH. A phase III trial of virulizin plus gemcitabine vs. gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: Results of subgroup analysis. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2006; 24(18s): [abstr 4161]
 - 19 Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, Lehrer D, Goldenberg A, Knox JJ, Chen H, Clark-Garvey S, Weinberg A, Mandeli J, Christos P, Mazumdar M, Popa E, Brown RS Jr, Rafii S, Schwartz JD. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2992-2998
 - 20 Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, Clark JW, Muzikansky A, Horgan K, Sheehan S, Hale KE, Enzinger PC, Bhargava P, Stuart K. Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1898-1903
 - 21 Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B, Taylor I, Moscovici M, Saltz LB. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4293-4300
 - 22 Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-390
 - 23 Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, Donehower RC, Fitch T, Picus J, Erlichman C. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6657-6663
 - 24 Thomas MB, Chadha R, Glover K, Wang X, Morris J, Brown T, Rashid A, Dancey J, Abbruzzese JL. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 1059-1067
 - 25 Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, Hambleton J, Novotny WF, Kabbinnavar F. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3502-3508
 - 26 Hochster HS, Hart LL, Ramanathan RK, Childs BH, Hainsworth JD, Cohn AL, Wong L, Fehrenbacher L, Abubakr Y, Saif MW, Schwartzberg L, Hedrick E. Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the TREE Study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3523-3529
 - 27 Chen HX, Mooney M, Boron M, Vena D, Mosby K, Grochow L, Jaffe C, Rubinstein L, Zwiebel J, Kaplan RS. Phase II multicenter trial of bevacizumab plus fluorouracil and leucovorin in patients with advanced refractory colorectal cancer: an NCI Treatment Referral Center Trial TRC-0301. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3354-3360
 - 28 Lilenbaum RC. The evolving role of cetuximab in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4432s-4435s
 - 29 Galizia G, Lieto E, De Vita F, Orditura M, Castellano P, Troiani T, Imperatore V, Ciardiello F. Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3654-3660
 - 30 Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
 - 31 Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1658-1664
 - 32 Van Cutsem E, Lang I, D'haens G, Moiseyenko V, Zaluski J, Folprecht G, Tejpar S, Kisker O, Stroh C, Rougier P. KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol* 2008; 26(s): [abstr 2]
 - 33 Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, De Braud FG, Volovat C, Nippgen J, Stroh C, Celik I, Koralewski P. KRAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J Clin Oncol* 2008; 26(s): [abstr 4000]
 - 34 Tejpar S, Peeters M, Humblet Y, Vermorken JB, De Hertogh G, De Roock W, Nippgen J, von Heydebreck A, Stroh C, Van Cutsem E. Relationship of efficacy with KRAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer(mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J Clin Oncol* 2008; 26(s): [abstr 4001]
 - 35 Cohn AL, Smith DA, Neubauer MA, Houston G, Khandelwal P, Wiggans RG, Suzuki S, Yassine M, Deeter R, Sikorski R. Panitumumab (pmab) regimen evaluation in colorectal cancer to estimate primary response to treatment (PRECEPT): Effect of KRAS mutation status on second-line treatment (tx) with

- pma and FOLFIRI. *J Clin Oncol* 2008; 26(s): [abstr 4127]
- 36 Lockhart AC, Cropp GF, Berlin JD, Donnelly E, Schumaker RD, Schaaf LJ, Hande KR, Fleischer AC, Hannah AL, Rothenberg ML. Phase I/pilot study of SU5416 (semaxinib) in combination with irinotecan/bolus 5-FU/LV (IFL) in patients with metastatic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2006; 29: 109-115
- 37 Aklilu M, Kindler HL, Donehower RC, Mani S, Vokes EE. Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 1270-1273
- 38 Baselga J, Schoffski P, Rojo F, Dumez H, Ramos FJ, Macarulla T, Cajal R, Kisker O, Van Oosterom A, Tabernero J. A phase I pharmacokinetic (PK) and molecular pharmacodynamic (PD) study of the combination of two anti-EGFR therapies, the monoclonal antibody (MAb) cetuximab (C) and the tyrosine kinase inhibitor (TKI) gefitinib (G), in patients (pts) with advanced colorectal (CRC), head and neck (HNC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2006; 24(18s): [abstr 3006]
- 39 Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, Kemeny NE, Hollywood EM, Gonen M, Quinones M, Morse M, Chen HX. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4557-4561
- 40 Christensen E. Choosing the best endpoint. *J Hepatol* 2008; 49: 672-673
- 41 Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 579-591
- 42 Ellis LM, Hicklin DJ. Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6371-6375
- 43 Abou-Alfa GK, Venook AP. The impact of new data in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2008; 10: 199-205
- 44 Galle PR. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma - We have won a battle not the war. *J Hepatol* 2008; 49: 871-873
- 45 Zender L, Kubicka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Onkologie* 2008; 31: 550-555
- 46 Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, Ryan CW, von Mehren M, Benjamin RS, Raymond AK, Bramwell VH, Baker LH, Maki RG, Tanaka M, Hecht JR, Heinrich MC, Fletcher CD, Crowley JJ, Borden EC. Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J Clin Oncol* 2008; 26: 626-632
- 47 Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, Schwartz M, Lotze M, Talwalkar J, Gores GJ. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698-711
- 48 Simpson D, Keating GM. Sorafenib: in hepatocellular carcinoma. *Drugs* 2008; 68: 251-258
- 49 Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grunwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008; 372: 449-456
- 50 Hofmann M, Stoss O, Shi D, Buttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Ruschoff J, Henkel T. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52: 797-805
- 51 Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1312-1327

编辑 史景红 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 2008-11-18)

T α 1对食管癌细胞RNA转染的脐血树突状细胞诱导T细胞杀瘤活性的影响

王健, 苏安英, 柴锡庆, 门金娥, 郑海萍, 张向阳, 田珂

王健, 苏安英, 柴锡庆, 河北工程大学教务处 河北省邯郸市 056038
门金娥, 郑海萍, 张向阳, 田珂, 河北工程大学附属医院中心实验室 河北省邯郸市 056038
河北省科技研究与发展计划资助项目, No. 06276102D
作者贡献分布: 此课题由王健, 苏安英及柴锡庆设计; 研究过程由王健, 苏安英及门金娥操作完成; 研究所用试剂及分析工具由郑海萍与张向阳提供; 数据分析由田珂完成; 本论文写作由王健, 苏安英及田珂完成。
通讯作者: 王健, 056038, 河北省邯郸市光明南大街199号, 河北工程大学教务处, wjhdyz@sina.com
电话: 0310-8576106
收稿日期: 2008-06-23 修回日期: 2008-10-23
接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

Effect of T α 1 on ESCC RNA-transfected human cord blood dendritic cells induced antitumor activity of cytotoxic T lymphocytes

Jian Wang, An-Ying Su, Xi-Qing Chai, Jin-E Men, Hai-Ping Zheng, Xiang-Yang Zhang, Ke Tian

Jian Wang, An-Ying Su, Xi-Qing Chai, Department of Educational Administration, Hebei University of Engineering, Handan 056038, Hebei Province, China
Jin-E Men, Hai-Ping Zheng, Xiang-Yang Zhang, Ke Tian, Department of Central Laboratory, Hospital Affiliated to Hebei University of Engineering, Handan 056038, Hebei Province, China
Supported by: the Research and Development Plan of Science and Technology of Hebei Province, No. 06276102D
Correspondence to: Jian Wang, Department of Educational Administration, Hebei University of Engineering, 199 Guangmingnan Street, Handan 056038, Hebei Province, China. wjhdyz@sina.com
Received: 2008-06-23 Revised: 2008-10-23
Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate effect of human cord blood dendritic cells (DCs) transfected with RNA of esophageal carcinoma cells on the proliferation of T lymphocyte and on the antitumor activity of cytotoxic T lymphocytes (CTL), and immunoadjuvant effect of T α 1 on human cord blood dendritic cells.

METHODS: The RNA of T.Tn cells were prepared by TRIzol reagent. The cord blood monocytes were cultured to produce DCs with rhSCF,

rhGM-CSF and rhIL-4. The DCs were collected and transfected with tumor cell total RNA. T α 1 was added in culture system to enhance the DCs vaccine. MHC-I, MHC-II and co-stimulatory molecules, CD54, CD80 and CD86 on the surface of DCs were analyzed by FCM. The mixed lymphocyte reaction (MLR) and cytotoxicity of CTLs to T.Tn cells was assayed using MTT colorimetry.

RESULTS: Compared with pre-transfection group, expressions of MHC-I, MHC-II, CD54, CD80 and CD86 (MHC-I: 70.36 ± 6.09 vs 8.17 ± 1.93 ; MHC-II: 72.03 ± 5.32 vs 7.64 ± 5.33 ; CD54: 69.36 ± 7.33 vs 2.05 ± 2.03 ; CD80: 67.21 ± 6.77 vs 2.33 ± 1.65 ; CD86: 68.85 ± 7.41 vs 6.73 ± 1.97 , $P < 0.01$) were significantly higher in DCs transfected with RNA of esophageal carcinoma cells; T cell proliferation was markedly enhanced (10 : 1: 4.77 ± 0.79 vs 1.65 ± 0.71 ; 50 : 1: 3.85 ± 0.57 vs 1.56 ± 0.13 ; 100 : 1: 2.89 ± 0.59 vs 1.19 ± 0.21 , $P < 0.05$); and tumor cytolytic activities of cytotoxic T lymphocyte were effectively induced (10 : 1: 27.36 ± 8.93 vs 10.35 ± 2.93 ; 20 : 1: 44.55 ± 2.36 vs 11.77 ± 1.03 ; 50 : 1: 51.08 ± 4.92 vs 12.75 ± 1.49 , $P < 0.05$). T α 1 enhanced significantly the surface molecule expression (MHC-I: 87.88 ± 9.13 vs 70.36 ± 6.09 ; MHC-II: 93.16 ± 3.34 vs 72.03 ± 5.32 ; CD54: 91.75 ± 3.84 vs 69.36 ± 7.33 ; CD80: 87.27 ± 8.68 vs 67.21 ± 6.77 ; CD86: 89.09 ± 6.86 vs 68.85 ± 7.41 , $P < 0.05$), stimulation of proliferation (10 : 1: 8.31 ± 1.78 vs 4.77 ± 0.79 ; 50 : 1: 5.97 ± 0.14 vs 3.85 ± 0.57 ; 100 : 1: 4.03 ± 0.13 vs 2.89 ± 0.59 , $P < 0.05$) and activity of cytotoxic T lymphocytes (10 : 1: 47.66 ± 4.12 vs 27.36 ± 8.93 ; 20 : 1: 56.72 ± 7.24 vs 44.55 ± 2.36 ; 50 : 1: 76.48 ± 3.47 vs 51.08 ± 4.92 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: DCs from human cord blood monocytes exhibit high expression of MHC and co-stimulatory molecules and enhances T lymphocyte capability after transfection with RNA of esophageal carcinoma. The vaccine of cord blood DCs with adjuvant of T α 1 may provide an effective and specific way for immunotherapy of esophageal carcinoma.

Key Words: Dendritic cells; Cord blood; Esophageal carcinoma; T lymphocyte cytotoxicity; Thymosin

Wang J, Su AY, Chai XQ, Men JE, Zheng HP, Zhang XY,

■背景资料

食管癌是最常见的恶性肿瘤之一, 而中国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家。传统的治疗方法以手术和放疗、化疗为主, 生物治疗方面尚较少报道。树突状细胞是功能最强的抗原提呈细胞, 而脐血来源的树突状细胞可提供足量的不受主要组织相容性复合物 (MHC) 限制的抗原提呈细胞, 将其用于食管癌的生物治疗方面国内尚未见报道。

■同行评议者

张军, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

■研究前沿

如何获得足量DCs,使其负载肿瘤抗原后再回输体内,是肿瘤过继免疫治疗的关键步骤,也是当前研究的热点。脐血DCs具有来源广泛、采集容易、费用低廉、供需双方无痛苦、移植抗宿主发生率低,为肿瘤免疫治疗的首选。目前食管癌特异性抗原尚不明确,有研究表明,由肿瘤细胞RNA转染的方式致敏的DCs可在未知肿瘤抗原具体成分的情况下,获得特异性杀瘤活性;且具有取材量少、易提取、可扩增、无污染等优势。

Tian K. Effect of T α 1 on ESCC RNA-transfected human cord blood dendritic cells induced antitumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3673-3676

摘要

目的:探讨食管癌细胞RNA转染脐血树突状细胞(dendritic cells, DCs)对T细胞增殖和CTL特异性抗肿瘤作用的影响,以及T α 1对脐血DCs疫苗的免疫佐剂作用。

方法:分离脐血单个核细胞,经rhSCF、rhGM-CSF和rhIL-4诱导和T.Tn细胞RNA转染形成成熟DCs,加入T α 1制备肿瘤疫苗。流式细胞术(FCM)检测各组DCs表型变化;MTT法检测各组脐血DCs诱导T细胞增殖和CTL细胞毒活性。

结果:T.Tn细胞RNA转染后组较转染前组脐血DCs高表达MHC-I、MHC-II、CD54、CD80和CD86分子(MHC-I: 70.36 ± 6.09 vs 8.17 ± 1.93 ; MHC-II: 72.03 ± 5.32 vs 7.64 ± 5.33 ; CD54: 69.36 ± 7.33 vs 2.05 ± 2.03 ; CD80: 67.21 ± 6.77 vs 2.33 ± 1.65 ; CD86: 68.85 ± 7.41 vs 6.73 ± 1.97 , $P < 0.01$);与转染前组相比,可显著促进T细胞增殖($10:1$: 4.77 ± 0.79 vs 1.65 ± 0.71 ; $50:1$: 3.85 ± 0.57 vs 1.56 ± 0.13 ; $100:1$: 2.89 ± 0.59 vs 1.19 ± 0.21 , $P < 0.05$),并有效诱导CTL的特异性杀瘤活性($10:1$: 27.36 ± 8.93 vs 10.35 ± 2.93 ; $20:1$: 44.55 ± 2.36 vs 11.77 ± 1.03 ; $50:1$: 51.08 ± 4.92 vs 12.75 ± 1.49 , $P < 0.05$)。而T α 1能显著促进RNA致敏脐血DCs的各种表面分子表达(MHC-I: 87.88 ± 9.13 vs 70.36 ± 6.09 ; MHC-II: 93.16 ± 3.34 vs 72.03 ± 5.32 ; CD54: 91.75 ± 3.84 vs 69.36 ± 7.33 ; CD80: 87.27 ± 8.68 vs 67.21 ± 6.77 ; CD86: 89.09 ± 6.86 vs 68.85 ± 7.41 , $P < 0.05$);和刺激T细胞增殖能力($10:1$: 8.31 ± 1.78 vs 4.77 ± 0.79 ; $50:1$: 5.97 ± 0.14 vs 3.85 ± 0.57 ; $100:1$: 4.03 ± 0.13 vs 2.89 ± 0.59 , $P < 0.05$);及诱导CTL的能力($10:1$: 47.66 ± 4.12 vs 27.36 ± 8.93 ; $20:1$: 56.72 ± 7.24 vs 44.55 ± 2.36 ; $50:1$: 76.48 ± 3.47 vs 51.08 ± 4.92 , $P < 0.05$)。

结论:T α 1联合食管癌细胞RNA转染脐血DCs可制备高效、特异的肿瘤疫苗,有望成为食管癌生物治疗的新途径。

关键词:树突状细胞;脐血;食管癌;T细胞;胸腺肽

王健, 苏安英, 柴锡庆, 门金娥, 郑海萍, 张向阳, 田珂. T α 1对食管癌细胞RNA转染的脐血树突状细胞诱导T细胞杀瘤活性的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(32): 3673-3676

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3673.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是目前已知的功能最强大的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs),也是唯一能激活初始型T细胞的APC,他决定着特异性免疫应答对抗原的选择性并提供共刺激信号^[1]。由DCs制备的肿瘤疫苗治疗多种恶性肿瘤的临床实验已取得了一定临床效果,但DCs的数量和功能均有待进一步提高^[2]。脐血来源的DCs可提供足量的不受主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)限制的APC^[3],而胸腺肽 α 1(thymosin α 1, T α 1)作为一种的功能强大的免疫调节剂,已在临床广泛应用,将T α 1加入DCs疫苗联合应用被认为是增强其抗肿瘤效应的较好方法^[4]。本研究中我们观察了T α 1对人食管癌细胞RNA转染的脐血DCs诱导T细胞增殖和细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)杀伤活性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌T.Tn细胞株购自上海市肿瘤研究所,脐血来自我校附属医院产科。rhGM-CSF、rhSCF、rhIL-4和rhIL-2为美国PeproTech公司产品。鼠抗人MHC-I、MHC-II、CD80、CD86、CD54分子的单克隆抗体(mAb)和FITC-羊抗鼠IgG,均为美国Ancell公司产品。TRIzol试剂和转染试剂Lipofectamine 2000脂质体购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤RNA的提取:将冻存T.Tn食管癌细胞常规复苏、培养、消化、传代,取对数生长期细胞消化、离心, PBS洗涤3次,台盼蓝染色计数活细胞>95%。按TRIzol试剂说明书提取T.Tn细胞总RNA, -20℃冻存。

1.2.2 脐血DCs的制备和转染:选择健康、足月的孕妇,在胎儿娩出后立即采集脐血50-100 mL/份。采用密度梯度离心法分离出单个核细胞以 2×10^6 /孔接种于培养板。用含150 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液培养2 h后,在贴壁细胞中加入终浓度为50 μ g/L rhSCF、100 μ g/L rhGM-CSF及5 μ g/L rhIL-4,置于37℃体积分数为50 mL/L CO₂的饱和湿度培养箱中培养。隔天半量换液,同时补充上述细胞因子,诱导DCs生成。培养至第10天,用500 μ L无血清1640培养基稀释10 μ g RNA,再用500 μ L无血清1640培养基稀释10 μ L Lipofectamine 2000试剂,与稀释的RNA混匀,加至DCs培养孔,置37℃ 50 mL/L CO₂培养箱孵育4

表 1 肿瘤RNA转染前后脐血DCs表面标志的表达 (mean ± SD)

分组	MHC- I	MHC- II	CD54	CD80	CD86
RNA转染前	8.17 ± 1.93	7.64 ± 5.33	2.05 ± 2.03	2.33 ± 1.65	6.73 ± 1.97
RNA转染后	70.36 ± 6.09 ^d	72.03 ± 5.32 ^d	69.36 ± 7.33 ^d	67.21 ± 6.77 ^d	68.85 ± 7.41 ^d
RNA转染+Tα1	87.88 ± 9.13 ^a	93.16 ± 3.34 ^a	91.75 ± 3.84 ^a	87.27 ± 8.68 ^a	89.09 ± 6.86 ^a

^a*P* < 0.05 vs 转染后组; ^d*P* < 0.01 vs 转染前组.

