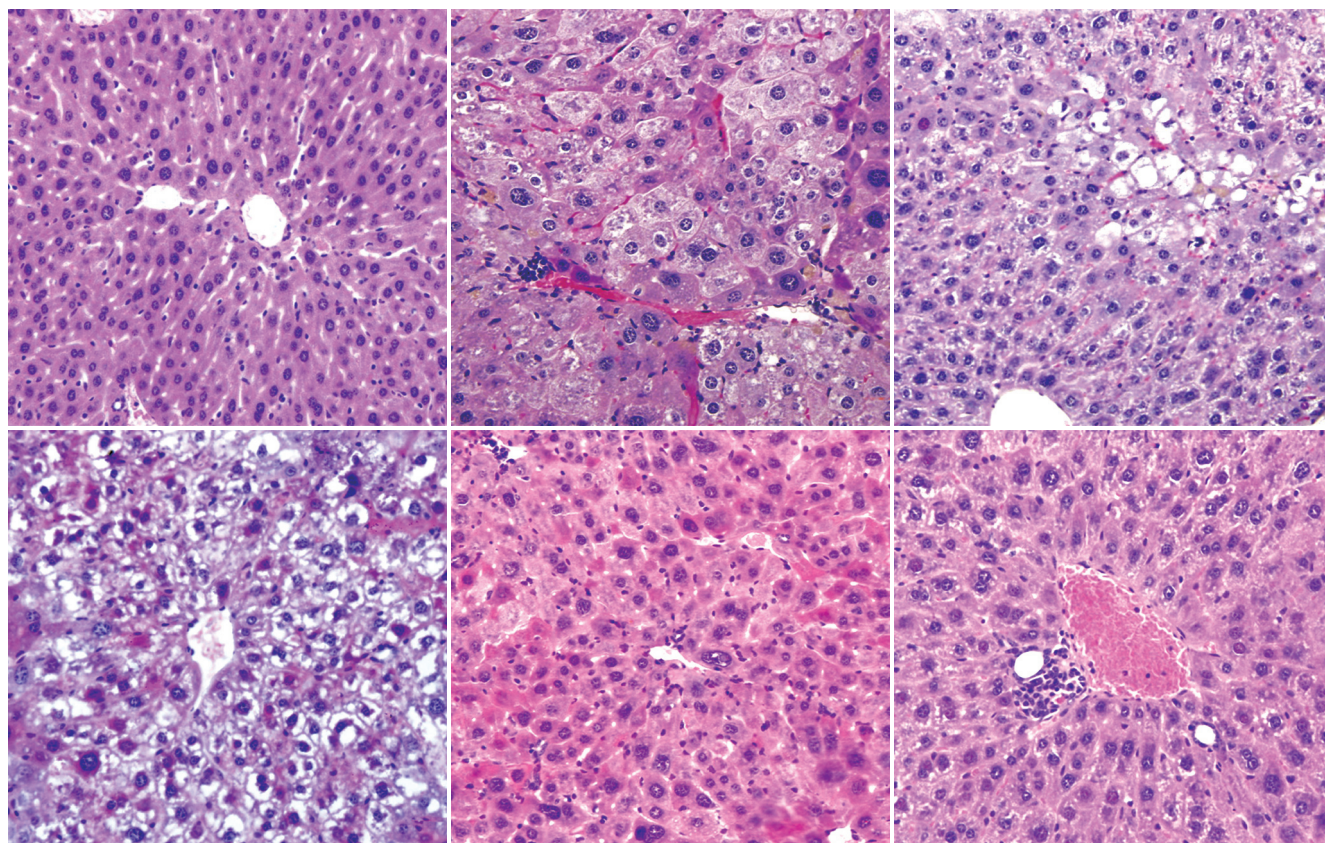


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 2 月 28 日 第 16 卷 第 6 期 (Volume 16 Number 6)



6 / 2008

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》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》，俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

房殿春教授
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

成军教授
程英升副教授
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
白文元教授
苒新明教授
陈洪副教授
陈尼维主任医师
陈其奎教授

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

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

张吉翔教授
张集昌主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
代文杰教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
龚建平教授
巩鹏副教授

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

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

消化感染病学

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

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

消化中医药学

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

消化肿瘤学

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

消化影像学

程红岩教授
韩新巍教授
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
杨建勇教授

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
范志宁主任医师
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授
刘鲁明教授
唐文富主治医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员

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

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2008 年 2 月 28 日 第 16 卷 第 6 期 (总第230期)

述 评

- 571 胃癌综合治疗现状与进展
陈凜, 李涛

基础 研究

- 575 PI3K/Akt/p27kip1通道介导胃癌细胞对阿霉素、足叶乙甙化疗的耐药性及其机制
张利, 于红刚, 于皆平, 罗和生
- 582 植物药洪天肝康防治小鼠肝硬化的药效
杨锐华, 许晴, 乔岩岩, 贾洪章, 史小林
- 590 小鼠胰腺腺泡细胞系MPC-83中功能性G蛋白偶联受体的缺失
程海立, 王琳, 崔宗杰
- 596 MAdCAM-1及NF- κ B在小鼠恶唑酮结肠炎中的表达及一氧化氮供体的干预作用
张丽航, 欧阳钦
- 602 PRL-3真核绿色荧光蛋白表达载体的构建及其在结肠癌SW480细胞中的表达
柳玉红, 李建明, 周军, 丁彦青
- 607 红霉素和阿齐霉素对大鼠胃肠感觉传入的影响
肖刚, 李静, 邓丽君, 陆杰
- 613 兔肝VX2瘤活体二维多体素 ^1H -MRS的成像技术
颜荣华, 肖恩华, 梁斌
- 621 新型核苷类似物 β -L-D4A对人DNA聚合酶 β 和 δ 的作用及其机制
李岩, 林菊生, 张颖慧, 王晓燕, 何星星, 汪鸿, 高玲玲

临 床 研 究

- 629 配对胃癌组织中S100A4的表达
黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 王卫华, 王孟薇
- 635 白介素6基因启动子-572C/G多态性与非酒精性脂肪肝炎的关系
马瑞宏, 黄颖秋
- 640 肝移植患者血清中S-100 β 蛋白浓度变化及机制
龙波, 李妍, 陈卫民

文 献 综 述

- 645 MicroRNA与HBV相关性肝癌发生发展关系的研究进展
黄金明, 叶进, 陈立波
- 653 肝源性胰岛素抵抗的研究进展
黄涛, 秦波
- 658 骨髓干细胞定向分化为肝样细胞的研究进展
刘志锋, 行治国, 丁亚楠, 陈强, 潘兴华

研 究 快 报

- 663 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜NF- κ B DNA结合活性的作用
李红, 杜群, 王汝俊, 王文君, 李燕舞, 巫燕莉
- 667 激光诱导大鼠大肠早癌组织自体荧光光谱特征
黄秋林, 张阳德

临 床 经 验

- 671 卡培他滨联合甲酰四氢叶酸钙和奥沙利铂治疗进展期胃癌28例
殷国建, 王少峰, 兰康华, 沈琼
- 675 功能性胃肠病的腹痛分型、鉴别诊断与罗马Ⅲ诊断标准的应用
廖常奎, 王佩秋

病例报告	680 双胎妊娠合并急性脂肪肝1例 徐亚丽 682 胰源性门脉高压伴乳糜腹水1例 郭佳, 黄宗文
致谢	684 致谢世界华人消化杂志编委
消息	574 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 589 欢迎订阅2008年《世界华人消化杂志》 601 世界华人消化杂志个性化服务订购活动 620 山西省对世界华人消化杂志编辑标准质量评估的结果(2007) 628 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知 634 <i>WCJD</i> 和 <i>WJG</i> 2008年对同行评议实行公开策略 639 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版 644 <i>WCJD</i> 和 <i>WJG</i> 2008年对作者贡献分布开始实行公开策略 652 《世界华人消化杂志》简介 657 世界华人消化杂志的同行评价 674 中国学术期刊综合引证报告(2007) 679 世界华人消化杂志作者修改稿增加科学新闻稿的内容 681 世界华人消化杂志在线办公系统 683 <i>WCJD</i> 和 <i>WJG</i> 开始实行网络版文章与该文章发表前纪录的链接
封面故事	杨锐华, 许晴, 乔岩岩, 贾洪章, 史小林. 植物药洪天肝康防治小鼠肝硬化的药效. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 582-589 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/582.asp
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 程剑侠; 英文编辑 王先林; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

<div>  <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创刊 1993-01-15 改刊 1998-01-25 出版 2008-02-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总编辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期刊名称 世界华人消化杂志 主管单位 山西省科学技术厅 主办单位 太原消化病研治中心</p> </div>		<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志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》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2008年版权归世界华人消化杂志所有</p>
中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R		邮发代号 82-262 国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元 广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

