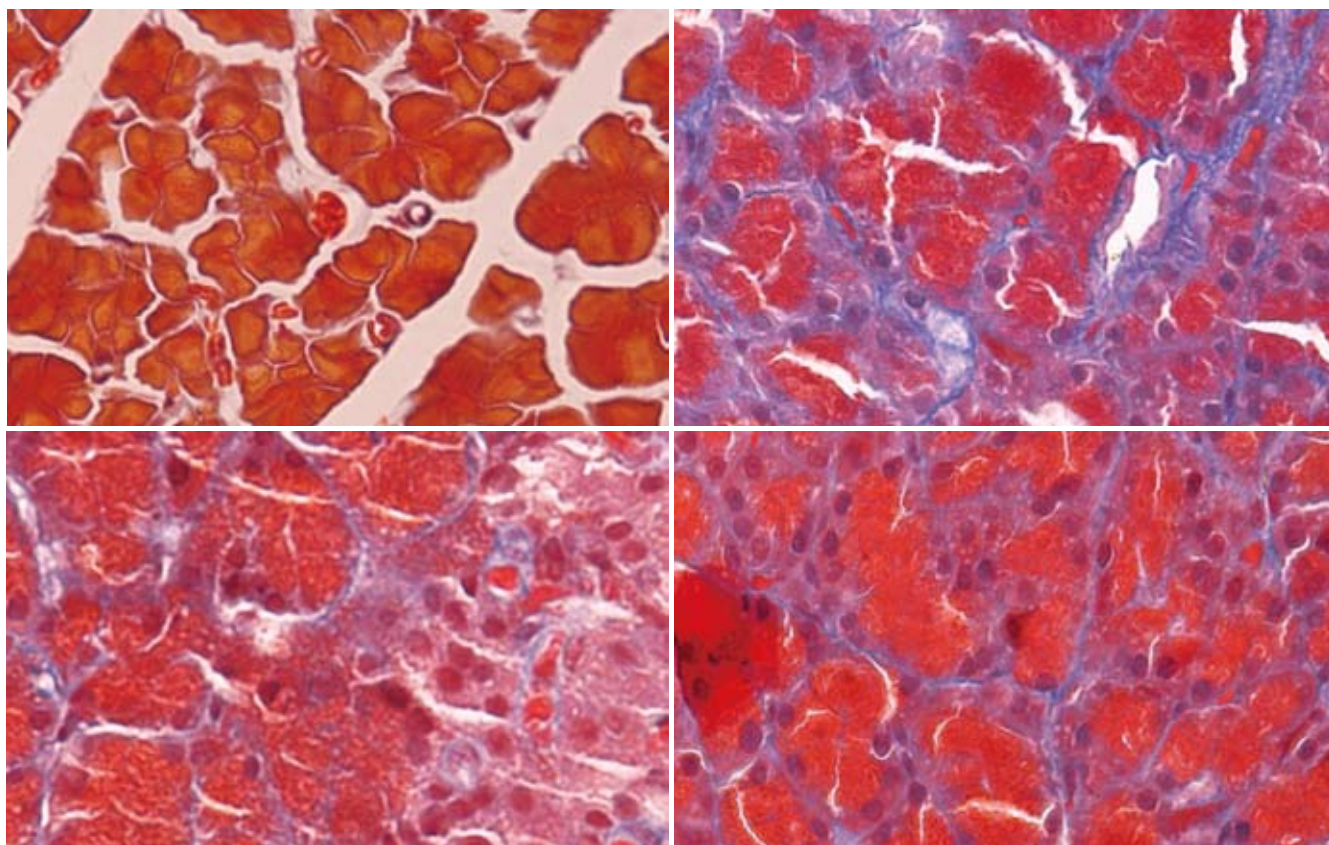


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010年5月8日 第18卷 第13期 (Volume 18 Number 13)



13 / 2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊,是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》,荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

程英升教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
聂新明教授
陈洪副教授

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

马红主任医师
马欣主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
田宇彬教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王艳艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
周国雄主任医师
周晓东副教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师
消化外科学
蔡开琳副教授

蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
莫卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师

李文岗教授
李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
汤恢煊教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

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

消化感染病学

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

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

消化中医学

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

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

消化肿瘤学

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

消化影像学

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

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授

袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
王钦红教授
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员

周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2010年5月8日 第18卷 第13期 (总第309期)

述 评

1301 血糖和血糖波动与肝纤维化

邵佳亮, 胡国信

基 础 研 究

1306 微管不稳定蛋白在食管癌细胞和组织中的表达及意义

刘飞, 刘芳, 孙玉琳, 赵晓航

1313 蛋白酶激活受体2激动剂对食管癌EC109细胞侵袭转移的促进作用

周静, 谢立群, 李轩, 陈小义, 陈莉, 郑艳敏, 李飞

1320 TLR2、TLR4和TLR9在慢性重型肝炎患者及肝衰竭大鼠中的表达

陈煜, 时红波, 张帆, 丁美, 赵军, 刘旭华, 段钟平

1326 抗肝癌免疫纳米颗粒的制备及其对肝癌细胞增殖的影响

别彩群, 韩利民, 王启章, 范红梅, 朱浩峰, 梁旭亮, 杨冬华

1331 氧化苦参碱对慢性胰腺炎胰腺组织中 I 型胶原及 α -SMA的影响

王昱良, 郑永青, 夏时海, 汪海燕, 苏丽婷, 吴双

1337 0.2-0.4 T静磁场对肿瘤细胞生长和黏附功能的影响

曹建平, 骞爱荣, 张维, 商澎

临 床 研 究

1344 Bmi-1和S100A4蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及其临床病理意义

符仲标, 张蕾, 李颖霞, 张同贞, 张云汉, 温洪涛

文 献 综 述

1350 肝癌转移、复发预测的蛋白质分子标志物

舒宏, 康晓楠, 刘银坤

1356 NSAIDs预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的研究进展

王钧, 白飞虎, 周毅

1360 雌马酚产出相关细菌研究进展

蔡莉, 王培玉, 张玉梅

研 究 快 报

1366 高频超声多参数诊断SD大鼠脂肪肝的价值

全杰荣, 罗燕, 范玉亭

临 床 经 验

1371 Runx3在不同类型胃息肉与胃癌中的蛋白表达及与幽门螺杆菌感染的相关性

仇达, 高善玲, 朱丽, 崔琳

1375 Her-2蛋白在胃癌中的表达及其临床意义

陈娟, 李东石, 余英豪, 王烈, 欧阳学农, 谢飞来, 熊喜生

1380 复方甘草酸苷联合拉米夫定治疗乙型肝炎相关性肾炎40例

杨道坤, 孙屹峰, 梁海军, 申保生, 乔汉臣

1384 不同方法检测肝癌患者外周血中CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs水平的关系及意义

王芳, 吕洪敏, 韩涛, 王鹏, 王凤梅, 朱争艳, 向慧玲

1390 幽门螺杆菌、高胃泌素血症对结肠腺瘤形成的作用

张雪梅, 刘丽娜, 马红霞, 高勇

1395 胎儿弯曲菌蛟河株从结肠癌患者血液中的分离及鉴定

李春辉, 孙可敬, 孙风辉

	1400 国产、进口奥曲肽处理肿瘤治疗相关性腹泻的比较 邱红, 熊慧华, 胡广原, 汪锐, 唐曦
附 录	1404 《世界华人消化杂志》投稿须知 1409 2010年国内国际会议预告
志 谢	1410 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	1312 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》 1325 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1330 《世界华人消化杂志》栏目设置 1336 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》影响因子0.729 1343 《世界华人消化杂志》修回稿须知 1349 《世界华人消化杂志》计量单位标准 1355 《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.547 1359 《世界华人消化杂志》正文要求 1365 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 1370 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》 1383 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 1389 《世界华人消化杂志》数字用法标准 1394 汤姆森-路透公布2008年 <i>WJG</i> 影响因子2.081 1399 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结
封面故事	王昱良, 郑永青, 夏时海, 汪海燕, 苏丽婷, 吴双. 氧化苦参碱对慢性胰腺炎胰腺组织中 I 型胶原及 α -SMA 的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1331-1336 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1331.asp
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<div>世界華人消化雜誌</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吳階平 題寫封面刊名 陳可冀 題寫版權刊名 (旬刊) 創刊 1993-01-15 改刊 1998-01-25 出版 2010-05-08 原刊名 新消化病學雜誌</div>	<div>編輯 世界華人消化雜誌編輯委員會 030001, 山西省太原市雙塔西街77號 電話: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div> <div>出版 世界華人消化雜誌編輯部 030001, 山西省太原市雙塔西街77號 電話: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div> <div>印刷 北京科信印刷廠</div> <div>發行 國內: 北京報刊發行局 國外: 中國國際圖書貿易總公司 (100044, 北京市399信箱)</div> <div>訂購 全國各地郵電局</div> <div>郵購 世界華人消化雜誌編輯部 030001, 山西省太原市雙塔西街77號 電話: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div>	<div>世界華人消化雜誌是一份同行評議性的旬刊, 是一份被《中國科技論文統計源期刊》和《中文核心期刊要目總覽》收錄的學術類期刊。《世界華人消化雜誌》的英文摘要被美國《化學文摘》, 荷蘭《醫學文摘庫/醫學文摘》和俄羅斯《文摘雜誌》收錄。</div> <div>世界華人消化雜誌正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。</div> <div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</div> <div>2010年版权归世界华人消化杂志所有</div>			
中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262	国外代号 M 4481	国内定价 每册56.00元 全年2016.00元	广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

May 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 13

EDITORIAL	1301 Blood glucose, blood glucose fluctuation and hepatic fibrosis <i>Shao JL, Hu GX</i>
BASIC RESEARCH	<p>1306 Significance of STMN1 expression in esophageal squamous cell carcinoma <i>Liu F, Liu F, Sun YL, Zhao XH</i></p> <p>1313 Protease-activated receptor-2 agonists promote cell invasion and metastasis in human esophageal cancer cell line EC109 <i>Zhou J, Xie LQ, Li X, Chen XY, Chen L, Zheng YM, Li F</i></p> <p>1320 Expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in patients with chronic severe hepatitis and rats with liver failure <i>Chen Y, Shi HB, Zhang F, Ding M, Zhao J, Liu XH, Duan ZP</i></p> <p>1326 Preparation of hepatocellular carcinoma-targeted immunonanoparticles and investigation of their effects on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells <i>Bie CQ, Han LM, Wang QZ, Fan HM, Zhu HF, Liang XJ, Yang DH</i></p> <p>1331 Oxymatrine enhances the expression of collagen I and α-SMA in rat chronic pancreatitis <i>Wang YL, Zheng YQ, Xia SH, Wang HY, Su LT, Wu S</i></p> <p>1337 Effects of exposure to static magnetic fields (0.2-0.4 T) on the growth and adhesion of tumor cells <i>Cao JP, Qian AR, Zhang W, Shang P</i></p>
CLINICAL RESEARCH	1344 Clinicopathological significance of Bmi-1 and S100A4 expression in esophageal squamous cell carcinoma <i>Fu ZB, Zhang L, Li YX, Zhang TZ, Zhang YH, Wen HT</i>
REVIEW	<p>1350 Biomarkers for prediction of metastasis and recurrence of hepatocellular carcinoma <i>Shu H, Kang XN, Liu YK</i></p> <p>1356 Recent advances in the prevention of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis with NSAIDs <i>Wang J, Bai FH, Zhou Y</i></p> <p>1360 Advances in research on equol-producing bacteria <i>Cai L, Wang PY, Zhang YM</i></p>
RAPID COMMUNICATION	1366 Multi-parameter quantitative evaluation of rat fatty liver using high-frequency ultrasound <i>Quan JR, Luo Y, Fan YT</i>
CLINICAL PRACTICE	<p>1371 Association between Runx3 protein expression and <i>Helicobacter pylori</i> infection in different types of gastric polyps and gastric cancer <i>Zhang D, Gao SL, Zhu L, Cui L</i></p> <p>1375 Clinical significance of Her-2 protein expression in gastric cancer <i>Chen J, Li DS, Yu YH, Wang L, Ouyang XN, Xie FL, Xiong XS</i></p> <p>1380 Treatment of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis with compound glycyrrhizin and lamivudine: an analysis of 40 cases <i>Yang DK, Sun YF, Liang HJ, Shen BS, Qiao HC</i></p>

	<p>1384 Correlation between two different methods in detecting CD4⁺CD25^{hi-int} T regulatory cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma <i>Wang F, Lv HM, Han T, Wang P, Wang FM, Zhu ZY, Xiang HL</i></p> <p>1390 Effects of <i>Helicobacter pylori</i> infection and hypergastrinemia on the growth of colonic adenoma <i>Zhang XM, Liu LN, Ma HX, Gao Y</i></p> <p>1395 Characterization of a novel strain of <i>Campylobacter fetus</i> separated from the blood sample from a patient with colon cancer <i>Li CH, Sun KX, Sun FH</i></p> <p>1400 Domestic versus imported octreotide in the treatment of acute diarrhea associated with anti-tumor therapy: an analysis of 138 cases <i>Qiu H, Xiong HH, Hu GY, Wang R, Tang X</i></p>
APPENDIX	<p>1404 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>1409 Meeting events calendar in 2010</p>
ACKNOWLEDGMENT	1410 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p>Wang YL, Zheng YQ, Xia SH, Wang HY, Su LT, Wu S. Oxymatrine enhances the expression of collagen I and α-SMA in rat chronic pancreatitis.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(13): 1331-1336</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1331.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i></p> <p>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date May 8, 2010

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: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue
RMB 2016 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2010 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 © 2010 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

血糖和血糖波动与肝纤维化

邵佳亮, 胡国信

邵佳亮, 胡国信, 南昌大学第一附属医院感染内科 江西省南昌市 330006

胡国信, 副教授, 硕士生导师, 主要从事病毒性肝炎、肝纤维化的临床与实验研究。

江西省卫生厅科技计划基金资助项目, No. 20091038

作者贡献分布: 本文由邵佳亮与胡国信共同综述, 胡国信审校。

通讯作者: 胡国信, 副教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院感染内科, huguoxin8228@sina.com

电话: 0791-8692571

收稿日期: 2010-02-24 修回日期: 2010-04-26

接受日期: 2010-05-07 在线出版日期: 2010-05-08

Blood glucose, blood glucose fluctuation and hepatic fibrosis

Jia-Liang Shao, Guo-Xin Hu

Jia-Liang Shao, Guo-Xin Hu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Jiangxi Provincial Health Department, No. 2009308

Correspondence to: Associate Professor Guo-Xin Hu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huguoxin8228@sina.com

Received: 2010-02-24 Revised: 2010-04-24

Accepted: 2010-05-07 Published online: 2010-05-08

Abstract

Hepatic fibrosis is a common pathologic process shared by many chronic hepatic diseases and will ultimately result in hepatic cirrhosis. Due to improvement in living standards and changes in eating habits, the incidence of diabetes is continuously increasing. Nowadays, mounting evidence shows a link between diabetes and liver fibrosis. This article briefly summarizes recent advances and future prospects in research on the relationship among hyperglycemia, blood glucose fluctuation and hepatic fibrosis.

Key Words: Blood glucose; Blood glucose fluctuation; Hepatic fibrosis

Shao JL, Hu GX. Blood glucose, blood glucose fluctuation and hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1301-1305

摘要

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是肝硬化的早

期阶段, 是各种慢性肝病的共同病理过程, 并最终发展成为肝硬化。随着生活水平的提高、饮食习惯的改变, 糖尿病的发病率逐年升高。目前有很多资料证实了糖尿病与HF有关联。本文简要总结了近年来国内外学者在高血糖和波动血糖与HF关系研究中取得的共识与现状, 并就其研究进展进行讨论和展望, 以期加深人们对血糖和波动血糖与HF的认识并积极开展有关方面的研究。

关键词: 血糖; 血糖波动; 肝纤维化

邵佳亮, 胡国信. 血糖和血糖波动与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1301-1305

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1301.asp>

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis)是肝脏对各种原因所致肝损伤的“创伤愈合”反应, 是组织发生修复反应时细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成、降解与沉积不平衡而引起的病理过程, 它是各种肝病导致肝硬化的共同途径。如何治疗这类患者是世界性难题。近20年来, 随着细胞学和分子生物学技术的发展, 肝纤维化的研究取得了长足进展。主要表现在^[1-5]: (1)确立了肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活、转化是肝纤维化发生、发展的核心环节; (2)肝纤维化的分子病理机制逐渐了解, 尤其是影响HSC生物学行为的调控机制, 如血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)介导的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路(主要包括Raf-MEK-ERK、SEK-MKK-JNK、MEKK-MKK-P38)、转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)-Samd信号通路等参与了HSC的活化、增殖、胶原合成等; (3)明确了肝纤维化以及一定程度的肝硬化是完全可逆转的观点; (4)阐明了调控HSC的激活、增殖、转化、凋亡及ECM合成与分解是防治肝纤维化研究的重点。最近国际著名肝病专家Friedman教授^[6]对近5-10年

■背景资料

随着人们生活水平的提高、膳食结构变化和生活行为方式的改变, 我国糖尿病(包括1型和2型)的发病率逐年升高。据最新报道中国是世界上三个糖尿病大国之一, 居第2位, 糖尿病已成为我国最重要的非传染性流行病之一。高血糖作为糖尿病的主要特征, 对许多脏器如肾脏、心脑血管纤维化的形成具有明显促进作用, 与肝脏纤维化的关系也在研究之中。已有证据显示在糖尿病患者中, 终末期肝病的死亡率比心血管疾病高。近年来许多实验研究与临床资料均证实高血糖与HSC、肝纤维化关系密切。

■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

■研究前沿

目前胰岛素增敏剂成为治疗NAFLD性肝纤维化的研究热点,主要包括噻唑烷二酮(TZDs, PPAR γ 激活剂)和二甲双胍2类。

肝纤维化研究进行了总结,认为与肝纤维化有关的临床和基础研究均取得了巨大进展,同时也指出不同病因的肝纤维化其发生、发展的机制不同,防治措施也不同。因此,在肝纤维化的研究中仍有许多亟待解决的问题。比如临床上经常遇到的疾病-糖尿病并肝纤维化、肝硬化。人们要问,高血糖作为糖尿病的主要表现形式,他是如何致肝损伤?如何形成肝纤维化?又如何早期防治?阐明这些问题,对于丰富肝纤维化发生机制,完善肝纤维化的防治策略具有重要意义。

1 高血糖与HSC、肝纤维化的关系

随着人们生活水平的提高、膳食结构变化和生活行为方式的改变,我国糖尿病(包括1型和2型)的发病率逐年升高。据最新报道中国是世界上三个糖尿病大国(印度、中国、美国)之一,居第2位,糖尿病已成为我国最重要的非传染性流行病之一^[7]。高血糖作为糖尿病的主要特征,对许多脏器如肾脏、心脑血管纤维化的形成具有明显促进作用,与肝脏纤维化的关系也在研究之中^[8,9]。已有证据显示在糖尿病患者中,终末期肝病的死亡率比心血管疾病高^[10]。近年来许多实验研究与临床资料均证实高血糖与HSC、肝纤维化关系密切。

1.1 实验研究 Paradis等^[11]用葡萄糖或胰岛素培养HSC,发现结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)基因和蛋白表达均显著增加,当在HSC培养液中加入葡萄糖时发现I型前胶原mRNA表达轻微增加,提示高糖和胰岛素是纤维化进展中的一个关键因素。Sugimoto等^[12]发现高糖可通过诱导MAPK磷酸化等导致HSC增生和I型胶原的产生。最近国内学者焦明丽等研究显示,高血糖可能通过刺激HSC-T6分泌TGF- β 1、PDGF、III型前胶原(type III procollagen, PCIII)、CTGF、PDGF-BB、透明质酸酶(hyaluronic acid, HA)及层黏蛋白(laminin, LN)促进肝纤维化^[13,14]。此后,进一步的体内实验表明高血糖可通过诱导肝脏 α -SMA、CTGF表达,促进肝脏HSC活化、增殖,促进肝纤维化的形成,加重大鼠肝纤维化的程度^[15]。李芹等^[16]通过观察不同浓度葡萄糖对大鼠HSC增殖的影响,以进一步探讨糖尿病性肝纤维化的发生机制,发现不同高浓度的葡萄糖均能激活HSC,导致HSC增殖, DNA合成增加,且HSC增殖及其DNA合成随葡萄糖浓度增加而增加,呈剂量依

赖性。范建高等^[17]探讨了高血糖对CCl₄中毒大鼠肝纤维化进展的影响,结果发现高血糖能加剧CCl₄相关肝损伤,促进肝纤维化、肝硬化的发生发展。研究者还发现糖尿病+CCl₄组肝组织炎症活动度计分(HAI)并不比血糖正常+CCl₄组高,肝脂肪变程度在糖尿病+CCl₄组反而下降,提示高血糖可能并非通过肝脂肪变性和炎症途径加剧CCl₄相关肝纤维化。朱春晖等^[18]观察了糖尿病树鼯肝脏病理变化,通过Masson染色和电镜观察证实糖尿病组动物模型注射链脲佐菌素(STZ)后8 wk出现早期肝纤维化病理改变,高血糖能促进肝纤维化的形成。同时也发现早期糖尿病肝损害在轻度脂肪变性(仅有小泡性的脂肪变性)时,肝纤维染色及电镜下已有胶原纤维增生,因此作者认为肝脂肪变性并不一定是糖尿病肝纤维化发展中的必然过程,与范建高等^[17]观点一致。

1.2 临床研究 Abrams等^[19]报道在非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD),高血糖与肝脏炎症及汇管区纤维化密切相关;Raynard等^[20]前瞻性观察了268例酒精性肝病患者的血糖水平与肝纤维化的关系,研究表明血糖水平与肝纤维化积分正相关,血糖是酒精性肝病进展到肝纤维化的独立危险因素;有学者回顾性研究了血糖与慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)患者发生肝纤维化的关系,结果显示高血糖的CHC患者发生肝纤维化的比例显著高于同样病程下的正常血糖患者,且随着时间的延长上述情况更明显,认为高血糖是丙型肝炎(viral hepatitis type C, HCV)感染者肝纤维化程度的独立预测因素^[21];Haukeland等^[22]对83名肝活检确诊的NAFLD进行随访,发现伴有2型糖尿病或糖耐量异常的NAFLD患者肝纤维化或肝硬化发生率明显增加。

综上所述,说明糖尿病与肝纤维化发生、发展密切相关,因此有必要对高血糖促使肝纤维化形成与发展的机制作进一步探讨。

2 波动性高血糖对机体靶器官的影响

众所周知,高血糖对糖尿病患者组织器官的损害是通过慢性持续性(持续性高血糖)和血糖水平波动(波动性高血糖)两种方式体现^[23]。波动性高血糖是指间歇性或阵发性高血糖状态,亦称血糖漂移。早期,人们对持续性高血糖与糖尿病的并发症研究较多。近年来研究表明,持续性高血糖和波动性高血糖均为糖尿病的特征和危险因素,糖尿病慢性并发症的发生、发展不仅与

血糖水平的持续升高密切相关, 而且与血糖的波动性有密切关系, 血糖波动越大, 糖尿病慢性并发症的发生率越高、预后越差. 因此波动性高血糖及其对靶器官的损害已成为糖尿病学研究的新热点^[24,25]. 目前也有许多实验研究与临床试验研究来证实血糖波动与靶器官损害的情况.

2.1 实验研究 Quagliaro等^[26]在培养人脐静脉内皮细胞时, 分别给予稳定低糖浓度(5 mmol/L)、稳定高糖浓度(20 mmol/L)和波动性高糖浓度(5 mmol/L和20 mmol/L每24 h交替)的培养环境, 2 wk后发现3组细胞的蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)活性分别为基础状态的150%、350%和600%, 提示波动性高血糖较稳定性高血糖更强烈地激活PKC的表达. PKC又可激活MAPK信号通路, 使细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、E2选择素的表达上调, 促使细胞凋亡及DNA的氧化损伤, 这些效应均可以促进糖尿病并发症的发展. 同时, 他们还发现恒定性与间歇性高浓度葡萄糖均可通过依赖PKC活化的还原型辅酶 I / II NADPH氧化酶刺激活性氧的过度生成导致细胞凋亡的增加, 而间歇性状态更为明显, 支持葡萄糖浓度的波动参与了糖尿病血管损伤的形成^[27]. Takeuchi等^[28]在培养大鼠肾小球系膜细胞(mesangial cells, MCs)时, 分别给予稳定低糖浓度(5 mmol/L)、稳定高糖浓度(25 mmol/L)和波动性高糖浓度(5 mmol/L和25 mmol/L每24小时交替)的培养环境, 10 d后发现波动高糖组胶原III含量分别为稳定低糖组和稳定高糖组的329%和110%, 而胶原IV的含量分别为31%和14%, 提示波动性高糖较稳定性高糖更强烈地促进系膜细胞分泌胶原. Jones等^[29]也报道高糖培养可影响肾小管细胞的增殖和胶原合成等, 而波动性高糖培养可使这些效果更显著. 张晋欣等^[30]探讨波动性与持续性高糖对血管内皮细胞生存及凋亡的影响, 结果表明持续高葡萄糖(25 mmol/L)条件下细胞生存率低于正常浓度, 而波动性高糖(5.5或25 mmol/L)条件下细胞生存率又低于持续高糖, 凋亡率则相反, 揭示波动性高糖较持续性高糖对血管内皮细胞具有更强的损伤效应, 且是独立于持续性高糖之外的血管内皮细胞伤害因素. 刘江华等^[31]以体外培养人脐静脉内皮细胞为研究对象, 分别检测波动性高糖(5 mmol/L或20 mmol/L)与恒定性高糖(20 mmol/L)环境下内皮细胞合成的血管舒张因子前列环素

(prostaglandin I₂, PGI₂)及一氧化氮(nitrogen mon-oxidum, NO)的含量, 同时观察培养液中丙二醛含量的变化. 结果发现, 相对于恒定性高血糖, 波动性高血糖能更显著地降低内皮细胞PGI₂与NO的生成, 从而提示波动性高血糖对血管内皮细胞有更强的损伤作用. 赵晟等^[32]建立急性血糖波动和持续性高血糖雄性Wistar大鼠动物模型, 建模48 h后发现血糖波动组大鼠肝细胞凋亡率显著高于对照组及持续性高血糖组($P<0.05$), 并揭示其机制可能为血糖波动能诱导氧化应激增强, 进而使Jun氨基末端激酶-1、肝细胞内核因子- κ B细胞信号转导途径激活. 以上这些实验在细胞、分子以及基因水平上揭示, 如果细胞处于剧烈波动的糖环境, 受到的影响较持续性高血糖环境更大.

2.2 临床研究 尽管还没有来自随机临床试验的结论性证据, 但越来越多的临床试验强烈提示, 血糖波动与糖尿病并发症显著相关. Ceriello等^[33]通过葡萄糖钳夹实验对正常受试者和2型糖尿病患者给以5、10、15 mmol/L, 以及5-15 mmol/L每间隔6 h的血糖浓度, 结果发现血糖波动组的血浆硝基酪氨酸-3及24 h尿前列腺素- α (两指标均反映机体氧化应激水平)较恒定高血糖组明显增多. Gimeno-Orna等^[34]对130例无糖尿病视网膜病变的2型糖尿病患者随访5.2年, 结果表明空腹血糖的变异度是糖尿病视网膜病变的独立危险因素. 陈海燕等^[35]对38例老年2型糖尿病患者超声检测下肢血管, 根据病变程度分为轻中度病变组和重度病变组. 应用动态血糖监测系统对两组患者血糖连续监测3 d, 计算平均血糖波动幅度、最大血糖波动幅度等, 结果发现平均血糖波动幅度、最大血糖波动幅度等明显增高, 得出结论血糖波动是老年2型糖尿病下肢血管病变的危险因素. 方小正等^[36]探讨169例2型糖尿病患者波动性高血糖状态对微血管病变的影响, 结果显示慢性波动性高血糖组(II组)餐后2 h血糖显著高于慢性持续性高血糖组(I组), 餐后2 h胰岛素与餐后2 h C肽水平显著低于I组, II组微血管并发症发生率显著高于I组($P<0.01$), 研究提示2型糖尿病在波动性高血糖状态下微血管病变明显增加.

目前国内外有关血糖波动与HSC、肝纤维化关系的报道鲜见, 最近我们对此进行了一些探索, 我们采用稳定性低糖浓度(5.5 mmol/L)、稳定性高糖浓度(20 mmol/L)和波动性高糖浓度(5.5 mmol/L和20 mmol/L每8 h交替)的培养环境

■ 相关报道

Paradis等用葡萄糖或胰岛素培养HSC, 发现结缔组织生长因子(CTGF)基因和蛋白表达均显著增加, 当在HSC培养液中加入葡萄糖时发现I型前胶原mRNA表达轻微增加, 提示高糖和胰岛素是纤维化进展中的一个关键因素.

■同行评价

本文综述内容新颖,层次清晰,具有较好的可读性。

干预HSC,稳定性高糖组和波动性高糖均能促进HSC的增殖,与稳定性低糖组比较,都有显著性差别($P<0.05$)且以波动性高糖组更显著。

3 糖尿病相关肝纤维化的防治

目前尚无针对糖尿病患者肝纤维化的特异性干预方法,大多报道均是针对糖尿病并非酒精性脂肪肝性肝纤维化的药物。目前胰岛素增敏剂成为治疗NAFLD性肝纤维化的研究热点,主要包括噻唑烷二酮(TZDs, PPAR γ 激活剂)和二甲双胍2类。多项临床研究发现非酒精性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)患者口服罗格列酮或吡格列酮48 wk后发现胰岛素抵抗和生化指标、肝纤维化程度均明显改善^[37];然而最近的一项吡格列酮对照研究证实,肝酶水平和组织学上炎症程度虽下降显著,但纤维化改善不明显^[38]。因此PPAR γ 激活剂在肝纤维化过程中所发挥的作用仍未完全阐明,是否具有抗纤维化的作用亦尚无定论,同时药物的不良反应也不可忽视^[39]。二甲双胍可减少肝糖生成和增加外周组织糖利用,有报道其有改善NAFLD患者的肝纤维化^[40]。但Marchesini等^[41]的研究中,20例NASH患者服用二甲双胍肝酶指标有显著改善,而缺乏改善肝纤维化组织学证据。因此,对二甲双胍的疗效也有争议。正如Friedman教授指出,近30年来西方发达国家对肝纤维化和肝硬化的发病机制研究虽深,但在肝纤维化防治方面成果却不多^[42]。因此研发防治糖尿病性肝纤维化的药物势在必行。最近王蓉蓉等^[43]研究了中药银杏叶提取物(EGb)对2型糖尿病性NASH大鼠肝纤维化模型的干预作用,结果表明EGb可减轻模型大鼠糖、脂代谢异常的程度,减少肝脏I、III型胶原的mRNA表达。中医中药是我国原创学科,中医药抗肝纤维化、降血糖是我国特色和优势,筛选新的有效中药,发挥中药的多途径、多环节、多靶点抗糖尿病性肝纤维化的作用,使我国糖尿病性肝病的研究在国际学术界独树一帜具有重大意义。

4 结论

随着国内外学者对肝纤维化研究的广泛深入,发现不同病因的肝纤维化的发生机制和防治策略不同。已有证据显示在糖尿病患者中,终末期肝病的死亡率比心血管疾病高,但目前对糖尿病导致肝纤维化的机制仍然了解甚少,防治措施缺乏。作为糖尿病的危险因素之一的波动性血

糖,对机体组织器官的影响大于持续性血糖,但目前国际上尚无有关波动血糖与肝纤维化、肝硬化关系的研究。因此积极开展血糖、波动血糖与肝纤维化的研究具有重要的意义。

5 参考文献

- 1 Friedman SL. Hepatic fibrosis - overview. *Toxicology* 2008; 254: 120-129
- 2 贾继东,李海. 肝脏纤维化基础和临床研究进展. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 5-6
- 3 邓群,张一,胡国信,袁铿,袁芳,黄艳琴. 羟基喜树碱对大鼠肝星状细胞增殖抑制的最佳浓度. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 554-559
- 4 张一,邓群,胡国信,袁铿,袁芳,黄艳琴. 羟基喜树碱对HSC-T6细胞增殖与凋亡的影响. *中华肝脏病杂志* 2010; 18: 199-203
- 5 马超,马红. P38丝裂原活化蛋白激酶信号通路与肝星状细胞. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 68-73
- 6 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669
- 7 潘长玉. 从循证医学看糖尿病伴高血压患者的血压管理策略. *中华糖尿病杂志* 2010; 26: 1-5
- 8 Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 193-203
- 9 Gnudi L, Thomas SM, Viberti G. Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2226-2232
- 10 Tolman KG, Fonseca V, Tan MH, Dalpiaz A. Narrative review: hepatobiliary disease in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 141: 946-956
- 11 Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, Bedossa P. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001; 34: 738-744
- 12 Sugimoto R, Enjoji M, Kohjima M, Tsuruta S, Fukushima M, Iwao M, Sonta T, Kotoh K, Inoguchi T, Nakamuta M. High glucose stimulates hepatic stellate cells to proliferate and to produce collagen through free radical production and activation of mitogen-activated protein kinase. *Liver Int* 2005; 25: 1018-1026
- 13 焦明丽,任莉,苋新明. 高糖对肝星状细胞增殖及对转化生长因子 β 1、血小板衍生生长因子和III型前胶原表达的影响. *西安交通大学学报(医学版)* 2009; 30: 554-558
- 14 苋新明,焦明丽,任莉,常远红. 高糖对肝星状细胞T6表达结缔组织生长因子、血小板衍生生长因子BB及层黏蛋白和透明质酸的影响. *中国医科大学学报* 2008; 37: 739-741
- 15 方瑜洁,苋新明. 高血糖对肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA和CTGF表达的影响. *中国现代医药杂志* 2009; 11: 1-4
- 16 李芹,邓存良,陈庄,王明勇. 高糖、胰岛素对大鼠肝星状细胞增殖影响. *中国现代医学杂志* 2009; 19: 1669-1672
- 17 范建高,田丽艳,蔡晓波,钱燕,杨兆瑞,徐正婕. 高血

- 糖对四氯化碳中毒大鼠肝纤维化进展的影响. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 58-60
- 18 朱春晖, 冼苏, 韦敏怡, 秦映芬, 周嘉. 糖尿病树鼯肝脏病理分析. 中国现代医学杂志 2007; 17: 543-546
- 19 Abrams GA, Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH. Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2004; 40: 475-483
- 20 Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, Chaput JC, Naveau S. Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 2002; 35: 635-638
- 21 Ratzu V, Munteanu M, Charlotte F, Bonyhay L, Poynard T. Fibrogenic impact of high serum glucose in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 39: 1049-1055
- 22 Haukeland JW, Konopski Z, Linnestad P, Azimy S, Marit Løberg E, Haaland T, Birkeland K, Bjørø K. Abnormal glucose tolerance is a predictor of steatohepatitis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1469-1477
- 23 Monnier L, Colette C. Glycemic variability: should we and can we prevent it? *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2: S150-S154
- 24 Piconi L, Corgnani M, Da Ros R, Assaloni R, Piliago T, Ceriello A. The protective effect of rosuvastatin in human umbilical endothelial cells exposed to constant or intermittent high glucose. *J Diabetes Complications* 2008; 22: 38-45
- 25 贾伟平. 信息改变认知: 动态血糖监测在临床中的应用. 中华医学杂志 2009; 89: 649-650
- 26 Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes* 2003; 52: 2795-2804
- 27 Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis* 2005; 183: 259-267
- 28 Takeuchi A, Throckmorton DC, Brogden AP, Yoshizawa N, Rasmussen H, Kashgarian M. Periodic high extracellular glucose enhances production of collagens III and IV by mesangial cells. *Am J Physiol* 1995; 268: F13-F19
- 29 Jones SC, Saunders HJ, Qi W, Pollock CA. Intermittent high glucose enhances cell growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. *Diabetologia* 1999; 42: 1113-1119
- 30 张晋欣, 李兴. 波动性高糖对血管内皮细胞生存及凋亡的影响. 中国现代药物应用 2009; 3: 4-6
- 31 刘江华, 宓宝斌, 廖二元, 柏勇平, 刘宗汉, 全智华, 文格波. 波动性高糖对内皮细胞血管舒张因子合成的影响. 中国动脉硬化杂志 2006; 14: 55-56
- 32 赵晟, 杨智勇, 张微, 李艳, 韩萍. 急性血糖波动对肝细胞凋亡的影响及可能的机制研究. 中国全科医学 2010; 13: 157-159
- 33 Ceriello A, Esposito K, Piconi L, Ihnat MA, Thorpe JE, Testa R, Boemi M, Giugliano D. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2008; 57: 1349-1354
- 34 Gimeno-Orna JA, Castro-Alonso FJ, Boned-Juliani B, Lou-Arnal LM. Fasting plasma glucose variability as a risk factor of retinopathy in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2003; 17: 78-81
- 35 陈海燕, 李明龙, 赵树娥, 张莹荣, 李茵茵. 老年2型糖尿病患者血糖波动与下肢血管病变的关系. 中国老年学杂志 2008; 28: 153-155
- 36 方小正, 陈敏, 李红, 卢正红. 波动性高血糖状态与糖尿病微血管病变的研究. 医学临床研究 2008; 25: 1945-1947
- 37 Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Liang TJ, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 188-196
- 38 Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 2297-2307
- 39 冯业霜, 马红, 岳兰萍, 刘天会, 丛敏, 尤红, 贾继东. 罗格列酮对大鼠肝星状细胞 I 型胶原和基质金属蛋白酶组织抑制因子1表达的影响. 中华肝脏病杂志 2009; 17: 66-67
- 40 Nair S, Diehl AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 23-28
- 41 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001; 358: 893-894
- 42 Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology* 2006; 43: S82-S88
- 43 王蓉蓉, 苏志涛, 王环, 王文艳, 吴晓桦, 万丽, 陈丽玲, 陈筱菲, 陈国荣. 银杏叶提取物对2型糖尿病大鼠肝纤维化的影响. 中华肝脏病杂志 2008; 16: 942-943

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

微管不稳定蛋白在食管癌细胞和组织中的表达及意义

刘飞, 刘芳, 孙玉琳, 赵晓航

■背景资料

STMN1是一种重要的微管解聚蛋白, STMN1解聚微管的功能受其磷酸化水平的严格调节, 在多种恶性肿瘤的发生发展过程中发挥了重要作用。关于STMN1在食管癌发病中作用的研究报道比较少。本文探讨了STMN1在食管鳞癌中的表达和作用。

刘飞, 刘芳, 孙玉琳, 赵晓航, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021
刘飞, 博士, 主要从事消化系统肿瘤标志分子研究。
国际科技合作与交流专项基金资助项目, No. 2008DFA31130
国家高技术发展计划“863”基金资助项目, No. 2006AA02A403
作者贡献分布: 实验操作由刘飞、刘芳及孙玉琳完成; 免疫组织化学分析由刘芳完成; 数据分析和论文起草由刘飞与孙玉琳完成; 赵晓航负责实验设计、论文修改和审阅。
通讯作者: 赵晓航, 研究员, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院研究所分子肿瘤学国家重点实验室, zhaoxh@cicams.ac.cn
电话: 010-67709015 传真: 010-87778360
收稿日期: 2010-02-25 修回日期: 2010-03-30
接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-05-08

Significance of STMN1 expression in esophageal squamous cell carcinoma

Fei Liu, Fang Liu, Yu-Lin Sun, Xiao-Hang Zhao

Fei Liu, Fang Liu, Yu-Lin Sun, Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China
Supported by: the International Science & Technology Cooperation and Exchange Program of China, No. 2008DFA31130; and the National High-Tech R & D Program of China (863 Program), No. 2006AA02A403
Correspondence to: Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 17 Panjiayuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. zhaoxh@cicams.ac.cn
Received: 2010-02-25 Revised: 2010-03-30
Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of Stathmin 1 (STMN1) protein in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissue and cell lines and to evaluate its correlation with the clinicopathologic parameters of ESCC.

METHODS: One-dimensional (1-D) Western blot was performed to determine the expression of STMN1 in 8 ESCC cell lines. Two-dimensional (2-D) Western blot was used to determine modified STMN1 in KYSE180 cells. Western blot and immunohistochemistry (IHC) were employed to determine the expression of STMN1 in ESCC specimens. The chi-square test was used to ana-

lyze IHC results.

RESULTS: STMN1 was widely expressed in ESCC cells, including WHCO1, EC0156, KYSE510, KYSE180, KYSE170, KYSE150, KYSE140 and KYSE30 cell lines. Two STMN1 protein spots were detected in KYSE180 cells on 2-D Western blot: one stronger signal and one weaker signal located in more basic area, which suggests that STMN1 protein may be modified in KYSE180 cells. Western blot analysis showed that STMN1 was overexpressed in 69.2% (9/13) of ESCC specimens compared with their normal epithelial counterparts. IHC assay also demonstrated that the positive rate of STMN1 expression was significantly higher in ESCC tissue than in matched adjacent normal tissue ($P < 0.05$). STMN1 expression is not correlated with age, gender, differentiation, tumor grade and lymph node metastasis.

CONCLUSION: The expression of STMN1 protein is up-regulated in both ESCC tissue and cell lines and may be modified in some ESCC cell lines. STMN1 might exert an oncogenic function in ESCC. Dynamic measurement of STMN1 expression level might aid to evaluate the progression of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Stathmin 1; Western blot

Liu F, Liu F, Sun YL, Zhao XH. Significance of STMN1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1306-1312

摘要

目的: 探讨食管鳞癌细胞和组织中STMN1的表达与食管鳞癌病理分级的关系。

方法: 一维(1-D)Western blot分析8种食管鳞癌细胞的STMN1表达, 二维(2-D)Western blot分析KYSE180食管鳞癌细胞中STMN1的表达与修饰状态。免疫组织化学分析食管鳞癌组织及其配对样本食管上皮STMN1表达和定位, 以及卡方检验统计分析食管癌组织STMN1表达与临床分级的关系。

■同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

结果: STMN1在人食管鳞癌细胞WHCO1、EC0156、KYSE510、KYSE180、KYSE170、KYSE150、KYSE140和KYSE30中广泛表达。2-D Western blot结果表明STMN1在食管癌细胞KYSE180中呈现为一个具有较强信号的蛋白点和另一个具有较弱信号的、等电点偏碱性的蛋白点,提示STMN1可能存在特定修饰状态。Western blot结果显示,与正常食管上皮相比,食管癌组织中STMN1表达升高(69.2%, 9/13)。食管癌组织芯片免疫组织化学分析结果显示STMN1在72%(13/18)肿瘤组织中高表达较STMN1在17.6%(3/17)癌旁食管上皮表达具有统计学意义($P < 0.05$),但与组织病理分级无关($P = 0.646$)。

结论: STMN1蛋白在食管鳞癌细胞和组织表达上调并伴随部分修饰,提示在食管鳞癌组织中STMN1具有癌基因的作用,参与食管癌变进程。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 微管不稳定蛋白; 蛋白免疫印迹法

刘飞, 刘芳, 孙玉琳, 赵晓航. 微管不稳定蛋白在食管癌细胞和组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1306-1312
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1306.asp>

0 引言

微管不稳定蛋白(stathmin 1, STMN1)是一种重要的微管调节蛋白^[1]。STMN1最初在白血病细胞HL60中发现,又称为p17、p19、19K、metablastin、Prosolin、Protein Pr22、白血病相关磷酸化蛋白p18、原癌蛋白18、LAP18和Op18等。微管在生物机体细胞内发挥着支架、胞内物质运输和形成纺锤体的重要功能。而STMN1起着结合 α/β 微管蛋白从而解聚微管的功能,因此STMN1通过微管在细胞的生命活动过程中扮演着重要的角色。STMN1在多种恶性肿瘤的发生发展过程中发挥了重要作用。STMN1是一种广泛存在的胞质蛋白,在哺乳动物神经组织中表达最高。STMN1蛋白含有149个氨基酸,4个结构域,分为N端调节部分和C端作用部分,核心部分位于42至126位氨基酸。STMN1蛋白与 α/β 微管蛋白结合,促进微管解聚和抑制微管合成。研究表明STMN1参与细胞骨架的形成及维持、胞内物质运输、细胞黏附与移行、细胞增殖、分化和死亡^[2]。STMN1解聚微管的功能受其磷酸化水平的严格调控^[3]。磷酸

化的STMN1结合游离 α/β 微管蛋白的功能消失,微管随之延长。STMN1与恶性肿瘤发生发展密切相关,在白血病、淋巴瘤、成神经细胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌和间皮瘤等恶性肿瘤中STMN1蛋白表达升高^[4-6]。食管癌是我国常见消化系恶性肿瘤,以食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)为主。目前关于STMN1在食管癌发病中作用的研究报道较少。本研究采用1-D和2-D Western blot方法,分析STMN1在8种人食管鳞癌细胞系和食管鳞癌组织中的表达和修饰改变;免疫组织化学分析食管鳞癌组织及其配对食管上皮STMN1的表达和定位改变,以及与食管癌病理分期的关系,对认识STMN1在食管鳞癌中作用机制具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管鳞癌细胞系EC0156由本实验室建系^[7], WHCO1由南非开普敦大学Hendricks博士惠赠^[8], KYSE510、KYSE180、KYSE170、KYSE150、KYSE140和KYSE30由日本京都大学Shimada Y博士惠赠。STMN1抗体购自Cell Signaling Technology公司。 β -actin抗体购自Sigma公司。7 cm(pH3-10, 线性)固相pH梯度干胶条(IPGs)购自Amersham Biosciences公司。13对食管鳞状细胞癌/癌旁远端配对组织样本取自中国医学科学院肿瘤医院胸外科单纯手术治疗患者,并经病理证实。组织标本一经分离,迅速去除坏死及结缔组织,经预冷的生理盐水多次清洗后液氮速冻,转入-80℃冰箱保存。患者平均年龄58.1(32-72)岁,其中男10例,女3例。病例取材得到患者本人知情同意,患者术前未接受输血和放疗。含有31对食管癌组织微阵列芯片购自上海芯超生物科技有限公司。EliVision plus试剂盒购自福建迈新生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: EC0156和WHCO1细胞培养于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中。KYSE510、KYSE180、KYSE170、KYSE150、KYSE140和KYSE30细胞培养于含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中。上述两种培养基在使用前添加100 IU/mL青霉素和100 g/L链霉素。所有细胞均置于含50 mL/L CO₂的37℃孵育箱内培养,每3-5 d传代1次。

1.2.2 总蛋白提取: 使用直径10 cm的培养皿培养细胞,待细胞数达到约 1×10^7 时备用。使用

■ 研发前沿

对STMN1的研究重点目前主要集中在相关疾病特别是恶性肿瘤。目前的热点主要:(1)在恶性肿瘤中的STMN1的表达水平及功能变化;(2)STMN1对恶性肿瘤药物治疗疗效的影响;(3)机体细胞对STMN1的调控机制。

■相关报道

相关文献表明, stathmin在许多恶性肿瘤组织中高表达而且stathmin的表达水平高低与患者预后有关联, stathmin的高表达对化疗效果存在影响, 可能是不良预后和化疗效果的预测指标之一。

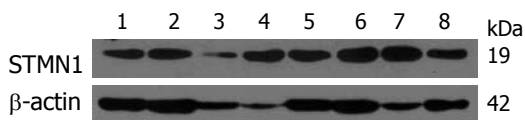


图1 STMN1在食管癌细胞中的表达。1: WHCO1; 2: EC0156; 3: KYSE510; 4: KYSE180; 5: KYSE170; 6: KYSE150; 7: KYSE140; 8: KYSE30。

4℃预冷的1×PBS洗2次, 每次5 mL。在培养皿中加入预冷的细胞裂解液1 mL, 用细胞刮子迅速刮下细胞并收集至2 mL离心管中。冰上超声, 4℃离心, 12 000 $g \times 15$ min, 收集上清, 分装后于-80℃保存。上清中吸出20 μ L, 用Bradford法进行蛋白定量。

1.2.3 双向电泳(2-DE): 将80-100 μ g蛋白加入到155 μ L水化液(8 mol/L脲; 2% CHAPS; 65 mmol/L DTT; 0.5% IPG 缓冲液, pH3-10; 痕量溴酚蓝)中使蛋白充分溶解后, 缓慢加入到IPG沟槽内, 将7 cm的线性IPG胶条(pH3-10)胶面朝上缓慢插入其中, 胶条阳性端靠近槽底部, 避免产生气泡, 用胶带封闭上样孔和底部的透气孔, 室温水化10-12 h后行等电聚焦分离。电压条件设置为0 V, 4 h; 50 V, 8 h; 500 V, 1 h; 1 000 V, 1 h; 4 000 V, 1 h; 8 000 V, 1 h; 8 000 V, 2 h。IPG胶条经平衡液(50 mmol/L Tris-Cl, pH8.8; 6 mol/L脲; 30%甘油; 2% SDS; 65 mmol/L DTT; 痕量溴酚蓝)平衡15 min。将胶条转入烷基化平衡液(50 mmol/L Tris-Cl, pH8.8, 6 mol/L脲, 30%甘油; 2% SDS; 140 mmol/L碘乙酰胺; 痕量溴酚蓝)中烷化15 min。经等电聚焦分离后的IPG胶条水平放置于12%的聚丙烯酰胺凝胶上方, 用0.5%琼脂糖密封胶条后, 行SDS-PAGE分离, 电泳条件为80 V电泳2.5-3 h。

1.2.4 蛋白质印迹方法检测STMN1: 取提取的细胞系和食管癌组织部分总蛋白经15% SDS-PAGE电泳分离, 湿转法将蛋白转印至PVDF膜, 10%脱脂奶粉-PBS室温封闭3 h, 然后与1:200比例稀释的STMN1抗体室温孵育3 h或4℃过夜, 再与辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗孵育1 h后, ECL化学发光作用3 min后曝光、显影和定影。

1.2.5 免疫组织化学分析: 按EliVision plus试剂盒说明书操作。主要步骤如下: 组织芯片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 用1×PBS(pH7.4)洗3次, 每次3 min。经10 mmol/L pH6.0枸橼酸盐缓冲液, 100℃孵育10 min后, 1×PBS洗3次, 每次3 min; 3%过氧化氢溶液(H_2O_2)室温孵育10 min, 后1×PBS洗3次, 每次3 min; 增强液孵育20 min, 1×PBS洗3次, 每次3 min; 酶标聚合物孵育30 min, 1

表1 食管癌组织STMN1表达 (n)

分组	阳性	阴性	有效
癌	13	5	18
正常	3	14	17

表2 食管癌STMN1表达与组织病理分级关系 (n)

分组	阳性	阴性	有效
高分化组	3	1	4
中分化组	6	3	9

×PBS洗3次, 每次3 min; DAB染色, 复染, 脱水, 透明, 封片。相同含量无关免疫球蛋白替代一抗, 作为阴性对照。结果判断: 高倍镜下, 胞质出现黄色颗粒判断为阳性, 如无明显变化则视为阴性。

统计学处理 数据分析使用SPSS16.0统计软件。采用行×列表 χ^2 检验进行统计分析, 当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STMN1在食管癌细胞中的表达 不同食管癌细胞系中均表达(图1)。

2.2 STMN1在食管癌配对组织中的表达 食管癌与癌旁食管上皮配对组织蛋白Western blot分析, 结果显示STMN1相对分子质量约为19 kDa(图2), 食管癌组织中STMN1蛋白表达水平较癌旁食管上皮升高69.2%(9/13)。

2.3 2-D Western blot分析STMN1在食管组织中的表达 采用2-D Western blot分析了食管癌与癌旁配对组织蛋白样本。结果显示, STMN1在癌组织表达, 其相对分子质量约为19 kDa, 等电点约为5.7(图3), 与STMN1的理论相对分子质量和等电点一致。与此对应的正常食管上皮组织中并没有检测到该蛋白信号。

2.4 食管癌细胞STMN1的修饰 食管癌细胞KYSE180中STMN1表达的2-D Western blot分析(图4), 结果表明, STMN1共有两个蛋白点, 信号较强的蛋白点相对分子质量稍大(约19 kDa), 而信号较弱蛋白点的等电点偏碱性, 提示在KYSE180细胞中, STMN1具有特定修饰。

2.5 食管癌组织中STMN1的表达 食管癌多组织阵列上STMN1免疫组织化学染色后, 食管癌有效例数为18例、癌旁食管上皮有效例数为17例、癌与癌旁匹配(同一患者来源)的有效例数为13例(表1, 2)。STMN1在3例正常食管上皮组织中

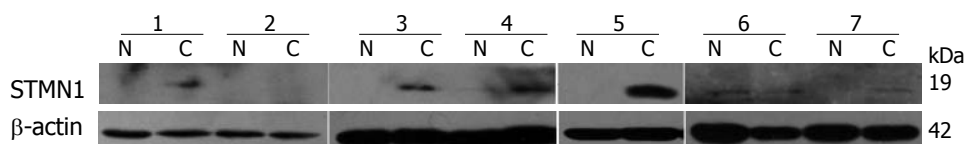


图2 部分食管癌组织中STMN1表达结果. N: 正常组织; C: 肿瘤组织.

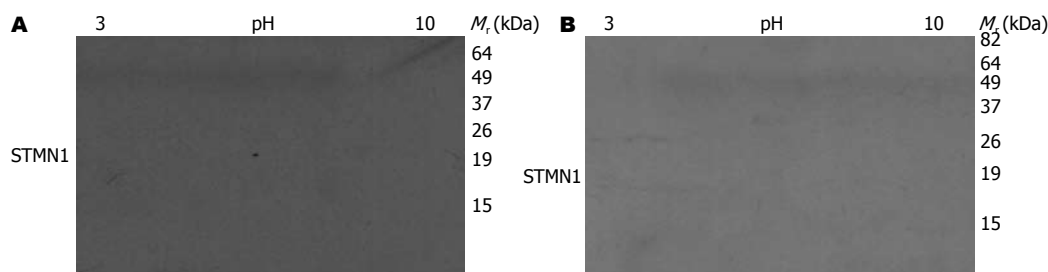


图3 食管癌组织 2-D Western blot分析结果. A: 肿瘤组织; B: 正常组织.

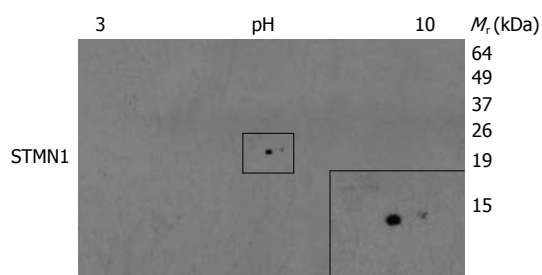


图4 食管癌细胞STMN1的2-D Western blot分析.

呈弱阳性表达(图5A, C), 阳性率为17.6%(3/17); 食管癌组织中有13例STMN1表达阳性(图5B, D), 阳性率为72%(13/18). STMN1在食管癌和癌旁食管上皮中均位于胞质(图5). 四格表Fisher确切检验($P = 0.002$)显示差异有统计学意义($P < 0.05$), 表明STMN1在食管癌中表达升高.

按照食管癌组织芯片病理分级进行阳性例数统计列表(表2), 经Fisher确切概率法计算 $P = 0.471$, 表明STMN1表达与食管癌组织病理分级无关.

3 讨论

STMN1蛋白全长149个氨基酸, 是一种重要的微管功能调节蛋白. STMN1通过结合 α/β 微管蛋白而解聚微管, 在细胞的生命活动过程中扮演重要的角色. 微管解聚与聚合发生在微管末端, STMN1主要作用于微管“+”末端, 通过捕获微管蛋白异二聚体和减少游离的微管蛋白的浓度, 减慢微管末端的聚合速度^[9].

STMN1的功能与磷酸化水平密切相关. 未磷酸化的STMN1既促进微管解聚, 同时也结合至 α/β 微管蛋白, 形成三元复合物, 结合过程可

逆, 最终形成比较稳定的STMN1- α/β 复合物. 当STMN1发生磷酸化后, 其解聚微管主要功能受到抑制, 而去磷酸化后, 蛋白功能迅速恢复而发挥解聚微管的作用. 磷酸化的STMN1解聚微管功能消失, 三元复合物解体, 释放微管二聚体, 参加微管多聚化, 使微管不断延长^[10,11].

STMN1蛋白共有4个磷酸化位点, 分别位于Ser-16、Ser-25、Ser-38和Ser-63, 其磷酸化受到一系列蛋白激酶作用^[12]. Ser-25和Ser-38是MAP激酶的磷酸化位点, Ser-16是钙离子依赖激酶的磷酸化位点. Ser-63是cAMP依赖蛋白激酶的靶点^[4]. 当细胞进入有丝分裂后, Ser-16发生磷酸化, 抑制其解聚微管的功能. 分裂完成后Ser-16则去磷酸化, STMN1解聚微管. Manna等^[3]发现只要磷酸化STMN1 16或者63位Ser, 就会强烈降低STMN1结合游离微管蛋白的能力. 而即使同时磷酸化Ser-25和Ser-38丝毫不影响STMN1结合游离微管的能力, 微管照样缩短. 相比而言, Ser-16和Ser-63对于STMN1的作用转换更为关键, 只要能磷酸化Ser-16和Ser-63的激酶就能完全调节微管的功能^[4]. Chen等^[13]发现BGLF4能磷酸化STMN1的Ser-16、Ser-25和Ser-38, 而且与BGLF4的表达水平呈剂量依赖性, 但是BGLF4对Ser-63的磷酸化作用非常弱. 本文2-D Western blot结果发现在KYSE180细胞中检测到两个STMN1信号点, 信号较强的蛋白点相对分子质量稍大, 而信号较弱蛋白点的等电点偏碱性, 提示在KYSE180细胞中STMN1受到某种特定修饰.

与其他许多重要蛋白一样, STMN1的功能在细胞内受到严格调控. 研究发现STMN1受Rac/Cdc42调节. Rac/Cdc42是1种Rho GTPase

■创新盘点

本文首先对8种食管癌细胞系进行了STMN1的表达筛选, 并引入了2-D Western blot技术在食管癌中对STMN1进行验证及相关修饰的探索.