表 2 肿瘤RNA转染前后脐血DCs对混合T细胞增殖的影响 (mean ± SD)

分组	效靶比		
	10 : 1	50 : 1	100 : 1
RNA转染前	1.65 ± 0.71	1.56 ± 0.13	1.19 ± 0.21
RNA转染后	4.77 ± 0.79 ^a	3.85 ± 0.57 ^a	2.89 ± 0.59 ^a
RNA转染+Tα1	8.31 ± 1.78 ^c	5.97 ± 0.14 ^c	4.03 ± 0.13 ^c

^a*P* < 0.05 vs 转染前组; ^c*P* < 0.05 vs 转染后组.

h. 在实验组培养孔中加入Tα1, 使其终浓度为50 μg/L, 继续培养至第11天.

1.2.3 流式细胞术(flow cytometry, FCM)对脐血DCs表面标志的鉴定: 分别收集转染前后各组的DCs, PBS液洗3次, 用PBS调整细胞浓度为 1×10^9 /L, 加入1:100稀释的小鼠抗人MHC- I、MHC- II、CD80、CD86及CD54的mAb, 室温孵育30 min, PBS洗2次, 弃上清. 再加入FITC-羊抗小鼠IgG(二抗)工作液100 μL, 避光室温孵育30 min, PBS洗涤细胞2次, 以洗去未结合的荧光标记二抗. 加入1 mL PBS, 以同种型荧光染色的Ig作为对照调节电压, 以PBS代替一抗和二抗作为阴性对照, 用FCM进行检测, Expo32ADC进行免疫荧光数据分析.

1.2.4 RNA致敏DCs对T细胞增殖能力的影响: 从脐带血中常规分离单个核细胞, 贴壁细胞用于DCs诱导. 收集悬浮细胞, 加入含150 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液调整细胞密度为 1×10^{11} /L, 通过尼龙毛柱分离T细胞, 调整细胞的密度为 2×10^9 /L. 将T细胞悬液加入到96孔平底培养板中, 每孔100 μL. 每孔按DC与T细胞比例分别为1:100、1:50、1:10加入DC, 设3个复孔, 培养68 h. 每孔加入MTT(5 g/L)10 μL继续培养4 h. 弃去上清, 每孔加入二甲亚砜100 μL, 震荡溶解颗粒, 于波长570 nm用酶标检测仪测定吸光度(A)值, 计算刺激指数(SI). $SI = \frac{\text{实验组的A值}}{\text{对照组的A值}}$.

1.2.5 RNA致敏DCs对CTL杀伤活性的影响: 将 2×10^9 /L的T细胞悬液加入到24孔培养板中, 每孔

1 mL. 以DCs与T淋巴细胞1:10比例加入DCs, 每孔均加入100 mL/L的rhlL-2, 置37℃、50 mL/L CO₂培养3 d. 取传代12-24 h的T.Tn细胞为靶细胞, 调整细胞密度至 1×10^8 /L, 各取100 μL加入到96孔平底培养板中. 以活化的各实验组的T细胞为效应细胞, 按效靶比为10:1、20:1、50:1加入到96孔板中, 每组设3个复孔, 并设效应细胞对照组和靶细胞对照组. 37℃、50 mL/L CO₂培养箱中孵育48 h. 加入MTT溶液15 μL/孔, 继续培养4 h后弃上清, 用酶标检测仪波长570 nm测定A值. 杀伤活性 = $\frac{[\text{靶细胞对照组A} - (\text{实验组A} - \text{效应细胞对照组A})]}{\text{靶细胞对照组A}} \times 100\%$.

统计学处理 采用mean ± SD表示, 用SPSS13.0软件行LSD检验, *P* < 0.05为统计学差异有显著性.

2 结果

2.1 肿瘤RNA转染前后脐血DCs表面标志的表达 经食管癌T.Tn细胞RNA转染后的脐血DCs表面MHC- I、MHC- II分子及协同刺激分子(CD80、CD86)、黏附分子(CD54)表达高于RNA转染前组(*P* < 0.01), 而加入Tα1后可显著增强RNA转染后组上述各种分子的表达(*P* < 0.05, 表1).

2.2 肿瘤RNA转染前后致敏脐血DCs对混合T细胞增殖的影响 由食管癌T.Tn细胞RNA转染后组脐血DCs促进T细胞增殖的能力较转染前组显著增强(*P* < 0.05), 而加入Tα1组T细胞增殖能力提高更加明显(*P* < 0.05, 表2).

2.3 肿瘤RNA转染前后脐血DCs对CTL杀伤活性的影响 食管癌T.Tn细胞RNA转染后组脐血DCs可诱导CTL产生特异性杀伤活性(*P* < 0.05), 而加入Tα1刺激组诱导能力显著增强(*P* < 0.05, 表3).

3 讨论

DCs是体内功能最强大的APC, 具有独特的抗原提呈和免疫激发功能, 因此DCs在肿瘤的发生、发展和免疫治疗中发挥着重要的作用. 有研究发现, 肿瘤患者外周血及肿瘤组织中DCs的含量是评估肿瘤发展和预后的独立指标^[5]. 然而, 在

■应用要点

本研究发现脐血树突状细胞有着诸多优势, Tα1为临床常用生物制剂, 二者相结合可提高免疫治疗效果, 有很大推广潜力, 从而产生巨大的经济和社会效益.

■同行评价

本研究采用的研究方法成熟, 研究设计合理, 统计分析结果可信, 对食管癌研究具有一定的价值.

表 3 肿瘤RNA转染前后脐血DCs对CTL杀伤活性的影响 (mean \pm SD)

分组	效靶比		
	10 : 1	50 : 1	100 : 1
RNA转染前	10.35 \pm 2.93	11.77 \pm 1.03	12.75 \pm 1.49
RNA转染后	27.36 \pm 8.93 ^a	44.55 \pm 2.36 ^a	51.08 \pm 4.92 ^a
RNA转染+T α 1	47.66 \pm 4.12 ^c	56.72 \pm 7.24 ^c	76.48 \pm 3.47 ^c

^a $P < 0.05$ vs 转染前组; ^c $P < 0.05$ vs 转染后组.

肿瘤患者体内, 由于自体DCs数量有限、局部调节活性物质不足以及肿瘤细胞分泌抑制性细胞因子等原因, 使其提呈肿瘤抗原能力十分有限. 因此, 如何获得足量DCs, 使其负载肿瘤抗原后再回输体内, 是肿瘤过继免疫治疗的关键步骤, 也是当前研究的热点^[6]. 脐血中造血干细胞含量丰富, 加入相应细胞因子诱导分化后, DCs获得率较其他来源高; 且来源广泛、采集容易、费用低廉、供需双方无痛苦、移植物抗宿主发生率低, 因此在自体DCs数量不足以进行有效治疗时, 可首先考虑采用脐血DCs^[7].

肿瘤生物治疗的另一个关键是寻找特异的肿瘤抗原. 但目前食管癌特异性抗原尚不明确, 且由于手术标本常伴有坏死组织和细菌污染等原因较难获得. 有研究表明, 肿瘤细胞的RNA可被DCs摄取, 在胞内翻译成相应的蛋白质, 经抗原处理系统加工成抗原肽, 运送到细胞表面与MHC分子结合, 激活CTL发挥抗肿瘤效应^[8]. 因此, 由肿瘤细胞RNA致敏的DCs疫苗可在未知肿瘤抗原具体成分的情况下, 获得特异性杀瘤活性; 且具有取材量少、易提取、可扩增、无污染等优势^[9]. 国外已对淋巴瘤、肾癌、黑色素瘤等肿瘤进行了尝试, 取得了良好的效果. 另有报道显示, 采用理想的免疫佐剂和DCs疫苗联合应用, 可进一步增强DCs抗原提呈功能和Th1细胞反应, 从而增强和延续特异性CTL的杀伤效应. T α 1作为一种免疫调节剂, 可促进T淋巴细胞分化成熟和增殖, 增加, 促进NK细胞活性, 且具有功能强大、毒副作用小等优点, 因此日益受到临床重视. 本文将传代培养的T.Tn细胞株总RNA转染脐血来源的DCs, 转染后DCs表面标志CD54、CD80、CD86和MHC-I、MHC-II类分子表达明显增高, 说明转染RNA可以促进DCs成熟. 此外, 在T细胞增殖和CTL细胞毒试验中, 转染RNA后的DCs均显示出对T细胞增殖和CTL杀

瘤功能的良好激活能力, 这正是其强大抗原呈递功能的反映. 而与T α 1同时应用, 可使其免疫刺激活性进一步增强, 其原因可能与T α 1引起的Th1活化和加强细胞因子分泌有关, 在这方面我们将继续作深入研究.

总之, 人脐血单个核细胞经体外诱导可分化为功能良好的DCs, 由食管癌细胞RNA转染后能有效促进T细胞的增殖和杀瘤活性. T α 1作为免疫佐剂, 可大大增强DCs疫苗的抗原提呈功能, 二者联合应用有望成为食管癌免疫治疗的新途径.

4 参考文献

- Perreau M, Mennechet F, Serratrice N, Glasgow JN, Curiel DT, Wodrich H, Kremer EJ. Contrasting effects of human, canine, and hybrid adenovirus vectors on the phenotypical and functional maturation of human dendritic cells: implications for clinical efficacy. *J Virol* 2007; 81: 3272-3284
- Zhang JG, Eguchi J, Kruse CA, Gomez GG, Fakhrai H, Schroter S, Ma W, Hoa N, Minev B, Delgado C, Wepsic HT, Okada H, Jadus MR. Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 566-575
- Slukvin II, Vodyanik MA, Thomson JA, Gumenyuk ME, Choi KD. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional dendritic cells through the myeloid pathway. *J Immunol* 2006; 176: 2924-2932
- Romani L, Bistoni F, Gaziano R, Bozza S, Montagnoli C, Perruccio K, Pitzurra L, Bellocchio S, Velardi A, Rasi G, Di Francesco P, Garaci E. Thymosin alpha 1 activates dendritic cells for antifungal Th1 resistance through toll-like receptor signaling. *Blood* 2004; 103: 4232-4239
- Takahashi K, Sato S, Yanagimoto H, Terakawa N, Toyokawa H, Yamamoto T, Matsui Y, Takai S, Kwon AH, Kamiyama Y. Circulating dendritic cells and development of septic complications after pancreatectomy for pancreatic cancer. *Arch Surg* 2007; 142: 1151-1157; discussion 1157
- Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Chaput N, Taieb J, Menard C, Viaud S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Therapy-induced tumor immunosurveillance involves IFN-producing killer dendritic cells. *Cancer Res* 2007; 67: 851-853
- Joshi AD, Clark EM, Wang P, Munger CM, Hegde GV, Sanderson S, Dave HP, Joshi SS. Immunotherapy of human neuroblastoma using umbilical cord blood-derived effector cells. *J Neuroimmune Pharmacol* 2007; 2: 202-212
- Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, Tureci O, Sahin U. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 2006; 108: 4009-4017
- Hsu AK, Kerr BM, Jones KL, Lock RB, Hart DN, Rice AM. RNA loading of leukemic antigens into cord blood-derived dendritic cells for immunotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 855-867

编辑 史景红 电编 郭海丽

射频消融联合肝动脉栓塞治疗兔肝癌的安全性

李绍钦, 倪才方, 蒋国民, 陈 琰

李绍钦, 蒋国民, 南京医科大学附属常州二院介入科 江苏省常州市 213003

倪才方, 陈琰, 苏州大学附属第一医院介入科 江苏省苏州市 215006

江苏省卫生厅重大课题资助项目, No. K200407

作者贡献分布: 此课题由倪才方与陈琰设计; 研究过程由李绍钦, 倪才方及陈琰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由蒋国民提供; 数据分析由李绍钦与陈琰完成; 本文写作由李绍钦, 倪才方及陈琰完成。

通讯作者: 倪才方, 215006, 江苏省苏州市, 苏州大学附属第一医院介入科. cjr.nicaifang@vip.163.com

收稿日期: 2008-07-28 修回日期: 2008-09-27

接受日期: 2008-10-07 在线出版日期: 2008-11-18

Combined therapy of radiofrequency ablation with transcatheter artery embolization in rabbit model of hepatic carcinoma

Shao-Qin Li, Cai-Fang Ni, Guo-Min Jiang, Long Chen

Shao-Qin Li, Guo-Min Jiang, Department of Interventional Radiology, the Second Hospital of Changzhou Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China

Cai-Fang Ni, Long Chen, Department of Interventional Radiology, the First Hospital Affiliated to Suzhou University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Supported by: the Grand Medical Program of Jiangsu Province, No. K200407

Correspondence to: Cai-Fang Ni, Department of Interventional Radiology, the First Hospital Affiliated to Suzhou University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. cjr.nicaifang@vip.163.com

Received: 2008-07-28 Revised: 2008-09-27

Accepted: 2008-10-07 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate the safety about the combined therapy of radiofrequency ablation (RFA) with transcatheter artery embolization (TAE) in rabbits with VX2 hepatic carcinoma.

METHODS: VX2 tumor tissues were implanted into the rabbit's liver to establish liver cancer model. Thirty-six rabbits with hepatic carcinoma were assigned to 4 groups randomly ($n = 9$). Group A received RFA treatment only; group B, C, D received TAE treatment 1, 4, 7 d prior to RFA treatment respectively. The ALT and UREA levels of the experimental rabbits were mea-

sured before and after each treatment.

RESULTS: Decreased appetite, drowsiness and dispiritedness were observed in the rabbits, especially in group B and C. No death was observed in group A and group D, but there were 3 deaths in group B and 2 deaths in group C. ALT levels were the highest at the first day in all groups. The difference was significant at the first day between group B (385.0 ± 213.1 U/L), C (289.2 ± 192.6 U/L) and A (178.4 ± 49.2 U/L), D (208.2 ± 65.5 U/L) respectively ($P < 0.05$), but not significant between group B and C, group A and D; There were no differences between each group at the 4th day and 7th day. No statistical significance in UREA levels was observed among the four groups.

CONCLUSION: RFA at 1, 4 d after TAE might impact liver function severely. RFA, is relatively safe at 7 d after TAE treatment. Combined therapy of RFA and TAE exerts no impact on renal function in all groups.

Key Words: VX2; Hepatic neoplasms; Radiofrequency ablation; Cool-tip electrodes; Transcatheter artery embolization; Iodized oil

Li SQ, Ni CF, Jiang GM, Chen L. Combined therapy of radiofrequency ablation with transcatheter artery embolization in rabbit model of hepatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3677-3680

摘要

目的: 研究射频消融(RFA)与肝动脉栓塞(TAE)联合治疗VX2兔肝移植瘤的安全性。

方法: 将VX2肿瘤块植入实验兔的肝脏内, 建立兔肝癌模型。将36只兔肝癌模型随机分为4组, 每组9只, A组行单纯RFA治疗, B、C、D组分别在TAE治疗后1、4、7 d行RFA治疗; 术前及术后检查实验兔肝、肾功能和存活情况。

结果: 实验兔术后出现精神萎靡、纳差、嗜睡, 以B组及C组最重, A组最轻。A组及D组无动物死亡, B、C组分别死亡3、2只。各组ALT值均在治疗后第1天最高。A组(178.4 ± 49.2

■背景资料

肝动脉栓塞联合射频治疗可以扩大损毁范围, 提高肿瘤坏死率。此方法已在临床上应用, 并取得较好疗效。单纯行肝动脉栓塞或射频均会对肝脏有一定损害。二者联合治疗的时间间隔对安全性有何影响, 有待进一步研究。

■同行评议者
肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

■相关报道

目前临床上TACE后行RFA的时间间隔大多为0 d-4 wk, 文献报道两者间隔时间越短, 疗效越好, 但安全性越差。

U/L)、D组(208.2 ± 65.5 U/L)分别与B组(385.0 ± 213.1 U/L)和C组(289.2 ± 192.6 U/L)比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), B组与C组, D组与A组之间比较, 均无统计学意义; 各组治疗后4、7 d ALT值比较均无统计学意义。各组UREA值组间比较差异也无统计学意义。

结论: 栓塞后1、4 d行射频治疗对肝脏功能将产生严重的影响, 栓塞后7 d进行射频治疗相对比较安全。单纯射频及联合治疗对肾功能无明显影响。

关键词: 兔鳞癌细胞株; 肝癌; 射频消融; 冷循环电极; 肝动脉栓塞; 碘化油

李绍钦, 倪才方, 蒋国民, 陈珑. 射频消融联合肝动脉栓塞治疗兔肝癌的安全性. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3677-3680
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3677.asp>

0 引言

肝动脉栓塞联合射频治疗可以扩大损毁范围, 提高肿瘤坏死率^[1-3]。此方法已在临床上开始应用, 并取得较好疗效^[4-11]。单纯行肝动脉栓塞或射频均会对肝脏有一定损害。二者联合治疗的时间间隔对安全性有何影响? 目前临床上没有统一标准, 缺乏理论基础, 无大型动物肿瘤模型在此方面的实验报道。我们期望通过动物实验研究初步阐明以上问题。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰白兔36只, 雌雄不限, 体质量2.5-3.5 kg, 3-4月龄, 苏州大学动物实验中心提供; VX2瘤株为鳞状细胞癌, 由血液病研究所实验室冻存; 3F Progreat导管; 冷循环射频治疗仪, 针尖长2 cm的冷循环单极射频针。仪器与设备DSA; 4排螺旋CT; 欧林巴斯显微镜及照相系统。

1.2 方法

1.2.1 动物分组: VX2肿瘤肝脏种植成功后2 wk, 并经CT平扫及增强证实肿瘤直径2.0 cm左右。将36只肝移植瘤兔分为4组, 每组9只: A组: 单纯RFA治疗; B组: 栓塞后1 d行射频治疗; C组: 栓塞后4 d行射频治疗; D组: 栓塞后7 d行射频治疗。各组分别于治疗前、治疗后1、4、7 d抽取静脉血查肝肾功能。

1.2.2 动物模型制备: VX2肿瘤细胞复苏后, 接种于兔后腿肌肉组织内, 2 wk后剪取长出的肿瘤组织边缘部分, 剪至1 mm³左右的小块; 选取新西兰大白兔36只麻醉后, 四肢固定仰卧于CT机床

台上, 上腹部及剑突周围脱毛后消毒。18G穿刺针首先放入长约2-3 cm的1条明胶海绵条, 再放入2-3个准备好的组织块, 沿设定的穿刺位置、方向进针, 并CT扫描证实针尖的位置后(一般为肝左叶), 平头穿刺针芯将瘤块快速推入肝内(平头穿刺针芯伸出穿刺针约1.5 cm并重复2-3次)。拔出针具, 消毒穿刺点。术后庆大霉素4万单位肌注, 连续3 d。

1.2.3 RFA治疗: 荷瘤兔麻醉后, 予以腹部、大腿及背部脱毛, 背部贴附一电极片后仰卧固定于金属车上, 金属车上亦贴附一电极片并与RFA治疗仪的电极导线相连。上腹部消毒铺巾后, 于上腹部偏左行4.0 cm左右的纵行切口, 切开后逐层分离, 暴露肝脏肿瘤; 肝脏周缘湿纱布遮盖以保护肝脏及相邻脏器; 将电极针插入肿瘤中央后射频10 min(功率25 W)。术毕逐层缝合切口, 庆大霉素腹腔内灌注。术后继续给予庆大霉素4万单位肌注。