February 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 6

EDITORIAL	571 Advances in treatment of gastric cancer <i>Chen L, Li T</i>
BASIC RESEARCH	<p>575 PI3K/Akt/p27kip1 pathway mediates chemoresistance to Etoposide and Doxorubicin in gastric carcinoma cell line BGC-823 and its mechanism <i>Zhang L, Yu HG, Yu JP, Luo HS</i></p> <p>582 Experimental study of herbal-based medicine Hong Tian Gan Kang on the intervention and therapy for hepatic cirrhosis <i>Yang RH, Xu Q, Qiao YY, Jia HZ, Shi XL</i></p> <p>590 Complete loss of functional G protein-coupled receptors in mouse pancreatic acinar cell MPC-83 <i>Cheng HL, Wang L, Cui ZJ</i></p> <p>596 Expression of MAdCAM-1 and nuclear factor kappa B and the intervention effect of nitric oxide donor in oxazolone-induced colitis <i>Zhang LH, Ouyang Q</i></p> <p>602 Construction of pEGFP-N1-PRL-3 vector and its expression in SW480 cells <i>Liu YH, Li JM, Zhou J, Ding YQ</i></p> <p>607 Effect of erythromycin and azithromycin on sensation afferent nerve functions of gastrointestinal tract in rats <i>Xiao G, Li J, Deng LJ, Lu J</i></p> <p>613 Technology of <i>in vivo</i> two-dimension multi-voxel ^1H magnetic resonance spectroscopy for rabbit liver VX2 tumor <i>Yan RH, Xiao EH, Liang B</i></p> <p>621 Effect of β-L-D4A on human DNA polymerases β and δ and its mechanism <i>Li Y, Lin JS, Zhang YH, Wang XY, He XX, Wang H, Gao LL</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>629 S100A4 gene expression in matched gastric cancer samples <i>Huang HL, Wu BY, You WD, Wang WH, Wang MW</i></p> <p>635 C/G homozygotes of interleukin-6 single nucleotide polymorphism at -572 are associated with nonalcoholic steatohepatitis <i>Ma RH, Huang YQ</i></p> <p>640 Changes of serum S-100β protein concentration in patients with original liver transplantation and its possible mechanism <i>Long B, Li Y, Chen WM</i></p>
REVIEW	<p>645 Advances in research of microRNA- and HBV-related liver cancer <i>Huang JM, Ye J, Chen LB</i></p> <p>653 Progress in hepatogenous insulin-resistance <i>Huang T, Qin B</i></p> <p>658 Research progress in directional differentiation from bone marrow stem cells into hepatocyte-like cells <i>Liu ZF, Xing ZG, Ding YN, Chen Q, Pan XH</i></p>
RAPID COMMUNICATION	663 Effect of Kuijieling Decoction on DNA binding activity of NF- κ B in colonic mucosa of rat ulcerative colitis model

	<p><i>Li H, Du Q, Wang RJ, Wang WJ, Li YW, Wu YL</i></p> <p>667 Characteristics of laser-induced autofluorescence spectra in early colorectal carcinoma <i>Huang QL, Zhang YD</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>671 Capecitabine in combination with leucovorin and oxaliplatin as adjuvant chemotherapy in the treatment of advanced gastric cancer <i>Yin GJ, Wang SF, Lan KH, Shen Q</i></p> <p>675 Application of Rome III criteria in typing and differential diagnosis of abdominal pain of functional gastrointestinal disorders <i>Liao CK, Wang PQ</i></p>
CASE REPORT	<p>680 Twin pregnancy complicated with acute fatty liver: one-case analysis <i>Xu YL</i></p> <p>682 One-case analysis for eportal hypertension with pancreatic chylous ascites <i>Guo J, Huang ZW</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>683 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Yang RH, Xu Q, Qiao YY, Jia HZ, Shi XL.</i> Experimental study of herbal-based medicine Hong Tian Gan Kang on the intervention and therapy for hepatic cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(6): 582-589 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/582.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jian-Xia Cheng</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jian-Xia Cheng</i> English Language Editor: <i>Xian-Lin Wang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date February 28, 2008

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR
Taiyuan Research and Treatment Center
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING
Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wcjdnet.com

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
Director: Hai-Ning Zhang

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

胃癌综合治疗现状与进展

陈凇, 李涛

陈凇, 李涛, 中国人民解放军总医院普通外科 北京市 100853
陈凇, 教授, 主要从事胃肠道肿瘤外科研究.

通讯作者: 陈凇, 100853, 北京市复兴路28号, 解放军总医院普通外科. chenlinbj@vip.sina.com
电话: 010-66937846

收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2008-01-23

Advances in treatment of gastric cancer

Lin Chen, Tao Li

Lin Chen, Tao Li, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. chenlinbj@vip.sina.com
Received: 2007-05-18 Revised: 2008-01-23

Abstract

Surgery is the first choice of treatment for gastric cancer. The development of micro-invasive surgery brings new challenges to gastric cancer therapy. The limited data indicate that laparoscopy operation can achieve the same therapeutic efficacy as laparotomy. New adjuvant chemotherapy contributes to the removal of stage IIIb or IV gastric cancer. Abdominal cavity heat therapy for gastric cancer has also achieved rather satisfactory therapeutic results. Study on microcosmic field of gastric cancer will provide more data on early diagnosis and treatment of gastric cancer. No standard treatment modalities for gastric cancer are available, though there are many. Therefore, further study is needed.

Key Words: Gastric cancer; Surgery; Chemotherapy

Chen L, Li T. Advances in treatment of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 571-574

摘要

手术是胃癌治疗的首选方式, 目前比较统一的观点是将D2手术作为标准的手术方式. 微创技术的发展为胃癌手术带来了新的挑战, 目前有限的资料证实腹腔镜胃癌手术可以达到开

腹手术相同的治疗效果. 新辅助化疗为部分IIIb或IV期胃癌患者提供了可以切除的机会. 腹腔热疗也逐步取得了良好的治疗效果. 对于胃癌微观领域的研究将为其早期诊断和治疗提供更多的依据. 目前胃癌治疗方法多种多样, 尚无统一标准, 需要深入研究.

关键词: 胃肿瘤; 手术; 化疗

陈凇, 李涛. 胃癌综合治疗现状与进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 571-574

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/571.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内发病率仅次于肺癌, 位居第二位. 我国每年胃癌发病率约为60/10万, 死亡率约为30/10万, 位居所有恶性肿瘤死亡第一位. 与日本等发达国家相比, 我国胃癌患者多数在就诊时已处于进展期, 早期胃癌所占比例不足10%^[1]. 近些年来, 对进展期胃癌治疗的重点是强调根治性手术的规范性及相关辅助治疗的合理性, 目前对进展期胃癌的治疗仍然没有达到理想的效果. 因此充分了解目前国内外胃癌治疗方法的特点、进展; 总结经验教训, 扬其所长, 发挥协调、互补、共进作用, 以期提高疗效.

1 外科治疗是胃癌综合治疗的基础

1.1 规范化分期 规范胃癌的分期是实施胃癌根治术和评价手术疗效的基础. UICC和AJCC修订的TNM分期, 是目前国际上应用较为广泛的分期方法. 其中淋巴结的分期主要是根据淋巴结的转移枚数. 优点是简便、合理、容易推广; 缺点是未规定淋巴结检查总数和每枚淋巴结切片数. JRS GC 1999年修订的13版胃癌淋巴结分站是国际上另外一种主要的分期方法, 已经被包括我国在内的很多国家所采用. 此方法对于指导胃癌外科手术过程中进行准确的淋巴结清扫提供了重要依据. 许多研究资料表明JRS GC淋巴分组系统对于指导胃癌手术有很大帮助, 而TNM分期有

■背景资料

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 且多数患者就诊时处于进展期, 早期胃癌所占比例不足10%. 对进展期胃癌治疗的重点是强调根治性手术的规范性及相关辅助治疗的合理性, 但仍然没有达到理想的效果. 因此充分总结目前国内外胃癌治疗的经验和教训, 以期提高胃癌治疗效果.

■同行评议者

宋于刚, 教授, 南方医科大学南方医院消化内科研究所

■研发前沿

手术是胃癌治疗的首选方式。目前国内外多数学者统一的观点是将D2手术作为标准的手术方式。微创技术的发展为胃癌手术带来了新的挑战,目前有限的资料证实腹腔镜胃癌手术可以达到开腹手术相同的治疗效果。新辅助化疗为部分Ⅲb或Ⅳ期胃癌患者提供了可以切除的机会。腹腔镜治疗也逐步取得了良好的治疗效果。对于胃癌微观领域的研究将为其早期诊断和治疗提供更多的依据。