应用要点

本文为STMN1是否能作为食管癌的一个潜在标志物提供了一个可选项。另外STMN1的功能与其修饰状态关系很大,本文在这方面做了些预期的探索,为深入研究提供了线索。

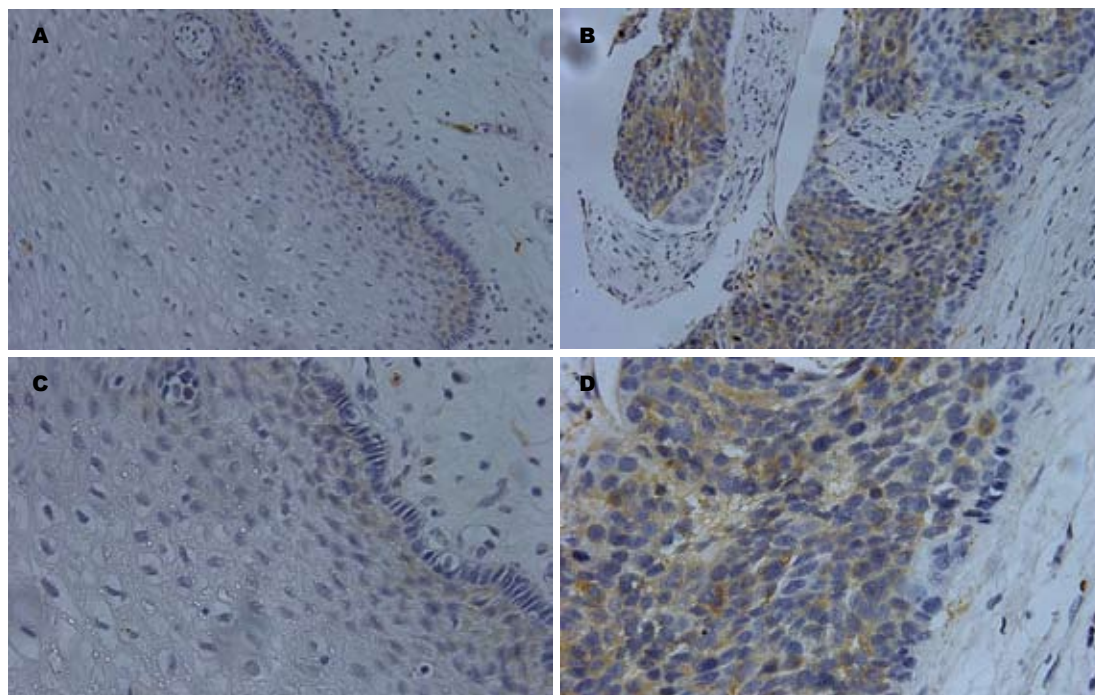


图5 STMN1在食管癌组织微阵列上的免疫组织化学染色图。A, C: 正常食管上皮; B, D: 食管癌组织, A, B: $\times 200$; C, D: $\times 400$ 。

相关蛋白,参与调控肌动蛋白细胞骨架^[14]。STMN1的活性还受到 $p53$ 和E2F的调节。 $p53$ 升高,STMN1则迅速降低,有人推测 $p53$ 是STMN1的一个抑制因子。在恶性神经胶质瘤中,高表达 $p53$ 导致STMN1降低,使细胞分裂停滞在分裂的关键时期 G_2/M 期, G_2/M 期细胞数量大大增加^[15]。E2F也能引起STMN1的明显降低^[16]。据此推测,STMN1可能参与了细胞周期检验点控制。抑制细胞STMN1会导致出现多倍体也是另一个佐证。Baldassarre等^[17]发现上调 $p27$ 能抑制STMN1参与解聚微管的功能,肿瘤细胞的迁移、分裂与增殖能力均有明显降低。肺腺癌细胞A549中内源或外源表达Egr1蛋白后,STMN1的启动子活性明显降低同时STMN1蛋白表达水平随之降低。因此Egr1是一个新的调节STMN1的蛋白因子^[18]。转移生长因子诱导早期基因1(Transforming growth factor-beta inducible early gene 1, TIEG1)是一种通过TGF-beta通路诱发凋亡的蛋白,下调STMN1明显与TIEG1相关联,同时异位高表达STMN1抑制肿瘤细胞TIEG1介导的生长抑制,siRNA STMN1会抑制胰腺癌细胞生长,因此STMN1可能是TIEG1的一个下游靶蛋白^[19]。内皮细胞内HIF累积与STMN1表达有关,是通过PI3K/Akt信号通路实现的,下调STMN1,会抑制AKT的活性,使磷酸化水平降低^[20]。Verma等发现STAT3活化后大量

结合STMN1,竞争性抑制STMN1与微管蛋白的结合,游离微管蛋白大量增加,微管得以延长^[21]。Lin等^[22]发现由EBV病毒编码的LMP1能间接的磷酸化STMN1,促进M期纺锤体的形成。

STMN1对细胞周期和细胞的正常分裂有着非常重要的作用。Balehandran等发现反义阻抑STMN1表达导致红白血病K56细胞增殖率显著降低。Mistry等^[23]发现抑制STMN1表达可使白血病细胞失去转化表型,并抑制其成瘤倾向。运用反义寡核苷酸抑制Eca109细胞中STMN1表达,Eca109细胞胞体凝缩,增殖能力减弱,细胞生长及目的基因表达明显受抑($P<0.05$)。细胞分裂阻滞在分裂期的中期, G_2/M 期细胞比例由 $12.2 \pm 1.0\%$ 升至 $36.5 \pm 5.8\%$ ^[24]。目前认为,STMN1在有丝分裂期不发挥作用,使纺锤体正常组装;STMN1在其他细胞周期中均抑制纺锤体的形成。

研究表明,STMN1在包括乳腺癌、肺癌、宫颈癌、卵巢癌和嗜铬细胞瘤等多种恶性肿瘤中高表达。STMN1高表达可作为乳腺癌的预测因子^[25]。Alli等^[26]发现含有突变型 $p53$ 基因的人乳腺癌细胞系中STMN1表达增加。Chen等^[27]通过免疫组织化学发现中低分化肺腺癌中STMN1阳性率高达70%之多,而高分化肺腺癌STMN1阳性率不到50%。Xi等发现永生化和宫颈癌细胞中STMN1 mRNA和蛋白水平明显高于正常宫颈上皮组织,免疫组织化学分析结果也表明

宫颈癌组织中STMN1的表达水平明显升高, 而且STMN1的表达与宫颈癌的临床分期、肿块大小、区域淋巴结转移和血液转移都成正相关。因此, Xi等^[28]认为STMN1可以作为宫颈癌的预后预测因子。Su等^[29]研究分析了178例卵巢癌病例, 结果表明STMN1高表达的患者比低表达患者的无进展生存期和总生存期明显缩短。而Sadow等^[30]比较了48例嗜铬细胞瘤和28例恶性嗜铬细胞瘤中STMN1的表达水平, 结果表明恶性嗜铬细胞瘤的STMN1表达明显高于良性嗜铬细胞瘤, 良性嗜铬细胞瘤STMN1的表达明显高于正常肾上腺组织。Björklund等^[31]运用包含7770个cDNA克隆的表达微阵列筛查11例嗜铬细胞瘤的表达, 结果发现与正常肾上腺组织相比, 瘤组织中STMN1 mRNA表达明显升高。RT-PCR验证结果显示, 良性和恶性嗜铬细胞瘤STMN1 mRNA表达水平分别升高6倍和8倍, 而转移病例中STMN1 mRNA表达水平则升高达16倍。在肉瘤细胞, 当STMN1过表达时, 细胞移行能力加强; STMN1表达被抑制时, 细胞移行能力降低^[17]。RNAi人骨肉瘤细胞株Saos-2和MG63下调STMN1后, 明显抑制细胞增殖能力和致瘤性, 细胞停滞在G₂/M期最终引发凋亡。Zhang等^[32]发现喉癌中STMN1表达升高69%(24/35), 而STMN1在正常组织表达率仅为33.3%(6/18)。高STMN1表达与成神经管细胞瘤的扩散有关, 患者生存率降低, 平均生存期明显减短^[33]。

STMN1对恶性肿瘤的化疗效果有很大影响。研究发现siRNA STMN1和药物紫杉烷有协同效应。因此下调STMN1有潜在的抗肿瘤效果和增敏化疗药物的作用^[34]。用反义核酸抑制白血病细胞K562 STMN1再加入紫杉醇后, 会导致严重的有丝分裂紊乱(染色体数过少或者多核化)。在细胞分裂阶段产生大量的非整倍体, 凋亡细胞的数目大为增加^[35]。

本文发现STMN1在食管癌细胞中广泛表达, 对比了STMN1在食管癌组织和癌旁食管上皮中的表达, Western blot结果显示STMN1在食管癌组织中表达升高69.2%(9/13)。组织芯片结果表明食管癌组织中STMN1表达水平升高72%(13/18)与文献报道的其他恶性肿瘤中STMN1阳性表达率升高的结果一致, 提示STMN1在食管癌细胞的发生发展中发挥重要作用。

4 参考文献

- 1 Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 18-24
- 2 Rana S, Maples PB, Senzer N, Nemunaitis J. Stathmin 1: a novel therapeutic target for anticancer activity. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8: 1461-1470
- 3 Manna T, Thrower DA, Honnappa S, Steinmetz MO, Wilson L. Regulation of microtubule dynamic instability in vitro by differentially phosphorylated stathmin. *J Biol Chem* 2009; 284: 15640-15649
- 4 Liu Z, Lu H, Shi H, Du Y, Yu J, Gu S, Chen X, Liu KJ, Hu CA. PUMA overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 1647-1654
- 5 Kim JY, Harvard C, You L, Xu Z, Kuchenbecker K, Baehner R, Jablons D. Stathmin is overexpressed in malignant mesothelioma. *Anticancer Res* 2007; 27: 39-44
- 6 Nakashima D, Uzawa K, Kasamatsu A, Koike H, Endo Y, Saito K, Hashitani S, Numata T, Urade M, Tanzawa H. Protein expression profiling identifies maspin and stathmin as potential biomarkers of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Int J Cancer* 2006; 118: 704-713
- 7 Wang Q, Xu Y, Zhao X, Chang Y, Liu Y, Jiang L, Sharma J, Seo DK, Yan H. A facile one-step in situ functionalization of quantum dots with preserved photoluminescence for bioconjugation. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 6380-6381
- 8 Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F, Parker MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3071-3077
- 9 Segerman B, Holmfeldt P, Morabito J, Cassimeris L, Gullberg M. Autonomous and phosphorylation-responsive microtubule-regulating activities of the N-terminus of Op18/stathmin. *J Cell Sci* 2003; 116: 197-205
- 10 Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 2004; 93: 242-250
- 11 Devred F, Tsvetkov PO, Barbier P, Allegro D, Horwitz SB, Makarov AA, Peyrot V. Stathmin/Op18 is a novel mediator of vinblastine activity. *FEBS Lett* 2008; 582: 2484-2488
- 12 Mistry SJ, Atweh GF. Role of stathmin in the regulation of the mitotic spindle: potential applications in cancer therapy. *Mt Sinai J Med* 2002; 69: 299-304
- 13 Chen PW, Lin SJ, Tsai SC, Lin JH, Chen MR, Wang JT, Lee CP, Tsai CH. Regulation of microtubule dynamics through phosphorylation on stathmin by Epstein-Barr virus kinase BGLF4. *J Biol Chem* 2010; 285: 10053-10063
- 14 Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A. Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* 2001; 276: 1677-1680
- 15 Johnsen JL, Aurelio ON, Kwaja Z, Jørgensen GE, Pellegata NS, Plattner R, Stanbridge EJ, Cajot JF. p53-mediated negative regulation of stathmin/Op18 expression is associated with G(2)/M cell-cycle arrest. *Int J Cancer* 2000; 88: 685-691
- 16 Polager S, Ginsberg D. E2F mediates sustained G2 arrest and down-regulation of Stathmin and AIM-1 expression in response to genotoxic stress. *J Biol*

■同行评价

本研究反映了研究工作的科学问题和特定内容, 简明而有特色, 有较好的科学性和可读性, 能较好地反映我国胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

- Chem* 2003; 278: 1443-1449
- 17 Baldassarre G, Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Vecchione A, Spessotto P, Morriore A, Canzonieri V, Colombatti A. p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell* 2005; 7: 51-63
 - 18 Fang L, Min L, Lin Y, Ping G, Rui W, Ying Z, Xi W, Ting H, Li L, Ke D, Jihong R, Huizhong Z. Downregulation of stathmin expression is mediated directly by Egr1 and associated with p53 activity in lung cancer cell line A549. *Cell Signal* 2010; 22: 166-173
 - 19 Jiang L, Chen Y, Chan CY, Wang X, Lin L, He ML, Lin MC, Yew DT, Sung JJ, Li JC, Kung HF. Down-regulation of stathmin is required for TGF-beta inducible early gene 1 induced growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 2009; 274: 101-108
 - 20 Yoshie M, Miyajima E, Kyo S, Tamura K. Stathmin, a microtubule regulatory protein, is associated with hypoxia-inducible factor-1alpha levels in human endometrial and endothelial cells. *Endocrinology* 2009; 150: 2413-2418
 - 21 Verma NK, Dourlat J, Davies AM, Long A, Liu WQ, Garbay C, Kelleher D, Volkov Y. STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 12349-12362
 - 22 Lin X, Liu S, Luo X, Ma X, Guo L, Li L, Li Z, Tao Y, Cao Y. EBV-encoded LMP1 regulates Op18/stathmin signaling pathway by cdc2 mediation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2009; 124: 1020-1027
 - 23 Mistry SJ, Bank A, Atweh GF. Synergistic antiangiogenic effects of stathmin inhibition and taxol exposure. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 773-782
 - 24 Wang F, Wang LX, Wang RL, Fan QX, Zhao PR. [Construction and expression of human stathmin gene eukaryotic expression vector and its effect on esophageal cancer cells] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2008; 30: 179-183
 - 25 Bièche I, Lachkar S, Becette V, Cifuentes-Diaz C, Sobel A, Lidereau R, Curmi PA. Overexpression of the stathmin gene in a subset of human breast cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 701-709
 - 26 Alli E, Bash-Babula J, Yang JM, Hait WN. Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 6864-6869
 - 27 Chen G, Wang H, Gharib TG, Huang CC, Thomas DG, Shedden KA, Kuick R, Taylor JM, Kardias SL, Misek DE, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Overexpression of oncoprotein 18 correlates with poor differentiation in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2003; 2: 107-116
 - 28 Xi W, Rui W, Fang L, Ke D, Ping G, Hui-Zhong Z. Expression of stathmin/op18 as a significant prognostic factor for cervical carcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 837-846
 - 29 Su D, Smith SM, Preti M, Schwartz P, Rutherford TJ, Menato G, Danese S, Ma S, Yu H, Katsaros D. Stathmin and tubulin expression and survival of ovarian cancer patients receiving platinum treatment with and without paclitaxel. *Cancer* 2009; 115: 2453-2463
 - 30 Sadow PM, Rumilla KM, Erickson LA, Lloyd RV. Stathmin expression in pheochromocytomas, paragangliomas, and in other endocrine tumors. *Endocr Pathol* 2008; 19: 97-103
 - 31 Björklund P, Cupisti K, Fryknäs M, Isaksson A, Willenberg HS, Akerström G, Hellman P, Westin G. Stathmin as a marker for malignancy in pheochromocytomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010; 118: 27-30
 - 32 Zhang X, Cao H, Gao D. [The expression stathmin gene in laryngeal squamous cell carcinoma] *Lin Chung Erbi Yanhou Toujing Waike Zazhi* 2009; 23: 872-873, 877
 - 33 Kuo MF, Wang HS, Kuo QT, Shun CT, Hsu HC, Yang SH, Yuan RH. High expression of stathmin protein predicts a fulminant course in medulloblastoma. *J Neurosurg Pediatr* 2009; 4: 74-80
 - 34 Wang R, Dong K, Lin F, Wang X, Gao P, Wei SH, Cheng SY, Zhang HZ. Inhibiting proliferation and enhancing chemosensitivity to taxanes in osteosarcoma cells by RNA interference-mediated downregulation of stathmin expression. *Mol Med* 2007; 13: 567-575
 - 35 Iancu C, Mistry SJ, Arkin S, Atweh GF. Taxol and anti-stathmin therapy: a synergistic combination that targets the mitotic spindle. *Cancer Res* 2000; 60: 3537-3541

编辑 王天奇 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

蛋白酶激活受体2激动剂对食管癌EC109细胞侵袭转移的促进作用

周静, 谢立群, 李轩, 陈小义, 陈莉, 郑艳敏, 李飞

周静, 谢立群, 李轩, 郑艳敏, 武警医学院附属医院消化内科 天津市 300162

陈小义, 陈莉, 武警医学院细胞生物学教研室 天津市 300162
李飞, 武警新疆兵团指挥部医院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830063

周静, 河北医科大学在读硕士, 主要从事胃食管反流病及食管癌的相关研究。

作者贡献分布: 此课题由周静和谢立群设计; 研究过程由周静、李轩及李飞操作完成; 研究所用试剂及分析工具由谢立群、陈小义及陈莉提供; 数据分析由周静与郑艳敏完成; 本论文写作由周静完成。

通讯作者: 谢立群, 教授, 300162, 天津市, 武警医学院附属医院消化内科. xieliqu66@hotmail.com

电话: 022-60578763

收稿日期: 2010-01-25 修回日期: 2010-04-15

接受日期: 2010-04-20 在线出版日期: 2010-05-08

Protease-activated receptor-2 agonists promote cell invasion and metastasis in human esophageal cancer cell line EC109

Jing Zhou, Li-Qun Xie, Xuan Li, Xiao-Yi Chen, Li Chen, Yan-Min Zheng, Fei Li

Jing Zhou, Li-Qun Xie, Xuan Li, Yan-Min Zheng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of the Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Xiao-Yi Chen, Li Chen, Department of Cell Biology, Medical College of the Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Fei Li, Xinjiang Production and Construction Corps Hospital of the Chinese People's Armed Police Forces, Urumqi 830062, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Professor Li-Qun Xie, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of CAPF, Tianjin 300162, China. xieliqu66@hotmail.com

Received: 2010-01-25 Revised: 2010-04-15

Accepted: 2010-04-20 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To determine the expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in human esophageal cell line EC109, and to evaluate the effects of PAR-2 activation on cell invasion and migration.

METHODS: The expression of PAR-2 protein and mRNA in EC109 cells was determined by

immunocytochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. Methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay, cell invasion and migration assay, semi-quantitative PCR and zymographic analysis were performed to examine whether endogenous PAR-2 activator trypsin and PAR-2 activating-peptide SLIGKV could alter cell proliferation, invasion, migration, and matrix metalloproteinase (MMP) production.

RESULTS: Both PAR-2 mRNA and protein were expressed in EC109 cells. PAR-2 mRNA was up-regulated in cells treated with trypsin or PAR-2-activating peptide SLIGKV (0.781 ± 0.045 and 0.653 ± 0.029 vs 0.491 ± 0.032 , both $P < 0.01$), but not in those treated with control peptide VKGILS ($P > 0.05$). Trypsin and SLIGKV promoted the proliferation of EC109 cells in a dose- and time-dependent manner. No significant difference was noted in cell proliferation between untreated cells and cells treated with control peptide VKGILS. Treatment with trypsin or SLIGKV significantly increased the number of EC109 cells that passed through the Millicell inserts in the migration assay (72.5 ± 9.2 vs 31.6 ± 6.6 , and 59.4 ± 8.7 vs 36.2 ± 9.8 , both $P < 0.01$). Compared with untreated cells and cell treated with control peptide, trypsin and SLIGKV significantly increased the mRNA expression (0.719 ± 0.034 vs 0.341 ± 0.032 , and 0.466 ± 0.042 vs 0.370 ± 0.021 , both $P < 0.01$) and gelatinolytic activity (75.6 ± 6.1 vs 44.9 ± 4.2 , and 60.4 ± 4.6 vs 39.3 ± 5.2 , both $P < 0.01$) of MMP-9.

CONCLUSION: PAR-2 is expressed in EC109 cells. PAR-2 activation may be able to promote the invasion and metastasis of human esophageal carcinoma cells by stimulating MMP-9 production.

Key Words: Protease activated receptor-2; Trypsin; Esophageal carcinoma; Invasion and migration

Zhou J, Xie LQ, Li X, Chen XY, Chen L, Zheng YM, Li F. Protease-activated receptor-2 agonists regulates cell

■背景资料

蛋白酶激活受体-2(PAR-2)是一种细胞膜表面受体,属于与G蛋白相耦联的蛋白酶激活受体超家族成员,广泛分布于各个系统和组织中。大量研究表明,PAR-2在多种消化系统肿瘤及其微环境中都有表达,与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关。

■同行评议者

杨建民, 教授, 浙江省人民医院消化内科

■研究前沿

食管癌侵袭转移是影响患者预后的主要因素。PAR-2在食管癌组织中表达,且表达部位主要分布于食管腔内,可被十二指肠胃食管反流液中的胰蛋白酶激活发挥生物学效应。因此,研究PAR-2在食管癌细胞增殖、侵袭转移中的作用对阐明食管癌发生、发展机制作用重大。

invasion and metastasis in human esophageal cancer cells EC109. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(13): 1313-1319

摘要

目的: 探讨人食管癌细胞株EC109蛋白酶激活受体-2(PAR-2)的表达,以及内源性PAR-2激动剂胰蛋白酶和PAR-2激动肽SLIGKV对该细胞侵袭转移的影响及其可能的分子机制。

方法: 采用RT-PCR法和免疫细胞化学染色法检测EC109细胞中PAR-2 mRNA及蛋白的表达情况;胰蛋白酶和SLIGKV对细胞施加干预后,MTT法检测细胞增殖情况,Transwell小室法检测细胞侵袭和迁移能力的变化,RT-PCR法检测PAR-2、MMP-2/MMP-9 mRNA表达的变化,明胶酶谱法检测MMP-2、MMP-9明胶酶活性的变化。

结果: 食管癌细胞EC109在胰蛋白酶和SLIGKV刺激后,PAR-2 mRNA表达较对照组显著上调(0.781 ± 0.045 、 0.653 ± 0.029 vs 0.491 ± 0.032 , 均 $P < 0.01$);胰蛋白酶在1-10 nmol/L、SLIGKV在1-50 $\mu\text{mol/L}$ 时可促进细胞增殖($P < 0.01$ 或 0.05),呈剂量依赖性;Transwell小室实验中胰蛋白酶组及SLIGKV组的细胞侵袭和迁移能力显著高于对照组及反肽组(72.5 ± 9.2 、 59.4 ± 8.7 vs 31.6 ± 6.6 、 36.2 ± 9.8 , 均 $P < 0.01$);胰蛋白酶及PAR-2激动肽作用后细胞MMP-9 mRNA的表达量明显高于对照组及反激动肽组(0.719 ± 0.034 、 0.466 ± 0.042 vs 0.341 ± 0.032 、 0.370 ± 0.021 , 均 $P < 0.01$),细胞水解明胶的能力也明显高于对照组及反激动肽组(75.6 ± 6.1 、 60.4 ± 4.6 vs 44.9 ± 4.2 、 39.3 ± 5.2 , 均 $P < 0.01$)。而对MMP-2的mRNA表达和水解明胶的能力无明显影响($P > 0.05$)。

结论: 食管癌EC109细胞表达PAR-2受体,且内源性PAR-2激动剂胰蛋白酶和PAR-2激动肽SLIGKV可能通过激活PAR-2受体上调MMP-9表达,进而促进食管癌细胞侵袭转移。

关键词: 蛋白酶激活受体2; 胰蛋白酶; 食管癌; 侵袭转移

周静, 谢立群, 李轩, 陈小义, 陈莉, 郑艳敏, 李飞. 蛋白酶激活受体2激动剂对食管癌EC109细胞侵袭转移的促进. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1313-1319

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1313.asp>

0 引言

食管癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,进展

较快,易发生淋巴结转移,预后较差,这与其高度的恶性生物学行为有关。其中侵袭和转移是癌细胞最具特征性的生物学恶性特点,与预后密切相关。因此进一步研究食管癌细胞侵袭转移的潜在分子机制对寻找新的治疗方法具有重要意义。蛋白酶激活受体-2(proteinase-activated receptors 2, PAR-2)是细胞膜上的一种G蛋白偶联受体,胰蛋白酶是该受体的天然激动剂,PAR-2在多种消化系肿瘤中都有表达,且强度高于正常组织细胞,与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关。已有研究表明食管癌组织表达PAR-2受体^[1],然而关于PAR-2受体及其内源性激动剂胰蛋白酶是否参与食管癌侵袭转移的机制目前尚未见报道。本研究中,我们体外培养人食管癌细胞株EC109,通过RT-PCR和免疫细胞化学的方法研究了EC109细胞中PAR-2受体的表达水平,以及PAR-2受体活化对EC109细胞侵袭转移的影响,为新型抗癌药物的开发及治疗提供了一定的实验依据及理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 优质胎牛血清购自中国医学科学院天津血液学研究所;RPMI 1640培养基购自Gibco公司;胎牛血清(FBS)购自中国医学科学院天津血液学研究所;PAR-2多克隆抗体购自Santa Cruz公司;链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)免疫组织化学试剂盒、DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司;TRIzol购自Invitrogen公司;PCR marker、RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司;PAR-2激动剂(SLIGKV)和反PAR-2激动肽(VLGILS)均由美联(西安)生物科技有限公司合成;Matrigel胶购自BD Biosciences公司、Transwell小室购自Millipore公司、PAR-2、MMP-2、MMP-9,引物均合成自Invitrogen生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组: 选用含100 mL/L FBS的RPMI 1640完全培养基,置于37 °C、50 mL/L CO₂的孵箱(相对湿度为95%)中培养。待细胞长满培养瓶底部70%-80%时,用0.25%胰蛋白酶:0.03% EDTA(1:1)消化传代,取对数生长期细胞用于实验。MTT实验,设对照组(以培养基代替药物)、胰蛋白酶组(浓度分别为0.1, 1, 10, 100 nmol/L)、SLIGKV组(浓度分别为5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)、VKGILS-NH₂组(浓度分别为5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)。RT-PCR、Western blot、细胞迁移

和侵袭实验、明胶酶谱实验分组为对照组、胰蛋白酶组(10 nmol/L)、SLIGKV组(50 μ mol/L)、VKGILS-NH₂组(50 μ mol/L). 加药前应换无血清RPMI 1640培养液培养24 h使细胞周期同步化.

1.2.2 免疫细胞化学检测PAR-2的蛋白表达: 在预先放有盖玻片的6孔板中每孔接种 1.0×10^5 个细胞, 37 $^{\circ}$ C培养24 h, 细胞融合达60%左右, 取出盖玻片, 用预冷的1:1混合的甲醇:丙酮固定, 3%过氧化氢去除内源性过氧化氢酶的作用, 正常山羊血清封闭液室温封闭10 min, 滴加1:100稀释的羊抗PAR-2多克隆抗体(阴性对照加PBS), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 滴加生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育10 min, 滴加辣根酶标记的链霉卵白素37 $^{\circ}$ C孵育10 min, DAB显色, 苏木素复染, 封片并在显微镜下观察照相.

1.2.3 RT-PCR: 采用TRIzol试剂从EC109细胞中提取总RNA, 并检测RNA的含量和纯度(A_{260}/A_{280} 为1.8-2.0). 以1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性(28S和18S RNA条带比值 ≥ 2.0). 用1 μ g细胞总RNA进行逆转录, 条件如下: 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min. 应用Omiga2.0设计PAR-2的引物序列, 内参照 β -actin, 引物序列如下: PAR-2(FP: 5'-AGA AGC CTT ATT GGT AAG GTT-3', RP: 5'-AAC ATC ATG ACA GGT CGT GAT-3', 扩增片段为582 bp); MMP-2(FP: 5'-CAG GCT CTT CTC CTT TCA CAA C-3', RP: 5'-AAG CCA CGG CTT GGT TTT CCT C-3', 扩增片段为398 bp); MMP-9(FP: 5'-TCC CCT ACG TCA CCT ATG ACA T-3', RP: 5'-GCC CAG CCC ACC TCC ACT CCT C-3', 扩增片段为172 bp); β -actin(FP: 5'-TGT TTG AGA CCT TCA ACA CCC-3', RP: 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AGG-3', 扩增片段为540 bp). PCR反应条件如下: PAR-2: 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 51 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 30个循环扩增. MMP-2: 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 30个循环扩增. MMP-9: 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 61 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 30个循环扩增. β -actin: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 30个循环扩增. PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳, 结果用凝胶自动成像系统扫描, 并以 β -actin校正作相对量分析, 数值以两者吸光度的比值表示.

1.2.4 MTT实验: 将细胞悬液以 6×10^4 /mL的密度接种在96孔板中, 37 $^{\circ}$ C培养24 h后更换无血清培养液继续培养24 h, 按分组加药, 每组设8个复孔, 继续培养48 h后每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μ L,

继续培养4 h, 中止培养, 弃培养基, 每孔加入150 μ L DMSO, 室温振荡混匀30 min, 使结晶物成分的溶解, 选择490 nm波长, 在酶标仪上测定各孔的A值并记录结果. 并重复进行3次实验.

1.2.5 细胞迁移和侵袭试验: Albini等^[2]设计的侵袭小室试验是体外检测肿瘤细胞侵袭能力的经典方法, 在体外较理想地模拟了侵袭和转移的过程. 其结果综合反映了肿瘤细胞的运动迁移能力和对细胞外基质的降解能力. 本试验对原试验进行了改良. 细胞迁移试验, 对数生长期EC109细胞无血清RPMI 1640培养液饥饿24 h, 0.04% EDTA消化液消化, 无血清RPMI 1640培养基悬浮成单细胞悬液, 调整细胞浓度至 2.5×10^5 /mL, 台盼蓝染色检测细胞活力95%以上. 每个millicell侵袭小室上室中加入细胞悬液0.2 mL, 同时按实验分组加药, 每加药组设3个复孔, 在侵袭小室的下室加入含10%小牛血清的细胞培养液RPMI 1640, 每孔600 μ L, 培养箱中培养24 h, 取下微孔膜, 用棉球擦尽未过膜细胞后, 甲醇固定和苏木精染色. 显微镜下观察穿过膜的细胞数, 计数中间及四周5个高倍(400倍)镜下视野细胞数, 计算平均数. 细胞侵袭试验, 提前在4 $^{\circ}$ C融解Matrigel基质胶, 每个聚碳酸酯微孔膜表面铺以40 μ L稀释的Matrigel胶(matrigel与无血清培养基之比为1:4), 放入培养箱中4 h凝固备用, 接种细胞浓度调整至 1.0×10^5 /mL, 其余操作同迁徙试验.

1.2.6 明胶酶谱测定MMP-2、MMP-9酶的活性变化: 用蛋白提取液[50 mmol/L Tris (pH8.0), 1% NP-40, 0.1%十二醇硫酸钠, 0.02%叠氮钠, 150 mmol/L氯化钠和0.5%苯甲基磺酰氟]提取细胞总蛋白, 并通过BCA蛋白定量试剂盒说明测定并调整样本蛋白含量, 非还原性的10% PAGE凝胶(含1.0 g/L明胶)电泳. 室温下在洗脱液(2.5% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L CaCl₂, 1 μ mol/L ZnCl₂, pH7.0)中振荡3次, 每次15 min, 然后在37 $^{\circ}$ C明胶酶缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH7.4; 200 mmol/L NaCl; 5 mmol/L CaCl₂)中孵育过夜. 室温下在含1.0 g/L考马斯亮蓝的固定液中(乙酸: 甲醇: 水的浓度为1:4:5)固定、染色各30 min; 再用不含考马斯亮蓝的固定液脱色至出现清晰透亮条带. 蛋白酶的活性部位为透亮条带. 结果用凝胶自动成像系统读取条带面积, 宽度和灰度值, 并以底部蛋白深染色条带作相对量分析, 数值以两者比值表示.

统计学处理 用SPSS11.0软件处理. 样本均

■相关报道

本课题组前期研究表明, PAR-2可促进肝癌细胞HepG2增殖, 其促增殖作用与ERK/AP-1途径有关; 并能促进该细胞的侵袭转移, 其具体机制与促进细胞黏附有关.

■创新盘点

本课题采用人食管癌细胞株 EC109 为靶细胞, 观察该细胞中 PAR-2 的表达情况; 研究内源性 PAR-2 激动剂胰蛋白酶和人工 PAR-2 激动肽 SLIGKV 对该细胞增殖、侵袭转移的影响; 以及胰蛋白酶及 PAR-2 激动肽作用前后 MMP-2、MMP-9 表达的改变, 探讨 PAR-2 受体介导的食管癌细胞增殖及侵袭转移的可能分子机制。

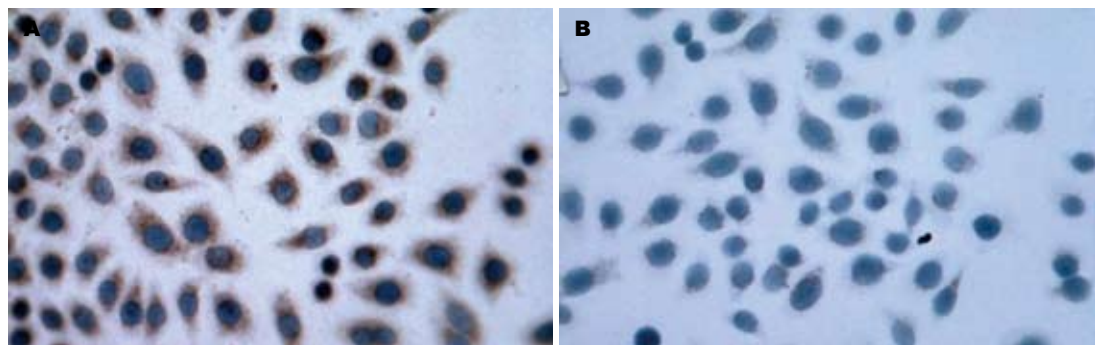


图1 免疫细胞化学染色检测EC109细胞中PAR-2的表达($\times 400$)。A: PAR-2在EC109细胞呈阳性表达; B: 阴性对照。

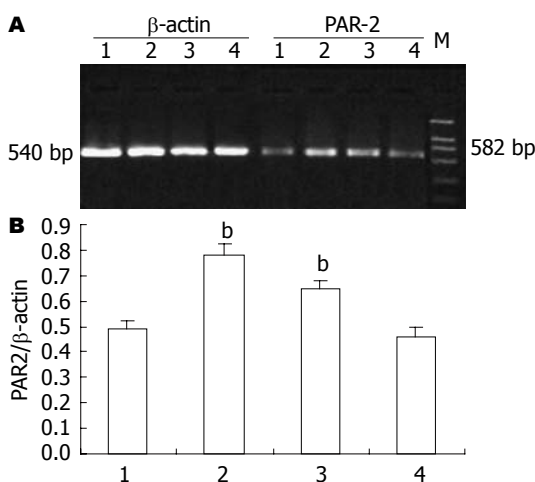


图2 RT-PCR检测EC109细胞中PAR-2 mRNA的表达。A: EC109细胞中PAR-2 mRNA的表达; B: PAR-2 mRNA的表达分析。1: 对照组; 2: 10 nmol/L胰蛋白酶处理18 h; 3: 50 μ mol/L SLIGKV处理18 h; 4: 50 μ mol/L VKGILS处理18 h。^b $P < 0.01$ vs 对照组。

数的比较采用方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测PAR-2蛋白的表达 EC109细胞与抗PAR-2多克隆抗体有很强的结合反应, PAR-2蛋白表现为棕黄色, 着色主要在胞膜和胞质中, 而阴性对照组细胞胞膜、胞质不着色。说明EC109细胞在蛋白水平表达PAR-2(图1)。

2.2 RT-PCR检测PAR-2的mRNA表达 结果显示EC109细胞在基因水平有PAR-2 mRNA的表达。10 nmol/L胰蛋白酶、50 μ mol/L SLIGKV处理细胞后, PAR-2 mRNA表达量分别为 0.781 ± 0.045 、 0.653 ± 0.029 (以 β -actin为参照的相对灰度)与对照组(0.491 ± 0.032)相比显著增高($P < 0.05$)。而50 μ mol/L VKGILS组PAR-2 mRNA表达量为 0.463 ± 0.036 , 与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$, 图2)。说明SLIGKV和胰蛋白

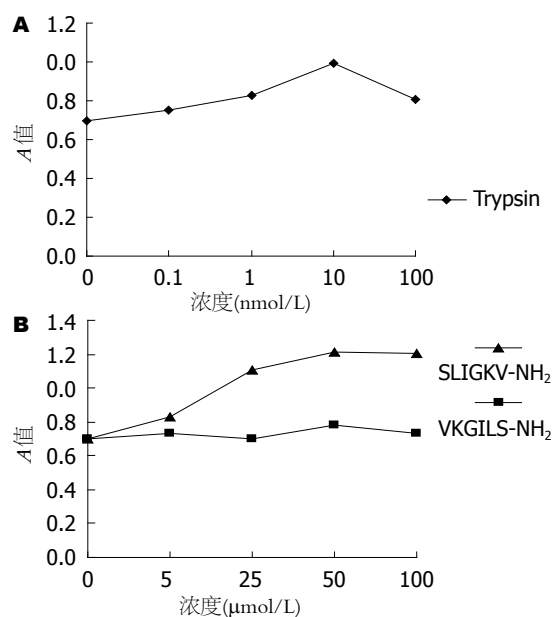


图3 MTT法检测胰蛋白酶、SLIGKV及VKGILS对EC109细胞增殖的影响。

酶可上调EC109细胞PAR-2 mRNA的表达, 而VKGILS无此作用。

2.3 MTT实验 结果显示SLIGKV在1-50 μ mol/L、胰蛋白酶在1-10 nmol/L时均能促进食管癌细胞EC109的增殖, 呈浓度依赖性($P < 0.05$)。而SLIGKV和胰蛋白酶的加药浓度分别达到100 μ mol/L和100 nmol/L时, 食管癌细胞增殖能力分别较SLIGKV在50 μ mol/L、胰蛋白酶在10 nmol/L时有所下降($P < 0.05$)。而1-100 μ mol/L VKGILS对细胞增殖能力的影响不明显, 与对照组相比无显著意义($P > 0.05$, 图3)。说明适当浓度的SLIGKV和胰蛋白酶可促进食管癌细胞EC109的增殖。

2.4 细胞侵袭迁移试验 肿瘤的转移包括肿瘤侵袭生长和细胞脱落进入循环流动, 与脉管内皮或组织基质黏附, 通过组织和间隙变形移动, 降解破坏细胞间质和定植生长等主要过程。我们发现10 nmol/L胰蛋白酶和50 μ mol/L SLIGKV

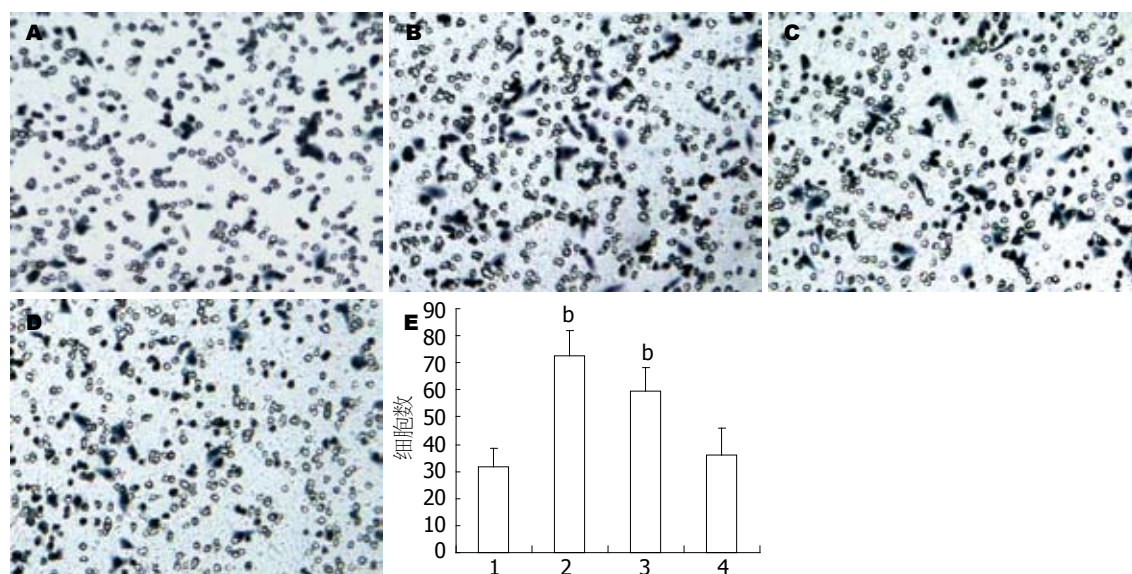


图4 Transwell小室法检测胰蛋白酶、SLIGKV和VLGILS对EC109细胞迁移与侵袭的影响(倒置显微镜×200). A, 1: 对照组; B, 2: 10 nmol/L胰蛋白酶组; C, 3: 50 μmol/L SLIGKV组; D, 4: 50 μmol/L VLGILS组. ^b*P*<0.01 vs 对照组.

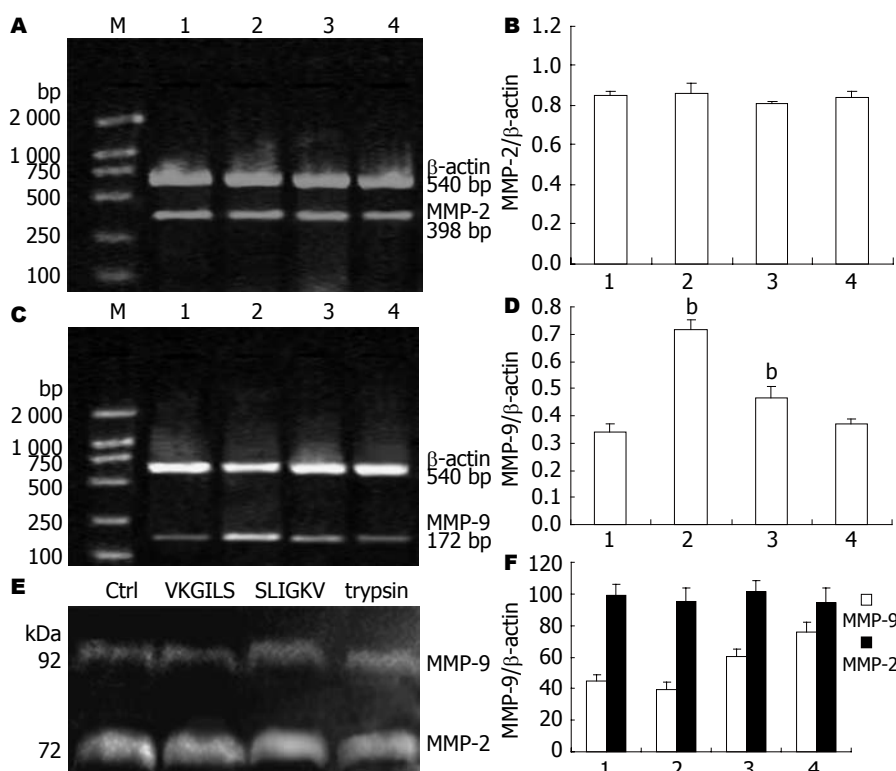


图5 胰蛋白酶、SLIGKV及VLGILS对MMP-2、MMP-9表达的影响. A: RT-PCR检测MMP-2 mRNA表达的变化; C: RT-PCR检测MMP-2 mRNA表达的变化; E: 明胶酶谱法检测MMP-2、MMP-9酶活性的变化; 1: 对照组; 2: 10 nmol/L胰蛋白酶组; 3: 50 μmol/L SLIGKV组; 4: 50 μmol/L VLGILS组. ^b*P*<0.01 vs 对照组.

作用24 h后, EC109细胞侵袭迁移破坏能力比对照组明显增强(图4A). 图4B显示侵袭迁移的定量数据, 在细胞侵袭迁移试验中, 胰蛋白酶组和SLIGKV组作用24 h后, EC109细胞发挥破坏Matrigel基质胶作用, 进入微孔膜内的细胞数也高于对照组与VLGILS组(72.5 ± 9.2 、 59.4 ± 8.7 vs 31.6 ± 6.6 、 36.2 ± 9.8 , *P*<0.01).

2.5 MMP-2、MMP-9的mRNA表达和酶活性的变化 10 nmol/L胰蛋白酶和50 μmol/L SLIGKV作

用后可明显上调EC109细胞MMP-9的基因表达和酶的活性, 而对MMP-2的基因表达和酶的活性无上调作用(图5A、C、E). 图5B、D、F分别显示MMP-2、MMP-9 mRNA表达和酶活性的定量数据: RT-PCR结果显示10 nmol/L胰蛋白酶、50 μmol/L SLIGKV处理细胞后, MMP-9的mRNA表达量(以β-actin为参照的相对灰度)明显高于对照组与VLGILS组(0.719 ± 0.034 、 0.466 ± 0.042 vs 0.34 ± 0.032 、 0.370 ± 0.021), 且差异有统计学

应用要点

本课题观察到PAR-2激活后对食管癌细胞增殖、侵袭转移产生强烈的刺激作用. 这些研究工作为阐明食管癌发生、发展机制提供新的理论依据.

■同行评价

本研究选题较好,设计合理,具有一定的学术价值。

意义($P<0.01$, 图5D), 而MMP-2的mRNA表达量与其他两组相比, 差别无统计学意义($P>0.05$)(图5B)。明胶酶谱结果显示10 nmol/L胰蛋白酶组和50 μ mol/L SLIGKV组MMP-9酶的活性明显高于对照组与VLGILS组(75.6 ± 6.1 、 60.4 ± 4.6 vs 44.9 ± 4.2 、 39.3 ± 5.2), 且差异有统计学意义($P<0.01$), 而MMP-2酶的活性没有显著变化(图5F)。

3 讨论

PAR-2是一种细胞膜表面受体, 属于与G蛋白相耦联的蛋白酶激活受体超家族成员^[3], 广泛分布于各个组织和系统中, 胰蛋白酶、类胰蛋白酶、凝血因子和其他未知蛋白水解酶均为该受体的天然激动剂, 人工合成的小分子多肽SLIGKV通过模仿PAR-2受体的配体区域也可激活该受体^[4,6]。PAR-2在胃、胰腺、结肠等多种消化系肿瘤中都有表达, 且强度高于正常组织细胞, 与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关^[7-9]。已有研究表明, PAR-2在食管癌组织中表达, 但表达强度与正常食管相比无显著差异^[1], 这与PAR-2在其他消化系肿瘤中表达上调的研究不一致, 尚需进一步研究。

胰蛋白酶属于基质丝氨酸蛋白酶(matrix serine proteases, MSPs)家族成员之一, 表达于胃、结肠等多种消化系肿瘤细胞中, 与肿瘤的增殖和侵袭转移密切相关。胰蛋白酶是PAR-2受体的天然激动剂。胃肠道消化液中的胰蛋白酶常随生理/病理情况下的胃食管反流作用于正常食管或食管肿瘤部位, 可引起食管黏膜急性损伤和炎症^[10,11], 然而关于其是否参与了食管肿瘤发生与发展过程的研究, 目前尚未见相关报道。

本研究中我们通过RT-PCR和免疫细胞化学的方法证明食管癌细胞EC109在基因和蛋白水平表达PAR-2受体, 这和前人的研究相一致^[1]; 实验中我们用胰蛋白酶和人工合成的PAR-2激动肽SLIGKV作用于EC109细胞发现胰蛋白酶和SLIGKV可上调PAR-2 mRNA的表达, 并促进该细胞增殖。而反PAR-2激动肽VKGILS相对分子质量和氨基酸组成与SLIGKV完全相同, 只是氨基酸顺序不同, 不能模仿PAR-2的配体区域活化PAR-2受体, 在相同实验条件下不能上调PAR-2 mRNA的表达。这一结果与胰蛋白酶和PAR-2激动剂在一些其他肿瘤细胞中的作用类似^[7,9], 提示胰蛋白酶和PAR-2激动肽SLIGKV可活化PAR-2受体并上调其表达, 并可能发挥一些生物学效应。胰蛋白酶和PAR-2激动肽上调PAR-2 mRNA表达的原因可能是由于PAR-2激活后出

现脱敏和水解, 导致机体反馈性上调受体PAR-2 mRNA的表达。

侵袭和转移是恶性肿瘤最重要的特征之一, 也是肿瘤治疗失败的主要原因。因此, 判断肿瘤的侵袭和转移能力尤为重要。肿瘤细胞侵袭能力的增加有利于破坏肿瘤细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 促进肿瘤的转移, 有助于促进新生淋巴管和血管的形成, 为肿瘤的远处转移创造有利条件; 肿瘤细胞迁移能力的增强有利于肿瘤细胞更快穿过组织和内皮间隙, 与内皮基质结合, 为转移肿瘤团块的最终形成创造有利条件。本研究中我们通过Tanswell小室法发现, PAR-2激活肽和胰蛋白酶可提高食管癌EC109细胞侵袭和迁移的能力, 表明PAR-2受体的活化与食管癌细胞侵袭转移密切相关, 并可能是食管癌侵袭转移过程中的重要环节。且结果显示胰蛋白酶组比SLIGKV组肿瘤细胞的侵袭迁移能力更强, 提示胰蛋白酶还可能通过其他途径促进肿瘤侵袭转移。胰蛋白酶促进侵袭转移的途径还有: (1)可直接降解肿瘤细胞的胞外蛋白, 攻击基底膜的I型胶原; (2)可激活其他蛋白水解级联反应, 包括激活丝氨酸蛋白酶和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases MMPs), 后者被证明是肿瘤侵袭转移最重要的酶类之一^[12]。

MMPs是一类具有 Zn^{2+} 依赖性的内源性蛋白水解酶, 是人体内降解ECM的主要酶类, 与肿瘤侵袭和转移密切相关。MMPs参与肿瘤侵袭转移的机制主要有: (1)破坏肿瘤侵袭的组织学屏障; (2)促进新生血管的形成; (3)调节肿瘤细胞与基质的黏附; (4)激活具有潜在活性的蛋白质。近年来的研究结果提示, MMPs是胰蛋白酶和PAR-2介导肿瘤侵袭转移的主要通路。首先, 胰蛋白酶可通过激活MMPs, 促进多种肿瘤细胞的侵袭转移; 其次, PAR-2的活化可引起结肠癌细胞分泌MMPs, 促进转录生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)释放, 介导表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)的激活和磷酸化, 活化细胞外信号调节激酶ERK1/2, 促进结肠癌细胞增殖和侵袭转移^[9,12-14]。大量研究证实, MMP-2和MMP-9是降解型胶原最主要的酶, 其在肿瘤的新生血管形成、肿瘤细胞的浸润和转移灶的形成过程中均起重要作用^[15], 是多种癌症的表型特征和重要预后标志。胰腺癌细胞中, 胰蛋白酶可上调MMP-2表达, 促进TGF- β 的释放, 进而促进VEGF分泌^[16]; 而舌鳞

状上皮癌细胞中TAT-2可通过上调MMP-9表达促进肿瘤侵袭^[17]; 除此之外, 鼻咽癌中的PAR-2可通过上调MMP-9表达, 介导肿瘤血管生成和淋巴转移。而本研究中我们通过RT-PCR和明胶酶谱法发现, 胰蛋白酶和PAR-2激动肽SLIGKV可上调食管癌EC109细胞MMP-9的mRNA表达, 增强MMP-9水解明胶的能力, 而对MMP-2的基因表达和酶的活性无影响。这和上述研究的结果基本一致。提示, 食管癌中胰蛋白酶及PAR-2激动肽可能通过激活PAR-2受体促进MMP-9的合成和分泌, 促进ECM降解或激活相关的信号传导通路最终参与食管癌细胞侵袭转移过程。

总之, PAR-2仍然是目前肿瘤研究中的一个热点, PAR-2的动态表达与肿瘤侵袭转移的关系及相关信号转导途径等都值得深入研究。PAR-2/MMPs途径在食管癌增殖及侵袭转移过程中发挥重要作用。该途径可能成为防治食管癌的重要靶点。

4 参考文献

- Ribeiro FS, Simão TA, Amoêdo ND, Andreollo NA, Lopes LR, Acatauassu R, Rumjanek FD, Albano RM, Pinto LF, Monteiro RQ. Evidence for increased expression of tissue factor and protease-activated receptor-1 in human esophageal cancer. *Oncol Rep* 2009; 21: 1599-1604
- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987; 47: 3239-3245
- Jiang R, Zatta A, Kin H, Wang N, Reeves JG, Mykytenko J, Deneve J, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J. PAR-2 activation at the time of reperfusion salvages myocardium via an ERK1/2 pathway in in vivo rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2845-H2852
- Al-Ani B, Hansen KK, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptor-2: key role of amino-terminal dipeptide residues of the tethered ligand for receptor activation. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 149-156
- Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2 (PAR2) agonist causes periodontitis in rats. *J Dent Res* 2005; 84: 154-159
- Kirkland JG, Cottrell GS, Bunnett NW, Corvera CU. Agonists of protease-activated receptors 1 and 2 stimulate electrolyte secretion from mouse gallbladder. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G335-G346
- Caruso R, Pallone F, Fina D, Gioia V, Peluso I, Caprioli F, Stolfi C, Perfetti A, Spagnoli LG, Palmieri G, Macdonald TT, Monteleone G. Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor transactivation and proliferation. *Am J Pathol* 2006; 169: 268-278
- Shimamoto R, Sawada T, Uchima Y, Inoue M, Kimura K, Yamashita Y, Yamada N, Nishihara T, Ohira M, Hirakawa K. A role for protease-activated receptor-2 in pancreatic cancer cell proliferation. *Int J Oncol* 2004; 24: 1401-1406
- Darmoul D, Marie JC, Devaud H, Gratio V, Laburthe M. Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2. *Br J Cancer* 2001; 85: 772-779
- Naito Y, Uchiyama K, Kuroda M, Takagi T, Kokura S, Yoshida N, Ichikawa H, Yoshikawa T. Role of pancreatic trypsin in chronic esophagitis induced by gastroduodenal reflux in rats. *J Gastroenterol* 2006; 41: 198-208
- Kono K, Takahashi A, Sugai H, Umekawa T, Yano T, Kamiyasu K, Teramatsu M, Fujii H. Oral trypsin inhibitor can improve reflux esophagitis after distal gastrectomy concomitant with decreased trypsin activity. *Am J Surg* 2005; 190: 412-417
- Moilanen M, Sorsa T, Stenman M, Nyberg P, Lindy O, Vesterinen J, Paju A, Kontinen YT, Stenman UH, Salo T. Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *Biochemistry* 2003; 42: 5414-5420
- Zeng ZS, Shu WP, Cohen AM, Guillem JG. Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 144-148
- Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Laburthe M. Protease-activated receptor 2 in colon cancer: trypsin-induced MAPK phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 2004; 279: 20927-20934
- Tack J. Review article: role of pepsin and bile in gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 1: 48-54
- Uchima Y, Sawada T, Hirakawa K. Action of antiproteases on pancreatic cancer cells. *JOP* 2007; 8: 479-487
- Li Z, Bian LJ, Li Y, Liang YJ, Liang HZ. Expression of protease-activated receptor-2 (PAR-2) in patients with nasopharyngeal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognosis. *Pathol Res Pract* 2009; 205: 542-550

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

TLR2、TLR4和TLR9在慢性重型肝炎患者及肝衰竭大鼠中的表达

陈煜, 时红波, 张帆, 丁美, 赵军, 刘旭华, 段钟平

■背景资料

Toll样受体(TLRs)是近年来发现的在宿主抗病原微生物的免疫应答中起重要作用的细胞表面受体分子。他们不仅在天然免疫应答中识别病原微生物的病原相关分子模式(PAMPs), 激活先天性免疫应答, 还引起细胞因子的释放, 上调共刺激分子的表达, 为获得性免疫的启动提供必要的活化信号。肝脏中的TLRs通过门静脉能够接触到大量病原体成分, 通过信号转导广泛参与肝脏的生理病理过程。

陈煜, 时红波, 丁美, 赵军, 刘旭华, 段钟平, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 北京市 100069

张帆, 河南科技大学第三附属医院 河南省洛阳市 471003
“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项

(十一五)基金资助项目, No. 2008ZX10002-005-3
国家重点基础研究发展计划(973)基金资助项目, No.

2007CB512801

国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目, No. 2006AA02A410

国家自然科学基金资助项目, No. 30800517

作者贡献分布: 此课题由段钟平与陈煜设计; 研究过程由时红波、丁美及赵军操作完成; 研究所用试剂由张帆提供; 研究所用标本由刘旭华提供; 数据分析由时红波完成; 本论文写作由陈煜与时红波完成。

通讯作者: 段钟平, 教授, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心. duan2517@163.com

电话: 010-63291007

收稿日期: 2010-01-22 修回日期: 2010-04-16

接受日期: 2010-04-20 在线出版日期: 2010-05-08

Expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in patients with chronic severe hepatitis and rats with liver failure

Yu Chen, Hong-Bo Shi, Fan Zhang, Mei Ding,
Jun Zhao, Xu-Hua Liu, Zhong-Ping Duan

Yu Chen, Hong-Bo Shi, Mei Ding, Jun Zhao, Xu-Hua Liu, Zhong-Ping Duan, Artificial Liver Center, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
Fan Zhang, the Third Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China

Supported by: the National Science and Technology Project on Prevention of AIDS and Virus Hepatitis of China, No. 2008ZX10002-005-3; the National Basic Research Program of China, No. 2007CB512801; the National High Technology Research and Development Program of China, No. 2006AA02A410; and National Natural Science Foundation of China, No. 30800517

Correspondence to: Professor Zhong-Ping Duan, Artificial Liver Center, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China. duan2517@163.com

Received: 2010-01-22 Revised: 2010-04-16

Accepted: 2010-04-20 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To explore the pathogenesis of severe hepatitis and hepatic failure by investigating the expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4 and TLR9 in patients with chronic severe

hepatitis and rats with hepatic failure.

METHODS: The expression of TLR2, TLR4 and TLR9 was detected by immunohistochemistry in liver tissue and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with severe hepatitis, chronic hepatitis B and liver cirrhosis, and normal controls. The expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in liver tissue of rats with acute hepatic failure and chronic-on-acute hepatic failure, and normal rats was also detected by immunohistochemistry. Rat colon tissue was used as positive controls.

RESULTS: The hepatic expression of TLR2 and TLR9 was not detected in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis and normal controls, but in patients with severe hepatitis. The expression of TLR2 and TLR9 was not detected in PBMC of patients with chronic hepatitis B and normal controls, but in patients with severe hepatitis. The hepatic expression of TLR2 and TLR9 was not detected in normal rats, but in rats with acute and chronic-on-acute hepatic failure. TLR4 expression was not detected in all samples except positive controls. TLR2 and TLR9 were mainly distributed in inflammatory cells, but seldom in hepatic parenchymal cells.

CONCLUSION: The high expression of TLR2 and TLR9 is related to the body's immune function and may be associated with the development of severe hepatitis and hepatic failure.

Key Words: Severe hepatitis; Hepatic failure; Toll-like receptor 2; Toll-like receptor 4; Toll-like receptor 9; Peripheral blood mononuclear cell

Chen Y, Shi HB, Zhang F, Ding M, Zhao J, Liu XH, Duan ZP. Expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in patients with chronic severe hepatitis and rats with liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1320-1325

摘要

目的: 观察重型肝炎患者及肝衰竭大鼠中TLR2、TLR4和TLR9的表达, 为重型肝炎肝

■同行评议者

孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科

衰竭发病机制的研究提供思路。

方法: 免疫组织化学法检测慢性重型肝炎患者肝组织及外周血单个核细胞(PBMC)中TLR2、TLR4和TLR9表达,同时平行设立慢性乙型肝炎、肝硬化患者和正常人作为对照。免疫组织化学法检测急性肝衰竭、慢加急性肝衰竭及正常大鼠肝组织中TLR2、TLR4和TLR9表达。阳性对照为大鼠结肠组织。

结果: 正常人、慢性乙型肝炎和肝硬化患者肝组织中TLR2和TLR9未见表达;慢性重型肝炎患者肝组织中TLR2和TLR9有表达;正常人及慢性乙型肝炎患者PBMC中TLR2、TLR9未见表达,慢性重型肝炎患者PBMC中TLR2和TLR9有表达;正常大鼠肝组织TLR2、TLR9未见表达,急性肝衰竭和慢加急性肝衰竭大鼠肝组织中TLR2、TLR9有表达;TLR4在所有标本中均未见表达,但在阳性对照中有表达;TLR2、TLR9的表达多见于炎性细胞中,在肝实质细胞上表达很少。

结论: TLR2、TLR9的高表达与机体的免疫状态密切相关,可能参与了重型肝炎和肝衰竭的发病过程。

关键词: 重型肝炎;肝衰竭;Toll样受体2;Toll样受体4;Toll样受体9;外周血单个核细胞

陈煜,时红波,张帆,丁美,赵军,刘旭华,段钟平. TLR2、TLR4和TLR9在慢性重型肝炎患者及肝衰竭大鼠中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1320-1325
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1320.asp>

0 引言

Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)是近年来发现的在宿主抗病原微生物的免疫应答中起重要作用的细胞表面受体分子。他们不仅在天然免疫应答中识别病原微生物的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),激活先天性免疫应答,还引起细胞因子的释放,上调共刺激分子的表达,为获得性免疫的启动提供必要的活化信号^[1-3]。近年研究显示,TLRs在病毒性肝炎的发病机制中通过诱导TNF、IFN等的生成和调节Th1和Th2反应平衡而产生免疫刺激并发挥抗病毒作用^[4-6],TLRs的过激活会导致免疫紊乱,造成肝细胞损伤的发生^[7]。本研究通过观察慢性重型肝炎患者及肝衰竭大鼠中TLR2、TLR4和TLR9的表达,初步探讨TLR2、TLR4和TLR9与免疫损伤的关系,为重型肝炎肝

衰竭发病机制的研究提供思路。

1 材料和方法

1.1 材料 慢性乙型肝炎、肝硬化患者及正常人肝组织标本各5例,慢性重型肝炎患者肝组织标本3例,慢性乙型肝炎、慢性重型肝炎患者及正常人全血标本各10例,所有病例均符合2000年西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准^[8],以上标本来自首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心。所有标本采取前均与患者签署知情同意书,并得到医院伦理委员会批准。TLR2多克隆抗体购于Santa Cruz BioTechnology公司,TLR4和TLR9单克隆抗体购于Imgenex公司。淋巴细胞分离液购于天津灏洋生物制品有限公司。HRP标记的羊抗鼠IgG、生物素标记的兔抗羊IgG和HRP标记的生物素化抗体购于北京中杉金桥生物有限公司。雌性Wistar大鼠12只,清洁级,体质量280-330 g,购自首都医科大学实验动物中心。人血白蛋白购自兰州生物制品所,D-氨基半乳糖盐酸盐购自江苏省启东市久丰工贸有限公司,脂多糖购自美国Sigma公司。其余为国产试剂分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝衰竭模型的建立: 取♀Wistar大鼠12只,随机分为3组,每组4只。(1)大鼠急性肝衰竭模型组:给予D-氨基半乳糖盐酸盐400 mg/kg和脂多糖100 μg/kg同时腹腔注射,构建大鼠急性肝衰竭模型;(2)大鼠慢加急性肝衰竭模型组:给予人血白蛋白每只2.5 mg尾静脉注射,每周2次,连续8 wk后给予D-氨基半乳糖400 mg/kg和脂多糖100 μg/kg同时腹腔注射,构建大鼠慢加急性肝衰竭模型;(3)正常对照组:常规喂养。详细建模方法见参考文献[9]。

1.2.2 肝组织免疫组织化学: 常规方法烤片40 min,用二甲苯及乙醇脱蜡处理;盐酸甲醇处理15 min, PBS洗片3次,枸橼酸缓冲液微波修复5 min; PBS洗片后,用羊血清工作液封闭30 min;分别加入TLR2、TLR4、TLR9抗体37℃孵育1 h; PBS洗片后,加入TLR4、TLR9抗体的组织片中加入HRP标记的羊抗鼠IgG,加入TLR2抗体的组织片中加入生物素标记的兔抗羊IgG,37℃孵育30 min; PBS洗片后,加入TLR4、TLR9抗体的组织片加入DAB显色,加入TLR2抗体的组织片加入HRP标记的生物素化抗体,37℃孵育30 min; PBS洗片后,加入TLR2抗体的组织片加入DAB显色;苏木精复染,组织透明,树胶封片。取

■ 研发前沿

近几年来,TLRs在肝脏疾病,如肝移植、病毒性肝炎和肝硬化中的作用正被逐步揭示出来,有关TLRs在重型肝炎肝衰竭方面的研究还不多。

■相关报道

Manigold等发现TLR2在高内毒素血症的肝硬化患者PBMC中表达上调,而TLR4在Child-Pugh分级为A的肝硬化患者PBMC中表达下调,提示TLRs可能参与了肝硬化的发展过程。

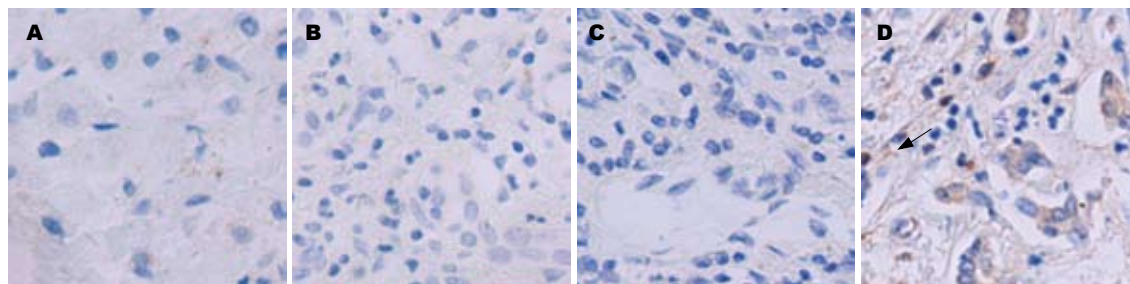


图1 TLR2在人肝组织中的表达(IHC × 200). A: 正常人肝组织; B: 慢乙型肝炎患者肝组织; C: 肝硬化患者肝组织; D: 慢性重型肝炎患者肝组织。

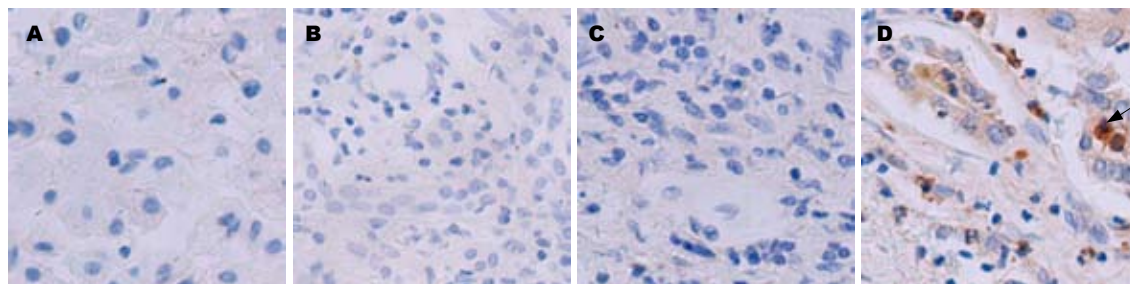


图2 TLR9在人肝组织中的表达(IHC × 200). A: 正常人肝组织; B: 慢乙型肝炎患者肝组织; C: 肝硬化患者肝组织; D: 慢性重型肝炎患者肝组织。

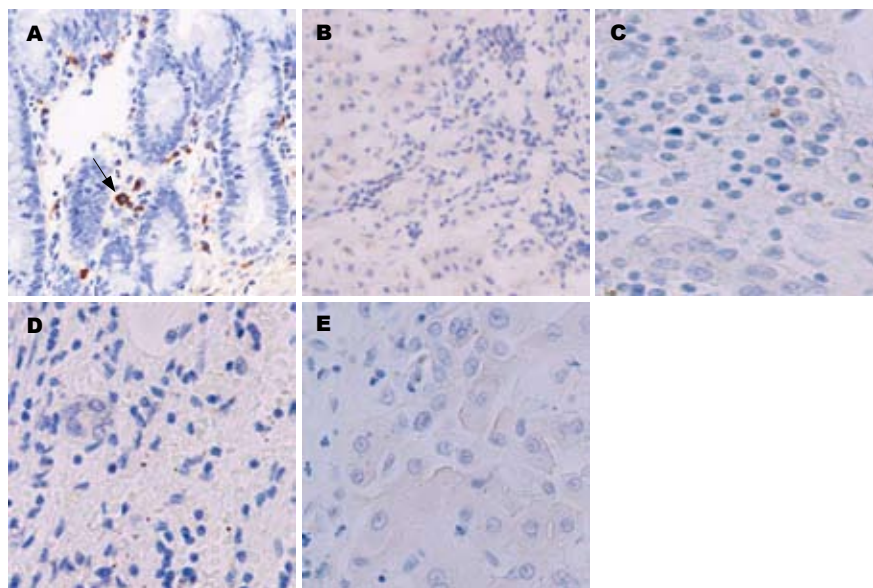


图3 TLR4在大鼠结肠及人肝组织中的表达(IHC × 200). A: 阳性对照-大鼠结肠组织; B: 正常人肝组织; C: 慢乙型肝炎患者肝组织; D: 肝硬化患者肝组织; E: 慢性重型肝炎患者肝组织。

正常大鼠结肠组织作为阳性对照。

1.2.3 外周血单个核细胞提取及免疫组织化学: 将抗凝血标本2 000 r/min离心, 吸取血浆, 加入等体积生理盐水; 将生理盐水混合液缓慢加入到淋巴细胞分离液的上层; 2 000 r/min离心30 min, 吸取淋巴细胞液层, 加入生理盐水清洗, 1 500 r/min离心10 min; 弃上清, 再加入10 mL生理盐水清洗1次, 细胞计数 2×10^7 ; 取适量浓度的细胞悬液涂布于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 室温自然干燥, 浓甲醛熏蒸固定2 h; 固定的载玻

片用酸甲醛处理10 min, PBS洗片后, 其余步骤与肝组织免疫组织化学相同。

2 结果

2.1 TLR2、TLR4和TLR9在慢性乙型肝炎、慢性重型肝炎、肝硬化患者及正常人肝组织中的表达 正常人、慢性乙型肝炎和肝硬化患者肝组织中TLR2和TLR9未见表达; 慢性重型肝炎患者肝组织中TLR2和TLR9有表达; TLR4在正常人及患者肝组织中均未见表达, 但在阳性对照中

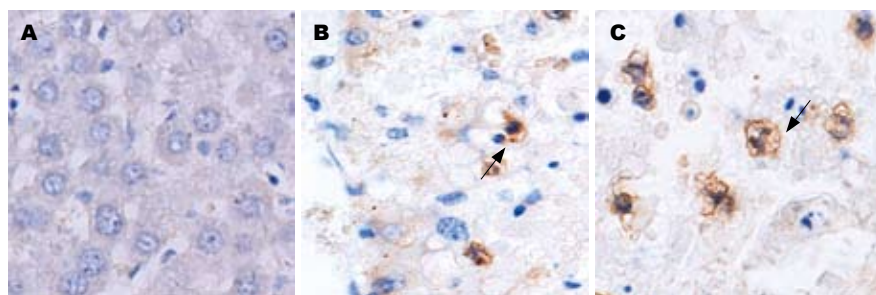


图 4 TLR2在大鼠肝组织中的表达(IHC × 200).

A: 正常大鼠肝组织; B: 急性肝衰竭大鼠肝组织; C: 慢加急性肝衰竭大鼠肝组织.

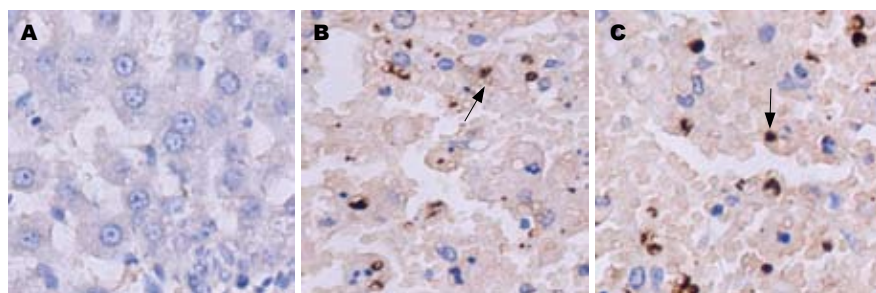


图 5 TLR9在大鼠肝组织中的表达(IHC × 200).