1.2.4 肝动脉造影及栓塞治疗: 荷瘤兔麻醉后, 股动脉区备皮消毒, 切开皮肤, 钝性分离股动脉, 股动脉切口近心端用缝线穿过其下方, 并轻轻提起, 用眼科剪在股动脉上方剪开长约2 mm的斜形切口; 在导丝引导下置入4F H1导管将导管送至L1水平造影, 找到腹腔动脉后超选至腹腔干动脉造影, 了解肝固有动脉走行及肿瘤供血情况后, 通过H1导管置入3F SP导管或3F Progreat导管, 超选至肝固有动脉并造影, 根据肿瘤大小、血供及染色情况, 注入适量碘化油, 再次造影肿瘤染色基本消失。术后给予预防感染、补液。

1.2.5 联合治疗: RFA及DSA肝动脉栓塞治疗方法如上所述; B组、C组、D组在TAE 1、4、7 d后行RFA。A组在RFA后及B组、C组、D组在TAE后及联合治疗后连续3 d行同样上述方法进行预防感染处理。

1.2.6 肝、肾功能检查: A组瘤兔在术前、RFA后1、4、7 d分别在耳缘静脉抽取2 mL静脉血, 送生化室行丙氨酸氨基转移酶(谷丙转氨酶, ALT)、血清尿素(UREA)检查; 其余3组(B组、C组、D组)也分别在术前、TAE+RFA后第1、4、7天行ALT、UREA检查, 以了解肝、肾功能及其变化情况。

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, 选用SPSS13.0统计软件, 统计方法采用完全随机分组设计的方差分析和LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

■应用要点

通过动物实验, 我们得到初步结论, TACE后第7天行RFA疗效无明显影响, 安全性较高。

表 1 各组不同时间点ALT值比较 (U/L)

	A组	B组	C组	D组	F	P
术前	47.6 ± 10.7	47.1 ± 11.2	46.9 ± 10.4	51.4 ± 11.3	0.458	0.85
术后1 d	178.4 ± 49.2	385.0 ± 213.1	289.2 ± 192.6	208.2 ± 65.5	5.645	0.02
4 d	103.6 ± 33.0	202.2 ± 62.1	181.6 ± 42.4	128.3 ± 18.4	1.254	0.49
7 d	60.4 ± 15.6	147.2 ± 23.4	113.8 ± 95.8	90.7 ± 48.1	2.012	0.34

表 2 各组不同时间点UREA值比较 (mmol/L)

	A组	B组	C组	D组	F	P
术前	4.74 ± 0.94	4.57 ± 0.74	4.64 ± 0.49	4.72 ± 0.63	1.321	0.84
术后1 d	5.02 ± 0.58	5.00 ± 0.58	5.10 ± 0.57	4.85 ± 1.23	1.129	0.76
术后4 d	5.84 ± 0.43	5.30 ± 1.62	4.68 ± 0.68	5.00 ± 1.43	1.254	0.69
术后7 d	5.54 ± 0.42	5.00 ± 0.86	4.84 ± 0.67	4.92 ± 1.04	0.912	0.91

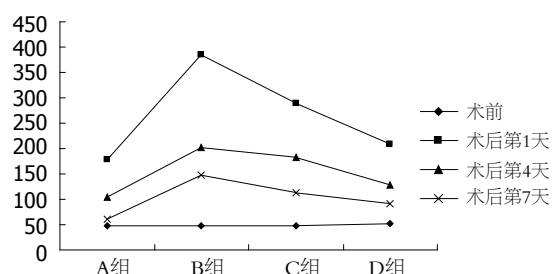


图 1 各组不同时间点ALT值比较.

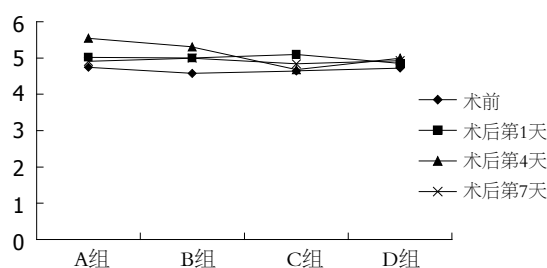


图 2 各组不同时间点UREA值比较.

2 结果

2.1 一般情况 A组动物出现精神萎靡、纳差、嗜睡, 一般3 d后恢复正常; 联合治疗组上述症状更明显, 甚至部分动物出现拒食, B组、C组最显著, D组症状较A组稍明显, 但明显比B组及C组轻。

2.2 动物死亡情况 A组、D组没有动物死亡, B组、C组分别有3只、2只动物死亡, 均在联合治疗后24 h内死亡。动物死亡后及时补充。

2.3 ALT和UREA变化 各组治疗后1 d ALT值比较: 各组动物治疗后ALT值均在第1天时最高, 4 d后明显下降, 其中以栓塞1 d后射频组(B组)在治疗后第1天升高幅度最大, 明显高于D组、A组栓塞后射频第1天, 差异有统计学意义($P<0.05$), 与C组栓塞后射频第1天比较差异无统计学意义; 单纯射频组(A组)升高幅度最小, 下降速度最快。D组联合治疗后第1天与A组联合治疗后第1天ALT值比较差异无统计学意义; C组联合治疗后第1天与A组、D组联合治疗后第1天ALT值比较差异有统计学意义($P<0.05$)。各组治疗后4、7 d ALT值比较: B组联合治疗后4、7 d ALT值仍较其他组联合治疗后第4天高(B组>C组>D组>A组), 但各组比较差异均无统计学意义(表1, 图1)。

各组UREA值组间比较差异均无统计学意义(表2, 图2)。

3 讨论

TAE^[12]与RFA^[13-14]均会对肝脏功能产生一定的破坏性影响, 一般1 d开始升高, 7 d后基本恢复正常^[15-16]。但RFA联合TAE会使ALT更明显的增高, 以B组联合治疗后第1天最明显, 与A组单纯射频后第1天比较差异均有统计学意义($P<0.001$), 与D组术后第1天相比差异亦有统计学意义($P<0.05$), 但是与C组术后第1天比较差异无统计学意义; C组术后第1天与D组术后第1天ALT比较差异亦有统计学意义($P<0.05$), D组术后第1天与A组术后第1天比较虽然有增加, 但差异亦无统计学意义, 而C组术后第1天与A组术后第1天比较差异有统计学意义($P<0.05$)。而A、B、C、D组4 d及7 d后ALT比较差异均无统计学意义。以上结果说明: 栓塞1、4 d后行射频治疗(B、C组)1 d在栓塞和射频双重打击下, 动物肝脏功能储备严重降低。从各实验组动物治疗后4、7 d ALT比较差异均无统计学意义分析, 实验动物(特别对于B、C组)ALT恢复较快。另外, 治疗后

■名词解释

VX2兔鳞癌细胞株: 兔VX2肿瘤是世界上广泛使用、可在大型动物体内生长的恶性肿瘤, 常用于恶性肿瘤介入和射频治疗的研究及影像学研究和动物模型的建立。

■同行评价

本研究为临床进一步联合应用TACE与RFA的时间窗等相关问题提供了实验依据,对临床有指导作用。

的动物死亡时间主要集中在24 h以内,而24 h以后实验动物无死亡,说明动物死亡和ALT增高密切相关。

动物死亡时间也是在B组和C组,且为急性期死亡,存活时间没有超过24 h,考虑死亡原因主要为联合治疗创伤极大,肝脏功能储备严重降低,导致急性肝功能衰竭。而TAE后7 d,肝脏储备功能已经基本恢复,D组射频第1天ALT值与单纯射频第1天(R1)ALT值比较,差异无统计学意义,提示TAE后7 d行射频治疗是安全的。

总之,ALT升高的主要原因是TAE和RFA以及联合治疗均不可避免对正常肝脏造成一定的损害作用,特别TAE和RFA联合治疗间隔时间短(少于7 d),对肝脏功能会产生严重的破坏性,而栓塞后7 d进行射频治疗相对比较安全;所以,在临床治疗中,肝功能损害严重的患者应慎用此项治疗。同时,在临床上应重视治疗后肝功能的保护及支持治疗。单纯射频及联合治疗对肾功能无明显影响。

4 参考文献

- 1 Lorentzen T, Christensen NE, Nolsle CP, Torp-Pedersen ST. Radiofrequency tissue ablation with a cooled needle in vitro: ultrasonography, dose response, and lesion temperature. *Acad Radiol* 1997; 4: 292-297
- 2 Goldberg SN, Gazelle GS, Solbiati L, Rittman WJ, Mueller PR. Radiofrequency tissue ablation: increased lesion diameter with a perfusion electrode. *Acad Radiol* 1996; 3: 636-644
- 3 Sugimori K, Morimoto M, Shirato K, Kokawa A, Tomita N, Saito T, Nozawa A, Hara M, Sekihara H, Tanaka K. Radiofrequency ablation in a pig liver model: effect of transcatheter arterial embolization on coagulation diameter and histologic characteristics. *Hepatol Res* 2002; 24: 164
- 4 Goldberg SN, Kamel IR, Kruskal JB, Reynolds K, Monsky WL, Stuart KE, Ahmed M, Raptopoulos V. Radiofrequency ablation of hepatic tumors: increased tumor destruction with adjuvant liposomal doxorubicin therapy. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 93-101
- 5 Buscarini L, Buscarini E, Di Stasi M, Quaretti P, Zangrandi A. Percutaneous radiofrequency

thermal ablation combined with transcatheter arterial embolization in the treatment of large hepatocellular carcinoma. *Ultraschall Med* 1999; 20: 47-53

- 6 Lencioni R, Cioni D, Donati F, Bartolozzi C. Combination of interventional therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 8-14
- 7 Curley SA, Izzo F, Delrio P, Ellis LM, Granchi J, Vallone P, Fiore F, Pignata S, Daniele B, Cremona F. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann Surg* 1999; 230: 1-8
- 8 Takaki H, Yamakado K, Nakatsuka A, Fuke H, Murata K, Shiraki K, Takeda K. Radiofrequency ablation combined with chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinomas 5 cm or smaller: risk factors for local tumor progression. *J Vasc Interv Radiol* 2007; 18: 856-861
- 9 Yamakado K, Nakatsuka A, Takaki H, Yokoi H, Usui M, Sakurai H, Isaji S, Shiraki K, Fuke H, Uemoto S, Takeda K. Early-stage hepatocellular carcinoma: radiofrequency ablation combined with chemoembolization versus hepatectomy. *Radiology* 2008; 247: 260-266
- 10 Veltri A, Moretto P, Doriguzzi A, Pagano E, Carrara G, Gandini G. Radiofrequency thermal ablation (RFA) after transarterial chemoembolization (TACE) as a combined therapy for unresectable non-early hepatocellular carcinoma (HCC). *Eur Radiol* 2006; 16: 661-669
- 11 Izzo F, Barnett CC Jr, Curley SA. Radiofrequency ablation of primary and metastatic malignant liver tumors. *Adv Surg* 2001; 35: 225-250
- 12 吕毅, 潘承恩, 王居. 肝癌化疗栓塞术后综合征发生机理及治疗. *肝胆外科杂志* 1995; 3: 137-140
- 13 Yoshitani S, Hayashi K, Kuroda M, Tanaka Y, Hasegawa T, Saito H, Kosaka T, Takashima S. [Results of local ablation therapy for liver metastases from colorectal cancer using radiofrequency ablation and microwave coagulation therapy (RFA/MCT)] *Gan To Kagaku Ryoho* 2005; 32: 1666-1669
- 14 Takeda Y, Hasuike Y, Kashiwazaki M, Shin E, Tsujinaka T. [Transdiaphragmatic radiofrequency ablation of malignant liver tumors] *Gan To Kagaku Ryoho* 2002; 29: 2229-2233
- 15 吴文娟, 邹英华, 南月敏, 李海涛, 刘向东, 杨春, 崔慧先. As₂O₃碘油栓塞对兔VX₂肝癌凋亡、增殖及肝功能的影响. *实用放射学杂志* 2006; 22: 1-4
- 16 赵华栋, 包国强, 马庆久, 赖大年, 鲁建国, 褚延魁, 杜锡林, 何显力. 射频消融治疗兔肝脏肿瘤的实验研究. *肝胆外科杂志* 2006; 14: 301-303

编辑 李军亮 电编 郭海丽

心脏停搏供体大鼠供肝热缺血对原位肝移植物的影响

张宝良, 刘彤

张宝良, 河北医科大学附属唐山工人医院普通外科 河北省唐山市 063000

刘彤, 天津医科大学总医院普通外科 天津市 300052

作者贡献分布: 张宝良与刘彤对此文所作贡献均等; 此课题由张宝良与刘彤设计; 研究过程由张宝良与刘彤操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘彤与张宝良提供; 数据分析由张宝良完成; 本论文写作由张宝良与刘彤完成。

通讯作者: 刘彤, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院普通外科. liutonga@126.com

收稿日期: 2008-09-07 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

Influence of warm ischemia reperfusion of the donor liver from non-heart-beating donors on the graft in rat orthotopic liver transplantation

Bao-Liang Zhang, Tong Liu

Bao-Liang Zhang, Department of General Surgery, Tangshan Workers' Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Tong Liu, Department of General Surgery, General Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Tong Liu, Department of General Surgery, General Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China. liutonga@126.com

Received: 2008-09-07 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate the effect on graft of warm ischemia reperfusion injury following orthotopic liver transplantation from non-heart beating donors in rats.

METHODS: The rats were divided into four groups ($n = 24/\text{group}$) including the control group and 3 liver transplantation groups in which cardiac arrest time was respectively 0, 15, 30 min (W0, W15, W30). The model of orthotopic liver transplantation with arterial reconstruction was established. Six rats in each group each time were sacrificed on 3, 7, 14 and 30 days after surgery, respectively. Histological features, hepatic function and Ki-67 were detected.

RESULTS: Histological studies showed that

longer warm ischemia time increased the liver restoration time as well as aggravated liver parenchyma injury. Serum levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in all groups showed no marked difference on 3, 7, 14 and 30 days after surgery. The proportion of Ki67-labeled hepatocytes increased with the warm ischemia time of the graft and returned to normal on day 14 postoperatively. In all the groups, the proportion of Ki67-labeled hepatocytes showed no significant correlation with ALT and AST.

CONCLUSION: The main site of warm ischemia of the graft is the hepatocyte. The injury of hepatocyte aggravates with warm ischemia time of the graft. Restoration of the function is faster than restoration of the morphology.

Key Words: Reperfusion injury; Liver transplantation; Warm ischemia; Rats; Heart arrest

Zhang BL, Liu T. Influence of warm ischemia reperfusion of the donor liver from non-heart-beating donors on the graft in rat orthotopic liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3681-3686

摘要

目的: 探讨来自心脏停搏供体大鼠肝移植供肝热缺血再灌注损伤对移植物的影响。

方法: 实验分为4组: 对照组(C)和移植组, 移植组根据供肝获取前经历供体心脏停搏时间的不同分为3组: 热缺血0 min(W0组)、热缺血15 min(W15组)和热缺血30 min(W30组), 其后用建立大鼠动脉化原位肝移植模型, 每组均为24只大鼠, 分别测定术后3、7、14和30 d移植肝组织学、肝功能和细胞增殖核抗原Ki-67蛋白的变化, 每个时间点各取6只大鼠处死。

结果: 随着供肝热缺血时间的延长, 移植肝损伤加重, 并且恢复过程也延长。移植组和对照组术后第3、7、14和30天血清ALT、AST均无显著性改变。肝移植术后早期肝细胞Ki-67表达水平随供肝热缺血时间的延长而增高, 术后14 d恢复正常。各组的肝细胞Ki-67表达均与血清ALT、AST无关。

■背景资料

目前, 国内外均利用来自无心跳供体的供肝缓解供肝来源短缺与等待肝移植患者剧增之间的矛盾, 但其移植术后原发性移植肝无功能的机会较高。因此, 本文利用心脏停搏供体的大鼠肝移植进行供肝热缺血损伤研究。

■同行评议者

邱双健, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

■ 研发前沿

供肝热缺血损伤一直是肝移植领域的研究难点,其中如何减轻供肝热缺血损伤正成为研究热点.采用药物和其他方法减轻来自无心跳供体的移植肝的热缺血再灌注损伤正日益受到人们的关注.

结论: 肝移植过程中供肝热缺血主要损伤肝细胞,并随着供肝热缺血时间的延长移植肝细胞损伤加重,肝细胞功能恢复早于其形态学恢复.

关键词: 再灌注损伤; 肝移植; 热缺血; 大鼠; 心脏停搏

张宝良, 刘彤. 心脏停搏供体大鼠供肝热缺血对原位肝移植物的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3681-3686

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3681.asp>

0 引言

目前,我国的临床肝移植中,供肝主要来源于无心跳供体.国外也利用无心跳供体来缓解供肝来源的短缺与等待肝移植的患者剧增之间的矛盾.但是,无心跳供体必然会使供肝遭受热缺血,加重移植肝的损伤,从而增加肝移植术后发生移植原发性肝无功能的机会^[1].因此,本实验利用来自心脏停搏供体的大鼠动脉化肝移植模型进行供肝热缺血损伤研究,为今后进行相关临床与基础研究提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 选用♂近交系Lewis大鼠,体质量150-170 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司.所有动物均在清洁、温暖(20-25℃)、通风环境下,普通饲料喂养,体质量增至180-220 g行原位肝移植术.

1.2 方法

1.2.1 分组: 实验分为4组:肝移植组和对照组(C组),肝移植组根据供肝获取前经历供体心脏停搏时间的不同分为3组:热缺血0 min(W0组)、热缺血15 min(W15组)和热缺血30 min(W30组).

1.2.2 手术方法: 供体、受体术前禁食12 h,不禁水.供体40 g/L水合氯醛溶液7.5 mL/kg腹腔内注射麻醉,于双人双目显微镜下行清洁手术. W0组:供肝基本分离完毕后,自腹主动脉插管灌注4℃乳酸钠林格氏液,直至肝脏颜色呈土黄色,切取肝脏及腹主动脉袖套,保存于4℃乳酸钠林格氏液中. W15组和W30组供体手术:供体麻醉满意后,经阴茎背静脉注入肝素钠生理盐水2 mL(含肝素钠500 U),约5 min后开胸用血管钳夹闭心脏基底部致心脏停搏,热缺血时间自夹闭心脏基底部起至冷灌注前测算,热缺血各组利用心脏停搏期间游离供肝^[2-3].

大鼠动脉化原位肝移植操作步骤参照Engemann法^[3],其简要过程如下:受体游离肝脏

步骤同供体手术,以8-0无损伤缝线行肝上下腔静脉端端吻合,双套管法吻合门静脉及肝下下腔静脉,供体腹主动脉袖套与受体左肾静脉水平以下腹主动脉行端侧吻合.将胆道支撑管远端插入受体胆总管,结扎、固定、大网膜包裹. 3组的无肝期、肝下下腔静脉阻断时间、腹主动脉吻合时间、无肝期结束至肝动脉开放时间、冷缺血时间均无显著性差别. C组只向胆总管内插入胆道支撑管.