助于指导术后治疗。

1.2 胃癌手术的争议性问题 长期以来,针对胃癌究竟行D2清除术还是D1清除术一直是东、西方学者存在争议的问题。近十年来,经过东、西方学者的反复论证,目前已经比较统一的观点是进展期胃癌行D2手术作为标准术式。(1)D2适用证: T1癌肿直径大于2.0 cm、N1(+)者和原发癌为T2-T3、淋巴结转移为N0-N2(+)者,术前、术中检查无远处转移者。但是对于N2(+)及N2以上(+)胃癌手术方式主要有D2(+)和D3两种,目前观点不一致。T3(癌侵及浆膜或穿透浆膜)是临床上比较常见的胃癌。Ahmad *et al*^[2]报导了T3胃癌59例,结果发现只有Ⅱ期(T3N0)、ⅢB期(T3N1)时行D2清除术能明显改善生存率,比ⅢB期(T3N2)、Ⅳ期疗效明显为佳。后者可行D3或姑息性切除术。(2)JRS GC 13版建议对于胃癌开腹手术者,应检查腹腔脱落癌细胞,如发现CY1(+)或P1(+)者乃属Ⅳ期,已不适宜行根治手术。(3)术中检查怀疑N2(+),应冰冻切片检查No.9、16a侧方淋巴结,确定行标准根治术或者扩大淋巴结清除术。(4)缩小还是扩大手术:目前认为胃黏膜内癌(m)或者部分黏膜下癌(sm)可缩小胃切除范围与淋巴结清除范围,但前提是术前对癌浸润深度(m, sm)、类型、大小有准确的判断,术后病理学方面检查标本水平缘检查水平缘LM(lateral margin),与垂直缘(黏膜下层切除断端)VM(vertical margin)有无残留癌,并将切除标本间隔2 mm切片做详尽的病理学检查,术后密切随诊。扩大根治术是癌或转移灶侵及胃周脏器(T4),或淋巴结转移已达N2远,尚能行根治切除(B级),而施行的联合脏器切除和(或)的D2以上淋巴结清除术。此类手术侵袭较大,技术操作有一定的难度,根治性较低(B级),疗效不甚理想。因此建议此类手术应在大医院由经验丰富的胃癌外科专家实施,严格掌握手术适应证,防止过度滥用和发生严重的并发症。

1.3 胃癌微创手术 腹腔镜是近年来胃癌治疗过程中应用、开展的一项新技术。Uyama *et al*^[3]报导了腹腔镜下进展期胃癌根治术,包括腹腔镜下行全胃切除和D2淋巴结清扫,截止到2006年底,日本已有近9000例胃癌患者行腹腔镜胃癌手术。国内不少单位已经开展了此项手术。总结国内外学者的诊治经验,针对腹腔镜胃癌根治术的适应证目前比较一致的观点是Ⅰ、Ⅱ、及部分Ⅲa期患者。我们的经验是手助腹腔镜技术(HALS)可以降低手术难度,扩大腹腔镜下胃癌手术的使用范围,如腹腔镜下的全胃切除术+脾、胰体尾

切除。

腹腔镜胃癌根治术的近期疗效主要体现在肿瘤根治的有效性和微创的优越性两个方面。对于肿瘤切除的根治性,讨论的重点在于淋巴结清扫的数目。意大利外科学者Huscher *et al*^[4]分析了LADG与开腹手术中清扫的总淋巴结数(LADG: OG = 54: 53)、胃周淋巴结数(LADG: OG = 36: 36)和第二站淋巴结数(LADG: OG = 17: 17)后认为,腹腔镜下对进展期胃癌进行D2淋巴结清扫可行、安全,能够达到与开腹同样的肿瘤学根治效果和R0切除。Varela *et al*^[5]报导腹腔镜胃癌根治术出血量少,术后疼痛轻、胃肠功能恢复快、住院时间短,对全身免疫功能影响小;充分体现了腹腔镜的微创优势。

腹腔镜胃癌根治术的远期疗效,是临床关注和讨论的热点问题,至今仍没有前瞻性随机对照的大宗临床病例研究报道。但根据2004-05在美国佛罗里达美国胃肠内镜外科学会(SAGES)上,日本Ishikawa *et al*^[6]的回顾性多中心研究,报道了18个外科中心1993/2002年1491例LADG治疗早期胃癌的临床资料,手术并发症12%,死亡率0%,复发率0.4%,5年生存率99.2%;他们的结论是腹腔镜手术对早期胃癌是可行的。对于腹腔镜胃癌根治术治疗进展期胃癌的远期疗效,报道和例数都很少。Huscher *et al*^[4]报道了一组腹腔镜与开腹胃癌根治术治疗进展期胃癌的前瞻性随机对照研究的临床资料,其中行腹腔镜手术者17例,开腹手术者20例;5年总生存率前者为58.9%,后者为55.7%;无病生存率前者为57.3%,后者为54.8%;两组的肿瘤复发率也无差别。对此仍然需要大宗前瞻性临床病例报导。

2 正确选择胃癌化疗的适应征和方法

2.1 新辅助化疗 胃癌新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer)主要目的在于使肿瘤体积缩小,提高手术切除率,改善治疗效果。研究发现单纯手术治疗,即使是扩大根治性切除和淋巴结清扫,仍然无法达到真正生物学意义上的根治;而且术后局部复发率高达50%以上。此外对于没有出现远处转移的胃癌患者,姑息性切除的效果较未手术的效果好。从理论上分析认为新辅助化疗独特的优势在于:(1)患者对治疗的耐受性较好;(2)可以取得“降期(down staging)”和缩小肿瘤(down sizing)的效果,从而提高R0类手术切除率;(3)较早的全身治疗可能会消除或控制潜在的微转移灶,从而减少术后

复发、转移的可能; (4)术前疗效的评判有助于术后治疗方案的选择和预后评估, 尤其是取得肿瘤对于化疗药物敏感性的证据。目前关于胃癌新辅助化疗的临床资料多限于II期临床研究, 少数进行了III期临床试验^[7-9]。2005年ASCO会议上报导了MAGICIII期随机研究的结果证实新辅助化疗能够使局部进展期胃癌患者降期, 提高切除率和改善预后, 毒副反应可耐受, 并且没有增加手术的死亡和并发症。国内有学者对15例IIIb或IV期胃癌患者采用FOL FOX方案进行新辅助化疗的II期临床试验。结果7例患者出现瘤体缩小, 并进行了R0切除。我们曾经对8例胃癌肝转移患者行术前新辅助化疗有4例患者肝转移结节完全消失, 全部患者均进行手术治疗, 随访1-2年, 目前无死亡病例发生, 说明新辅助治疗对于胃癌肝转移的良好效果。新辅助化疗的缺点是术前应用化疗药物可以引起骨髓抑制而造成白细胞和血小板减少; 其次是化疗可能造成全身情况恶化等并发症, 使手术和术后恢复增加了难度。

目前, 关于新辅助化疗对于胃癌的治疗效果尚未见到高证据水平多中心随机对照研究, 甚至连单机构的高质量研究也未见报告, 而且meta分析的文献目前仍然是空白。因此, 新辅助治疗对胃癌疗效的影响进行明确结论为时尚早, 需要更多的循证医学的证据。

2.2 腹腔内温热化疗 术中腹腔内温热化疗(intra-operative peritoneal hyperthermo chemotherapy, IPHC)是十余年逐渐发展起来的一项化疗新技术, 适用于预防、治疗胃癌术后腹膜转移或复发。此种方法适用的对象为: (1)术中腹腔为游离癌细胞检测阳性; (2)肿瘤浸润至浆膜或浆膜外; (3)腹膜已有散在性转移复发。在预防术后腹膜转移复发方面, Mochiki *et al*^[7]将141例进展期胃癌随机分成两组, 手术+IPHC组71例, 单纯手术组70例。两组患者在年龄、性别、临床病理分期、淋巴结转移、肿瘤组织学类型、手术方式等差异均无显著性。治疗组在术毕关腹前即给予IPHC治疗(丝裂霉素30-40 mg/3000-4000 mL生理盐水, 43-44℃, 120 min), 术后随访3-12年, 结果发现术后IPHC组和单纯手术组患者的腹腔复发率分别为1.4%(1/71)和22.9%(16/70)($P = 0.00008$), 而术后2、4、8年的生存率, IPHC组分别为88%、76%、62%, 单纯手术组则分别为77%、58%和49%($P = 0.00362$), 提示IPHC能明

显地降低胃癌患者术后腹膜的转移复发, 提高逐年生存率。还有的作者对胃癌已有腹膜转移者比较了腹腔注药与静脉注药、腹腔给顺铂或联合给顺铂+5-FU。结果表明, 腹腔给药比静脉给药好, 联合顺铂+5-FU比仅给顺铂好。故对于进展期胃癌患者, 术中应尽可能切除肉眼所见的转移病灶, 包括已种植于腹膜的癌性结节, 以减少患者肿瘤的负荷, 辅以IPHC治疗, 可望进一步提高疗效^[11]。

2.3 术后放化疗 目前, 在全世界范围内, 对于胃癌的术后辅助治疗投入了很大的精力, 尤其以术后化疗研究得最多。2001年美国INT0116试验对281例胃癌患者进行术后放化疗, 结果证实胃癌术后放化疗能够显著提高患者术后3年生存时间(50% vs 41%, $P = 0.005$), 并且能够显著减少肿瘤复发率(48% vs 31%, $P < 0.001$), 应该成为胃癌综合治疗的一个方面^[11-12]。但是, 以上结果并未得到欧洲学者尤其是英国学者的认同。因此仍然需要对INT0116结果进行完善, 提高治疗有效率。近些年来, 值得欣喜的是, 新型化疗药物不断出现和放疗技术的发展为包括胃癌在内的恶性肿瘤治疗提供了很大帮助。