A: 正常大鼠肝组织; B: 急性肝衰竭大鼠肝组织; C: 慢加急性肝衰竭大鼠肝组织.

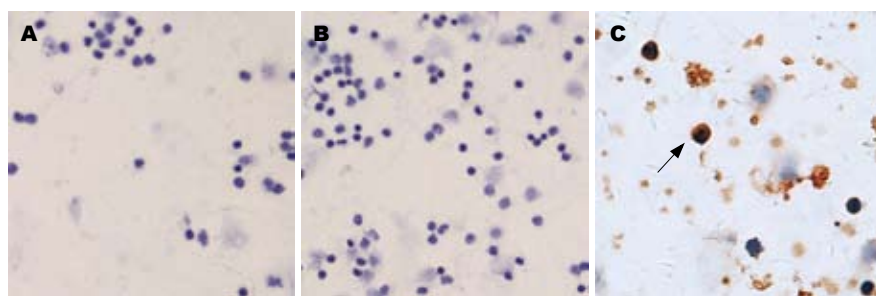


图 6 TLR2在人PBMC中的表达(IHC × 200).

A: 正常人; B: 慢性乙型肝炎患者; C: 慢性重型肝炎患者.

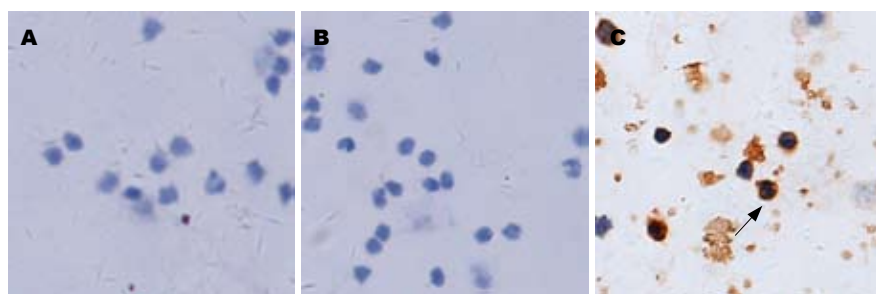


图 7 TLR9在人PBMC中的表达(IHC × 200).

A: 正常人; B: 慢性乙型肝炎患者; C: 慢性重型肝炎患者.

有表达. TLR2、TLR9的表达多见于炎性细胞中, 在肝实质细胞上表达很少(图1-3).

2.2 TLR2、TLR4和TLR9在急性肝衰竭、慢加急性肝衰竭及正常大鼠肝组织中的表达 正常大鼠肝组织TLR2、TLR9未见表达, 急性肝衰竭、慢加急性肝衰竭大鼠肝组织中TLR2、TLR9有表达; TLR4在肝衰竭大鼠肝组织未见表达, 但在阳性对照中有表达. TLR2、TLR9的表达多见于炎性细胞中, 在肝实质细胞上表达很少(图4, 5).

2.3 TLR2、TLR4和TLR9在慢性乙型肝炎、慢性重型肝炎及正常人PBMC中的表达 正常人及慢性乙型肝炎患者PBMC中TLR2、TLR9未见

表达; 慢性重型肝炎患者PBMC中TLR2和TLR9有表达, TLR4在正常人及患者PBMC中未见表达, 但在阳性对照中有表达(图6, 7).

3 讨论

TLRs广泛分布于各种组织中, 其表达与天然配体的刺激有关. TLR1、TLR2及TLR6能识别多种PAMPs, 包括细菌胞壁酸、肽聚糖和LPS^[10]; TLR3识别病毒双链RNA^[11]; TLR4可识别LPS^[12]; TLR5识别细菌鞭毛蛋白^[10]; TLR7、TLR8识别病毒的单链RNA^[13,14]; TLR9识别细菌胞嘧啶-腺嘌呤(CpG)DNA^[15]. 肝脏中的TLRs通过门静脉能够接触到大量病原体成分, 通过信号转导广

■创新盘点

重症肝炎是肝病领域研究的热点, 本研究应用免疫组织化学法观察了慢性重型肝炎患者及肝衰竭大鼠肝组织及外周血单个核细胞中TLR2、TLR4和TLR9的表达, 分析探讨了TLR2、TLR4和TLR9与免疫损伤的关系, 为重型肝炎肝衰竭发病机制的研究提供了一些新思路.

■应用要点

TLR2、TLR9的高表达与机体的免疫状态密切相关,可能参与了重型肝炎和肝衰竭的发病过程。

泛参与肝脏的生理病理过程。近几年来,TLRs在肝脏疾病,如病毒性肝炎、肝硬化及酒精性肝病中的作用正被逐步揭示出来^[16-23]。Isogawa等^[16]研究发现,活化的TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR9能够于24 h内通过IFN- α/β 依赖途径抑制HBV的复制。Manigold等^[17]发现TLR2在高内毒素血症的肝硬化患者PBMC中表达上调,而TLR4在Child-Pugh分级为A的肝硬化患者PBMC中表达下调,提示TLRs可能参与了肝硬化的发展过程。

本研究发现,慢性乙型肝炎和肝硬化患者TLR2、TLR9未见表达,慢性重型肝炎患者和肝衰竭大鼠TLR2和TLR9有表达,TLR4在所有标本中均未见表达,但在阳性对照中有表达。慢性乙型肝炎和肝硬化患者,特别是非活动性慢性乙型肝炎和代偿期肝硬化患者,病情比较稳定,很少伴有细菌感染,因此体内TLRs未被激活,免疫损伤相对较轻;慢性重型肝炎患者多由慢性肝炎进展而来,病情反复发作,常伴有细菌感染,在激活TLRs的同时也造成一定程度的免疫损伤。由于肝衰竭患者的肝组织不易获得,因此构建了大鼠肝衰竭模型。肝衰竭大鼠与重型肝炎患者肝组织中TLR2和TLR9的表达趋势是一致的,提示可以用大鼠肝衰竭模型模拟重型肝炎患者体内TLRs的表达情况。有报道TLR4在慢性乙型肝炎和慢性重型肝炎患者中表达增加^[24],在急性肝衰竭大鼠中表达增加^[25],而本研究中TLR4在慢性乙型肝炎和慢性重型肝炎患者及肝衰竭大鼠中均未见表达,分析可能与所选病例的病程不同有关。也有可能TLR4的天然配体LPS有关,Nomura等认为存在LPS耐受机制,即暴露于LPS的单核巨噬细胞表面表达的TLR4下调^[26-28],有关重型肝炎患者体内TLR4的表达还需要进一步研究。

本研究发现,在慢性乙型肝炎、肝硬化、重型肝炎肝组织中,TLR2、TLR9的表达多见于炎性细胞中,在肝实质细胞上表达很少,这与其他学者报道基本一致^[29,30]。TLRs在各类免疫细胞中广泛表达,如单核/巨噬细胞、B细胞、T细胞及树突状细胞都表达TLRs,在肠道及呼吸道等经常与细菌接触的上皮细胞上,往往也有TLRs的表达,而在肝实质细胞中表达很少。据此推测,TLRs的表达在肝脏疾病的发生及其所致的肝细胞损伤中所起的作用,可能主要是通过识别受体而激活免疫应答损伤肝细胞,由于受体识别而直接产生肝细胞损伤相对较少。因此,深入研

究TLRs与免疫损伤的关系,将对重型肝炎肝衰竭发病机制的研究具有非常重要的意义。

4 参考文献

- 1 杨俊涛,张令强,贺福初. Toll样受体在肝脏疾病中的功能. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 632-633
- 2 金生,张大志,陈压西. Toll样受体与肝脏疾病. 中华内科杂志 2005; 14: 68-69
- 3 Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216
- 4 赵甫涛,姬新颖,潘蕾,贾战生. Toll样受体及其在病毒性肝炎发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2459-2463
- 5 金仲品. Toll样受体与肝脏疾病相关性的研究概况. 滨州职业学院学报 2006; 3: 73-76
- 6 Dabbagh K, Lewis DB. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 199-204
- 7 Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttill RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004; 173: 7115-7119
- 8 中华医学会传染病学与寄生虫学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 9 刘旭华,陈煜,王泰龄,闫军,张立洁,宋晨朝,张晶,段钟平. 人血白蛋白及D-氨基半乳糖、脂多糖联合诱导建立大鼠慢加急性肝衰竭模型. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 771-775
- 10 Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001; 2: 346-352
- 11 Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 147-154
- 12 Finberg RW, Kurt-Jones EA. Viruses and Toll-like receptors. *Microbes Infect* 2004; 6: 1356-1360
- 13 王景锋,邵军军,常惠芸,高闪电,李菁. 病毒固有免疫识别受体研究进展. 细胞与分子免疫学杂志 2009; 25: 1217-1220
- 14 Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 5598-5603
- 15 Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007; 13: 552-559
- 16 Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol* 2005; 79: 7269-7272
- 17 Manigold T, Böcker U, Hanck C, Gundt J, Traber P, Antoni C, Rossol S. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 275-282
- 18 Chen Z, Cheng Y, Xu Y, Liao J, Zhang X, Hu Y, Zhang Q, Wang J, Zhang Z, Shen F, Yuan Z. Expression profiles and function of Toll-like

- receptors 2 and 4 in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B patients. *Clin Immunol* 2008; 128: 400-408
- 19 苟艳子, 连建奇, 聂青和, 庄严, 刘清泉, 邵彬. 肝硬化患者外周血单核细胞表面TLR2和TLR4表达的临床意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3278-3283
 - 20 左国庆, 何松, 刘长安, 龚建平. 实验性酒精性肝病时脂多糖结合蛋白和脂多糖受体CD14的表达. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 207-210
 - 21 Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Thurman RG. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2001; 34: 101-108
 - 22 吴河水, 王琳, 田元, Ori Rotstein. Toll样受体参与小鼠肝脏缺血再灌注损伤. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 424-427
 - 23 晏春根, 谢青. Toll样受体与炎症应答. *国外医学·流行病学与传染病学分册* 2003; 30: 159-162
 - 24 Wei XQ, Wen ZF, Zheng FP, Yao JL. [Changes of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 on the peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis B and chronic severe hepatitis B] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 354-357
 - 25 姚景宏, 贺永文. TLR4在急性肝衰竭模型大鼠中的动态变化及意义. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2007; 16: 164-167
 - 26 Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164: 3476-3479
 - 27 Jiang W, Sun R, Wei H, Tian Z. Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17077-17082
 - 28 罗福玲, 万敬员, 周岐新. 内毒素耐受机制的研究进展. *生理科学进展* 2006; 37: 319-324
 - 29 Wang AP, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H. Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2005; 25: 85-91
 - 30 Asahina Y, Yoshioka N, Kano R, Moritomo T, Hasegawa A. Full-length cDNA cloning of Toll-like receptor 4 in dogs and cats. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 96: 159-167

■同行评价

本研究内容重要, 提供了一些有用的新信息, 创新性较强。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}¹, Vmax不能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}, Vd, 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。

抗肝癌免疫纳米颗粒的制备及其对肝癌细胞增殖的影响

别彩群, 韩利民, 王启章, 范红梅, 朱浩峰, 梁旭竞, 杨冬华

■背景资料

近年来, 纳米载药体系作为一种新的药物控释体系已经成为新药研究开发中一个非常闪光的亮点。目前, 纳米颗粒已被作为药物、蛋白质、疫苗、核酸片段等理想载体, 在生物医学研究和临床诊治中显现出极大的应用前景。

别彩群, 韩利民, 王启章, 范红梅, 朱浩峰, 广州医学院附属深圳沙井医院消化科 广东省深圳市 518104

梁旭竞, 杨冬华, 暨南大学附属第一医院消化科 广东省广州市 510630

别彩群, 医学博士, 主要从事肝癌的基础及临床研究。

广东省科技计划基金资助项目, No. 2006B19901014

作者贡献分布: 别彩群与杨冬华对此文所作贡献均等; 此课题由别彩群与杨冬华设计; 研究过程由别彩群、王启章、范红梅、朱浩峰及梁旭竞操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由杨冬华提供; 数据分析由韩利民与杨冬华完成; 本文写作由别彩群、韩利民、王启章、范红梅、朱浩峰、梁旭竞及杨冬华共同完成。

通讯作者: 杨冬华, 教授, 510630, 广东省广州市, 暨南大学附属第一医院消化科. thdyang@yahoo.cn

电话: 0755-27722241

收稿日期: 2010-01-11 修回日期: 2010-04-07

接受日期: 2010-04-13 在线出版日期: 2010-05-08

Preparation of hepatocellular carcinoma-targeted immunonanoparticles and investigation of their effects on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells

Cai-Qun Bie, Li-Min Han, Qi-Zhang Wang, Hong-Mei Fan, Hao-Feng Zhu, Xu-Jing Liang, Dong-Hua Yang

Cai-Qun Bie, Li-Min Han, Qi-Zhang Wang, Hong-Mei Fan, Hao-Feng Zhu, Department of Gastroenterology, Shenzhen Shajing Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Shenzhen 518104, Guangdong Province, China Xu-Jing Liang, Dong-Hua Yang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

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

Correspondence to: Professor Dong-Hua Yang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. thdyang@yahoo.cn

Received: 2010-01-11 Revised: 2010-04-07

Accepted: 2010-04-13 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To prepare polyelectrolyte nanoparticles loaded with humanized single-chain Fv dimers for hepatocellular carcinoma (BDM diabody), and to investigate their effects on the proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

METHODS: By means of infrared spectroscopy and transmission electron microscopy, the

physicochemical characteristics of polyelectrolyte nanoparticles were characterized, including particle size and morphology, the concentration of protein loaded, and the protein entrapment efficiency of the nanoparticles. The effects of BDM-loading nanoparticles on the proliferation of HCC cells were determined by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay.

RESULTS: The particle size ranged from 100 to 200 nm. The concentration of protein loaded was 75 µg/mg. The protein entrapment efficiency was 53%. BDM-loading nanoparticles could significantly inhibit the proliferation of HCC cells.

CONCLUSION: HCC-targeted nanoparticles are successfully prepared, which provides a basis for future targeted diagnosis and therapy of HCC.

Key Words: Diabody against hepatocellular carcinoma; Polyelectrolyte nanoparticle; Hepatocellular carcinoma

Bie CQ, Han LM, Wang QZ, Fan HM, Zhu HF, Liang XJ, Yang DH. Preparation of hepatocellular carcinoma-targeted immunonanoparticles and investigation of their effects on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1326-1330

摘要

目的: 制备抗肝癌单链抗体二聚体高分子免疫纳米颗粒, 观察其对肝癌细胞增殖的影响。

方法: 采用离子交联的方法, 以壳聚糖水溶性衍生物多糖为基材, 将已获得的抗肝癌单链抗体二聚体BDM制备成免疫纳米颗粒, 检测纳米颗粒的表征、包封率及载药量, 并通过MTT法观察免疫纳米颗粒对肝癌细胞株增殖的影响。

结果: 制备粒径为100-200 nm的抗肝癌单链抗体二聚体高分子纳米颗粒, 最佳包封率为53%, 载药量为75 µg/mg抗体二聚体, 抗肝癌单链抗体二聚体高分子纳米颗粒显示较好的抗肿瘤作用, 其对肝癌细胞的抑制率为34%左右, 且有浓度依赖性。

■同行评议者

庄林, 主任医师, 昆明市第三人民医院肝病科

结论: 成功制备了抗肝癌单链抗体二聚体高分子纳米颗粒, 初步应用具有抑瘤性, 为下一步开展体内肝癌的放射免疫诊断和靶向治疗奠定了基础。

关键词: 肝癌抗体二聚体; 高分子纳米颗粒; 肝癌

别彩群, 韩利民, 王启章, 范红梅, 朱浩峰, 梁旭竞, 杨冬华. 抗肝癌免疫纳米颗粒的制备及其对肝癌细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1326-1330

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1326.asp>

0 引言

近年来, 纳米载药体系作为一种新的药物控释体系已经成为新药研究开发中一个非常闪光的亮点。纳米颗粒体积超微, 比表面大, 能顺利穿过人体毛细血管, 有利于透皮吸收和细胞内药效发挥; 被单核吞噬细胞系统吞噬后, 能够通过网状内皮系统迅速分布于靶部位; 由于载体材料的保护作用, 可防止药物被胃酸降解, 提高药物口服吸收的生物利用度; 作用于靶器官的纳米粒子, 由于载体的不同特性, 可达到控释、缓释的效果, 高效低毒^[1,2]。目前, 纳米颗粒已被作为药物、蛋白质、疫苗、核酸片段等理想载体, 在生物医药研究和临床诊治, 尤其是对肿瘤的治疗显现出极大的应用前景^[3-6]。多糖是单糖的聚合物, 作为天然的生物材料, 多糖不仅具有高度的稳定性、亲水性、安全无毒性, 体内降解也容易, 自然界来源广泛, 成本低廉, 是纳米载药体系的基质载体的最理想材料^[7-10]。多糖纳米粒子的制备方法有多种, 其中离子交联法因具有制备条件温和, 操作步骤简单等优点在生物医学领域广泛应用。在前面的研究中我们研究组已构建及在毕赤酵母中表达大量具有良好生物学活性的抗肝癌单链抗体二聚体^[11,12], 本研究将采用离子交联法制备壳聚糖/抗肝癌单链抗体二聚体免疫纳米颗粒, 并观察其对肝癌细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 抗肝癌单链抗体二聚体BDM为本实验室制备, 等电点为5.9; 壳聚糖(脱乙酰度>85%, 黏度 = 2500 cps)为济南海得贝生物技术有限公司产品; 壳聚糖使用前用Co60 γ -辐射(25 kGy剂量)灭菌; 人肝癌细胞株(Bel-7402、HepG2、SMMC-7721)为本室保存, DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)细胞培养基干粉为美国Gibco公司产品; 小牛血清、胰蛋白酶, Invitrogen

公司产品。其他试剂均为国产分析纯。FT-IR红外光谱仪, Bruker(德国); JSM-T300型扫描电子显微镜, JEOL公司(德国); Biofuge28RS超速离心机, Heraeus(德国)。

1.2 方法

1.2.1 离子交联法制备壳聚糖/抗体二聚体BDM3纳米粒子: 按文献方法^[13,14], 称取壳聚糖6 mg, 搅拌溶解于1%冰醋酸溶液6 mL中, 配制得到壳聚糖溶液, 将抗肝癌单链抗体二聚体BDM分别配制成浓度为0.1、0.5、1 g/L的水溶液; 分别取去离子水和不同浓度抗体二聚体溶液1 mL加入壳聚糖溶液, 调节溶液的pH, 用电磁搅拌器中速搅拌5 min; 磁力搅拌下缓慢滴加1 mL TPP(0.1%)水溶液, 继续搅拌30 min, 得到乳光液; 4 °C条件下, 20 000 r/min的转速高速离心30 min; 沉淀物用蒸馏水反复洗涤, 冷冻干燥得到的白色粉末即为壳聚糖纳米粒子和壳聚糖/抗体二聚体BDM纳米粒子。

1.2.2 纳米粒子的表征: 将壳聚糖/抗体二聚体BDM纳米粒子悬浮液超速离心, 去掉上清液, 将底部沉淀冷冻干燥, 采用KBr压片法, 测定纳米粒子的红外光谱。取所制备的壳聚糖/抗体二聚体BDM纳米粒子悬浮液1滴滴加到镀有碳膜的铜网上, 室温干燥后, 直接用扫描电镜观察纳米粒子的形貌。

1.2.3 纳米粒子的包封率和载药量检测: 将负载了不同浓度的抗肝癌单链抗体二聚体BDM的纳米粒子悬浮液用20 000 r/min超速离心30 min, 上清液中游离的抗肝癌单链抗体二聚体BDM的量用BCA试剂盒测定。纳米粒子对抗肝癌单链抗体二聚体BDM的包封率和载药量用以下公式计算: BDM的包封率 = (投入BDM总量-游离BDM量)/投入BDM总量 \times 100%; BDM的载药量 = 已包裹BDM总量/微球总量 \times 100%。

1.2.4 壳聚糖/抗体纳米粒体外释放试验: 将载药量最高的壳聚糖/抗体二聚体BDM纳米粒混悬液2 mL置于摇床上震荡120 r/min, 温度保持37 °C。在预定不同时间点, 纳米粒悬浊液被取出, 20 000 r/min离心, 上清保存, BCA法检测其中蛋白含量。沉淀重悬于2 mL新鲜磷酸盐缓冲液继续震荡。计算累计释放率。

1.2.5 壳聚糖/抗体纳米粒子对肝癌细胞系增殖的影响: 将肝癌细胞株(Bel-7402、HepG2、SMMC-7721)消化之后按1:1:1混匀, 用DMEM细胞培养液稀释成 2×10^4 个/mL, 接种于96孔培养板上, 每孔200 μ L。培养24 h, 待细

■ 相关报道

米托恩配牛血清白蛋白纳米粒接上抗人肝癌单克隆抗体Hab18构建人肝癌特异性的免疫纳米粒, 体外作用于人肝癌株SMMC-7721细胞, 显示出明显的细胞毒性作用, 又能特异性地结合人肝癌细胞, 多柔比星-聚氨基丙稀酸正丁酯纳米粒, 与高特异性的抗人肝癌酸性同功铁蛋白单克隆抗体结合, 得到肝癌特异性免疫纳米粒, 体外细胞毒试验及裸鼠体内抑瘤试验均表现出极强的肝肿瘤靶向性。

■创新盘点

本研究将抗肝癌单链抗体二聚体通过共价交联在壳聚糖纳米粒子的表面形成具有免疫活性的纳米粒子,它具有双重靶向性,即一方面他属于纳米粒子体系,可通过控制粒子大小使其选择性地被滞留在特定的器官;另一方面,可通过改变粒子表面修饰的抗体在体内免疫应答而特异性作用于其相关抗原的细胞,使其易达到靶细胞区。

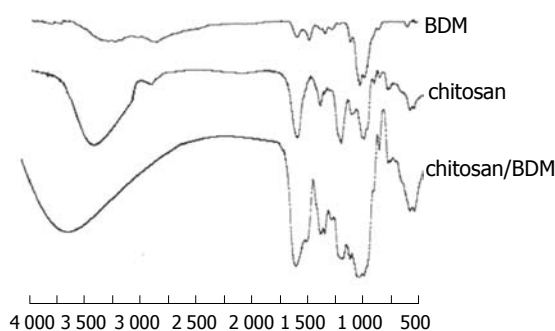


图1 壳聚糖、抗体BDM及壳聚糖/抗体BDM纳米粒子的红外谱图。

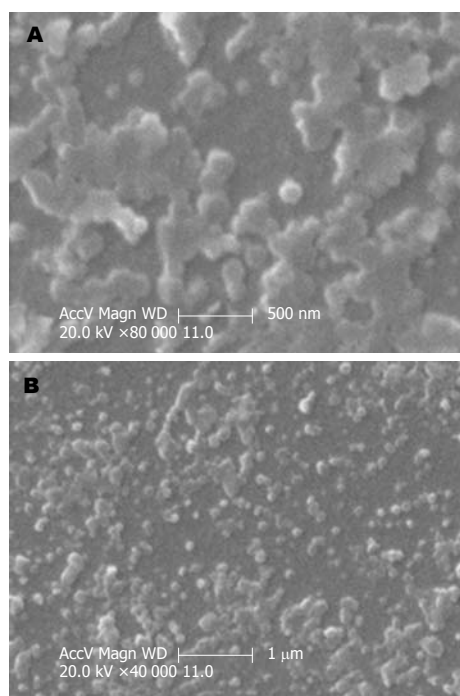


图2 壳聚糖/抗体纳米粒子扫描电镜图。A: $\times 80\,000$; B: $\times 40\,000$ 。

胞贴壁后,向96孔细胞培养板中加入100 μL 不同浓度的BDM和负载了BDM的壳聚糖纳米粒子(10、20、30、50、80、100 mg/L)悬浮液,每个实验组设四个平行,PBS作为空白对照。置37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养;用于制备纳米粒子的壳聚糖的浓度为1 g/L。培养72 h后,每孔加MTT溶液(5 g/L)20 μL ,继续孵育4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加150 μL DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解。选择490 nm波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值。抑制率 = (对照组A值-加药组A值)/对照组A值。

统计学处理 所有数据用SPSS12.0 for Windows软件包进行处理,计量资料 t 检验,计数资料均采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

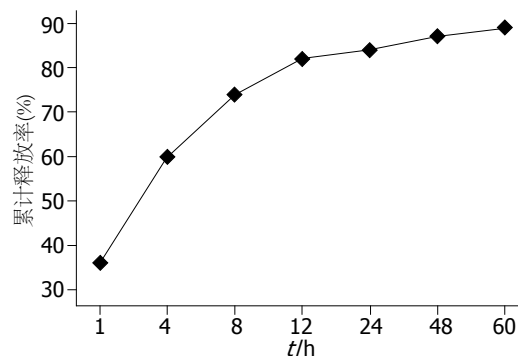


图3 壳聚糖/BDM纳米粒的累积释药曲线。

2 结果

2.1 纳米粒子的红外光谱图 分别对抗体二聚体BDM、壳聚糖和壳聚糖/抗体二聚体BDM纳米粒子进行了红外光谱测定,测定的红外光谱图分别如图1所示。在抗体二聚体BDM的红外谱图中,1324/ cm 处伸缩振动吸收谱带明显增强。壳聚糖的特征吸收谱带为1524.32/ cm ($-\text{NH}_3^+$),1047.63/ cm (C-O伸缩),壳聚糖/抗体二聚体BDM纳米粒子的红外谱图中,在1552/ cm 处出现了新的吸收谱带,该吸收谱带表明在壳聚糖的氨基和抗体的羧基之间形成了离子键。

2.2 纳米粒子的扫描电镜图 制备的壳聚糖/抗体二聚体BDM纳米粒子进行了扫描电镜观察,所得的电镜照片如图2。可看出,纳米粒子的粒径为100-200 nm,表面光滑,大小比较均一,形态呈球形,而且分散性较好,较少有粘连团聚的现象。

2.3 纳米粒子的包封率和载药量 经测量,壳聚糖纳米粒子对不同浓度(0.1、0.5、1 g/L)BDM3的包封率为21%、33%、53%,每毫克壳聚糖纳米粒子含BDM为4、28、75 μg ,包封率和载药量随着抗体浓度的增加而增加。

2.4 体外释放药物实验结果 将载药量最高的纳米粒子进行体外释放实验,于1、4、8、12、24、48、60 h各时间点取震荡中的纳米粒离心,取上清进行蛋白浓度测定,计算累计释放药物量,释放曲线见图3,体外释药曲线呈双相,即在爆发释放之后为缓慢释放,抗体的释放在最初1 h内有爆发释放现象,释放率达36%,这是由于纳米粒子具有很大的比表面积,其表面可吸附较多抗体分子,可能是由于这些吸附于粒子表面的抗体解吸,而造成壳聚糖纳米粒子的爆发释放。4 h其累积释放率达到60%,4-12 h内抗体接近匀速释放,12 h后抗体的释放变得非常缓慢,其最大累积释放率为82%。

2.5 抗体二聚体BDM及壳聚糖/BDM纳米粒子

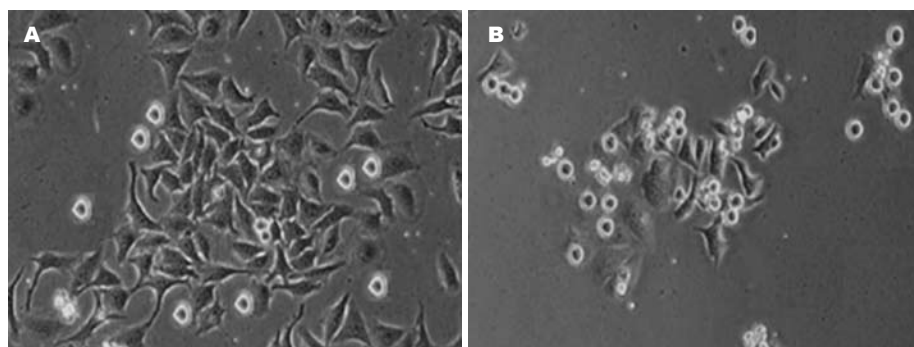


图4 肝癌细胞与壳聚糖纳米粒及壳聚糖/BDM纳米粒共培养24 h. A: 肝癌细胞与壳聚糖纳米粒; B: 肝癌细胞与壳聚糖/BDM纳米粒.

■应用要点

本文所研究抗肝癌抗体是从噬菌体抗体库中筛选出来的具有与肝癌细胞系结合的单链抗体, 原考虑将其作为“弹头”用于肝癌的靶向诊断, 但本实验表明该抗体还有“弹药”的作用, 可直接抑制肿瘤细胞的增殖, 为后续研究和临床诊治提供了新思路, 为下一步开展体内肝癌的放射免疫诊断和靶向治疗奠定了基础.

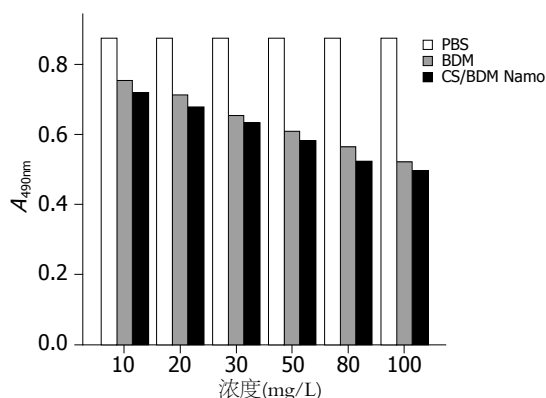


图5 抗肝癌单链抗体二聚体及壳聚糖/抗体纳米粒子对肝癌细胞增殖的影响.

对肝癌细胞系增殖的影响 测定抗肝癌单链抗体二聚体水溶液、负载抗肝癌单链抗体二聚体的壳聚糖纳米粒子悬浮液对肝癌细胞的抑制作用. 不同浓度的抗肝癌单链抗体二聚体溶液、壳聚糖/BDM纳米粒子悬浮液对肝癌细胞的抑制作用. 壳聚糖纳米粒与负载抗体的壳聚糖纳米粒与肝癌细胞共培养见图4. MTT结果显示, 抗肝癌单链抗体二聚体对肝癌细胞的抑制作用随浓度的增加而增加, 相比游离的抗肝癌单链抗体二聚体, 被纳米粒子负载的抗肝癌单链抗体二聚体对肝癌细胞的显示出更好的抑制作用, 浓度为100 mg/L壳聚糖/BDM纳米粒子对肝癌细胞的抑制率为34%, 而浓度为10 mg/L壳聚糖/BDM纳米粒子对肝癌细胞的抑制率为15%, 其抑瘤作用与浓度成正比(图5).

3 讨论

20世纪80年代肝癌的靶向治疗开始兴起, 现在已经发展到从器官(组织)、细胞到分子三个水平实施肝癌靶向治疗^[15]. 靶向治疗是指将配体或抗体等特异性的靶向分子偶联至纳米粒子表面而使药物定向分布到靶组织^[16,17]. 纳米粒对肝癌的靶向途径有: 受体介导的靶向途径, 如去唾液酸糖蛋白受体介导系统和甘露糖受体

介导系统; 免疫分子介导的靶向途径, 即通过抗原抗体结合的特异性相互作用, 实现药物的靶向传递, 如抗体介导的靶向药物、免疫微球靶向给药系统、基因介导靶向途径等. 目前这方面的研究很多. 米托恩酞牛血清白蛋白纳米粒(DHAQBSA-NP)接上抗人肝癌单克隆抗体Hab18构建人肝癌特异性的免疫纳米粒(Hab18-DHAQBSA-NP), 体外作用于人肝癌株SMMC-7221细胞, 显示出明显的细胞毒性作用, 又能特异性地结合人肝癌细胞^[18]. 2002年, 美国FeRx公司磁导向载体-阿霉素(MTC-DOX)技术已通过美国FDA认证, 主要用于肝细胞癌的治疗, 并在随后临床治疗中取得显著的疗效^[19].

纳米粒作为载药系统使用, 最终目的是实现药物的长效缓释与定向释放, 载药纳米粒的体外药物释放性能是反映载药纳米粒缓释效果的一个重要指标, 对评价载药纳米粒的有效性有极为重要的参考价值. 本研究中载药纳米粒的体外释药曲线呈双相行, 在长达60 h的释药实验中观察到壳聚糖纳米粒释药包括较快释放及平缓释放两个过程. 前12 h内累积释药率达到60%, 为较快释放, 使所递呈的抗体在短期内达到有效的治疗浓度, 而12-60 h内最大累积释药率为82%, 为平缓释放过程, 保证了治疗的时效性. 该实验说明药物的释放是可控的, 这对于设计可提供临床相关药物浓度的纳米粒传输系统是非常重要的.

本研究将抗肝癌单链抗体二聚体通过共价交联在壳聚糖纳米粒子的表面形成具有免疫活性的纳米粒子, 它具有双重靶向性, 即一方面他属于纳米粒子体系, 可通过控制粒子大小使其选择性地被动滞留在特定的器官; 另一方面, 可通过改变粒子表面修饰的抗体在体内免疫应答而特异性作用于其相关抗原的细胞, 使其易达到靶细胞区. 抗肝癌单链抗体二聚体纳米粒对肝癌细胞的具有明显的抑制作用, 相比游离的抗肝癌单链抗体二聚体, 被纳米粒子

■同行评价

本研究选题很好,符合当前的研究热点,目的明确,方法正确,结果可信。

负载的抗肝癌单链抗体二聚体对肝癌细胞的显示出更好的抑制作用,且抑制作用随浓度的增高而增加。这可能是由于被纳米粒子包裹的抗肝癌单链抗体二聚体被缓慢释放出来,能够在较长时间范围内有效抑制肿瘤细胞。

本文所研究抗肝癌抗体是从噬菌体抗体库中筛选出来的具有与肝癌细胞系结合的单链抗体,原考虑将其作为“弹头”用于肝癌的靶向诊断,但本实验表明该抗体还有“弹药”的作用,可直接抑制肿瘤细胞的增殖,为后续研究和临床诊治提供了新思路,为下一步开展体内肝癌的放射免疫诊断和靶向治疗奠定了基础,其抑制肿瘤细胞增殖机制尚待进一步探讨。

4 参考文献

- 1 张阳德,肖志刚,张浩伟.载药纳米粒在肝癌靶向治疗中的研究进展.中国医学工程 2005; 13: 609-616
- 2 徐祖顺,易昌凤.聚合物纳米粒子.第1版.北京:化学工业出版社,2006: 15-25
- 3 Debotton N, Parnes M, Kadouche J, Benita S. Overcoming the formulation obstacles towards targeted chemotherapy: in vitro and in vivo evaluation of cytotoxic drug loaded immunonanoparticles. *J Control Release* 2008; 127: 219-230
- 4 Chen H, Gao J, Lu Y, Kou G, Zhang H, Fan L, Sun Z, Guo Y, Zhong Y. Preparation and characterization of PE38KDEL-loaded anti-HER2 nanoparticles for targeted cancer therapy. *J Control Release* 2008; 128: 209-216
- 5 Gao J, Kou G, Wang H, Chen H, Li B, Lu Y, Zhang D, Wang S, Hou S, Qian W, Dai J, Zhao J, Zhong Y, Guo Y. PE38KDEL-loaded anti-HER2 nanoparticles inhibit breast tumor progression with reduced toxicity and immunogenicity. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115: 29-41
- 6 Olivier JC. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx* 2005; 2: 108-119
- 7 郝英魁,杨学东.载药壳聚糖纳米粒的研究进展.中国药理学杂志 2005; 40: 1292-1295
- 8 陈钟,戴新征.壳聚糖及其纳米粒子在组织工程中的应用.国际生物医学工程杂志 2006; 29: 48-52
- 9 刘晨光,刘成圣,孟祥红,陈西广,刘万顺.壳聚糖作为药物缓释材料的研究进展.高技术通讯 2003; 13: 98-102
- 10 李近,蒋国强,林莹,丁富新.长效载药微粒研究进展.精细化工 2006; 23: 992-996
- 11 别彩群,杨冬华,刘浏.人源化抗肝癌噬菌体单链抗体二聚体的构建、表达与鉴定.中华肝脏病杂志 2009; 17: 466-467
- 12 别彩群,杨冬华,汤绍辉,丁世华.特异性抗肝癌单链抗体二聚体在毕赤酵母中高效表达、纯化与生物学活性鉴定.世界华人消化杂志 2009; 17: 3729-3733
- 13 Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci* 1997; 63: 125-132
- 14 Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res* 1997; 14: 1431-1436
- 15 Ye SL. [Non-surgical therapy for hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 558-560
- 16 Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 283-318
- 17 Gao J, Kou G, Chen H, Wang H, Li B, Lu Y, Zhang D, Wang S, Hou S, Qian W, Dai J, Zhao J, Zhong Y, Guo Y. Treatment of hepatocellular carcinoma in mice with PE38KDEL type I mutant-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles conjugated with humanized SM5-1 F(ab') fragments. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 3399-407
- 18 刘晓波,蔡美英.抗人肝癌免疫毫微粒的制备及体外免疫学性质的鉴定.中国免疫学杂志 2000; 16: 262-265
- 19 Wilson MW, Kerlan RK Jr, Fidelman NA, Venook AP, LaBerge JM, Koda J, Gordon RL. Hepatocellular carcinoma: regional therapy with a magnetic targeted carrier bound to doxorubicin in a dual MR imaging/conventional angiography suite--initial experience with four patients. *Radiology* 2004; 230: 287-293

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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。

氧化苦参碱对慢性胰腺炎胰腺组织中 I 型胶原及 α -SMA 的影响

王昱良, 郑永青, 夏时海, 汪海燕, 苏丽婷, 吴双

王昱良, 河南省三门峡市黄河医院消化内科 河南省三门峡市 472000

郑永青, 汪海燕, 武警8650部队医院内科 山西省晋中市 030600

夏时海, 苏丽婷, 吴双, 天津市武警医学院附属医院肝胆胰脾内科 天津市 300162

武警总部自然科学基金资助项目, No. WKH2006-9

作者贡献分布: 王昱良与郑永青对此文所作贡献均等; 此课题由夏时海设计; 研究过程由王昱良、郑永青、苏丽婷及吴双操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由夏时海提供; 数据分析由王昱良、郑永青及汪海燕完成; 本论文写作由王昱良与郑永青完成。

通讯作者: 夏时海, 副教授, 300162, 天津市河东区程林庄路, 天津市武警医学院附属医院肝胆胰脾内科. xshhcx@sina.com

电话: 022-60578765

收稿日期: 2010-02-02 修回日期: 2010-04-10

接受日期: 2010-04-20 在线出版日期: 2010-05-08

Oxymatrine enhances the expression of collagen I and α -SMA in rat chronic pancreatitis

Yu-Liang Wang, Yong-Qing Zheng, Shi-Hai Xia, Hai-Yan Wang, Li-Ting Su, Shuang Wu

Yu-Liang Wang, Department of Gastroenterology, Huanghe Hospital, Sanmenxia 472000, Henan Province, China

Yong-Qing Zheng, Hai-Yan Wang, Department of Internal Medicine, the 8650th Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Jinzhong 030600, Shanxi Province, China

Shi-Hai Xia, Li-Ting Su, Shuang Wu, Department of Hepatobiliary & Pancreatic medicine, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Chinese People's Armed Police Force, No. WKH2006-9

Correspondence to: Associate Professor Shi-Hai Xia, Department of Hepatobiliary & Pancreatic medicine, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Hedong District, Tianjin 300162, China. xshhcx@sina.com

Received: 2010-02-02 Revised: 2010-04-10

Accepted: 2010-04-20 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To investigate the treatment effects of oxymatrine (OM) against chronic pancreatitis in rats and to explore the potential mechanisms involved.

METHODS: Forty healthy Wistar rats were ran-

domly and equally divided into four groups: negative control group (NC group), CP model group (CP group), OM treatment group (OT group), and OM pretreatment group (OP group), which received saline qod, diethyldithiocarbamate (DDC) at 700 mg/kg qod, diethyldithiocarbamate (DDC) at 700 mg/kg qod and OM at 100 mg/kg a week later, and diethyldithiocarbamate (DDC) at 700 mg/kg qod and OM at 100 mg/kg simultaneously, respectively. Thirty days later, DDC injection was discontinued, while OM treatment continued. Rats were executed on days 20 and 40 ($n = 5$ at each time point). Collagen fibers were stained by Masson's trichrome. The localization and expression of collagen I and α -SMA in chronic pancreatitis were examined by immunohistochemistry.

RESULTS: Collagen I was localized in the periphery of the pancreas in the NC group. In the CP group, collagen I could also be seen in periacinar and perilobular areas. The immunoreactivity of α -SMA was detected in the blood vessel wall in the NC group, and in the blood vessel wall and periacinar area in the CP group. The expression of collagen I and α -SMA in periacinar area was significantly lower in the OP and OT groups than in the CP group. The percentages of collagen area on days 20 and 40 were significantly lower in the NC group ($3.0\% \pm 0.32\%$ and $2.45\% \pm 0.24\%$) than in the other groups (all $P < 0.05$), but significantly higher in the CP group ($22.54\% \pm 4.45\%$ and $35.14\% \pm 3.27\%$) than in the OP group ($13.16\% \pm 1.84\%$ and $25.14\% \pm 3.67\%$) and the OT group ($19.58\% \pm 2.78\%$ and $28.68\% \pm 2.55\%$). The percentages of collagen areas on day 40 in the CP and OT groups were significantly higher than those on day 20 (both $P < 0.05$). The relative expression levels of α -SMA on days 20 and 40 were significantly higher in the CP group (1.06 ± 0.04 and 1.16 ± 0.03) than in other groups (all $P < 0.05$). The NC group had the lowest relative expression level of α -SMA (0.73 ± 0.06 and 0.78 ± 0.06). No significant difference was noted in the relative expression level of α -SMA between the OT and OP groups.

背景资料

慢性胰腺炎主要以胰腺纤维化为病理特征, 临床表现为腹痛、脂肪泻和糖尿病等症状。国内外的发病率呈上升趋势, 目前尚无针对胰腺纤维化的治疗措施, 对于慢性胰腺炎的治疗仍是一个世界级难题。

同行评议者

田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科

■研究前沿

各种损伤因子通过多种细胞内信号通路激活PSC,活化后的PSC增殖合成细胞外基质,促进纤维化的形成。目前针对各种信号通路,已有多种试剂与药物包括抗氧化剂、PPAR- γ 配体曲格列酮、curcumin、蛋白酶抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂等,在动物模型上取得令人鼓舞的抗纤维化与抗炎效果,为治疗胰腺纤维化与炎症带来广阔的前景。

■相关报道

Tanioka等用二甲基二硫代氨基甲酸盐(DDC)可以活化PSC,增加 α -SMA阳性细胞的数量,增加I型胶原和MMP的分泌,TGF- β 1的分泌也增加。

CONCLUSION: The expression of collagen I and α -SMA is enhanced in rat CP, predominantly localized in perivascular, periacinar and perilobular areas. OM can decrease collagen production and pancreatic stellate cell activation and thereby inhibit the development of pancreatic fibrosis.

Key Words: Pancreatic fibrosis; Chronic pancreatitis; Oxymatrine; Collagen I; α -smooth muscle actin

Wang YL, Zheng YQ, Xia SH, Wang HY, Su LT, Wu S. Oxymatrine enhances the expression of collagen I and α -SMA in rat chronic pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1331-1336

摘要

目的: 探讨氧化苦参碱对大鼠慢性胰腺炎的治疗作用及其机制。

方法: Wistar大鼠40只,按照随机数字表分为:阴性对照组(NC组, $n = 10$),以300 mg/kg隔日腹腔内注射生理盐水;模型组(CP组, $n = 10$),以700 mg/kg隔日腹腔内注射二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDC);OM治疗组(OT组, $n = 10$),以700 mg/kg隔日腹腔内注射DDC, 1 wk后开始每日腹腔注射OM 100 mg/kg; OM预防组(OP组, $n = 10$),依照模型组方法注射DDC的同时每日腹腔内注射OM 100 mg/kg。到30 d时停止注射DDC,但仍继续注射OM。将上述4组分别在20 d、40 d处死大鼠($n = 5$),用Masson染色的方法观察胶原纤维增生,用免疫组织化学的方法观察I型胶原、 α -SMA在胰腺组织的定位及表达,用Western blot方法检测 α -SMA在胰腺组织表达量的变化。

结果: Masson染色可见胶原纤维面积百分比,分别在20、40 d时CP组($22.54\% \pm 4.45\%$ 、 $35.14\% \pm 3.27\%$)高于其余各组($P < 0.05$), OP组($13.16\% \pm 1.84\%$ 、 $25.14\% \pm 3.67\%$)与OT组($19.58\% \pm 2.78\%$ 、 $28.68\% \pm 2.55\%$)较CP组降低($P < 0.05$), NC组($3.0\% \pm 0.32\%$ 、 $2.45\% \pm 0.24\%$)低于其余各组($P < 0.05$), CP组与OT组在40 d时的胶原纤维面积百分比较20 d时增高($P < 0.05$)。I型胶原与 α -SMA在胰腺组织的定位:用免疫组织化学的方法发现NC组胰腺组织 α -SMA在血管壁平滑肌表达阳性,其余部位未见表达; CP组 α -SMA在血管周围和腺泡间有阳性表达;在OT、OP组, α -SMA在腺泡间有少量表达。I型胶原在NC组主要位于胰腺组织周边; CP组除在上述部位外,还表达于腺泡间及小叶周围。用Western blot方法检测胰腺组织中 α -SMA与 β -actin的相对表达量分别在20、40 d时CP组(1.06 ± 0.04 、 1.16 ± 0.03)高于其余各组($P < 0.05$), NC组($0.73 \pm$

0.06 、 0.78 ± 0.06)低于其余各组($P < 0.05$), OT组与OP组比较无差别($P > 0.05$)。

结论: 慢性胰腺炎时I型胶原和 α -SMA表达增强,主要位于血管和腺泡周围以及小叶间。OM可以通过减少胰腺组织内胶原的生成及PSC的活化抑制胰腺纤维化的发展。

关键词: 胰腺纤维化; 慢性胰腺炎; 氧化苦参碱; I型胶原; α -平滑肌肌动蛋白

王昱良, 郑永青, 夏时海, 汪海燕, 苏丽婷, 吴双. 氧化苦参碱对慢性胰腺炎胰腺组织中I型胶原及 α -SMA的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(13): 1331-1336

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1331.asp>

0 引言

慢性胰腺炎的病理改变主要以纤维化为主,目前认为胰腺星状细胞(pancreatic stellate cell, PSC)是胰腺纤维化的效应细胞,在各种因素作用下,造成胰腺实质损伤坏死伴发炎症反应,继而各种炎症因子释放并激活PSC转变为 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)染色阳性的类成纤维细胞,细胞外基质的合成分泌增多,导致胰腺纤维化。胰腺纤维化的治疗仍在探索阶段,氧化苦参碱(oxymatrine, OM)系药用苦参的干燥根中提取的生物碱,有多方面的药理作用。近年大量研究结果表明OM具有明显的抗器官纤维化作用,且在治疗慢性肝炎和肝纤维化等方面已经得到了广泛的应用,而肝星状细胞与PSC生物学特性极其相似。本文通过观察OM对大鼠胰腺胶原纤维及 α -SMA的影响探讨了OM对胰腺纤维化的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠, δ , 体质量 $220 \text{ g} \pm 30 \text{ g}$,购于军事医学科学院动物中心。二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDC)购于上海国药集团化学试剂公司。OM由正大天晴公司惠赠。兔抗大鼠I型胶原多克隆抗体、小鼠抗大鼠 α -SMA单克隆抗体、SABC试剂盒(生物素化羊抗小鼠IgG、SABC、正常山羊封闭液)均购于南京博士德公司。生物素标记的羊抗兔IgG(即用型)、HRP标记的链霉卵白素(即用型), HRP标记的羊抗小鼠IgG均购于北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组: δ Wistar大鼠40只,参照Matsumura等^[1]所述造模方法,按照随机数字表分为:阴性

表 1 胶原纤维面积百分比 (mean \pm SD, $n = 5$)

分组	20 d	40 d
CP组	22.54 \pm 4.45	35.14 \pm 3.27 ^e
OP组	13.16 \pm 1.84 ^{ac}	25.14 \pm 3.67 ^{ac}
OT组	19.58 \pm 2.78 ^c	28.68 \pm 2.55 ^{ae}
NC组	2.45 \pm 0.24 ^a	3.0 \pm 0.32 ^a

^a $P < 0.05$ vs CP组; ^c $P < 0.05$ vs NC组; ^e $P < 0.05$ vs 20 d.

对照组(NC组, $n = 10$), 以300 mg/kg隔日腹腔内注射生理盐水; 模型组(CP组, $n = 10$), 以700 mg/kg隔日腹腔内注射DDC; OM治疗组(OT组, $n = 10$), 以700 mg/kg隔日腹腔内注射DDC, 1 wk后注射OM 100 mg/kg. OM预防组(OP组, $n = 10$), 依照模型组方法注射DDC的同时每日腹腔内注射OM 100 mg/kg. 到30 d时停止注射DDC, 但仍继续注射OM. 将上述4组分别依20 d、40 d处死大鼠($n = 5$), 取胰腺组织.

1.2.2 病理学观察: Masson染色法对胰腺组织进行染色, 镜下观察腺泡及红细胞呈红色, 胶原纤维呈蓝色丝状, 计算胶原纤维在400倍镜下标本四角及中央5个视野中的面积百分比, 以纤维占视野面积的百分比表示胶原含量, 取平均值进行统计分析.

1.2.3 免疫组织化学法观察 I 型胶原、 α -SMA 在胰腺组织的定位: 多聚赖氨酸石蜡切片脱蜡至水, 3% H_2O_2 20 min去除内源性过氧化物酶, 漂洗后浸入0.01 mol/L pH6.0的枸橼酸钠缓冲液中微波修复, 漂洗后用5%正常小牛血清封闭20 min, 滴加PBS 1:50稀释的兔抗大鼠 I 型胶原多克隆抗体/小鼠抗大鼠 α -SMA单克隆抗体50 μ L, 实验对照组切片以PBS代替一抗, 37 $^{\circ}$ C水浴上孵育2 h. PBS冲洗后, 滴加生物素化山羊抗兔 IgG(即用型)/生物素化羊抗小鼠IgG, 37 $^{\circ}$ C孵育20 min. PBS冲洗, HRP标记的链霉卵白素(即用型)/SABC, 37 $^{\circ}$ C孵育20 min, PBS冲洗, 将DAB显色液按顺序(A、B、C)各1滴混合, 用1 mL双蒸水稀释, DAB显色观察到有黄色出现后(约10 s), 用蒸馏水冲洗. 苏木素复染, 乙醇梯度脱水, 封片, 镜下观察.

1.2.4 Western blot法检测 α -SMA含量: 将提取的蛋白样品用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度, 稀释到总蛋白浓度为5 g/L, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳法(积层胶为5%, 分离胶为10%)分离, 积层胶电压80 V, 持续20 min, 分离胶电压120 V, 持续100 min; 将PVDF膜平衡后在14 V恒

表 2 α -SMA/ β -actin 的I/I比值 (mean \pm SD, $n = 5$)

分组	20 d	40 d
CP组	1.06 \pm 0.04 ^a	1.16 \pm 0.03 ^a
OP组	0.92 \pm 0.05 ^{ac}	0.97 \pm 0.02 ^{ac}
OT组	0.95 \pm 0.03 ^{ac}	0.99 \pm 0.05 ^{ac}
NC组	0.73 \pm 0.06	0.78 \pm 0.06

^a $P < 0.05$ vs NC组; ^c $P < 0.05$ vs CP组.

压下转印250 min; 将PVDF膜用5%脱脂奶粉PBS液封闭; 小鼠抗大鼠 α -SMA单克隆抗体(用封闭液稀释, 比例1:300)孵育120 min; 漂洗后以辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG(用封闭液稀释, 比例1:500)室温下震荡孵育80 min, ECL化学发光显色, 暗室中拍片. 以 β -actin作为内参. 将结果扫描成电子图像, 以Image Pro Plus 5.0图像分析软件分析, 计算出吸光度值, 取前后两者的比值作为 α -SMA蛋白的相对表达量.

统计学处理 所有的数值均用mean \pm SD表示, 各组之间比较采用单因素方差分析法, LSD法进行两两比较, 采用检验水准 $P = 0.05$. 全部数据的统计学处理均采用SPSS 12.0 for windows分析软件.

2 结果

2.1 胰腺组织的病理结果 Masson染色可见胶原纤维面积百分比在20 d时CP组、OP组、OT组和NC组分别为22.54% \pm 4.45%, 13.16% \pm 1.84%, 19.58% \pm 2.78%, 2.45% \pm 0.24%; 在40 d时CP组、OP组、OT组、NC组分别为35.14% \pm 3.27%, 25.14% \pm 3.67%, 28.68% \pm 2.55%, 3.0% \pm 0.32%(表1, 图1).

2.2 胰腺组织中的 I 型胶原、 α -SMA的定位 免疫组织化学切片显示在NC组 I 型胶原主要位于胰腺组织周边; CP组除在上述部位外, I 型胶原还表达于腺泡间及小叶周围; NC组 α -SMA在血管壁平滑肌表达阳性, 其余部位未见表达; CP组 α -SMA在腺泡间有阳性表达; 在OT、OP组的免疫组织化学切片中 I 型胶原、 α -SMA在腺泡间的有少量表达(图2, 3).

2.3 胰腺组织中 α -SMA的相对含量的变化 α -SMA与 β -actin的相对表达量在20 d时CP组、OP组、OT组、NC组分别为1.06 \pm 0.04, 0.92 \pm 0.05, 0.95 \pm 0.03, 0.73 \pm 0.06; 在40 d时CP组、OP组、OT组、NC组分别为1.16 \pm 0.03, 0.97 \pm 0.02, 0.99 \pm 0.05, 0.78 \pm 0.06(表2, 图4).

■创新盘点

OM在治疗慢性肝炎和肝纤维化等方面已经得到了广泛的应用, 抑制肝星状细胞的增殖为其作用机制之一, 而肝星状细胞与胰腺星状细胞生物学特性极其相似, 本实验研究了OM对胰腺纤维化的治疗作用并初步探讨了其作用机制.

■应用要点

OM可以抑制PSC从静止向活化的转化,通过减少胰腺组织内胶原的生成及 α -SMA的表达抑制胰腺纤维化的发展,为OM在抗纤维化的应用方面提供依据。

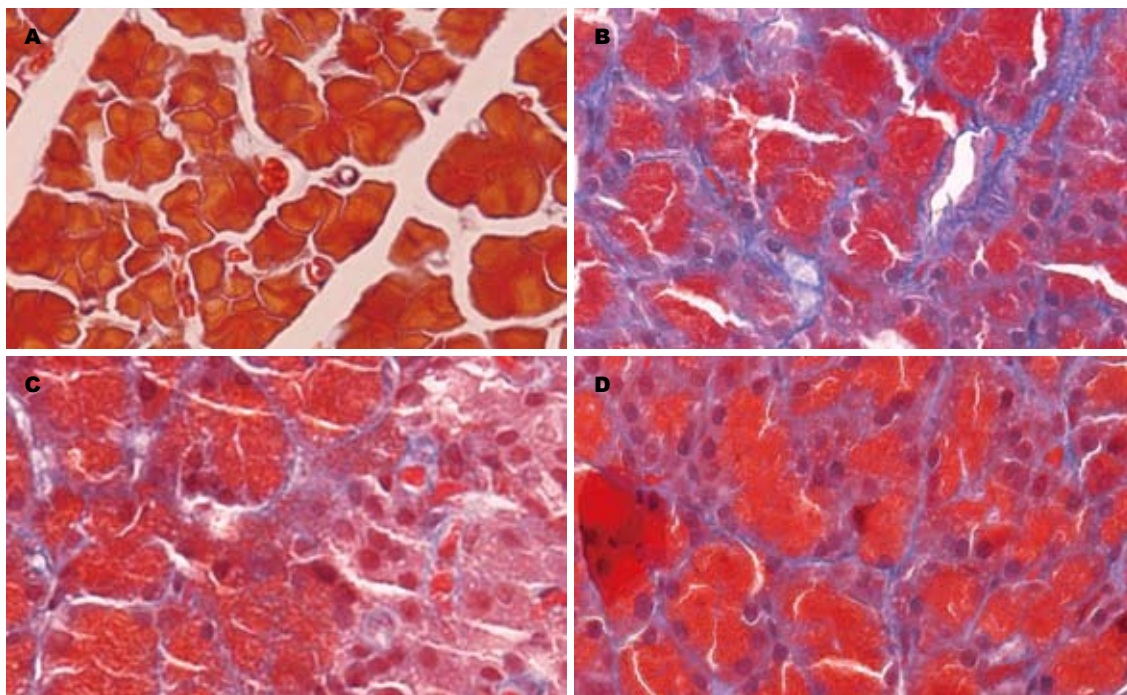


图1 Masson法显示胶原纤维的分布($\times 400$). A: NC组; B: CP组; C: OT组; D: OP组.

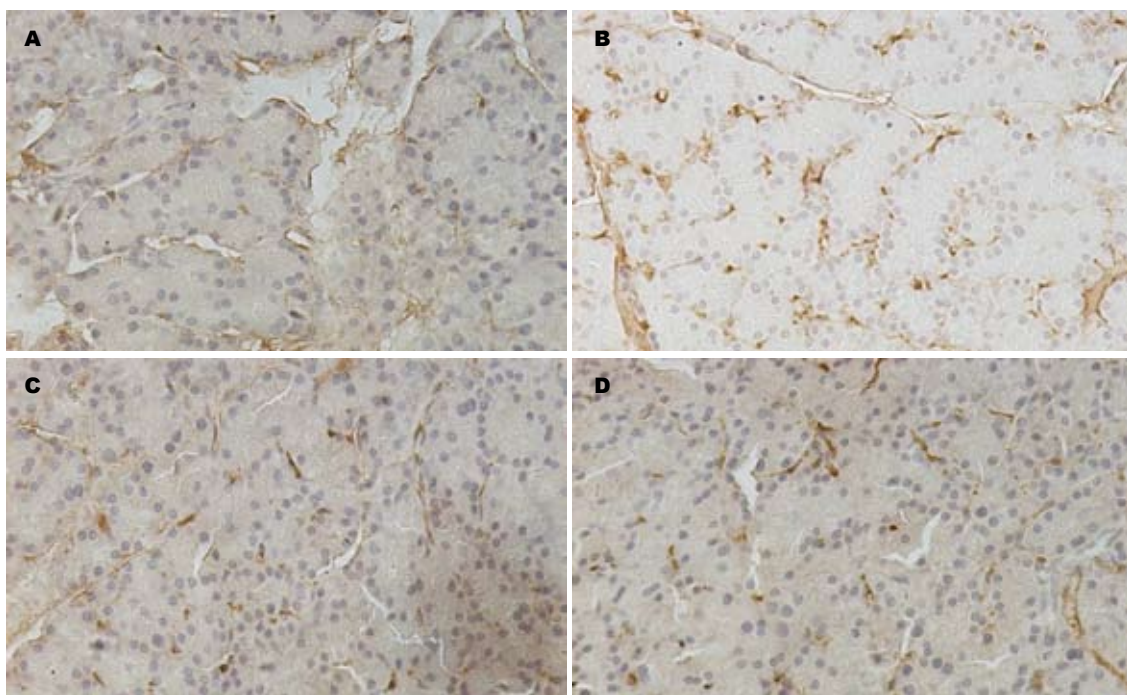


图2 免疫组织化学法显示I型胶原的分布($\times 200$). A: NC组; B: CP组; C: OT组; D: OP组.

3 讨论

酗酒^[2]、吸烟^[2]、病毒感染^[3]、氧自由基^[4,5]、胰导管内压力增高^[6]等均可活化PSC. 活化后的PSC体积变大,数量增多,转变为 α -SMA染色阳性的类成纤维细胞,细胞外基质的合成分泌增多^[7].

研究表明,氧自由基在活化PSC的过程中发挥重要作用,过多的氧自由基可以活化有丝分裂

原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,诱导I型前胶原基因表达,可以活化PSC,增加 α -SMA阳性细胞的数量,增加I型胶原、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的分泌及TGF- β 1的分泌^[4,5,8,9]. 本实验中二乙基硫代氨基甲酸盐(DDC)是超氧化物歧化酶(SOD)抑制剂,可以抑制SOD,减少组织中氧自由

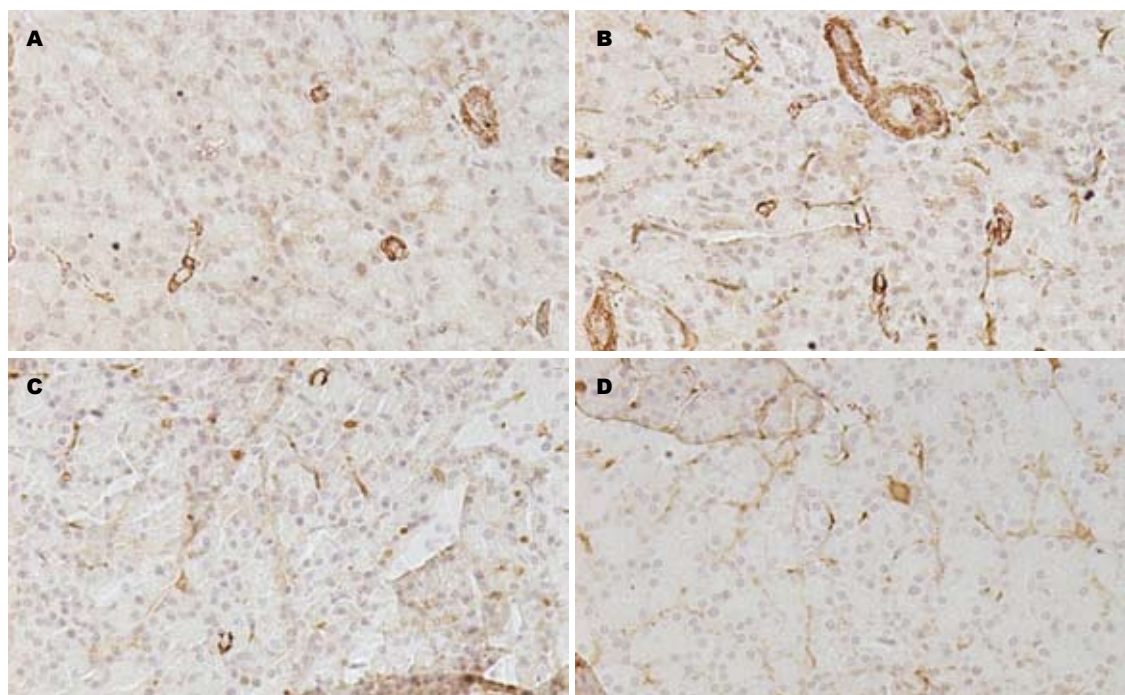


图 3 免疫组织化学法显示 α -SMA的分布($\times 200$). A: NC组; B: CP组; C: OT组; D: OP组.

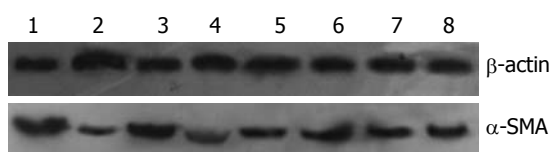


图 4 Western blot法显示 β -actin与 α -SMA在各组的表达. 1: CP 20 d; 2: NC 20 d; 3: CP 40 d; 4: NC 40 d; 5: OP 20 d; 6: OT 20 d; 7: OP 40 d; 8: OT 40 d.

基的清除, 参照Matsumura等^[1]所述造模方法给予大鼠腹腔注射700 mg/kg的DDC制备慢性胰腺炎模型, 发现分别在20、40 d时, 正常大鼠胰腺组织间质中极少量存在的纤维组织在模型组明显增多, 并随着用药的延长, 纤维化程度逐渐加重. 用Masson染色法可清楚看到模型组胰腺组织的小叶周围有大量丝状蓝染的胶原纤维组织, 炎症细胞浸润, 本实验模型未发现胰腺腺泡细胞大量的坏死、萎缩, 考虑原因可能有: (1)造模时间短, 纤维化程度轻, 可以延长造模时间来观察其能否发展为重度纤维化. (2)DDC诱导大鼠胰腺组织纤维化不遵循胰腺组织坏死-纤维化的顺序, 其机制可能与氧自由基增多直接导致PSC活化后表达ECM增多有关. 在本实验中用免疫组织化学的方法发现, I型胶原在腺泡间及小叶周围表达增多; 同时, α -SMA的表达增强, 主要表达于血管周围, 腺泡间及小叶周围. 与文献报道一致^[4,5,7].

近期研究发现, 血管紧张素转换酶抑制剂可以减少胰腺腺泡细胞的凋亡及PSC的生成, 减轻

■名词解释

有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK): 是丝氨酸/色氨酸特异性蛋白酶家族, 在调节细胞基因表达、增生、细胞存活与凋亡以及细胞死亡等方面有广泛的生物学作用.