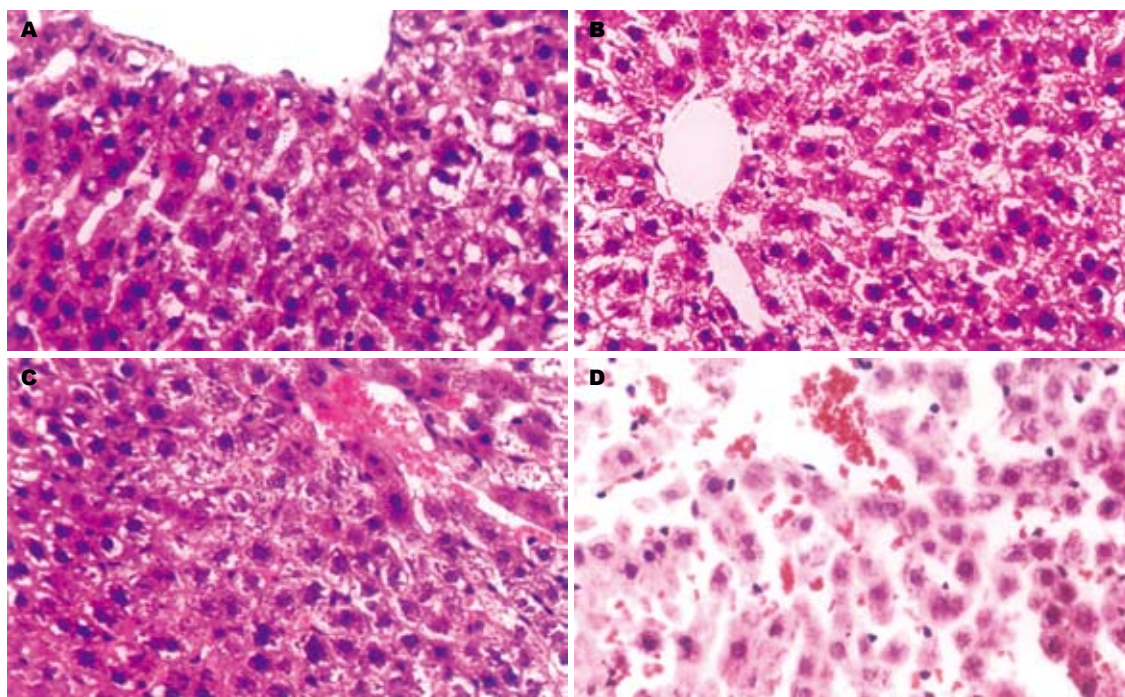
1.2.3 标本获取及检测指标: 各组大鼠分别于术后(POD)第3、7、14、30天乙醚麻醉下行无菌手术,获取肝组织及血清,每个时间点各取6只大鼠.血清行肝脏相关的酶学(ALT、AST)分析,肝组织标本行病理切片常规HE染色检查和免疫组化检测肝细胞增殖核抗原Ki-67的表达.兔抗大鼠Ki-67多克隆抗体和兔二步法检测试剂盒分别购自LAB VISION和北京中杉金桥生物技术有限公司.以PBS代替第一抗体作为阴性对照,取乳腺癌组织作为阳性对照. Ki-67阳性反应主要定位于细胞核,呈棕色颗粒状,高倍镜下每张切片选择10个有代表性的视野,每个视野记数100个细胞,共记数1000个细胞,计算其阳性细胞比例,作为Ki-67的标记指数.

统计学处理 本实验采用SPSS13.0统计软件包进行数据分析处理.所有结果,当 $P < 0.05$ 时认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 肝移植术后移植物的病理变化 术后第3天, W0组(图1A):区域性肝细胞水肿, W15组(图1B)及W30(图1C)组均出现弥漫性肝细胞水肿,三组均出现胞质疏松化和气球样变,细胞核肿胀,肝细胞索结构不清,均见核分裂及较多双核细胞,上述改变,均随热缺血时间的延长而加重. 术后第7天, W0组(图2A)及W15组(图2B)肝细胞水肿均较第3天减轻,双核细胞较第3天减少, W30组(图2C)肝细胞水肿与术后第3天相似,可见中性粒细胞浸润. 术后第14天, W0组(图3A)肝结构基本恢复正常, W15组(图3B)及W30组(图3C)肝细胞水肿明显减轻,可见胆管细胞增生. 术后第30天, W0组(图4A)肝结构基本正常, W15组(图4B)及W30组(图4C)肝细胞水肿较轻,可见胆管细胞增生及中性粒细胞浸润. 对照组各时间点肝脏结构均基本正常(图1D、图2D、图3D、图4D).

2.2 大鼠肝移植术后肝功能的变化 大鼠肝移



■应用要点

本文对来自心脏停搏供肝的临床肝移植应用有一定的指导作用, 并对供肝热缺血损伤研究提供理论依据。

图 1 大鼠肝移植术后3 d移植物的病理变化(HE × 400). A: W0; B: W15; C: W30; D: C.

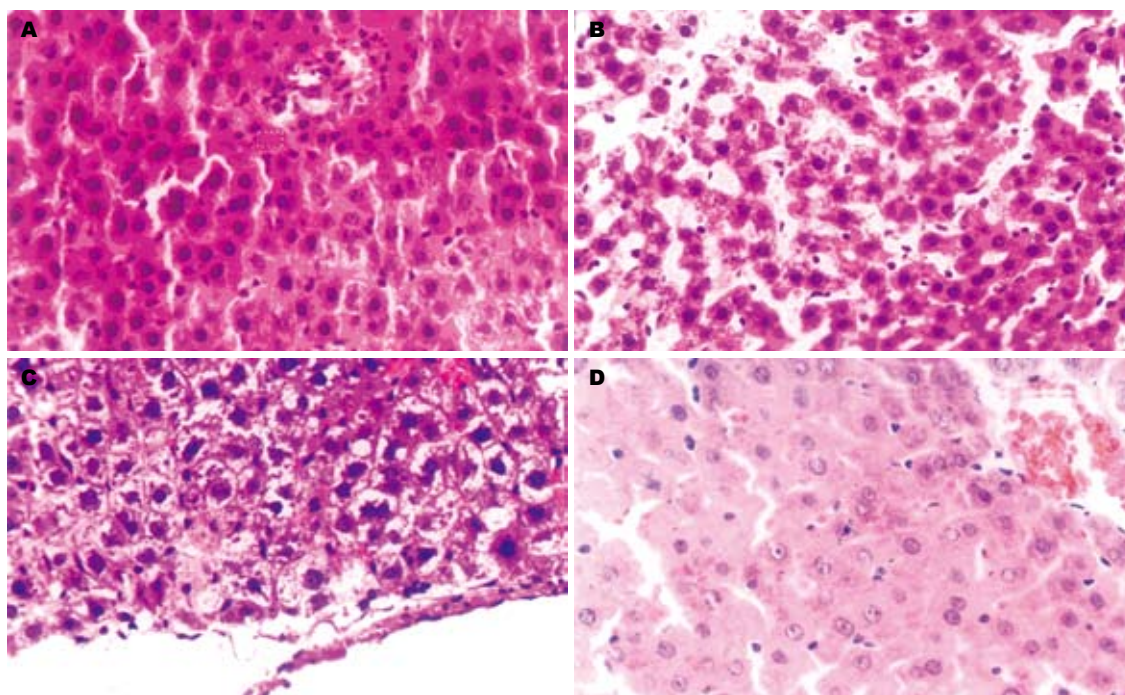


图 2 大鼠肝移植术后7 d移植物的病理变化(HE × 400). A: W0; B: W15; C: W30; D: C.

植术后第3、7、14、30天血清ALT、AST结果显示: 热缺血各组和对照组相比ALT和AST均无显著性差别; 并且热缺血各组及对照组随着术后时间的延长ALT和AST均无显著性变化(表1-2).

2.3 肝移植术后肝细胞的增生情况 在大鼠肝移植术后第3天, C组与热缺血各组差异明显, 随着

供肝热缺血时间的增加, 肝细胞增生显著. W0与W15和W30组差别显著, W15和W30组差别显著. 术后第7天, C组与热缺血各组差异显著, W0与W15差异消失, W0与W30、W15与W30差别显著. 在术后14 d、30 d, 热缺血各组与C组无明显差异.

热缺血各组肝细胞增生状况随着术后时间

■同行评价

该研究利用来自心脏停搏供体的大鼠动脉化肝移植模型进行供肝热缺血损伤研究,认为热缺血30 min内来自于心脏停搏的供肝肝移植术是安全的,该研究的发现具有一定的临床应用价值.

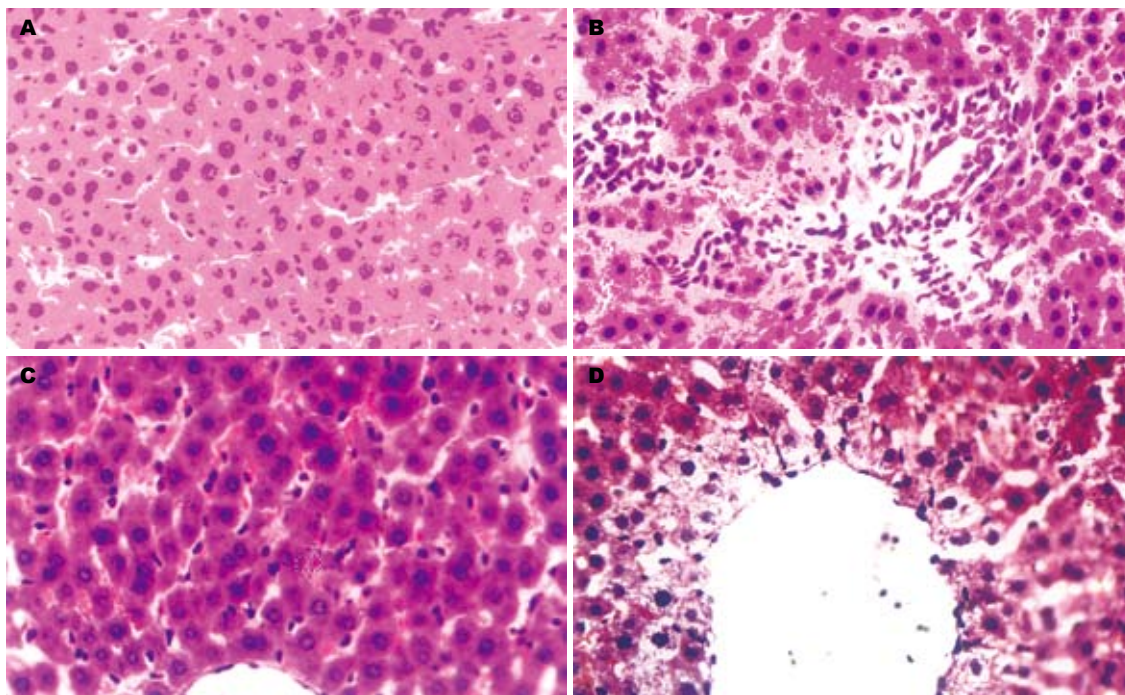


图 3 大鼠肝移植术后14 d移植物的病理变化(H&E × 400). A: W0; B: W15; C: W30; D: C.

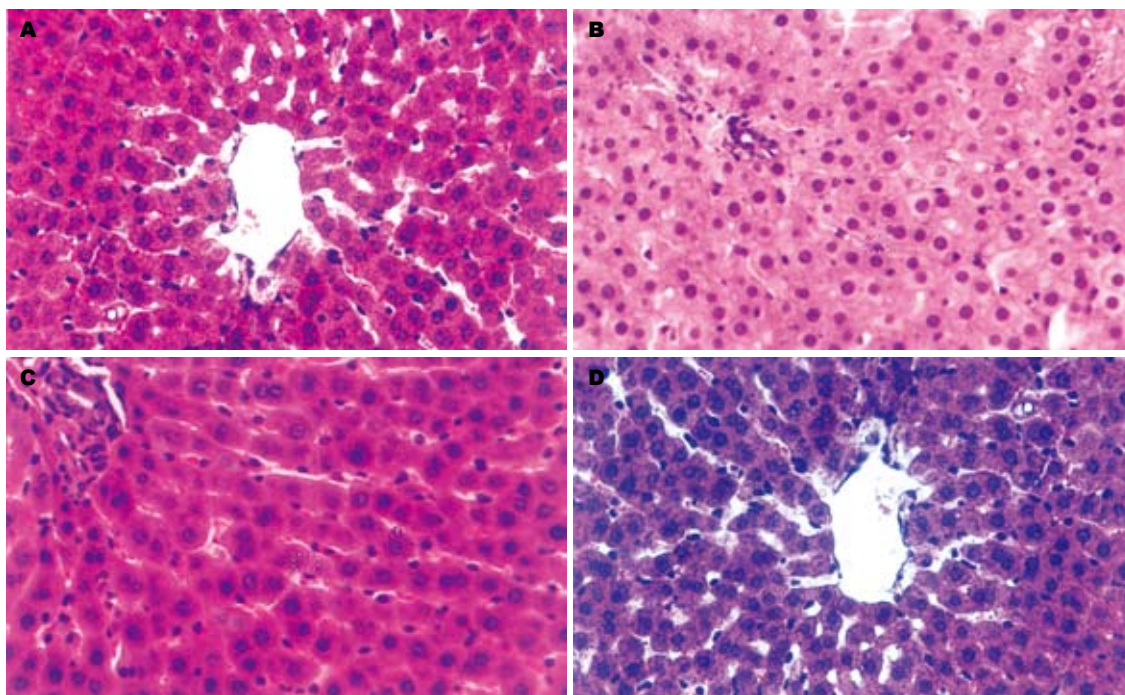


图 4 大鼠肝移植术后30 d移植物的病理变化(H&E × 400). A: W0; B: W15; C: W30; D: C.

的延长有逐渐下降的趋势,并在术后14 d其差异消失,与C组无明显差别. W0组术后第3天显著高于7、14和30 d,术后7 d与14 d、7 d与30 d、14 d与30 d差异消失. W15和W30组术后3 d显著高于7 d、14 d和30 d,术后7 d与14 d、7 d与30 d差异显著,14 d与30 d差异消失; C组在术后各时间点之间均无明显差别(图5).

术后3 d和7 d,移植组的肝细胞Ki-67表达与热缺血时间具有显著正相关性,而术后14 d和30 d不具有相关性(POD3: $r_s = 0.826$, $P = 0.000$; POD7: $r_s = 0.682$, $P = 0.002$; POD14: $r_s = 0.367$, $P = 0.134$; POD30: $r_s = 0.184$, $P = 0.466$). 经统计学分析,各组的肝细胞Ki-67表达均与血清ALT、AST无关.

表 1 肝移植术后ALT水平变化 (mean \pm SD, U/L)

分组	W0	W15	W30	C	F	P
POD3	71.2 \pm 18.8	82.8 \pm 8.1	85.2 \pm 28.9	70.7 \pm 6.1	1.078	0.381
POD7	71.0 \pm 7.5	69.8 \pm 13.5	66.8 \pm 12.3	73.2 \pm 19.1	0.222	0.880
POD14	80.0 \pm 10.2	77.5 \pm 7.4	74.7 \pm 12.4	84.2 \pm 23.2	0.457	0.715
POD30	75.8 \pm 8.5	85.5 \pm 17.9	73.7 \pm 15.4	76.5 \pm 13.7	0.802	0.507
F	0.756	1.835	1.001	0.732		
P	0.532	0.173	0.413	0.545		

表 2 肝移植术后AST水平变化 (mean \pm SD, U/L)

分组	W0	W15	W30	C	F	P
POD3	85.5 \pm 14.3	100.5 \pm 18.5	105.3 \pm 37.2	86.3 \pm 20.4	1.062	0.402
POD7	97.3 \pm 13.8	87.3 \pm 15.4	82.8 \pm 10.6	87.3 \pm 12.0	1.322	0.295
POD14	109.3 \pm 20.6	90.0 \pm 25.3	101.5 \pm 21.4	92.7 \pm 29.9	0.770	0.524
POD30	99.7 \pm 29.2	108.2 \pm 44.9	82.5 \pm 9.6	76.5 \pm 13.8	1.651	0.210
F	1.380	0.688	1.713	0.663		
P	0.278	0.570	0.196	0.585		

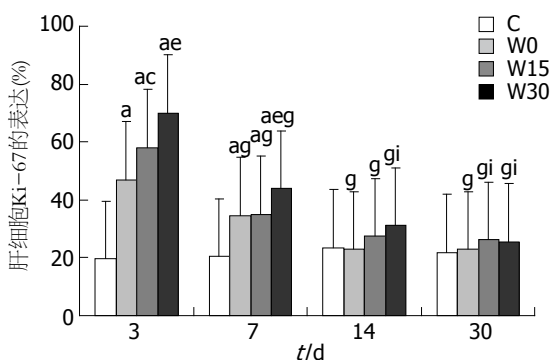


图 5 肝移植术后肝细胞Ki-67表达的变化(mean \pm SD).
^a $P < 0.05$ vs C组; ^c $P < 0.05$ vs W0组; ^e $P < 0.05$ vs W15组; ^g $P < 0.05$ vs POD3; ⁱ $P < 0.05$ vs POD7.

3 讨论

无心跳供体分为4类: (1)到达医院时已经死亡; (2)不成功的复苏; (3)等待心脏停搏(通常为有计划的生命支持撤离后); (4)脑死亡时心脏停搏. 第1和2类称为不可控的无心跳供体, 第3类称为可控的无心跳供体, 其肝移植术后效果与来自于脑死亡供体相比术后长期效果一致^[4-5]. 而不可控的无心跳供体代表了最大的潜在器官供体来源, 因此界定一个肝移植植物可用的最大热缺血时间具有重要的临床实用价值.

来自于无心跳供体的器官其基本问题在于长时间的热缺血. 热缺血能快速引起肝脏内ATP含量降低, 进一步造成细胞内酸中毒、细胞水肿. 同时再灌注时, 大量氧自由基产生和大量炎

性介质释放, 进一步加重肝窦内皮细胞损伤和肝细胞损伤, 并且损害肝脏的微循环, 增加肝移植术后发生原发性无功能的机会^[6].

肝移植术后的病理学检查成为判断肝移植术后并发症的金标准. 本组实验结果显示, 肝脏移植术后第3天随着供肝热缺血时间的延长, 移植肝细胞水肿及胞质疏松化、气球样变明显加重, 并以小叶中央明显.

Ikeda *et al*^[7]发现移植肝损伤随着热缺血时间的延长而加重, 而肝窦内皮细胞未见明显改变. 同时发现热缺血造成Kupffer细胞数量下降、吞噬能力降低. 心脏停搏供体的肝脏移植植物, 主要表现为肝细胞损伤, 非实质细胞的损伤与无心跳停搏供体相似^[8]. 随着供体心搏骤停的时间延长, 肝移植术后早期肝细胞的凋亡数量增加, TNF- α 上升, 术后晚期肝细胞坏死增加^[9]. 本实验也证实随着供肝热缺血时间的延长, 肝细胞损伤加重这一结论.