3 胃癌治疗的发展方向及预测

胃恶性肿瘤组织的形成是一个多步骤、涉及到多因素的过程。目前已经研究证实, 组织基因、及基因序列的变异表现出特定的临床、病理学特征, 已经成为研究领域的一个新的热点问题。基因微序列(gene microarray)是一种新的分子生物学方法, 能够检测到肿瘤组织内的基因表达情况, 提供基因突变的信息, 可能为以后的胃癌治疗提供更多的帮助。目前大多数的胃癌基因微序列的研究集中在胃癌发生相关基因、及具有生物学活性的相关基因。以后的胃癌治疗过程中, 胃癌基因微序列与其他方法联合作为胃癌早期诊断与治疗的一种可靠的方法。尽管条件尚待改善, 但是其拓展了我们对于胃癌发生、治疗概念方面的理解。因此, 在以后的胃癌患者治疗过程中, 我们可以应用胃镜取得少量肿瘤组织, 进行基因微序列扩增、功能学基因分析, 为患者进行究竟是进行新辅助治疗、手术治疗还是术后放化疗进行提供更多的依据, 以提高胃癌患者的预后。

4 参考文献

- 1 Archie V, Kauh J, Jones DV Jr, Cruz V, Karpeh MS

■创新盘点

- 1 提出手助腹腔镜技术(HALS)可以降低手术难度, 扩大腹腔镜下胃癌手术的使用范围, 如腹腔镜下的全胃切除术+脾、胰体尾切除。
- 2 胃癌微观序列的研究可以为胃癌的早期诊断和治疗提供更多的证据。

■应用要点

文章重点对腹腔镜胃癌根治手术, 新辅助化疗和腹腔热灌注化疗临床应用进行总结, 可以为临床开展此类技术提供更多参考依据。

■同行评价

本文对胃癌综合治疗的现状与进展进行了详细的综述,内容充实,结构清晰,行文流畅,具有较强的科学性和理论指导意义,引用的参考文献较新。

- Jr, Thomas CR Jr. Gastric cancer: standards for the 21st century. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57: 123-131
- 2 Ahmad Z, Idrees R, Azad NS, Ahmed R, Ahsan A, Asghar N. Gastric carcinoma: typing, staging, lymph node and resection margin status on gastrectomy specimens. *J Coll Physicians Surg Pak* 2007; 17: 539-542
- 3 Uyama I, Sakurai Y, Komori Y, Nakamura Y, Shyoji M, Isogaki J, Tonomura S, Inaba K, Furuta S, Sunagawa R. The advances of laparoscopic treatment for gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34: 21-24
- 4 Huscher CG, Mingoli A, Sgarzini G, Sansonetti A, Di Paola M, Recher A, Ponzano C. Laparoscopic versus open subtotal gastrectomy for distal gastric cancer: five-year results of a randomized prospective trial. *Ann Surg* 2005; 241: 232-237
- 5 Varela JE, Hiyashi M, Nguyen T, Sabio A, Wilson SE, Nguyen NT. Comparison of laparoscopic and open gastrectomy for gastric cancer. *Am J Surg* 2006; 192: 837-842
- 6 Ishikawa K, Arita T, Ninomiya S, Bandoh T, Shiraishi N, Kitano S. Outcome of segmental gastrectomy versus distal gastrectomy for early gastric cancer. *World J Surg* 2007; 31: 2204-2207
- 7 Mochiki E, Shioya M, Sakurai H, Andoh H, Ohno T, Aihara R, Asao T, Kuwano H. Feasibility study of postoperative intraperitoneal hyperthermochemotherapy by radiofrequency capacitive heating system for advanced gastric cancer with peritoneal seeding. *Int J Hyperthermia* 2007; 23: 493-500
- 8 Hofler H, Langer R, Ott K, Keller G. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in carcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 2006; 587: 115-120
- 9 D'Ugo D, Persiani R, Rauser S, Biondi A, Vigorita V, Boccia S, Ricci R. Response to neoadjuvant chemotherapy and effects of tumor regression in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 1105-1109
- 10 Zhu ZG, Tang R, Yan M, Chen J, Yang QM, Li C, Yao XX, Zhang J, Yin HR, Lin YZ. Efficacy and safety of intraoperative peritoneal hyperthermic chemotherapy for advanced gastric cancer patients with serosal invasion. A long-term follow-up study. *Dig Surg* 2006; 23: 93-102
- 11 Leong T. Chemotherapy and radiotherapy in the management of gastric cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 673-678
- 12 Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann Surg* 2005; 241: 27-39

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验,(2)采集数据,(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章,(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析,(2)获取研究经费,(3)行政、技术或材料支持,(4)指导,(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

PI3K/Akt/p27kip1通道介导胃癌细胞对阿霉素、足叶乙甙化疗的耐药性及其机制

张利, 于红刚, 于皆平, 罗和生

张利, 于红刚, 于皆平, 罗和生, 武汉大学人民医院消化内科
湖北省武汉市 430060

张利, 硕士, 主要从事胃肠肿瘤防治的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30300154

作者贡献分布: 实验设计、实验操作、及论文撰写者由张利完成, 于红刚参与实验指导, 于皆平和罗和生参与论文修改。

通讯作者: 于红刚, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. baker818@126.com

电话: 027-88041919-8455 传真: 027-88041919-8455

收稿日期: 2007-10-26 修回日期: 2008-01-16

PI3K/Akt/p27kip1 pathway mediates chemoresistance to Etoposide and Doxorubicin in gastric carcinoma cell line BGC-823 and its mechanism

Li Zhang, Hong-Gang Yu, Jie-Ping Yu, He-Sheng Luo

Li Zhang, Hong-Gang Yu, Jie-Ping Yu, He-Sheng Luo,
Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

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

Correspondence to: Dr. Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. baker818@126.com

Received: 2007-10-26 Revised: 2008-01-16

Abstract

AIM: To investigate the effect of chemoresistance to Etoposide and Doxorubicin mediated by the PI3K/Akt/p27 pathway on human gastric carcinoma cell line BGC-823 and its mechanism.

METHODS: Cultured BGC-823 gastric cancer cells were divided into control group, PI3K/Akt/p27 Kip1 channel inhibitor Wort (Wort) group, Etoposide (Eto) group, Doxorubicin (Dox) group, Eto + Wort group and Dox + Wort group. Cell survival was assessed with MTT method. Cell cycle and apoptosis were detected using a flow cytometer (FCM). Expression level of p27 Kip1 and p27 gene mRNA was determined by Western blotting analysis and reverse transcription-polymerase chain reaction, respectively.

RESULTS: The cell survival rate at 24 h was lower in Wort group, Eto + Wort group and Dox + Wort group than in control group (57.8%, 46.5%, 44.3% vs 46.5%, 44.3%, $P < 0.01$). The cell ratio in G₀-G₁ phase was higher in Wort group, Eto + Wort group and Dox + Wort group than in control group (85.0 ± 3.54 , 91.5 ± 3.63 vs 91.5 ± 3.64 vs 71.5 ± 3.25 , $P < 0.01$) and the protein expression was increased at 12 h and 24 h. The cell survival rate in Eto and Dox groups was higher than that in control group, but no obvious change was found in G₀ - G₁ phase. The p27 mRNA expression was similar in different groups.

CONCLUSION: Activation of PI3K/Akt/p27 channel can mediate chemo-resistance to tumor cells.

Key Words: PI3K/Akt/p27kip1 pathway; p27 protein; Doxorubicin; Etoposide; Chemoresistance; Cell apoptosis and proliferation

Zhang L, Yu HG, Yu JP, Luo HS. PI3K/Akt/p27kip1 pathway mediates chemoresistance to Etoposide and Doxorubicin in gastric carcinoma cell line BGC-823 and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 575-581

摘要

目的: 探讨PI3K/Akt(PKB)/p27kip1通道对胃癌细胞BGC-823化疗的效果和作用机制。

方法: 将培养的胃癌细胞BGC-823分为对照组, PI3K/Akt/p27kip1通道抑制剂Wort组(Wort组), 足叶乙甙组(Eto组), 阿霉素组(Dox组), Eto+Wort组和Dox+Wort组; MTT法检测细胞生存率, 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡, Western印迹法检测p27Kip1蛋白表达水平, RT-PCR检测p27基因mRNA表达水平。

结果: 与对照组相比, Wort组, Eto+Wort组和Dox+Wort组24 h细胞生存率降低(57.8%、46.5%、44.3% vs 46.5%、44.3%, $P < 0.01$), G₀-G₁期的比例增多(85.0 ± 3.54 , 91.5 ± 3.63 ,

■背景资料

近年来, PI3K/Akt通道与肿瘤的关系已日益受到重视。Akt又名PKB, 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, Akt是磷脂酰肌醇3-激酶的直接下游靶蛋白, Akt成为信号传导深入研究关注的焦点。通过抑制Akt的活性, 从而提高胃癌细胞中的广谱周期蛋白依赖性激酶抑制剂p27蛋白的表达, 进而对肿瘤细胞周期行负性调节和诱导凋亡。

■同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

■研究前沿

肿瘤细胞信号转导特别是各种传导通路是该领域研究热点, PI3K/Akt通道以及下游Akt/p27途径参与了调控胃癌细胞生长传导的机制。

92.4±3.64 vs 71.5±3.25, $P<0.01$), 12 h和24 h蛋白表达升高; Eto组和Dox组细胞生成率较对照组升高, 但G₀-G₁期的比例无明显变化; 各组p27基因mRNA表达水平一致。