炎症反应及纤维化^[10]; 别嘌呤醇可以减少胶原沉积和小叶的萎缩, 抑制PSC的活化, 阻止纤维化的形成^[11]; vit-A可以抑制PSC活化及 α -SMA、I型胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白的表达^[12]. Troglitazone是PSC活化的体外拮抗物, 可以减少细胞增殖和 α -SMA的表达^[13], 减轻胰腺炎症及纤维化^[14], 阻抑ECM合成与促炎因子产生^[15,16]. OM有多方面的药理作用, 尤其在抗肝纤维化有显著疗效^[17,18], 近期研究表明OM还可以抑制体外培养的细胞株所携带的乙型肝炎病毒^[19]. 用30、60、100 mg/kg OM给大鼠灌胃或者腹腔内注射可以预防大鼠肝纤维化发生^[20]. 本实验用100 mg/kg OM分别于同时、1 wk后干预模型组大鼠发现, 经OM干预后, 小叶间蓝染的胶原纤维明显减少, 胰腺纤维化程度减轻, I型胶原及 α -SMA的表达较模型组减少. 为进一步验证OM对 α -SMA表达的影响, 用Western blot法检测胰腺组织中 α -SMA的相对含量发现, α -SMA在模型组较对照组显著增高, OM干预后可降低其表达, 说明OM可以抑制PSC从静止向活化的转化, 通过减少胰腺组织内胶原的生成及 α -SMA的表达抑制胰腺纤维化的发展.

4 参考文献

- 1 Matsumura N, Ochi K, Ichimura M, Mizushima T, Harada H, Harada M. Study on free radicals and pancreatic fibrosis--pancreatic fibrosis induced by repeated injections of superoxide dismutase inhibitor.

■同行评价

本研究科学性、创新性均较好,有一定的基础研究水平。

- 2 Yadav D, Hawes RH, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA, Bishop MD, Baillie J, Sherman S, DiSario J, Burton FR, Gardner TB, Amann ST, Gelrud A, Lawrence C, Elinoff B, Greer JB, O'Connell M, Barmada MM, Slivka A, Whitcomb DC. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med* 2009; 169: 1035-1045
- 3 Jerrells TR, Vidlak D, Strachota JM. Alcoholic pancreatitis: mechanisms of viral infections as cofactors in the development of acute and chronic pancreatitis and fibrosis. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 430-439
- 4 Kikuta K, Masamune A, Satoh M, Suzuki N, Satoh K, Shimosegawa T. Hydrogen peroxide activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in pancreatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 2006; 291: 11-20
- 5 Tanioka H, Mizushima T, Shirahige A, Matsushita K, Ochi K, Ichimura M, Matsumura N, Shinji T, Tanimoto M, Koide N. Xanthine oxidase-derived free radicals directly activate rat pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 537-544
- 6 Watanabe S, Nagashio Y, Asaumi H, Nomiyama Y, Taguchi M, Tashiro M, Kihara Y, Nakamura H, Otsuki M. Pressure activates rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1175-G1181
- 7 Neuschwander-Tetri BA, Bridle KR, Wells LD, Marcu M, Ramm GA. Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells. *Lab Invest* 2000; 80: 143-150
- 8 Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Externally applied pressure activates pancreatic stellate cells through the generation of intracellular reactive oxygen species. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G972-G978
- 9 陈捷, 余晓云, 侯晓华. 脂质过氧化在胰腺纤维化形成中的作用. *胰腺病学* 2007; 7: 100-103
- 10 Madro A, Korolczuk A, Czechowska G, Celiński K, Słomka M, Prozorow-Król B, Korobowicz E. RAS inhibitors decrease apoptosis of acinar cells and increase elimination of pancreatic stellate cells after in the course of experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 2: 239-249
- 11 Tasci I, Deveci S, Isik AT, Comert B, Akay C, Mas N, Inal V, Yamanel L, Mas MR. Allopurinol in rat chronic pancreatitis: effects on pancreatic stellate cell activation. *Pancreas* 2007; 35: 366-371
- 12 McCarroll JA, Phillips PA, Santucci N, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut* 2006; 55: 79-89
- 13 Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma block activation of pancreatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 141-147
- 14 Shimizu K, Shiratori K, Hayashi N, Kobayashi M, Fujiwara T, Horikoshi H. Thiazolidinedione derivatives as novel therapeutic agents to prevent the development of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2002; 24: 184-190
- 15 Shimizu K, Shiratori K, Kobayashi M, Kawamata H. Troglitazone inhibits the progression of chronic pancreatitis and the profibrogenic activity of pancreatic stellate cells via a PPARgamma-independent mechanism. *Pancreas* 2004; 29: 67-74
- 16 Hisada S, Shimizu K, Shiratori K, Kobayashi M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand prevents the development of chronic pancreatitis through modulating NF-kappaB-dependent proinflammatory cytokine production and pancreatic stellate cell activation. *Rocz Akad Med Białymst* 2005; 50: 142-147
- 17 Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Fang JY, Song YL, Shen ZH, Cao AP. Inhibitory effect of oxymatrine on serum hepatitis B virus DNA in HBV transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1176-1179
- 18 Liu J, Manheimer E, Tsutani K, Gluud C. Medicinal herbs for hepatitis C virus infection: a Cochrane hepatobiliary systematic review of randomized trials. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 538-544
- 19 聂红明, 陈建杰, 高月求, 金树根, 王灵台. 苦参碱与氧化苦参碱体外抗乙肝病毒的比较. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 4046-4050
- 20 白静丽, 杨世忠. 氧化苦参碱对肝纤维化大鼠血清中 MMP-2、MMP-9和TGF-β1的影响. *中国老年学杂志* 2006; 26: 510-511

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》 2008年影响因子 0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统,在“万方数据-数字化期刊群”基础上,结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),以我国正式出版的各学科6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据,严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后,进行规范化处理和有效链接,经统计分析,编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3 683次,影响因子0.729,即年指标0.142,引用期刊数732,学科扩散指标0.533,被引半衰期4.303,H指数8。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

0.2–0.4 T静磁场对肿瘤细胞生长和黏附功能的影响

曹建平, 蹇爱荣, 张维, 商澎

曹建平, 蹇爱荣, 张维, 商澎, 西北工业大学生命科学院 空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室 特殊环境生物物理学研究所 陕西省西安市 710072

曹建平, 2005年西北大学硕士, 主要从事磁场生物学效应的研究。国家自然科学基金资助项目, No. 30670520

作者贡献分布: 此课题由曹建平、蹇爱荣及商澎设计; 研究过程主要由曹建平与张维完成; 论文写作由曹建平完成。

通讯作者: 商澎, 教授, 710072, 陕西省西安市友谊西路127号, 西北工业大学生命科学院。shangpeng@nwpu.edu.cn
电话: 029-88460391

收稿日期: 2009-12-30 修回日期: 2010-04-20

接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-08

Effects of exposure to static magnetic fields (0.2-0.4 T) on the growth and adhesion of tumor cells

Jian-Ping Cao, Ai-Rong Qian, Wei Zhang, Peng Shang

Jian-Ping Cao, Ai-Rong Qian, Wei Zhang, Peng Shang, Key Laboratory for Space Biosciences & Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670520

Correspondence to: Professor Peng Shang, Key Laboratory for Space Biosciences & Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, Shaanxi Province, China. shangpeng@nwpu.edu.cn

Received: 2009-12-30 Revised: 2010-04-20

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of exposure to moderate-intensity static magnetic fields on the growth and adhesion of tumor cells.

METHODS: After SMMC-7721, HepG2 and MCF-7 cells were exposed to static magnetic fields (0.2-0.4 T), cell growth was measured by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay, cell adhesion to fibronectin (FN) was detected by crystal violet staining, and cell cycle distribution was evaluated by flow cytometry.

RESULTS: The effects of exposure to static magnetic fields on different cell types differed greatly. Moderate-intensity static magnetic field exposure did not affect cell growth, but reduced

cell adhesion to FN (1.847 ± 0.342 vs 1.094 ± 0.33 , $P = 0.012$) and decreased the percentage of cells in G₂/M phase (12.05 ± 1.14 vs 3.74 ± 0.87 , $P = 0.018$) in SMMC-7721 cells. In MCF-7 cells, moderate-intensity static magnetic field exposure promoted cell growth, enhanced cell adhesion to FN (1.094 ± 0.076 vs 2.177 ± 0.474 , $P = 0.017$) and increased the percentage of cells in G₂/M phase ($4.42\% \pm 1.23\%$ vs $12.04\% \pm 1.65\%$, $P = 0.004$). In HepG2 cells, cell growth was inhibited and cell cycle was blocked in G₂ phase (0.305 ± 0.076 vs 0.394 ± 0.089 , $P = 0.467$) after exposure to moderate-intensity static magnetic fields though cell adhesion to FN was not significantly altered ($1.90\% \pm 0.79\%$ vs $0.24\% \pm 0.15\%$, $P = 0.046$).

CONCLUSION: Exposure to moderate-intensity static magnetic fields (0.2-0.4 T) exerts different effects on cell growth, adhesion and cell cycle progression in different types of tumor cells.

Key Words: Moderate-intensity static magnetic field; Tumor cell; Proliferation; Adhesion; Cell cycle

Cao JP, Qian AR, Zhang W, Shang P. Effects of exposure to static magnetic fields (0.2-0.4 T) on the growth and adhesion of tumor cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1337-1343

摘要

目的: 研究0.2-0.4 T中强静磁场对肿瘤细胞生长和黏附的影响。

方法: 用0.2-0.4 T静磁场对SMMC-7721、HepG2和MCF-7细胞曝磁处理后, 用噻唑蓝(MTT)法检测中强磁场对SMMC-7721、HepG2和MCF-7细胞生长增殖的影响。通过结晶紫染色检测细胞对FN黏附能力的变化, 并应用流式细胞技术检测中强磁场对肿瘤细胞周期的影响。

结果: 中强磁场影响SMMC-7721、HepG2和MCF-7细胞的生长和黏附功能。中强磁场对不同的肿瘤细胞有不同的效应, 对SMMC-7721的生长没有明显的影响, 但降低SMMC-7721黏附能力(1.847 ± 0.342 vs 1.094 ± 0.33 , $P =$

■背景资料

磁场的细胞生物学效应是磁场和细胞共同作用的结果, 是与两者的参数密切相连的。磁场参数包括磁场类型、场强大小、均匀性、方向性、作用时间等; 细胞因子包括细胞的磁性、种类、敏感性、作用部位等, 这些参数都是影响磁场细胞生物学效应的主要因素。磁场对肿瘤细胞影响的规律和机制有待进一步深入研究。

■同行评议者

陈洪, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科; 莫卫东, 副教授, 安徽省立医院肝脏外科

■相关报道

Tenuzzo等研究了多种细胞包括正常细胞和转化细胞,发现这些细胞的增殖一样也是各不相同,其中对HepG2细胞的研究同样表现为抑制作用。

0.012),与对照组相比SMMC-7721细胞周期的G2/M的百分比降低($12.05\% \pm 1.14\%$ vs $3.74\% \pm 0.87\%$, $P = 0.018$).而对于MCF-7细胞,中强磁场促进细胞的增殖,增强细胞对FN的黏附能力(1.094 ± 0.076 vs 2.177 ± 0.474 , $P = 0.017$),使其G₂/M的百分比降低($4.42\% \pm 1.23\%$ vs $12.04\% \pm 1.65\%$, $P = 0.004$). HepG2细胞在中强磁场中,细胞的增殖受到抑制,对FN的黏附能力没有明显的变化(0.305 ± 0.076 vs 0.394 ± 0.089 , $P = 0.467$),但G₂/M的百分比有所升高($1.90\% \pm 0.79\%$ vs $0.24\% \pm 0.15\%$, $P = 0.046$).

结论: 0.2-0.4 T中强静磁场对不同的肿瘤细胞有不同的影响。

关键词: 中强静磁场; 肿瘤细胞; 增殖; 黏附; 细胞周期

曹建平, 蹇爱荣, 张维, 商澎. 0.2-0.4 T静磁场对肿瘤细胞生长和黏附功能的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1337-1343

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1337.asp>

0 引言

随着科学和技术水平的提高,人们在自然环境中面临的磁场辐射越来越多,有低频电磁场、高频电磁场、脉冲磁场、旋转磁场、静磁场、强磁场等,不同类型磁场的生物效应在多种生物系统上曾有过研究^[1]. 不同的磁场对人类的健康有不同的影响^[2]. 有研究报道,由高压线产生的高频电磁场使居住于其附近的未成年人的白血病产生的机会大幅增加^[2],而低频点磁场对细胞的形态、增殖、周期、染色体结构、基因表达等均会产生影响^[3]. 但并非电磁场没有有益的方面,结合静磁场在一些疾病的治疗中已经得到应用. Haddad等^[4]运用电磁场来治疗骨质疾病就取到良好的效果. 近几年通过对静磁场生物学效应的研究,发现其对生命活动的影响也会因不同的生物体而产生不同的效应^[5],虽然磁场对离体培养的肿瘤细胞影响的研究报道较多^[6],磁场抑制肿瘤的动物实验的报道也不少^[7,8],但这些研究主要集中在低频或高频电磁场方面,而静磁场对离体培养的肿瘤细胞影响的研究比较少。

磁场的细胞生物学效应是磁场和细胞共同作用的结果,是与两者的参数密切相连的. 磁场参数包括磁场类型、场强大小、均匀性、方向性、作用时间等;细胞因子包括细胞的磁性、种类、敏感性、作用部位等,这些参数都是影

响磁场细胞生物学效应的主要因素^[9,10]. 磁场对肿瘤细胞影响的规律和机制有待进一步深入研究. 本文报道了由大梯度强磁场产生的中强度静磁场(0.2-0.4 T)对不同肿瘤细胞的增殖、细胞周期和黏附能力所产生的影响特征,期望能对临床利用磁场治疗肿瘤提供理论依据,并为磁场环境对生命活动的影响机制作一些初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基(Gibco™, Invitrogen Corporation)、MEM培养基(Hyclone), L-15培养基(CO₂非依赖培养基, Gibco™, Invitrogen Corporation), 胎牛血清(Gibco™, Invitrogen Corporation), 胰岛素[诺和灵, 诺和诺德(中国)制药有限公司], 青霉素(Penicillin, Amresco), 链霉素(Streptomycin, Solarbio), 胰蛋白酶(Trypsase, Amresco)、噻唑蓝(MTT, Amresco)、二甲基亚砷(DMSO), 其余试剂皆为国产分析纯制剂. CO₂培养箱(Thermo), 超导磁体(JMTA-16T50MF, 日本JASTEC), 酶标仪(Model 680, Bio-Rad), 流式细胞仪(FACSCalibur, BD).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: SMMC-7721肝癌细胞、HepG2肝癌细胞和MCF-7乳腺癌细胞均购自上海细胞库. SMMC-7721肝癌细胞培养于10%小牛血清、100 kU/L青霉素及100 kU/L链霉素的RPMI 1640培养基中; HepG2肝癌细胞常规培养于10%小牛血清、100 kU/L青霉素及100 kU/L链霉素的MEM培养基中; MCF-7乳腺癌细胞常规培养于10%小牛血清、0.2 kU/L胰岛素、100 kU/L青霉素及100 kU/L链霉素的MEM培养基中. 在37℃、饱和湿度及50 mL/L CO₂的细胞培养箱内培养, 2-3 d传代1次,以维持细胞处于对数成长期。

1.2.2 磁场环境: 超导磁体产生的外周中强磁场(0.2-0.4 T)环境. 超导磁体在其外部环境中产生一个0.2-0.4 T的静磁场环境. 在这一磁场强度区域内,本研究制作一个铜制的培养箱,并用热循环水控制其温度于37℃. 将培养的对数期SMMC-7721、HepG2和MCF-7细胞用L-15培养基(CO₂非依赖培养基)在50 mm培养皿中并置于0.2-0.4 T的中强磁场中, 37℃密闭培养. 对照组细胞置于普通培养箱中,也用L-15培养基与50 mm培养皿中37℃密闭培养。

1.2.3 MTT法检测中强磁场对肿瘤细胞生长的影响: 先将SMMC-7721、HepG2和MCF-7细胞以

2×10^4 的接种量接种于酶标条中, 37°C , 5 mL/L CO_2 预培养过夜. 将酶标条中的培养基换为L-15培养基, 密封并置于0.2–0.4 T的中强磁场中 37°C 连续培养72 h, 每隔6 h, 加入MTT液继续培养4 h, 然后每孔加入DMSO 100 μL , 振荡混匀后用酶标仪测定每孔 $A_{490\text{nm}}$ 值. 用GraphPad Prism 5.0软件绘制生长曲线. 对照组的处理, 除了在普通培养箱中培养外, 其他均与曝磁组相同.

1.2.4 流式细胞技术检测中强磁场对肿瘤细胞周期的影响: 先将细胞SMMC-7721、HepG2和MCF-7用血清饥饿法进行同步培养, 然后以 2×10^5 的接种量接种于50 mm培养皿中, 在 37°C , 50 mL/L CO_2 预培养过夜. 换用L-15培养基, 密封并置于0.2–0.4 T的中强磁场中 37°C 培养过夜. 消化后调整细胞浓度为 1×10^6 . 离心除去上清液. 加入1 mL的DNA低渗缓冲液(0.1%柠檬酸三钠、0.3% Triton X-100、0.01% PI和0.002%核糖核酸酶)使细胞悬浮, 4°C 避光, 30 min后用流式细胞仪检测细胞周期. 对照组的处理, 除了在普通培养箱中培养外, 其他均与曝磁组相同.

1.2.5 结晶紫染色法检测中强磁场对肿瘤细胞黏附的影响: 用FN(1 g/L)包被酶标条: 每孔加入5 μL 的FN, 4°C 过夜. 用0.1% FBS(SMMC-7721用RPMI 1640培养基配制, HepG2和MCF-7细胞用MEM培养基配制)洗3次. 再用0.5% FBS 37°C 封闭1 h. 然后每孔加入100 μL $5 \times 10^8/\text{L}$ 的细胞, 与0.2–0.4 T的磁场中培养1.5 h, 使细胞与细胞外基质黏附. 然后用PBS清洗加样孔以除去未黏附的细胞. 950 mL/L乙醇固定15 min后, 弃去乙醇, 加入100 μL 0.5%结晶紫, 室温30 min, 弃去结晶紫, 用PBS洗加样孔至无色, 再加入10%乙酸10 min, 最后用酶标仪测定570 nm的吸光度. 对照组除了在 37°C 培养箱中培养外, 其他均与实验组相同. 另外空白对照组, 除了未加细胞外其余的过程与对照组和实验组相同.

统计学处理 测定值以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. 采用GraphPad Prism 5.0软件进行数据分析. 组间比较采用多样本均数的Two-way ANOVA检验. 两组均数比较采 t 检验. $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示有显著性差异.

2 结果

2.1 中强磁场对肿瘤细胞增殖的影响 中强磁场对不同的肿瘤细胞的增殖有不同的效应. 从图1中可以看到, 0.2–0.4 T的磁场对SMMC-7721细胞的生长基本上没有影响, 从生长曲线上看对

照组和实验组的生长曲线几乎完全重叠. 但是0.2–0.4 T的磁场对HepG2和MCF-7细胞的生长影响却很大. 0.2–0.4 T的静磁场对MCF-7细胞的生长有促进作用, 而对HepG2细胞的生长有抑制作用. 因此可以看到0.2–0.4 T的静磁场对不同的肿瘤细胞的生长会产生有不同的效果.

2.2 中强磁场影响肿瘤细胞的细胞周期 由图2–4和表1可以看到中强磁场对不同肿瘤细胞的细胞周期影响是不同的. SMMC-7721和HepG2细胞的细胞周期在磁场中 G_2 期细胞的比例减少, 这说明磁场促进了细胞由 G_2 期到M期的转化. 与对照组相比SMMC-7721细胞周期的 G_2/M 的百分比降低($12.05\% \pm 1.14\%$ vs $3.74\% \pm 0.87\%$, $P = 0.018$). 而对于MCF-7细胞则正好相反, 在 G_2 期内抑制细胞周期地进行, 其 G_2/M 的百分比降低($4.42\% \pm 1.23\%$ vs $12.04\% \pm 1.65\%$, $P = 0.004$).

2.3 中强磁场影响肿瘤细胞对细胞外基质FN的黏附 黏附能力是癌细胞侵蚀的始动步骤, 高侵袭的肿瘤细胞与基底膜成分的异质性黏附能力通常增高. 黏附实验表明, 中强磁场对肿瘤细胞对细胞外基质FN的黏附能力的影响随细胞的不同而有差异. 由图5可以看到, 在0.2–0.4 T的磁场中, 与对照组相比MCF-7细胞对FN黏附能力增强(1.094 ± 0.076 vs 2.177 ± 0.474 , $P = 0.017$), 而SMMC-7721细胞对FN黏附能力减弱(1.847 ± 0.342 vs 1.094 ± 0.33 , $P = 0.012$), 但是0.2–0.4 T的磁场对HepG2细胞对FN黏附能力基本上没有影响(0.305 ± 0.076 vs 0.394 ± 0.089 , $P = 0.467$). 因此, 磁场对不同的肿瘤细胞黏附能力有不同的效应.

3 讨论

近几年来对磁场的细胞生物学效应的研究发现, 磁场对细胞的影响表现在多个层次. 在分子水平上, 磁场对蛋白质等生物大分子产生效应. 由于磁场产生的磁力矩的作用, 会是默写蛋白质的结构和功能发生变化. 如在增殖的GH3细胞中电压激活的 Na^+ 流在125 mT的磁场中则减少^[11]. 这是由于磁场的作用使 Na^+ 通道发生改变. 磁场同样也影响基因的表达, 而且这种影响因不同的基因而异. 100 mT的静磁场处理小鼠海马神经元细胞会增加生长相关蛋白-43(AP-1)的表达^[12], 0.18–0.2 T的静磁场处理HelaS3细胞也会增加c-fos mRNA在细胞中表达增加^[13]. 而0.5 T处理人外周血单核细胞, 虽然细胞中IFN- γ 和IL-4的表达增加, 但其CD69的表达却会降

■创新盘点

本文报道了由大梯度强磁场产生的中强度静磁场(0.2–0.4 T)对不同肿瘤细胞的增殖、细胞周期和黏附能力所产生的影响特征, 期望能对临床利用磁场治疗肿瘤提供理论依据, 并为磁场环境对生命活动的影响机制作一些初步研究.

■应用要点

大量的研究报道表明,一定强度的静磁场可以抑制肿瘤的生长,这为应用磁场治疗肿瘤提供了实验依据。

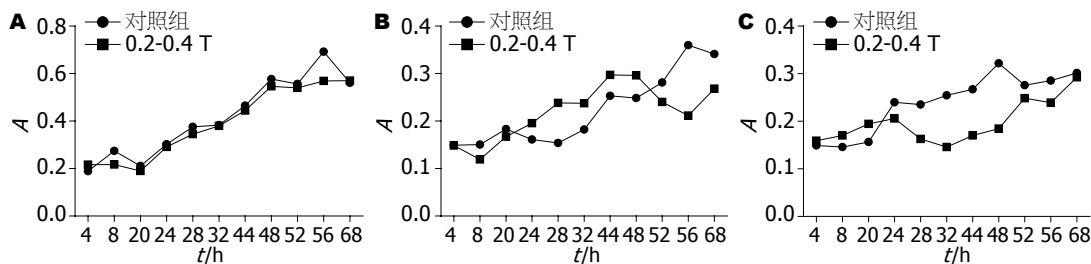


图 1 0.2-0.4 T的中强磁场对SMMC-7721、MCF-7和HepG2细胞增殖的影响. A: SMMC-7721; B: MCF-7; C: HepG2.

表 1 SMMC-7721、HepG2和MCF-7细胞曝磁后的细胞周期分析结果 ($n = 3$, %, mean \pm SD)

细胞	分组	G ₁	S	G ₂ /M
SMMC-7721	对照组	65.42 \pm 3.01	22.54 \pm 1.17	12.05 \pm 1.14
	曝磁组	74.44 \pm 2.23	21.81 \pm 0.98	3.74 \pm 0.87 ^a
HepG2	对照组	67.10 \pm 1.69	31.00 \pm 2.51	1.90 \pm 0.79
	曝磁组	64.70 \pm 2.43	35.06 \pm 1.93	0.24 \pm 0.15 ^a
MCF-7	对照组	47.44 \pm 2.22	48.14 \pm 2.37	4.42 \pm 1.23
	曝磁组	43.96 \pm 1.32	44.00 \pm 0.88	12.04 \pm 1.65 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

低^[14]. 磁场对基因及其表达的影响, 主要取决于对磁场的敏感性和表达与磁场的相关性. 在细胞结构层次上, 磁场首先会影响细胞的形态. 在0.2 T磁场中, 人神经细胞(FNC-B4)的形态发生明显地改变, 显示细胞涡流的形成和分枝神经炎特点的突触终扣的出现^[15]. 细胞的形态受到影响则细胞的结构和功能势必也会受到影响. 大鼠的肾细胞和皮层星形胶质细胞在0.5 mT的静磁场中, 随处理时间的延伸, 其增殖会逐渐降低^[16]. 在静磁场中, 细胞的代谢活动也会受到影响. 在0.2 T的静磁场中人成纤维细胞的乳酸盐产生率、葡萄糖消耗均出现明显的改变^[17]. 磁场常常能促进由诱导剂引起的细胞凋亡. 6 mT磁场能促进由喜树碱诱导的HL-60细胞的凋亡^[18]. 同样7 mT磁场也能促进由FeCl₂诱导的淋巴细胞的凋亡^[19]. 最有趣的是磁场会影响体外培养细胞的排列. 镰刀型红细胞在0.35 T的磁场中, 其长轴定向地与磁场垂直^[20], 而作用于正常的红细胞, 红细胞的盘平面与磁场方向平行^[21]. 在4.0 T的磁场中, 人的包皮成纤维细胞^[22]、成骨细胞^[23]也会发生定向排列反应. 这可能是由于细胞中含有某些抗磁性的物质, 使某些细胞及其结构在磁场中沿一定方向排列. 由于这一特征, 也为细胞组织工程提供一很好的方法.

本研究的结果表明, 中强静磁场对肿瘤细胞的影响因不同的细胞有很大差异. 对于

SMMC-7721和HepG2细胞, 虽然他们均为肝癌细胞, 但来源不同所受到磁场的作用也不相同. 中强静磁场对SMMC-7721细胞的增殖不产生影响, 但却明显抑制HepG2细胞的增殖. 对于不同组织来源的细胞-乳腺癌细胞, 其增殖在中强静磁场中表现出较为复杂的变化. 在培养52 h以前, 磁场促进了MCF-7细胞的增殖. 但随后细胞的增殖明显的受到抑制. 这可能的原因是在初期细胞的生长受到促进, 培养基的营养消耗快, 对于细胞生长有害的物质积累也比较快的原因造成的. 静磁场对不同的细胞增殖有不同的效应. Tenuzzo等^[24]研究了多种细胞包括正常细胞和转化细胞, 发现这些细胞的增殖一样也是各不相同, 其中对HepG2细胞的研究同样表现为抑制作用. 大量的研究报道表明, 一定强度的静磁场可以抑制肿瘤的生长, 这为应用磁场治疗肿瘤提供了实验依据^[25-27].

对于黏附能力来说, SMMC-7721细胞的黏附能力明显受到磁场的抑制, 而HepG2细胞的黏附能力在磁场中没有明显的变化. 两种细胞的G₂/M细胞的百分比均明显降低, 差异很显著. 然而对于MCF-7细胞来说, 磁场却明显促进了其黏附能力. 这说明磁场对肿瘤细胞的功能产生一定的影响, 但这种影响因细胞的不同而各有差异. 这种现象同样也表现在磁场对细胞周期的影响中. 对于SMMC-7721细胞来说, G₀/G₁细胞

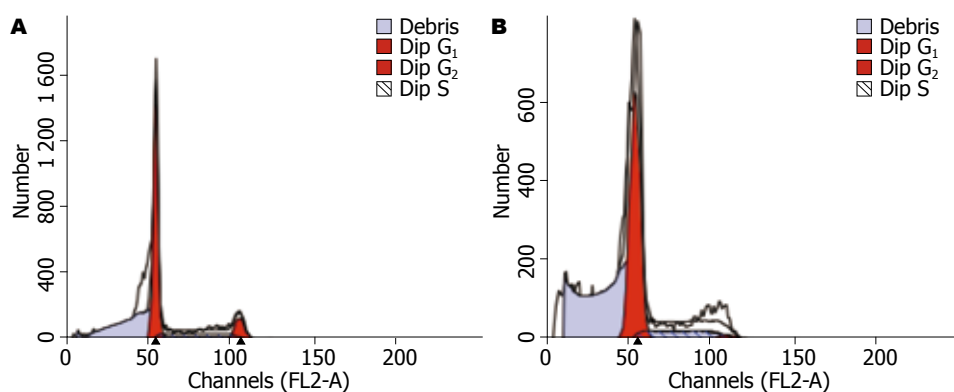


图 2 0.2–0.4 T中强磁场对SMMC-7721细胞周期影响的流式细胞仪分析结果. A: 对照组; B: 曝磁组.

同行评价

本研究设计尚合理, 讨论较全面, 文中所列图表及其说明比较清楚可靠, 内容较新颖, 有一定创新性, 学术价值较好.

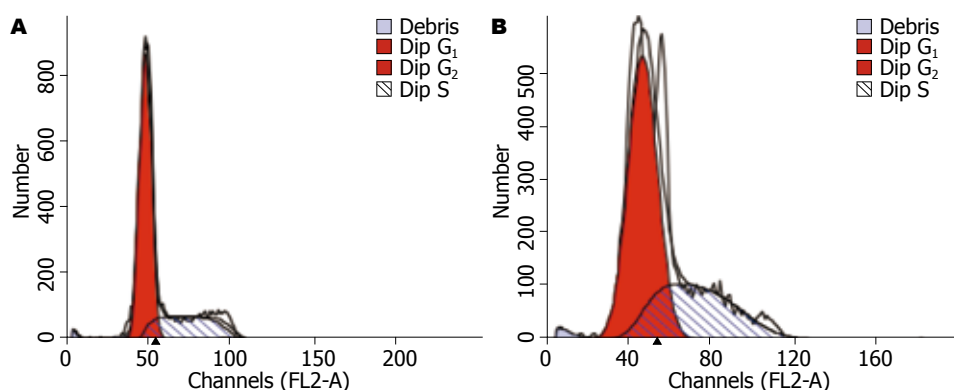


图 3 0.2–0.4 T中强磁场对HepG2细胞周期影响的流式细胞仪分析结果. A: 对照组; B: 曝磁组.

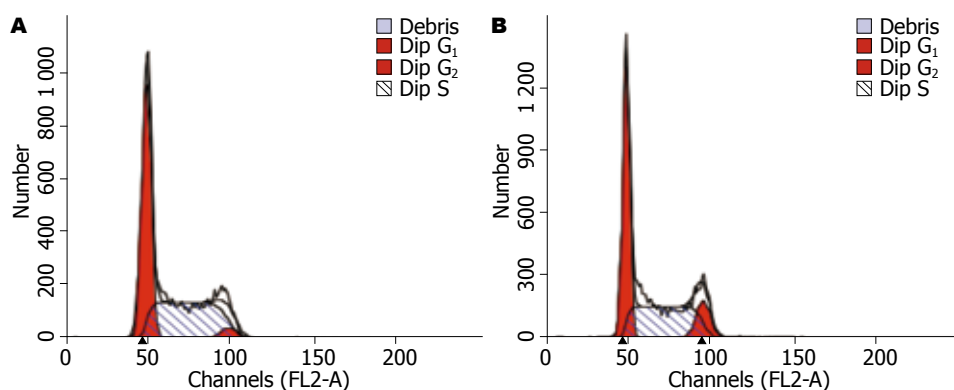


图 4 0.2–0.4 T中强磁场对MCF-7细胞周期影响的流式细胞仪分析结果. A: 对照组; B: 曝磁组.

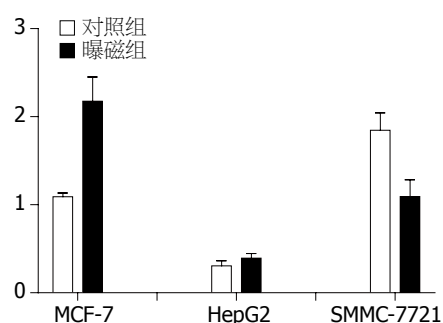


图 5 0.2–0.4 T中强磁场对SMMC-7721、MCF-7和HepG2细胞黏附的影响.

的百分比增加, 其可能的机制是磁场促进了静止态的G₁期细胞活跃而向S期转变, 使DNA合成增多. 而HepG2细胞G₀/G₁细胞的百分比变化不明显, 但细胞的增殖受到抑制, 这说明细胞的在

M期的生长过程受到了磁场的影响. MCF-7细胞在中强静磁场中的生长也明显受到影响. 磁场促进了MCF-7细胞的增殖, 但促进了细胞的黏附能力, G₂/M细胞的百分比明显增加. 推测肿瘤细胞的DNA合成受到静磁场的影响和调节. 结合磁场对肿瘤细胞增殖的影响结果来看, 磁场对肿瘤细胞的影响在不同方面其结果是不相同的, 这说明在应用磁场治疗肿瘤的应用中还要考虑到肿瘤的种类和特征.

MCF-7细胞在中强静磁场中所受到的影响与SMMC-7721细胞和HepG2细胞所受到磁场的影响结果几乎相反, 这说明不同组织来源的细胞所受到磁场的作用是不同的. 我们知道, 组成机体的物质按磁性本质特征分为顺磁性物质和抗磁性物质, 并且这两种物质在磁场中表现

出的物理本质现象是不同的. 肝脏作为机体代谢的重要器官, 含有大量的顺磁性物质, 如Fe, 那么由此来源的细胞所含顺磁性物质也必定高于其他组织来源的细胞. 蹇爱荣等^[28]研究发现, 强磁重力环境影响成骨细胞的形态、增殖以及细胞中钙、钠、镁等元素百分含量. 由此可见, 他们势必在磁场中表现出不同的效应.

虽然静磁场的细胞生物学效应复杂, 其生物安全性还需要进一步的研究探索. 在应用磁场对肿瘤的治疗中还应考虑到静磁场对正常细胞的影响. 磁场对正常细胞的影响也表现在多个方面, 对其增殖、细胞的结构和功能也会产生影响^[29-31]. 如磁场对MC-3T3细胞的增殖以及结构和功能产生影响. 但这些并未阻碍磁场在临床中的应用. 但近年来强静磁场甚至是超强静磁场在医疗上已经展开了应用. 如现在运用的核磁共振成像检测疾病时, 就运用了很强的静磁场, 且这一强度有的甚至达到 $10\text{ T}^{[32]}$. 也有人将磁场与放疗、化疗联合应用于恶性肿瘤的临床治疗. 柳霞等^[33]的研究显示, 联合磁场与化疗治疗恶性肿瘤并未发现明显的不良反应, 所有患者均能耐受. Letiagin等^[34]应用磁场联合放疗、化疗治疗局部晚期乳腺癌患者, 取得了很好的疗效, 并未增加副反应的发生. 但磁场对肿瘤细胞所产生的影响因细胞的不同而异. 在应用磁场对肿瘤治疗的同时, 还应考虑磁场的特征和肿瘤细胞的特征.

4 参考文献

- Funk RH, Monsees T, Ozkucur N. Electromagnetic effects - From cell biology to medicine. *Prog Histochem Cytochem* 2009; 43: 177-264
- Hardell L, Sage C. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 104-109
- Miyakoshi J. Biological responses to extremely low-frequency electromagnetic fields. *J Dermatol Sci* 2006; 2: 23-30
- Haddad JB, Obolensky AG, Shinnick P. The biologic effects and the therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: new findings and a review of earlier work. *J Altern Complement Med* 2007; 13: 485-490
- Silva AK, Silva EL, Egito ES, Carriço AS. Safety concerns related to magnetic field exposure. *Radiat Environ Biophys* 2006; 45: 245-252
- Cameron IL, Short NJ, Markov MS. Safe alternative cancer therapy using electromagnetic fields. *Environmentalist* 2007; 27: 453-456
- Hashish AH, El-Missiry MA, Abdelkader HI, Abou-Saleh RH. Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007 Nov 7. [Epub ahead of print]
- Yang PF, Hu LF, Wang Z, Ding C, Zhang W, Qian AR, Shang P. Inhibitory effects of moderate static magnetic field on Leukemia. *IEEE Trans Magn* 2009; 45: 2136-2139
- Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Prog Biophys Mol Biol* 2005; 87: 213-223
- Schenck JF. Physical interactions of static magnetic fields with living tissues. *Prog Biophys Mol Biol* 2005; 87: 185-204
- Rosen AD. Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Na^+ channels in GH3 cells. *Bioelectromagnetics* 2003; 24: 517-523
- Hirai T, Nakamichi N, Yoneda Y. Activator protein-1 complex expressed by magnetism in cultured rat hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 200-207
- Hiraoka M, Miyakoshi J, Li YP, Shung B, Takebe H, Abe M. Induction of c-fos gene expression by exposure to a static magnetic field in HeLaS3 cells. *Cancer Res* 1992; 52: 6522-6524
- Salerno S, Lo Casto A, Caccamo N, d'Anna C, de Maria M, Lagalla R, Scola L, Cardinale AE. Static magnetic fields generated by a 0.5 T MRI unit affects in vitro expression of activation markers and interleukin release in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 457-463
- Pacini S, Vannelli GB, Barni T, Ruggiero M, Sardi I, Pacini P, Gulisano M. Effect of 0.2 T static magnetic field on human neurons: remodeling and inhibition of signal transduction without genome instability. *Neurosci Lett* 1999; 267: 185-188
- Buemi M, Marino D, Di Pasquale G, Floccari F, Senatore M, Aloisi C, Grasso F, Mondio G, Perillo P, Frisina N, Corica F. Cell proliferation/cell death balance in renal cell cultures after exposure to a static magnetic field. *Nephron* 2001; 87: 269-273
- Yamaguchi H, Hosokawa K, Soda A, Miyamoto H, Kinouchi Y. Effects of seven months' exposure to a static 0.2 T magnetic field on growth and glycolytic activity of human gingival fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1156: 302-306
- Teodori L, Grabarek J, Smolewski P, Ghibelli L, Bergamaschi A, De Nicola M, Darzynkiewicz Z. Exposure of cells to static magnetic field accelerates loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. *Cytometry* 2002; 49: 113-118
- Jajte J, Grzegorzczak J, Zmysłony M, Rajkowska E. Effect of 7 mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: apoptosis, necrosis and free radical processes. *Bioelectrochemistry* 2002; 57: 107-111
- Murayama M. Orientation of sickled erythrocytes in a magnetic field. *Nature* 1965; 206: 420-422
- Higashi T, Yamagishi A, Takeuchi T, Kawaguchi N, Sagawa S, Onishi S, Date M. Orientation of erythrocytes in a strong static magnetic field. *Blood* 1993; 82: 1328-1334
- Guido S, Tranquillo RT. A methodology for the systematic and quantitative study of cell contact guidance in oriented collagen gels. Correlation of fibroblast orientation and gel birefringence. *J Cell Sci* 1993; 105 (Pt 2): 317-331
- Kotani K, Iwasaka M, Ueno S. Magnetic orientation of collagen and bone mixture. *J Appl Phys* 2000; 87: 6191-6193
- Tenuzzo B, Chionna A, Panzarini E, Lanubile R,

- Tarantino P, Di Jeso B, Dwikat M, Dini L. Biological effects of 6 mT static magnetic fields: a comparative study in different cell types. *Bioelectromagnetics* 2006; 27: 560-577
- 25 朱杰西. 稳恒磁场抑制肿瘤增殖的实验研究与理论探讨. *现代生物医学进展* 2006; 6: 10-13
- 26 杨逢瑜. 磁场对肿瘤细胞的抑制作用. *生物磁学* 2004; 4: 1-4
- 27 张沪生. 一定参数的磁场在不同生物层次上抑制恶性肿瘤生长. *生物磁学* 2004; 4: 1-4
- 28 蹇爱荣, 张维, 翁媛媛, 杨鹏飞, 王哲, 商澎. 强磁重力环境对成骨细胞增殖、形态及其主要元素含量的影响. *第四军医大学学报* 2008; 29: 1729-1732
- 29 Qian AR, Zhang W, Tian ZC, Di SM, Yang PF, Yin DC, Hu LF, Wang Z, Xu HY, Shang P. Gravitational environment produced by a superconducting magnet affects osteoblast morphology and functions. *Acta Astronautica* 2008; 63: 929-946
- 30 Qian AR, Hu LF, Gao X, Zhang W, Di SM, Tian ZC, Yang PF, Yin DC, Weng YY, Shang P. Large gradient high magnetic field affects the association of MACF1 with actin and microtubule cytoskeleton. *Bioelectromagnetics* 2009; 30: 545-555
- 31 Qian A, Di S, Gao X, Zhang W, Tian Z, Li J, Hu L, Yang P, Yin D, Shang P. cDNA microarray reveals the alterations of cytoskeleton-related genes in osteoblast under high magneto-gravitational environment. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41: 561-577
- 32 Schenck JF. Safety of strong, static magnetic fields. *J Magn Reson Imaging* 2000; 12: 2-19
- 33 柳霞, 孙诚, 仰劲松, 蒋薇薇. 强磁场结合化疗抗肿瘤协同效应的实验研究. *空军总医院学报* 2001; 17: 156-157
- 34 Letiagin VP, Protchenko NV, Rybakov IuL, Dobrynin IaV. [Experience with turbulent magnetic field as a component of breast cancer therapy] *Vopr Onkol* 2003; 49: 748-751

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 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.

Bmi-1和S100A4蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及其临床病理意义

符仲标, 张 蕾, 李颖霞, 张同贞, 张云汉, 温洪涛

■背景资料

食管癌为我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 尽管人们对食管癌的防治做出了种种努力, 但近几十年来食管癌的5年生存率没有得到明显改善, 这是其早期不易诊断且又易发生侵袭转移的原因。因此, 找到食管癌早期发生及其侵袭与转移的主要调控因子, 将直接影响食管癌的治疗与预后。也是目前人们对食管癌临床和基础研究的主要方向。

符仲标, 李颖霞, 张同贞, 温洪涛, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

张蕾, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052

张云汉, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省郑州市 450052
符仲标, 2008级郑州大学第一附属医院消化内科在读硕士, 主要从事消化系肿瘤的基础与临床研究。

河南省高校杰出科研人才创新工程基金资助项目, No. 2007KYCX005

作者贡献分布: 本课题由温洪涛与张云汉设计; 研究过程及统计分析由符仲标、李颖霞及张同贞完成; 研究所用的材料由张蕾与温洪涛提供; 论文写作由符仲标与张蕾完成; 张云汉审阅。

通讯作者: 温洪涛, 教授, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 河南省郑州大学第一附属医院消化内科。wenhongtao68@163.com
电话: 0371-66295932

收稿日期: 2010-01-14 修回日期: 2010-04-06

接受日期: 2010-04-13 在线出版日期: 2010-05-08

Clinicopathological significance of Bmi-1 and S100A4 expression in esophageal squamous cell carcinoma

Zhong-Biao Fu, Lei Zhang, Ying-Xia Li,
Tong-Zhen Zhang, Yun-Han Zhang, Hong-Tao Wen

Zhong-Biao Fu, Ying-Xia Li, Tong-Zhen Zhang, Hong-Tao Wen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Lei Zhang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Yun-Han Zhang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Innovation Project Foundation for Outstanding Talents in Universities in Henan Province, No. 2007KYCX005

Correspondence to: Professor Hong-Tao Wen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. wenhongtao68@163.com

Received: 2010-01-14 Revised: 2010-04-06

Accepted: 2010-04-13 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To detect the expression of Bmi-1 and S100A4 proteins in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze their clinicopathological significance.

METHODS: The expression of Bmi-1 and S100A4

proteins was detected by immunohistochemistry in 68 ESCC specimens, 45 tumor-adjacent dysplastic tissue specimens and 36 normal esophageal mucosa specimens. Statistical analysis was performed using the chi-square test.

RESULTS: The positive rates of Bmi-1 and S100A4 protein expression differed significantly among ESCC, dysplasia and normal esophageal mucosa (Bmi-1: 57.4%, 48.9%, and 25.0%; S100A4: 48.6%, 26.7%, and 13.9%; all $P < 0.01$). Overexpression of Bmi-1 and S100A4 protein was related with lymph node metastasis and TNM stage in ESCC (all $P < 0.05$). S100A4 protein expression was found to be correlated with the depth of tumor invasion ($P < 0.05$). A positive correlation was also noted between the expression of Bmi-1 and that of S100A4 in ESCC ($r = 0.302$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Overexpression of Bmi-1 and S100A4 proteins is associated with ESCC invasion and metastasis. Combined detection of Bmi-1 and S100A4 protein expression is helpful for evaluation of the prognosis of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Bmi-1; S100A4; Immunohistochemistry

Fu ZB, Zhang L, Li YX, Zhang TZ, Zhang YH, Wen HT. Clinicopathological significance of Bmi-1 and S100A4 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1344-1349

摘要

目的: 探讨Bmi-1和S100A4蛋白在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中的表达及其临床病理意义。

方法: 采用免疫组织化学法分别检测68例食管鳞状细胞癌、45例癌旁异型增生及36例正常食管黏膜组织中Bmi-1及S100A4蛋白的表达, 并分析两者的表达水平与临床病理因素的关系。采用 χ^2 检验进行统计学分析。

结果: Bmi-1蛋白在食管鳞状细胞癌、癌旁异

■同行评议者

李增山, 副教授,
中国人民解放军
第四军医大学病
理教研室

型增生及正常黏膜组织中的阳性表达率分别为57.4%、48.9%、25.0%; S100A4蛋白的阳性表达率分别为48.6%、26.7%、13.9%, 两者在组间的表达差异有统计学意义($P<0.01$)。食管鳞癌组织中Bmi-1和S100A4的蛋白表达与淋巴结转移及TNM分期均密切相关($P<0.05$), 而S100A4的蛋白表达还与肿瘤浸润深度有关($P<0.05$)。两者在食管鳞状细胞癌组织中的表达呈正相关($r=0.302, P<0.05$)。

结论: Bmi-1及S100A4的蛋白表达与食管鳞状细胞癌发生发展密切相关, 联合检测Bmi-1及S100A4两蛋白指标对食管鳞癌的预后判断具有重要的意义。

关键词: 食管鳞状细胞癌; Bmi-1; S100A4; 免疫组织化学

符仲标, 张蕾, 李颖霞, 张同贞, 张云汉, 温洪涛. Bmi-1和S100A4蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及其临床病理意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1344-1349

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1344.asp>

0 引言

Bmi-1(B-cell specific Moloney murine leukaemia virus insertion site 1, Bmi-1)基因, 是在研究转基因鼠白血病过程中发现的一种原癌基因, 他可协同*c-myc*基因共同促进细胞转化和肿瘤形成, 对肿瘤细胞逃逸凋亡具有重要作用, 并直接参与干细胞的自我更新^[1-3]。文献报道, 在人类鼻咽癌、胃癌、大肠癌、乳腺癌等多种肿瘤中Bmi-1均呈现高表达^[4-7], 且与肿瘤的发生发展及患者的预后有关, 但其在食管癌中的作用仅有He等^[8]的1篇报道。S100A4(钙离子结合调节蛋白)是S100蛋白家族成员之一, 其与肿瘤的侵袭转移密切相关^[9]。有关其与肿瘤浸润转移的研究虽有报道, 但联合检测Bmi-1和S100A4蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及相关性研究, 迄今国内外均未见报道。本实验采用免疫组织化学法分别检测Bmi-1及S100A4蛋白在36例正常食管黏膜、45例异型增生和68例食管鳞状细胞癌组织中的表达, 探讨他们与ESCC发生发展的关系及其临床病理意义。

1 材料和方法

1.1 材料 郑州大学第一附属医院2006-2008年手术切除的68例食管癌标本。患者术前均未接受化疗放疗及免疫治疗。其中男39例, 女29例, 年龄37-81岁。病理学均确诊为鳞状细胞癌。其中有淋

巴结转移25例, 无淋巴结转移43例; 浸润深度: 浅层(黏膜固有层或黏膜下层)20例, 深层(肌层或外膜)48例; 据2002年国际抗癌联盟(UICC)食管癌TNM分期: I-IIA 43例, IIB-III 25例。所有标本分别在癌灶、癌旁3 cm以内及手术远端正常黏膜组织3处取材, 均经100 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 4 μm厚的连续切片。兔抗人Bmi-1多克隆抗体购于Abcam公司。即用型兔抗人S100A4多克隆抗体、SP免疫组织化学试剂盒均购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法 免疫组织化学染色采用链酶卵白素-生物素过氧化物酶法(streptavidin peroxidase, SP)。Bmi-1抗体稀释度为1:50, S100A4为工作液, DAB显色, 苏木素复染, 操作步骤严格按照说明书进行。实验中以已知的阳性组织(Bmi-1: 乳腺癌组织; S100A4: 扁桃体组织)作阳性对照, PBS代替一抗作阴性对照。参考冯艳等^[10]计分方法并做适当的修改: 以胞质和/或胞核出现棕黄或黄褐色颗粒为阳性细胞, 随机选取5个高倍视野计数, 以阳性细胞数和着色强度综合判断结果, 其中阳性细胞数记分: $<5\%$ 为0分, $\geq 5\%$ 且 $<25\%$ 为1分, $\geq 25\%$ 且 $<50\%$ 为2分, $\geq 50\%$ 且 $<75\%$ 为3分, $\geq 75\%$ 为4分; 着色强度记分: 阴性染色1分, 弱染色2分, 中等强度染色3分, 强染色4分。两者得分相乘结果: ≤ 3 分者为(-); 4-8分者为(+); >8 分者(++), 以+和++视为阳性。

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行数据分析, 统计方法采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Bim-1蛋白在食管不同组织中的表达及其与ESCC临床生物学行为的关系 Bmi-1蛋白主要在胞质中表达, 呈棕黄或黄褐色颗粒, 少数细胞的胞质和胞核可同时表达(图1)。在肿瘤组织中Bmi-1蛋白呈灶性或弥漫性分布, 以弥漫性为主。Bmi-1蛋白在鳞癌、异型增生及正常食管黏膜组织的阳性表达率分别为: 57.4%、48.9%和25.0%, 组间差异有统计学意义($P<0.01$, 表1)。Bmi-1蛋白在ESCC中的表达与患者的性别、年龄及肿瘤的分化程度、浸润深度均无关($P>0.05$), 但与淋巴结转移及TNM分期有关($P<0.05$, 表2)。

2.2 S100A4蛋白在食管不同组织中的表达及其与ESCC临床生物学行为的关系 S100A4蛋白在正常食管黏膜可见弱着色, 以胞质为主。在癌细胞的胞质中有较强表达, 呈棕黄颗粒, 少数位

■ 研究前沿

Bmi-1基因属于多梳基因家族中的重要成员, 在细胞生长、增殖和干细胞自我更新的过程中发挥着重要的作用。研究发现该基因与人类多种肿瘤的发生、发展密切相关, 并极有可能作为判断恶性肿瘤进展和预后的新的指标。迄今, 有关Bmi-1在食管鳞癌中的研究报道极少。

■相关报道

Kim等应用RT-PCR和免疫组织化学技术对乳腺癌研究发现,与对照组相比,癌组织中的Bmi-1 mRNA水平明显升高.

表 1 不同类型食管组织中Bmi-1和S100A4的表达

组织类别	n	Bmi-1				χ^2 值	P值	S100A4				χ^2 值	P值
		-	+	++	阳性率(%)			-	+	++	阳性率(%)		
鳞癌	68	29	17	22	57.4	9.986	0.007	35	19	14	48.6	14.041	0.001
异型性增生	45	23	12	10	48.9			33	10	2	26.7		
正常黏膜	36	27	8	1	25.0			31	4	1	13.9		

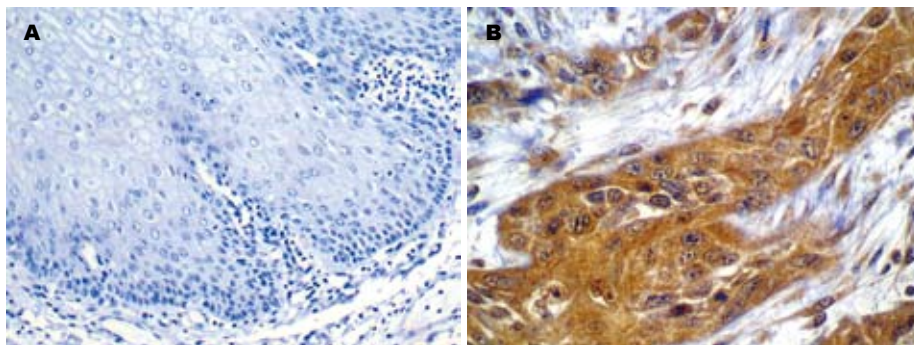


图 1 Bmi-1蛋白的表达. A: 正常黏膜阴性(SP × 100); B: 鳞癌组织强阳性(SP × 200).

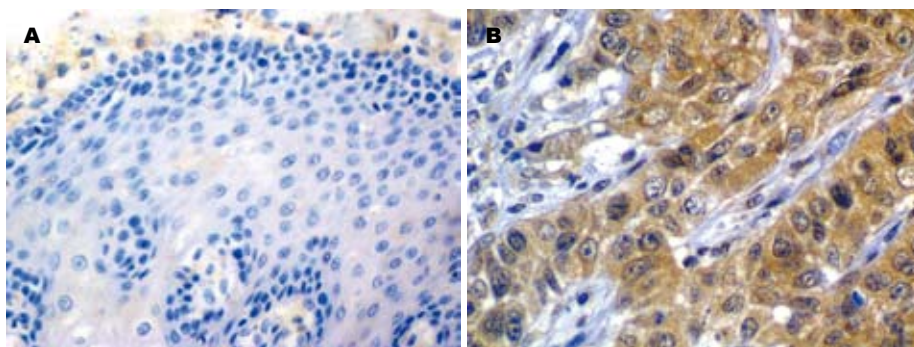


图 2 S100A4蛋白的表达(SP × 200). A: 正常黏膜阴性; B: 鳞癌组织强阳性.

于胞核(图2). S100A4蛋白在鳞癌、异型增生和正常黏膜组织中的阳性表达率分别为48.6%、26.7%及13.9%, 组间差异有统计学意义($P < 0.01$, 表1). S100A4蛋白在ESCC中的表达水平与患者性别、年龄及肿瘤分化程度无关($P > 0.05$), 但与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移和TNM分期均有关($P < 0.05$, 表2).

2.3 Bmi-1与S100A4蛋白在食管鳞状细胞癌中表达的相关性分析 Bmi-1和S100A4的蛋白在ESCC中表达水平呈正相关($P < 0.05$, 表3).

3 讨论

食管癌是世界上常见的恶性消化系统肿瘤之一, 因其侵袭转移而严重影响患者的治疗及预后, 因此找到食管癌发生及侵袭转移的早期主要相关因子, 对食管癌的防治及预后将具有重要的意义. 多梳基因(PcG)是转录抑制因子, 调控细胞的增殖和分化, 他们的调节障碍往往导致细胞异型增生. Bmi-1属于PcG成员, 目前对其作用

的研究已有较大的进展. Bmi-1主要是通过负调控其下游靶基因INK4a-ARF来发挥作用的^[11-14]. 过表达的Bmi-1可以抑制P16^{INK4a}和P19^{ARF}(人类P14^{ARF})的表达, 从而减少了P16^{INK4a}对细胞周期的抑制作用, 促进细胞的增殖生长; 同时也减弱了P19^{ARF}保护抑癌蛋白P53降解的作用, 使得P53抑癌的作用减弱, 促进肿瘤发生; 相反, 若Bmi-1表达下调或失活, 那么就减弱或失去了对INK4a-ARF基因转录的抑制作用, 引起细胞的过早衰老和凋亡^[12]. 对体外细胞研究发现缺失Bmi-1的鼠成纤维细胞在培养中表现出早熟并易老化, 无法正常自我更新与繁殖; 但过度表达Bmi-1的鼠成纤维细胞则出现细胞无法正常凋亡, 过度增殖并进而永生化^[11], 证明了Bmi-1的缺失或过表达对个体的生长发育都是不利的. 此外过表达的Bmi-1还能增加端粒酶的活性, 维持端粒的长度, 导致细胞永生化^[4,15]. 这都提示Bmi-1过表达在肿瘤的发生中具有重要的作用. 迄今Bmi-1在人类多种实体瘤中高表达已得到

表 2 Bmi-1、S100A4蛋白在食管鳞癌组织中的表达与临床病理因素的关系

因素	n	Bmi-1				χ^2 值	P值	S100A4				χ^2 值	P值
		-	+	++	阳性率(%)			-	+	++	阳性率(%)		
性别													
男	39	18	10	11	53.8	0.4600	0.498	18	12	9	53.8	1.035	0.309
女	29	11	7	11	62.1			17	7	5	41.4		
年龄(岁)													
>60	35	17	8	10	51.4	1.0350	0.309	16	9	10	54.3	0.957	0.328
<60	33	12	9	12	63.6			19	10	4	42.4		
分化程度													
高	12	7	3	2	41.7	1.4750	0.478	8	4	0	33.3	2.567	0.227
中	31	12	9	10	61.3			17	12	2	45.1		
低	25	10	5	10	60.0			10	3	12	60.0		
浸润深度													
浅层	20	11	4	5	45.0	1.7868	0.184	15	3	2	25.0	6.280	0.012
深层	48	16	13	17	62.5			20	16	12	58.3		
淋巴结转移													
有	25	6	8	11	76.0	5.6200	0.018	8	7	10	68.0	6.000	0.014
无	43	23	9	11	46.5			27	12	4	37.2		
TNM分期													
I - II A	43	24	7	12	44.2	8.2900	0.004	27	10	6	37.2	6.000	0.014
II B - III	25	5	10	10	80.0			8	9	8	68.0		

■创新盘点

本实验应用免疫组织化学法联合检测Bmi-1和S100A4蛋白在食管鳞状细胞癌、癌旁异型增生及癌旁正常黏膜组织中的表达情况,从而在蛋白水平上探讨Bmi-1和S100A4蛋白与食管癌各项临床病理参数之间的关系,为Bmi-1和S100A4蛋白作为判断食管癌生物学行为的重要参考指标提供理论依据。

表 3 Bmi-1与S100A4在食管鳞癌组织中表达的相关性

S100A4	Bmi-1		合计	r值	P值
	(-)	(+)(++)			
(-)	20	15	35		
(+)(++)	9	24	33		
合计	29	39	68	0.302	0.012

证实^[4-8]。本实验结果发现Bmi-1蛋白在正常食管黏膜、癌旁异型增生和ESCC组织中的表达呈增高趋势,组间比较有明显差异,与He等^[8]研究的结果基本一致。提示了Bmi-1蛋白参与了食管鳞状细胞癌的癌变过程, Bmi-1蛋白的高表达也许能为食管鳞癌的早期病变提供依据。

高表达Bmi-1的肿瘤细胞被认为肿瘤存在的“癌症干细胞”^[12],据此认为高表达Bmi-1蛋白的肿瘤会具有更强的侵袭力^[16],在胃癌中研究发现Bmi-1蛋白的高表达与TNM分期、浸润深度和淋巴结转移呈正相关^[17]。我们研究发现Bmi-1蛋白的表达与TNM分期和淋巴结转移密切相关,随着TNM分期和淋巴结转移的增加而增加。提示Bmi-1蛋白不仅在食管的早期癌变中就呈现高表达状态,而且其过表达在食管癌的侵袭转移过程中可能起着重要的作用,高表达者提示肿瘤极有可能已发生了转移。He等^[8]

报道Bmi-1的mRNA表达水平与ESCC的组织分级、临床分期以及淋巴结转移有高度的正相关性,但其蛋白水平与上述因素无任何相关性,这与我们的研究结果有些不符有待进一步的探讨。作者还认为Bmi-1的表达状态与患者的预后有关,高表达者预后差^[4,6,8,18]。这也许能为我们提供一个判断患者预后的新的分子标志物。

本研究还发现Bmi-1蛋白的主要定位在胞质中^[5,8],说明了Bmi-1蛋白发挥功能的场所主要是在胞质,与已有多数研究发现其主要定位于胞核中的现象不符^[6,7,17]。与多梳基因家族主要是在胞核内通过调控核内的相关基因(如:INK4a-ARF基因)来发挥作用的假说不一致,这有待进一步研究^[19]。

S100A4蛋白是钙结合蛋白(S100)家族成员之一,是由101个氨基酸的多肽组成的,相对分子质量约为11.5 kDa。其主要通过钙离子信号转导途径参与细胞增殖分化、细胞黏附运动,基因表达,细胞凋亡及血管生成等过程^[20,21]。目前研究表明S100A4蛋白在胃癌、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌等多种肿瘤中高表达,且其表达状态与肿瘤的侵袭、转移密切相关^[22-26]。本研究发现ESCC癌变过程中, S100A4蛋白的表达在正常食管黏膜、异型增生及ESCC组织中依次增高,组间差异存在统计学意义,提示了S100A4

应用要点

本实验证实了Bmi-1和S100A4蛋白在食管鳞癌表达的状况及二者的相关性。联合监测两种蛋白的表达,对食管癌的诊断及预后判断具有重要的意义。为食管癌的防治提供新的思路 and 理论依据。

蛋白与食管癌的发生密切相关。在癌组织中,S100A4蛋白的表达随肿瘤的浸润深度、淋巴结转移和TNM分期增高而增高,差异有统计学意义。郑献召等^[9]对食管癌的研究也得出了类似的结果。这说明了S100A4蛋白不仅参与了食管癌的癌变过程,而且在食管癌的侵袭转移中具有重要的作用。有学者将S100A4基因转染至本无转移性的大鼠乳腺癌细胞系后,发现该细胞系出现转染现象,而高转移性的肿瘤细胞系经过RNA干扰处理后可明显抑制其转移性^[20]。证实了S100A4作为癌肿浸润转移的分子基础之一,也给了我们提示S100A4基因可作为控制肿瘤侵袭转移的基因治疗靶点之一。对胰腺癌的研究发现S100A4蛋白的高表达除了与肿瘤的浸润转移有关外,还是影响患者预后的独立危险因素^[27,28]。可能是过表达的S100A4蛋白通过增强肿瘤的侵袭转移能力而导致患者预后不良之故。使得通过检测S100A4蛋白来判断食管癌预后有了依据。

在恶性肿瘤发生机制的研究中,许多学者提出了基因协同作用假说,认为在恶性肿瘤发生、发展和转移的各阶段,至少存在两个或两个以上功能不同的基因异常激活,并在时间和空间上相互配合,协同促进了细胞的癌变和转移。本研究显示Bmi-1与S100A4的蛋白在ESCC组织中的表达呈正相关($r = 0.302, P < 0.05$),且随着TNM分期、淋巴结转移的增加,两者的表达均在升高,说明了Bmi-1和S100A4蛋白的过表达共同促进ESCC的发生及侵袭转移,但其相互作用机制仍不清,有待研究。

总之,ESCC组织中Bmi-1和S100A4的蛋白表达均明显高于正常组织且与食管癌的转移密切相关,两者可以作为评估食管癌发生及侵袭转移的有效指标。联合检测两者对食管癌的诊断及预后判断具有重要的意义。

参考文献

- Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* 2004; 113: 175-179
- Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 86-95
- Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2003; 425: 962-967
- Song LB, Zeng MS, Liao WT, Zhang L, Mo HY, Liu WL, Shao JY, Wu QL, Li MZ, Xia YF, Fu LW, Huang WL, Dimri GP, Band V, Zeng YX. Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res* 2006; 66: 6225-6232
- Zhao J, Luo XD, Da CL, Xin Y. Clinicopathological significance of B-cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1 expression in gastric carcinoma and its precancerous lesion. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2145-2150
- 林妙霞, 文卓夫, 冯智英, 何丹. Bmi-1、Ki67在大肠肿瘤组织中的表达及意义. *癌症* 2008; 27: 1321-1326
- Kim JH, Yoon SY, Jeong SH, Kim SY, Moon SK, Joo JH, Lee Y, Choe IS, Kim JW. Overexpression of Bmi-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer. *Breast* 2004; 13: 383-388
- He XT, Cao XF, Ji L, Zhu B, Lv J, Wang DD, Lu PH, Cui HG. Association between Bmi1 and clinicopathological status of esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2389-2394
- 郑献召, 李珊珊, 轩小燕, 李娜, 王丰. 食管鳞癌组织中S100A4和MMP2蛋白表达与临床病理学特征的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3338-3342
- 冯艳, 宋立兵, 郭宝红, 廖雯婷, 李满枝, 刘万里, 曾木圣, 张玲. Bmi-1在乳腺癌组织中的表达及意义. *癌症* 2007; 26: 154-157
- Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 1999; 397: 164-168
- Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M. Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 1999; 13: 2678-2690
- Spike BT, Macleod KF. The Rb tumor suppressor in stress responses and hematopoietic homeostasis. *Cell Cycle* 2005; 4: 42-45
- Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* 2005; 19: 1432-1437
- Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4736-4745
- Dirks P. Bmi1 and cell of origin determinants of brain tumor phenotype. *Cancer Cell* 2007; 12: 295-297
- 黄开红, 刘建化, 李学先, 宋立兵, 曾木圣, 郭宝红. Bmi-1在胃癌组织中的表达及相关性研究. *中国肿瘤临床* 2007; 34: 961-965
- Wang H, Pan K, Zhang HK, Weng DS, Zhou J, Li JJ, Huang W, Song HF, Chen MS, Xia JC. Increased polycomb-group oncogene Bmi-1 expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 535-541
- Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 243-269
- Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol* 2002; 160: 7-13
- Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob

- A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V. Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 2005; 280: 20833-20841
- 22 Yoon CS, Hyung WJ, Lee JH, Chae YS, Won NH, Yeom BW, Choi JS. Expression of S100A4, E-cadherin, alpha- and beta-catenin in gastric adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1916-1920
- 23 于观贞, 王杰军, 陈颖, 倪灿荣, 朱明华. 转移相关基因nm23和P53及S100A4在晚期胃癌中的表达及与侵袭转移的相关性研究. *中华胃肠外科杂志* 2006; 9: 165-169
- 24 孙明, 刘学峰, 潘春雨, 詹运鸿, 吴斌. 钙离子结合蛋白A4和上皮型钙黏附蛋白在膀胱癌中的表达及临意义. *现代肿瘤医学* 2008; 16: 1723-1726
- 25 Cabezón T, Celis JE, Skibshøj I, Klingelhöfer J, Grigorian M, Gromov P, Rank F, Myklebust JH, Maelandsmo GM, Lukanidin E, Ambartsumian N. Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer. *Int J Cancer* 2007; 121: 1433-1444
- 26 Cho YG, Kim CJ, Nam SW, Yoon SH, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Overexpression of S100A4 is closely associated with progression of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4852-4856
- 27 鲁林源, 艾开兴, 黄新余, 陈巍, 张惠箴. S100A4、VEGF的表达与胰腺癌预后的关系. *肿瘤* 2008; 28: 326-329
- 28 Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 1595-1603

■同行评价

本文研究设计较为合理, 结果明确, 论述有据, 学术价值较好.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-及-后列出, 在±前后都要列出. 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 pg/ml ± 0.27 pg/ml 应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/L$, WBC数用 $\times 10^9/L$, 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mmol/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 × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 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·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

肝癌转移、复发预测的蛋白质分子标志物

舒宏, 康晓楠, 刘银坤

■背景资料

肝癌根治性切除后5年生存率可达40%以上, 但术后高转移复发率(5年复发率达70%, 小肝癌也达50%)已成为进一步提高远期疗效的瓶颈, 也是攻克肝癌的关键, 临床尚迫切需要一些生物学预后指标来监测肝癌患者术后转移的复发。

舒宏, 康晓楠, 刘银坤, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所
复旦大学生物医学研究院 上海市 200032
国家863高科技发展计划基金资助项目, No. 2006AA02A308
“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”国家重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-021
作者贡献分布: 本文由舒宏撰写; 康晓楠与刘银坤审核。
通讯作者: 刘银坤, 教授, 200032, 上海市, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 复旦大学生物医学研究院。
liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn
电话: 021-54237962
收稿日期: 2010-01-24 修回日期: 2010-04-17
接受日期: 2010-04-20 在线出版日期: 2010-05-08

Biomarkers for prediction of metastasis and recurrence of hepatocellular carcinoma

Hong Shu, Xiao-Nan Kang, Yin-Kun Liu

Hong Shu, Xiao-Nan Kang, Yin-Kun Liu, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital; Institute of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China
Supported by: the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA02A308; the National Key Project for Infectious Diseases, No. 2008ZX10002-021
Correspondence to: Professor Yin-Kun Liu, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China. liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn
Received: 2010-01-24 Revised: 2010-04-17
Accepted: 2010-04-20 Published online: 2010-05-08

Abstract

The metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC) has long been recognized as a multi-step process that involves multiple factors. Instead of diagnostic models based on single-molecule detection, the combination of multiple molecules will be the trend for early tumor diagnosis or prediction of tumor metastasis and recurrence. Many differentially expressed metastasis-associated genes and proteins have been reported in HCC. This article gives an overview of protein biomarkers for prediction of HCC metastasis and recurrence.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Recurrence; Metastasis; Biomarker

Shu H, Kang XN, Liu YK. Biomarkers for prediction of metastasis and recurrence of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1350-1355

摘要

肝癌转移是一个多步骤、多因素相互作用的复杂过程。在肝癌转移复发的蛋白质组学研究方面, 发现了很多新的潜在蛋白质分子标志物。由于仅用单个指标是无法进行准确预测的, 采用多个指标进行联合检测将是今后肝癌转移预测的研究方向。本文综述了所涉及肝癌转移复发早诊的新型分子标志物。

关键词: 肝癌; 复发; 转移; 分子标志物

舒宏, 康晓楠, 刘银坤. 肝癌转移、复发预测的蛋白质分子标志物. *世界华人消化杂志* 2010; 18(13): 1350-1355
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1350.asp>

0 引言

肿瘤转移复发与基因表达的调控, 关键基因的突变, 如P53, nm23-H1^[1]和 β -catenin^[2], 细胞周期的异常, 缺氧, 微环境的改变和神经内分泌系统的紊乱等因素引发的信号传导如WNT、NF- κ B等相关, 是一个仍然需要深入研究的复杂的病理过程。肝癌根治性切除术后5年内仍有60%-70%的患者出现转移复发, 复发性肝癌的早期诊断和可能的化学干预是提高患者长期生存率的关键之一, 术后随访、定期复查必不可少。目前临床上首推方法是B超和定期甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)及甲胎蛋白异质体(lectinreactive α -fetoprotein, AFP-L3)^[3,4]检测, 但诊断与预测的准确性不高, 临床尚迫切需要一些生物学预后指标来监测肝癌患者术后转移复发的可能。较早报道的预测指标, 除了临床和病理指标外, 还有一些细胞水平的指标。近年来, 多集中在蛋白分子指标方面。本文对与HCC转移复发相关的蛋白分子进行总结。

1 单一分子指标

1.1 催化酶类 在肿瘤侵袭转移过程中, 肿瘤细胞先对细胞外基质进行降解, 才能穿过基底膜侵入周围组织。尿激酶性纤溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)及其受体uPA-R与

■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感染科; 范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

表 1 与肝癌复发相关的蛋白质分子标志物

分类	蛋白分子	方法	参考文献
单一分子			
催化酶类	uPA, uPA-R, PAI-1, MMP-2, MMP-9, APC-EB1, Capn4, Aurora-B	IHC, ELISA, LCM-ICAT, WB, LCM-DIGE, TMA, qRT-PCR	[5-12]
细胞因子, 黏附分子和白细胞分化抗原	VEGF, TGF- β , MTA, OPN, TIP30, CK-19, CD24	ELISA, IHC, TMA, 2-DE-MALDI, RT-PCR, WB	[13-27]
热休克蛋白家族	HSP27, HSPA9	2-DE-MALDI, WB, IP	[28-32]
其他	IMP3, XIAP, KIAA0101, ASPM	RT-PCR, IHC	[33-36]
多分子联合	HKII/ALDOB	RT-PCR	[37]
	GGT/ALT	ELISA	[38]
	M-CSF, M ϕ	TMA	[39]
	MMP/TIMP	IHC	[40]
	CK-10, CK-19	IF, IHC, WB, qRT-PCR	[41]
	OPN, CD44	TMA	[42]
	E-cad, Cx43, CD44v6	D-IF, CLSM	[43]
	Op18/stathmin, P53, OPN	IHC	[44]
	PCNA, VEGF	IHC	[45]
	PCNA, P53, VEGF	IHC	[46]
	CD151/c-Met	qRT-PCR, WB, IHC, CLSM, TMA	[47]

蛋白分子中灰色表示下调, 黑色表示上调; 2-DE-MALDI: 双向电泳-基质辅助激光解吸质谱技术; DIGE: 荧光差异电泳; ELISA: 酶联免疫吸附试验; IF: 免疫荧光; IHC: 免疫组织化学; IP: 免疫印迹; LCM: 激光显微切割; CLSM: 激光扫描共聚焦显微镜; qRT-PCR: 定量逆转录聚合酶链式反应; TMA: 组织芯片; WB: 蛋白印迹。

抑制剂纤维蛋白溶酶原活化抑制剂(plasminogen activation inhibitor, PAI)是丝氨酸蛋白酶类, uPA在HCC中过表达及PAI-1血浆中水平增高, 尤其在有门静脉癌栓、侵袭转移的肝癌中^[5,6]; 金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP), MMP-2和MMP-9与肿瘤侵袭转移关系最密切^[7], 以上蛋白水解酶均与肝癌侵袭性呈正相关。其中, uPA是影响肝癌侵袭的最敏感的因素, 是肝癌复发的一个较强的预测指标^[8], 超过0.70 $\mu\text{g/L}$, 肝癌可能复发。

Orimo等^[9]采用2D-DIGE定量蛋白质组学方法, 从45例外科手术组织(包括11例癌旁组织, 27例分化程度不同的肝癌和7例正常)中筛选出26个差异蛋白, 其中APC结合EB1蛋白(adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1, EB1)受转录因子c-Myc, RhoA和CDC42等调控, 蛋白表达与低分化肝癌紧密关联, 差异分析显示EB1可作为干细胞癌预后判断的指标之一。

Bai等^[10]等通过LCM结合定量蛋白质组学, 筛查出肝癌肝移植术后转移复发相关蛋白Capn4, 是巯基蛋白酶家族Calpain中的28 kDa调节性亚基, Capn4蛋白的表达增加可减少细胞分泌MMP-2, 减少Talin的降解, 抑制FAK的磷酸化,

影响黏着斑的分解和细胞迁移运动, 从而抑制了肝癌细胞的体内外的侵袭和转移。Aurora-B是一种中心体上的功能性激酶, 又称为染色质过客蛋白激酶, 属于Aurora激酶家族成员, 已被证明是一种癌蛋白。有研究结合临床显示AURKB-Sv2 (Aurora B splicing variant 2)^[11,12]的表达初步反映肿瘤的早晚程度, 与肝癌的复发率及生存率存在一定关系(表1)。

1.2 细胞因子、黏附分子和白细胞分化抗原 肿瘤的侵袭转移中, 血管生成有重要的作用。参与调节血管生成的重要因素是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。研究发现肿瘤直径>5 cm、有癌栓或镜下癌栓的患者体内水平较高^[13], 血清VEGF水平明显升高(>400 ng/L)及术后仍维持在高水平或再度升高者的HCC患者转移复发率明显升高^[14]。近年来, Sorafenib等分子靶向药物的研究日益增多, 可抑制肝癌细胞VEGF受体活性, 提示VEGF受体是抗肿瘤复发目标位点。Wang等^[15]实验结果显示, Sorafenib联合雷帕霉素能抑制裸鼠模型中肝癌的生长和转移。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)在肝癌中呈过度表达状态, 抑制免疫系统, 促进癌细胞生长、浸润、远

■研究前沿

探讨肝癌转移复发的分子机制, 寻找早期诊断肝癌、预测转移的生物标志和干预治疗的靶点, 已成为当今肝癌研究的热点。

■相关报道

Bai等对接受肝移植术的肝细胞癌患者进行跟踪随访,随访的患者包括有肝癌复发者和未复发者。通过LCM结合定量蛋白质组学,筛选出149种蛋白,其中钙蛋白酶小亚基1(Capn4)在肝移植后的复发患者中的表达量较高,他作为一种与多种癌细胞转移扩散相关蛋白有相互作用的蛋白,可作为预测肝细胞癌患者预后情况(复发和存活时间)的一个独立指标。

处转移^[16]。肝癌衍生的TGF- β 1^[17]作为化学诱导剂使内皮细胞表达CD105增高,促使血管生成,通过促进已停止增殖的内皮细胞分化,或促进基质的分化,刺激血管生成。

转移相关基因(metastasis-associated gene, MTA)蛋白^[18,19]是ATP依赖的核小体重建和组蛋白去乙酰化核小体复合物(NuRD)的组成部分,与肝癌的侵袭和转移过程密切相关。表现在细胞间黏附力的下降,黏附分子、细胞骨架蛋白的表达及新生血管、淋巴管的形成等。MTA1调节HIF-1 α 去乙酰化,促发肝癌血管生成。并且MTA1在c-MYC介导的细胞转化中起重要的作用,MTA1和MTA2介导肿瘤抑制基因P53蛋白去乙酰化和失活。MTA3作为上皮间质转变的调节子会引起细胞黏附分子E-cadherin表达。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)^[20-22]是肿瘤转移复发环节中发现的最重要的蛋白,患者血浆骨桥蛋白浓度与肝癌预后呈负相关。主要表现在促进细胞黏附、迁移,降解细胞外基质,促进肿瘤血管生成。Ets-1和AP-1的协同效应抑制OPN的转录, TIP30的异位表达最终导致癌细胞的侵袭下降^[23]。细胞角蛋白亚类(CK 8/18/19/20)不仅与转移有关,而且与转移潜能的高低有关。用蛋白质组技术^[24,25]比较高低转移潜能肝癌细胞系,发现CK19蛋白与高转移潜能有关,CK19表达高者,门静脉癌栓发生率高,肝癌肝移植术后复发率明显高于CK-19表达阴性。CD24与肿瘤侵袭转移有关,最近研究表明CD24^[26,27]的过表达使肝癌的侵袭能力增高,转移潜能增强、增殖能力增加,与Wnt/ β -catenin信号通路相关,可以作为肝癌患者术后预后不良的一个新标志物(表1)。

1.3 分子伴侣-热休克蛋白家族 用蛋白质组技术发现热休克蛋白27(heat shock protein 27, HSP27)^[28,29]也是人肝癌转移相关的重要蛋白,有转移的肝癌过度表达HSP27。Guo等^[30,31]对其作用机制研究表明,发现PKC β -ERK-HSP27/PKC β -p38MAPK-HSP27通路,揭示HSP27通过IKK β 及I κ B α 成分的相互作用及影响IKK复合物的稳定性,参与NF- κ B途径的激活,抑制肝癌细胞的凋亡,从而参与肝癌细胞侵袭转移。

Yi等^[32]应用双向电泳技术发现肝癌组织中HSPA9基因编码的致死蛋白(mortalin),他是HSP70家族成员,主要通过结合各种因子而发挥作用,如P53、FGF-1、IL-1R1和GRP94等。Mortalin通过与野生型p53共区域化来发挥抑癌

基因的胞质固定和转录失活作用。肝癌高转移细胞株中mortalin表达量也明显增高,早期复发肝癌患者的表达量明显增高,并且与肿瘤的发生、恶化和侵袭转移密切相关。因此认为mortalin可以作为监测肝癌早期复发的一个候选标志物(表1)。

1.4 其他分子 胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白3(insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3, IMP3)的表达与P53突变相关^[33],与 β -catenin突变无关。在肝癌细胞中的运动、侵袭以及迁移到内皮,能促进细胞黏附和树突状伪足形成,表明IMP3与早期预测肝癌复发、肝癌分期有关。X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor-of-apoptosis protein, XIAP)^[34],是IAP家族中最有效力的caspase抑制物,介导TAB1-TAK1-JNK1级联反应途径,血管内皮受损时可诱导NF- κ B的活化,发挥凋亡抑制作用。在临床90%的肝癌患者中高表达,可能作为靶分子可减少肝癌转移复发。KIAA0101^[35]包含增殖细胞核抗原PCNA结合基序,研究表明可以促进肝癌转移潜能,可以早期预测肝癌复发和预后。ASPM^[36](abnormal spindle-like microcephaly associated)基因定位于中心体,纺锤体极,中间体,过表达多与肝癌病理的晚期有关,也与肝癌侵袭转移潜能有关(表1)。

2 肝癌转移复发预测的多分子联合

缺氧可诱导HIF-1 α 通过Mdm2(murine double minute 22)引起细胞p53表达上调, p53增高后可进一步启动p21Cip1基因转录。同时, HIF-1 α 可诱导HIKK表达增加,提示肝癌细胞在缺氧情况下HIF-1 α 能介导糖酵解增强的其中一个途径是刺激HK II表达增加。研究发现己糖激酶II(type II hexokinase, HK II)表达增加和醛缩酶B(aldolase B, ALDOB)^[37]表达下降对中晚期肝癌早期复发有预测意义。 γ -谷氨酰转移酶II(γ -glutamyltransferase II, GGT II)正常人血清内GGT主要来自肝脏,在转移的肝肿瘤中,唾液酸含量发生改变,GGT的 β 1, 6 GlcNAc支链增多。最近有报道称^[38]GGT/ALT比值升高对肝癌child A肝切除患者的预后相关,在GGT和ALT联合诊断研究显示,确定肝癌复发率和生存率AUC_{GGT/ALT}面积均超过AUC_{AFP}。

Zhu等^[39]研究发现巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factors, M-CSF)和巨噬细胞(M ϕ)在癌旁组织中有高密度表达,

并且M-CSF和M ϕ 联合诊断肝癌患者的复发和死亡效果是最佳的, ROC面积均大于传统依据的UICC TNM分级诊断, 与肝癌发展以及肝切除后的复发生存相关。

组织金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)能抑制MMP的活性, MMP上调联合TIMP下调可能具有更好的预示肝癌转移复发的作用^[40]。最近报道表明, CK-10联合CK-19^[41]可作为肝癌切除术后复发的预测分子。OPN除与整合素结合外, 羧基端可以和黏附分子CD44相互作用, 能引起CD44依赖的化学趋化性增高。CD44被认为是一种假定的OPN受体, 存在于肿瘤相关淋巴细胞表面, OPN与CD44^[42]联合能够预测肝癌的转移复发及其预后。上皮型钙黏附蛋白(E-cad)、连接蛋白43(Cx43)的低表达与CD44v6的高表达^[43]可能参与HCC的侵袭, 尤其是CD44v6的表达还与HCC的组织学分级相关。三者联合检测对判断HCC的诊断和预后有一定价值。

有报道称^[44], Op18/stathmin的过表达, P53突变和OPN高表达的联合应用, 更加有助于对肝癌进展, 早期复发和预后的监测, 对肝癌发病机制研究也具有应用前景。增殖细胞核抗原(PCNA)、VEGF单独应用, 肝癌术后生存率均差。VEGF预测术后1、2年复发的特异度为70.6%和77%, PCNA预测1、2年复发的特异度为51.5%和55.7%。联合应用两个指标预测1、2年复发特异度为87.7%和90.2%, 高于单个指标($P<0.001$)^[45]。PCNA高指数标记, P53核内聚集和VEGF高表达均与肝癌患者预后差相关^[46]。四跨膜蛋白CD151和c-Met在肝癌中过表达^[47], HGF/c-Met信号转导与其他信号间的交互作用中扮演重要的角色, CD151可与c-Met形成功能复合物, 与肝癌侵袭密切相关, 两者联合可以作为肝癌切除术后预测分子, 也可能成为抑制HGF/c-Met信号的全新靶点(表1)。

3 结论

要解决肝癌的转移复发, 重点是要有有效的预测和有效的预防。近年来, 肿瘤转移机制的研究进展提示转移可能是肿瘤发生中的早期事件^[48]。除了通过高通量蛋白芯片和蛋白质组学等技术, 获得了一些高复发肝癌的分子标签, 在新的肝癌转移复发标志物的研究方面已经有较大的进展。建立肝癌转移的多分子预测模型, 经大量临床标本进一步验证, 尤其是前瞻性规模化验证

和加速临床应用将是今后的主要的趋势和研究重点, 对具有转移复发倾向的肝癌患者进行有效干预, 对进一步提高肝癌患者的治疗效果、改善预后具有非常重要的临床意义。

4 参考文献

- 1 Mangnall D, Smith K, Bird NC, Majeed AW. Early increases in plasminogen activator activity following partial hepatectomy in humans. *Comp Hepatol* 2004; 3: 11
- 2 Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY. Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 763-770
- 3 Zhi H, Zhan J, Deng QL, Huang ZM. [Postoperative detection of AFP mRNA in the peripheral blood of hepatic cellular carcinoma patients and its correlation with recurrence] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2007; 29: 112-115
- 4 Morimoto O, Nagano H, Miyamoto A, Fujiwara Y, Kondo M, Yamamoto T, Ota H, Nakamura M, Wada H, Damdinsuren B, Marubashi S, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Association between recurrence of hepatocellular carcinoma and alpha-fetoprotein messenger RNA levels in peripheral blood. *Surg Today* 2005; 35: 1033-1041
- 5 Zheng Q, Tang ZY, Xue Q, Shi DR, Song HY, Tang HB. Invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in relation to urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 641-646
- 6 Zheng Q, Tang Z, Wu Z, Shi D, Song H. [Inhibitor of plasminogen activator 1 (PAI-1) in hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Waike Zazhi* 1998; 36: 474-476
- 7 Niu Q, Tang Z, Ma Z, Qin L, Bao W, Zhang L. [Relationship between serum matrix metalloproteinase-2 and metastasis and recurrence following radical hepatic resection in hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001; 9 Suppl: 58-60
- 8 Itoh T, Hayashi Y, Kanamaru T, Morita Y, Suzuki S, Wang W, Zhou L, Rui JA, Yamamoto M, Kuroda Y, Itoh H. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator activity in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 422-430
- 9 Orimo T, Ojima H, Hiraoka N, Saito S, Kosuge T, Kakisaka T, Yokoo H, Nakanishi K, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, Kondo T. Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli-end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1851-1863
- 10 Bai DS, Dai Z, Zhou J, Liu YK, Qiu SJ, Tan CJ, Shi YH, Huang C, Wang Z, He YF, Fan J. Capn4 overexpression underlies tumor invasion and metastasis after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 460-470
- 11 Sistayanarain A, Tsuneyama K, Zheng H, Takahashi H, Nomoto K, Cheng C, Murai Y, Tanaka A, Takano Y. Expression of Aurora-B kinase and phosphorylated histone H3 in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2006; 26: 3585-3593
- 12 Yasen M, Mizushima H, Mogushi K, Obulhasim G, Miyaguchi K, Inoue K, Nakahara I, Ohta T, Aihara A, Tanaka S, Arii S, Tanaka H. Expression of Aurora

■同行评价

本文对肝癌转移复发相关的多种蛋白质分子标志物进行了综述, 对了解这方面的研究现状具有一定参考价值。

- B and alternative variant forms in hepatocellular carcinoma and adjacent tissue. *Cancer Sci* 2009; 100: 472-480
- 13 Kamel L, Nessim I, Abd-el-Hady A, Ghali A, Ismail A. Assessment of the clinical significance of serum vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in patients with hepatocellular carcinoma. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35: 875-890
- 14 侯振江, 王秀文, 张丽华, 周秀艳, 戴殿禄, 闫金辉. 原发性肝癌患者血清leptin, VEGF和AFP表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3195-3200
- 15 Wang Z, Zhou J, Fan J, Qiu SJ, Yu Y, Huang XW, Tang ZY. Effect of rapamycin alone and in combination with sorafenib in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5124-5130
- 16 Xu Z, Shen MX, Ma DZ, Wang LY, Zha XL. TGF-beta1-promoted epithelial-to-mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF-beta1-enhanced cell migration in SMMC-7721 cells. *Cell Res* 2003; 13: 343-350
- 17 Benetti A, Berenzi A, Gambarotti M, Garrafa E, Gelati M, Dessy E, Portolani N, Piardi T, Giulini SM, Caruso A, Invernici G, Parati EA, Nicosia R, Alessandri G. Transforming growth factor-beta1 and CD105 promote the migration of hepatocellular carcinoma-derived endothelium. *Cancer Res* 2008; 68: 8626-8634
- 18 Toh Y, Nicolson GL. The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 215-227
- 19 Ryu SH, Chung YH, Lee H, Kim JA, Shin HD, Min HJ, Seo DD, Jang MK, Yu E, Kim KW. Metastatic tumor antigen 1 is closely associated with frequent postoperative recurrence and poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 929-936
- 20 Xie H, Song J, Du R, Liu K, Wang J, Tang H, Bai F, Liang J, Lin T, Liu J, Fan D. Prognostic significance of osteopontin in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 167-172
- 21 Takafuji V, Forgues M, Unsworth E, Goldsmith P, Wang XW. An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 6361-6371
- 22 Zhang H, Ye QH, Ren N, Zhao L, Wang YF, Wu X, Sun HC, Wang L, Zhang BH, Liu YK, Tang ZY, Qin LX. The prognostic significance of preoperative plasma levels of osteopontin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 709-717
- 23 Zhao J, Lu B, Xu H, Tong X, Wu G, Zhang X, Liang A, Cong W, Dai J, Wang H, Wu M, Guo Y. Thirty-kilodalton Tat-interacting protein suppresses tumor metastasis by inhibition of osteopontin transcription in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 265-275
- 24 Ding SJ, Li Y, Tan YX, Jiang MR, Tian B, Liu YK, Shao XX, Ye SL, Wu JR, Zeng R, Wang HY, Tang ZY, Xia QC. From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 73-81
- 25 Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, Lesaffre E, Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology* 2006; 49: 138-151
- 26 Yang XR, Xu Y, Yu B, Zhou J, Li JC, Qiu SJ, Shi YH, Wang XY, Dai Z, Shi GM, Wu B, Wu LM, Yang GH, Zhang BH, Qin WX, Fan J. CD24 is a novel predictor for poor prognosis of hepatocellular carcinoma after surgery. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5518-5527
- 27 Cai MY, Xu YF, Qiu SJ, Ju MJ, Gao Q, Li YW, Zhang BH, Zhou J, Fan J. Human leukocyte antigen-G protein expression is an unfavorable prognostic predictor of hepatocellular carcinoma following curative resection. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4686-4693
- 28 Feng JT, Liu YK, Song HY, Dai Z, Qin LX, Almofti MR, Fang CY, Lu HJ, Yang PY, Tang ZY. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics* 2005; 5: 4581-4588
- 29 Song HY, Liu YK, Feng JT, Cui JF, Dai Z, Zhang LJ, Feng JX, Shen HL, Tang ZY. Proteomic analysis on metastasis-associated proteins of human hepatocellular carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 92-98
- 30 Guo K, Kang NX, Li Y, Sun L, Gan L, Cui FJ, Gao MD, Liu KY. Regulation of HSP27 on NF-kappaB pathway activation may be involved in metastatic hepatocellular carcinoma cells apoptosis. *BMC Cancer* 2009; 9: 100
- 31 Guo K, Liu Y, Zhou H, Dai Z, Zhang J, Sun R, Chen J, Sun Q, Lu W, Kang X, Chen P. Involvement of protein kinase C beta-extracellular signal-regulating kinase 1/2/p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 activation in hepatocellular carcinoma cell motility and invasion. *Cancer Sci* 2008; 99: 486-496
- 32 Yi X, Luk JM, Lee NP, Peng J, Leng X, Guan XY, Lau GK, Beretta L, Fan ST. Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 315-325
- 33 Jeng YM, Chang CC, Hu FC, Chou HY, Kao HL, Wang TH, Hsu HC. RNA-binding protein insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression promotes tumor invasion and predicts early recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1118-1127
- 34 Shi YH, Ding WX, Zhou J, He JY, Xu Y, Gambotto AA, Rabinowich H, Fan J, Yin XM. Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence. *Hepatology* 2008; 48: 497-507
- 35 Yuan RH, Jeng YM, Pan HW, Hu FC, Lai PL, Lee PH, Hsu HC. Overexpression of KIAA0101 predicts high stage, early tumor recurrence, and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5368-5376
- 36 Lin SY, Pan HW, Liu SH, Jeng YM, Hu FC, Peng SY, Lai PL, Hsu HC. ASPM is a novel marker for vascular invasion, early recurrence, and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4814-4820
- 37 Peng SY, Lai PL, Pan HW, Hsiao LP, Hsu HC. Aberrant expression of the glycolytic enzymes aldolase B and type II hexokinase in hepatocellular carcinoma are predictive markers for advanced

- stage, early recurrence and poor prognosis. *Oncol Rep* 2008; 19: 1045-1053
- 38 Ju MJ, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Gao Q, Cai MY, Li YW, Tang ZY. Preoperative serum gamma-glutamyl transferase to alanine aminotransferase ratio is a convenient prognostic marker for Child-Pugh A hepatocellular carcinoma after operation. *J Gastroenterol* 2009; 44: 635-642
- 39 Zhu XD, Zhang JB, Zhuang PY, Zhu HG, Zhang W, Xiong YQ, Wu WZ, Wang L, Tang ZY, Sun HC. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2707-2716
- 40 Gao ZH, Tretiakova MS, Liu WH, Gong C, Farris PD, Hart J. Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 533-540
- 41 Yang XR, Xu Y, Shi GM, Fan J, Zhou J, Ji Y, Sun HC, Qiu SJ, Yu B, Gao Q, He YZ, Qin WZ, Chen RX, Yang GH, Wu B, Lu Q, Wu ZQ, Tang ZY. Cytokeratin 10 and cytokeratin 19: predictive markers for poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3850-3859
- 42 Yang GH, Fan J, Xu Y, Qiu SJ, Yang XR, Shi GM, Wu B, Dai Z, Liu YK, Tang ZY, Zhou J. Osteopontin combined with CD44, a novel prognostic biomarker for patients with hepatocellular carcinoma undergoing curative resection. *Oncologist* 2008; 13: 1155-1165
- 43 张宝燕, 戴晓汶, 陈清勇, 方丽, 钱斌, 孙国英, 崔海宏. 上皮型钙黏附蛋白、CD44v6及连接蛋白43在肝细胞癌中的表达及意义. *中华病理学杂志* 2006; 35: 616-619
- 44 Yuan RH, Jeng YM, Chen HL, Lai PL, Pan HW, Hsieh FJ, Lin CY, Lee PH, Hsu HC. Stathmin overexpression cooperates with p53 mutation and osteopontin overexpression, and is associated with tumour progression, early recurrence, and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 2006; 209: 549-558
- 45 王洪海, 任宁, 张辉, 叶青海, 孙惠川, 王鲁, 谭云山, 钦伦秀. 联合检测VEGF、PD-ECGF和PCNA表达预测肝细胞癌术后复发及预后. *中国临床医学* 2005; 12: 448-451
- 46 Stroescu C, Dragnea A, Ivanov B, Pechianu C, Herlea V, Sgarbura O, Popescu A, Popescu I. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis* 2008; 17: 411-417
- 47 Ke AW, Shi GM, Zhou J, Wu FZ, Ding ZB, Hu MY, Xu Y, Song ZJ, Wang ZJ, Wu JC, Bai DS, Li JC, Liu KD, Fan J. Role of overexpression of CD151 and/or c-Met in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 491-503
- 48 Podsypanina K, Du YC, Jechlinger M, Beverly LJ, Hambardzumyan D, Varmus H. Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science* 2008; 321: 1841-1844

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位. 2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位. 大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价. 《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

NSAIDs预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的研究进展

王 钧, 白飞虎, 周 毅

■背景资料

ERCP术后胰腺炎(PEP)是ERCP术后最常见、最严重的并发症之一,常导致住院时间的延长,费用的增加,甚至危及患者的生命。已有多种药物用于预防PEP的发生,但研究结果均不能令人满意。非甾体类抗炎药(NSAIDs)是一类具有环氧合酶(cyclooxygenase)抑制活性药物的总称,近年来,NSAIDs在预防PEP中的作用已得到多项研究阳性结果支持,显示出了良好的应用前景。

王钧, 周毅, 中国人民解放军第451医院消化内科 陕西省西安市 710054

白飞虎, 宁夏医科大学附属医院消化内科 宁夏回族自治区银川市 750004

作者贡献分布: 本文综述由王钧与白飞虎完成; 周毅审校。

通讯作者: 王钧, 副主任医师, 710054, 陕西省西安市友谊东路, 中国人民解放军第451医院消化内科。

wangjundocor@yahoo.com.cn

电话: 029-84734078

收稿日期: 2009-12-27 修回日期: 2010-03-29

接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-05-08

Recent advances in the prevention of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis with NSAIDs

Jun Wang, Fei-Hu Bai, Yi Zhou

Jun Wang, Yi Zhou, Department of Gastroenterology, the 451st Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Fei-Hu Bai, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Correspondence to: Jun Wang, Department of Gastroenterology, the 451st Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. wangjundocor@yahoo.com.cn

Received: 2009-12-27 Revised: 2010-03-29

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-05-08

Abstract

Acute pancreatitis is one of the most common complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) and often results in prolonged hospitalization and further intervention. Trials of many pharmacological therapies for post-ERCP pancreatitis (PEP) have yielded disappointing results. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are potent inhibitors of prostaglandin synthesis, phospholipase A2 and neutrophil-endothelial interaction. Recently, prospective clinical trials evaluating NSAIDs in the prevention of PEP have yielded positive results, indicating their promising future in clinical use.

Key Words: Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Pancreatitis; Non-steroidal anti-inflammatory drugs

Wang J, Bai FH, Zhou Y. Recent advances in the prevention of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis with NSAIDs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1356-1359

摘要

内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)已发展成为肝胆胰疾病的重要诊治手段, ERCP术后胰腺炎(post-ERCP pancreatitis, PEP)是ERCP术后最常见、最严重的并发症之一,常导致住院时间的延长,费用的增加,甚至危及患者的生命。已有多种药物用于预防PEP的发生,但研究结果均不能令人满意。非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)是一类具有环氧合酶(cyclooxygenase)抑制活性药物的总称。近年来,NSAIDs在预防PEP中的作用已得到多项研究阳性结果支持,显示出了良好的应用前景,本文对这方面的研究进展作一综述。

关键词: 内镜逆行胰胆管造影术; 胰腺炎; 非甾体类抗炎药

王钧, 白飞虎, 周毅. NSAIDs预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(13): 1356-1359
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1356.asp>

0 引言

自1968年首次报道内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)以来, ERCP已发展成为肝胆胰疾病的重要诊治手段,其并发症包括:出血、穿孔、感染等,其中ERCP术后胰腺炎(post-ERCP pancreatitis, PEP)是ERCP术后最常见、最严重的并发症之一,其发生率约5%-7%^[1]。PEP的发生常导致住院日的延长,费用的增加,甚至危及患者的生命。已有多种药物用于预防PEP的发生,如:生长抑素及其类似物、硝酸甘油、蛋白酶抑制剂等,但研究结果均不能令人满意^[1-3]。非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)是一类具有环氧合酶(cyclooxygenase)抑制活性药

■同行评议者

何裕隆, 教授, 中山大学附属第一医院胃肠胰外科

物的总称,有较好的抗炎、镇痛、退热作用而广泛应用于临床^[4]。近年来,NSAIDs在预防PEP中的作用已得到多项研究阳性结果支持,显示出了良好的应用前景,本文对这方面的研究进展作一综述。

1 PEP的定义及分级

目前关于PEP的定义仍沿用1991年Cotton等专家组^[5]制定的ERCP术后并发症的定义的共识意见。即:ERCP术后出现持续性的胰腺炎相关的临床症状(如新出现的或加重的腹部疼痛)伴有术后24 h血清淀粉酶超过正常上限的3倍,且伴有腹痛、恶心呕吐等胰腺炎症状并且需入院1 d以上,而如只有血尿淀粉酶升高,则诊断术后高淀粉酶血症。共识意见对PEP严重程度的分级大致如下:轻型,需入院治疗或延长原计划入院时间至2-3 d;中型,住院天数延长4-10 d;重度,住院天数延长10 d以上,出现局部或全身并发症,需ICU治疗或侵入性(如经皮穿刺引流或外科手术)治疗。

2 PEP发生的危险因素

总体来说,PEP发生的危险因素包括患者及操作技术相关因素^[6-8]。患者相关的危险因素包括年轻女性、疑有oddi括约肌功能障碍(sphincter of oddi dysfunction, SOD)、有PEP发生史和无血清胆红素升高。操作方面包括:胰管插入、多次插管、胰管括约肌切开术、乳头括约肌扩张术、多次胰腺显影、十二指肠乳头括约肌切开术(endoscopic spincterotomy, EST)时胰管开口及周围黏膜损伤或过度灼伤等。具有多种危险因素的患者发生PEP的风险会显著增高。

3 NSAIDs预防PEP的研究进展

传统的NSAIDs包括阿司匹林、消炎痛、舒林酸等,其特点是对环氧合酶-1(cyclooxygenase -1, COX-1),环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)均有抑制作用。近年来又研制出了多种COX-2特异性抑制剂,如NS-398, SC-58125等以及COX-1特异性抑制剂如SC-560等^[9]。1996年, Makela等^[10]研究发现NSAIDs能有效抑制重症胰腺炎患者血清的PLA₂的活性及中性粒细胞/内皮细胞的附着,从而减少中性粒细胞在损伤组织的积聚。1997年, Simon^[11]的研究显示NSAIDs可抑制伴随中性粒细胞活化的一系列现象,包括环磷酸腺苷的合成、过氧化物阴离子的产生、溶酶体酶的释放等,从而减轻炎症反应。这些研究提示

NSAIDs可能用于预防PEP的发生。随后,2003年, Murray等^[12]发表了评价双氯芬酸预防PEP的随机对照临床研究(randomized clinical trial, RCT),结果显示ERCP术后立即双氯芬酸直肠给药治疗组与安慰剂组相比, PEP的发生率显著降低(6.36% vs 15.5%)。2007年, Sotoudehmanesh等^[13]报道消炎痛直肠给药可有效、安全地预防PEP的发生,尤其是对于PEP高风险(如经过胰管造影)病例,而且药物干预组无一例发生中至重度PEP,而安慰剂组发生率为2.3%。同年, Montaña Loza等^[14]报道:75例怀疑有胆管阻塞的墨西哥ERCP患者被随机分为消炎痛10 mg直肠纳入组及安慰剂组,结果发现消炎痛组PEP发生率(5.3%)显著低于对照组(16%)。Cheon等^[15]的涉及207例美国病例的RCT提示:ERCP术前及术后口服50mg双氯酚酸钠不能降低整体人群及高风险人群的PEP发生率及严重程度。2008年, Khoshbaten等^[16]报道了来自的伊朗的研究,针对ERCP高风险(如:需胰管造影)患者,与安慰剂组(26%)相比,100 mg双氯芬酸直肠给药组PEP的发生率(4%)显著降低($P<0.01$)。2009年,来自土耳其的 Senol等^[17]报道:ERCP术后立即肌注75 mg双氯酚酸钠并持续静滴生理盐水4 h(5-10 mL/kg体重),与对照组相比, PEP及术后4、8、24 h血清淀粉酶值无显著差别,但将患者分层分析后提示:对未合并SOD的患者,双氯酚酸钠可显著降低PEP发生。接下来, Elmunzer等^[18]统计分析了截止2008年的以上4个RCT涉及912个病例研究,结果提示:NSAIDs可显著降低ERCP术后胰腺炎的发生及严重程度,使用NSAIDs的患者无一例发生重症胰腺炎,也不增加EST术后出血几率。而来自我国温州大学第二附属医院的Zheng等^[19]进一步将以上ERCP病例按其手术操作难度分为高危和低危人群,将PEP按照Cotton标准分为轻、中、重度,进行分层统计分析后提示:直肠给予NSAIDs可显著降低轻度PEP的发生($RR = 0.40$),可降低中度及重度PEP的发生($RR = 0.13$),全部912例患者均无死亡,提示直肠给予NSAIDs是安全有效的。

将以上研究归纳分析:(1)关于给药途径:既有经口途径^[15],也有经直肠给药的报道^[12-14,16],还有肌肉注射的报道^[17]。目前哪种给药途径更好尚无定论^[18],但四项RCT证实直肠给药有效^[12-14,16],而一项研究证实口服^[15]无效,荟萃分析也证实NSAIDs直肠给药可有效、安全地预防PEP的发生^[19]。究其原因可能是:经直肠途径给药的达药

■研究前沿

已有多种药物用于预防ERCP术后胰腺炎的发生,如:生长抑素及其类似物、硝酸甘油、蛋白酶抑制剂等,但研究结果均不能令人满意。非甾体类抗炎药(NSAIDs)在预防PEP中的作用已得到多项研究阳性结果支持,显示出了良好的应用前景,但目前关于给药途径、给药时间、药物种类等报道不一,尚有争议,期待有更多高质量的研究提供更多的证据,更加合理、有效地降低PEP的发生率。

■应用要点

NSAIDs在预防PEP中的作用已得到多项研究阳性结果支持,而且其使用方便,价格便宜,投入-效益比明显,且短期使用无明显不良反应,已呈现了美好的前景,可能是将来预防PEP最有希望的一类药物。

物峰浓度需30-90 min,其生物利用度是100%,而经口途径,达峰值时间是2 h,生物利用度是50%-60%^[20]。因此ERCP术前即刻直肠给药起效可能更快,效果可能更好,而且经肛途径也可避免关于NSAIDs可能引发上消化道出血不良反应的担忧。(2)关于给药时间:既有ERCP术后立即给药^[12,16,17],也有术前给药的报道^[13]。还有术前术后联合给药的报道^[15](给药时间为ERCP术前30-90 min以及术后4-6 h口服),已有分析显示无论是ERCP术前还是术后均可降低PEP的发生及降低其严重程度^[18]。然而,到底何时给药及持续多长时间可取得最佳效果尚需进一步摸索及更好的临床试验证实。(3)关于药物种类:已有报道包括:消炎痛^[13,14]和双氯芬酸钠^[15,16]。关于使用何种NSAIDs效果更佳,目前尚无公论,但有分析提示:其对PEP的预防作用与使用何种药物无关,因其抗炎机制及效应(磷脂酶A2抑制活性)大致相同^[19]。但其他、尤其是近几年出现的NSAIDs是否会起效更快、效果更好尚需更多的临床研究去探索。(4)关于不良反应:目前所有的RCT均未发现NSAIDs的不良反应,如溃疡、出血、穿孔,表明短期作用是安全的^[20]。(5)关于其应用人群:适用于普通ERCP危险度人群,更适合于存在PEP发生高风险的ERCP患者(如胰管注射造影剂),这部分患者也最有可能从预防性使用NSAIDs中获益^[21]。当然其使用也受限,如有活动性溃疡病、肾衰的病例不能使用。对于预测有发生心血管意外的高危患者应全面权衡其利弊^[18]。

4 结论

NSAIDs在预防PEP中的作用已得到多项研究阳性结果支持,而且其使用方便,价格便宜,投入-效益比明显(美国平均治疗每个PEP病例需多花费5 700美元,而预防性使用消炎痛或双氯芬酸仅需2美元^[18]),且短期使用无明显不良反应,已呈现了美好的前景,可能是将来预防PEP最有希望的一类药物。当然,目前上述研究还存在一定的局限性,如:仅使用到两种NSAIDs即消炎痛和双氯芬酸钠,仅涉及到三个国家的相关研究,PEP的标准不同^[19]。而且,既往曾被寄予厚望的其他类多种药物经过数千病例的研究后均未取得预防PEP的理想效果,直至目前尚无预防性使用任何一种药物被列为共识^[21]。合理选择病例、熟练操作、改进器械、合理运用药物等多方面因素的联合改进才有可能最大限度地降低PEP的发生,我们期待有更多高质量的研究提供更多的证据,

更加合理、有效地降低PEP的发生率。

5 参考文献

- 1 Frank CD, Adler DG. Post-ERCP pancreatitis and its prevention. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 680-688
- 2 Andriulli A, Leandro G, Federici T, Ippolito A, Forlano R, Iacobellis A, Annese V. Prophylactic administration of somatostatin or gabexate does not prevent pancreatitis after ERCP: an updated meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 624-632
- 3 Bang UC, Semb S, Nojgaard C, Bendtsen F. Pharmacological approach to acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2968-2976
- 4 Dai Y, Wang WH. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2884-2889
- 5 Cotton PB, Lehman G, Vennes J, Geenen JE, Russell RC, Meyers WC, Liguory C, Nickl N. Endoscopic sphincterotomy complications and their management: an attempt at consensus. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 383-393
- 6 韩兵, 王宝仁. ERCP术后急性胰腺炎并发症的危险因素及预防研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1813-1818
- 7 Freeman ML, Guda NM. Prevention of post-ERCP pancreatitis: a comprehensive review. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 845-864
- 8 Wang P, Li ZS, Liu F, Ren X, Lu NH, Fan ZN, Huang Q, Zhang X, He LP, Sun WS, Zhao Q, Shi RH, Tian ZB, Li YQ, Li W, Zhi FC. Risk factors for ERCP-related complications: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 31-40
- 9 Lanás A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase inhibition in the gastrointestinal tract: a trip from peptic ulcer to colon cancer. *Am J Med Sci* 2009; 338: 96-106
- 10 Mäkelä A, Kuusi T, Schröder T. Inhibition of serum phospholipase-A2 in acute pancreatitis by pharmacological agents in vitro. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 401-407
- 11 Simon LS. Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheumatol* 1996; 8: 169-175
- 12 Murray B, Carter R, Imrie C, Evans S, O'Suilleabhain C. Diclofenac reduces the incidence of acute pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastroenterology* 2003; 124: 1786-1791
- 13 Sotoudehmanesh R, Khatibian M, Kolahdoozan S, Ainechi S, Malboosbaf R, Nouraie M. Indomethacin may reduce the incidence and severity of acute pancreatitis after ERCP. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 978-983
- 14 Montañó Loza A, Rodríguez Lomelí X, García Correa JE, Dávalos Cobián C, Cervantes Guevara G, Medrano Muñoz F, Fuentes Orozco C, González Ojeda A. [Effect of the administration of rectal indomethacin on amylase serum levels after endoscopic retrograde cholangiopancreatography, and its impact on the development of secondary pancreatitis episodes] *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 330-336
- 15 Cheon YK, Cho KB, Watkins JL, McHenry L, Fogel EL, Sherman S, Schmidt S, Lazzell-Pannell L, Lehman GA. Efficacy of diclofenac in the prevention of post-ERCP pancreatitis in

- predominantly high-risk patients: a randomized double-blind prospective trial. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 1126-1132
- 16 Khoshbaten M, Khorram H, Madad L, Ehsani Ardakani MJ, Farzin H, Zali MR. Role of diclofenac in reducing post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e11-e16
- 17 Senol A, Saritas U, Demirkan H. Efficacy of intramuscular diclofenac and fluid replacement in prevention of post-ERCP pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3999-4004
- 18 Elmunzer BJ, Waljee AK, Elta GH, Taylor JR, Fehmi SM, Higgins PD. A meta-analysis of rectal NSAIDs in the prevention of post-ERCP pancreatitis. *Gut* 2008; 57: 1262-1267
- 19 Zheng MH, Xia HH, Chen YP. Rectal administration of NSAIDs in the prevention of post-ERCP pancreatitis: a complementary meta-analysis. *Gut* 2008; 57: 1632-1633
- 20 Dai HF, Wang XW, Zhao K. Role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the prevention of post-ERCP pancreatitis: a meta-analysis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 11-16
- 21 Testoni PA. Simple measures to prevent post-ERCP pancreatitis? *Gut* 2008; 57: 1197-1198

■同行评价

本文全面介绍了关于NSAIDs预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的内容, 具有较强的临床意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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, 表内个数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

雌马酚产出相关细菌研究进展

蔡莉, 王培玉, 张玉梅

■背景资料

大豆异黄酮是一类天然的选择性雌激素受体调节剂, 有着非常广泛的生物活性。近年来, 发现大豆素在肠道中由某些特定肠道细菌代谢产生的雌马酚具有比大豆异黄酮更高的生物活性, 而人群中能够把大豆素代谢为雌马酚者仅为30%-50%。

蔡莉, 张玉梅, 北京大学医学部公共卫生学院营养与食品卫生系 北京市 100191

王培玉, 北京大学医学部公共卫生学院社会医学与健康教育系 北京市 100191

国家自然科学基金资助项目, No. 30872114

作者贡献分布: 本文文献查阅由蔡莉与王培玉完成; 论文写作由蔡莉完成; 论文审校由王培玉与张玉梅完成。

通讯作者: 张玉梅, 副教授, 100191, 北京市海淀区学院路38号, 北京大学医学部公共卫生学院营养与食品卫生系。

zhangyumei@bjmu.edu.cn

电话: 010-82801575

收稿日期: 2010-02-01 修回日期: 2010-04-25

接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-08

Advances in research on equol-producing bacteria

Li Cai, Pei-Yu Wang, Yu-Mei Zhang

Li Cai, Yu-Mei Zhang, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China

Pei-Yu Wang, Department of Social Medicine and Health Education, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872114

Correspondence to: Associate Professor Yu-Mei Zhang, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, 38 Xueyuan Road, Haidian District, Beijing 100191, China. zhangyumei@bjmu.edu.cn

Received: 2010-02-01 Revised: 2010-04-25

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-08

Abstract

The main components of isoflavones are genistein and daidzein, both of which have beneficial effects on many diseases. Numerous studies have demonstrated that the biological properties of isoflavones are partially attributed to equol. Daidzein can be transformed to equol exclusively by intestinal bacteria, and only 30%-50% of humans possess such type of bacteria. In this article, we will give an overview of recent advances in research on equol-producing bacteria harbored in the intestine of humans and animals. The bacteria capable of converting daidzein to equol directly will be highlighted. It is revealed that equol-producing bacteria can produce equol during *in vitro* anaerobic culture.

Key Words: Equol; Intestinal bacteria; Metabolism

Cai L, Wang PY, Zhang YM. Advances in research on equol-producing bacteria. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1360-1365

摘要

大豆异黄酮的苷元主要为染料木素和大豆素, 可预防和改善多种疾病。近年来, 大量研究表明大豆异黄酮的生物作用某种程度上归因于雌马酚。大豆素在肠道内由特定菌群转化为雌马酚, 并不是所有人都可以产生雌马酚。本文综述了人体和动物肠道中与雌马酚产出有关的细菌, 重点介绍了目前分离得到的能够直接将大豆素转化为雌马酚的菌株。可产雌马酚的相关细菌经体外厌氧培养能产生雌马酚。

关键词: 雌马酚; 肠道细菌; 代谢

蔡莉, 王培玉, 张玉梅. 雌马酚产出相关细菌研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1360-1365

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1360.asp>

0 引言

大豆异黄酮(soybean isoflavones, SI)是以3-苯并吡喃为母核的植物雌激素, 具有弱雌激素和抗雌激素双重活性, 是一类天然的选择性雌激素受体调节剂。众多研究发现, 以染料木素(genistein)大豆素(daidzein)为主要苷元成分的SI具有非常广泛的生物学活性, 如降低冠心病、动脉粥样硬化的发病率, 抗乳腺癌、前列腺癌, 预防骨质疏松, 并可改善绝经期综合征, 保护神经, 抗衰老^[1]等。近年来, 随着研究的深入, 发现daidzein在肠道中由某些特定肠道细菌代谢产生的雌马酚(equol)具有比SI更高的生物活性, 性质更稳定, 更易被结肠壁吸收、在血浆中的清除速度更慢, 并推测SI的生物学作用在一定程度上可能归因equol^[2]。而人群中能够把daidzein代谢为equol者仅为30%-50%。影响产equol能力的因素包括肠道生理环境、宿主基因、饮食因素等。如不同人种间差异明显, 韩裔美国人中产equol的比例高于美国白种人^[3], 素食者中产equol比例高于非素食者^[4]。研究还显示, 宿主基因对肠

■同行评议者

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

道正常菌群有影响^[5]; 膳食构成可能会影响肠道细菌的组成和equol产出^[6], 说明宿主基因和饮食因素可能是通过影响肠道菌群而影响个体产equol的能力. 由于equol仅由肠道细菌特异性产生, 并且equol的生物学作用和对人群的适用性优于SI, 因此equol产出相关细菌的应用前景非常广. 把equol产出相关细菌分离出来, 将使以下几点成为可能: (1)通过肠道细菌检测来鉴定产equol者; (2)通过生物技术大量合成equol, 从而促进equol人体试验的开展; (3)把equol开发成保健品, 用于促进非equol产出人群的健康和预防疾病.

1 equol在体内的产生

SI在天然大豆中的主要存在方式是结合了糖基的糖苷大豆异黄酮, 即大豆苷(daidzin)和染料木苷(genistin). 在人和哺乳动物体内, 糖苷形式的SI不能直接经小肠壁吸收, 也没有生理活性, 少量大豆苷在小肠中可被 β -葡萄糖苷酶作用去除糖基生成大豆素daidzein, 部分游离苷元被小肠吸收. 未被吸收的SI可被肠道细菌降解, daidzein的代谢途径是先加氢形成双氢大豆素(dihydrodaidzein, DHD), 然后通过C-环开环形成O-脱甲基安哥拉紫檀素(O-demethylangolensin, O-DMA), 或是通过去酮形成equol, 由胃肠黏膜吸收^[7].

2 equol的生物活性

equol的分子式为 $C_{15}H_{14}O_3$, 在体内比其前体daidzein有更强的生物活性, 并且与降低某些疾病和肿瘤的发病率有关. 目前研究较多的是equol的抗氧化能力、雌激素和抗雌激素双重活性. 抗氧化作用可能是equol生物学作用的基础之一. 研究发现, equol可以清除多种自由基; 可以显著降低DNA链断裂, 且作用效果优于daidzein和传统的抗氧化维生素抗坏血酸和 α -生育酚^[8]; 还可以通过清除自由基和抑制氧化应激损伤以达到抗辐射的作用. equol为手性分子, 有S和R两种异构体, 具有类雌性激素活性. 目前在体内发现的代谢产物均为S型, S型与ER- β 的亲合力较强; R型与ER- α 的亲合力较弱, 与ER- β 的亲合力更弱. 这两种异构体与雌激素受体的亲合力均高于daidzein^[9]. 当体内雌激素过多时, equol与雌激素受体竞争性结合, 降低雌激素与受体结合的机会, 起到抗雌激素作用.

有研究发现, SI对机体的保护作用可能部

分归因于equol. 最近的SI人体干预实验表明, 对产equol者的干预效果优于非产出者. 比如在摄入大豆或SI后, 骨质疏松的预防作用在产equol者中更为明显^[10]; 产equol者血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、C-反应蛋白降低的幅度和肱动脉血流介导血管舒张增加的幅度均比非产出者大^[11], 提示equol有更强的心血管疾病保护作用; 补充SI的妇女中, 更年期症状得到改善^[12], 骨吸收的指标尿脱氧吡啶诺啉明显下降, 收缩压和舒张压均下降, 血和尿中equol含量高的受试者, 改善效果更好^[13]. 此外, 流行病学研究和动物实验、体外实验也表明, equol有抗乳腺癌、前列腺癌等作用^[14,15].

3 人体内的equol产出相关细菌

早期研究表明, 在人体粪样中加入daidzein后厌氧培养, 可以检测到equol^[16], 证实了daidzein在人体肠道内由细菌代谢生成equol, 但究竟肠道中哪些细菌对daidzein有降解作用并不清楚. 随着研究的深入, 研究者逐渐分离出一些可以降解daidzein的细菌.

3.1 阶段降解daidzein的细菌 2000年, Hur等^[17]对粪样中微生物进行分离培养, 发现大肠杆菌HGH21和革兰阳性菌株HGH6可将糖苷形式的daidzin和genistin降解为苷元, 即daidzein和genistein. 在37℃厌氧条件下, 梭菌菌株HGH6还可以使daidzein和genistein转化为DHD和双氢染料木素(dihydrogenistein, DHG). HGH6可以将异黄酮C-2和C-3之间的双键转化为单键, 但不能转化黄酮类物质芹菜素(apigenin)和5, 7-二羟黄酮(chrysin)中类似的双键, 提示此菌可能对SI的降解具有特异性. Wang等^[18]于2004年从一个健康妇女的粪样中分离出一株革兰阴性杆状厌氧细菌Julong732, 在厌氧条件下可将DHD转化为S-equol. 菌株Julong732不具有能将R-equol转化为S-equol(或反向转化)的消旋酶. 通过16S rRNA基因序列比对发现, Julong732与Eggerthella hongkongensis HKU10具有92.8%的相似性, 其核苷酸序列基因库(GenBank)的登录号是AY310748. 有报道显示, 由于婴幼儿体内正常微生物群落结构不完善而不能代谢大豆异黄酮苷元. 然而, Tamura等^[19]于2006年从一个7岁男孩粪样中分离得到1株革兰阳性厌氧菌TM-40, 具有将糖苷形式的daidzin和苷元形式的daidzein转化为DHD的能力, 由此推测人体在7岁或7岁以

■ 研发前沿

目前对雌马酚的研究主要集中在雌马酚的生物学作用和雌马酚产出相关细菌的分离和应用.

■相关报道

Yee等用*Lactococcus garvieae*对大豆进行发酵,发酵过程中50%的daidzein转化为5-OH-equol。对5-OH-equol进行安全性评价,实验证明5-OH-equol没有遗传毒性,急性毒性剂量大于4 000 mg/kg,无观察到不良反应剂量(NOEL)为2 000 mg/(kg·d),证明此发酵产物的安全性较高。

前就具备降解SI的能力。在37℃厌氧培养TM-40的过程中,daidzein做为底物时,DHD的转化率较高,而daidzin做为底物时,DHD的转化率更高。16S rRNA基因序列分析,发现TM-40与粪芽孢菌*catenaformis*有93%的相似性,其GenBank登录号是AB249652。

上述细菌均不能直接将daidzein转化为equol,为进一步研究,Wang等^[20]将Julong732和乳酸杆菌Niu-O16混合培养,成功使daidzein转化为equol。其中Niu-O16是从牛的瘤胃内容物中分离出来的菌株,可使daidzein转化成DHD。因其生物转化能力优于菌株HGH6,故研究者在混合培养中选用Niu-O16。在Julong732和Niu-O16的混合培养物中加入daidzein和在单纯Julong732培养物中加入DHD均能产equol,前者产equol的速率比后者快。主要原因推测为混合培养物中Julong732数量增加,因为混合培养时,Julong732繁殖速度增加,同时Niu-O16繁殖速度减慢,说明了细菌在生长过程中受到其他菌种的影响。Decroos等^[21]采集了4位志愿者的粪样作为培养分离样本,研究人体粪样细菌对daidzein的代谢情况。结果显示,其中两份粪样的微生物具有降解daidzein的能力,终产物分别是DHD和O-DMA, DHD和equol。对能产生equol的粪样进行分子指纹分析技术研究,发现黏膜乳酸杆菌EPI2,粪链球菌EPI1, *Finegoldia magna* EPI3和*Veillonella sp.* strain EP(简称EPC4)联合培养可产生equol。其中只有前三株细菌可以被纯培养,这三株细菌纯培养均不能产生equol,研究者未能阐明EPC4中每个细菌的具体转化功能。研究同时发现氢气、丁酸和丙酸等结肠中碳水化合物的发酵终产物可以提高混合培养物中equol的产量;而果寡糖对equol的产生有抑制作用。把EPC4混合培养物接种到equol非产出者的粪样,可以在培养后的粪样中检测到equol。为探究EPC4在肠道的具体代谢情况,研究者构建了一个人体肠道微生物体系模拟器^[22],包括胃、小肠、升结肠、横结肠、降结肠五个部分。在模拟器中加入大豆胚芽粉,分别用两个不能产equol个体的粪样对EPC4进行培养。结果显示,EPC4在胃部和小肠的环境下有活性,但不能产生equol;在升结肠部位检测到少量equol;在横结肠和降结肠中能检测到较多的equol,同时daidzein和DHD都下降,表明EPC4可以使equol非产出者成为产equol者。

3.2 直接把daidzein代谢为equol的细菌 近年来,对daidzein降解菌的研究发展较快,通过对培养条件的优化和控制,部分研究者已经检测到能够将daidzein直接转化为equol的菌株。2007年,Shigeto等^[23]将20例成年男女的粪样在37℃厌氧环境中用脑心浸液(brain heart infusion, BHI)进行分离培养,成功分离出3株能将daidzein直接转化为equol的细菌。经过生物学鉴定,确定这3株菌株分别为乳酸球菌20-92、真杆菌7-430和梭菌20-197,其中乳酸球菌20-92的16S rRNA基因序列与*Lactococcus garvieae* 100%相同,GenBank登录号为AY699289,其他两个菌株未能鉴定菌种。这是首次报道乳酸菌能够直接将daidzein转化为equol,由于乳酸菌的安全性较高,推测菌株20-92有望用于食品开发。

Jin等^[24]于2008年从人粪样中分离得到菌株PUE和DZE,前者能将葛根素的葡萄糖基去掉转化为daidzein,后者能将daidzein和genistein分别转化为equol和5-OH-equol,两者联合培养可以使葛根素转化为equol。同样在37℃厌氧环境中,将粪样稀释液接种于一般厌氧培养基(general anaerobic medium, GAM)中,DZE菌株在GAM培养液中生长缓慢,但加入1%精氨酸或加入PUE联合培养,其生长速度加快。16S rRNA基因序列分析显示,DZE的GenBank登录号是EU377663,与*Slackia faecicanis sp.*有92.8%的相似性。经过各种细菌鉴定试验,研究者推测DZE属Coriobacteriaceae科一个新的属,并命名为*Slackia equolifaciens sp. nov.*

Yokovama等^[25]于2008年从人粪样中分离得到1株格兰阳性非子孢细菌YY7918,能够将daidzein转化为equol。研究者在厌氧环境中分别用BHI、心浸液(heart infusion, HI)、乳酸杆菌MRS培养基、GAM培养液和大豆酪蛋白消化物培养基来培养细菌,发现用HI和MRS来培养细菌,daidzein不能被代谢,最终选用GAM作为基础培养基。16S rRNA基因序列分析发现,YY7918与*Eggerthella hongkongensis* HKU10有93.3%的相似性,基因树显示YY7918属于Coriobacteriaceae科*Eggerthella sp.*的一个新物种,其GenBank登录号是AB379693。研究还发现,YY7918进行对氨基糖苷类、四环素类、新喹诺酮类和β-内酰胺类抗生素敏感,提示服用上述抗生素可能会使个体产equol的能力下降。

Maruo等^[26]在2008年从健康人的粪样中分

离出9株格兰阳性厌氧球杆菌, 其中有7株细菌能够将daidzein转化为equol, 分别命名为FJC-B9T, FJC-B12, FJC-B15, FJC-B19, FJC-B20, FJC-D47和FJC-D53; 另外菌株FJC-A10和FJC-A16能够将DHD转化为equol. 上述菌株用GAM肉汤在37℃厌氧培养时, 加入精氨酸可使其生长加快. 研究者将分离得到的9个菌株分为4组, 从每个组中选出一代表菌, 进行16S rRNA基因序列分析. 结果显示, 菌株FJC-B9T, FJC-B20, FJC-D53, FJC-A10的GenBank登录号分别是AB306661, AB306662, AB306663和AB306660, 基因树分析表明同属于Coriobacteriaceae科, 并且和菌株Julong732, do03位于同一个簇内, 而这个簇与*Eggerthella sp.*, *slackia sp.*具有明显的界线. 虽然菌株Julong732和do03也具有产equol的能力, 但研究者的进一步研究表明并不是所有位于这个簇内的菌株都具有产equol的能力. 在此之前, Coriobacteriaceae科被划分为8个属, Maruo等将新发现的9个菌株划分为这个科的一个新属新种, 命名为*Adlercreutzia equolifaciens gen. nov., sp. nov.*. 目前对Coriobacteriaceae科并没有公认的表型特征, 研究者发现新分离得到的9个菌株以及*Eggerthella sp.*的三个菌株所含的甲基萘醌类是二甲基萘醌-6(Dimethylmenaquinone-6, DMMK-6)和甲基萘醌-6(Methylmenaquinone-6, MMK-6), 具有特异性, 因此推测DMMK-6和MMK-6可能是Coriobacteriaceae科潜在的化学分类标志物.

2009年, Matthies等^[27]从一个37岁健康妇女的粪样中分离得到1株格兰阳性杆状厌氧菌HE8, 与菌株DZE一样, HE8能够分别将daidzein和genistein转化为equol和5-OH-equol. 在HE8菌株培养过程中加入四环素, 用来抑制不会影响daidzein转化为equol的菌群生长. 用HPLC检测HE8菌株对SI的转化发现, HE8菌株对daidzein的转化比genistein快. 相对于静止期, 在培养早期加入daidzein或genistein, HE8对SI的转化速度增加数倍. 与菌株DZE相同, 1%精氨酸可以促进HE8的生长. 16S rRNA基因序列分析发现, HE8与DZE有87.6%的相似性. 根据细菌表型特征和遗传分析, HE8属于Coriobacteriaceae科*slackia sp.*的一个新物种, 其GenBank登录号为EU826403.

4 动物体内直接把daidzein代谢为equol的菌株
许多动物体内有能够降解daidzein的细菌. 2006

年, Minamida等^[28]首次从大鼠肠道中分离出1株格兰阳性厌氧杆菌, 命名为do03, 能够使daidzein转化为equol. 在37℃厌氧环境中, 用普通GAM肉汤作为对照, 往培养液中加入丁酸和精氨酸, equol产出速率分别增加4.7倍和4.5倍. 结果还显示, 菌株do03在生长过程中能够利用精氨酸, 由此推测equol产出速率的增加可能是因为do03数量的增长. 16S rRNA基因序列比对分析发现, do03与人体肠道细菌Julong732有99%的相似性, GenBank登录号是AB266102.

2008年, Matthies等^[29]从小鼠肠道中分离得到一株格兰阳性厌氧杆菌Mt1B8, 具有将daidzein和genistein分别转化成equol和5-OH-equol的功能. 研究者在37℃厌氧环境中用BHI培养液来增菌, 接着用自制的Mt1琼脂来分离细菌. 16S rRNA基因序列和基因树比对显示, Mt1B8也属于Coriobacteriaceae科, 其GenBank的登录号是AM747811.