由于肝脏移植术后肝细胞受损, 导致其开始增殖进行恢复. 本实验采用细胞增殖核抗原Ki-67来反映细胞增殖活性, 探讨肝组织再生的可能性. 本实验结果显示, 在移植术后第3天, 随着供肝热缺血时间的增加, 肝细胞增生显著, 并且增生程度与热缺血时间具有显著相关性. 并且随着术后时间的延长, 肝细胞增生逐渐恢复正常, 且随热缺血时间延长, 其恢复过程也延长.

血清ALT、AST存在于正常的肝细胞中,

当肝细胞损伤时逸出细胞外,测定血清中的这些酶可反映出肝细胞损伤的程度. 本实验发现,肝移植组术后第3天血清ALT、AST恢复正常,显示肝移植术后功能与形态的不一致性. 血清ALT、AST等活性一般在肝移植术后几小时内增高,术后24 h达到高峰,其后迅速下降^[10]. He *et al*^[11]在大鼠肝移植研究中,同样也发现热缺血30 min以内,ALT、AST在术后3 d基本降至正常,这与本实验结果较为一致,说明热缺血在30 min以内,肝细胞损伤不严重,复流后能很快恢复其功能. 而从病理形态学上看,其形态学恢复正常需要较长时间,热缺血时间的增加明显延长其恢复过程. 肝移植术后肝细胞的功能恢复明显早于其形态学恢复,说明了肝脏本身所蕴藏的巨大储备潜能.

大鼠供肝热缺血时限多数报道为30 min^[11-12]. 本实验的结果证实,来自于心脏停搏时间30 min以内的供肝适合进行肝移植术后的长期研究,同时也提示长时间热缺血的边缘供肝在临床上具有一定的可用性. 此外,采用应用自由基清除剂依达拉奉可减轻来自无心跳供体的移植肝的热缺血再灌注损伤^[13],中药苦参碱可以通过减轻再灌注后内毒素血症,抑制库氏细胞激活及炎症性细胞因子释放,清除氧自由基,促进NO合成等途径,减轻肝细胞及肝窦内皮细胞的损伤,并且可以促进抑制凋亡基因的表达来抑制冷保存再灌注导致的肝细胞凋亡^[14-15],这必将会进一步促进无心跳供体的临床应用.

4 参考文献

- 1 Abt PL, Desai NM, Crawford MD, Forman LM, Markmann JW, Olthoff KM, Markmann JF. Survival following liver transplantation from non-heart-beating donors. *Ann Surg* 2004; 239: 87-92
- 2 Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69
- 3 Engemann R, Ulrichs K, Thiede A, Müller-Ruchholtz W, Hamelmann H. Value of a physiological liver transplant model in rats. Induction of specific graft tolerance in a fully allogeneic strain combination. *Transplantation* 1982; 33: 566-568
- 4 Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1995; 27: 2893-2894
- 5 Manzarbeitia CY, Ortiz JA, Jeon H, Rothstein KD, Martinez O, Araya VR, Munoz SJ, Reich DJ. Long-term outcome of controlled, non-heart-beating donor liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 211-215
- 6 Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001; 181: 160-166
- 7 Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992; 16: 454-461
- 8 Tsutsumi R, Azuma T, Miyamoto S, Hou Z, Ohkubo H, Yuzawa H, Kamohara Y, Okudaira S, Mizoe A, Fujioka H, Furui J, Kanematsu T. Main injury site of liver grafts from non-heart-beating donors in pigs. *Transplant Proc* 2000; 32: 2348
- 9 严佑祺, 李宏为, 张明钧, 杨卫平, 蔡伟耀. 肝细胞凋亡与肝移植中热缺血损伤关系的实验研究. *外科理论与实践* 2002; 7: 211-213
- 10 Biasi F, Bosco M, Chiappino I, Chiarpotto E, Lanfranco G, Ottobrelli A, Massano G, Donadio PP, Vaj M, Andorno E. Oxidative damage in human liver transplantation. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 311-317
- 11 He XS, Ma Y, Wu LW, Ju WQ, Wu JL, Hu RD, Chen GH, Huang JF. Safe time to warm ischemia and posttransplant survival of liver graft from non-heart-beating donors. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3157-3160
- 12 蔡伟耀, 张明钧, 严佑祺, 杨卫平, 狄忠民, 邓侠兴, 周光文, 李宏为. 大鼠心脏停搏供体肝移植的实验研究. *中华器官移植杂志* 2001; 22: 238-240
- 13 Nakamura A, Akamatsu Y, Miyagi S, Fukumori T, Sekiguchi S, Satomi S. A free radical scavenger, edaravone, prevents ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 2008; 40: 2171-2174
- 14 朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛. 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1675-1680
- 15 朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛. 苦参碱对大鼠供肝冷保存再灌注损伤中肝细胞凋亡及调控基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 25-28

编辑 李军亮 电编 何基才

E-cad-β-cat复合体表达及临床病理特征与食管癌预后的关系

林香春, 吴静, 王沧海, 魏南, 寇炜, 姬瑞, 路红

林香春, 吴静, 王沧海, 魏南, 北京大学第九临床医院 北京世纪坛医院消化科 北京市 100038

寇炜, 西北民族大学医学院 甘肃省兰州市 730000

姬瑞, 路红, 兰州大学第一医院消化科 甘肃省兰州市 730000
作者贡献分布: 林香春与吴静对此文所作贡献均等; 此课题由吴静与林香春设计; 研究过程由林香春, 吴静, 寇炜, 姬瑞及路红完成; 数据分析由林香春, 吴静, 王沧海及魏南参与; 本论文写作由林香春, 吴静及王沧海完成。

通讯作者: 吴静, 100038, 北京市, 北京大学第九临床医院, 北京世纪坛医院消化科. wujing36@163.com

收稿日期: 2008-08-11 修回日期: 2008-10-20

接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-11-18

E-cadherin-β-catenin complex expression and clinicopathologic properties in esophageal carcinoma patients and their relationship with the prognosis

Xiang-Chun Lin, Jing Wu, Cang-Hai Wang, Nan Wei, Wei Kou, Rui Ji, Hong Lu

Xiang-Chun Lin, Jing Wu, Cang-Hai Wang, Nan Wei, Department of Gastroenterology and Hepatology, the Ninth Hospital Affiliated to Beijing University; Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Wei Kou, Medical College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Rui Ji, Hong Lu, Department of Gastroenterology and Hepatology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Jing Wu, Department of Gastroenterology and Hepatology, the Ninth Hospital Affiliated to Beijing University; Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China. wujing36@163.com

Received: 2008-08-11 Revised: 2008-10-20

Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of E-cadherin (E-cad) and β-catenin (β-cat) complex in esophageal carcinoma (EC) tissue and the clinicopathologic properties in EC patients and to further explore their relationship with the prognosis.

METHODS: The data of 67 EC patients undergoing radical esophagectomy from 1998 to 2001 were reviewed and analyzed. The expression of

E-cad and β-cat in the resected esophageal carcinoma tissue was detected using immunohistochemical technique. The prognostic factors were analyzed by Kaplan-Meier univariate and Cox multivariate survival analyses.

RESULTS: The univariate Kaplan-Meier analysis showed that age, the degree of tumor differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis and the expression of E-cad and β-cat complex were very important prognostic factors for EC patients. The multivariate analysis demonstrated that the degree of tumor differentiation and depth of invasion, lymph node metastasis were independent prognostic factors ($P = 0.039, 0.006, 0.020$), Risk degree were 2.675, 3.077, 2.958 while E-cad-β-cat could not be used as independent prognostic factors for EC patients.

CONCLUSION: Both the expression of E-cad - β-cat complex and clinicopathologic properties are very important for prognosis of EC patients. The clinicopathologic properties could be used as independent markers for predicting the prognosis. The degree of tumor differentiation is the most important prognostic factor.

Key Words: E-cadherin; β-catenin; Esophageal carcinoma; Prognosis

Lin XC, Wu J, Wang CH, Wei N, Kou W, Ji R, Lu H. E-cadherin-β-catenin complex expression and clinicopathologic properties in esophageal carcinoma patients and their relationship with the prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3687-3691

摘要

目的: 探讨食管癌患者E-钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)和β-连环素(β-catenin, β-cat)复合体表达及临床病理特征与食管癌患者术后生存的关系。

方法: 收集1998-2001年本院行食管癌根治术后的标本67例, 应用免疫组织化学S-P法进行E-cad和β-cat复合体测定, 结合病理学特征与

■背景资料

侵袭转移是肿瘤细胞的主要生物学特性, 也是造成肿瘤患者死亡的主要原因。E-cadherin为重要的细胞黏附分子, 其所介导的黏附系统已被公认为“浸润抑制系统”。

■同行评议者

王健生, 副教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科; 吕宾, 教授, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

■相关报道

研究表明E-cad- β -cat复合体在多种恶性肿瘤中表达异常,但由于肿瘤转移的分子机制十分复杂,不同的研究者观察的结果不甚一致。

患者生存期进行Kaplan-Meier单因素分析和Cox回归多因素模型分析。

结果:食管癌患者的年龄、肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移以及E-cad和 β -cat表达是影响患者预后的重要因素;浸润深度、病理分级和淋巴结转移可作为独立的预后预测因子($P = 0.039, 0.006, 0.020$),风险度分别为2.675, 3.077, 2.958。而E-cad和 β -cat不可作为独立的因子。

结论:食管癌患者E-cad和 β -cat复合体异常表达和食管癌的临床病理特征是影响患者预后的重要因素,且后者是独立的预后预测因素,其中分化程度最为重要。

关键词: E-钙粘蛋白; β -连环素; 食管癌; 预后

林香春, 吴静, 王沧海, 魏南, 寇炜, 姬瑞, 路红. E-cad- β -cat复合体表达及临床病理特征与食管癌预后的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3687-3691

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3687.asp>

0 引言

食管癌是我国常见的消化系恶性肿瘤,居肿瘤死亡的第4位,其侵袭转移是食管癌患者死亡的首要原因。研究表明, E-钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)作为细胞黏附分子,其表达下调或功能障碍与恶性肿瘤细胞分化及侵袭转移有关^[1]。连环素(catenin, cat)最初是对上皮钙粘蛋白进行免疫沉淀研究时发现,经典家族包括 α 、 β 、 γ -catenin,其中 β -cat是复合体功能调控的重要环节。 β -catenin不仅能通过Wnt信号通路影响细胞增殖周期,而且能与E-cad形成E-cad和 β -cat复合体而介导同种细胞间的黏附^[2]。多种因素可以影响这种复合物的稳定性,导致E-cad黏附能力下降,影响细胞间的黏附^[3],促使肿瘤的发生发展,同时与患者的预后有关。我们采用超敏感SP免疫组化方法,探讨食管癌患者E-cad和 β -cat复合体表达和临床病理特征与食管癌患者术后生存的关系,以期临床治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集1998-2001年本院行食管癌根治术后的标本67例,年龄28-78(中位51.5)岁,男55例,女12例。全部病例均有完整的临床资料,术前均未行放疗及其他治疗,病理类型均为鳞癌。依据肿瘤UICC分类,高分化鳞癌(G1)7例、中分化鳞癌(G2)25例、低分化(G3)33例、未分化(G4)2

例。有淋巴结转移36例,无淋巴结转移31例。对67例患者进行3年随访观察,其中回访50例。

1.2 方法 采用免疫组织化学SP方法检测E-cad和 β -cat表达。切除组织经40 g/L甲醛溶液固定,石蜡包埋,连续4 μ m厚度切片,分别进行HE染色和E-cad和 β -cat免疫组织化学染色。用PBS代替一抗作阴性对照,癌旁正常组织作为阳性内对照。鼠抗人mAb E-cad及鼠抗人mAb β -cat为美国Sigma公司产品;超敏SP组化试剂盒,链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase), DAB显色剂及其他常用试剂购置于福州迈新生物技术开发公司。

染色评估分别由两位病理医生完成,一致性达90%以上。E-cad和 β -cat表达染色标准以细胞膜有明确棕褐色着色为阳性。根据文献将染色半定量计分为0-3分。0分:细胞膜、浆均未染色;1分:细胞质染色为主;2分:细胞膜、浆混合染色;3分:正常细胞呈细胞膜连续染色。在同一张肿瘤组织切片中,因分化程度的差异,染色也存在差异,此种情况则以主导染色计分;若染色差异超过20%,则以混合染色计分。失去连续细胞膜染色为异常染色,即0-2分为异常染色。

统计学处理 采用SPSS10.0分析软件包行统计学处理。各相关指标间进行Spearman等级相关分析。应用Kaplan-Meier曲线分析食管癌患者各项临床指标对其预后的影响,显著性检验采用时序检验(Log-rank test)。建立Cox回归多因素模型分析(Forward法),筛选影响食管癌预后的多种因素。

2 结果

2.1 E-cad和 β -cat表达与食管癌预后的关系 本组67例食管癌中,最后获得随访50例,随访时间为3-50 mo,随访成功率74.63%。平均生存期26.45 \pm 2.17 mo;3年生存率为24%。

50例随访者中, E-cad表达正常者23例,平均生存时间33.54 \pm 3.09 mo,生存3年以上者9例,生存率为39.13%;表达异常者27例平均生存时间为20.21 \pm 2.43 mo,生存3年以上者3例,生存率为11.11%。结果表明, E-cad表达正常(阳性表达)与表达异常(阴性表达)之间的3年生存率相比有显著性差异($P = 0.0032 < 0.01$)(图1-2, 表1)。

50例随访者中 β -cat正常表达者为24例,平均生存时间31.23 \pm 3.30 mo,生存3年以上者9例,生存率为37.50%;26例 β -cat异常表达者,平均生存时间21.68 \pm 2.43 mo,生存3年以上者3例,生

表 1 50例食管癌患者单因素生存分析(Kaplan-Meier)

变量	n	平均存活时间(mo)	P
年龄			
≥50	24	17.53 ± 2.23	0.0308
<50	26	25.03 ± 2.80	
性别			
男	25	20.95 ± 2.45	0.6617
女	25	21.02 ± 2.78	
肿瘤大小(cm)			
≥3	26	20.11 ± 2.41	0.4867
<3	24	22.00 ± 2.28	
肿瘤大体形态			
溃疡型	18	20.52 ± 3.26	0.8491
蕈伞型	17	18.68 ± 3.01	
浸润型	15	24.15 ± 3.24	
病理分级			
高/中分化	20	36.34 ± 3.36	0.0002
低分化	30	19.26 ± 1.85	
浸润深度			
T ₁ /T ₂	23	34.59 ± 3.34	0.0004
T ₃ /T ₄	27	19.33 ± 1.96	
淋巴结转移			
N ₀	23	32.98 ± 3.18	0.0064
N ₁	27	20.42 ± 2.32	
E-cad			
阳性	23	33.54 ± 3.09	0.0032
阴性	27	20.21 ± 2.43	
β-cat			
阳性	24	31.23 ± 3.30	0.0343
阴性	26	21.68 ± 2.43	

存率为11.54%。结果表明, β-cat正常表达(阳性表达)者生存时间显著高于异常表达(阴性表达)者($P = 0.0343 < 0.05$, 图3-4, 表1)。

2.2 临床病理特征与食管癌预后的关系 采用Kaplan-Meier法统计食管癌患者各项临床病理特征对其预后的影响, 并绘制生存曲线。时序检验(Log-rank test)发现, 食管癌患者年龄、病理分级、浸润深度、淋巴结转移, 以及E-cad、β-cat表达是影响患者预后的重要因素(表1)。结果发现: 年龄小于50岁的患者平均生存时间明显高于年龄大于50岁者($P < 0.01$); 病理分级为高/中分化食管癌者平均生存时间显著高于低分化食管癌($P < 0.01$); 癌细胞局限于黏膜层和肌层内(T₁/T₂)食管癌的平均生存时间显著高于癌细胞浸润至外膜者($P < 0.01$); 淋巴结未转移(N₀)食管癌者平均生存时间显著高于淋巴结转移(N₁)食管癌($P < 0.01$)。

2.3 Cox多元回归分析-E-cad和β-cat及食管癌患

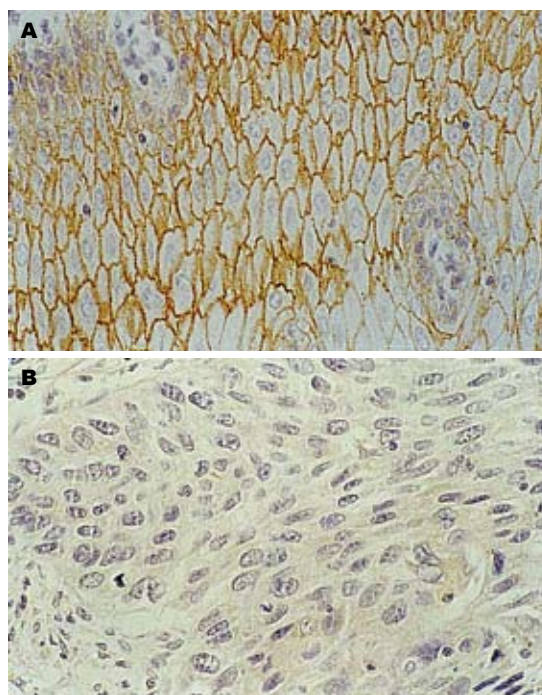


图 1 E-cad在鳞癌中的表达(SP × 400)。A: 在高/中分化鳞癌E-cad表达正常(阳性表达); B: 在未分化鳞癌E-cad表达异常(阴性表达)。

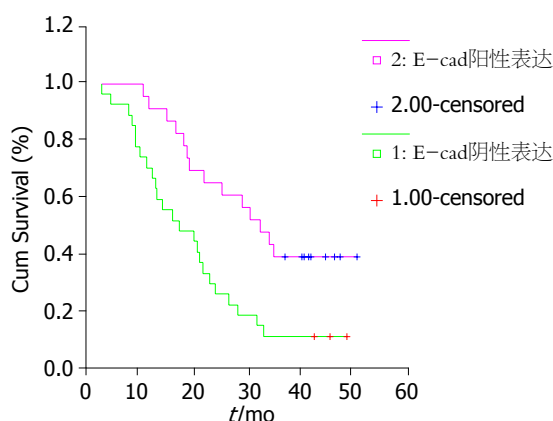


图 2 食管癌组织中E-cad的表达与患者的生存期之间的关系。

者的临床病理特征等因素与预后的关系 采用Cox多元回归分析方法将50例食管癌患者的临床病理特征-浸润深度、淋巴结转移和分化程度以及E-cad和β-cat等因素作为多变量进行预后预测分析。结果表明, 浸润深度($P = 0.038$)、病理分级($P = 0.006$)和淋巴结转移($P = 0.022$)可作为独立的预后预测因子, 而E-cad和β-cat不能作为独立的因子(表2)。

3 讨论

近年, 随着食管癌和贲门癌发病率的逐年升高, 对食管癌患者恶性程度的评定、治疗方式的选择以及术后生存期的判断已受到广泛关注^[4]。

■应用要点

本文检测67例食管癌手术标本中E-cad-β-cat复合体的表达, 并结合病理学特征与患者生存期进行分析, 具有重要的临床指导意义。

■同行评价

该文题目简明,能够准确反映研究工作的科学问题和内容,应用常规免疫组化SP法研究了E-cad- β -cat复合体表达及临床病理特征与食管癌预后的关系,具有一定的临床参考价值。