结论: PI3K/Akt/p27通道激活能介导肿瘤细胞化疗耐药。

关键词: PI3K/Akt通道; p27蛋白; 阿霉素; 足叶乙甙; 化疗耐药; 细胞增殖与凋亡

张利, 于红刚, 于皆平, 罗和生. PI3K/Akt/p27kip1通道介导胃癌细胞对阿霉素、足叶乙甙化疗的耐药性及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 575-581

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/575.asp>

0 引言

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率居我国恶性肿瘤之首, 寻找一种辅助疗法以提高手术疗效和延长失去手术机会患者的生存期已成为令人瞩目的课题. 目前胃癌化学治疗(简称化疗)已引起越来越多医学工作者的重视。

最新研究显示, 一些肿瘤细胞可以通过对负责细胞生长和凋亡的细胞信息传导通路进行调控而获得对化疗药物的耐药性^[1], 磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, 以下简称PI3K)信息传导通路的激活被认为是肿瘤细胞抗凋亡的主要机制之一^[2-3], 该通路不但与肿瘤的发生有关, 还与肿瘤的进一步浸润和转移有关^[4], 可能该通道抑制剂有较强的癌细胞杀伤和抑制作用^[5-8]. 足叶乙甙(Etoposide)和阿霉素(Doxorubicin)为应用较为普遍的抗癌药, 这两种药物主要通过干扰拓扑异构酶II α 诱导双链DNA断裂^[9]. 因拓扑异构酶II α 的表达与细胞周期循环紧密联系, 故足叶乙甙和阿霉素主要影响快速增殖细胞. 本研究通过PI3K/Akt/p27kip1通道抑制剂Wortmannin, 阿霉素及足叶乙甙对低分化胃癌细胞BGC-823生长增殖的影响, 以探求其作用机制, 为克服肿瘤细胞化疗耐药提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料 噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、胎牛血清、RPMI-1640、碘化丙啶(PI)、Annexin V/PI双染试剂盒、细胞计数板、96孔培养板、Western blot试剂盒、P27兔抗人一抗、羊抗兔二抗、5×上样缓冲液(以上试剂均购于武汉汉

海生物); 流式细胞仪(武汉大学医学院), 酶联检测仪、CO₂孵箱、电泳和电转槽、底片、显影液和定影液、Vilber Lourmat凝胶成像系统(以上于武汉大学人民医院消化实验室); Ecl试剂盒(Santa公司); 细胞裂解液, TRIzol, RNA初提试剂盒, cDNA合成试剂盒及PCR试剂盒(以上购于晶美生物); 引物合成和设计由英俊公司提供帮助, 100 bp DNA ladder(Genscript Corporation); 人胃癌细胞株BGC-823购用中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将胃癌细胞接种于含100 mL/L胎牛血清(56℃灭活30 min), 100 000 IU/L青霉素及100 000 IU/L链霉素的RPMI1640培养液中, 在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中进行单层传代培养2 d更换培养基1次, 1:4常规传代培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT法检测细胞生存率: 细胞以每孔3×10⁸个/L的浓度接种于96孔培养板, 于含100 mL/L胎牛血清RPMI-1640培养液中培养36 h, 细胞贴壁后, 先均用无血清培养液培养24 h后, 实验组: II: 单加Wortmannin组(Wort, 终浓度40 nmol/L), III: 单加足叶乙甙组(Eto, 20 μ mol/L), IV: 加Eto+Wort组, V: 单加阿霉素(Dox, 0.3 μ mol/L)组, VI: 加Dox+Wort组及他们的混合液, 对照组加等量相同不含药物培养液. 药物作用24 h后, 于每孔中加入配制的0.5% MTT 20 μ L继续培养4 h, 弃上清, 加入150 μ L DMSO, 在混合振荡仪上振摇约15 min, 使结晶物充分溶解后, 于酶联检测仪上570 nm波长测定各孔吸光光度值. 计算细胞毒性值(CT%), CT% = (1-A处理/A对照)×100%. 分别做5次, 结果以mean±SD表示。

1.2.3 药物作用时间曲线: 细胞以每孔3×10⁸个/L的浓度接种于96孔培养板, 共接种4个96孔板, 实验组单独加入阿霉素(0.3 μ mol/L)、足叶乙甙(20 μ mol/L)、单独Wort组(40 nmol/L)及他们的混合培养液, 对照组加入等量相同培养液. 分别于加药后12、24、36、48 h取出一培养板测定药物组的A值, 并根据存活率绘制药物作用下的细胞生长曲线, 存活率=A处理/A对照×100%。

1.2.4 流式细胞仪: (1)PI单染色检测Etoposide, Doxorubicin, Wort及他们的混合液对BGC-823细胞周期和凋亡的影响: 药物干预分组同1.2.2, 于药物作用24 h后, 分别收集处理组及对照组培养瓶细胞, 用PBS洗涤2次后, 用700 mL/L乙醇固定待检. 上机前再经PBS洗涤2次, RNA酶

■应用要点

本文通过体外细胞培养,测定不同化疗药物干预后的生存率和增殖抑制指标,并裂解细胞检测p27蛋白、mRNA的表达,为常规化疗药物作用PI3K/Akt/p27通道,调控胃癌细胞增殖的信号传导机制提供了更有力的支持,为临床联合化疗药物以提高疗效性提供了理论依据和指导作用。

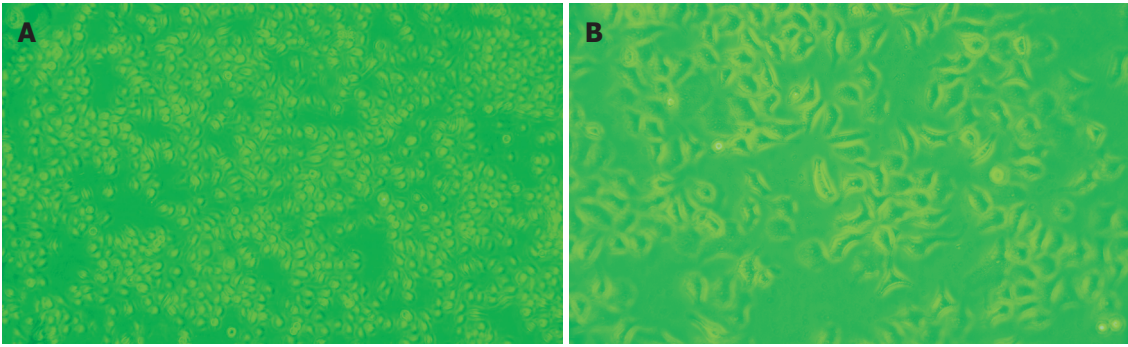


图 1 细胞生长状态. A: 给药(阿霉素)前; B: 药物(阿霉素)作用细胞24 h后.

消化, PI染色. 用流式细胞仪测定, 每次计数细胞10000个, 用多参数细胞分析软件处理测定结果, 对各样本进行细胞周期分析, 并计算凋亡率. (2)Annexin V/PI双染: 将各分组干预的细胞, 用冰冷PBS洗涤2次后, 离心, 加入结合缓冲液(1:4去离子水稀释)250 μ L重新悬浮细胞, 取100 μ L放入待测管, 按说明加以上两种染色试剂置暗处孵育15 min上机, 检测早期细胞凋亡.

1.2.5 Western blot检测p27蛋白表达: 取对数生长期肿瘤细胞先加无血清培养液24 h后, 再分别在六组中加抗癌药, I: 对照组(无血清培养液), II: 单加Wort组, III: 单加足叶乙甙组(Eto), IV: 加Eto+Wort组, V: 单加阿霉素(Dox)组, VI: 加Dox+Wort组. 作用12、24 h后分别收集细胞(死亡细胞多漂起, 通过收集培养液离心而收集死亡细胞), 加裂解液提取总蛋白, 取400 μ L裂解上清液, Bradford法测定蛋白浓度: 每种样品以20 μ g总蛋白上样, 进行12.5% PAGE凝胶电泳, 100 V, 40 min. 电泳结束后, 取下凝胶25 V电转2 h, 使蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC)膜上, 将NC膜用封闭液封闭非特异性抗体2 h, 加入一抗(兔抗人p27抗体1:1000), 4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜加入二抗(羊抗兔1:2000)室温孵育1 h, 将NC膜置于ECL(增强化学发光试剂)中反应1-3 min, 暗室中使X线片曝光, 常规方法显影定影, X线片上的条带用图像分析系统进行分析, 测定积分灰度值, 将p27/ β -actin的比值作为蛋白表达的相对量.

1.2.6 RT-PCR检测p27基因的表达: (1)细胞总RNA的提取: 细胞处理过程及分组同1.2.5, 将分组干预的细胞, 经PBS洗涤后, 每瓶加入1 mL TRIzol, 使细胞充分裂解, 按操作手册抽提取总RNA, 紫外分光光度计检测RNA的纯度和含量, RNA电泳检测其完整性. (2)两步法实时定量RT-PCR: 按cDNA合成说明书逆转录为cDNA, 合成的引物序列见表1, 常规PCR扩增, 循环参数如

表 1 p27及内参GAPDH引物序列、TM值和产物长度

Primer	Seq(5' to 3')	TM值	产物长度
p27			
Left	TCATGCCCTCTCTTCGTTTCC	59.89	353 bp
Right	CGTTCGGATATAAACTGGCC	59.57	353 bp
GAPDH			
Left	ACCACAGTCCATGCCATCAT	60.36	182 bp
Right	TCTACCACCCTGTTGCTGTA	60.64	182 bp

下: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 最佳退火温度55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 35个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, GAPDH为内参照, PCR反应产物15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 两者同时进行(两引物退火温度相同). 采用法国Vilber Lourmat凝胶成像系统观测实验5次, 测定积分灰度值以p27/GAPDH的比值作为基因表达的相对量(表1).