Yu等^[30]首次从猪的粪样中分离出两株格兰阳性短杆菌D1和D2, 可以将daidzein转化为equol. 为富集猪粪样中能够产equol的微生物, Yu等对三种不同培养基(M1, M2, M3)进行了筛选, 结果发现自制的M1培养基中富集的微生物产生大量的equol. 并且发现, 补充葡萄糖、麦芽糖、果糖、菊粉、乙酸和丁酸的基础培养基均能促进菌株D1生长, 其中果寡糖和菊粉比葡萄糖能更好促进菌株D1生长; 而乳酸对equol的产生有抑制作用. 生物学鉴定表明, D1和D2都属于真杆菌属, 其GenBank登录号分别为DQ904563和DQ904564.

5 结论

daidzein在人或动物体内由肠道细菌转化为equol. equol产出相关细菌的分离条件不尽相同, 其中培养基的种类、细菌生长促进物的选择和厌氧条件的控制尤为重要. 目前已经分离出的能够降解daidzein及其代谢物的细菌主要集中在Coriobacteriaceae科各个属、真杆菌属、梭菌属、乳酸球菌和乳酸杆菌属, 如菌株Julong732, DZE, YY7918, FJC-B9T等, HE8, do03, Mt1B8属于Coriobacteriaceae科各个属; 菌株7-430, D1, D2位于真杆菌属, 菌株HGH6, TM40和20-197位于梭菌属; 菌株20-92, EPI2, Niu-O16属于乳酸菌. 人群中产equol者只占30%-50%, 而equol有着广泛的生物活性并对人体产生有益的影响, 并且体外培养上述产equol的细菌能够得

■创新盘点

本文综述了人体和动物肠道中与雌马酚产出有关的细菌, 重点介绍了近几年分离得到的能够直接将大豆素转化为雌马酚的菌株.

■应用要点

深入了解雌马酚
产生相关细菌的
种类和分离培养
条件,为雌马酚生
物合成提供了新
的思路。

到equol,因此其应用前景十分广阔。但是,能否通过检测人体粪源细菌来快速鉴定产equol者仍然是一个未解决的问题;此外,能否通过生物技术大量合成安全、有活性的equol也有待进一步的研究。

6 参考文献

- Mateos-Aparicio I, Redondo Cuenca A, Villanueva-Suárez MJ, Zapata-Revilla MA. Soybean, a promising health source. *Nutr Hosp* 2008; 23: 305-312
- Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 2002; 132: 3577-3584
- Song KB, Atkinson C, Frankenfeld CL, Jokela T, Wähälä K, Thomas WK, Lampe JW. Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls. *J Nutr* 2006; 136: 1347-1351
- Setchell KD, Cole SJ. Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians. *J Nutr* 2006; 136: 2188-2193
- Van de Merwe JP, Stegeman JH, Hazenberg MP. The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983; 49: 119-124
- Nagata C, Ueno T, Uchiyama S, Nagao Y, Yamamoto S, Shibuya C, Kashiki Y, Shimizu H. Dietary and lifestyle correlates of urinary excretion status of equol in Japanese women. *Nutr Cancer* 2008; 60: 49-54
- Heinonen S, Wähälä K, Adlercreutz H. Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds. *Anal Biochem* 1999; 274: 211-219
- Hedlund TE, Johannes WU, Miller GJ. Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. *Prostate* 2003; 54: 68-78
- Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Phipps WR, Kurzer MS. Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 581-586
- Wu J, Oka J, Higuchi M, Tabata I, Toda T, Fujioka M, Fuku N, Teramoto T, Okuhira T, Ueno T, Uchiyama S, Urata K, Yamada K, Ishimi Y. Cooperative effects of isoflavones and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: a randomized placebo-controlled trial. *Metabolism* 2006; 55: 423-433
- Clerici C, Setchell KD, Battezzati PM, Pirro M, Giuliano V, Asciutti S, Castellani D, Nardi E, Sabatino G, Orlandi S, Baldoni M, Morelli O, Mannarino E, Morelli A. Pasta naturally enriched with isoflavone aglycons from soy germ reduces serum lipids and improves markers of cardiovascular risk. *J Nutr* 2007; 137: 2270-2278
- Howes LG, Howes JB, Knight DC. Isoflavone therapy for menopausal flushes: a systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 2006; 55: 203-211
- Uesugi S, Watanabe S, Ishiwata N, Uehara M, Ouchi K. Effects of isoflavone supplements on bone metabolic markers and climacteric symptoms in Japanese women. *Biofactors* 2004; 22: 221-228
- Choi EJ, Ahn WS, Bae SM. Equol induces apoptosis through cytochrome c-mediated caspases cascade in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Chem Biol Interact* 2009; 177: 7-11
- Akaza H, Miyana N, Takashima N, Naito S, Hirao Y, Tsukamoto T, Fujioka T, Mori M, Kim WJ, Song JM, Pantuck AJ. Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34: 86-89
- Chang YC, Nair MG. Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *J Nat Prod* 1995; 58: 1892-1896
- Hur HG, Lay JO Jr, Beger RD, Freeman JP, Rafii F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol* 2000; 174: 422-428
- Wang XL, Hur HG, Lee JH, Kim KT, Kim SI. Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 214-219
- Tamura M, Tsushida T, Shinohara K. Isolation of an isoflavone-metabolizing, Clostridium-like bacterium, strain TM-40, from human faeces. *Anaerobe* 2007; 13: 32-35
- Wang XL, Kim HJ, Kang SI, Kim SI, Hur HG. Production of phytoestrogen S-equol from daidzein in mixed culture of two anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* 2007; 187: 155-160
- Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol* 2005; 183: 45-55
- Decroos K, Eeckhaut E, Possemiers S, Verstraete W. Administration of equol-producing bacteria alters the equol production status in the Simulator of the Gastrointestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *J Nutr* 2006; 136: 946-952
- Uchiyama S, Tomomi U, Suzuki T. Identification of a Newly Isolated Equol-Producing Lactic Acid Bacterium from the Human Feces. *J Enteric Bacteria* 2007; 21: 217-220
- Jin JS, Nishihata T, Kakiuchi N, Hattori M. Biotransformation of C-glucosylisoflavone puerarin to estrogenic (3S)-equol in co-culture of two human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 1621-1625
- Yokoyama S, Suzuki T. Isolation and characterization of a novel equol-producing bacterium from human feces. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72: 2660-2666
- Maruo T, Sakamoto M, Ito C, Toda T, Benno Y. Adlercreutzia equolifaciens gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus Eggerthella. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; 58: 1221-1227
- Matthies A, Blaut M, Braune A. Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 1740-1744
- Minamida K, Tanaka M, Abe A, Sone T, Tomita

- F, Hara H, Asano K. Production of equol from daidzein by gram-positive rod-shaped bacterium isolated from rat intestine. *J Biosci Bioeng* 2006; 102: 247-250
- 29 Matthies A, Clavel T, Gütschow M, Engst W, Haller D, Blaut M, Braune A. Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4847-4852
- 30 Yu ZT, Yao W, Zhu WY. Isolation and identification of equol-producing bacterial strains from cultures of pig faeces. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 282: 73-80

■同行评价
本文内容丰富全面, 对同行有一定的参考意义。

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.

高频超声多参数诊断SD大鼠脂肪肝的价值

全杰荣, 罗燕, 范玉亭

■背景资料

脂肪肝是多种因素引起的肝细胞内脂肪堆积的一种病理表现, 目前, 脂肪肝患病率呈上升趋势。定量诊断脂肪肝的方法包括CT、MRI、MRS及超声。超声由于普及、经济、快速、方便成为诊断脂肪肝最常用的方法, 在定量诊断研究中也引人注目。

全杰荣, 罗燕, 范玉亭, 四川大学华西医院超声诊断科 四川省成都市 610041

国家自然科学基金资助项目, No. 30870715

作者贡献分布: 此课题立题及设计由罗燕完成; 研究过程由罗燕、全杰荣及范玉亭完成; 数据分析及论文撰写由全杰荣完成; 实验指导及论文修改由罗燕完成。

通讯作者: 罗燕, 教授, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院超声诊断科. luoyan77@vip.sina.com

电话: 028-85423192

收稿日期: 2010-02-25 修回日期: 2010-04-16

接受日期: 2010-04-20 在线出版日期: 2010-05-08

Multi-parameter quantitative evaluation of rat fatty liver using high-frequency ultrasound

Jie-Rong Quan, Yan Luo, Yu-Ting Fan

Jie-Rong Quan, Yan Luo, Yu-Ting Fan, Department of Ultrasound, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30870715

Correspondence to: Professor Yan Luo, Department of Ultrasound, West China Hospital of Sichuan University, 37 Guoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. luoyan77@vip.sina.com

Received: 2010-02-25 Revised: 2010-04-16

Accepted: 2010-04-20 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To investigate the value of high-frequency ultrasound for multi-parameter quantitative evaluation of fatty liver in rats.

METHODS: Thirty-two Sprague-Dawley rats, including 24 rats with nonalcoholic fatty liver and 8 normal controls, were used in this study. The significance of liver gray scale (GS) value, hepatorenal GS ratio and hepatosplenic GS ratio in diagnosing fatty liver was evaluated by comparing with pathological results.

RESULTS: The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve for liver GS value was 0.91. Using a liver GS value of 54 as the cutoff point, the sensitivity and specificity were 81.8% and 100%, respectively. The area under the ROC curve for hepatorenal GS ratio was 0.76. Using a hepatorenal GS ratio of 1.05 as the cutoff

point, the sensitivity and specificity were 63.6% and 88.9%, respectively. The optimal cutoff point of hepatorenal GS ratio for the prediction of steatosis > 60% was 1.2, with a sensitivity of 100% and a specificity of 99.0%. The area under the ROC curve of hepatosplenic GS ratio was 0.96. Using a hepatosplenic GS ratio of 1.1 as the cutoff point, the sensitivity and specificity were 86.4% and 100%, respectively. The optimal cutoff point of hepatosplenic GS ratio for the prediction of steatosis \geq 30% was 1.23, with a sensitivity of 80% and a specificity of 100%; and for the prediction of steatosis > 60% was 1.3, with a sensitivity of 100% and a specificity of 95.5%.

CONCLUSION: Liver GS value can be used as a diagnostic parameter for fatty liver in rats. Hepatorenal GS ratio can only be used for diagnosis of severe steatosis. Hepatosplenic GS ratio is a promising parameter for diagnosis of different degrees of steatosis.

Key Words: Fatty liver; Ultrasonography; Rat

Quan JR, Luo Y, Fan YT. Multi-parameter quantitative evaluation of rat fatty liver using high-frequency ultrasound. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1366-1370

摘要

目的: 探讨高频超声多参数诊断及分级诊断大鼠脂肪肝(FL)的价值。

方法: 选用SD大鼠32只, 8只为对照组, 24只为高脂饮食FL组, 以病理为金标准, 计算肝脏灰阶强度值(GS)、肝肾GS比值、肝脾GS比值诊断及分级诊断脂肪肝的准确性。

结果: 肝脏GS诊断FL的ROC曲线下面积为0.91, 以GS>54诊断FL的灵敏度(Sen)和特异度(Spe)为81.8%, 100.0%。肝肾GS比(肝/肾)诊断FL的ROC曲线下面积为0.76; 以肝/肾>1.05诊断FL的Sen和Spe为63.6%, 88.9%; 以肝/肾>1.2诊断重度FL的Sen和Spe为100%, 99%。肝脾GS比(肝/脾)诊断FL的ROC曲线下面积为0.96; 以肝/脾>1.1诊断FL的Sen和Spe为86.4%,

■同行评议者

吕宾, 教授, 浙江中医学附属属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

100.0%; 以肝/脾>1.23诊断中度以上FL的Sen和Spe为80%, 100%; 以肝/脾>1.3诊断重度FL的Sen和Spe为100%, 95.5%.

结论: 肝脏GS可作为大鼠FL初步诊断的指标; 肝肾GS比仅可作为重度FL的诊断指标; 肝脾GS比有望作为分级诊断的指标.

关键词: 脂肪肝; 超声诊断; 大鼠

全杰荣, 罗燕, 范玉亭. 高频超声多参数诊断SD大鼠脂肪肝的价值. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1366-1370
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1366.asp>

0 引言

随着我国公众生活水平的提高, 脂肪肝在我国逐渐成为常见病. 脂肪肝早期是防治的最佳阶段, 因此, 在高危人群中早期筛查出脂肪肝患者并密切随访, 对该疾病的治疗非常重要. 超声检查以其无创性、经济性而成为诊断脂肪肝的首选方法, 但由于受到患者条件、检查者经验及仪器条件等诸多影响, 诊断结果相对客观性较差, 且在分级诊断方面缺乏量化数值指标. 为了筛选出较好的诊断脂肪肝的量化数值指标, 我们采用高脂高胆固醇饮食建立了大鼠脂肪肝模型, 对肝脏、脾脏、肾脏进行了二维超声图像平均灰阶强度(gray scale, GS)分析, 探讨高频超声多参数诊断大鼠脂肪肝的准确性及分级诊断的可能性.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠32只, ♂, 体质量150-200 g, 由四川大学动物实验中心提供. 高脂饲料配方: 基础饲料87.9%, 猪油10%, 胆固醇2%, 猪胆盐0.1%. 由四川大学动物实验中心提供基础饲料并加工. 猪油为市售, 胆固醇和猪胆盐购自溶海生物科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 对照组8只, 喂养基础饲料; 实验组24只, 喂养高脂饲料.

1.2.2 大鼠肝脏体表超声检查: 采用超声诊断仪Siemens Acuson Antares, 探头为VFX13-5, 在相同条件下(总增益为29 dB/DR65, 深度为2.5 cm, 分辨率及灵敏度固定, STC曲线调节钮置于正中成一直线)检查. 对照组于第4周和第10周各对4只大鼠进行超声检查, 实验组于第4, 6, 8, 10, 12, 14周分别对4只大鼠进行超声检查. 检查前用10%水合氯醛麻醉后胸腹部8% Na₂S溶液脱毛.

受检测大鼠取仰卧位, 留取右肝的横断面、脾脏及双肾的纵断面图像并存盘, 检查后第2天处死大鼠, 送肝脏病理检查.

1.2.3 超声分析方法及参数选择: 用Adobe Photoshop 7.0直方图技术测量每一样本肝脏、脾脏及肾脏实质灰阶值, 测量时选取60像素×60像素的感兴趣区域(图像大小为1024像素×768像素), 避开可见的管道系统, 重复测量3次取均值, 计算肝肾GS比值和肝脾GS比值. 整个过程由同一位有经验的超声医师盲法进行检查、测量.

1.2.4 病理检查方法: 处死大鼠后随即做肝脏冰冻切片, 切片厚度约3 mm, 苏丹III染色后用Image-Pro Plus 6.0软件进行脂滴计数和细胞计数, 根据脂肪浸润的肝细胞数量占肝细胞总数的比例<30%、30%-60%、>60%分为轻度、中度及重度脂肪肝^[1].

统计学处理 定量数据均以mean±SD表示. 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较对照组及不同程度脂肪肝组肝脏GS值、肝肾GS比值、肝脾GS比值, 组间存在差异者用S-N-K法进行组间比较. 统计软件为SPSS13.0, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠造模情况 根据病理诊断标准, 对照组8只无脂肪肝, 实验组无脂肪肝1只, 轻度脂肪肝7只, 中度脂肪肝6只, 重度脂肪肝9只, 1只因病理图像不清晰无法判定被剔除.

2.2 正常肝脏及脂肪肝超声与病理图像 超声发现: 正常肝脏实质回声稍低, 分布均匀, 可见稀疏、散在短小线状回声, 肝内管道显示清晰; 轻度脂肪肝与正常肝脏声像图无明显差异, 中重度脂肪肝可轻至中度长大, 实质回声细密、增强, 肝内管道走行不清, 后方回声未见明显衰减. 病理发现: 正常肝脏肝小叶结构清晰, 肝细胞索排列整齐, 肝窦正常, 实验组大鼠肝细胞内从第4周检查时即出现脂滴空泡, 但数目较少, 以小泡性脂滴为主, 随着时间的增加, 细胞内大泡性脂滴空泡增多. 同时, 肝细胞索排列紊乱, 肝窦变窄(图1).

2.3 正常及不同程度脂肪肝的超声测值 肝脏GS值中度、重度组与正常组间差异有统计意义, 重度组和轻度组差异有统计意义. 肝肾GS比值重度组和正常、轻度、中度组差异有统计意义. 肝脾GS比值轻度、中度、重度组与正常组间差异有统计意义, 重度组与轻度组差异有统计意义.

■研发前沿

由于受到患者条件、检查者经验及超声仪器条件等诸多影响, 加之通常难以获得患者的病理资料, 因此超声对脂肪肝的诊断尤其是分级诊断存在一定的主观性及争议, 需要寻找准确诊断及分级诊断的方法, 而国内有病理对照的定量诊断脂肪肝的研究较少.

■相关报道

刘云霞等系统评价表明现有脂肪肝超声研究均存在病例选择和/或金标准和/或重复性等问题; 苏瑞娟等发现超声灰阶均值与脂肪变性细胞间有较好的相关性; 张文媛等发现肝脏平均灰阶值定量诊断脂肪肝优于现临床采用的目测观察法; Mancini等发现肝肾灰阶比值能定量评价脂肪肝含量.

■创新盘点

肝脏GS值可以用来初步诊断脂肪肝,但受不同仪器、不同条件、不同腹壁厚度影响大,肝肾GS比值可能受高脂血症造成的肾损害影响,而肝脾GS比值则理论上不受腹壁厚度或高脂血症等影响,有望作为评价肝脏相对回声强度的指标。

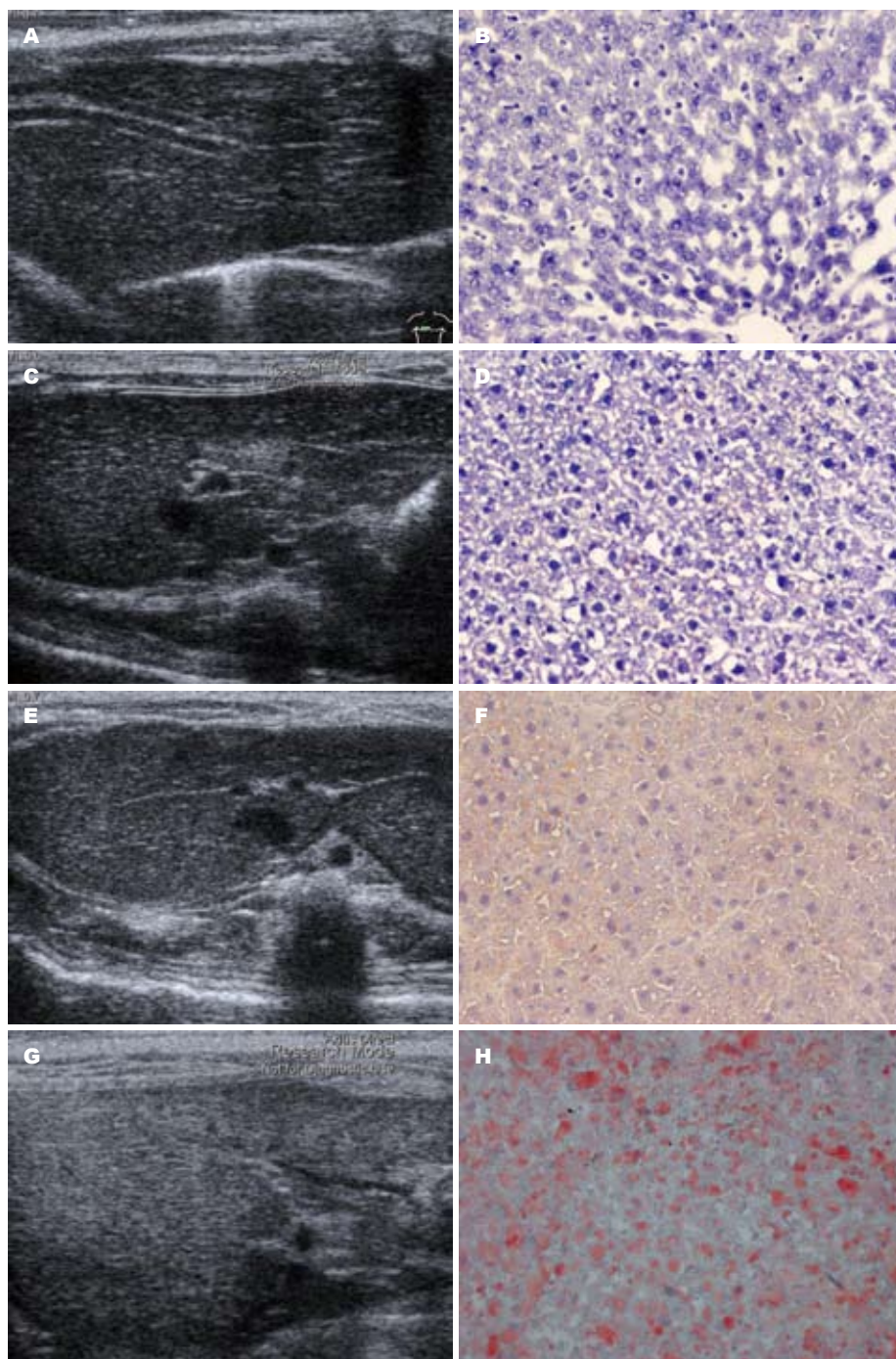


图1 正常肝脏及不同程度脂肪肝超声与病理图像. A, B: 正常大鼠肝脏; C, D: 轻度脂肪肝; E, F: 中度脂肪肝; G, H: 重度脂肪肝; A, C, E, G: 超声图像; B, D, F, H: 病理图像(苏丹Ⅲ×400).

义,重度组与中度组差异有统计意义(表1).

2.4 肝脏GS值、肝肾GS比值、肝脾GS比值正常组与脂肪肝组的临界值 根据ROC曲线选取灵敏度和特异度之和最大的点为临界值.当诊断中度以上脂肪肝时,则以轻度和正常为阴性,中度和重度为阳性,诊断重度脂肪肝时,则以正常、轻度和中度为阴性,重度为阳性,绘制ROC曲线后,再由前述方法选取临界值.肝脏GS值诊断脂肪肝的ROC曲线下面积为0.91,以肝脏GS>54诊断脂肪肝的灵敏度和特异度为81.8%, 100.0%. 肝肾GS比值(肝/肾)诊断脂肪肝的ROC曲线下面积

为0.76,以肝/肾>1.05诊断脂肪肝的灵敏度和特异度为63.6%, 88.9%,以肝/肾>1.2诊断重度脂肪肝的灵敏度和特异度为100%, 99%. 肝脾GS比值(肝/脾)诊断脂肪肝的ROC曲线下面积为0.96;以肝/脾>1.1诊断脂肪肝的灵敏度和特异度为86.4%, 100.0%;以肝/脾>1.23诊断中度以上脂肪肝的灵敏度和特异度为80%, 100%;以肝/脾>1.3诊断重度脂肪肝的灵敏度和特异度为100%, 95.5%(图2).

3 讨论

随着我国公众生活水平的提高及饮食结构的改

表 1 大鼠脂肪肝超声测值 (mean ± SD)

病理程度	n	肝脏GS值	肝肾GS比值	肝脾GS比值
正常	9	48.80 ± 3.60	0.95 ± 0.09	1.02 ± 0.05
轻度	7	54.15 ± 7.50	1.07 ± 0.15	1.15 ± 0.07 ^a
中度	6	62.18 ± 5.60 ^a	0.92 ± 0.10	1.20 ± 0.11 ^a
重度	9	68.72 ± 12.91 ^{ac}	1.40 ± 0.13 ^{ace}	1.56 ± 0.15 ^{ace}

^aP<0.05 vs 正常组; ^aP<0.05 vs 轻度脂肪肝组; ^aP<0.05 vs 中度脂肪肝组.

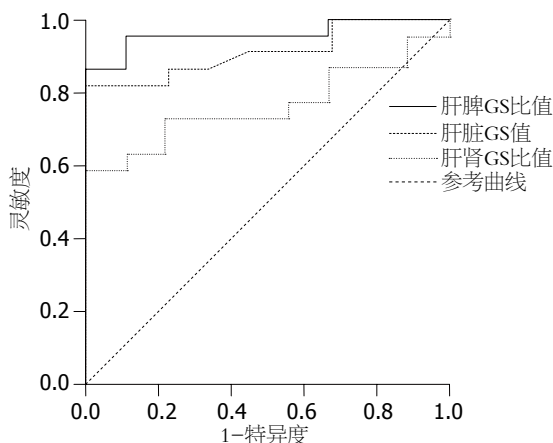


图 2 正常组与脂肪肝组ROC曲线.

变, 脂肪肝在我国逐渐成为常见病. 早期脂肪肝是防治的最佳阶段, 不加以干预则可能导致肝功异常, 甚至发展到肝硬化、肝硬化^[2]. 因此, 在高危人群中早期筛查出脂肪肝患者并早期干预, 对该疾病的转归非常重要. B超是临床上常用及经济的检查手段, 但在轻度脂肪浸润时诊断脂肪肝敏感性低, 肝脏纤维化程度也会影响诊断的敏感性, 且不同患者、不同医生、不同的仪器及设置条件等都会影响诊断结果, 此外, 在超声诊断脂肪肝的研究中, 通常难以获得患者的病理资料, 因此超声对脂肪肝的诊断尤其是分级诊断存在一定的主观性及争议^[3-5]. 实验动物模型去除了腹壁的影响、固定仪器使用条件避免了不同仪器及不同使用条件的差异, 且容易获得病理结果, 因而能够较好地研究脂肪肝诊断及分级诊断, 本研究通过高脂高胆固醇饮食建立脂肪肝模型^[6].

苏瑞娟等^[7]研究提示肝脏GS值与大鼠肝细胞脂肪变性数密切相关($r = 0.81$). 据文献[8]报道, 当大鼠肝脏回声强于或等于右肾皮质回声时, 肝脏回声诊断脂肪肝的敏感度和特异度分别为90%, 100%, 阳性和阴性预测值分别为100.0%, 76.9%. 张文绥等^[9]用超声直方图肝脏平

均灰阶值诊断大鼠脂肪肝的灵敏度88%, 特异度93%, 准确性90%. 本实验肝脏灰阶值诊断大鼠脂肪肝的灵敏度81.8%, 特异度100.0%, 提示肝脏灰阶值可作为脂肪肝诊断的数值指标, 实验结果与其他学者相似. 但其在分级诊断方面效果不理想, 可能与样本量小或者指标本身有关. 此外在临床应用中, 该指标可能会受到不同仪器、不同条件、不同腹壁厚度影响大, 不宜作为分级诊断指标.

除了上述指标, 也有研究^[10-13]趋于用相对指标来诊断, 因为基本排除了影响直方图值的主要因素, 比如探头频率、直方图样框的深度及仪器增益等, 在以上条件相对恒定的状态下, 所测得的直方图值则具有相对准确的价值, 所以本研究也选择了用肝肾GS比值和肝脾GS比值来诊断.

研究^[11-13]表明肝肾GS比值与肝脂肪细胞变性数明显相关, 以此指标诊断脂肪肝灵敏度90%-100%, 特异度90%-95%, 但也有研究者^[14]认为肝肾GS比值分级诊断脂肪肝不如肉眼判断. 本研究中, 肝肾GS比值诊断脂肪肝的灵敏度和特异度分别为63.6%, 88.9%, 与其他研究相比较, 也低于另外两个指标, 可能与高脂血症造成的肾损害相关^[15], 实验中观察到部分大鼠肾脏回声明显增强. 当以肝/肾>1.2诊断重度脂肪肝的灵敏度和特异度为100%, 99%, 提示其可以作为大鼠重度脂肪肝的诊断指标.

脾脏是均质性器官, 常作为腹部脏器定量诊断的参照物^[16], CT也正是以肝脾CT比值来诊断脂肪肝. 本研究中, 我们提出以脾脏的灰阶值作为参照, 肝脾GS比值正常大鼠95%CI为0.98-1.06, 脂肪肝组95%CI为1.23-1.43; 以肝脾GS比值大于1.1诊断脂肪肝, 诊断的灵敏度、特异度分别为86.4%, 100.0%; 以肝脾GS比值大于1.23诊断中度以上脂肪肝, 诊断的灵敏度、特异度分别是80%, 100%; 以肝脾GS比值大于1.3诊断重度脂肪肝, 诊断的灵敏度、特异度分别是

应用要点

超声直方图平均灰阶值测定是一种简单、实用的方法, 目前采用相同的仪器及条件控制, 应用相对比值可能会有较大的临床应用意义, 肝脾灰阶比值有望作为临床诊断脂肪肝的无创性量化指标推广.

■同行评价

本研究设计尚可, 结果可靠, 具有较好的参考价值.

100.0%, 95.5%. 由此提示其即可用于脂肪肝诊断, 还可能成为脂肪肝分级的有效指标, 而且用于临床有可能消除不同腹壁厚度等患者条件的影响, 对于脂肪肝合并肾脏损害的患者该指标同样有意义.

肝脏GS值可作为大鼠脂肪肝初步诊断的指标, 肝肾GS比值仅可作为重度脂肪肝的诊断指标, 肝脾GS比值有望作为大鼠脂肪肝诊断及分级诊断的指标, 但由于该研究样本量较小, 尚需更多研究进一步证实.

4 参考文献

- 1 Iwasaki M, Takada Y, Hayashi M, Minamiguchi S, Haga H, Maetani Y, Fujii K, Kiuchi T, Tanaka K. Noninvasive evaluation of graft steatosis in living donor liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1501-1505
- 2 Reid BM, Sanyal AJ. Evaluation and management of non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1117-1122
- 3 Mehta SR, Thomas EL, Bell JD, Johnston DG, Taylor-Robinson SD. Non-invasive means of measuring hepatic fat content. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3476-3483
- 4 Schwenzer NF, Springer F, Schraml C, Stefan N, Machann J, Schick F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *J Hepatol* 2009; 51: 433-445
- 5 刘云霞, 王洁贞, 刘建平, 庞春坤, 贾红英. 脂肪肝影像学诊断性试验的系统评价. *中国医学科学院学报* 2004; 26: 580-584
- 6 刘再毅, 梁长虹, 王秋实, 刘于宝, 徐莉, 郑君惠. ¹H-MRS在鉴定大鼠非酒精性脂肪肝模型构建中的作

- 用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1612-1616
- 7 苏瑞娟, 吕国荣, 王振华, 李伯义, 刘彦英, 何韶铮, 金鹏. 宫内缺氧对子代大鼠脂肪肝发病的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1048-1051
- 8 Lessa AS, Paredes BD, Dias JV, Carvalho AB, Quintanilha LF, Takiya CM, Tura BR, Rezende GF, Campos de Carvalho AC, Resende CM, Goldenberg RC. Ultrasound imaging in an experimental model of fatty liver disease and cirrhosis in rats. *BMC Vet Res* 2010; 6: 6
- 9 张文媛, 刘阁玲, 张国顺, 马利转. 超声直方图定量评价大鼠肝脏脂肪变性的实验研究. *武警医学* 2009; 20: 590-593
- 10 王韧, 陈亚青, 周永昌, 朱洁华. 超声直方图对脂肪肝诊断的初步分析. *临床消化病杂志* 2006; 18: 91-92
- 11 Mancini M, Prinster A, Annuzzi G, Liuzzi R, Giacco R, Medagli C, Cremone M, Clemente G, Maurea S, Riccardi G, Rivellese AA, Salvatore M. Sonographic hepatic-renal ratio as indicator of hepatic steatosis: comparison with (1)H magnetic resonance spectroscopy. *Metabolism* 2009; 58: 1724-1730
- 12 Webb M, Yeshua H, Zelber-Sagi S, Santo E, Brazowski E, Halpern Z, Oren R. Diagnostic value of a computerized hepatorenal index for sonographic quantification of liver steatosis. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 192: 909-914
- 13 王立, 何苗苗, 周宇谦. 超声定量分析脂肪肝图像与肝功能的关系. *中国临床医学* 2005; 12: 904-908
- 14 Vehmas T, Kaukiainen A, Luoma K, Lohman M, Nurminen M, Taskinen H. Liver echogenicity: measurement or visual grading? *Comput Med Imaging Graph* 2004; 28: 289-293
- 15 张娟, 刘颖, 礼广森, 韩琳琳. 超声背向散射积分技术评价高脂大鼠肾损害的实验研究. *中国超声医学杂志* 2007; 23: 176-179
- 16 Yabuki A, Endo Y, Sakamoto H, Nagayoshi T, Matsumoto M, Suzuki S. Quantitative assessment of renal cortical echogenicity in clinically normal cats. *Anat Histol Embryol* 2008; 37: 383-386

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

Runx3在不同类型胃息肉与胃癌中的蛋白表达及与幽门螺杆菌感染的相关性

仇达, 高善玲, 朱丽, 崔琳

仇达, 高善玲, 朱丽, 崔琳, 哈尔滨医科大学第二附属医院消化内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086
黑龙江省科学技术厅科技攻关基金资助项目, No. GC06C421
作者贡献分布: 本文文献检索、资料分析及撰写由仇达完成; 朱丽协助; 崔琳辅助完成文章的后期修改; 选题, 指导及审校由高善玲完成。
通讯作者: 高善玲, 主任医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第二附属医院消化内科. bolixin-beibei@163.com
电话: 0451-86605143
收稿日期: 2010-01-13 修回日期: 2010-03-29
接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-05-08

Association between Runx3 protein expression and *Helicobacter pylori* infection in different types of gastric polyps and gastric cancer

Da Zhang, Shan-Ling Gao, Li Zhu, Lin Cui

Da Zhang, Shan-Ling Gao, Li Zhu, Lin Cui, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by: the Key Science and Technology Program of Science and Technology Department of Heilongjiang Province, No. GC06C421
Correspondence to: Shan-Ling Gao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. bolixin-beibei@163.com
Received: 2010-01-13 Revised: 2010-03-29
Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To detect Runx3 protein expression and *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection in different pathological types of gastric polyps and gastric cancer, and to investigate their association with the development of gastric polyps and gastric cancer.

METHODS: The expression of Runx3 protein was detected by immunohistochemistry in specimens of inflammatory gastric polyps ($n = 25$), hyperplastic gastric polyps ($n = 25$), adenomatous polypsis ($n = 25$) and gastric cancer ($n = 30$). *H.pylori* infection was evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining, toluidine blue staining and Warthin-Starry (W-S) silver staining.

RESULTS: The positive rate of Runx3 protein expression in gastric cancer was significantly lower than those in normal gastric mucosa, inflammatory gastric polyps, and hyperplastic gastric polyps ($\chi^2 = 8.967, 5.632$ and 4.289 , respectively; all $P < 0.05$). The positive rate of Runx3 protein expression in adenomatous polypsis was significantly lower than those in normal gastric mucosa, inflammatory gastric polyps, and hyperplastic gastric polyps (all $P < 0.05$). Although the positive rate of Runx3 protein expression in gastric cancer was lower than that in adenomatous polypsis, the difference was not statistically significant. Significant difference was noted in the rate of *H.pylori* infection between normal gastric mucosa and gastric cancer ($P < 0.05$). A negative association was noted between the rate of *H.pylori* infection and Runx3 protein expression in gastric polyps and gastric cancer.

CONCLUSION: Reduced Runx3 protein expression and *H.pylori* infection may play a synergistic role in the development of gastric cancer.

Key Words: Runx3; *Helicobacter pylori*; Gastric polyps; Gastric cancer

Zhang D, Gao SL, Zhu L, Cui L. Association between Runx3 protein expression and *Helicobacter pylori* infection in different types of gastric polyps and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1371-1374

摘要

目的: 检测不同病理类型胃息肉和胃癌中Runx3蛋白的表达和幽门螺杆菌(*H.pylori*)的感染率, 探讨其在胃息肉与胃癌中的相关性。

方法: 对炎性胃息肉组25例、增生性胃息肉组25例、腺瘤性息肉组25例、胃癌组30例采用SP染色法检测Runx3的表达水平, HE染色、甲苯胺蓝染色和Warthin-Starry(W-S)银染法检测*H.pylori*的感染情况。

结果: 胃癌组Runx3蛋白的阳性表达率明显

■背景资料

目前对胃息肉的诊断和治疗已经取得了较大进展。但临床医师对胃息肉在临床上的认识仍有较大争议, 主要集中在胃息肉与胃癌的关系及*H.pylori*感染的关系。对胃良性肿瘤胃息肉的研究, 有利于我们更好地认识研究胃癌这一给人类带来巨大危害的恶性疾病。

■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

■研发前沿

Runx3基因作为一种新近发现的抑癌基因,其具体抑癌机制仍然有待于在以后的研究中解决,特别是Runx3基因与其他基因或是因素之间的相互关系还有待进一步深入研究。

低于正常胃黏膜组、炎性胃息肉组和增生性胃息肉组,差异有统计学意义($\chi^2 = 8.967$ 、5.632、4.289, 均 $P < 0.05$);腺瘤性息肉组明显低于正常胃黏膜组、炎性胃息肉组和增生性胃息肉组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。胃癌组低于腺瘤性息肉组,但差异无统计学意义。*H.pylori*的感染率在胃癌组与正常胃黏膜组相比*H.pylori*感染率有统计学意义($P < 0.05$)。胃息肉组和胃癌组中*H.pylori*、Runx3的表达率之间存在着负性相关。

结论: Runx3蛋白表达下调与*H.pylori*感染可能在胃癌的发生过程中起着协同作用。

关键词: Runx3; 幽门螺杆菌; 胃息肉; 胃癌

仇达, 高善玲, 朱丽, 崔琳. Runx3在不同类型胃息肉与胃癌中的蛋白表达及与幽门螺杆菌感染的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1371-1374

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1371.asp>

0 引言

胃息肉是指胃黏膜局限性上皮隆起性的病变。目前对息肉的分类方法很多,国内学者依据病理组织学特征将其分为炎症性息肉、炎性纤维性息肉、错构瘤性息肉、增生性息肉和腺瘤性息肉等。多数报道腺瘤性息肉具有较高的癌变率,但各种类型胃息肉中基因的表达在息肉形成、癌变过程中的作用及其胃癌发生发展之间的关系,目前的文献报道尚不多见。胃癌的发生是一个多因素、多步骤、多基因参与的过程^[1-3]。Runx3作为新发现的肿瘤抑制基因,近期研究又发现Runx3失活或缺失的胃黏膜可以发生肠化生,虽然肠化生并不是伴癌状态,但是其能提高胃液pH值,利于细菌生长而易致癌。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)作为第一类致癌因子其与胃癌发生发展的关系日益受到人们的重视,有学者认为*H.pylori*感染导致了原癌基因的激活和抑癌基因的失活。本实验通过对不同类型胃息肉和胃癌中抑癌基因Runx3的表达和*H.pylori*感染的检测,分析其在各型胃息肉和胃癌中的表达及两者之间的关系,从临床应用角度探讨不同类型胃息肉与胃癌发生的相关性,并期望为肿瘤的基因治疗提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 收集哈尔滨医科大学附属第二医院2006-2009年手术切除的胃癌标本30例,术前均

未进行放化疗,胃镜下电切炎性胃息肉标本25例、增生性胃息肉标本25例、腺瘤性息肉25例,所有标本经病理科确诊。且无使用非甾体类抗炎药及糖皮质激素史。各标本经常规甲醛固定,石蜡包埋切片。*H.pylori*特染主要试剂包括1%硝酸银、2%硝酸银、0.1%甲苯胺蓝染液和醋酸盐缓冲液。免疫组织化学主要试剂包括兔抗人Runx3多克隆抗体试剂盒(购自武汉博士得生物工程有限公司)、生物素标记二抗(辣根过氧化物酶连接的山羊抗兔抗体)购自武汉博士得生物工程有限公司、0.1 mol/L枸橼酸盐缓冲液(自配)、DAB显色剂、防脱片剂APES购自北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Runx3蛋白的检测及阳性结果的判定: 免疫组织化学方法检测Runx3的表达,实验按照试剂盒说明书进行,阴性对照用PBS代替一抗,用已知阳性切片作为阳性对照。由2名未参与实验研究、不了解患者临床资料的病理医生分别独立观察所有切片。以细胞核膜或胞质内出现棕黄色细颗粒为阳性,每一切片观察5个不相连的视野,每个视野计数100个细胞,计算每张切片染色细胞百分率。根据染色细胞所占比例,将Runx3蛋白的阳性率分成4个等级:染色细胞比例>90%为强阳性(+++);50%-90%为阳性(++);10%-49%为弱阳性(+);<10%为阴性(-)。结果不一致时,采取协商统一的原则。

1.2.2 *H.pylori*检测方法及阳性结果判定: 分别采用常规HE染色、Warthin-Starry(W-S)银染法和甲苯胺蓝法检测*H.pylori*的感染情况,后确认*H.pylori*感染有两项以上为阳性者为*H.pylori*阳性组,均阴性者为阴性组,单项阳性者退出该实验。HE染色*H.pylori*为淡紫色,W-S法染色为棕黑色,甲苯胺蓝染色为蓝色。

统计学处理 数据库建立和数据分析采用SPSS13.0软件处理,以 χ^2 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 Runx3蛋白在不同病理类型的胃息肉与胃癌中的表达 Runx3蛋白的表达在正常胃黏膜组、炎性胃息肉组、增生性胃息肉组、腺瘤性息肉组、胃癌组中分别为80.00%、72.00%、68.00%、44.00%、40.00%,胃癌组与正常胃黏膜组、炎性胃息肉组、增生性胃息肉组的阳性率相比有显著性差异($\chi^2 = 8.967$ 、5.632、4.289, 均 $P < 0.05$)。胃癌组与腺瘤性息肉组比无统计学

■相关报道

Runx3在肿瘤发病机制中的研究是近几年研究的热点,目前大量文献报道了消化系统肿瘤和Runx3的相互关系,特别是胃、食管和结肠的研究较多。

表1 Runx3蛋白在不同病理类型的胃息肉与胃癌中的表达

类型	Runx3					阳性率(%)
	<i>n</i>	-	+	++	+++	
正常胃黏膜	25	5	8	7	5	80.00
炎性胃息肉	25	7	7	6	5	72.00
增生性胃息肉	25	8	9	6	2	68.00
腺瘤性胃息肉	25	14	6	3	2	44.00 ^a
胃癌	30	18	7	5	0	40.00 ^a

^a $P<0.05$ vs 正常胃黏膜组、炎性胃息肉组和增生性胃息肉组。

意义($\chi^2 = 0.089$, 表1)。

2.2 *H.pylori*在不同病理类型的胃息肉与胃癌中的表达 *H.pylori*主要存在于胃黏膜表面的黏液中、细胞的表面、胃小凹内、腺腔中及癌旁黏膜,呈弯曲状、海鸥状及杆状,往往聚集成群,而癌组织内却少见*H.pylori*。在正常胃黏膜组、炎性息肉组、增生性息肉组、腺瘤性息肉组、胃癌组*H.pylori*的感染率分别为40.00%、48.00%、48.00%、72.00%、73.33%。经统计学分析,胃癌组与正常胃黏膜组相比,*H.pylori*的感染率有显著差异($P<0.05$,表2)。

2.3 在不同病理类型的胃息肉与胃癌中*H.pylori*阳性组和*H.pylori*阴性组Runx3蛋白的表达 *H.pylori*阳性组中Runx3蛋白的阳性表达率为60.81%,*H.pylori*阴性组中Runx3蛋白的阳性表达率为82.14%。在130例胃黏膜标本中,*H.pylori*阳性组Runx3的阳性表达明显低于*H.pylori*阴性组($\chi^2 = 3.853$, $P<0.05$)。

3 讨论

迄今为止,对胃息肉的诊断和治疗已经取得了较大进展。但临床医师对胃息肉在临床上的认识仍有较大争议,主要集中在胃息肉与胃癌的关系及其与*H.pylori*感染的关系。对胃良性肿瘤胃息肉的研究,有利于我们更好地认识研究胃癌这一给人类带来巨大危害的恶性疾病。

Runx3基因(runt-related transcription factor3 gene)为一种新发现的肿瘤抑癌基因,其能调控细胞的生长发育和细胞的凋亡,对细胞的信号转导和其他生物学效应有着重要而复杂的转录调节作用。因其表达下调在人类多种恶性肿瘤的发生发展过程中起重要作用而备受关注^[4]。抑癌基因Runx3在胃癌中被发现以来,研究便集中在该基因与消化系肿瘤发生发展的关系,尤其是在胃癌、结直肠癌、食管癌、肝癌中^[5],研究最

表2 *H.pylori*在不同病理类型的胃息肉与胃癌中的感染

类型	<i>H.pylori</i>				阳性率(%)
	<i>n</i>	-	+		
正常胃黏膜	25	15	10		40.00
炎性胃息肉	25	13	12		48.00
增生性胃息肉	25	13	12		48.00
腺瘤性胃息肉	25	7	18		72.00
胃癌	30	8	22		73.33 ^a

$\chi^2 = 6.227$, ^a $P<0.05$ vs 正常胃黏膜组。

早、最多的当属其与胃癌发生发展的关系。早期Li等^[4]发现人正常胃黏膜上皮细胞存在Runx3基因的表达式,而在胃癌组织中则有45%-60%的病例存在Runx3基因表达的缺失或下调。这与本研究结果基本相一致,用免疫组织化学检测不同病理类型胃息肉和胃癌中Runx3蛋白的表达情况,在正常胃黏膜组、炎性胃息肉组、增生性胃息肉组、腺瘤性息肉组、胃癌组中其表达分别为80.00%、72.00%、68.00%、44.00%、40.00%,表达率逐渐下降。胃癌组与正常胃黏膜组、炎性胃息肉组、增生性胃息肉组的阳性率相比有统计学意义($P<0.05$)。提示Runx3蛋白表达下调,可能导致胃黏膜上皮细胞增生和分化异常^[6],参与胃癌的发生过程,是胃癌发生过程中的关键性基因。有资料报道由于Runx3半合子缺失或者超甲基化,使得Runx3的表达下调,而胃癌中有一半存在Runx3的甲基化^[4,7]。这提示我们可以探索以Runx3为治疗的靶点,用诱导沉默Runx3基因重新表达的方法对胃癌进行基因治疗。本研究还显示,胃癌组与腺瘤性息肉组比无统计学意义。从而表明腺瘤性胃息肉带有更多的癌细胞的生物学特性和基因表达特点,在多种致癌因素作用下,更趋于发展成为癌。有细胞动力学研究显示,胃增生性息肉的上皮细胞更新缓慢,超微结构发现有细胞成熟过度 and 衰老的特性,因此有可能癌变。据文献报道^[8],增生性息肉癌变率为0.3%-0.6%。Ginsberg证实了在增生性息肉中也包含有腺瘤的成分,此可能为极少数增生性息肉癌变的机制。一般认为,炎性息肉恶变率较低,但许多研究也发现炎性增生性息肉有癌变倾向^[9,10]。

20世纪90年代以来,在人群中具有较高感染率的*H.pylori*与胃癌关系已受到广泛的关注,目前大多数学者认为胃癌可能是*H.pylori*长期感染与其他因素共同作用的结果。据世界胃肠病学

■创新盘点

本实验通过Runx3表达和*H.pylori*感染的联合检测有助于推测胃息肉的生物学行为发展趋势,早期诊断胃息肉癌变并判断其预后,为进一步研究胃息肉与胃癌之间发生、发展的分子机制提供了新的思路。

■应用要点

本实验通过对不同类型胃息肉和胃癌中抑癌基因Runx3的表达和*H.pylori*感染的检测,分析其在各型胃息肉和胃癌中的表达及两者之间的关系,从临床应用角度探讨不同类型胃息肉与胃癌发生的相关性,并期望为肿瘤的基因治疗提供新的途径。

■同行评价

本文具有一定的新颖性,结果有可能对胃息肉癌变的检测及预防起作用。

组织(WGO-OMGE)统计^[11]:全球*H.pylori*感染率大于50%,其中亚洲地区感染率为50%-80%;发达国家*H.pylori*感染率有下降趋势,而发展中国家*H.pylori*感染率较高,年龄、种族、性别、地理位置和社会经济状况等是影响*H.pylori*发病率和感染率的因素。1994年世界卫生组织国际癌症研究机构已将*H.pylori*列为人类I类致癌因子^[12]。本研究实验结果显示:胃癌患者*H.pylori*感染率明显高于正常胃黏膜,表明*H.pylori*感染与胃癌的发生存在密切关系,并且在腺瘤性胃息肉中感染率也较高,因此说明*H.pylori*感染可能在胃息肉癌变过程中起重要作用。赵继红等^[13]通过免疫组织化学研究显示,肿瘤性息肉*H.pylori*感染者中性粒细胞核抗原阳性表达大于未感染者。有2例重度异性增生的乳头状腺瘤P53表达阳性,随访10-23 mo,再次活检病理证实均发生癌变。提示肿瘤性息肉中*H.pylori*感染可促使上皮逐步向癌肿转化。因此,根除*H.pylori*感染,减轻胃黏膜炎症,可能是预防肿瘤性息肉恶变的措施之一。

在不同病理类型胃息肉中*H.pylori*阳性组Runx3蛋白表达率低于*H.pylori*阴性组,二者之间有统计学意义($P<0.05$),这提示Runx3蛋白表达下调与*H.pylori*感染在胃息肉癌变中可能起着协同作用。正如近期研究发现Runx3能抵抗TGF- β 诱导的生长抑制和细胞凋亡,调控胃黏膜上皮细胞分化,其失活或缺失可导致胃黏膜上皮细胞发生肠化生^[14],从而提高胃液pH值,利于细菌生长而易致癌。也有学者认为*H.pylori*感染导致了原癌基因的激活和抑癌基因的失活。那么是Runx3基因失活引发肠化导致*H.pylori*感染,还是*H.pylori*感染导致了Runx3抑癌基因的失活?其具体关系有待进一步深入研究。目前对胃息肉癌变的分子生物学机制研究较少,考虑到促使胃黏膜恶变的因素同样可以引起胃息肉的恶变,认为胃息肉癌变的发生也是多因素,多阶段,多基因变异的结果^[15]。因此,Runx3蛋白表达和*H.pylori*感染的联合检测有助于推测胃息肉的生物学行为发展趋势,早期诊断胃息肉癌变并判断其预后,为进一步研究胃息肉与胃癌之间发生、发展的分子机制提供了新的思路。

4 参考文献

- 1 Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K,

- Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000; 35 Suppl 12: 111-115
- 2 Hara T, Ooi A, Kobayashi M, Mai M, Yanagihara K, Nakanishi I. Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in gastric cancers: detection by fluorescence in situ hybridization. *Lab Invest* 1998; 78: 1143-1153
- 3 Yu J, Miehke S, Ebert MP, Hoffmann J, Breidert M, Alpen B, Starzynska T, Stolte Prof M, Malfertheiner P, Bayerdörffer E. Frequency of TPR-MET rearrangement in patients with gastric carcinoma and in first-degree relatives. *Cancer* 2000; 88: 1801-1806
- 4 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 5 陶军, 邓涛. 抑癌基因RUNX3与消化系统肿瘤关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3787-3791
- 6 Cameron ER, Blyth K, Hanlon L, Kilbey A, Mackay N, Stewart M, Terry A, Vaillant F, Wotton S, Neil JC. The Runx genes as dominant oncogenes. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30: 194-200
- 7 Sakata K, Tamura G, Endoh Y, Ohmura K, Ogata S, Motoyama T. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer* 2002; 86: 564-567
- 8 Abraham SC, Singh VK, Yardley JH, Wu TT. Hyperplastic polyps of the stomach: associations with histologic patterns of gastritis and gastric atrophy. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 500-507
- 9 Murakami K, Mitomi H, Yamashita K, Tanabe S, Saigenji K, Okayasu I. p53, but not c-Ki-ras, mutation and down-regulation of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 are associated with malignant transformation in gastric hyperplastic polyps. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 224-234
- 10 Yao T, Kajiwaru M, Kuroiwa S, Iwashita A, Oya M, Kabashima A, Tsuneyoshi M. Malignant transformation of gastric hyperplastic polyps: alteration of phenotypes, proliferative activity, and p53 expression. *Hum Pathol* 2002; 33: 1016-1022
- 11 Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, Van der Merwe S, vaz Coelho LG, Fock KM, Fedail S, Cohen H, Malfertheiner P, Vakil N, Hamid S, Goh KL, Wong BC, Krabshuis JH. 世界胃肠病学组织(WGO-OMGE)临床指南-发展中国家幽门螺杆菌感染. *胃肠病学* 2007; 12: 40-52
- 12 齐淑文, 谢立群, 舒徐, 王华. p53基因网络与幽门螺杆菌致病关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 681-686
- 13 赵继红, 黄彩儿. 胃息肉的组织学分型与Hp感染关系. *宁波医学* 2002; 12: 462-463
- 14 Fukamachi H. Runx3 controls growth and differentiation of gastric epithelial cells in mammals. *Dev Growth Differ* 2006; 48: 1-13
- 15 朱人敏, 秦苏堤. 胃癌癌前病变分子遗传学改变的研究. *中华消化内镜杂志* 2003; 4: 286-288

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

Her-2蛋白在胃癌中的表达及其临床意义

陈娟, 李东石, 余英豪, 王烈, 欧阳学农, 谢飞来, 熊喜生

陈娟, 福建医科大学福总临床医学院病理科 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025

李东石, 中国人民解放军南京军区福州总医院放疗科 福建省福州市 350025

余英豪, 谢飞来, 熊喜生, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科 福建省福州市 350025

王烈, 中国人民解放军南京军区福州总医院普外科 福建省福州市 350025

欧阳学农, 中国人民解放军南京军区福州总医院肿瘤科 福建省福州市 350025

作者贡献分布: 此课题由陈娟与余英豪设计; 技术操作由李东石、王烈、欧阳学农、谢飞来及熊喜生完成; 数据分析由陈娟完成; 本论文写作由陈娟与余英豪完成。

通讯作者: 余英豪, 主任医师, 教授, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科。
yuyinghao0808@126.com

电话: 0591-83717703

收稿日期: 2010-01-11 修回日期: 2010-03-30

接受日期: 2010-04-07 在线出版日期: 2010-05-08

Clinical significance of Her-2 protein expression in gastric cancer

Juan Chen, Dong-Shi Li, Ying-Hao Yu, Lie Wang, Xue-Nong Ouyang, Fei-Lai Xie, Xi-Sheng Xiong

Juan Chen, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Dong-Shi Li, Department of Radiology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Ying-Hao Yu, Xie-Fei Lai, Xi-Sheng Xiong, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

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

Xue-Nong Ouyang, Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, 156 North Xihuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. yuyinghao0808@126.com

Received: 2010-01-11 Revised: 2010-03-30

Accepted: 2010-04-07 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation between Her-2 protein expression and clinicopathological characteristics of gastric carcinoma.

METHODS: Her-2 protein expression was ex-

amined by immunohistochemistry (EliVision™ plus) in 778 gastric adenocarcinoma specimens.

RESULTS: The positive rate of Her-2 protein overexpression (+++) was 11.35% (68/576). Her-2 protein overexpression was associated with tumor histotype, differentiation, TNM stage, and distant metastasis (all $P < 0.05$), but not with sex, age, tumor site, and lymph node metastasis (all $P > 0.05$). Multivariate analysis demonstrated that tumor histotype, differentiation, TNM stage, and distant metastasis were significant predictors of Her-2 protein overexpression in gastric carcinoma (all $P > 0.05$). Moderate Her-2 protein expression (++) was detected in 5.68% of gastric carcinoma specimens.

CONCLUSION: Detection of Her-2 protein expression may be used to assess the malignant biological behavior and prognosis of gastric cancer. Gastric cancer patients exhibiting Her-2 protein overexpression might constitute potential candidates for new adjuvant therapies that involve the use of humanized monoclonal antibodies.

Key Words: Gastric cancer; Her-2; Immunohistochemistry; Clinicopathological characteristic; Targeted therapy

Chen J, Li DS, Yu YH, Wang L, Ouyang XN, Xie FL, Xiong XS. Clinical significance of Her-2 protein expression in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1375-1379

摘要

目的: 评价Her-2过表达与胃癌患者临床病理参数间的相关性及其临床意义。

方法: 采用EliVision™ plus免疫组织化学染色方法检测778例胃腺癌标本中Her-2蛋白的表达。

结果: Her-2阳性率(+++)为11.35%, Her-2阳性与性别、年龄、肿瘤部位、浸润深度及淋巴结转移无相关性(均 $P > 0.05$), 而与组织类型、分化程度、TNM分期及远处转移相关。

■背景资料

胃癌在全世界肿瘤死因中占第2位, 在发展中国家胃癌的发病率约为60%。中国是胃癌发病率最高的国家之一。大部分胃癌患者在诊断时已为晚期, 手术切除生存率很低, 化疗效果不明显。由于目前国内尚无靶向治疗与胃癌的标准治疗联合应用的研究报道, 寻找胃癌特定分子靶点, 为有效治疗提供分子基础是临床的迫切需求。

■同行评议者

喻荣彬, 副教授, 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系

■研究前沿

关于表皮生长因子受体2(Her-2)基因与肿瘤关系,大量研究集中在乳腺癌上。而目前有关Her-2蛋白及Her-2基因与胃癌关系的大宗病例研究较少,结果也不尽一致,且国内外尚无胃癌Herceptin靶向治疗的统一标准。

($P<0.05$)。经多因素分析,组织类型、分化程度、TNM分期及远处转移均会影响Her-2的表达($P<0.05$)。Her-2(++)表达率为5.68%。

结论: Her-2检测可以作为评估胃癌恶性生物学行为及预后的指标,并为靶向治疗提供了理论依据。

关键词: 胃癌; 表皮生长因子受体-2; 免疫组织化学; 临床病理参数; 靶向治疗

陈娟, 李东石, 余英豪, 王烈, 欧阳学农, 谢飞来, 熊喜生. Her-2蛋白在胃癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1375-1379

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1375.asp>

0 引言

胃癌是世界上导致死亡的第二大肿瘤,大部分患者在诊断时已发展到了晚期,化疗效果不明显,在胃癌中发现表皮生长因子受体2(Her-2)基因的高表达为我们治疗胃癌提供了一个靶向治疗的靶点,但有关该基因与胃癌关系的研究较少。国内未见关于Her-2研究的大宗病例报道,其他研究报道的评分标准亦较混乱,无一例按最新修订的Hercep Test评分标准。国内关于Her-2与临床病理参数间的关系等研究结果报道不一^[1,2],有必要进行大宗病例的标准化研究。本研究采取大宗病例,应用免疫组织化学的方法检测Her-2在胃癌组织中的表达情况,分析其与临床病理参数的关系及其临床应用的价值,为胃癌的诊断、治疗及预后判断提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-01/2009-08在中国人民解放军南京军区福州总医院手术切除的胃癌组织标本1107例,选择资料完整的胃腺癌病例778例进行研究,组织标本经甲醛固定,石蜡包埋,3 μ m厚连续切片,分别进行HE和免疫组织化学染色;所有病例术前均未行放化疗。患者中男579例,女199例,年龄27-85(平均58.2)岁。胃癌TNM分期采用AJCC标准(2002)。组织分型采用Lauren分型标准,分为肠型、弥漫型、混合型。试剂均购自福州迈新生物技术开发公司,一抗为鼠抗人单克隆抗体CerbB-2(产品编号MAB-0198)。试剂盒选用EliVisionTM plus试剂盒(产品编号KIF-9903-A、B)。石蜡切片机(LEICA RM2245);显微镜(OLYMPUS BX51);电热恒温干燥箱(上海-恒科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 采用EliVisionTM plus免疫组织化学染色方法: 石蜡切片脱蜡、水化, PBS冲洗3 \times 3 min; 高温高压抗原修复; 加3%过氧化氢溶液, 室温下孵育10 min, 以阻断内源性过氧化物酶; PBS冲洗3 \times 3 min; 加第一抗体, 室温下孵育60 min; PBS冲洗3 \times 5 min; 加聚合物增强剂(试剂A), 室温下孵育20 min; PBS冲洗3 \times 3 min; 加酶标抗鼠聚合物(试剂B), 室温下孵育30 min; PBS冲洗3 \times 3 min; 加新配制的DAB显色液, 显微镜下观察3-10 min, 阳性显色为棕色; 自来水冲洗, 苏木素复染, 0.1%盐酸分化, 自来水冲洗, PBS冲洗返蓝; 梯度酒精脱水干燥, 中性树脂封片。

1.2.2 Her-2过表达的分析方法: 采用Hercep Test进行IHC检测分析并根据修订的评分系统^[3]进行评分。此评分系统中, IHC3+为Her-2阳性, IHC+及IHC-为Her-2阴性。Her-2阳性染色呈棕黄色颗粒, 位于细胞膜。无着色/少于10%肿瘤细胞有细胞膜着色(0/阴性); 大于10%的肿瘤细胞呈现微弱、不完整的细胞膜着色(1+/阴性); 大于10%的肿瘤细胞呈现弱至中度完整的细胞膜着色(2+/不确定); 大于10%的肿瘤细胞呈现强的、完整的细胞膜着色(3+/阳性)。

统计学处理 采用SPSS16.0软件进行 χ^2 检验或确切概率法分析。通过多因素分析, 对各个因素之间的关系进行分析。

2 结果

2.1 Her-2蛋白在胃癌中的表达 Her-2阳性反应信号位于包膜, 其表达呈明显的异质性。778例胃癌组织中Her-2阳性(IHC3+)表达率为11.35%(图1, 2), 但这些病例中, 正常胃黏膜未见Her-2的高表达(图3)。Her-2(++)表达率为5.68%(44/775)。Her-2阳性(IHC3+)与临床病理参数的关系见表1。

2.2 Her-2蛋白表达与胃癌临床病理参数间的关系 Her-2阳性表达率为11.35%, 与性别、年龄、肿瘤部位、浸润深度及淋巴结转移无相关性($P>0.05$), 而与组织类型、分化程度、TNM分期及远处转移相关($P<0.05$)。经多因素分析, 组织类型、分化程度、TNM分期及远处转移均会影响Her-2的表达($P<0.05$)。

3 讨论

Her-2基因是癌基因, 定位于人染色体17q21上, 编码具有酪氨酸激酶活性的细胞膜糖蛋白, 属于酪氨酸激酶I型受体家族, 参与细胞的分裂、生长、繁殖的调控, 与细胞运动、细胞生

存能力的增强及癌细胞转移有关. 在正常情况下处于非激活状态, 当Her-2受到某些致癌因素的作用后, 其结构或表达失控而被激活, 转而具有肿瘤转化活性, 可促使细胞发生恶性转化^[4]. Her-2的高表达已在多种肿瘤中发现, 如结直肠癌、膀胱癌、卵巢癌. 研究表明, 30%以上的人类肿瘤组织中伴有Her-2基因过度表达, 尤其是乳腺癌. 其过表达与乳腺癌分化程度、临床分期呈正相关, 且表达越高, 预后越差^[5], 一些文献报道胃癌Her-2蛋白的过表达率为9%-38%^[6,7], 本研究该基因的阳性表达率为11.35%, 与以往研究一致.

Tanner等^[8]发现胃食管连接部(GEJ)胃癌比胃部胃癌Her-2的阳性表达率高(24% vs 12%). 而我们的研究发现, Her-2的阳性表达与肿瘤的部位无关, 这与国内的一些研究一致^[9]. 我们的研究发现肠型胃癌比弥漫型和混合型胃癌的表达率高(肠型22.1%、弥漫型3.5%、混合型7.9%), 这与文献^[7]一致. 而混合型与弥漫型Her-2的表达率无差别. 有些报道认为Her-2/neu基因激活可能与肠型胃癌特定细胞亚群的生长发育相关^[8,10]. 但Her-2在肠型胃癌中的选择性表达机制是复杂的. 不是所有的肠型胃癌中Her-2都会高表达, 组织分型(肠型)不是Her-2高表达的唯一相关因素^[7]. 在胃癌中, Her-2基因的扩增与钙粘蛋白基因的突变呈反相关关系^[11]. 最近研究发现, 钙粘蛋白基因突变是弥漫型胃癌的遗传标志^[12]. 也许, Her-2基因的扩增和高表达与肠型胃癌的预后有关, 而与弥漫型胃癌的预后无关, 这有待于进一步研究. 本研究显示Her-2表达与胃癌浸润深度及淋巴结转移均无明显关系, 但与胃癌分化程度明显相关, 高、中分化的癌阳性率明显高于低、未分化的癌($P<0.05$). 提示Her-2与胃高分化腺癌的发生有密切关系, 其机制我们将在以后的研究中进一步探讨.

针对乳腺癌Her-2/neu过表达的单克隆抗体Herceptin已进入临床应用, 并显示了良好的疗效. 在胃癌中Her-2/neu的高表达是否可以为胃癌治疗提供了一个新的靶点? Herceptin可否作为治疗胃癌新的靶向药物? 这已引起国内外学者的关注, 但国内Herceptin在胃癌上的应用经验尚不多. Park等^[7]报道Herceptin对有Her-2基因扩增的胃癌细胞具有抑制生长的作用. Rebischung等^[13]研究发现Herceptin联合作用于Topo II的化疗药对Her-2基因过度表达的转移性胃癌有效. Fujimoto-Ouchi等^[14]报道Herceptin对有Her-2过

表 1 Her-2表达与胃癌患者临床病理参数的关系

临床病理参数	n	Her-2阳性n(%)	P值
性别			
男	576	68(11.8)	0.501
女	199	20(10.1)	
年龄(岁)			
<60	363	34(9.4)	0.101
≥60	412	54(13.1)	
肿瘤部位			
胃食管连接部胃癌 ¹	324	40(12.3)	0.461
胃部胃癌	451	48(10.6)	
浸润深度			
Tis	2	0(0.0)	0.170
T1	51	5(9.8)	
T2	314	46(14.6)	
T3	385	36(9.4)	
T4	23	1(4.3)	
Lauren分型			
肠型	285	63(22.1)	<0.001
弥漫型	313	11(3.5)	
混合型	177	14(7.9)	
分化程度			
高、中分化	461	77(16.7)	<0.001
低、未分化	314	11(3.5)	
TNM分期			
0+ I + II	351	50(14.2)	0.021
III + IV	424	38(9.0)	
淋巴结转移			
N ₀	215	27(12.6)	0.220
N ₁	322	42(13.0)	
N ₂	168	15(8.9)	
N ₃	70	4(5.7)	
远处转移			
无	89	17(19.1)	0.014
有	686	71(10.3)	

¹发生于胃食管连接部近端5 cm和远端5 cm之间的病变.