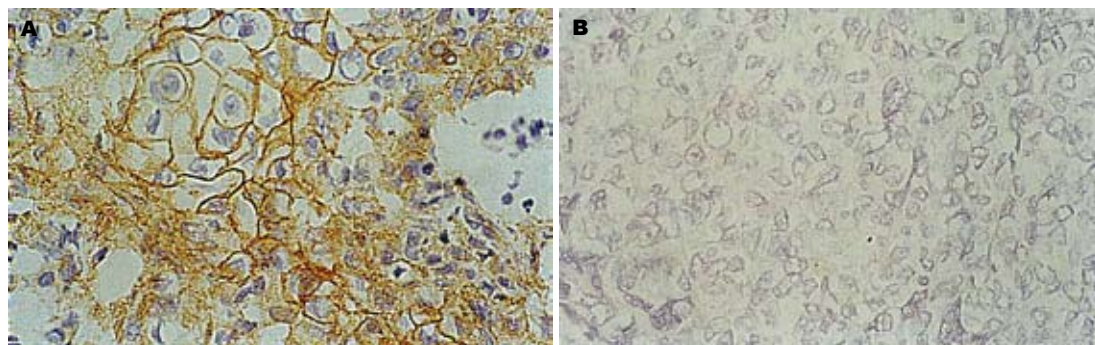


图3 β -cat在鳞癌中的表达(SP $\times 400$)。A: 在高/中分化鳞癌 β -cat表达正常(阳性表达); B: 在未分化鳞癌 β -cat表达异常(阴性表达)。

表2 Cox多元回归分析与预后相关危险因素

协变量	回归系数	标准误	统计量	ν	P值	风险度
部位	0.022	0.316	0.005	1	0.944	1.023
大小	0.392	0.373	1.102	1	0.294	1.480
病理形态	-0.485	0.366	1.757	1	0.185	0.616
浸润深度	0.984	0.477	4.248	1	0.039	2.675
病理分级	1.124	0.405	7.690	1	0.006	3.077
淋巴结	1.085	0.466	5.420	1	0.020	2.958
E-cad	-0.130	0.486	0.072	1	0.788	0.878
β -cat	0.217	0.558	1.154	1	0.695	1.244

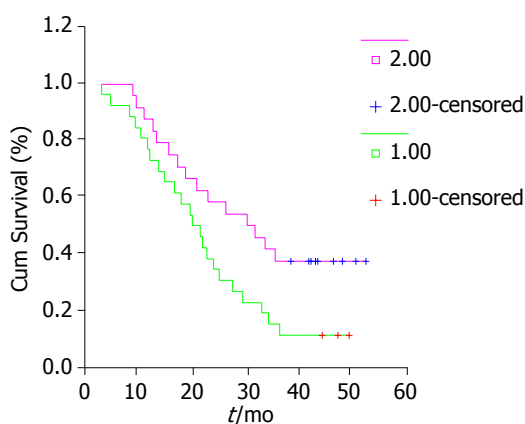


图4 食管癌组织中 β -cat的表达与患者的生存期之间的关系。

侵袭转移是肿瘤细胞的主要生物学特性,也是造成肿瘤患者死亡的主要原因。E-cadherin为重要的细胞黏附分子,是一类建立细胞间紧密连接,维持细胞极性,保持组织结构完整的钙依赖性跨膜糖蛋白。作为抑癌基因,其所介导的黏附系统已被公认为“浸润抑制系统”^[5],能抑制肿瘤细胞从原发灶脱落,为重要的肿瘤转移抑制因素之一。E-cad的功能不仅需要钙离子存在,还需要与其配体-连接素(β -catenin, β -cat)结合成E-cad- β -cat复合体才能发挥作用。E-cad- β -

cat复合体在多种恶性肿瘤中表达异常^[6-8],其结构与功能的变化直接关系到癌细胞分化和侵袭力。然而, E-cad- β -cat复合体在肿瘤转移中所起的具体作用及其机制,不同的研究者观察的结果不甚一致,其原因与肿瘤转移的分子机制十分复杂,影响因素众多有关^[9-11]。

我们采用Kaplan-Meier法对9个影响食管癌患者术后生存的因素进行单因素分析,结果发现食管癌患者的年龄、病理分级、浸润深度、淋巴结转移,以及E-cad、 β -cat表达是影响患者预后的重要因素,与以往的研究一致^[12-13]。提示E-cad表达下调或失去表达,使癌细胞极性丧失、去分化,具备侵袭性生长的特点,而 β -cat表达下调或功能障碍, E-cad将无法实现稳固的细胞-细胞黏附。因此, E-cad- β -cat复合体异常表达导致的黏附功能下降可促进肿瘤的浸润和转移,从而影响肿瘤患者的生存期。同时,我们也采用Cox回归多因素模型分析,以避免多因素的相互影响,结果发现肿瘤病理分级、浸润深度、淋巴结转移,可作为独立的预后预测因子,而E-cad和 β -cat不能作为独立的因子,不同于以往的研究^[13-15]。由于E-cad和 β -cat异常表达与食管癌的浸润深度,病理分级,淋巴结转移及生存期和患者的3年生存率有密切的关系,我们认为此结果

可能与样本数量偏少有关. 故关于E-cad和β-cat作为独立的预后指标需进一步大样本研究.

以上结果显示黏附分子E-cad-β-cat复合体的功能随着肿瘤的发生、发展而遭破坏, 使上皮细胞间的黏附力下降, 癌细胞从肿瘤组织中脱落, 导致肿瘤的转移. 提示E-cad-β-cat复合体表达下降为肿瘤的恶性侵袭行为, 且预示患者预后不良^[7]. 食管癌组织中E-cad-β-cat复合体表达减少或缺失, 与肿瘤的发生发展、浸润和转移密切相关. 临床工作中应寻求一些影响食管癌患者侵袭转移的因素, 有必要将临床病理特征与E-cad和β-cat这些指标综合分析, 以便早期对高危人群进行评估, 为改善预后提供可靠的依据.

4 参考文献

- 1 Lin YC, Wu MY, Li DR, Wu XY, Zheng RM. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, gamma-catenin and cyclin D1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3235-3239
- 2 吴静, 薛群基, 刘维民, 王爱勤, 寇伟. E-钙粘蛋白与食管癌侵袭转移的关系. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1618-1620
- 3 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2003; 23: 1581-1588
- 4 Eksteen JA, Latchford A, Thomas SJ, Jankowski JA. Commentary: Regional variations in oesophageal and gastric cardia cancers--implications and practice. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1425-1427
- 5 Lioni M, Brafford P, Andl C, Rustgi A, El-Deiry W, Herlyn M, Smalley KS. Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Am J Pathol* 2007; 170: 709-721
- 6 Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, Ishigami S, Aikou T. Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1174-1180
- 7 顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 郑爱民, 黄蓉蓉, 胡益云. 大肠癌E-cadherin, beta-catenin, MMP-7表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 375-380
- 8 Falkenback D, Nilbert M, Oberg S, Johansson J. Prognostic value of cell adhesion in esophageal adenocarcinomas. *Dis Esophagus* 2008; 21: 97-102
- 9 Shabani HK, Kitange G, Tsunoda K, Anda T, Tokunaga Y, Shibata S, Kaminogo M, Hayashi T, Ayabe H, Iseki M. Immunohistochemical expression of E-cadherin in metastatic brain tumors. *Brain Tumor Pathol* 2003; 20: 7-12
- 10 张秀凤, 王益民, 王瑞, 魏丽珍, 李琰, 郭炜, 王娜, 张健慧. E-钙粘蛋白基因多态性与食管癌、贲门癌的关系. *癌症* 2005; 24: 513-519
- 11 Setoyama T, Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Yokomakura N, Ishigami S, Aikou T. alpha-catenin is a significant prognostic factor than E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2007; 95: 148-155
- 12 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
- 13 吴永廉, 郑建盛, 陈秀娇. α-cat和β-cat及E-cad在食管癌组织中的表达及其临床意义. *中华肿瘤防治杂志* 2006; 13: 752-755
- 14 Zhai B, Yan HX, Liu SQ, Chen L, Wu MC, Wang HY. Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5665-5673
- 15 马杰, 李宝生, 闫婧, 孙菊杰, 孙兰萍, 李俞慧. 食管癌组织中E-cadherin的表达及其与临床病理特征和预后关系的研究. *中华肿瘤防治杂志* 2008; 15: 31-34

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 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和*World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-18)

慢性萎缩性胃炎中医药治法分类研究

王伟, 朱方石, 吴晓燕

■背景资料

近年来, 中医药治疗CAG显示了一定的优势和潜力, 但纵观文献及报道资料显示, 中医治疗方法繁多而方药弥散, 缺乏统一、规范、标准的治疗原则及其方案。

王伟, 吴晓燕, 南京中医药大学 江苏省南京市 210028
朱方石, 江苏省中医药研究院 南京中医药大学附属中西医结合医院 江苏省南京市 210028
国家“十一五”科技支撑计划资助项目, No. 2007BAI20B093
作者贡献分布: 此课题由朱方石设计; 研究过程由王伟, 朱方石及吴晓燕操作完成; 研究所用分析工具由王伟提供; 数据分析由王伟完成; 本论文写作由王伟, 朱方石及吴晓燕完成。
通讯作者: 朱方石, 210028, 江苏省南京市红山路, 江苏省中医药研究院. zhufs@tom.com
电话: 025-85608666
收稿日期: 2008-08-12 修回日期: 2008-10-07
接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-18

TCM treatment approaches to chronic atrophic gastritis

Wei Wang, Fang-Shi Zhu, Xiao-Yan Wu

Wei Wang, Xiao-Yan Wu, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China
Fang-Shi Zhu, Academy of Traditional Chinese Medicine of Jiangsu Province, Hospital of Chinese and Western Integrated Medicine Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China
Supported by: the 11th “Five-Year” Plan to Support Scientific and Technological Projects, No. 2007BAI20B093
Correspondence to: Fang-Shi Zhu, Academy of Traditional Chinese Medicine of Jiangsu Province, Hongshan Road, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China. zhufs@tom.com
Received: 2008-08-12 Revised: 2008-10-07
Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To understand and highlight the present situation, component and distribution of traditional Chinese medical treatment approaches of choice to chronic atrophic gastritis (CAG) and to assess these treatment approaches, aiming at proposing a standard framework of treatment.

METHODS: We searched the journal from 2000 to 2008 from the Network Database, and collected 139 dissertations which comprised detailed data and included 10 748 clinical cases diagnosed with CAG. We generalized totally 78 traditional Chinese medical treatment approaches to CAG and compared the differences of these approaches.

RESULTS: The leading treatment approaches

mostly used in clinic for CAG were replenishing qi and spleen invigorating, more than 20%. The rest of the treatment approaches, comprising over 10% were soothing the liver and regulating qi, enriching yin and nourishing stomach, and clearing heat and promoting diuresis. However, no significant difference was noted between fortifying spleen and replenishing qi approach and soothing liver and regulating qi approach, showing that these two treatment approaches were the frequently used treatment methods for CAG. Then, warming and nourishing spleen, promoting blood circulation and removing blood stasis were methods comprising over 5%. Warming yang and tonifying kidney method accounted for < 5%.

CONCLUSION: Replenishing qi and fortifying spleen is the basic TCM treatment approach to chronic atrophic gastritis, and soothing liver and regulating qi approach is also one of the most common rules. Approach sorting offers one of the basis to draw up a normative treatment protocol for CAG which is applicable for clinical practice.

Key Words: Chronic atrophic gastritis; Treatment; Traditional Chinese medicine; Classification; Method

Wang W, Zhu FS, Wu XY. TCM treatment approaches to chronic atrophic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3692-3695

摘要

目的: 了解和明确中医药对慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 主要治法的现状及构成分布的主次, 评价其优势和不足, 以期制定符合临床的规范化治疗方案提供框架结构。

方法: 通过网络数据库检索2000-2008年中西医结合学期刊, 收集含中医治法具体病例数据的论文139篇中确诊CAG病例10 748例, 对78种治疗方法进行归纳、分类、统计和总结, 分析比较CAG中医治法的构成比及其差异。

结果: 中医治法构成比排在首位的为益气健脾法, 超过20%; 其余按构成比高低顺序排

■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

列、并超过10%的依次为疏肝理气、滋阴养胃、清热化湿法;但健脾益气法与疏肝理气法比较无显著性差异,表明该二法为CAG最常见治法。而超过5%的依次为温中健脾、活血化瘀法;低于5%的为温阳补肾和其他治法。

结论: CAG以益气健脾为最基本大法,疏肝理气法亦为最常见治法之一;其治法分类的排列主次可作为制定CAG临床规范化治疗方案的依据之一。

关键词: 慢性萎缩性胃炎; 治疗; 中医药; 分类; 方法

王伟, 朱方石, 吴晓燕. 慢性萎缩性胃炎中医药治法分类研究. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3692-3695
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3692.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是以胃黏膜腺体萎缩为特征的一种常见的消化系统疾病,其癌变率为2.55%-7.46%^[1],属于中医“胃脘痛”、“痞满”、“胃痞”范畴。CAG迄今无特效治疗方法,而中医药治疗显示了一定的优势和潜力,但综观文献及报道资料显示,中医治疗方法繁多而方药弥散,缺乏统一、规范、标准的治疗原则及方法。为确定CAG中医治法构成分布和优势主次,以期为制定符合临床、实用、规范的中医药治疗CAG方案奠定基础,我们通过中国知网全文数据库、万方数据、维普中文科技期刊数据库等检索了2000-01/2008-05发表的有关中医治法的论文,对其中含中医治法具体病例数据的论文139篇中的10 748例CAG患者进行了中医治法的分类研究,将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 搜集文献报道确诊的CAG患者10 748例,其中男6493例,女3989例,性别不明266例,病程最短3 mo,最长37年,年龄16-83岁,平均病程和平均年龄因各文献报道的均数不一难以明确,不同年龄段具体病例数据因各统计、划分方法不一,亦难以统计;不同名称的中医治法涉及78种之多。

1.2 方法

1.2.1 文献检索: 通过检索2000-01/2008-05中国知网全文数据库、万方数据中心、维普中文科技期刊数据库等所收录有关研究CAG中医治法的学术论文1500余篇,提取了含中医治法

具体病例统计数据的论文139篇。

1.2.2 治法归纳: 文献载录不同名称治法种类达78种,将其按异名同类及主要治法、次要治法、使用方药等进行归纳,以执简驭烦,总结出主要治法7种共8854例(其中包括单纯主要治法者4548例,涉及一种次要治法者4306例),少见治法3种及一些不常见治法合称其他治法共403例,涉及3种或3种以上治法的称混合治法共1491例;对9种分类治法进行构成比进行两两比较。

统计学处理 文献载录不同名称治法种类达78种,将其按异名同类及主要治法、次要治法、使用方药等进行归纳,以执简驭烦,总结出主要治法7种共8854例(其中包括单纯主要治法者4548例,涉及一种次要治法者4306例),少见治法3种及一些不常见治法合称其他治法共403例,涉及3种或3种以上治法的称混合治法共1491例;对9种分类治法构成比进行两两比较。

2 结果

2.1 10 748例CAG患者中医治法现状的构成分布 中医治法构成比排在首位的为益气健脾法,超过20%;其余按构成比高低顺序排列、并超过10%的依次为疏肝理气、滋阴养胃、清热化湿法;超过5%的依次为温中健脾、活血化瘀法;低于5%的为温阳补肾和其他治法,而其他治法是少见8种治法的组合;至于混合治法虽占13.87%,排在第4位,但由于是7种治法的兼夹混合,不符合可比性对照原则,难以作为主要治法进行比较(表1)。

2.2 CAG临床8种治法构成比两两比较 8种中医治法构成比组间比较,排在第1、第2位的益气健脾法与疏肝理气法无显著性差异,表明该二法为CAG最常见治法。排在第7、第8位的温阳补肾法与其他治法比较亦无明显差异,而他治法是少见8种治法的组合,不能视为常见治法,故温阳补肾法亦不宜视为常见治法。其余各治法组间两两比较均有差异性显著($P<0.01$,表2)。

3 讨论

通过文献报道10 748例CAG患者的中医药治法构成分布高低排序的结果来看,临床以益气健脾和疏肝理气法最为多见,分别为20.5%和18.37%,且二者间比较无统计学意义,这一结果表明,CAG临床以脾胃虚弱、肝胃不和型最为多见,益气健脾和疏肝理气为之治疗常法。其次

■创新盘点

本文首次对文献报道的中医药治疗CAG的大法进行了治法分类、构成比、主次排列的研究,总结了CAG的基本治疗大法 and 常见治法。

■应用要点

本文通过对CAG中医治法构成分布和优势主次的归纳、总结,为制定符合临床、实用、规范的中医药治疗CAG方案提供了框架结构和基础。

表 1 CAG中医药治法现状的构成分布

分组	主要治法	n	构成比%
1	益气健脾	2155	20.05
2	疏肝理气	1975	18.37
3	滋阴养胃	1638	15.24
4	清热化湿	1103	10.26
5	温中健脾	886	8.24
6	活血化瘀	690	6.42
7	温阳补肾	407	3.79
8	其他治法	403	3.75
9	混合治法	1491	13.87

超过10%的治法依次分别是:滋阴养胃、混合治法和清热化湿法,三者间亦有统计学意义,说明三治法比例差异;而混合治法虽在构成比上排在第4位,然由于是7种治法的兼夹混合,不符合可比性对照原则,不能作为常见的独立治法。此外,治法构成比超过6%、排在第6、7位的为温中健脾和活血化瘀法。至于排在第7位的温阳补肾与第8位的其他治法(少见治法)二者间比较无统计学意义,亦由于其他治法是少见8种治法的组合,故该二治法均不能视为常见治法。因此,本结果表明,临床CAG的主要中医独立治法依次为益气健脾、疏肝理气、滋阴养胃、清热化湿、温中健脾和活血化瘀之法,这一治疗方法前4位的现状结果与本课题组成员前期运用结构方程模型探讨CAG证型分布规律,得出临床以上述四型最为常见证型依次为脾胃虚弱,肝胃不和、胃阴不足、脾胃湿热型四种证型的证治规律相吻合^[2];亦与杨氏运用计算机对100位名中医治疗CAG临床经验资料的分析结果,前四证型相符^[3]。

从传统中医“以方测证、以法测证”的理论分析来看,益气健脾法居首,则表明脾胃虚弱型患者在临床最为常见。我们前期已分析认为,CAG病本正虚,尽管有饮食、情志、湿热等多种致病因素和环节,但脾胃虚弱为其发病基础,故临床以益气健脾为其基本大法^[4],是有其理论依据和临床治疗的基础。而疏肝理气治法占据第2位,我们认为,这与CAG肝胃同病有关。清叶天士《临证指南医案·木乘土》中指出:“肝为起病之源,胃为得病之所”。肝气横逆犯胃可致肝胃不和,或郁而化火耗伤胃阴致胃阴亏虚,或失于疏泄致胃气阻滞,久则入络致血瘀,若病程绵长可致气血不足,阴阳两伤。亦有人报道,CAG临床见证,以肝胃不和证型居多^[5];故有人