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0软件, 单纯比较处理组与对照组之间的差别用t检验. 随机区组间三者或以上计量资料的两两比较, 用LSD检验.

2 结果

2.1 MTT法测定细胞生存率 药物作用24 h后, 阿霉素、足叶乙甙、Wort组均有肿瘤细胞抑制作用(以阿霉素为例, 细胞生长状态前后对比见图1), 以Wort较为明显, 且联合作用抑制作用最为显著(表2).

2.2 药物作用时间趋势 各实验组和对照组药物作用胃癌细胞, 分别于12、24、36、48 h行细胞毒性检测, 单用足叶乙甙、阿霉素两组细胞生存率有明显下降, 但于24 h后出现细胞耐药, 下降幅度明显减弱; Wort组也有较强的细胞毒性, 且联合作用不但细胞毒性加强, 又能克服单用足叶乙甙、阿霉素出现的化疗耐药, 药物作用24 h后细胞生存率下降幅度仍明显(图2).

■名词解释

Wort: 一种常见 phosphatidylinositol 3kinase(PI3K) 抑制剂. Wort可以通过细胞和PI3K的110 kDa催化亚基相结合, 特异性抑制PI3K, 抑制PI3K/Akt信号通路, 包括常见的Akt磷酸化等.

表 2 实验组及对照组药物作用24 h后的吸光值及生存率比较($n = 5$)

分组	吸光值(A)	生存率(%)
对照组	1.136 ± 0.115	95.2
Wort组	0.712 ± 0.096^b	58.8
Eto组	0.978 ± 0.126	76.4
Wort+Eto组	0.625 ± 0.103^{bc}	51.5
Dox组	0.897 ± 0.130^a	73.5
Wort+Dox组	0.594 ± 0.110^{bd}	48.9

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 单用Wort组.

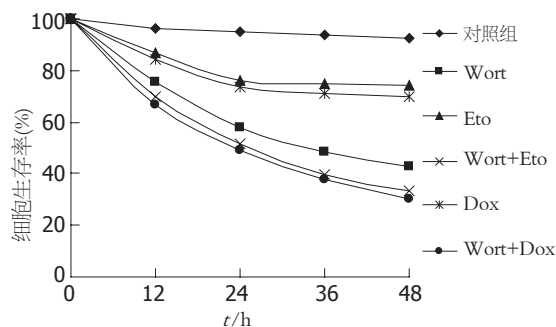


图 2 对照组和处理组药物作用时间趋势曲线图.

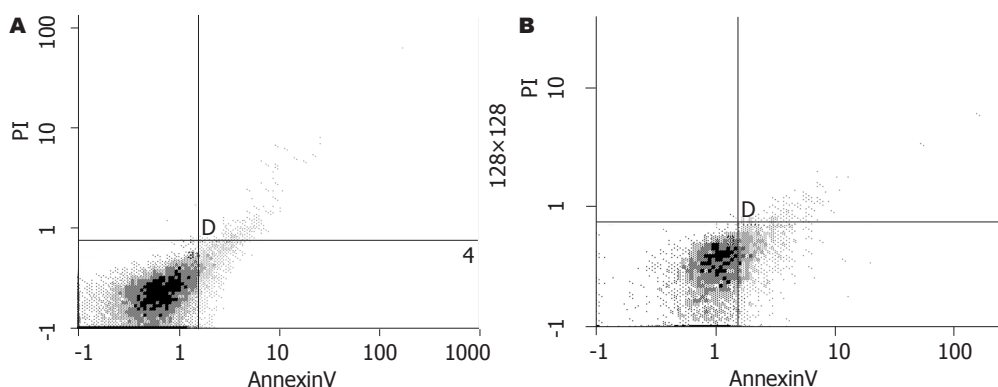


图 3 细胞早期凋亡分布图. A: 单用阿霉素药物组; B: 联合Wortmannin组; 右下象限为早期凋亡细胞比例分布.

表 3 Wort、Eto、Dox及联合液作用后的细胞周期、增殖指数和早期凋亡率分析($n = 5$, %)

分组	G ₀ -G ₁ 期	S期	G ₂ -M期	PI	凋亡率
对照组	71.5 ± 3.25	18.9 ± 1.36	6.3 ± 1.68	25.0 ± 2.35	7.2 ± 2.15
Wort组	85.0 ± 3.54^b	8.7 ± 1.46^b	5.1 ± 0.84	13.6 ± 1.87^b	42.4 ± 3.57^b
Eto组	75.1 ± 3.18	16.3 ± 1.25	8.2 ± 1.56	24.4 ± 2.14	9.2 ± 2.16
Wort+Eto组	91.5 ± 3.63^{bd}	2.5 ± 0.78^{bd}	5.7 ± 1.16	7.9 ± 1.16^{bd}	53.4 ± 3.82^b
Dox组	76.4 ± 3.36	15.8 ± 1.17	7.8 ± 1.45	23.6 ± 2.05	11.4 ± 2.21^a
Wort+Dox组	92.4 ± 3.64^{bd}	2.3 ± 0.65^{bd}	5.4 ± 1.02	7.4 ± 1.08^{bd}	54.8 ± 3.06^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 单用Wort组.

2.3 细胞周期和凋亡的检测结果 Wort、Etoposide、Doxorubicin及联合应用组分别作用细胞24 h后, Wortmannin参与三组与对照组在各期、增殖指数和早期凋亡率上的比较, 均有显著差异, 而足叶乙甙、阿霉素单用组与对照组比较, 各期细胞比例、PI和早期凋亡率的比较无统计学意义(阿霉素和联合Wortmannin作用细胞早期凋亡分布见图3). 显示Wortmannin及其联合应用组药物作用肿瘤细胞后, 与对照组比较细胞处于G₀-G₁期的比例增多, 说明药物作用后细胞G₁期延长和不增殖细胞群即G₁期细胞增多, G₁期延长意味着细胞增殖周期延长, 增殖缓慢, 而相对增

殖期细胞减少, 以联合组最显著; 并分析含Wort 3组的S期细胞比例可见, 该期细胞明显减少, 在联合组中更为突出(表3).

2.4 Western-blot对不同分组处理的胃癌细胞p27蛋白的检测 对照组及处理组Wort、Eto、Wort+Eto、Dox、Wort+Dox 5个组药物干预肿瘤细胞12 h、24 h后, 裂解细胞行免疫印迹p27蛋白表达检测, 各灰带值分别与 β -actin进行校正(图4). 两时间段含Wort组与对照组比较, p27蛋白表达强, 统计分析有差异($P < 0.05$), 以24 h更为明显, 干预24 h时联合组有显著差异($P < 0.01$); 单用Eto、Dox干预12 h时两组则较对照组表

表 4 对照组和各处理组p27/ β -actin和p27/GAPDH灰度值比较($n = 5$)

	对照组	Wort	Eto	Wort+Eto	Dox	Wort+Dox
p27/ β -actin						
12 h	0.19 \pm 0.045	0.27 \pm 0.047 ^a	0.21 \pm 0.036	0.28 \pm 0.040 ^a	0.17 \pm 0.039	0.29 \pm 0.043 ^b
24 h	0.29 \pm 0.057	0.38 \pm 0.063 ^a	0.11 \pm 0.043 ^b	0.43 \pm 0.045 ^b	0.14 \pm 0.047 ^b	0.44 \pm 0.056 ^b
p27/GAPDH	0.33 \pm 0.046	0.31 \pm 0.053	0.32 \pm 0.063	0.34 \pm 0.056	0.33 \pm 0.050	0.30 \pm 0.048

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

■同行评价

本文内容较新, 层次分明, 具有临床指导价值.