表达的胃癌细胞肿瘤模型具有抑制生长及抗体介导的细胞毒作用.

对于老年胃癌患者, Herceptin治疗具有其独特的优势. Inui等^[15]报道了1例Her-2过表达的88岁老年胃癌并肝转移患者. 他们利用Herceptin联合质子束治疗, 观察到明显而持续的抗肿瘤效用, 患者生存期达到了3年多. 靶向治疗特异性地抑制癌细胞的异常传导通路而对正常细胞作用极小, 这对于不能耐受常规抗肿瘤药物治疗的老年患者尤其重要.

Trastuzumab(Herceptin)不仅对胃癌具有治疗作用并且可以降低Her-2的表达. 研究发现,

■应用要点

本研究应用免疫组织化学方法检测Her-2在胃癌组织中的表达情况, 分析与临床病理参数的关系及其临床应用的价值, 拟为胃癌的诊断、个体化治疗及预后判断提供参考依据.

■同行评价

本文实用性强, 通过较大的样本量研究Her-2蛋白在胃癌病理组织中的表达及其临床意义, 得出了一些有价值的结果.

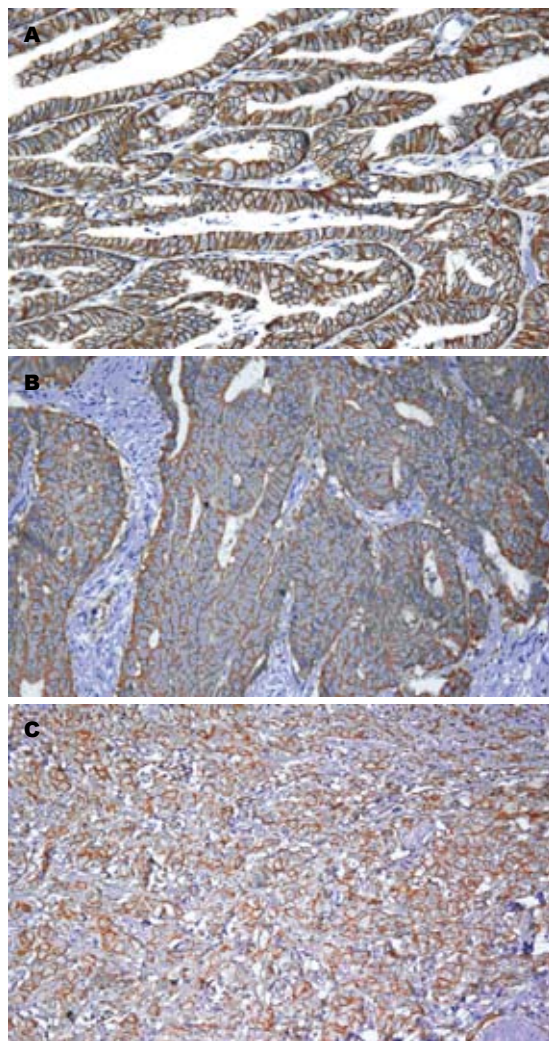


图 1 胃癌组织病理学(CerbB-2 × 200). 完整的癌细胞膜着色. A: 高分化腺癌; B: 中分化腺癌; C: 低分化腺癌.

在体外, Trastuzumab能够显著抑制Her-2高表达的人胃癌细胞系NCI-N87细胞的增殖; 在体内, Trastuzumab能够显著抑制NCI-N87细胞系裸鼠移植瘤的生长, 并使Her-2表达降低^[16], 其抑制肿瘤细胞生长的作用可能是通过降低P27(KIP1)的表达和抑制Her-2的磷酸化实现的^[17].

因此, Her-2可作为胃癌诊断和治疗的指标, Yu等^[18]研究发现Her-2过表达与年龄(>60岁), 肿瘤部位及分化程度相关, 并且与预后密切相关, 他们认为可以将Her-2作为胃癌进展的阳性指标. Roukos等^[19]认为, Her-2应该作为进展期胃癌的一个诊断指标. 他们发现Trastuzumab联合化疗能够提高胃癌患者的总生存率, 这可作为Her-2阳性表达疾病的一个新的标准化治疗方案. 以上研究已充分证明Herceptin在Her-2阳性胃癌治疗中的指导作用, 因此, 测定Her-2蛋白的表达为胃癌的靶向治疗提供了理论依据.

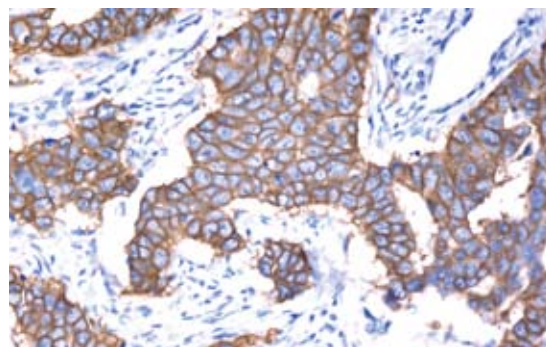


图 2 胃癌组织病理学(CerbB-2 × 400). 中低分化腺癌, 完整的癌细胞膜着色.

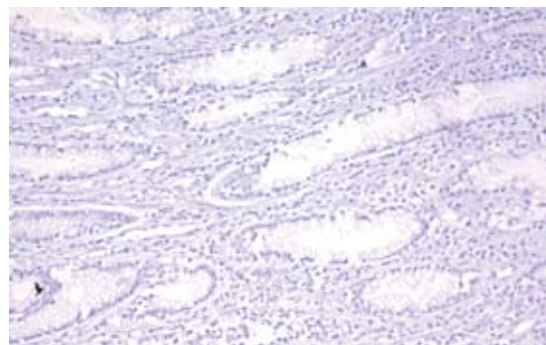


图 3 胃癌正常黏膜组织病理学(CerbB-2 × 200). CerbB-2 阴性.

Her-2是重要的生物预后因子. 研究发现, Her-2表达阳性的乳腺癌或胃癌患者预后显著比Her-2表达阴性患者差^[20]. Allgayer等^[21]发现Her-2高表达的胃癌患者, 其无病生存期及总生存期较Her-2低表达患者短, 他们认为Her-2是一新的预测胃癌总生存期的独立参数. 最新研究发现Her-2过表达与胃癌患者的预后密切相关^[22,23]. 因此, 对 Her-2检测有助于判断预后, Her-2可以作为胃癌患者的预后指标.

可见, Her-2基因在胃癌组织中的表达为胃癌的治疗提供了新思路. 因此, 如果对Her-2基因在胃癌发病中的作用机制及其产物P185蛋白的表达状况能得出肯定的结果, 那么Herceptin在胃癌中的使用将会得到进一步深入. 本研究测定胃癌组织中Her-2蛋白的表达, 将有助于临床判断患者预后, 并为Herceptin等分子靶向治疗药物在胃癌的应用提供了理论依据.

Her-2(++)的免疫组织化学染色情况不确定, 其阳性判断缺乏充足的理论支持. Her-2(++)与胃癌的关系、与基因扩增的关系、Herceptin治疗效果及其临床价值的研究未见报道. 因此, 我们将在后续的研究中对Her-2(++)的病例进行探讨. 以期Her-2(++)的病例在靶向治疗中受益.

近几年来, 国内外对Her-2的研究逐渐增多, 但还没有一个统一的结果可以为Herceptin的靶向治疗提供肯定的理论支持. 我们下一步将收集更多的病例进行进一步研究, 并对Her-2蛋白的高表达与基因扩增的关系及Her-2阳性表达(++)与基因扩增的关系进行研究; 研究Her-2在胃癌中的作用机制及其与预后的关系, 为靶向治疗提供理论依据.

4 参考文献

- 1 汪必成, 刘志苏. 胃癌中Her-2表达对肿瘤细胞周期影响及与癌浸润转移的关系. 武汉大学学报(医学版) 2006; 27: 181-183
- 2 刘震宇. Her-2在胃癌组织中的表达及意义. 山东医药 2009; 49: 82-83
- 3 Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Rüschoff J, Henkel T. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52: 797-805
- 4 罗荣城, 韩焕兴. 肿瘤生物治疗学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 857-859
- 5 Bernhard H, Neudorfer J, Gebhard K, Conrad H, Hermann C, Nährig J, Fend F, Weber W, Busch DH, Peschel C. Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 271-280
- 6 Meza-Junco J, Au HJ, Sawyer MB. Trastuzumab for gastric cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 1543-1551
- 7 Park DI, Yun JW, Park JH, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Yoo CH, Son BH, Cho EY, Chae SW, Kim EJ, Sohn JH, Ryu SH, Sepulveda AR. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1371-1379
- 8 Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E, Elenius K, Isola J. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 2005; 16: 273-278
- 9 陈斌, 罗荣城, 崔斐, 钱新宇. 胃癌HER-2/neu基因表达与预后的相关性. 南方医科大学学报 2006; 26: 344-347
- 10 HER-2研究全国协作组. 胃癌中HER-2/neu基因扩增和蛋白表达的多中心研究. 中华消化杂志 2006; 26: 657-660
- 11 Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* 1998; 12: 226-237
- 12 Pedrazzani C, Corso G, Marrelli D, Roviello F. E-cadherin and hereditary diffuse gastric cancer. *Surgery* 2007; 142: 645-657
- 13 Rebischung C, Barnoud R, Stéfani L, Faucheron JL, Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer* 2005; 8: 249-252
- 14 Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, Moriya Y, Mori K, Tanaka Y. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 795-805
- 15 Inui T, Asakawa A, Morita Y, Mizuno S, Natori T, Kawaguchi A, Murakami M, Hishikawa Y, Inui A. HER-2 overexpression and targeted treatment by trastuzumab in a very old patient with gastric cancer. *J Intern Med* 2006; 260: 484-487
- 16 Matsui Y, Inomata M, Tojigamori M, Sonoda K, Shiraishi N, Kitano S. Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model. *Int J Oncol* 2005; 27: 681-685
- 17 Kim SY, Kim HP, Kim YJ, Oh do Y, Im SA, Lee D, Jong HS, Kim TY, Bang YJ. Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin. *Int J Oncol* 2008; 32: 89-95
- 18 Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1331-1339
- 19 Roukos DH. Targeting gastric cancer with trastuzumab: new clinical practice and innovative developments to overcome resistance. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 14-17
- 20 Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008; 19: 1523-1529
- 21 Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2201-2209
- 22 Zhang XL, Yang YS, Xu DP, Qu JH, Guo MZ, Gong Y, Huang J. Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World J Surg* 2009; 33: 2112-2118
- 23 Jørgensen JT. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer. *Oncology* 2010; 78: 26-33

编辑 李军亮 电编 何基才

复方甘草酸苷联合拉米夫定治疗乙型肝炎相关性肾炎40例

杨道坤, 孙屹峰, 梁海军, 申保生, 乔汉臣

■背景资料

乙型肝炎病毒感染后, 肾炎的发生率约占肾小球肾炎的10%-65%, 随着肾活体组织穿刺的广泛开展, 诊断率较前明显提高; 但发病机制尚未完全清楚, 临床治疗上较为棘手。

杨道坤, 孙屹峰, 梁海军, 申保生, 乔汉臣, 新乡医学院第一附属医院感染疾病科 河南省卫辉市 453100

作者贡献分布: 实验设计为杨道坤与乔汉臣完成; 收集病例有杨道坤、孙屹峰、梁海军及申保生完成; 数据分析有杨道坤; 文章起草由杨道坤完成, 乔汉臣审阅。

通讯作者: 乔汉臣, 教授, 453100, 河南省卫辉市, 新乡医学院第一附属医院感染疾病科. hanchenqiao@yahoo.com.cn

电话: 0373-4402555

收稿日期: 2010-01-25 修回日期: 2010-04-19

接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-08

Treatment of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis with compound glycyrrhizin and lamivudine: an analysis of 40 cases

Dao-Kun Yang, Yi-Feng Sun, Hai-Jun Liang, Bao-Sheng Shen, Han-Chen Qiao

Dao-Kun Yang, Yi-Feng Sun, Hai-Jun Liang, Bao-Sheng Shen, Han-Chen Qiao, Department of Infection Diseases, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Han-Chen Qiao, Department of Infection Diseases, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China. hanchenqiao@yahoo.com.cn

Received: 2010-01-25 Revised: 2010-04-19

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To observe the efficacy of compound glycyrrhizin in combination with lamivudine in the treatment of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis (HBV-GN).

METHODS: Eighty HBV-GN patients were randomly and equally divided into two groups: control group and treatment group. The treatment group was treated with compound glycyrrhizin in combination with lamivudine, while the control group was treated with lamivudine alone. The treatment lasted one year. During treatment, the use of other immunosuppressive agents or cytotoxic agents was forbidden. The levels of urinary protein and serum albumin, liver and kidney function and adverse reactions were monitored.

RESULTS: In months 3, 6 and 12, the 24-h uri-

nary protein ($4.31 \text{ g} \pm 2.18 \text{ g}$ vs $5.89 \text{ g} \pm 3.01 \text{ g}$, $2.34 \text{ g} \pm 1.57 \text{ g}$ vs $4.25 \text{ g} \pm 2.27 \text{ g}$, and $1.59 \text{ g} \pm 0.64 \text{ g}$ vs $3.43 \text{ g} \pm 2.12 \text{ g}$, all $P < 0.05$) and serum albumin ($28.26 \text{ g/L} \pm 2.15 \text{ g/L}$ vs $23.65 \text{ g/L} \pm 6.13 \text{ g/L}$, $30.54 \text{ g/L} \pm 2.58 \text{ g/L}$ vs $27.36 \pm 2.23 \text{ g/L}$, and $35.46 \text{ g/L} \pm 2.12 \text{ g/L}$ vs $31.35 \text{ g/L} \pm 3.35 \text{ g/L}$, all $P < 0.05$) differed significantly between the treatment group and the control group.

CONCLUSION: Compound glycyrrhizin in combination with lamivudine has better efficacy and less adverse effects than lamivudine alone in the treatment of HBV-GN. Some HBV-GN patients may develop HBV resistance to lamivudine with the prolongation of treatment duration. Once lamivudine resistance is noted, adefovir should be given promptly.

Key Words: Lamivudine; Glycyrrhizin; Hepatitis B virus-associated glomerulonephritis; Combination treatment

Yang DK, Sun YF, Liang HJ, Shen BS, Qiao HC. Treatment of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis with compound glycyrrhizin and lamivudine: an analysis of 40 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1380-1383

摘要

目的: 观察复方甘草酸苷和拉米夫定治疗乙型肝炎相关性肾炎的临床疗效。

方法: 80例乙型肝炎相关性肾炎患者随机分为治疗组和对照组各40例, 治疗组给以复方甘草酸苷50 mg tid po, 拉米夫定100 mg qd po, 2种药物联合使用, 疗程1年; 对照组给以拉米夫定100 mg qd po, 疗程1年。治疗期间停用其他免疫抑制剂及细胞毒药物。观察治疗前后临床指标变化, 用药期间尿蛋白排泄情况、血清白蛋白及肝肾功能 and 所有不良反应。

结果: 3 mo、6 mo、12 mo治疗组与对照组比较, 每24 h尿蛋白有显著差异($4.31 \text{ g} \pm 2.18 \text{ g}$ vs $5.89 \text{ g} \pm 3.01 \text{ g}$, $2.34 \text{ g} \pm 1.57 \text{ g}$ vs $4.25 \text{ g} \pm 2.27 \text{ g}$, $1.59 \text{ g} \pm 0.64 \text{ g}$ vs $3.43 \text{ g} \pm 2.12 \text{ g}$, 均 $P < 0.05$), 血清白蛋白也有显著差异($28.26 \text{ g/L} \pm$

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

2.15 g/L vs 23.65 g/L \pm 6.13 g/L, 30.54 g/L \pm 2.58 g/L vs 27.36 \pm 2.23 g/L, 35.46 g/L \pm 2.12 g/L vs 31.35 g/L \pm 3.35 g/L, 均 $P<0.05$).

结论: 复方甘草酸苷联合拉米夫定治疗乙型肝炎相关性肾炎疗效好, 不良反应少, 随着时间的延长拉米夫定出现耐药, 须及时加用阿德福韦酯。

关键词: 拉米夫定; 复方甘草酸苷; 乙型肝炎相关性肾炎; 联合治疗

杨道坤, 孙屹峰, 梁海军, 申保生, 乔汉臣. 复方甘草酸苷联合拉米夫定治疗乙型肝炎相关性肾炎40例. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1380-1383

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1380.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)可引起肝外各脏器的病变与损害, 肾脏为HBV感染的重要脏器之一, 1989-10北京座谈会上, 将此病命名为HBV相关性肾炎(HBV associated glomerulonephritis, HBV-GN), 我国是HBV感染的高发区, HBV-GN在人群中发病率较高, 目前尚无规范化和有效的治疗方案. 本文对确诊的80例HBV-GN患者采用复方甘草酸苷和拉米夫定联合治疗, 取得了一定疗效, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2004-01/2008-12门诊和住院慢性肝炎患者43例, 肝硬化患者17例, 其中男60例, 女20例, 平均年龄30.62岁 \pm 8.23岁. 患者入选标准: (1)血清HBV抗原阳性; (2)患肾小球肾炎, 并可除外狼疮肾炎等继发性肾小球疾病; (3)肾组织切片中找到HBV抗原; (4)肝功能异常。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 治疗组给以复方甘草酸苷50 mg tid po, 拉米夫定100 mg qd po, 2种药物联合使用, 疗程1年; 对照组给以拉米夫定100 mg qd po, 疗程1年. 治疗期间停用其他免疫抑制剂及细胞毒药物, 观察治疗前后临床指标变化, 用药期间尿蛋白排泄情况及肝肾功能和所有不良反应, 所选病例肌酐清除率基本正常。

1.2.2 疗效观察: 完全缓解: 临床症状消失, 尿蛋白定量 <0.3 g/d, 肾功能稳定, AIB、ALT正常; 部分缓解: 尿蛋白定量较治疗前下降 $>50\%$, 肾功能稳定, ALB较治疗前升高 >30 g/L, ALT较治疗前下降 $>50\%$; 无效: 临床症状及实验室检查

无明显改善。

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, 治疗前后观察结果差异进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 治疗组和对照组尿蛋白的变化 治疗组3、6、12 mo与治疗前相比较尿蛋白明显减少, 差异显著[(4.31 \pm 2.18) g/24 h, (2.34 \pm 1.57) g/24 h, (1.59 \pm 0.64) g/24 h vs (6.71 \pm 3.15) g/24 h, $P<0.05$], 对照组治疗前尿蛋白为(6.75 \pm 3.18) g/24 h, 3 mo时[(5.89 \pm 3.01) g/24 h]与治疗前比较, 差异无显著性($P>0.05$), 6、12 mo[(4.25 \pm 2.27) g/24 h, (3.43 \pm 2.12) g/24 h]与治疗前比较, 差异显著($P<0.05$); 治疗组与对照组3、6、12 mo相比较, 差异显著($P<0.05$).

2.2 治疗组和对照组血白蛋白的变化 治疗组3 mo、6 mo、12 mo与治疗前相比较白蛋白明显增加, 差异显著[(28.26 \pm 2.15) g/L, (30.54 \pm 2.58) g/L, (35.46 \pm 2.12) g/L vs (22.13 \pm 6.21) g/L, $P<0.05$], 对照组治疗前白蛋白为(23.14 \pm 5.18) g/L, 3 mo时[(23.65 \pm 6.13) g/L]与治疗前比较, 差异无显著性($P>0.05$), 6、12 mo[(27.36 \pm 2.23) g/L, (31.35 \pm 3.35) g/L]与治疗前比较, 差异显著($P<0.05$); 治疗组与对照组3、6、12 mo相比较, 差异显著($P<0.05$).

2.3 治疗组和对照组血胆固醇和三酰甘油的变化 治疗组3、6 mo与治疗前相比较血胆固醇、血三酰甘油下降不明显, 差异不显著[血胆固醇: (6.21 \pm 2.1) mmol/L, (5.12 \pm 1.5) mmol/L vs (6.75 \pm 1.3) mmol/L, 血三酰甘油: (2.64 \pm 0.5) mmol/L, (2.15 \pm 0.4) mmol/L vs (2.72 \pm 0.8) mmol/L, $P>0.05$], 12 mo时下降明显, 差异显著[血胆固醇: (4.23 \pm 1.3) mmol/L vs (6.75 \pm 1.3) mmol/L, 血三酰甘油: (1.91 \pm 0.35) mmol/L vs (2.72 \pm 0.8) mmol/L, $P<0.05$].

2.4 肝功能谷丙转氨酶的变化 治疗组肝功能3 mo时已经明显好转, 谷丙转氨酶(89.46 U/L \pm 25.46 U/L)降为(30.24 U/L \pm 10.57 U/L), 对照组肝功能3 mo无明显好转, 6 mo时肝功能才好转, 谷丙转氨酶(88.46 U/L \pm 24.46 U/L)降为(36.54 U/L \pm 12.57 U/L).

2.5 治疗组和对照组HBV DNA的变化 80例患者治疗前HBV DNA滴度均超过 1.0×10^5 copies/L, 治疗3 mo时20例降为 1.0×10^3 copies/L, 6 mo时56例降为 1.0×10^3 copies/L, 12 mo时60例降为 1.0×10^3 copies/L. 两组3、6、12 mo HBV DNA降

■ 研发前沿

乙型肝炎病毒相关性肾炎临床上尚无统一有效的治疗方案, 目前着重强调抗病毒和免疫抑制剂治疗。

■ 相关报道

以往研究显示拉米夫定单独或联合糖皮质激素或/和其他免疫抑制剂治疗, 均取得一定疗效, 但缓解率相对较低, 尤其对肝功能不正常的患者。

■创新盘点

糖皮质激素抑制了免疫反应但同时又减弱了对病毒复制的抑制,出现了肝炎再燃、HBV复制再度活化和极少见的肝脏失代偿,本研究采用复方甘草酸苷替代糖皮质激素疗效显著,缓解率高达90%以上,尤其是肝功能不正常患者,此方案为最佳。

■应用要点

本文通过对拉米夫定联合复方甘草酸苷治疗乙肝相关性肾炎的研究,尤其是肝功能不正常或肝硬化患者,此方案为最佳,临床医生可借鉴。

低相一致。

2.6 疗效评价 治疗组40例患者中治疗3 mo时完全缓解6例(15%), 6 mo时完全缓解20例(50%), 12 mo时完全缓解30例(75%), 总有效率(96.25%); 对照组40例患者中治疗3 mo完全缓解2例(5%), 治疗6 mo时完全缓解12例(30%), 12 mo时完全缓解18例(45%), 总有效率为(68.23%), 两者总有效率相比差异显著($P<0.05$)。

2.7 不良反应 治疗组有2例患者出现一过性高血压, 对照组无任何不良反应。

3 讨论

HBV除了侵犯肝脏外, 还可对其他组织器官造成损伤^[1], HBV对肾脏的损伤, 不仅与病毒复制有关, 更主要的是与免疫应答有关^[2]; HBV-GN是HBV感染引起的免疫复合物性肾炎或由病毒直接侵犯人体所引起的肾炎, 主要由细胞毒CD8⁺CTL细胞介导的免疫复合物损伤^[3]; 所以治疗上着重强调抗病毒和免疫抑制治疗。

免疫抑制治疗经典药物是糖皮质激素, 但对于HBV复制引起的免疫性肾损伤, 激素抑制了免疫反应但同时又减弱了对病毒复制的抑制, 出现了肝炎再燃、HBV复制再度活化和极少见的肝脏失代偿^[4]; 我国学者报道, 使用激素和/或免疫抑制剂治疗HBV-GN取得一定疗效, 但完全缓解率低(28%-44.4%)^[5,6], 本研究采用复方甘草酸苷替代糖皮质激素疗效显著, 肝功能谷丙转氨酶在3 mo内正常, 尿蛋白明显减少, 血白蛋白明显升高在6 mo时基本正常; 而无明显不良反应。

复方甘草酸苷是由甘草酸苷、盐酸半胱氨酸和甘氨酸组成的复方制剂。现代药理学研究显示甘草酸苷抑制磷脂酶A2的活性, 阻止花生四烯酸在初始阶段的代谢水平, 使得前列腺素等炎性介质无法产生, 调节T细胞活性, 诱导 α -干扰素, 调节NK细胞活性, 抑制乙型肝炎表面抗原分泌, 防止脂质过氧化物刺激胶原基因转录, 抑制纤维化产生及发展而具有保护肝细胞、抗炎、抗病毒、免疫调节、抗肝纤维化等作用; 我国学者李勇等^[7]研究结果表明: 复方甘草酸苷不仅有保肝作用而且有较好抗病毒及抗肝纤维化作用。复方甘草酸苷化学结构上与肾上腺皮质激素相似对肝脏类固醇代谢 $\Delta 4-5$ -还原酶具有强亲和力抑制可的松和醛固酮在体内的灭活, 减缓类固醇的代谢速度, 发挥类固醇样作用, 且对下丘脑-肾上腺轴无明显影响, 故可作为

糖皮质激素替代药物或糖皮质激素减量或撤退过程中的替代治疗药^[8]。体外研究发现, 甘草酸苷可显著抑制抗原提呈细胞对T细胞的过度激活作用, 抑制有肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)介导的细胞免疫作用, 从而调节免疫反应。李芳等^[9]研究结果表明: 复方甘草酸苷注射液治疗原发性干燥综合征疗效显著, 不良反应少。

抗病毒治疗, Fabrizi等^[10]研究认为: HBV-GN发病机制的根本原因主要HBV感染, 且肾炎症状的好转主要取决于HBV的清除, Zhang等^[11]研究认为: 抗病毒治疗, 能减少尿蛋白, 且尿蛋白的清除率明显与HBeAg的清除呈正相关; 目前认可的药物主要有三种: α -干扰素、拉米夫定、阿德福韦。拉米夫定是近年出现的抗病毒药, 属核苷类药物, 作用靶点是HBV的前基因组RNA指导的DNA聚合酶, 通过与dNTP竞争结合于中的DNA, 使病毒DNA合成链终止, 从而抑制HBV DNA的逆转录和复制, 降低血清HBV DNA水平, 改善肝组织学病变, 是当前推荐治疗慢性乙型肝炎安全有效的药物, 并已获得较明显的临床效果^[12,13]。Tang等^[14]研究显示: 使用拉米夫定治疗HBV-GN可以有效地使HBV DNA转阴, 蛋白尿缓解, 其12 mo的完全缓解率高达60%, 耐受性较好而且服用方便。血清谷丙转氨酶正常且血清HBV DNA测不出, α -干扰素治疗无效, 失代偿肝病患者和拟行移植的患者不能使用, α -干扰素对HBV-GN可能有益, 尤其对儿童及非流行区成人患者, 但对流行区成人患者则几乎无效^[15]。Fabrizi等^[16]研究表明: 应用拉米夫定后, 病毒血症清除率在67%和100%之间, 谷丙转氨酶正常率在50%和100%, 但其作用短暂, 停药后易于复发, 故必须长期用药, 6 mo后可能出现耐药, 应定期监测, 及时加用阿德福韦酯等; Li等研究证实阿德福韦酯治疗HBV-GN是有效和安全的^[17], 在本研究中, 76例患者中均表现出良好的控制病毒复制作用, 表现为HBV DNA定量明显下降, 表现出良好的抑制病毒复制作用, 这与国外报道一致。

总之, 该方案对于HBV-GN合并肝功能损害的患者有一定的疗效, 不良反应少, 临床可以借鉴, 但样本小, 应进一步大样本, 随机双盲对照实验和长期随访加以验证。

4 参考文献

- 1 Mason A. Role of viral replication in extrahepatic syndromes related to hepatitis B virus infection.

- Minerva Gastroenterol Dietol 2006; 52: 53-66
- 2 Lin CY, Lin CC, Chang GJ, King CC. Defect of cell-mediated immune response against hepatitis B virus: an indication for pathogenesis of hepatitis-B-virus-associated membranous nephropathy. *Nephron* 1997; 76: 176-185
- 3 王湘, 赵英仁, 徐长福. 穿孔素在乙肝相关性肾炎的表达及意义. *第四军医大学学报* 2007; 28: 18-20
- 4 冉静, 冯萍. 糖皮质激素及免疫抑制剂致慢性乙肝复发和加重的7例临床分析. *华西医学* 2009; 24: 419-421
- 5 汤力, 陈香美, 赵威, 崔岩. 霉酚酸酯治疗乙肝病毒相关性肾炎的临床研究. *北京医学* 2005; 27: 166-169
- 6 张志勇, 周春华, 李明旭, 余永武, 杨君, 雷霞. 来氟米特联合激素治疗乙型肝炎病毒相关性肾炎的临床观察. *第二军医大学学报* 2006; 27: 1152-1153
- 7 李勇, 吴洪文, 唐小鹤. 复方甘草酸苷治疗乙型肝炎的作用研究. *中国现代药物应用* 2008; 2: 52-53
- 8 宋方闻, 白永敏, 陈云祥, 曹阳, 唐小平, 李学俊, 钟惟德. 美能(β -甘草酸复方制剂)的分子构型及临床疗效. *中国药房* 2003; 14: 304
- 9 李芳, 姚建华, 张凤肖, 孙丽君, 陶杰梅, 宁晓然. 复方甘草酸苷注射液治疗原发性干燥综合征的临床观察. *中国药房* 2007; 18: 858-859
- 10 Fabrizi F, Dixit V, Martin P. Meta-analysis: antiviral therapy of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 781-788
- 11 Zhang Y, Zhou JH, Yin XL, Wang FY. Treatment of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 770-777
- 12 赖祥红, 朱有鸿. 拉米夫定治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎长期临床疗效观察. *临床合理用药* 2009; 19: 56-57
- 13 Jonas MM, Mizerski J, Badia IB, Areias JA, Schwarz KB, Little NR, Greensmith MJ, Gardner SD, Bell MS, Sokal EM. Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002; 346: 1706-1713
- 14 Tang S, Lai FM, Lui YH, Tang CS, Kung NN, Ho YW, Chan KW, Leung JC, Lai KN. Lamivudine in hepatitis B-associated membranous nephropathy. *Kidney Int* 2005; 68: 1750-1758
- 15 Lai KN, Li PK, Lui SF, Au TC, Tam JS, Tong KL, Lai FM. Membranous nephropathy related to hepatitis B virus in adults. *N Engl J Med* 1991; 324: 1457-1463
- 16 Fabrizi F, Martin P, Bunnapradist S, Villa M, Rusconi E, Messa PG. Lamivudine in the treatment of HBV-related liver disease after renal transplantation: an update. *Int J Artif Organs* 2005; 28: 211-221
- 17 Li DF, Jin ZJ, Chen YS, Qiao LM, Zhou J. [Adefovir dipivoxil treatment of hepatic cirrhosis complicated with hepatitis B virus associated glomerulonephritis] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2008; 16: 349-351

■同行评价

本文立题有依据, 设计合理, 结果可信, 讨论简洁集中, 对乙型肝炎病毒感染引起的免疫复合物性肾炎的治疗有参考意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive>(WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)

不同方法检测肝癌患者外周血中CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs水平的关系及意义

王芳, 吕洪敏, 韩涛, 王鹏, 王凤梅, 朱争艳, 向慧玲

■背景资料

肝脏是一个倾向于免疫耐受的器官。当肝脏肿瘤发生时, 肿瘤之所以能够快速生长并转移的一个重要原因就是机体的免疫系统对肿瘤组织表现出一种耐受性, 即免疫耐受。肿瘤细胞不能被淋巴细胞有效杀伤。Tregs在HCC患者肿瘤的发生、发展中发挥了重要的作用, 多数人研究表明Tregs在肝癌患者的外周血和肝组织中表达升高。但是人们检测调节性T细胞方法的不同, 导致关于肝癌的研究结论尚不统一。

王芳, 天津医科大学三中心临床学院 天津市 300170
王芳, 吕洪敏, 韩涛, 王鹏, 王凤梅, 朱争艳, 向慧玲, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
国家重点基础研究发展规划(973计划)基金资助项目, No. 2007CB512801
科技部科技重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-005
天津市科委重点攻关专项基金资助项目, No. 05YFSZSF02500
天津市科委应用基础研究计划面上基金资助项目, No. 06YFJMJ13100
作者贡献分布: 王芳与吕洪敏对此文所作贡献均等; 此课题的设计由王芳、吕洪敏及王凤梅完成; 写作由王芳与吕洪敏完成; 数据采集由王芳、王鹏及朱争艳完成; 研究过程由王芳、吕洪敏、向慧玲及王鹏完成; 数据分析由王芳、吕洪敏及韩涛完成。
通讯作者: 吕洪敏, 教授, 主任医师, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院, 天津市人工细胞重点实验室。yaoywang@163.com
电话: 022-84112298 传真: 022-24382234
收稿日期: 2010-02-25 修回日期: 2010-04-23
接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-08

Correlation between two different methods in detecting CD4⁺CD25^{hi-int}T regulatory cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma

Fang Wang, Hong-Min Lv, Tao Han, Peng Wang, Feng-Mei Wang, Zheng-Yan Zhu, Hui-Ling Xiang

Fang Wang, the Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China

Fang Wang, Hong-Min Lv, Tao Han, Peng Wang, Feng-Mei Wang, Zheng-Yan Zhu, Hui-Ling Xiang, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cells, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2007CB512801; the Major Research Project of the Ministry of Science and Technology of China, No. 2008ZX10002-005; the Key Science and Technology Project of Tianjin Municipal Science and Technology Commission, No. 05YFSZSF02500; and the General Program of Applied Basic Research Foundation of Tianjin Municipal Science and Technology Commission, No. 06YFJMJ13100

Correspondence to: Professor Hong-Min Lv, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cells, Tianjin Third Central Hospital, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. yaoywang@163.com

Received: 2010-02-25 Revised: 2010-04-23

Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To explore the correlation between CD127^{low}

and Foxp3⁺ cell labeling-based methods in detecting CD4⁺CD25^{hi-int}T regulatory cells (Tregs) in peripheral blood of hepatocellular carcinoma (HCC) and to establish a regression equation based on the percentages of CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs in total CD4⁺T cells obtained with the two methods.

METHODS: The levels of CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs were detected by flow cytometry using CD-127^{low} and Foxp3⁺ markers in peripheral blood of 31 HCC patients. The levels of CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs were measured in 32 healthy controls.

RESULTS: The percentage of CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs in total CD4⁺T cells in peripheral blood of HCC patients was significantly higher than that in healthy controls (10.33% ± 4.47% vs 7.34% ± 1.76%, *P* < 0.01). The percentage of CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}Tregs in peripheral blood of HCC patients (10.51% ± 4.78%) is positively correlated with that of Foxp3⁺Tregs (*r* = 0.889, *P* < 0.01). Curve fitting showed that power model is the optimal model. According to the power model, the following regression equation was established: $Y = 1.236 \times (x^{0.899})$ (*Y* and *x* represent the percentages of Foxp3⁺Tregs and CD-127^{low}Tregs, respectively).

CONCLUSION: Treg level is significantly elevated in peripheral blood of HCC patients. There is a positive correlation between the percentage of CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs and that of CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}Tregs in peripheral blood of HCC patients. The conversion between the percentage of CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs and that of CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}Tregs can be achieved using a regression equation.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}Tregs; CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs

Wang F, Lv HM, Han T, Wang P, Wang FM, Zhu ZY, Xiang HL. Correlation between two different methods in detecting CD4⁺CD25^{hi-int}T regulatory cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Shijie*

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(13): 1384-1389

摘要

目的:探讨以标记CD127^{low}和Foxp3⁺两种方法检测肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者外周血中CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs水平的相关性,建立两者转换的回归方程。

方法:流式细胞术同时用CD127^{low}和Foxp3⁺两种标志物检测31例HCC患者外周血中CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs,检测32例对照组CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs水平。

结果:HCC患者与健康对照组外周血中CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs占CD4⁺T细胞的比例分别为10.33%±4.47%和7.34%±1.76%,差异有统计学意义($P<0.01$)。HCC患者外周血中CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}Tregs的比例为10.51%±4.78%,与Foxp3⁺Tregs比例呈正相关, Pearson相关系数为0.889,相关有统计学意义($P<0.01$)。两者曲线拟合提示幂模型是最优模型,建立回归方程 $Y = 1.236 \times (x^{0.899})$ (Y为Foxp3⁺Tregs, x为CD127^{low}Tregs)。

结论:HCC患者外周血中Tregs水平明显升高,用CD127^{low}和Foxp3⁺两种方法检测HCC患者外周血Tregs水平呈正相关,两者之间数值转换可利用回归方程。

关键词:肝癌; CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}Tregs; CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs

王芳, 吕洪敏, 韩涛, 王鹏, 王凤梅, 朱争艳, 向慧玲. 不同方法检测肝癌患者外周血中CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs水平的关系及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1384-1389
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1384.asp>

0 引言

调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)是一群在维持机体免疫平衡中发挥重要作用的CD4⁺T淋巴细胞。肝脏疾病的发生时常伴随着Tregs的异常改变:慢性乙型肝炎的进展与Tregs数量增加有关^[1],自身免疫性肝病的发生与Tregs的功能和数量降低相关,而肝癌的发生也与Tregs密切相关。此前的研究发现,循环中Tregs水平在肿瘤和癌症患者是增加的, Tregs参与各种肿瘤包括肝癌的发病机制,并影响疾病的进展^[2]。近年来,关于Tregs与肝癌的研究越来越多,但是在相同的研究对象中得出的结论有所差异,有的甚至是相反的结论。导致上述研究结论不同的原

因,很可能是检测Tregs手段的不同所致。Foxp3(forkhead family transcription factor, forkhead Box p3)被认为是Tregs发育和功能的关键调控基因,也是Tregs的特异性标记^[3]。不过Foxp3作为人Tregs的特异性标志有一定的局限,检测结果并不稳定,而且无法进行后续的细胞培养和进一步的其他检测^[4]。CD127是Tregs的表面膜分子的一种,CD127低表达与Foxp3⁺有高度一致性^[5],故检测CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}Tregs可较好地反映胸腺来源的Tregs的水平,也有研究^[6]认为CD127低表达与Foxp3阳性表达所定义的不是相同的一群细胞。为探讨两种检测CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs方法的相关性,我们对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者的同一份外周血全血标本同时选用CD127^{low}和Foxp3⁺两种方法来检测CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs占CD4⁺T细胞的比例,并试图建立两者之间的回归方程方便临床应用。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-07/2009-08我院肝内科住院的HCC患者31例,其中男25例,占80.6%,女6例,占19.4%,年龄45-81(平均57.05±10.05)岁。对照组为健康查体者32例,其中男23例,占71.9%,女9例,占28.1%,年龄范围43-69(平均57.47±5.48)岁。两组年龄及性别比例互相匹配。对照组肝功能水平、肝病自身抗体、血常规、胸片和腹部B超、心电图、尿常规均无异常。主要的仪器包括:流式细胞仪(购自美国Beckman公司),中佳KDC-1042离心机,CHA-S恒温振荡器。主要试剂包括:鼠抗人CD4-FITC抗体、CD25-PECY5抗体、CD127-PE抗体及各自的同型对照购自美国Beckman公司;鼠抗人Foxp3-PE抗体及其同型对照购自eBioscience公司。

1.2 方法

1.2.1 诊断方法:(1)HCC的诊断参照1999年第四届全国肝癌学术会议制定的《原发性肝癌临床诊断标准》^[7]。(2)入选条件:符合上述HCC诊断标准,且为初次诊断患者,尚未接受抗肿瘤及免疫调节治疗。患者基本情况见表1。

1.2.2 流式细胞仪检测CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs的比例:取新采集的原发性肝癌患者和健康对照组枸橼酸钠(EDTA)抗凝外周静脉血1 mL。具体步骤如下:取流式管2个,1管为对照管,1管为检测管。加入CD4-FITC抗体10 μL,样品管内加入CD25-PECY5抗体10 μL,对照管内加入CD25-同型对照PECY5抗体10 μL,每管内加入新鲜抗凝外周血100 μL,振荡混匀,室温避光孵

■ 研发前沿

目前各种免疫疗法正在用于癌症治疗,鉴于Tregs在肝癌肿瘤发生、进展中的“免疫抑制”作用,目前人们正在积极探索如何通过免疫学的改变包括通过Tregs的变化来早期发现肝癌,以及如何降低Tregs以恢复机体免疫系统对于肿瘤细胞的识别,从而调动淋巴细胞对肿瘤细胞进行杀伤,制定有效的免疫治疗策略。这样,统一、可以高效识别、花费少的Tregs检测方法的建立就是非常必要的。

■相关报道

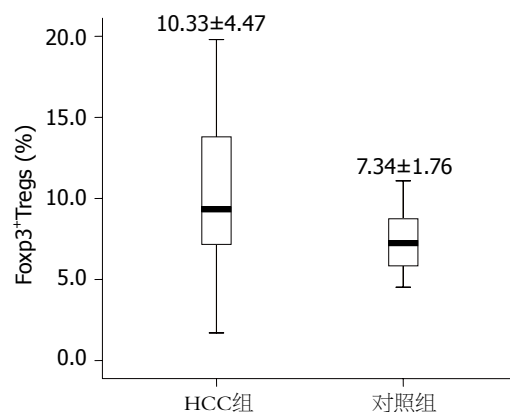
对于可否以 $CD4^+CD25^{hi-int}CD127^{low}$ 来定义 Tregs 以及 HCC 患者外周血中 Tregs 是否升高, 目前仍有争议, 且对于 Tregs 在肝癌患者免疫发病机制中的作用及去除 Tregs 细胞后是否能有效增强肝癌患者的抗肿瘤免疫尚不能确定。

表 1 HCC患者基本信息

项目	n	%
性别		
男	25	80.6
女	6	19.4
病因		
慢性乙型肝炎	24	77.4
慢性丙型肝炎	5	16.1
不明原因	2	6.5
常见症状		
右上腹不适	25	80.6
乏力	18	58.1
食欲下降	17	54.8
AFP值($\mu\text{g/L}$)		
≥ 400	28	90.3
< 400	3	9.7
Child-Pugh分级		
A级	21	67.7
B级	9	29.0
C级	1	3.2
有无远处转移		
有	3	9.7
无	28	90.3

育30 min. 加入溶血素4.5 mL, 振荡混匀, 37 °C 气浴并振荡10 min, 裂解红细胞, 离心机1 600 r/min离心6 min. 弃上清, 可观察到底部白色沉淀. 配制工作浓度破膜剂(原液和稀释液1:3)2 mL, 对照管和样品管分别加入1 mL, 振荡充分混匀后放置于4 °C冰箱1 h, 破膜. 取出离心, 离心机1 600 r/min离心6 min, 弃上清. 配制破膜缓冲液16 mL, 分别加入对照管和样品管2 mL, 振荡混匀后1 600 r/min离心5 min, 弃上清. 重复上一步骤. 样品管中加入Foxp3-PE抗体5 μL , 对照管内加入Foxp3同型对照-PE抗体5 μL , 4 °C避光孵育30 min. 各加入2 mL破膜缓冲液, 振荡混匀, 1 600 r/min离心5 min, 弃上清. 重复上一步骤. 加入1%多聚甲醛固定, 流式检测. 流式细胞仪检测, Expo32软件收获细胞并进行分析数据. 结果记录 $CD4^+CD25^{hi-int}Foxp3^+$ Tregs细胞占 $CD4^+$ T细胞的百分比.

1.2.3 流式细胞仪检测 $CD4^+CD25^{hi-int}CD127^{low}$ Tregs的比例: 将采集的原发性肝癌患者枸橼酸钠(EDTA)抗凝外周静脉血同时进行 $CD4^+CD25^{hi-int}CD127^{low}$ Tregs的检测. 步骤如下: 取流式管2个, 1管为对照管, 1管为检测管. 样品管内加入 $CD4$ -FITC抗体、 $CD25$ -PECY5抗体、 $CD127$ -PE抗体各10 μL , 对照管内加入 $CD4$ -FITC抗

图 1 HCC组和对照组 $CD4^+CD25^{hi-int}Foxp3^+$ Tregs的比较.

体、 $CD25$ 同型对照-PECY5抗体、 $CD127$ 同型对照-PE抗体各10 μL , 每管内加入新鲜抗凝外周血(EDTA)100 μL , 振荡混匀, 室温避光孵育30 min. 加入溶血素4.5 mL, 振荡混匀, 37 °C气浴并振荡10 min, 裂解红细胞, 离心机1 600 r/min离心6 min. 弃上清, 可观察到底部白色沉淀. 加入1%多聚甲醛固定, 流式检测. 流式细胞仪检测, Expo32软件收获细胞并进行分析数据. 结果记录 $CD4^+CD25^{hi-int}CD127^{low}$ Tregs细胞占 $CD4^+$ T细胞的百分比.

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计分析, 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 两组之间对比采用 t 检验, 相关分析采用Pearson相关检验, 两者之间数量关系采用曲线拟合, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 HCC患者和健康对照组外周血 $CD4^+CD25^{hi-int}Foxp3^+$ Tregs的比较 HCC患者外周血 $CD4^+CD25^{hi-int}Foxp3^+$ Tregs占 $CD4^+$ T细胞的比例为 $10.33\% \pm 4.47\%$, 健康对照组 $CD4^+CD25^{hi-int}Foxp3^+$ Tregs占 $CD4^+$ T细胞的比例为 $7.34\% \pm 1.76\%$, 认为两者之间的差异有统计学意义($P < 0.05$, $P = 0.000$, 图1).

2.2 HCC患者外周血中两种方法检测Tregs的水平的相关性比较 $CD4^+CD25^{hi-int}Foxp3^+$ Tregs占 $CD4^+$ T细胞的比例为 $10.33\% \pm 4.47\%$, $CD4^+CD25^{hi-int}CD127^{low}$ Tregs占 $CD4^+$ T淋巴细胞的比例为 $10.51\% \pm 4.78\%$, 两者Pearson相关系数为0.889, 两种方法检测Tregs的水平呈正相关($P < 0.05$, $P = 0.000$, 图2).

2.3 两种检测方法数值之间回归方程的建立 用SPSS软件中的曲线估计过程自动拟合11种模型, 所有模型均有显著性意义($P = 0.000$)(表2, 图3), 以Power(幂模型)决定系数 R^2 最高, 为0.810, 故选幂模型(图4), 回归方程为: $Y = 1.236 \times x^{0.899}$ (Y

表 2 CD127^{low}Tregs和Foxp3⁺Tregs数值转换11种模型的拟合结果

模型	模型主要参数					参数估计			
	R ²	F	df1	df2	P值	Constant	b1	b2	b3
线性模型(Linear)	0.791	109.764	1	29	0.000	1.590	0.832		
对数模型(Logarithmic)	0.697	66.573	1	29	0.000	-5.826	7.210		
逆模型(Inverse)	0.369	16.941	1	29	0.000	13.474	-24.991		
二次模型(Quadratic)	0.794	53.860	2	28	0.000	0.571	1.027	-0.008	
三次(Cubic)	0.794	34.758	3	27	0.000	1.253	0.771	0.018	-0.001
复合模型(Compound)	0.667	58.051	1	29	0.000	3.663	1.092		
幂模型(Power)	0.810	123.636	1	29	0.000	1.236	0.899		
S型模型(S)	0.654	54.935	1	29	0.000	2.710	-3.848		
生长模型(Growth)	0.667	58.051	1	29	0.000	1.298	0.088		
指数模型(Exponential)	0.667	58.051	1	29	0.000	3.663	0.088		
logistic模型(Logistic)	0.667	58.051	1	29	0.000	0.273	0.915		

■创新盘点

本研究进一步明确了HCC患者外周血全血中Tregs水平是明显升高的, 且以CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}和CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺两种方法检测肝癌患者外周血Tregs水平呈正相关, 两者之间的数值转换可利用回归方程。

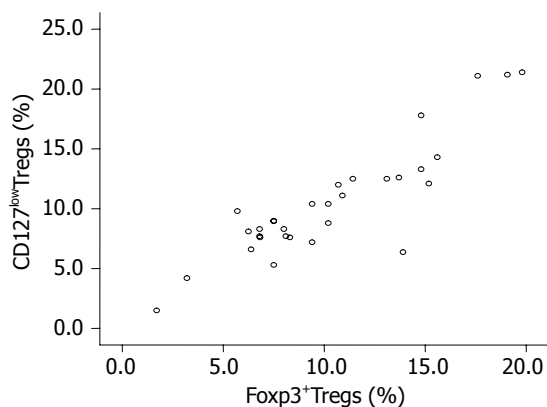
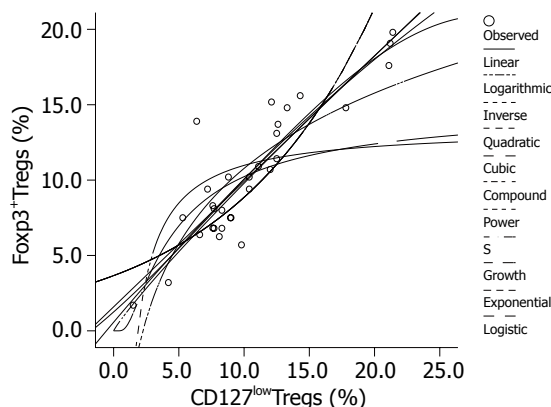


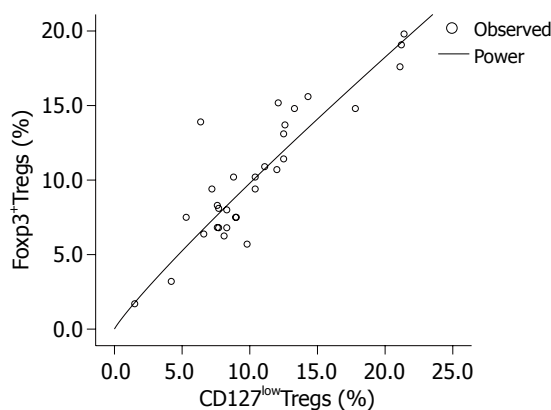
图 2 两种方法检测HCC患者外周血中Tregs散点图。

图 3 CD127^{low}Tregs和foxp3⁺Tregs数值转换的11种模型的拟合曲线。

为Foxp3⁺Tregs, x为CD127^{low}Tregs)。

3 讨论

原发性肝癌在我国较为常见, 缺乏有效的治疗措施, 预后较差。Tregs是具有免疫负调节功能的CD4⁺T细胞亚群, 能抑制抗肿瘤效应细胞的活化和增殖, 与肿瘤免疫逃逸有关^[8]。Tregs在肿瘤内的聚集会抑制CD8⁺T淋巴细胞的功能, 可能对肿瘤进展起促进作用。我们通过对原发性肝癌和健康对照组外周血CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs占CD4⁺T淋巴细胞的比例的研究看出, HCC患者外周血中的CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺Tregs比例明显高于健康对照组, 差异有统计学意义。我们的研究对象是初次诊断的、未经治疗尤其是免疫调节剂治疗的HCC患者, 排除了免疫调节及其他化疗等因素的影响。Fu等^[9]观察到肿瘤浸润淋巴细胞中Tregs频率和CD4⁺T淋巴细胞频率明显高于癌旁组织及正常组织; 同时肝癌患者外周血Tregs数量明显增加, 而且和疾病进展密切相关;

图 4 CD127^{low}Tregs和foxp3⁺Tregs数值转换的幂模型曲线。

并发现肝癌患者外周血Tregs频率与其生存期密切相关, 认为Tregs可以作为肝癌患者存活的预测指标。Wolf等^[10]观察到HCC患者外周血Tregs细胞内T细胞受体清除周期的数值明显降低, 在体外扩增没有进一步缩短端粒长度, 可能是由于诱导端粒酶活性, 推测HCC患者外周血Tregs

■应用要点

本研究比较了Tregs的两种检测方法:检测Foxp3识别Tregs操作步骤复杂,费用比较昂贵;而检测CD127来识别Tregs,操作步骤相对简单,费用相对较低,因此可以使用CD127^{low}为表型标志鉴定Tregs,并建立了两者之间数值转换的回归方程,为进一步关于肝癌病情观察、疗效判定、随访研究及探讨进一步的免疫治疗策略提供了前期试验证据。

频率增加是由于Tregs增殖而不是Tregs的重分布导致。这样,我们通过控制Tregs数量等方式来改变Tregs活性进而控制免疫反应可能作为治疗肝癌的一种新的策略。但也有一些研究认为原发性肝癌患者外周血中Tregs占总淋巴细胞的比例与健康对照组无差异^[1]。

目前关于HCC患者外周血中的Tregs水平研究结论不一,可能是因为检测方法不同。外周血Tregs数量极少,仅占CD4⁺T细胞的5%-10%,Tregs的检测方法对于进一步有关功能和应用的研究十分重要。人们早期研究Tregs是通过检测CD4⁺CD25⁺,缺点是活化的T细胞表面也表达CD25,无法与之区分;随后研究Tregs是通过检测CD4⁺CD25^{hi-int},缺点是CD4⁺CD25^{hi-int}无法明确界定,导致同样的研究可能出现不同的结果;自从Foxp3被认为Tregs特异性的转录因子以来,检测CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺成为迄今鉴定Tregs细胞特异的标志,但其检测需要破膜染色,不能用于细胞功能研究及临床免疫治疗;近年来有研究^[5]提示,在I型糖尿病患者中人类调节性T细胞可通过CD127低表达进行识别。这一群CD127低表达的细胞主要阳性表达Foxp3,而且还包括低表达和不表达CD25的细胞,功能学验证有抑制功能和无能性,提示可以用CD127低表达来定量Tregs且CD127可以作为Tregs的生物学标志。CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}Tregs的这些细胞多数是Foxp3⁺,联合CD4、CD25、CD127作为膜表面标志物可以得到更纯化的Tregs,他的表达与Foxp3表达极其一致,并且与CD4细胞中、高表达CD25也相一致,这个标志更适用于体外培养与分析。也有研究^[6]认为,在CD127低表达的细胞群中有34.0%±15.1%不表达Foxp3,而在CD127高表达的细胞群中则有30.3%±7.4%表达Foxp3,所以CD127低表达与Foxp3阳性表达在人外周血中定义的是不同的Tregs群;并且以CD127进行检测,流式细胞图上细胞分群不清楚,影响检测结果。所以,能否用CD127低表达来定义Tregs还有待进一步的研究。

我们的研究表明,对同一HCC患者的同一份外周血全血标本同时以CD4⁺CD25^{hi-int}Foxp3⁺和CD4⁺CD25^{hi-int}CD127^{low}为表型标志鉴定Tregs,Tregs占CD4⁺T细胞的比例数值上讲呈正相关,也就是说Tregs上膜表面分子CD127的低表达和细胞膜内特异性转录因子Foxp3的阳性表达正相关,与Liu等^[5]的研究结果相似。但是,我们也可以看到,两群细胞并不完全重叠一致,数值

上也不完全相同,还不能认为CD127^{low}Tregs和Foxp3⁺Tregs是完全相同的一群细胞。所以,我们只能得出结论,用CD127^{low}Tregs和Foxp3⁺Tregs在数值上有很好的相关性。

既然用CD127^{low}Tregs和Foxp3⁺Tregs在数值上有很好的相关性,我们可否建立模型来描述他们之间的数量关系呢?从二者的散点图可以看出二者存在明显的正相关。但这种绝对的直线相关并不多见,且直线是一种特殊的曲线,为了验证两者之间的关系,我们用SPSS13.0进行曲线估计,产生11种拟合模型。可以看到,Linear(线性模型)的决定系数R²为0.791,并不是最优模型,而Power(幂模型)决定系数R²最高,为0.810,是最优模型,故选用幂模型建立两者之间的数值转换的回归方程。这可方便临床应用,我们也在进一步验证该模型的有效性。

从经济学和临床应用的角度上讲,由于使用Foxp3检测Tregs花费相对较高,检测步骤复杂,且不能进行下一步的细胞培养和分析,而使用低表达CD127来检测Tregs检测花费相对较少,检测步骤相对简单,可以进行下一步的细胞培养和分析,且在细胞检出水平上与需要破膜的Foxp3检测有很好的相关性,我们认为可以使用CD127^{low}作为Tregs的表型标志进行肝癌病情、疗效观察及随访等研究。在HCC患者的临床随访观察中,如果同一患者前后检测Tregs使用的方法不一致,我们可以利用两者数值转换的幂模型得出近似数值,进行患者外周血Tregs变化的动态观察。

总之,我们认为:在HCC患者外周血中的Tregs水平是升高的,且用CD127低表达和Foxp3阳性表达两种方法检测HCC患者外周全血CD4⁺CD25^{hi-int}Tregs的水平呈正相关,可利用幂模型得出两者之间近似的数值转换,方便使用外周血中的Tregs为指标对HCC患者进行临床随访观察。我们也进一步在观察其他患者中使用CD127低表达和Foxp3阳性表达两种方法检测数值的相关性,并验证两者之间数值幂模型转换的有效性。

4 参考文献

- 1 周立平,陈昕,巴静,赵连爽,李异玲. HBV感染后外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞与疾病进展的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2366-2369
- 2 Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* 2010; 107: 57-117
- 3 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of

- CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336
- 4 Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4⁺ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 2007; 319: 41-52
- 5 Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701-1711
- 6 Klein S, Kretz CC, Krammer PH, Kuhn A. CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 492-499
- 7 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌诊断标准. 中华肝病杂志 2000; 8: 135
- 8 Delhem N, Carpentier A, Moralès O, Miroux C, Groux H, Auriault C, Pancré V. [Regulatory T-cells and hepatocellular carcinoma: implication of the regulatory T lymphocytes in the control of the immune response] *Bull Cancer* 2008; 95: 1219-1225
- 9 Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu YX, Wang FS. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007; 132: 2328-2339
- 10 Wolf D, Rumpold H, Koppelstätter C, Gastl GA, Steurer M, Mayer G, Günsilius E, Tilg H, Wolf AM. Telomere length of in vivo expanded CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells is preserved in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1198-1208
- 11 Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, Coleman N, Alexander GJ. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 2005; 41: 722-730

■同行评价

本研究设计合理, 方法新颖, 实验结果比较可靠, 文中所涉及的研究内容对从事肝脏疾病的临床和基础研究工作者有指导意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度。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 g \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 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 \leq 100, 百分数到个位; 101 \leq 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿拉伯数字不移行!

幽门螺杆菌、高胃泌素血症对结肠腺瘤形成的作用

张雪梅, 刘丽娜, 马红霞, 高勇

■背景资料

最近研究显示, 幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染阳性的结肠腺瘤患者往往伴随血清胃泌素水平显著升高, 结肠腺瘤组织中环氧合酶-2(COX-2)过表达。而COX-2不仅在癌前病变、原位癌中表达增高, 还与肿瘤血管新生有关。因此, *H. pylori*感染可能是形成结肠腺瘤的危险因素。

张雪梅, 高勇, 上海市东方医院 同济大学附属东方医院肿瘤科 上海市 200120

刘丽娜, 南京中医药大学第一临床医学院西医内科教研室 江苏省南京市 210046

马红霞, 上海市东方医院 同济大学附属东方医院检验科 上海市 200120

上海市浦东新区卫生系统重点基金资助项目, No. PWZXXK2007-06

作者贡献分布: 张雪梅与高勇对此文所作贡献均等; 此课题由张雪梅与高勇设计; 研究过程由张雪梅、刘丽娜及马红霞操作完成; 研究所用新试剂由马红霞提供, 分析工具由刘丽娜提供; 数据分析由张雪梅完成; 本论文写作由张雪梅完成。

通讯作者: 高勇, 副主任医师, 200120, 上海市即墨路150号, 上海市东方医院, 同济大学附属东方医院肿瘤科。

gaoyon@hotmail.com

电话: 021-38804518-7216

收稿日期: 2010-01-27 修回日期: 2010-04-12

接受日期: 2010-04-20 在线出版日期: 2010-05-08

Effects of *Helicobacter pylori* infection and hypergastrinemia on the growth of colonic adenoma

Xue-Mei Zhang, Li-Na Liu, Hong-Xia Ma, Yong Gao

Xue-Mei Zhang, Yong Gao, Department of Oncology, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China

Li-Na Liu, Department of Western Internal Medicine, the First Clinical Medical College of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Hong-Xia Ma, Department of Clinical Laboratory, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China

Supported by: the Key Program of Health Bureau of Shanghai Pudong New District, No. PWZXXK2007-06

Correspondence to: Yong Gao, Department of Oncology, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China. gaoyon@hotmail.com

Received: 2010-01-27 Revised: 2010-04-12

Accepted: 2010-04-20 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To investigate the association among gastrin level, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection and the development of colonic adenoma.

METHODS: Fasting serum samples from 48 patients with colonic adenomas and 43 demographically matched colonoscopy-negative controls were assayed for anti-*H. pylori* IgG and serum gastrin levels. Colonic adenoma patients received

oral celecoxib for 6 months. At the end of the second, fourth and sixth months, serum gastrin levels were measured by radioimmunoassay (RIA) and *H. pylori* IgG antibody was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The prevalence of *H. pylori* seropositivity was significantly higher in patients with colonic adenomas than in controls (68.8% vs 9.30%, $P < 0.05$). Similarly, median gastrin level was significantly higher in patients with colonic adenomas than in controls (72.7% vs 37.8%, $P < 0.05$). There was a positive correlation between *H. pylori* IgG antibody and serum gastrin level in colonic adenoma patients ($r = 0.854$, $P < 0.001$). Of note, hypergastrinemia was associated with distal colon distribution of adenomas, but not with adenoma number, size, grade or histological features. After celecoxib treatment, there were parallel falls in serum gastrin levels and *H. pylori* seropositivity in colonic adenoma patients.

CONCLUSION: Hypergastrinemia induced by *H. pylori* infection is associated with increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in colonic adenoma, suggesting the possibility that gastrin up-regulates COX-2 expression in colonic adenoma. Celecoxib can obviously decrease *H. pylori* seropositivity and gastrin levels and inhibit the growth of colonic adenomas by down-regulating COX-2 expression.