表 2 8种治法构成比两两比较

比较组	χ^2	P	比较组	χ^2	P
1和2	7.90	>0.05	3和5	229.07	<0.01
1和3	70.92	<0.01	3和6	400.39	<0.01
1和4	350.96	<0.01	3和7	795.24	<0.01
1和5	557.38	<0.01	3和8	803.03	<0.01
1和6	811.27	<0.01	4和5	23.75	<0.01
1和7	1340.64	<0.01	4和6	95.86	<0.01
1和8	1350.62	<0.01	4和7	330.06	<0.01
2和3	31.42	<0.01	4和8	335.26	<0.01
2和4	252.72	<0.01	5和6	24.33	<0.01
2和5	431.10	<0.01	5和7	179.88	<0.01
2和6	656.98	<0.01	5和8	183.80	<0.01
2和7	1140.43	<0.01	6和7	73.31	<0.01
2和8	1149.66	<0.01	6和8	75.87	<0.01
3和4	105.55	<0.01	7和8	2.28	>0.05

提出“胃病重调气”,除补益脾气外,还注重“降胃气,疏肝气”的治疗方法^[6]。至于滋阴养胃、清热化湿、温中健脾、活血化瘀亦为常见治法,我们认为,其常见治法贯穿着整个CAG中医病理机制。由于饮食、情志、湿热等致病因素的影响,日久导致了郁而生热或湿热困遏、或气滞血瘀,或伤阴耗气,或阴伤及阳,这一本虚标实的恶性循环外,形成了CAG病情反复迁延、病势缠绵的病症特点,故滋阴养胃、清热化湿、温中健脾、活血化瘀等常见治法亦是针对CAG不同病理环节的合理举措。

此外,混合治法构成比占13.87%,从形式上来看构成比居于第4位,虽然该治法不能作为CAG常见独立治法,但亦可说明,CAG临床症状反复、证候错杂已成为一普遍现象,多法并用、治法兼夹已成为治疗CAG方法的重要组成部分,故亦有人提出从心、肝、脾胃、肺、肾等各脏腑论治CAG的观点;另外,混合治法居多的现状似乎亦可说明,中医治疗CAG方法的相对凌乱,亟待提供标准、规范可供推广的中医治疗方案。

我们认为,临床治疗CAG以益气健脾为本,在辨证的前提下,疏肝理气法为之常法,根据病情,择选滋阴养胃、清热化湿、温中健脾、活血化瘀等法。其治法分类的排列主次可作为制定CAG临床规范化治疗方案的依据之一。

4 参考文献

- 赵霞,潘华峰,刘静.慢性萎缩性胃炎与细胞凋亡和增殖的研究进展.江西中医学院学报 2005; 17: 79-80
- 李国春,李春婷,黄蓝洋,单兆伟,陈启光.结构方程模

- 型在慢性萎缩性胃炎中医证候分型中应用. 中国卫生统计 2007; 24: 357-360
- 3 杨国平, 李敏, 孙益, 肖伟军, 郑红斌. 百名名中医治疗慢性萎缩性胃炎临床经验资料的计算机分析研究. 中国中医基础医学杂志 2008; 14: 62-63
- 4 朱方石, 姒健敏, 王良静. 萎缩性胃炎临床证型分类研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 844-846
- 5 于世良, 韩继春. 慢性萎缩性胃炎从肝论治. 辽宁中医学院学报 2005; 7: 328-328
- 6 赵盛云, 王垂杰. 王垂杰教授治疗慢性萎缩性胃炎及其癌前病变临证经验. 深圳中西医结合杂志 2008; 18: 25-26, 37

■同行评价

本文总体设计合理, 方法独特, 对临床具有一定的参考价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成t_{1/2}或T_{1/2}¹, V_{max}不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-18)

HBeAg阴性与阳性原发性肝癌临床和病毒相关因素分析

邹传鑫, 聂家艳, 戴绍军, 陈海燕, 谢明, 周东斌

■背景资料

原发性肝癌与乙型肝炎病毒感染密切相关。目前更重视HBeAg阳性乙型肝炎的治疗, 近期HBeAg阴性乙型肝炎感染逐渐引起学者的重视。

邹传鑫, 聂家艳, 戴绍军, 陈海燕, 谢明, 湖北省荆州中心医院消化内科 湖北省荆州市 434100

周东斌, 湖北省荆州市第二人民医院消化内科 湖北省荆州市 434100

作者贡献分布: 此课题由邹传鑫与谢明设计; 研究过程由邹传鑫, 聂家艳, 戴绍军, 陈海燕, 谢明及周东斌完成; 数据分析与本文写作由邹传鑫与聂家艳完成。

通讯作者: 邹传鑫, 434100, 湖北省荆州市, 荆州市中心医院消化内科。zhouchuanxin@medmail.com.cn

电话: 0716-9436341

收稿日期: 2008-08-26 修回日期: 2008-10-11

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-18

A correlation factor analysis of clinical and virological characteristics on HBeAg-negative and HBeAg-positive primary hepatic cancer

Chuan-Xin Zou, Jia-Yan Nie, Shao-Jun Dai, Hai-Yan Chen, Ming Xie, Dong-Bin Zhou

Chuan-Xin Zou, Jia-Yan Nie, Shao-Jun Dai, Hai-Yan Chen, Ming Xie, Department of Gastroenterology, Jingzhou Central Hospital, JingZhou 4343100, Hubei Province, China

Dong-Bin Zhou, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of JingZhou, JingZhou 4343100, Hubei Province, China

Correspondence to: Chuan-Xin Zou, Department of Gastroenterology, JingZhou Central Hospital, Jingzhou 4343100, Hubei Province, China. zhouchuanxin@medmail.com.cn

Received: 2008-08-26 Revised: 2008-10-11

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To investigate the clinical and virological characteristics of HBeAg-negative and HBeAg-positive primary hepatic cancer (PHC), and to explore their clinical significance.

METHODS: A total of 1356 out-patient and in-patient PHC cases were retrospectively analyzed. HBeAg-negative cases were taken as control group while HBeAg-positive cases were the test group. The upper alimentary canal bleeding rate, serum AFP values, HBV DNA levels were analyzed between the two groups.

RESULTS: Of the 1356 cases, 996 (73.4%) were HBeAg-negative(control group) and 360 (26.6%)

were HBeAg-positive (test group). Compared with the test group, there was a significantly higher upper alimentary canal bleeding rate (11.9% vs 22.2%, $\chi^2 = 17.70$, $P < 0.01$), a significantly lower DNA levels ($\chi^2 = 298$, $P < 0.005$) in the control group. And the cases of hepatic fibrosis staging ≥ 3 were also higher in the control group than in the test group (46.9% vs 33.1%, $\chi^2 = 7.27$, $P < 0.007$). No obvious difference in AFP levels was observed between the control group and the test group.

CONCLUSION: Hepatic tissue injury is more serious in HBeAg-negative patients than HBeAg-positive patients, and HBeAg-negative patients have greater tendency of developing portal hypertension-associated upper alimentary canal bleeding with a poor prognosis and HBeAg-negative patients should be warned against primary hepatic cancer.

Key Words: Primary hepatic cancer; Hepatitis B e antigens; Upper alimentary canal bleeding; DNA; Histology; AFP

Zou CX, Nie JY, Dai SJ, Chen HY, Xie M, Zhou DB. A correlation factor analysis of clinical and virological characteristics on HBeAg-negative and HBeAg-positive primary hepatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3696-3699

摘要

目的: 研究HBeAg阴性与HBeAg阳性的原发性肝癌患者临床特点和病毒相关因素的差异, 并探讨研究其临床意义。

方法: 对1356例原发性肝癌患者的门诊及住院病历进行回顾性调查, 以HBeAg阴性的原发性肝癌患者为对照组, HBeAg阳性的原发性肝癌患者为试验组。分析两组上消化道出血率、AFP水平、乙型肝炎病毒DNA定量和肝组织病理学指标的差异。

结果: HBeAg阴性原发性肝癌996例, 占73.4%; HBeAg阳性原发性肝癌360例, 占26.6%。HBeAg阴性组合并上消化道出血的比例为22.2%, 显著高于HBeAg阳性组的11.9% ($\chi^2 =$

■同行评议者

季国忠, 副教授, 南京医科大学第二附属医院消化科

17.70, $P < 0.01$). HBeAg阳性组乙型肝炎病毒DNA定量在各级对数值上均显著高于HBeAg阴性组($\chi^2 = 298, P < 0.005$). HBeAg阴性组肝纤维化分期 ≥ 3 的比例为46.9%, 高于HBeAg阳性组的33.1%($\chi^2 = 7.27, P = 0.007$). AFP水平在两组间无明显差异.

结论: HBeAg阴性原发性肝癌肝组织学损害程度重于HBeAg阳性原发性肝癌, 更易合并肝性门静脉高压症所致的上消化道出血, 预后较差. HBeAg阴性患者更要警惕原发性肝癌的发生.

关键词: 原发性肝癌; 肝炎e抗原; 上消化道出血; DNA; 组织学; AFP

邹传鑫, 聂家艳, 戴绍军, 陈海燕, 谢明, 周东斌. HBeAg阴性与阳性原发性肝癌临床和病毒相关因素分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(32): 3696-3699
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3696.asp>

0 引言

原发性肝癌的发病与HBV感染密切相关, 我国原发性肝癌患者的HBsAg阳性率为80%-95%^[1-2]. 一般认为, 慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、原发性肝癌是乙型肝炎病毒感染后随病程延长而所致的重要疾病. 原发性肝癌患者的预后除与癌细胞分化程度有关外, 与肝组织学损害程度也密切相关^[2-5]. 本研究主要从临床流行病学角度对两类原发性肝癌的相关因素进行比较分析, 从临床特征、病毒学特点及免疫学角度探讨HBeAg血清学结果对原发性肝癌临床转归和预后的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 研究对象为荆州市中心医院及荆州市第二人民医院1996-01/2007-06门诊及住院原发性肝癌患者. 所有病例均有肝功能、HBV血清免疫学标志检测及AFP结果, 部分病例有血清HBV DNA及肝脏组织学检测结果, 上消化道出血患者均经B超、CT排除门静脉血栓所致的肝后性门静脉高压症; 均除外HCV、HDV、HAV、HEV等肝炎病毒合并感染.

1.2 方法 所有病例均符合1999年第四届全国肝癌学会制定的原发性肝癌诊断标准. 以荧光定量PCR法(LightCycler PCR仪)检测血清HBV DNA, 以ELISSA法检测HBV血清免疫学标志, 试剂盒购自上海科华生物技术有限公司, 以全自动生化分析仪检测. 肝组织学切片采用HE及

和嗜银染色.

统计学处理 采用Mann-Whitney检验和 χ^2 检验.

2 结果

2.1 一般资料 所有1356例原发性肝癌中HBeAg阴性996例, 占总数的73.4%, 其中男890例, 女106例; 年龄18-86岁, 中位数42岁; 合并上消化道出血221例; 283例有肝组织学病理资料. HBeAg阳性原发性肝癌360例, 占总数的26.6%, 其中男301例, 女59例; 年龄20-71岁, 中位数40岁; 合并上消化道出血43例; 136例有肝组织学病理资料.

2.2 HBeAg阴性与HBeAg阳性临床相关因素的组间对比分析 (1)两组病例血清HBV DNA水平的对比分析: HBeAg阳性组的HBV DNA水平在各级对数值均高于HBeAg阴性组($P < 0.005$), HBeAg阳性组的HBV DNA含量对数值中位数分别为5.73, 高于HBeAg阴性组的1.33; HBV DNA $\geq 10^8$ 拷贝/L时, HBeAg阳性组的比例为87.1%(244/280), 显著高于HBeAg阴性组的27.6%(217/786)($\chi^2 = 298, P = 0.000$, 表1). (2)两组病例血清AFP水平对比分析: HBeAg阳性组AFP $> 500 \mu\text{g/L}$ 的比例为83.1%(61/360), 而HBeAg阴性组 $> 500 \mu\text{g/L}$ 的比例为82.4%(175/996), 无统计学差异($\chi^2 = 0.07, P > 0.75$). HBeAg阳性组AFP $> 2000 \mu\text{g/L}$ 的比例为50%(180/360), HBeAg阴性组 $> 2000 \mu\text{g/L}$ 的比例为47.7%(473/996), 也无统计学差异($\chi^2 = 0.67, P > 0.25$, 表2). (3)两组病例肝组织纤维化程度的对比分析: HBeAg阴性组肝纤维化分期 ≥ 3 的比例为46.9%(133/283), 高于HBeAg阳性组的33.1%(45/136)($\chi^2 = 7.27, P = 0.007$). 进一步分析还发现, 不论血清HBV DNA水平高于或低于 10^8 拷贝/L, 肝组织纤维化分期在HBeAg阴性组均重于HBeAg阳性组(表3). (4)两组病例合并上消化道出血的对比分析: HBeAg阴性组合并上消化道出血的比例为221/996(22.2%), 显著高于HBeAg阳性组的43/360(11.9%)($\chi^2 = 17.70, P < 0.01$).

3 讨论

HBV致肝癌是多因素多方面的机制, 不仅直接在癌基因(激活)或抑癌基因(失活)上产生效应, 也间接通过肝细胞损伤、再生循环来作用^[2]. HBV感染出现HBeAg阴性后, 可有以下特征: 进行性的肝脏损害, 存在前C区或核心启动子区发生改变的病毒变异, 后者使HBeAg不表达或表

■ 研究前沿

目前慢性乙型肝炎的抗病毒治疗是慢性肝炎治疗的热点、重点, 部分学者研究结果显示原发性肝癌的发生与慢性乙型肝炎病毒载量成正相关, 且多为HBeAg阳性.

■应用要点

本文研究发现HBsAg阳性患者,无论HBeAg阳性还是阴性,无论病毒载量的高低,都要警惕原发性肝癌的发生,预防原发性肝癌,还需探索更有效的方法。

表 1 部分门诊及住院病例HBeAg阴性组与阳性组HBV DNA含量分级

分组	n	HBV DNA含量对数值分级						
		0	3-	4-	5-	6-	7-	≥8-
试验组	280	5	10	21	52	71	86	35
对照组	786	253	16	152	93	53	49	22
χ^2 值		66.7	45.2	21.3	7.5	56.2	114.1	38.3
P值		0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000

表 2 HBeAg阴性组与阳性组AFP分级的病例数分布比较

分组	n	AFP(μg/L)						
		≤200	201-500	501-1000	1001-2000	2001-4000	4001-8000	≥8001
试验组	360	13(3.6)	48(13.3)	59(16.4)	60(16.7)	78(21.7)	63(17.5)	39(10.9)
对照组	996	40(4)	135(13.6)	158(15.9)	190(19.1)	176(17.7)	141(14.1)	156(15.6)
χ^2 值		0.12	0.01	0.05	1.02	2.77	2.31	2.11
P值		0.75	0.90	0.75	0.25	0.05	0.10	0.10

表 3 HBeAg阴性组与阳性组病理分期

分组	n	S0	S1	S2	S3	S4
试验组	136	2(1.5)	41(30.1)	48(35.3)	25(18.4)	20(14.7)
对照组	283	7(2.5)	66(23.3)	77(27.2)	74(26.1)	59(20.8)
χ^2 值		0.44	2.25	2.87	3.07	2.27
P值		0.50	0.14	0.08	0.08	0.14

达减少^[6]。以往认为HBeAg阴性提示感染性较小,病毒停止复制。然而有文献报道HBeAg阴性并不意味着疾病处于静止状态,国内有学者用分子杂交方法检测HBV DNA,发现持续抗-HBe阳转更易发生HBV DNA基因整合现象^[7],因此部分患者HBsAg阳性、HBeAg阴性仍表示现行感染且感染时间较长,正是在这种慢性迁延感染的情况下,由免疫耐受转为免疫激活,从而诱发和加速肝脏HBV DNA基因整合现象,最终诱发原发性肝癌的发生。亦有研究认为HBV致癌的机制可能是通过HBV DNA整合到肝细胞中,至使p53基因发生等位基因的缺失和点突变,表达出结构异常的P53蛋白,此异常蛋白与HBxAg构成稳定复合物,通过相互的协同作用致肝细胞发生转化,最后导致肝癌。

本研究资料显示1356例原发性肝癌中,HBeAg阴性病例占了绝大多数达73.4%,而合并上消化道出血的比例为22.2%,显著高于HBeAg阳性组(11.9%),表明HBeAg阴性并不意味着疾病处于静止状态,肝脏损伤及肝硬化均较重,并发症发生率较高。HBeAg阴性组与HBeAg阳性

组的组间比较显示:(1)HBeAg阳性组与HBeAg阴性组的HBV DNA水平的对数值中位数分别为5.73和1.33,差异有统计学意义,提示前者病毒复制水平总体上高于后者,与文献报道的慢性乙型肝炎一致^[5-7]。本组病例提示HBV相关性肝癌,与血清中HBV-DNA水平不呈正相关,这与目前国内部分研究不完全相同,需要进一步研究;(2)HBeAg阳性组与HBeAg阴性组的AFP水平无明显差异,表明AFP水平与HBeAg状态无明显相关。血清AFP是公认原发性肝癌的最好血清标志物,但由于受肝癌细胞分化程度等因素的影响,对PHC诊断的敏感度仅有约70%,特异度也只有83%^[8]。这可能是由于两组PHC患者的癌细胞分化程度无明显差异所致;(3)根据病毒复制水平进行分层分析提示,无论病毒复制是否活跃(HBV DNA<10⁸拷贝/L或≥10⁸拷贝/L),HBeAg阴性组纤维化的累积程度均相对HBeAg阳性组较重,这是因为HBeAg阴性慢性乙型肝炎的病程总体长于HBeAg阳性,提示其肝组织炎症损害的累积程度可能也较严重;(4)HBeAg阴性的原发性肝癌比HBeAg阳性者更易并发上消化道出血。无门静脉癌栓形成的原发性肝癌并发上消化道出血的主要原因是门静脉高压症所致的食管胃底静脉曲张破裂及门静脉高压性胃病,其次是脾功能亢进致血小板减少、凝血因子合成减少、消化性溃疡、营养不良致血管弹性下降等,这些因素亦是肝组织学严重损害的后果。

总之,无论HBeAg阳性还是HBeAg阴性

原发性肝癌, 都有肝炎活动, 病毒复制亦是肝炎活动的重要原因之一。本组观察的多数原发性肝癌患者病毒复制水平较低, HBeAg阴性的原发性肝癌预后更差。目前抗病毒治疗能提高HBeAg血清学转换, 降低血清HBV DNA水平, 减轻肝组织学炎症及纤维化, 这一点已经得到公认; 但抗病毒治疗能否降低HBV相关性原发性肝癌的发生, 值得进一步长期的临床观察研究, 在临床治疗及随访时, HBeAg阴性慢性乙型肝炎更应值得关注。

4 参考文献

- 1 杨东华, 陈旻湖. 消化系统疾病治疗学. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 837-838
- 2 王中林, 朱启镭. 乙型肝炎病毒相关原发性肝癌的分子发病机制. 国外医学·流行病学传染病学分册 2004;

- 5: 283-285
- 3 Gaeta GB, Stornaiuolo G, Precone DF, Lobello S, Chiamonte M, Strofolini T, Colucci G, Rizzetto M. Epidemiological and clinical burden of chronic hepatitis B virus/hepatitis C virus infection. A multicenter Italian study. *J Hepatol* 2003; 39: 1036-1041
- 4 Peng J, Luo K, Zhu Y, Guo Y, Zhang L, Hou J. Clinical and histological characteristics of chronic hepatitis B with negative hepatitis B e-antigen. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 1312-1317
- 5 陈成伟. 血清乙型肝炎病毒载量与肝细胞癌发生的关系. *中华内科杂志* 2005; 44: 715-716
- 6 龚作炯. 加强对HBeAg阴性慢性乙型肝炎的诊治. *中西医结合肝病杂志* 2005; 15: 257-259
- 7 杨创国, 于乐成, 陈金军, 孙剑, 郭亚兵, 骆抗先, 朱幼芙, 侯金林. 1686例慢性乙型肝炎中HBeAg阴性与阳性患者临床和病毒学特点比较分析. *中华内科杂志* 2005; 69: 648-651
- 8 王天然, 许爱国, 陈莉, 李丽萍, 李继红, 张丽华. 血清GLS和AFP联合测定对原发性肝癌诊断的意义. *临床肝胆病杂志* 2006; 4: 254-255

■同行评价

本文从临床特征、病毒学特点及免疫学角度探讨HBeAg血清学结果对原发性肝癌临床转归和预后的可能影响, 对临床医疗工作有一定的指导价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入光盘内; 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 2008-11-18)

锡类散与美沙拉嗪灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效比较

朱勇, 谢会忠

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)病因尚未完全明确, 病程迁延, 治疗缺乏特异措施, 且有癌变危险。近年来随着炎症性肠病处理共识意见形成, 其中提出针对溃疡性结肠炎的治疗, 对其应首先掌握好分级、分期、分段治疗的原则, 其中局部灌肠治疗被日益重视。

朱勇, 谢会忠, 新疆乌鲁木齐市新疆医科大学第一附属医院消化科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

作者贡献分布: 朱勇与谢会忠对此文所作贡献均等。

通讯作者: 谢会忠, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学第一附属医院消化科。zoe8160@souhu.com

电话: 0991-4362608

收稿日期: 2008-09-10 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-18

Efficacy comparison of Xilei San and Mesalazine enemas for active distal ulcerative colitis

Yong Zhu, Hui-Zhong Xie

Yong Zhu, Hui-Zhong Xie, Department of Gastroenterology, the First Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Professor Hui-Zhong Xie, Department of Gastroenterology, the First Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zoe8160@souhu.com

Received: 2008-09-10 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-18

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of enemas with Xilei San or with Mesalazine for active distal ulcerative colitis.