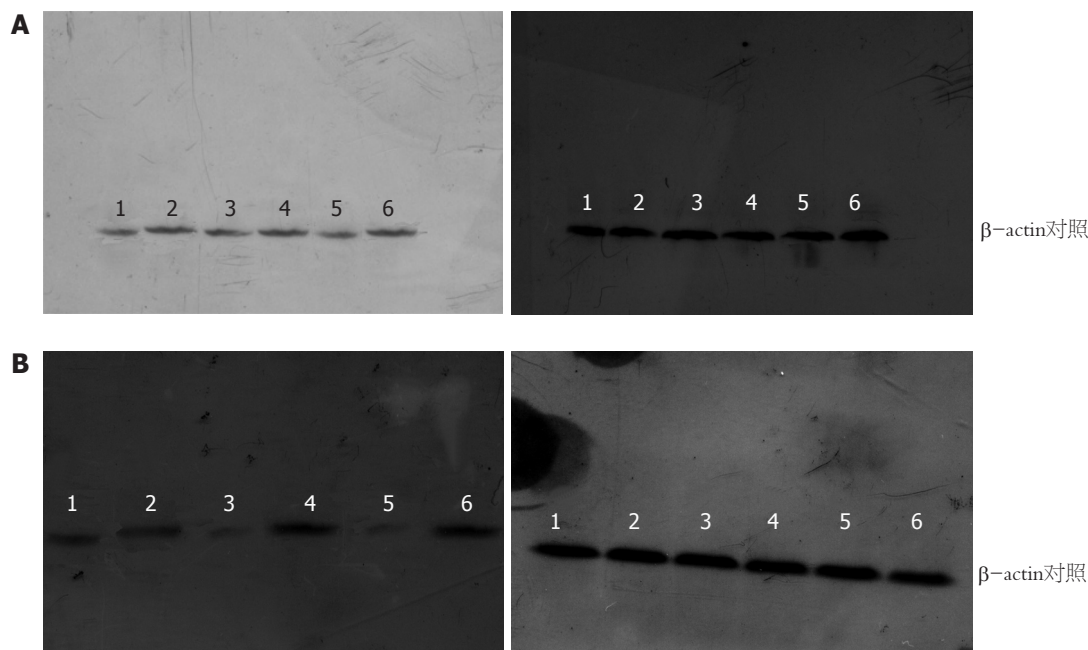


图 4 p27蛋白表达检测结果. A: 干预细胞12 h; B: 干预细胞24 h; 1: 对照组; 2: Wort 组; 3: Eto组; 4: Wort+Eto组; 5: Dox组; 6: Wort+Dox组.

达强弱无差异, 干预24 h时则出现有显著差异 ($P < 0.01$). 灰度值进行统计学分析结果见(表4).

2.5 RT-PCR对不同分组处理的胃癌细胞p27 mRNA基因表达的检测 对照组及处理组Wort、Eto、Wort+Eto、Dox、Wort+Dox五个组药物干预肿瘤细胞24 h后, TRIzol初提RNA, 逆转录为cDNA, 再进行PCR和p27 mRNA基因表达的检测(图5). 各灰度值与GAPDH比较, 并统计分析见(表4), 显示各药物组对p27 mRNA基因表达水平无影响.

3 讨论

PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, 可以特异性使肌醇环上的3位羟基磷酸化, 使PIP2转变为第二信使PIP3. PI3K主要是通过其3位羟基磷酸化产物PIP3转移Akt到细胞膜上, 并改变Akt的构象使之能被3-磷脂酰肌醇依赖蛋白激酶所磷酸化和激活, 从而传递抗凋亡信号到PI3K/Akt

下游通道的效应因子, 本研究证实Akt/p27途径起一定作用.

p27kip1是1994年由Polyak *et al*首先发现的一种广谱周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 具有抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)和抑制细胞从G₁期到S期的转化功能, p27蛋白的下调和高表达, 直接影响肿瘤细胞周期和肿瘤细胞的凋亡, 现纳入候选的抑癌基因^[10-11], 从p27基因的复制, 转录, 翻译到p27蛋白的降解, p27蛋白水平的调节, 主要是转录后水平, 转录后水平的调节途径包括对p27蛋白的水解、对p27在细胞中的定位以及对p27被扣留的调控, p27kip1基因改变少见^[12], 最新研究显示, 在乳腺癌^[13]及结肠癌^[14]患者中, p27蛋白表达高的患者其预后明显好于p27蛋白低表达者; p27蛋白低表达与肿瘤向血管、淋巴管浸润有明显关系^[15]; p27蛋白免疫反映性与肿瘤分期有关^[16]; 在卵巢上皮细胞癌患者中, p27蛋白低表达预示临床预后差^[17]; 食管癌患者

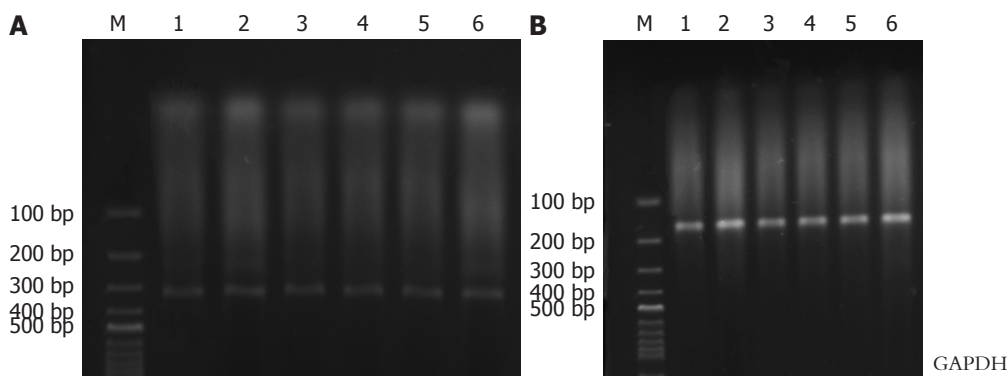


图5 p27 mRNA的表达结果. 1: 对照组; 2: Wort组; 3: Eto组; 4: Wort+Eto组; 5: Dox组; 6: Wort+ Dox组; M为Marker分子质量指示.

中, p27蛋白表达水平能反映食管癌细胞的增殖状态^[18], 均提示p27表达的高低将直接反映患者的预后, 也可间接反映化疗预后.

PI3K/Akt(PKB)通道激活对p27的作用是多方面的, 在不同的细胞类型中其效应也有不同: (1)PKB能磷酸化p27核定位信号区的T157^[19]; (2)PI3K调节p27的稳定性; (3)在PTEN缺失的细胞中, PKB介导的磷酸化可抑制p27的核转位; (4)PI3K途径的激活会导致p27在特定细胞中的表达下调; (5)PI3K的激活促进p27蛋白水解; (6)磷酸化p27KIP1使他们在胞内堆积; (7)forkhead家族蛋白, 是一类转录因子, 入核后促进p27蛋白的表达, 而PI3K通道的激活可以对其磷酸化起负性调节^[20-21]. PI3K/Akt途径对p27稳定性的调控在活体内可能更复杂一些. 综上所述, PI3K/Akt(PKB)通道激活或失活将直接影响p27的表达水平.

通过实验, 我们得出: (1)p27蛋白水平的调节, 在转录后, 故RT-PCR检测的结果p27基因各组的表达水平趋于一致, 各药物组对p27 mRNA无影响. (2)含PI3K/Akt(PKB)通道抑制剂Wort的3组p27蛋白表达均较对照组表达强, 联合应用表达升高更加显著, 而单用足叶乙甙和阿霉素组p27表达较对照组降低, 可知足叶乙甙和阿霉素能异常激活PI3K/Akt通道, 磷酸化的PKB通过上文所述的诸多作用机制, 导致p27表达下调, 且随时间的延长而下调明显, 与PI3K/Akt通道抑制剂Wort联合应用, 既能提高Wort对该通道的抑制能力, 直接上调p27蛋白表达水平, 又加强肿瘤细胞毒性和杀伤力, 细胞生存率明显降低; (3)足叶乙甙、阿霉素和Wort均有较强的胃癌细胞BGC-823抑制和杀伤作用, 以Wort作用更为突出, 单用足叶乙甙、阿霉素于24 h后出现明显细胞耐药, 联合Wort处理后未见肿瘤细胞耐药; 且

在含PI3K通道抑制剂Wort组, 细胞生存率均较对照组低(57.8%), 细胞停止生长在G₁期(85%), 联合阿霉素和足叶乙甙生存率更低(44.3%、46.5%), 停止在G₁期的肿瘤细胞为(92.2%、91.5%), 结合各实验结果综合分析, 提示PI3K/Akt通道抑制剂Wort能通过上调p27蛋白表达对肿瘤细胞周期进行负性调节, 并使肿瘤细胞停止生长在G₁期、明显降低增殖期细胞比例, p27蛋白还可以诱导肿瘤细胞凋亡, 且与阿霉素、足叶乙甙联合应用既加强了自身对PI3K/Akt通道的抑制作用, 又能提高足叶乙甙和阿霉素细胞毒性和杀伤力; 而单用阿霉素和足叶乙甙, 则异常激活PI3K/Akt通道, 直接下调p27表达水平, 失去了对肿瘤细胞周期的负性调节和诱导凋亡的能力, 胃癌细胞对化疗药物产生耐药. 以上提示PI3K/Akt/p27通道激活能介导肿瘤细胞化疗耐药.