Key Words: Colonic adenoma; *Helicobacter pylori*; Hypergastrinemia; Cyclooxygenase-2

Zhang XM, Liu LN, Ma HX, Gao Y. Effects of *Helicobacter pylori* infection and hypergastrinemia on the growth of colonic adenoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1390-1394

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染、血清胃泌素(GAS)与结肠腺瘤的相互关系。

方法: 采用放射免疫法(RIA)测定结肠腺瘤($n = 48$)及对照组($n = 43$)的血清胃泌素水平, 用ELISA法检测*H. pylori* IgG抗体。给予结肠腺瘤

■同行评议者

樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科

患者口服塞来昔布6 mo, 分别在2、4、6 mo 检测血清胃泌素及抗*H.pylori* IgG抗体。

结果: 腺瘤组患者*H.pylori*感染阳性率、血清胃泌素水平明显高于对照组($P<0.05$), 结肠腺瘤组血清胃泌素水平与*H.pylori* IgG抗体显著相关($r = 0.854, P<0.001$); 远端结肠腺瘤患者*H.pylori*阳性率显著高于近端结肠($P<0.05$), 同时高胃泌素血症患者比例明显高于近端结肠(72.7% vs 37.8%, $P<0.05$)。口服塞来昔布后, *H.pylori*阳性率、血清胃泌素水平均趋向下降并且随着服药时间的延长进一步降低。

结论: *H.pylori*感染可诱导高胃泌素血症与结肠腺瘤形成; COX-2可能介导胃泌素诱导的结肠腺瘤形成; 口服COX-2抑制剂塞来昔布可以降低*H.pylori*阳性率及血清胃泌素水平, 从而发挥抑制结肠腺瘤生长的作用。

关键词: 结肠腺瘤; 幽门螺杆菌; 高胃泌素血症; 环氧化酶-2

张雪梅, 刘丽娜, 马红霞, 高勇. 幽门螺杆菌、高胃泌素血症对结肠腺瘤形成的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1390-1394

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1390.asp>

0 引言

最近研究显示, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染阳性的结肠腺瘤患者往往伴随血清胃泌素(Gastrin)水平显著升高^[1], 结肠腺瘤组织中环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)过表达^[2]。而COX-2不仅在癌前病变、原位癌中表达增高, 还与肿瘤血管新生有关^[3,4]。因此, *H.pylori*感染可能是形成结肠腺瘤的危险因素^[2,5]。然而, 目前对结肠腺瘤与*H.pylori*感染的关系的研究很少, *H.pylori*感染、高胃泌素血症、COX-2与结肠腺瘤之间的关系尚无报道, 本研究试图揭示: (1)*H.pylori*诱导高胃泌素血症与结肠腺瘤形成是否相关; (2)结肠腺瘤患者*H.pylori*感染与组织病理学类型的潜在关系; (3)选择性COX-2抑制剂-塞来昔布(celecoxib)对结肠腺瘤有明显的抑制作用, 长期干预治疗后, 结肠腺瘤患者*H.pylori*阳性率与血清胃泌素水平的变化, 从而在结肠腺瘤防治过程中能否将COX-2抑制剂逐步合理地运用于临床。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-01-01/06-30在我院行结肠镜检查

的患者, 其中结肠腺瘤组患者48例, 男26例, 女22例; 以上病例均由结肠镜检查及病理证实。对照组43例, 男22例, 女21例, 由缺铁性贫血及腹痛患者组成, 经结肠镜检查无胃肠道疾病。所有患者既往均无结肠癌, 结肠增生性息肉, 慢性肠炎, 淋巴瘤, 消化性溃疡及胃肠手术病史, 无长期服用非甾体抗炎药、糖皮质激素病史, 无*H.pylori*根除治疗病史。

1.2 方法 全部入组人员均在结肠镜检查前2 d清晨空腹抽外周静脉血10 mL, 立即离心分离血清, 置-70 °C保存待测。血清胃泌素测定采用放射免疫分析法(中国原子能研究所提供药盒); 血清抗*H.pylori* IgG抗体用ELISA法检测(美国Maxin Biotech Inc产试剂盒), 抗*H.pylori* IgG含量大于40 EU/mL诊断为*H.pylori* IgG抗体阳性。结肠腺瘤组患者给予塞来昔布口服400 mg每日2次, 共计6 mo。其中2、4、6 mo分别检测血清胃泌素及抗*H.pylori* IgG抗体。

统计学处理 所有变量均以mean±SD的形式表示。多组均数比较采用方差分析, 变量方差不齐时采用变量变换后再行方差分析, 组间两两比较采用LSD法。血清胃泌素水平与*H.pylori* IgG抗体的相关性用线性回归分析法。多变量分析用Logist回归模型。独立变量: 高胃泌素血症(血清胃泌素>110 ng/L)(是: 1, 否: 0); 吸烟(是: 1, 否: 0); 饮酒(是: 1, 否: 0); 吸烟(是: 1, 否: 0); 体质指数(高: 1, 低: 0); *H.pylori*感染情况(+: 1, -: 0)。采用统计软件SPSS17.0进行数据的统计学分析, 取 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠腺瘤组与对照组流行病学特征 结肠腺瘤组与对照组流行病学特征无显著性差异(表1)。两组在年龄、性别、体质指数、经济状况方面相匹配, 腺瘤组患者吸烟(45.8%)与饮酒(35.4%)比例较高。其中, *H.pylori*感染阳性的患者腺瘤组(68.8%)明显多于对照组(9.30%), 两组有显著性差异($P<0.05$)。

2.2 结肠腺瘤组患者*H.pylori*阳性率与胃泌素水平的变化 血清胃泌素水平腺瘤组明显高于对照组(112.30 ng/L±29.47 ng/L vs 77.65 ng/L±20.31 ng/L, $P<0.05$), 同时高胃泌素血症患者的比例亦有显著性差异(37.4% vs 12.9%, $P<0.05$)。而在腺瘤组中, 远端结肠腺瘤患者*H.pylori*阳性率(90.9%)明显高于近端结肠(9.1%), 二者有显著性差异($P<0.05$); 同时高胃泌素血症患者比例

■研发前沿

目前对结肠腺瘤与*H.pylori*感染的关系的研究很少, *H.pylori*感染、高胃泌素血症、COX-2与结肠腺瘤之间的关系尚无报道。

■相关报道

Sotirios等的研究结果显示, *H.pylori*感染阳性的结肠腺瘤患者往往伴随血清胃泌素水平显著升高, 结肠腺瘤组织中COX-2过表达, 因此, *H.pylori*感染可能是形成结肠腺瘤的危险因素。

■应用要点

本实验发现: (1) *H.pylori* 感染可诱导高胃泌素血症与结肠腺瘤形成; (2) 选择性COX-2抑制剂塞来昔布经口服途径给药可以降低*H.pylori* 阳性率及血清胃泌素水平, 从而发挥抑制结肠腺瘤生长的作用, 为选择性COX-2抑制剂运用于临床肿瘤治疗提供了理论依据。

表 1 结肠腺瘤组与对照组流行病学特征

参数	结肠腺瘤 (n = 48)	对照组 (n = 43)	P值
中位年龄(岁)	62(33-81)	61.2(29-76)	0.590
性别			
男	26	22	0.470
女	22	21	
经济状况			
高	21	20	0.240
低	27	23	
吸烟史n(%)			
是	22(45.8)	14(32.5)	0.004
否	26(54.2)	29(67.5)	
饮酒史n(%)			
是	17(35.4)	10(20.8)	0.003
否	31(64.6)	33(79.2)	
体质量指数n(%)			
高	25(52.0)	23(53.4)	0.400
低	23(48.0)	20(46.6)	
<i>H.pylori</i> 感染n(%)			
阳性	33(68.8)	4(9.30)	0.001
阴性	15(31.2)	39(90.7)	

明显高于近端结肠(72.7 vs 37.8%, $P < 0.05$)。但是, 结肠腺瘤患者*H.pylori*阳性率与结肠腺瘤大小、数量、组织类型、分级无明显相关。此外, 本组结果显示, 结肠腺瘤不同病理类型间, 其血清胃泌素水平无显著差异(表2)。

2.3 塞来昔布干预后结肠腺瘤患者*H.pylori*阳性率与血清胃泌素的变化 未口服塞来昔布的结肠腺瘤患者(0 mo组)与对照组比较, *H.pylori*阳性率、胃泌素水平有显著差异。而口服塞来昔布后, *H.pylori*阳性率在各组均趋向下降并且随着服药时间的延长进一步降低。与0 mo组相比较, 2 mo组下降2.2%($P > 0.05$), 4 mo组下降8.4%($P > 0.05$), 6 mo组下降27.2%($P < 0.05$); 此外, *H.pylori*阳性率在2 mo组与4 mo组间无显著性差别(表3)。

胃泌素水平与0 mo组相比, 在6 mo组显著降低($P < 0.05$); 然而, 在4 mo组与6 mo组GAS无显著差异。随着*H.pylori*阳性率下降, GAS下降(表3)。结肠腺瘤组血清胃泌素水平与*H.pylori* IgG抗体显著相关($r = 0.854$, $P < 0.001$, 图1)。

3 讨论

胃泌素是胃肠道G细胞所分泌的一种多肽激素, 不仅能促进胃酸分泌, 还可以通过自分泌、旁分泌和神经内分泌方式发挥促进胃肠黏膜上皮

表 2 结肠腺瘤组患者*H.pylori*阳性率与胃泌素水平的变化

变量	<i>H.pylori</i> 阳性率n(%)	胃泌素(ng/L)	
		>110	≤110
部位			
近端结肠	3(9.1)	14	23
远端结肠	30(90.9)	8	3
数量			
1	29(87.9)	12	25
>1	4(12.1)	2	9
大小(cm)			
<1	9(27.3)	5	12
≥1	24(72.7)	13	18
组织类型			
管状腺瘤	10(30.3)	5	18
混合型	23(69.7)	9	15
绒毛状腺瘤	0(0.0)	0	0
分级			
低级	6(18.2)	2	10
中级	27(81.8)	14	19
高级	0(0.0)	1	2

细胞增生的作用。最近研究显示, 高水平胃泌素可能会促发结肠上皮组织增生, 增加结肠腺瘤形成的风险^[6-8], Mizuno等^[9]更是认为GAS(尤其是前胃泌素和甘氨酸胃泌素)自分泌调节机制激活是促进结肠息肉发生甚至癌变的早期事件。但其中机制并不清楚。我们研究显示, 结肠腺瘤组*H.pylori*感染阳性率显著高于对照组, 同时伴随高胃泌素血症患者比例明显增加。这个结果与Mizuno等^[9]等通过结肠镜检查332位患者评估发现, *H.pylori* IgG血清阳性的患者结肠腺瘤发病率较正常人明显升高的结果一致。此外, 我们发现, 结肠腺瘤患者血清胃泌素水平与*H.pylori* IgG抗体显著相关($r = 0.854$, $P < 0.001$)。因此, 我们推测, *H.pylori*感染阻抑了胃酸对G细胞分泌的负反馈作用, 从而引起血清胃泌素水平升高, 加剧结肠黏膜细胞经历凋亡后萎缩、肠化生或发育不良。最终, 在某些情况下, *H.pylori*感染引起血清胃泌素水平升高, 可能促使结肠腺瘤形成。

本组结果显示, 结肠腺瘤不同病理类型间, 其血清胃泌素水平无显著差异, 可能由于混合腺瘤例数较多, 管状腺瘤和绒毛状腺瘤例数较少。而结肠腺瘤患者*H.pylori*阳性率与结肠腺瘤大小、部位、数量、分级亦无明显相关。但是, 我们注意到高胃泌素血症与末端结肠有明显相关, 腺瘤大多位于结肠脾曲的末端以及直肠乙

表 3 塞来昔布干预后结肠腺瘤患者 *H.pylori* 阳性率与血清胃泌素的变化 (mean \pm SD)

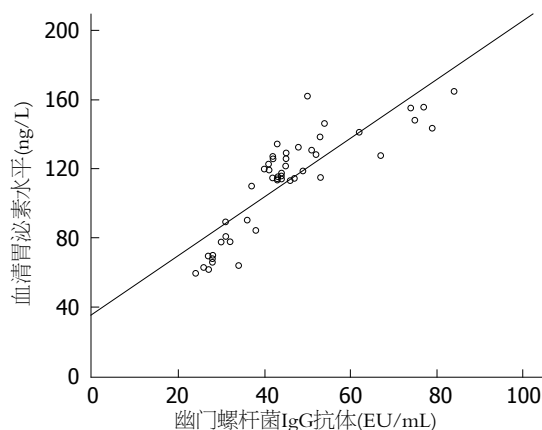
分组	n	<i>H.pylori</i> 阳性率 n(%)	胃泌素 (ng/L)
对照组	43	4(9.30)	77.65 \pm 20.31
0 mo组	48	33(68.8) ^a	112.30 \pm 29.17 ^a
2 mo组	48	32(66.6)	110.23 \pm 27.68
4 mo组	48	29(60.4)	110.10 \pm 27.54
6 mo组	48	20(41.6) ^{ac}	80.49 \pm 22.78 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 0 mo组.

状结肠交界处, 这可能与 *H.pylori* 刺激氨产生, 在末端结肠易引起细胞增殖, 产生氧自由基, 增加 NO 含量, 刺激干细胞突变, 形成结肠腺瘤^[11,12].

COX 是催化花生四烯酸合成前列腺素的关键限速酶, 其存在 COX-1 和 COX-2 两个亚型. COX-2 是一种诱导性即刻反应基因, 大多数正常组织不表达, 但在细胞因子、生长因子、癌基因及各种促癌因素的刺激下迅速上调, 参与肿瘤的发生发展^[13]. 近年来, 有报道 COX-2 抑制剂-塞来昔布(celecoxib)对结肠腺瘤的治疗有极好疗效^[14]. 我们也观察到, *H.pylori* 阳性率及血清胃泌素水平随着服用塞来昔布时间的延长逐渐降低, 并呈明显时间依赖性, 口服塞来昔布达 6 mo 可有统计学差异. 这些研究结果提示, *H.pylori* 感染可能使胃泌素升高(高胃泌素血症), 胃泌素通过 CCK-B 受体, 使 COX-2 mRNA 和蛋白质在肠道表达显著升高, COX-2 启动子活性增强, 释放前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2). PGE2 反作用于表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR), 促进结肠瘤细胞的有丝分裂信号. PGE2 对结肠黏膜产生营养作用, 导致结肠过度增殖, 形成腺瘤. 另外, 蔡瑞霞等^[15]报道, COX-2 在肿瘤组织中新生血管的内皮细胞, 基质的单核巨噬细胞及成纤维细胞内强表达, 参与血管生成. 因此, 塞来昔布也可以抑制结肠腺瘤新生血管的形成从而抑制结肠腺瘤的生长. 所以, 我们认为, 胃泌素可能是一种结肠上皮细胞潜在的 COX-2 表达刺激物, 通过受体介导产生一种蛋白激酶通路激活作用, 胃泌素诱导 COX-2 表达上调, 可导致激素依赖性胃肠道新生物形成, 包括结肠腺瘤.

总之, 本实验发现: (1) *H.pylori* 感染可诱导高胃泌素血症与结肠腺瘤形成; (2) 胃泌素与 COX-2 表达有关, COX-2 可能介导胃泌素诱导的结肠腺瘤形成; (3) 选择性 COX-2 抑制剂塞来昔

图 1 血清胃泌素水平与 *H.pylori* IgG 抗体的关系.

同行评价

本文立意较新颖, 设计尚可, 结果可信, 但须进一步深入研究.

布经口服途径给药可以降低 *H.pylori* 阳性率及血清胃泌素水平, 从而发挥抑制结肠腺瘤生长的作用. 在本实验过程中没有发现患者存在明显的胃肠道损伤, 为选择性 COX-2 抑制剂运用于临床肿瘤治疗提供了理论依据.

参考文献

- Georgopoulos SD, Polymeros D, Triantafyllou K, Spiliadi C, Mentis A, Karamanolis DG, Ladas SD. Hypergastrinemia is associated with increased risk of distal colon adenomas. *Digestion* 2006; 74: 42-46
- Hartwich A, Konturek SJ, Pierzchalski P, Zuchowicz M, Labza H, Konturek PC, Karczewska E, Bielanski W, Marlicz K, Starzynska T, Lawniczak M, Hahn EG. Helicobacter pylori infection, gastrin, cyclooxygenase-2, and apoptosis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16: 202-210
- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60: 1306-1311
- Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001; 3: 53-61
- Jones M, Helliwell P, Pritchard C, Thorakan J, Mathew J. Helicobacter pylori in colorectal neoplasms: is there an aetiological relationship? *World J Surg Oncol* 2007; 5: 51
- Soylu A, Ozkara S, Alis H, Dolay K, Kalayci M, Yasar N, Kumbasar AB. Immunohistochemical testing for Helicobacter Pylori existence in neoplasms of the colon. *BMC Gastroenterol* 2008; 8: 35
- Oset P, Jasińska A, Szcześniak P, Orszulak-Michalak D, Talar-Wojnarowska R, Małeczka-Panas E. [Analysis of serum gastrin levels in patients with adenomatous polyps of the colon] *Pol Merkuriusz Lekarski* 2009; 26: 458-461
- Smith AM, Watson SA. Gastrin and gastrin receptor activation: an early event in the adenoma-carcinoma sequence. *Gut* 2000; 47: 820-824
- Mizuno S, Morita Y, Inui T, Asakawa A, Ueno N, Ando T, Kato H, Uchida M, Yoshikawa T, Inui A. Helicobacter pylori infection is associated with colon

- adenomatous polyps detected by high-resolution colonoscopy. *Int J Cancer* 2005; 117: 1058-1059
- 10 罗伟仁, 陈小毅. 环氧合酶-2与肿瘤的关系. 肿瘤防治研究 2006; 33: 62-64
- 11 Guo YS, Cheng JZ, Jin GF, Gutkind JS, Hellmich MR, Townsend CM Jr. Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERK5 kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 48755-48763
- 12 Yan M, Myung SJ, Fink SP, Lawrence E, Lutterbaugh J, Yang P, Zhou X, Liu D, Rerko RM, Willis J, Dawson D, Tai HH, Barnholtz-Sloan JS, Newman RA, Bertagnolli MM, Markowitz SD. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase inactivation as a mechanism of resistance to celecoxib chemoprevention of colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 9409-9413
- 13 Rao VP, Poutahidis T, Ge Z, Nambiar PR, Boussahmain C, Wang YY, Horwitz BH, Fox JG, Erdman SE. Innate immune inflammatory response against enteric bacteria *Helicobacter hepaticus* induces mammary adenocarcinoma in mice. *Cancer Res* 2006; 66: 7395-7400
- 14 Fujimori S, Kishida T, Kobayashi T, Sekita Y, Seo T, Nagata K, Tatsuguchi A, Gudis K, Yokoi K, Tanaka N, Yamashita K, Tajiri T, Ohaki Y, Sakamoto C. *Helicobacter pylori* infection increases the risk of colorectal adenoma and adenocarcinoma, especially in women. *J Gastroenterol* 2005; 40: 887-893
- 15 蔡瑞霞, 盛霞, 袁志浩, 叶增强. CD105、COX-2和VEGF在结直肠癌中的表达及其与血管新生的关系. 肿瘤防治研究 2007; 34: 125-127

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology*(WJG)的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1 112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, WJG的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-06-19)

胎儿弯曲菌蛟河株从结肠癌患者血液中的分离及鉴定

李春辉, 孙可歆, 孙风辉

李春辉, 北华大学附属医院肿瘤科 吉林省吉林市 132011
孙可歆, 吉林医药学院检验系 吉林省吉林市 132013
孙风辉, 蛟河市第二人民医院 吉林省蛟河市 132013
作者贡献分布: 李春辉与孙可歆对此文所作贡献均等; 孙风辉提供标本; 此课题由李春辉与孙可歆设计; 研究过程由李春辉操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孙可歆提供; 数据分析由李春辉完成; 本论文写作由李春辉与孙可歆完成。
通讯作者: 孙可歆, 132013, 吉林省吉林市吉林大街5号, 吉林医药学院检验系. sunkexin77@126.com
电话: 0432-62166372
收稿日期: 2010-01-20 修回日期: 2010-04-20
接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-08

Characterization of a novel strain of *Campylobacter fetus* separated from the blood sample from a patient with colon cancer

Chun-Hui Li, Ke-Xin Sun, Feng-Hui Sun

Chun-Hui Li, Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Bei Hua University, Jilin 132011, Jilin Province, China
Ke-Xin Sun, Department of Medical Laboratory Science, Jilin Medical College, Jilin 132013, Jilin Province, China
Feng-Hui Sun, the Second People's Hospital of Jiaohe City, Jiaohe 132013, Jilin Province, China
Correspondence to: Ke-Xin Sun, Department of Medical Laboratory Science, Jilin Medical College, 5 Jilin Avenue, Jilin 132013, Jilin Province, China. sunkexin77@126.com
Received: 2010-01-20 Revised: 2010-04-20
Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To characterize the morphological and biological properties of a novel strain of *Campylobacter fetus* (Jiao he strain) separated from the blood sample from a patient with colon cancer.

METHODS: The morphological, cultural and biochemical characteristics of the isolated strain were studied with routine methods. Bacterial DNA was extracted to amplify 16S rDNA with TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Code No. D310). PCR products were then sequenced.

RESULTS: The morphological, cultural and biochemical characteristics of the isolated strain correspond well with those of *Campylobacter fe-*

tus. The sequence of 16S rDNA amplified from the isolated strain is also matched with those of *Campylobacter fetus* deposited in the NCBI database.

CONCLUSION: Jiao he strain may represent a novel subspecies of *Campylobacter fetus* since there are differences in some stably heritable morphological and cultural characteristics between Jiao he strain and subspecies fetus.

Key Words: *Campylobacter fetus*; Colon cancer; Pathogenicity; Jiao he strain

Li CH, Sun KX, Sun FH. Characterization of a novel strain of *Campylobacter fetus* separated from the blood sample from a patient with colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1395-1399

摘要

目的: 研究从结肠癌术后患者血液中分离出的病原菌生物学性状并鉴定其种型。

方法: 按常规的鉴定方法进行细菌学实验(包括形态学、培养特性、生化特征等实验); 用碱裂解法提取细菌DNA, 使用TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No. D310), 以Forward primer/Reverse primer 2为引物, 做16S rDNA PCR扩增及序列测定。

结果: 蛟河株的形态学、培养特性和生化特征等实验符合弯曲菌属胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)鉴定标准; 经16S rDNA扩增及测序结果NCBI上比对结果为胎儿弯曲菌。

结论: 蛟河株为弯曲菌属胎儿弯曲菌; 但比胎儿亚种形态学和生化特征有一定差异, 且可稳定遗传给子代, 可以确定为胎儿亚种的新变种。

关键词: 胎儿弯曲菌; 结肠癌; 致病性; 蛟河株

李春辉, 孙可歆, 孙风辉. 胎儿弯曲菌蛟河株从结肠癌患者血液中的分离及鉴定. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1395-1399
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1395.asp>

■背景资料

细菌的变异现象是细菌的普遍特征之一。在自然界中, 任何微生物都可发生变异。有的是表型变异(非遗传性变异), 有的是基因型变异(遗传性变异)。研究细菌的变异性, 发现新细菌或新变种, 有助于临床工作者对感染性疾病的病原学的深刻认识, 从而提高临床诊治水平, 科学诊断, 科学治疗。该研究直接来源于临床实践, 符合转化医学的科研思路。

■同行评议者

周晓东, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

■相关报道

众所周知,目前细菌的分类鉴定均是按照国际惯例,依据新版本“伯杰鉴定细菌学手册”(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)和“伯杰系统(分类)细菌学手册”(Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology)并参阅国内外相应的文献而进行。一方面要做细菌表型特征的鉴定;另一方面要做细菌的遗传学特征(测序)鉴定。目前,国内尚未见有对本菌的这种全方位的鉴定报道文献。

0 引言

弯曲菌属(*Campylobacter*)是一类呈逗点状、S状或螺旋状弯曲的革兰阴性杆菌,广泛分布于温血动物,常定居于家禽及野鸟的肠道内。引起人类肠道感染的菌种主要为空肠弯曲菌和大肠弯曲菌。其中,空肠弯曲菌空肠亚种最为常见。由胎儿弯曲菌引起人类感染的报道甚少。目前,有关胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)引起的结肠癌术后患者的菌血症和败血症,国内尚未见报道,国外报道的病例也甚少^[1-7,13,14]。我们于2009-06从患结肠癌术后来蛟河市二院进行化疗的患者出现败血症时的血液中分离出1株胎儿弯曲菌,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 临床病例:男,71岁,蛟河市天岗乡人,从事养殖野鸡、鸟、家禽等工作。患结肠癌在解放军222医院术后,来蛟河市二院化疗。查体:体温39.1℃,脉搏105次/分,呼吸33次/min,血压18/13 kPa(140/100 mmHg),精神萎靡,四肢末稍厥冷,双肺呼吸音清,未闻及干湿罗音。心律105次/min,律不齐。实验室检查:胸部CT显示:右肺门可见少许肿大淋巴结。血红蛋白100 g/L, RBC $3.01 \times 10^{12}/L$, WBC $20 \times 10^9/L$ 。肝功能ALT 25 U/L、GGT 91 U/L、总蛋白52.6 g/L、白蛋白22.8 g/L、球蛋白29.8 g/L。肾功能正常、粪便隐血(++),尿常规正常。病理诊断:结肠癌,中度分化。仪器与试剂: TaKaRa BIO公司TP3000型PCR仪, ABI公司377XLDNA测序仪, 测序试剂为: ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with Amplitaq DNA Polymerase, FS(Applied Biosystems)。细菌分离培养基: 血平板、普通平板、中国蓝平板。血液增菌培养基为美国BD公司BACTEC成人需氧增菌培养瓶, 血培养系统为BACTEC9050全自动血培养系统。

1.2 方法 细菌的生物学性状检验,包括形态学、培养特性和生化特征,其方法按常规方法进行^[7]。常规碱裂解法提取细菌DNA,对提取的细菌基因组DNA取1 μL 10倍稀释后进行琼脂糖凝胶电泳。以细菌基因组DNA为模板,使用TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No.D310),以Forward primer/Reverse primer2为引物,扩增目的片段。取5 μL进行脂糖凝胶电泳。使用TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0(Code No. DV805A)切胶回收目的片段,

取1 μL进行琼脂糖凝胶电泳。以试剂盒提供的Seq Forward、Seq Reverse、Seq Internal为引物对胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)CTA703株的16S rDNA基因序列测定与分析(华大生物工程有限公司进行)。

2 结果

2.1 细菌分离培养及生长特征 送检患者血液标本经BACTEC9050培养系统48 h显示阳性,取阳性培养物无菌操作分别接种血平板、普通平板、中国蓝平板进行分离培养。置于25、37、42℃不同温度环境下需氧纯培养24-48 h,未见细菌生长;72 h后25、37℃纯培养的血平板出现云雾状的生长物,42℃不生长。为微需氧菌,50 g/L CO₂可促进其生长。普通平板和中国蓝平板均无细菌生长。取纯培养物,经3-4次传代肉汤增菌培养后接种血平板,37℃ 24 h就可以出现云雾状而且沿接种线扩展生长,72 h后有部分形成光滑、湿润、灰色的单个菌落。

2.2 细菌的形态学特征 取阳性肉汤培养物直接涂片镜检:(1)瑞氏染色镜检,结果发现有细菌(图1A);(2)美蓝染色镜检发现细菌(图1B);(3)取阳性肉汤培养物滴于载玻片上,加上盖玻片,高倍镜下观察,发现有大量运动相当活跃的菌体,油镜下观察,发现有螺旋状且运动活泼的菌体。

取血平板生长的细菌涂片革兰染色镜检发现革兰阴性,菌体细长,弧形或两菌体相连形成弯曲的螺旋状、“S”形、海鸥展翅形(图2),旧培养物可呈现球状。细菌的大小,长为0.5-5 μm,无芽胞。鞭毛染色可见菌体一端或两端有单鞭毛,有的则为一根侧鞭毛(图3)。

2.3 细菌的生化特征 氧化酶阳性,触酶阳性,还原硝酸盐,对糖类不氧化也不发酵,甲基红阴性,V-P试验阴性,不液化明胶,尿素酶阴性,脂酶阴性,H₂S阴性,枸橼酸盐利用试验阴性。不产生色素。

2.4 细菌的基因组DNA 16S rDNA扩增及序列测定 提取细菌基因组DNA,并以此为模板使用TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No.D310),以该试剂盒提供的Forward primer/Reverse primer2引物,扩增目的片段。取5 μL进行脂糖凝胶电泳,结果如图4。

待测菌株16S rDNA PCR产物琼脂糖凝胶电泳显示,扩增产物约1 500 bp左右。阳性对照试剂盒提供的细菌通用16S rDNA阳标,由于细菌种类不同,与待测菌株扩增片段大小有差别。PCR产物经切胶回收,纯化,以试剂盒提供的Seq

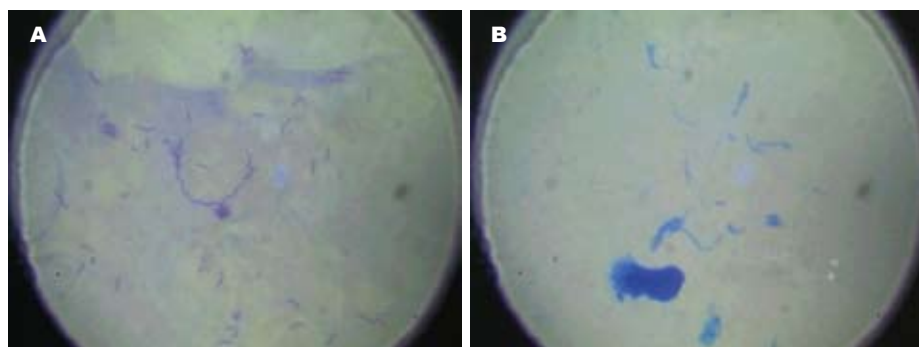


图 1 肉汤培养物所见($\times 1000$). A: 瑞氏染色; B: 美蓝染色.



图 2 血平板 24 h培养物涂片镜下所见(革兰染色, $\times 1000$).



图 3 鞭毛染色所见(鞭毛染色法 $\times 1000$).

■创新盘点

本研究从结肠癌患者血液分离出的弯曲菌属胎儿弯曲菌符合胎儿亚种的基本特征,因此确认他为胎儿亚种。但是,对所分离出的菌株比对上述两个亚种,发现他在生物学特征上又有与胎儿亚种、性病亚种不同之处,具有自己的特点。而且这些特性,经多次传代后在其子代仍保持不变,能稳定的遗传下去。显然,这个菌株发生的变异为遗传性变异。可以确定他是胎儿弯曲菌胎儿亚种的新变种。

Forward、Seq Reverse、Seq Internal为引物测序。2.5 待测细菌16S rDNA基因序列测定结果及NCBI基因库数据比对结果 由华大生物工程有限公司测得的基因序列,经BLAST分析,结果与胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)CTA703株的16S rDNA基因部分序列(基因登录号GI:116248040)100%一致,全长1 435 bp,表明待测菌株为胎儿弯曲菌。

3 讨论

众所周知,目前细菌的分类鉴定均是按照国际惯例,依据新版本“伯杰鉴定细菌学手册”(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)和“伯杰系统(分类)细菌学手册”(Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology)并参阅国内外相应的文献而进行的。一方面要做细菌表型特征的鉴定;另一方面要做细菌的遗传学特征(测序)鉴定。其中后者是确定细菌类缘关系的最理想方法。我们从一患结肠癌术后患者的血液中分离出的菌株,用常规碱裂解法提取细菌DNA,使用TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No.D310),以Forward primer/Reverse primer2为引物,做PCR扩增和16S rDNA扩增及序列测定结果NCBI上比对结果为100%符合弯曲菌属胎儿弯曲菌。

细菌的变异现象是细菌的普遍特征之一。在自然界中,任何微生物都可发生变异。有的是表型变异(非遗传性变异),有的是基因型变异(遗传性变异)。根据BERGEYS分类细菌学手册记

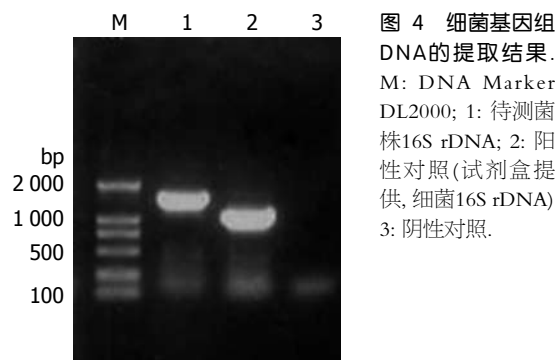


图 4 细菌基因组DNA的提取结果. M: DNA Marker DL2000; 1: 待测菌株16S rDNA; 2: 阳性对照(试剂盒提供,细菌16S rDNA); 3: 阴性对照.

载^[9],胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)又分为胎儿亚种(*C. fetus Subsp. fetus*)和性病亚种(*C. fetus Subsp. venerealis*).我们从结肠癌患者血液中分离出的弯曲菌属胎儿弯曲菌符合胎儿亚种的基本特征,因此确认他为胎儿亚种。但是,我们对所分离出的菌株比对上述两个亚种,发现他在生物学特征上又有与胎儿亚种、性病亚种不同之处,具有自己的特点。首先在形态学特征上,胎儿亚种和性病亚种均为一端或两端单鞭毛,我们分离出的菌株有的尚有一端丛鞭毛和侧单鞭毛。其次在培养特点上,42℃性病亚种不生长,胎儿亚种不一定,我们分离出的菌株则不生长。而且这些特性,经多次传代后在其子代仍保持不变,能稳定的遗传下去。显然,这个菌株发生的变异为遗传性变异。可以确定他是胎儿弯曲菌胎儿亚种的新变种。由于我们对所分离的菌株的DNA序列测序只测定了16S rDNA这一保守序列,尚未测定其全部序列。因此所分离的菌株是否为新的亚型有待进一步研究。

■同行评价

本文方法可靠,为进一步发现人类致病的新菌株进行了有益的探索.

据文献记载,胎儿弯曲菌是微嗜氧菌,必须使用少数经过评估的优化的血液分离培养弯曲菌的方法^[8,9]. BACTEC系统(需氧瓶)和Septi-check系统均适于常见弯曲菌生长^[11,12]. 其他方法,如厌氧肉汤培养基或裂解离心分离法(lysiscentrifugation),可能不太敏感^[10]. 绝大多数弯曲菌是微需氧的,含50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂和850 mL/L N₂的空气能达到最佳的分离培养效果^[8]. 但我们在有氧的条件下进行培养也可生长. 要探讨这个问题还需要从何谓厌氧菌及微嗜氧菌说起. 厌氧菌(anaerobes)是一大群要求在降低氧压的条件下才能生长,而不能在含有10% CO₂(空气中含180 mL/L O₂)的固体培养基表面生长的细菌总称. 他又分为极度厌氧菌(系指一些要求在低于5 mL/L O₂条件下才能生长,在空气中暴露10 min即死亡的细菌)和中度厌氧菌[系指能在2%-8%(平均3%)的氧分压环境中生长. 在空气中暴露60-90 min尚能存活的细菌]两种. 而微嗜氧菌(*microaerophilic bacteria*)或称微需氧菌系指能在50-100 mL/L CO₂空气中的固体培养基表面生长的细菌(如: 弯曲菌属). 我们的实验基本是在有氧条件进行的,那本菌为什么会生长呢? 我想有以下几种可能,供参考. (1)我们在临床实验室所使用的血液增菌培养基为美国BDBACTEC成人需氧增菌培养瓶,血培养系统为BACTEC9050全自动血培养系统. 这个全自动血培养系统每次可培养120个血液标本. 在发现这株菌前,我们并不知他对培养条件的要求,因此首先选用需氧培养. 结果是经24-48 h未见细菌生长,48 h后才见生长. 按照文献记载,弯曲菌生长速度不是缓慢型,通常经37 °C 18-24 h即可生长. 本菌经24-48 h未见细菌生长,48 h后才见生长,这是否与随着培养时间的增长,整个培养箱内氧的消耗逐渐加大(每次培养临床血标本都在50-100份),箱内氧的减少了,达到了本菌生长的基本要求有关? 有待于进一步探讨. (2)取阳性培养物无菌操作接种血平板,置于25、37、42 °C不同温度环境下需氧培养24-48 h,未见细菌生长;72 h后25、37 °C的血平板出现云雾状的生长物. 由于本菌不存在生长缓慢的特性,这是否也是与随着培养时间的增长,整个培养箱内氧的消耗逐渐加大,箱内氧的减少了,达到了本菌生长的基本要求有关? (3)我们的实验还表明,本菌经3-4次传代肉汤增菌培养后接种血平板,37 °C 24 h就可以出现云雾状而且沿接种线扩展生长,72 h后有部分形成

灰色单个菌落. 由此可看出,本菌的微嗜氧特性不是绝对的. 生活环境的改变,一部分不适应新的环境的细菌发生死亡,另一部分细菌为了生存,就要适应新的环境条件,这就是细菌的适应性变异. 细菌对环境等因素的适应性也是细菌生命活动的基本特性之一.

本菌株来自于结肠癌患者的血液,经BACTEC9050系统48 h显示阳性,初次分离血平板不生长,经2-3次传代肉汤增菌培养后接种于血平板,37 °C 24 h需氧环境下就可以出现云雾状而且沿接种线扩展生长的现象,培养72 h后部分形成灰色小菌落,培养时间和环境与资料要求的微需氧环境有所差别. 该血液阳性肉汤培养物直接涂片镜检,采用革兰染色最初未查到细菌,这很可能是与血液中的RBC碎片掩盖所致,或由于菌量少且沉于瓶底,取样时未取瓶底的样本所致. 而采用瑞氏染色和美蓝染色均发现有螺旋弯曲状杆菌. 因此我们认为, BACTEC9050系统报道阳性,取血液培养物涂片革兰染色镜检阴性时,需要进一步涂片做瑞氏染色和美蓝染色镜检为佳,以免漏检. 该菌株在血平板上,随着暴露空气时间的变化(1-7 d),其形态有较大的变化. 该菌株在15、42 °C环境中不生长,在25、37 °C环境中生长,生化反应与胎儿弯曲菌基本一致.

据文献报道,胎儿弯曲菌主要引起肠外感染. 其中胎儿亚种为主要的人类致病菌. 我们从一患结肠癌手术后进行化疗后出现高热的高龄患者血液中分离到本菌,说明胎儿弯曲菌与结肠癌的发生无直接因果关系. 菌血症和败血症的出现,很可能是由于患者高龄,肿瘤手术后又进行化疗,机体的免疫功能严重受损,胎儿弯曲菌趁机而入,借助于鞭毛和特异性外膜蛋白与肠上皮细胞结合,在肠上皮细胞内生长繁殖后入血,引起菌血症,细菌进一步在血液中大量繁殖并产生毒性产物引起全身性中毒症状(如高热,皮肤黏膜瘀斑等)出现败血症. 我们采用抗生素和改善免疫功能疗法收到了明显的疗效. 有关胎儿弯曲菌的致病性有待于进一步研究^[13,14].

4 参考文献

- 1 Monno R, Rendina M, Ceci G, Rizzo C, Luzzi I, Francavilla A, Rizzo G, Ierardi E. Campylobacter fetus bacteremia in an immunocompromised patient: case report and review of the literature. *New Microbiol* 2004; 27: 281-285
- 2 Glover SG, Smith CC, Reid TM, Khaund RR. Opportunistic Campylobacter bacteraemia in a patient with malignant histiocytic medullary

- reticulosis. *J Infect* 1982; 4: 175-177
- 3 Tilse MH, McAlister TV. Isolation of *Campylobacter* fetus from blood cultures. *Med J Aust* 1981; 2: 337-338
- 4 Longfield RN, Crane JM, Pasquale DN. *Campylobacter* fetus subsp jejuni bacteremia in diffuse lymphoma. *Mayo Clin Proc* 1981; 56: 582-583
- 5 Fick RB Jr, Isturiz R, Cadman EC. *Campylobacter* fetus septic arthritis: report of a case. *Yale J Biol Med* 1979; 52: 339-344
- 6 Krutchik AN, Velasquez W. *Campylobacter* fetus infection in a patient with Hodgkin's disease. *JAMA* 1977; 238: 1810-1811
- 7 杨小敏, 陈海. 新亚型胎儿弯曲菌引起败血症1例报道. *中国病原生物学杂志* 2008; 3: 79
- 8 李影林. *中华医学检验全书* (上卷). 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 1028-1034, 1574-1575
- 9 Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition. New York: Springer Science, 2005: 1148-1151
- 10 Kasten MJ, Allerberger F, Anhalt JP. *Campylobacter* bacteremia: clinical experience with three different blood culture systems at Mayo Clinic 1984-1990. *Infection* 1991; 19: 88-90
- 11 Lastovica AJ, Le Roux E, Penner JL. "*Campylobacter upsaliensis*" isolated from blood cultures of pediatric patients. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 657-659
- 12 Wang WL, Blaser MJ. Detection of pathogenic *Campylobacter* species in blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 709-714
- 13 Ohnita K, Isomoto H, Honda S, Wada A, Wen CY, Nishi Y, Mizuta Y, Hirayama T, Kohno S. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric inflammation in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1549-1553
- 14 Takatsu M, Ichiyama S, Nada T, Iinuma Y, Toyoda H, Fukuda Y, Nakashima N. *Campylobacter* fetus subsp. fetus cholecystitis in a patient with advanced hepatocellular carcinoma. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 197-198

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*)编辑委员会共计400人,全部为副教授及副主任医师以上。*WCJD*编委会审稿费结算工作于次年01-05开始。本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费费用,共计40 850元,数据以稿件审回日期为准。*WCJD*共计审稿1 418篇,其中送审专家377位,共计送审次数2 094次,成功审回次数1 634次,成功率78.03%。其中审稿次数排前三位的为:西安交通大学医学院第二附属医院感染科党双锁教授和福建医科大学附属协和医院消化内科王小众教授并列第一位,各17篇;南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位,16篇;中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位,各15篇。

*WCJD*编辑部感谢各位编委2009年对*WCJD*工作的支持,同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作。审稿费已经通过邮局汇款,如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差,请各位编委与编辑部联系,联系电话:010-85381892,联系人:李军亮。(编辑部主任:李军亮 2010-04-20)

国产、进口奥曲肽处理肿瘤治疗相关性腹泻138例

邱红, 熊慧华, 胡广原, 汪锐, 唐曦

■背景资料

在晚期结肠癌化疗的两项临床试验中, 化疗及放疗相关性腹泻是常见治疗不良反应, 常常导致患者抗肿瘤治疗中断, 严重时危及患者生命。控制和处理肿瘤治疗相关性腹泻具有重要意义, 而在有关晚期结肠癌化疗的两项临床试验中观察到较为严重的与IFL方案相关的腹泻反应使得临床对此更为重视。

邱红, 熊慧华, 胡广原, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科 湖北省武汉市 430030

汪锐, 武汉市第一医院肿瘤科 湖北省武汉市 430022

唐曦, 荆州市中心医院肿瘤科 湖北省荆州市 434020

作者贡献分布: 此治疗观察项目由邱红与胡广原设计; 病例选择由邱红、胡广原、熊慧华、汪锐及唐曦共同完成; 数据统计分析由邱红完成; 本论文写作由邱红与胡广原共同完成。

通讯作者: 胡广原, 副主任医师, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科。huguangyuan@medmail.com.cn

电话: 027-83663341

收稿日期: 2010-01-11 修回日期: 2010-04-06

接受日期: 2010-04-13 在线出版日期: 2010-05-08

Domestic versus imported octreotide in the treatment of acute diarrhea associated with anti-tumor therapy: an analysis of 138 cases

Hong Qiu, Hui-Hua Xiong, Guang-Yuan Hu, Rui Wang, Xi Tang

Hong Qiu, Hui-Hua Xiong, Guang-Yuan Hu, Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Rui Wang, Department of Oncology, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Xi Tang, Department of Oncology, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434020, Hubei Province, China

Correspondence to: Guang-Yuan Hu, Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. huguangyuan@medmail.com.cn

Received: 2010-01-11 Revised: 2010-04-06

Accepted: 2010-04-13 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To compare the efficacy of domestic and imported octreotide (Sandostatin) in the treatment of acute diarrhea associated with anti-tumor therapy.

METHODS: One hundred and thirty-eight patients with grade II or III diarrhea were enrolled into the study, of which 66 received Sandostatin treatment, and 72 were given domestic octreotide (100 µg, tid). Therapeutic efficacy was evaluated after a 3-day treatment.

RESULTS: No significant difference was noted in the complete remission rate of diarrhea between

patients treated with Sandostatin and domestic octreotide (75.8% vs 79.2%, $P > 0.05$). The doses of domestic octreotide used on days 2 and 3 were significantly higher than those of Sandostatin (both $P < 0.05$). The cost-effectiveness value for Sandostatin was significantly higher than that for domestic octreotide (1148.7 vs 507.3, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Domestic octreotide has equivalent efficacy and superior cost-effectiveness to Sandostatin in treating acute diarrhea associated with anti-tumor therapy. Increasing the dose of domestic octreotide is a reasonable choice in the management of grade III diarrhea.

Key Words: Anti-tumor therapy; Diarrhea; Octreotide

Qiu H, Xiong HH, Hu GY, Wang R, Tang X. Domestic versus imported octreotide in the treatment of acute diarrhea associated with anti-tumor therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1400-1403

摘要

目的: 分析国产奥曲肽(依普比善)及进口奥曲肽(善宁)治疗Ⅱ级以上肿瘤治疗相关性急性腹泻的疗效及药物经济学。

方法: 138例放疗及化疗相关性Ⅱ-Ⅲ级腹泻患者列入本观察研究, 66例接受善宁治疗、72例接受依普比善, 首剂均为100 µg, 皮下注射, tid, 连续治疗3 d后判断疗效。

结果: 善宁组腹泻完全缓解率为75.8%, 依普比善组为79.2%, 没有显著性差异。依普比善治疗Ⅲ级腹泻第2天及第3天用量剂量高于善宁组。善宁组治疗方案的成本效果分析值为1148.7, 依普比善组为507.3。

结论: 依普比善与善宁处理肿瘤治疗相关性腹泻方面疗效相当, 但依普比善更符合药物经济学原则。处理重度腹泻时提高依普比善剂量是合理选择, 且提高依普比善剂量并没有显著不良反应发生。

关键词: 肿瘤治疗; 急性腹泻; 奥曲肽

■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

邱红,熊慧华,胡广原,汪锐,唐曦. 国产、进口奥曲肽处理肿瘤治疗相关性腹泻138例. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1400-1403
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1400.asp>

0 引言

生长抑素对应的靶腺体包括脑组织、垂体、胰岛细胞、胃肠组织等,他作用于胃肠道组织时可抑制胃肠道的内外分泌功能、降低肠蠕动、增加离子及营养物质吸收、促进脉管收缩等功能^[1],最近研究认为生长抑素还可抑制细胞增殖,具有抗肿瘤作用^[2]. 奥曲肽与生长抑素受体2、6亚型高度亲和,生理效应与生长抑素类似,具有缓解腹泻、控制疼痛等作用. 与伊利替康联合5-FU及甲酰四氢叶酸(简称IFL)化疗方案相关的两项晚期结肠癌临床试验(N9741及C89803)报道了较高的急性腹泻相关死亡率,癌症治疗相关性腹泻得到越来越多的临床重视^[3]. 国外有多项研究表明:在治疗及预防化疗相关性腹泻方面,奥曲肽疗效明显优于洛哌丁胺及安慰剂^[4-6],目前国际姑息治疗委员会已将奥曲肽列为腹泻症状处理的基本用药. 国产醋酸奥曲肽(依普比善)在治疗食管胃底静脉曲张出血方面具有满意疗效^[7],我们在临床使用中发现依普比善治疗盆腔放疗相关性腹泻的疗效明显优于洛哌丁胺,不良反应低. 为比较依普比善与进口奥曲肽(善宁)在治疗肿瘤相关性腹泻方面的差异,本研究进行如下治疗观察,现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 根据美国NCI腹泻程度分级及肿瘤治疗相关性腹泻处理指南,138例具有生长抑素治疗指征的II及III级腹泻患者纳入本观察项目,根据指南其中II级腹泻患者合并下列症状之一,如肠绞痛、II级以上恶心呕吐、发热、白细胞下降、ECOG评分小于2. 出于伦理学考虑,IV级腹泻患者未纳入研究. 所有患者诊断均有病理学依据.

1.2 方法

1.2.1 治疗:发生抗肿瘤治疗相关性腹泻、且初诊医生判断无需进行静脉补液治疗的患者随机分入善宁治疗组及依普比善治疗组. 66例患者接受善宁治疗,72例患者接受依普比善治疗. 善宁及依普比善给药初始剂量为100 μg ,皮下注射,每隔8 h 1次. 给药第1天后观察腹泻如果保持不变或加剧,增加药物剂量为200 μg ,皮下注射,每隔8 h 1次;增加剂量给药24 h后,症状没有改善或加剧,则增加药物剂量300 μg ,皮下注射,每

隔8 h 1次. 所有患者根据相关检查给予对应症状处理措施及饮食指导,治疗期间密切观察患者体征及症状. 如果患者腹泻发生在抗肿瘤治疗期间,经高年资医师判断该患者是否需要停止抗肿瘤治疗以及是否需要输液治疗.

1.2.2 有效性判断:每隔24 h对患者进行一次腹泻症状评估. 治疗3 d后,如恢复平常大便次数或大便增加次数为1-2次/d,认为腹泻完全缓解. 如果未达以上标准,认为治疗失败. 记录两组患者抗肿瘤治疗停止天数以及需要输液治疗情况.

1.2.3 药效经济学分析:成本-效果分析是应用成本与效果的比值表示每获得一份效果所需要的净成本. 记录两组生长抑素用量及费用成本,采用成本-效果分析方法来表示药物治疗成本效果分析.

统计学处理 用mean \pm SD表示定量数据,采用SPSS13.0软件的两独立样本 t 检验进行均值比较分析;分类数据用SPSS13.0进行 χ^2 检验分析. 显著性差异水平为 $P<0.05$.

2 结果

2.1 两组患者一般情况统计 两组年龄、性别、诊断、抗肿瘤治疗方式、KPS评分、腹泻程度方面没有显著性差异,具有可比性(表1).

2.2 两组治疗效果比较 两组在腹泻缓解率及是否需要输液治疗方面没有显著性差异,疗效相当(表2). 善宁组共有37例患者的腹泻症状发生在抗肿瘤治疗进行中,其中有32例(86.5%)患者因腹泻中止治疗,依普比善组对应别为51例及41例(80.4%),两组因腹泻抗肿瘤治疗中止情况没有差异($P=0.453$). 图1散点图分析显示两组抗肿瘤治疗中止持续时间无差异($P=0.276$).

2.3 两组用药剂量及药物经济学比较 II级腹泻两组所有日均单次用量均为100 μg ,单次花费善宁组为135.0元,依普比善组为49.6元. III级腹泻治疗后缓解患者两组日均单次用药剂量见图2,依普比善用量在第2及第3天均高于善宁组,统计学有显著性差异. 善宁组治疗方案的成本效果分析值为1148.7,而依普比善组为507.3,提示国产醋酸奥曲肽治疗更符合药效经济学.

2.4 不良反应观察 善宁组头晕1例,注射部位疼痛2例;依普比善组头晕3例,注射部位疼痛4例,注射后腹部不适感为3例. 所有不良反应均为轻度,未影响患者治疗.

3 讨论

肠隐窝未分化细胞增殖池不断补充脱落的肠表

■研发前沿

目前常用的腹泻治疗方法在处理肿瘤治疗相关性腹泻中有效率并不理想,而生长抑素在腹泻方面的治疗应用逐步得到关注和研究,尤其是在重度腹泻、恶性肠梗阻方面显示了其治疗优势. 摸索生长抑素在国人中的最佳用药剂量仍然需要较多研究和探索.

■相关报道

国外关于生长抑素在处理肿瘤治疗相关性腹泻的前瞻性随机临床试验证实了该药对比洛哌丁胺及安慰剂的优势,目前生长抑素治疗已经被列为国际姑息治疗腹泻治疗的基本用药. 在化疗相关性腹泻处理指南中也指出生长抑素是中重度腹泻的标准用药.

■创新盘点

本研究在国内首次比较了国产奥曲肽与进口奥曲肽处理肿瘤治疗相关性腹泻的疗效,并能够指出国产奥曲肽在重度腹泻治疗上的不足之处。

表 1 两组患者一般情况统计

分组	善宁组	依普比善组	P值
年龄(岁)	48.3±9.3	47.9±7.5	0.764
性别n(%)			
男	37(56.1)	35(48.6)	0.399
女	29(43.9)	37(51.4)	
病理诊断n(%)			
膀胱癌	1(1.5)	0(0.0)	0.744
原发灶不明转移癌	1(1.5)	0(0.0)	
肺癌	10(15.2)	10(13.9)	
宫颈癌	9(13.6)	11(15.3)	
结肠癌	7(10.6)	10(13.9)	
淋巴瘤	2(3.0)	3(4.2)	
前列腺癌	3(4.5)	4(5.5)	
食管癌	4(6.1)	4(5.5)	
胃癌	14(21.2)	8(11.1)	
直肠癌	11(16.7)	15(20.8)	
子宫内膜癌	4(6.1)	6(8.3)	
恶性黑色素瘤	0(0.0)	1(1.4)	
KPS评分	79.2±5.3	79.8±4.9	0.479
抗肿瘤治疗方式n(%)			
放疗	11(16.7)	19(26.4)	0.363
同步放化疗	11(16.7)	12(16.7)	
化疗	44(66.6)	41(56.9)	
腹泻程度分级n(%)			
Ⅱ级	35(53.0)	27(37.5)	0.087
Ⅲ级	31(47.0)	45(62.5)	

面上皮细胞,该细胞对化疗及放射线尤为敏感,肠上皮再生受损及毛细血管渗出可影响黏膜屏障功能,肠吸收功能下降,导致水样腹泻。伊立替康活性代谢产物SN38直接作用于肠黏膜上皮细胞的拓扑异构酶-Ⅰ,引起DNA双链断裂,细胞死亡,导致肠结构和功能的改变。腹泻是伊立替康等化疗药物常见不良反应,化疗相关性腹泻发生率可高达82%,其中1/3可为Ⅲ、Ⅳ级重度腹泻^[8]。盆腔放疗中以腹绞痛及腹泻为特征的急性放射性肠炎发生率为50%左右,前列腺癌调强放射治疗腹泻的发生率仍可达36.7%,同步放化疗时放疗相关性腹泻的发生率更高,有报道可达80%以上^[9]。长期腹泻除导致电解质紊乱等并发症外,还常迫使化疗药物减量、放射治疗中断,影响抗肿瘤治疗效果。

癌症治疗相关性腹泻的治疗方法包括补液、预防性使用抗生素、止泻等,其中洛哌丁胺是急性腹泻治疗标准用药,但有效率并不高。奥曲肽具有抑制肠蠕动、减少肠分泌作用,已经被国际姑息治疗协会列为姑息治疗基本药物,关于长效奥曲肽治疗的一些临床试验也在

表 2 两组疗效分析

分组	善宁组	依普比善组	P值
腹泻缓解率n(%)			
Ⅱ级	是 28(80.0)	24(91.9)	0.552
	否 7(20.0)	3(11.1)	
Ⅲ级	是 22(71.0)	33(73.3)	0.821
	否 9(29.0)	12(26.7)	
总有效率	50(75.8)	57(79.2)	0.632
需要输液治疗n(%)			
是	42(63.6)	49(68.1)	0.584
否	24(36.4)	23(31.9)	

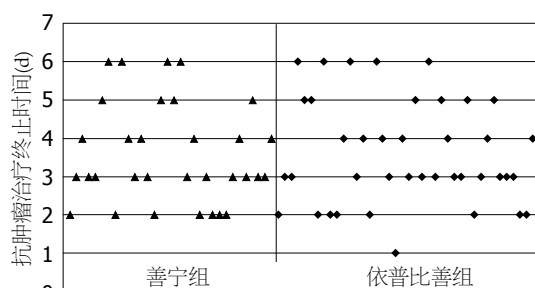


图 1 抗肿瘤治疗中发生腹泻导致治疗中止时间分析。善宁组32例,依普比善组42例。

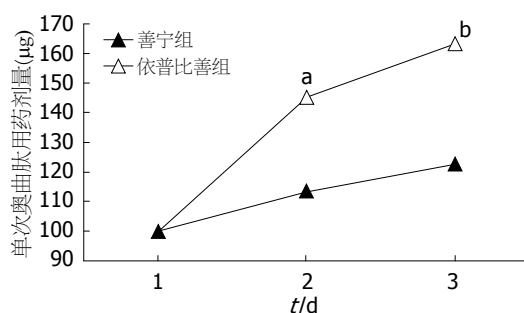


图 2 两组Ⅲ级腹泻用药调整剂量比较: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 善宁组。

进行中。国外研究表明善宁治疗化疗相关性腹泻有效率可达85%以上^[4-6],刘东屏等报道善宁治疗肠道菌群失调致腹泻的3及7 d有效率分别为37.5%和78.1%^[10],邱冬等采用善宁治疗常规治疗无效的化疗难治性腹泻的3 d有效率为84.7%^[11]。在本研究中,善宁及国产醋酸奥曲肽(依普比善)治疗化疗放疗相关性腹泻的总有效率分别为75.8%及79.2%,两组没有显著性差异,两组患者需要输液支持对症治疗的比例也没有明显差异,抗肿瘤治疗中止持续时间类似,显示依普比善与善宁疗效相当。需要指出的是善宁组及依普比善组腹泻治疗的3 d有效率均略低于部分国内及国外报道的85%以上,其原因可能是

■应用要点

国产醋酸奥曲肽(依普比善)在处理肿瘤治疗相关性急性腹泻更符合药物经济学原则,可推荐用于化疗放疗相关性急性腹泻的处理。

由于参与此研究的部分患者止泻治疗期间仍然持续进行抗肿瘤治疗, 某种程度上影响了奥曲肽的3 d治疗效果评价。

虽然善宁与依普比善疗效相当, 但根据腹泻程度的分层分析仍然可以看到两组在用药剂量的调整方面的部分差异。两组在Ⅱ级腹泻的用药方面, 日均单次100 μg的用量均可以达到满意控制效果。Ⅲ级腹泻的处理虽然疗效相当, 但是依普比善组第2及第3天的调整剂量高于善宁组, 具有显著性差异。根据此结果我们认为, 采用依普比善处理较重腹泻时, 为了获得更迅速的腹泻控制率, 初期即提高依普比善剂量似乎是较合理选择, 而且在本研究中我们没有观察到提高依普比善剂量后有严重不良反应发生。

成本和效果是药物经济学研究的两大要素, 药物经济学分析类型有成本-效果分析、成本-效用分析、成本-效益分析等。成本-效果分析是应用成本与效果的比值以表示每获得一份效果所需要的净成本, 在医学方面有广泛应用, 是目前医院药物经济学研究中最常用的方法。成本-效果分析常用计算成本-效果比和计算增量成本-效果比两种方法。根据本次调查原始资料进行的成本-效果分析法显示, 以腹泻缓解作为疗效指标时, 获得同等治疗疗效的前提下, 依普比善组费用较低, 其成本效果分析值仅为善宁组的50%左右。因此从降低医疗费用角度考虑, 依普比善比善宁具有优势。

皮下注射奥曲肽的不良反应包括头痛(6%)、头晕(5%)、恶性呕吐(5%-10%)以及注射部位疼痛(7.7%)^[12]等。善宁组及依普比善组患者, 出现了头晕、注射部位疼痛、腹部不适等症状, 但这些不良反应发生率相对较低, 且都为轻度, 不影响患者治疗, 提示皮下注射两种治疗方案的安全性较好。

总之, 依普比善在处理肿瘤治疗相关性急性腹泻方面疗效与善宁相当, 更符合药物经济学

原则, 可推荐用于化放疗相关急性腹泻的处理。与肿瘤治疗相关性腹泻治疗指南推荐的善宁基本用量相比, 使用依普比善在处理Ⅲ级以上腹泻时, 提高药物剂量可能更为合理。

4 参考文献

- 1 Reichlin S. Somatostatin and its receptor. Introduction. *Ciba Found Symp* 1995; 190: 1-6
- 2 Prommer EE. Established and potential therapeutic applications of octreotide in palliative care. *Support Care Cancer* 2008; 16: 1117-1123
- 3 Ashley AC, Sargent DJ, Alberts SR, Grothey A, Campbell ME, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Goldberg RM. Updated efficacy and toxicity analysis of irinotecan and oxaliplatin (IROX) : intergroup trial N9741 in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2007; 110: 670-677
- 4 Cascinu S, Fedeli A, Fedeli SL, Catalano G. Octreotide versus loperamide in the treatment of fluorouracil-induced diarrhea: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1993; 11: 148-151
- 5 Barbounis V, Koumakis G, Vassilomanolakis M, Demiri M, Efremidis AP. Control of irinotecan-induced diarrhea by octreotide after loperamide failure. *Support Care Cancer* 2001; 9: 258-260
- 6 Cascinu S, Fedeli A, Fedeli SL, Catalano G. Control of chemotherapy-induced diarrhea with octreotide. A randomized trial with placebo in patients receiving cisplatin. *Oncology* 1994; 51: 70-73
- 7 吴胡明, 马小董, 沈志浩. 依普比善治疗食管胃底静脉曲张破裂出血的临床分析. *浙江临床医学* 2007; 9: 230
- 8 Maroun JA, Anthony LB, Blais N, Burkes R, Dowden SD, Dranitsaris G, Samson B, Shah A, Thirlwell MP, Vincent MD, Wong R. Prevention and management of chemotherapy-induced diarrhea in patients with colorectal cancer: a consensus statement by the Canadian Working Group on Chemotherapy-Induced Diarrhea. *Curr Oncol* 2007; 14: 13-20
- 9 Sanguineti G, Endres EJ, Parker BC, Bicquart C, Little M, Chen G, Berilgen J. Acute toxicity of whole-pelvis IMRT in 87 patients with localized prostate cancer. *Acta Oncol* 2008; 47: 301-310
- 10 刘东屏, 贺庆娟, 孙明军. 生长抑素善宁治疗肠道菌群失调致腹泻32例疗效分析. *中国医师杂志* 2008; 10: 971-972
- 11 邱冬, 李杭, 陈南江. 善宁治疗严重化疗相关性腹泻的疗效观察. *肿瘤基础与临床* 2007; 20: 340-341
- 12 Petersenn S. Efficacy and limits of somatostatin analogs. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 53-57

■名词解释

成本-效果分析: 药物经济学常用的一个考核指标, 通过应用成本与效果的比值表示每获得一份效果所需要的净成本, 在医学方面有广泛应用, 常用计算成本-效果比和计算增量成本-效果比两种方法。

■同行评价

本文选题尚可, 有较好的临床参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)》是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《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期刊(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》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究

报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录。2008年度《世界华人消化杂志》总被引频次为2480, 位居内科学类41种期刊的第6位; 影响因子为0.547, 位居内科医学类41种期刊的第17位。《世界华人消化杂志》即年指标0.059, 他引率0.79, 地区分布数29, 基金论文比0.340, 国际论文比0.00, 学科影响指标0.59, 综合评价总分49.5, 位居内科学类41种期刊的第8位。

1.2 栏目 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。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 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.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能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} , Vd, $T_{1/2}$ 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.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 1×10^{12} /L, WBC数用 1×10^9 /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/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 × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·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乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2009年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-85381901, 传真: 010-85381893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 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 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000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 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \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 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \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 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 1000 , 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1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 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.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念 and 设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 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.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 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。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

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。

作者 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”。

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

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

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. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300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)。

3.11 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。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 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。

1 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。

2 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。

3 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, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 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

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262。

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[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。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID和DOI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。参考文献格式如下:

- 1 Jung EM, Clevert DA, Schreyer AG, Schmitt S, Rennert J, Kubale R, Feuerbach S, Jung F. Evaluation of quantitative contrast harmonic imaging to assess malignancy of liver tumors: A prospective controlled two-center study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6356-6364 [PMID: 18081224; DOI: 10.3748/wjg.13.6356]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

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

4 投稿方式

接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在

线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

5 修回稿须知

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

5.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回,所造成的问题由作者承担责任。

5.3 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。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-8538-1892
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2010年国内国际会议预告

2010-05-13/16

第四届MDCA肿瘤分子靶向及个体化医疗高峰论坛

会议地点: 北京市

联系方式: 010-58430577

2010-05-13/15

第五届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 南京市

联系方式: office@cnsld.org

2010-05-14/16

2010第四届中华消化病学年度讲坛

会议地点: 北京市

联系方式: cma_spd@yahoo.com

2010-05-28/31

2010中国普外科焦点问题学术论坛

会议地点: 兰州市

联系方式: 2010fis@gmail.com

2010-06-04/06

2010国际腹部创伤暨第十届全国脾脏外科学术研讨会

会议地点: 合肥市

联系方式: qiaohaiquan2008@yahoo.com.cn

2010-06-04/06

第二届世纪坛国际结直肠肛门病论坛

会议地点: 北京市

联系方式: luoch301@gmail.com; luoch301@gmail.com

2010-06-17/21

2010年全国肝脏疾病临床学术大会暨欧洲肝病学会日

会议地点: 厦门市

联系方式: zhgz@vip.163.com

2010-08-18/21

第二十一届世界癌症大会

会议地点: 深圳市

联系方式: bgs@caca.sina.net

2010-08-19/22

第二十二次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: szzyy88@163.com

2010-09-01

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: <http://www.csge.org.cn/2010/>

2010-09-01

第二次肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 太原市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2010-09-08/12

第九届全国介入放射学学术大会

会议地点: 广州市

联系方式: csir2010@163.com

2010-09-09/11

中华医学会第十一次全国感染病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: infectioncma@163.com

2010-09-10/12

第四届国际肝病学会年会

会议地点: 加拿大, 蒙特利尔

联系方式: info@ilca-online.org

2010-09-16/19

第十三届全国临床肿瘤学大会暨2010年CSCO学术年会

会议地点: 北京市

联系方式: <http://reg.cSCO.org.cn/reg2010/>

2010-10-23/27

第十八届欧盟胃肠病周

会议地点: 西班牙, 巴塞罗那

联系方式: <http://uegw10.uegf.org/>

2010-10-28/30

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

yjliu@cma.org.cn

2010-11-17/20

中华医学会糖尿病学分会第十四次全国学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: fredfeng@cma.org.cn

2010-11-18/21

第十四届全国胆道外科学术会议暨2010中国国际肝胆外科论坛

会议地点: 上海市

联系方式: ncbs_cifhbs@126.com

2010-12-26/30

肝胆疾病-肝功能衰竭治疗新理念

会议地点: 南京市

联系方式: 025-83106666-66866

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈洪 副教授

东南大学附属中大医院消化科

陈建杰 主任医师

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

范建高 教授

上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

范学工 教授

中南大学湘雅医院感染病科

傅春彬 主任医师

吉化集团公司总医院一院消化内科

傅红 副教授

上海复旦大学肿瘤医院肿瘤外科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

关玉盘 教授

首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

何裕隆 教授

中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

莫卫东 副教授

安徽省立医院肝脏外科

蓝宇 教授

北京积水潭医院消化科

李增山 副教授

中国人民解放军第四军医大学病理教研室

刘正稳 教授

西安交通大学医学院第一附属医院感染科

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

潘秀珍 教授

福建省立医院消化内科

沈柏用 副教授

上海市交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

彭吉润 主任医师

北京大学人民医院肝胆外科中心

孙殿兴 主任医师

白求恩国际和平医院肝病科

田宇彬 教授

青岛大学医学院附属医院消化内科

王承党 副教授

福建医科大学附属第一医院消化内科

吴君 主任医师

贵阳医学院附属医院感染科

杨建民 教授

浙江省人民医院消化内科

姚登福 教授

南通大学附属医院分子医学中心

喻荣彬 副教授

南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

周士胜 教授

大连大学医学院医学研究中心

周晓东 副教授

南昌大学第一附属医院消化内科

庄林 主任医师

昆明市第三人民医院肝病科