METHODS: A prospective randomized controlled clinical trial was carried out. Fifty-three patients with active mild to moderate distal ulcerative colitis in accordance with inclusion criteria were randomly divided into trial group ($n = 27$, Xilei San, 1.0-2.0 g, once per day) and control group ($n = 26$, Mesalazine, 1.0-2.0 g, once per day). They all underwent retaining enema for 4 weeks. Their clinical and endoscopic manifestations, stool test, disease active index (DAI) and adverse reaction were compared.

RESULTS: Two patients in each group were dropped-out, of which, one patient in the control group withdrew from the trial because of aggravating abdominal pain. Finally, 48 patients completed the trial (25 patients in Xilei San groups,

23 patients in Mesalazine group). All improved satisfactorily in terms of above data with no significance. The rate of adverse events in Mesalazine enemas group was 21.7%, no adverse events were seen in Xilei San group.

CONCLUSION: The management with Xilei San enema seems as effective as those with Mesalazine. Moreover, it induces less adverse effects.

Key Words: Xilei San; Mesalazine; Ulcerative colitis; Enema

Zhu Y, Xie HZ. Efficacy comparison of Xilei San and Mesalazine enemas for active distal ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(32): 3700-3703

摘要

目的: 评价锡类散与美沙拉嗪肠溶片保留灌肠治疗溃疡性结肠炎(UC)的临床疗效与不良反应。

方法: 采用前瞻性随机对照试验, 将符合入选标准的活动期轻、中度远段53例UC患者分成: 治疗组27例, 对照组26例。治疗组, 锡类散1.0-2.0 g, 每天1次, 保留灌肠; 对照组, 美沙拉嗪肠溶片1.0-2.0 g, 每天1次, 保留灌肠; 疗程均为4 wk。对两组的临床症状、结肠镜、便常规、疾病活动指数(DAI)进行比较, 并记录不良反应。

结果: 完成试验者48例(治疗组25例, 对照组23例), 两组各有2例失访, 其中对照组1例因腹痛加重退出。治疗组与对照组疾病活动指数、结肠镜下表现、临床疗效差异无统计学意义, 治疗组未见不良反应, 对照组不良反应发生率(5/23)21.7%。

结论: 锡类散与美沙拉嗪灌肠治疗远段UC, 疗效相仿, 前者不良反应更少, 且价格低廉。

关键词: 锡类散; 美沙拉嗪; 溃疡性结肠炎; 灌肠

朱勇, 谢会忠. 锡类散与美沙拉嗪灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效比较. *世界华人消化杂志* 2008; 16(32): 3700-3703
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3700.asp>

■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

0 引言

溃疡性结肠炎(UC)近年来发病率有逐步上升趋势,局部用药,其优点在于可将药物直接投放到肠道的炎症部位上,减少了全身的副作用,并提高疗效,所需剂量及诱导缓解时间通常少于口服药物治疗,目前局部保留灌肠治疗日益受到重视^[1].本试验对比分析锡类散与美沙拉嗪保留灌肠治疗活动期轻、中度远段UC的疗效与不良反应,进一步评价局部保留灌肠的方法.

1 材料和方法

1.1 材料 2007-11/2008-09在新疆医科大学第一附属医院消化科的住院患者,按照2007年《对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》中的诊断标准^[2],确诊为活动期轻、中度远段溃疡性结肠炎患者53例.并剔除以下情况:重度患者、爆发型患者;年龄在18岁以下或65岁以上,妊娠或哺乳期妇女,过敏体质者;合并心脑血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病,精神病患者;有结肠局部狭窄、肠梗阻、肠穿孔、中毒性结肠扩张、结肠癌、直肠癌等并发症者;不符合纳入标准,未按规定用药,无法判断疗效,或资料不全影响疗效判断者.所有患者自愿并口头知情同意.

1.2 方法

1.2.1 分组与治疗方案: 使用PEMS3.1统计软件,用完全随机设计方法产生随机序列,按就诊先后顺序,将研究对象编号(1-53).依据统计软件产生的随机序列进入各处理组.观察组:锡类散(江苏七〇七天然制药有限公司生产,每支1 g)1.0-2.0 g,加入温开水100 mL保留灌肠(水温:38-41℃,侧卧位,灌注药物后,应取膝胸位,并垫高臀部.导管一般从肛门插入15-20 cm为宜,药量一般保留6 h以上),每天1次,疗程4 wk.对照组:美沙拉嗪(佳木斯鹿灵制药有限公司生产,每片0.25 g)1.0-2.0 g,研成粉末加入温开水100 mL保留灌肠(具体方法:同锡类散灌肠),每日1次,疗程4 wk.剂量根据该地区体质量指数(BMI)和个人经验来调整.同时治疗过程予思密达对症治疗.

1.2.2 观察指标: (1)症状学指标:治疗前和治疗后第2周、第4周随访观察,记录腹泻、脓血便和腹痛等临床症状.治疗后第2周与第4周后两组临床症状改善情况,统计治疗2, 4 wk各项症状(腹泻、脓血便和腹痛)恢复正常比例(复常率^[3]),比较两组各项指标复常率差异有无显著性. (2)实验室检查指标:治疗前和治疗后第4周末检测粪

常规.统计两组患者的粪便红、白细胞恢复正常比例. (3)肠镜检查指标:治疗前和治疗第4周末进行结肠镜检查,分别搜集治疗前后肠镜资料进行对比,内镜下炎症程度拟参考Baron's分级^[4-5]进行评判,两位专家进行阅片评价.治疗后进步1级为有效,进步2级或缓解为显效,无进步或恶化为无效,失访记为无效. (4)治疗前后疾病活动指数(DAI)变化:两组治疗前后分别进行Sutherland DAI评分,对治疗前后进行DAI比较,比较两组之间DAI差异,进行临床治疗前后疗效的量化评估^[6].治疗后DAI评分,≤2为完全缓解;治疗后DAI下降≥2,但最终≥3为部分缓解^[7]. (5)两组间疗效比较:综合分析比较两组治疗4 wk后疗效.完全缓解:临床症状(腹泻、脓血便和腹痛)消失;结肠镜检查黏膜大致正常.有效:临床症状基本消失,结肠镜复查黏膜轻度炎症或假息肉形成;无效:经治疗后临床症状、内镜及病理检查无改善.总有效率=完全缓解+有效例数/总例数×100%.

1.2.3 不良反应评价: 记录并分析不良反应事件,并评价描述以下特征:类型、发生时间、频率、持续时间、严重程度.

1.2.4 随访: 建立患者详细资料,对患者建立疾病档案,设置随访表格,随访内容包括临床症状,肠镜、便常规等资料.共随访2次,治疗后第2周、第4周,第2周随访内容主要为临床症状改善情况(腹泻、脓血便和腹痛),治疗完成后即第4周随访内容包括临床症状、肠镜、便常规改善情况.

统计学处理 数据处理采用PEMS3.1统计软件,实验数据以计量资料 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,计量资料用 t 检验,计数资料组间差异采用卡方检验($P < 0.05$)具有统计学意义.

2 结果

2.1 患者一般情况 完成试验者49例(观察组25例,对照组23例),两组各有2例失访,其中对照组1例治疗1 wk后腹痛加重退出.两组患者一般资料构成比差异无显著性(表1).

2.2 两组患者疗效评价

2.2.1 临床症状改善比较: 多数患者随治疗时间延长,复常率增加,但两组间各指标复常率无显著差异(表2).

2.2.2 两组间便常规检查治疗前后改善结果比较: 治疗4 wk后复查便常规,观察组红、白细胞复常率:56.5%, 70.4%.对照组红、白细胞复常

■研发前沿

文献表明西医治疗相对较规范,具有起效快、近期临床缓解率高等优点,但停药后易复发,长期用药不良反应增多,部分顽固性患者疗效并不理想.而中医中药治疗本病,辨证灵活,治法多样,疗效显著,无副作用等特点,但是目前的研究中还存在偏倚因素严重的情况,为进一步筛选有效治疗方法形成障碍.

■应用要点

本研究中锡类散组与美沙拉嗪组疗效相当,但中药灌肠价格低廉,药源广泛,副作用少,值得临床进一步推广使用.

■名词解释

Sutherland DAI: 也称 Mayo 指数, Sutherland DAI 总分为各项分数之和, <2 分: 症状缓解; 3-5 分: 轻度活动; 6-10 分: 中度活动; 11-12 分: 重度活动。简化的 DAI 有助于疾病活动性和治疗反应的量化评估。

表 1 两组患者一般情况比较 $n(\%)$

		观察组($n=27$)	对照组($n=26$)
性别	男	13	15
	女	14	11
年龄(岁)	范围	18-65	18-65
	平均	42.8	43.2
体质量(kg)	平均	53.4	50.9
病情程度	轻	18(66.6)	20(76.9)
	中	9(33.4)	6(23.1)
结肠镜下	直肠	17(62.9)	18(69.2)
炎症范围	直肠乙状结肠	10(37.1)	8(31.8)

表 2 两组临床症状复常率比较 (%)

分组	n	时间	腹泻	脓血便	腹痛
观察组	25	2 wk 末	48.0	44.0	56.0
		4 wk 末	72.0	76.0	84.0
对照组	23	2 wk 末	43.0	39.1	43.0
		4 wk 末	69.0	73.9	69.5

率: 59.2%, 69.5%。两组患者的红白细胞数均有改善, 两组间差异无显著性意义。

2.2.3 治疗 4 wk 后结肠镜下炎症改善结果: 总有效率、显效率两组间差异无显著性意义(表3)。

2.2.4 治疗前后疾病活动指数(DAI)变化结果: 各组治疗前后比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 两组的疗效比较, 无显著性差异(表4)。

2.2.5 两组间疗效比较: 综合判断两组治疗 4 wk 后疗效, 观察组完全缓解率、总有效率分别为 48.0%, 76.0%, 对照组完全缓解率、总有效率为 43.4%, 78.2%, 两者差异无显著性(表5)。

2.3 两组患者不良反应评价 观察组未见不良反应, 无患者退出试验。对照组 3 例治疗过程中出现腹泻次数增加, 经对症治疗, 症状改善, 2 例出现肛周灼痛, 1 例出现皮疹, 1 例出现腹胀, 1 例患者因出现腹痛加重, 退出试验。对照组不良反应发生率(5/23)21.7%。两组患者治疗前后血常规、肝肾功均未见明显异常。

3 讨论

锡类散是《卫生部药品标准》收录的品种, 锡类散是中药制剂, 主要成分: 珍珠、青黛、牛黄、象牙屑及冰片。锡类散灌肠局部治疗, 利用该药的解毒化腐、收敛生肌的作用治疗溃疡性结肠炎, 能促进溃疡而愈合, 缓解腹痛, 具有疗效高、复发率低、无不良反应等特点, 可反复应用, 且价格低廉, 溃疡性结肠炎中西医

表 3 治疗 4 wk 后结肠镜下炎症改善结果

分组	n	显效	有效	无效	显效率(%)	总有效率(%)
观察组	25	13	5	7	52.0	72.0
对照组	23	10	7	6	43.4	73.9

表 4 两组 DAI 变化比较 (mean \pm SD)

分组	治疗前	治疗后
观察组	6.15 \pm 0.72	2.27 \pm 0.48
对照组	5.96 \pm 0.84	2.19 \pm 0.32

表 5 两组患者治疗 4 wk 后临床疗效比较 $n(\%)$

分组	n	完全缓解	有效	无效	总有效率(%)
观察组	25	12(48.0)	7(28.0)	6(24.0)	19(76.0)
对照组	23	10(43.4)	8(34.7)	5(17.5)	18(78.2)

结合诊治方案(2003 重庆)中推荐其对轻、中度远段溃疡性结肠炎应用^[8]。与此同时, 轻、中度活动性远段 UC(病变不超过 25 cm)局部使用 5-氨基水杨酸(5-ASA)作为一线治疗方案得到了共识。美沙拉嗪为治疗 UC 的氨基水杨酸新型制剂, 化学名称: 5-ASA, 局部灌肠临床疗效确切^[9]。

本研究采用多项指标且定量的评价其疗效与副作用, 在临床症状、便常规、结肠镜下表现, 两组患者无显著性差异, 治疗前后 DAI 差异变化也无显著性差异, 因此两者治疗轻度远段 UC 的疗效相当。本研究表明, 锡类散灌肠组不良反应发生率明显低于对照组美沙拉嗪组, 观察组无不良反应, 且本研究中有 2 例孕妇, 使用锡类散灌肠疗效满意。对照组不良反应发生率(5/23)21.7%, 分析其原因可能为: (1)临床治疗过程中, 美沙拉嗪肠溶片质地略硬, 研磨成粉末较困难, 颗粒较大, 导致药物吸收欠佳, 导致部分患者耐受性差。(2)肠溶片研碎后导致药效减低^[10-11]。(3)样本例数较少, 今后期待大样本研究。

通过对单剂锡类散局部灌肠治疗溃疡性结肠炎的研究, 同时与对照组单剂美沙拉嗪灌肠比较, 去除了众多混杂因素的影响, 一定程度上能够正确评价局部保留灌肠对 UC 的疗效。两组药物灌肠方法对治疗活动期轻、中度远段的 UC 患者均有效, 其中锡类散药源广泛、价格低廉、副作用更少。由于时间问题, 样本较少, 且只对两组灌肠方法的短期疗效进行比较分析,

未进行组织学炎症改善情况评价, 期待有更进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1371-1385
- 2 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007). *胃肠病学* 2007; 12: 488-494
- 3 国产5-氨基水杨酸肠溶片治疗研究协作组. 国产5-氨基水杨酸肠溶片治疗溃疡性结肠炎多中心临床研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 399-402
- 4 谢艳, 欧阳钦. 布地奈德和氢化可的松灌肠治疗溃疡性结肠炎的对比研究. *中华消化内镜杂志* 2000; 17: 159-162
- 5 Baron JH, Connell AM, Lennard-jones JE. Variation between observers in describing mucosal appearances in proctocolitis. *Br Med J* 1964; 1: 89-92
- 6 欧阳钦, Rakesh Tandon, KL Goh, 潘国宗, KM Fock, Claudio Fiocchi, SK Lam, 萧树东, 张虎, 梁红亮, 王玉芳. 亚太地区炎症性肠病处理共识意见. *胃肠病学* 2006; 11: 301-305
- 7 梁红亮, 欧阳钦. 罗格列酮联合氨基水杨酸治疗溃疡性结肠炎. *中华内科杂志* 2006; 45: 548-551
- 8 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 溃疡性结肠炎中西医结合诊治方案. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2690-2693
- 9 Marteau P, Probert CS, Lindgren S, Gassul M, Tan TG, Dignass A, Befrits R, Midhagen G, Rademaker J, Foldager M. Combined oral and enema treatment with Pentasa (mesalazine) is superior to oral therapy alone in patients with extensive mild/moderate active ulcerative colitis: a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* 2005; 54: 960-965
- 10 Rochester J, Abreu MT. Ulcerative colitis therapy: importance of delivery mechanisms. *Rev Gastroenterol Disord* 2005; 5: 215-222
- 11 Desreumaux P, Ghosh S. Review article: mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid - new evidence. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 Suppl 1: 2-9

■同行评价

本研究选题实用性较强, 观察指标合理, 统计方法正确, 结论得当, 对临床有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

• 消息 •

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 2008-11-18)

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!

曹秀峰 主任医师
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈治水 主任医师
中国人民解放军第二一一医院中医科

杜群 副研究员
广州中医药大学脾胃研究所药理室

杜雅莉 主任医师
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

高泽立 副教授
上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

葛海燕 教授
同济大学附属第十人民医院普通外科

韩天权 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

季国忠 副教授
南京医科大学第二附属医院消化科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

蓝宇 教授
北京积水潭医院消化科

李军祥 教授
北京中医药大学附属东方医院消化内科

刘绍能 主任医师
中国中医科学院广安门医院消化科

刘正稳 教授
西安交通大学医学院第一附属医院传染科

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

梅林 教授
北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

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

邱双健 副教授
复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

沈柏用 副教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

沈洪 教授
南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科

田晓峰 教授
大连医科大学附属第二医院

汪思应 教授
安徽医科大学实验动物中心

王健生 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

熊斌 教授
武汉大学中南医院肿瘤科

宣世英 教授
山东省青岛市市立医院肝病内科

张国梁 主任医师
天津市第一中心医院消化内科

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

张军 教授
西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

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)