进展期肿瘤的治疗问题, 主要是手术切除和解决肿瘤细胞的无限增殖, 而对细胞调控点的抑制作用是解决细胞增殖的关键, 细胞周期的调控点有三个: G₁期控制点, S期及M期控制点. p27蛋白主要是通过结合和抑制cyclin E/CDK2复合物(一种能调节细胞进入S期所必须的催化酶)来抑制细胞从G₁向S期转变, 同样, 还能广泛的调节其他的周期蛋白cyclin, 因而被称广谱细胞周期蛋白依赖性激酶CDK抑制剂(CDKI)^[22]: 一方面, p27kip1能够与CDK亚单位结合, 抑制CAK(CDK2 activating kinase)对CDK的激活过程; 另一方面, p27kip1直接抑制细胞中已激活的cyclin 2/CDK激酶活性^[23], 由于p27kip1的作用, cyclin D2/CDK4/6、cyclin E2/CDK2不能有效地磷酸化Rb蛋白, E2F转录因子不能被释放, 细胞周期的进程被阻断; p27蛋白的下调, 其直接结果导致TNF- α 的下调, 肿瘤细胞抗凋亡,

以上为p27蛋白作用G₁期控制点抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的机制。

总之, 足叶乙甙、阿霉素诱导PI3K/Akt/p27通路的异常激活能下调p27蛋白, 从而对细胞周期负性调节和诱导肿瘤细胞凋亡的能力下降, 该通道的激活参与胃癌细胞对化疗药物耐药性的产生。应用PI3K/Akt通路抑制剂将增加胃癌细胞对化疗药物的敏感性。

4 参考文献

- Poh TW, Pervaiz S. LY294002 and LY303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogen peroxide production independent of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *Cancer Res* 2005; 65: 6264-6274
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-1657
- Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002; 14: 381-395
- Qian Y, Zhong X, Flynn DC, Zheng JZ, Qiao M, Wu C, Dedhar S, Shi X, Jiang BH. ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling. *Oncogene* 2005; 24: 3154-3165
- Kraus AC, Ferber I, Bachmann SO, Specht H, Wimmel A, Gross MW, Schlegel J, Suske G, Schuermann M. In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene* 2002; 21: 8683-8695
- Krystal GW, Sulanke G, Litz J. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling blocks growth, promotes apoptosis, and enhances sensitivity of small cell lung cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 913-922
- Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 707-717
- Wu K, Wang C, D'Amico M, Lee RJ, Albanese C, Pestell RG, Mani S. Flavopiridol and trastuzumab synergistically inhibit proliferation of breast cancer cells: association with selective cooperative inhibition of cyclin D1-dependent kinase and Akt signaling pathways. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 695-706
- Kingma PS, Osheroff N. The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400: 223-232
- Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Uchida Y, Yokoyama S, Müller W. Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2874-2881
- Radošević N, Delmer A, Tang R, Marie JP, Ajchenbaum-Cymbalista F. Cell cycle regulatory protein expression in fresh acute myeloid leukemia cells and after drug exposure. *Leukemia* 2001; 15: 559-566
- Chen TC, Ng KF, Lien JM, Jeng LB, Chen MF, Hsieh LL. Mutational analysis of the p27(kip1) gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 153: 169-173
- Zheng WQ, Zheng JM, Ma R, Meng FF, Ni CR. Relationship between levels of Skp2 and P27 in breast carcinomas and possible role of Skp2 as targeted therapy. *Steroids* 2005; 70: 770-774
- Hershko DD, Shapira M. Prognostic role of p27Kip1 deregulation in colorectal cancer. *Cancer* 2006; 107: 668-675
- Goto A, Niki T, Moriyama S, Funata N, Moriyama H, Nishimura Y, Tsuchida R, Kato JY, Fukayama M. Immunohistochemical study of Skp2 and Jab1, two key molecules in the degradation of P27, in lung adenocarcinoma. *Pathol Int* 2004; 54: 675-681
- Langner C, von Wasielewski R, Ratschek M, Rehak P, Zigeuner R. Expression of p27 and its ubiquitin ligase subunit Skp2 in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2004; 64: 611-616
- Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM. Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5168-5177
- Huang JX, Song ZX, Qian RY, Xu GW. Expression of cell cycle-regulatory proteins in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ai Zheng* 2003; 22: 277-281
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002; 8: 1145-1152
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000; 404: 782-787
- Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3534-3546
- Timmerbeul I, Garrett-Engel CM, Kossatz U, Chen X, Firpo E, Grünwald V, Kamino K, Wilkens L, Lehmann U, Buer J, Geffers R, Kubicka S, Manns MP, Porter PL, Roberts JM, Malek NP. Testing the importance of p27 degradation by the SCFskp2 pathway in murine models of lung and colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 14009-14014
- Xu X, Nakano T, Wick S, Dubay M, Brizuela L. Mechanism of Cdk2/Cyclin E inhibition by p27 and p27 phosphorylation. *Biochemistry* 1999; 38: 8713-8722

编辑 孙诚谊 电编 吴鹏朕

植物药洪天肝康防治小鼠肝硬化的药效

杨锐华, 许晴, 乔岩岩, 贾洪章, 史小林

■背景资料

目前,在我国,原发性肝癌患者合并肝硬化者占53.9%-85.0%,甚至高达90%以上。因此防治肝纤维化和肝硬化是当今医学领域的重要课题。西医治疗肝硬化尚无特效疗法,而中药却在治疗上表现出独特的优势。

杨锐华, 许晴, 乔岩岩, 史小林, 首都医科大学组织学与胚胎学教研室 北京市 100069

贾洪章, 北京洪天医药技术研究所 北京市 100054

杨锐华, 2005级首都医科大学硕士, 主要从事植物药抗肝硬化的研究。

作者贡献分布: 杨锐华主要完成者, 包括制作动物模型, 采集数据, 统计分析, 起草文章; 许晴参与实验, 进行B超观察与分析等技术支持; 乔岩岩采集与分析数据; 贾洪章提供植物药组方; 史小林设计实验, 对实验结果与文章内容进行审阅, 提供研究经费。

通讯作者: 史小林, 100069, 北京市, 首都医科大学组织学与胚胎学教研室. szhyxzhx@ccmu.edu.cn

电话: 010-83911448

收稿日期: 2007-11-10 修回日期: 2008-02-10

Experimental study of herbal-based medicine Hong Tian Gan Kang on the intervention and therapy for hepatic cirrhosis

Rui-Hua Yang, Qing Xu, Yan-Yan Qiao,
Hong-Zhang Jia, Xiao-Lin Shi

Rui-Hua Yang, Qing Xu, Yan-Yan Qiao, Xiao-Lin Shi,
Department of Histology and Embryology, Capital Medical
University, Beijing 100069, China

Hong-Zhang Jia, Hong Tian Medical Technic Institute in
Beijing, Beijing 100054, China

Correspondence to: Xiao-Lin Shi, Department of Histology
and Embryology, Capital Medical University, Beijing
100069, China. szhyxzhx@ccmu.edu.cn

Received: 2007-11-10 Revised: 2008-02-10

Abstract

AIM: To investigate the prevention and treatment of Hong Tian Gan Kang (HTGK) on experimental hepatic cirrhosis.

METHODS: The female ICR mice were allocated into traditional Chinese medicine (HTGK) prevention group, treatment group, animal model group, and control group. During the process of inducing hepatocirrhosis by CCl₄ celiac injection in ICR mice, the HTGK group received HTGK per day, while the model group was created into the animal model by the above means without treatment. The mice of control group were normally raised without being created into models. The control group, animal model group and (HTGK) prevention group were sacrificed randomly at the end of the 60 d, 90 d and 180 d; while treatment group was sacrificed randomly

at the end of the 30 d, 60 d and 90 d. Tissue specimens were taken. Animals received liver histopathology and ultrastructure test.

RESULTS: Up to day 180, marked hepatic fatty changes, inflammation, necrosis and fibrosis were observed in mice of model group. In contrast, these alternations were attenuated by HTGK administration although mild fatty changes remained. Compared with the CCl₄-induced cirrhotic mice, histological changes of fibrosis were improved significantly in the mice treated with HTGK. Liver histopathology showed that the contents of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and alpha-smooth muscle actin (α -SMA) in the animal model group were significantly higher than those in the control group (TGF- β 1, 60 d: 0.269 vs 0.155; 90 d: 0.306 vs 0.155; 180 d: 0.336 vs 0.160; α -SMA, 60 d: 0.269 vs 0.160; 90 d: 0.299 vs 0.150; 180 d: 0.322 vs 0.155, $P < 0.01$). However, the contents of TGF- β 1 and α -SMA in the therapy group were significantly lower than those in the model group (0.220, 0.203, 0.185 vs 0.336, $P < 0.01$; 0.2451, 0.2113, 0.185 vs 0.3217, $P < 0.01$).

CONCLUSION: HTGK has suppressive, preventive and curative effect on hepatic fibrosis and hepatocirrhosis.

Key Words: Hepatic cirrhosis; Herbal-based medicine; Transforming growth factor- β 1; Alpha-smooth muscle actin; Mice

Yang RH, Xu Q, Qiao YY, Jia HZ, Shi XL. Experimental study of herbal-based medicine Hong Tian Gan Kang on the intervention and therapy for hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 582-589

摘要

目的: 研究植物药洪天肝康(HTGK)对小鼠实验性肝硬化的防治作用。

方法: 将ICR♀小鼠, 随机分成正常对照组、模型组、预防组和治疗组。正常对照组: 室温下常规饲养; 模型组: ip 200 mL/L CCl₄; 预防组: ip 200 mL/L CCl₄同时给予HTGK灌服; 治

■同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

疗组: 造模d 180开始给予HTGK灌服, 同时继续ip 200 mL/L CCl₄, 模型组和预防组于60、90、180 d; 治疗组于30、60、90 d分别进行肝脏B超检测, 并取出肝脏组织进行HE、VG染色和PAS反应, 以观察其组织病理学的变化. 应用免疫组织化学方法进行肝组织中转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的标记, 以探讨HTGK的作用途径. TGF- β 1和 α -SMA的阳性标记物应用图像分析仪进行定量测定.

结果: 模型组肝脏呈重度变性及炎性细胞浸润, 可见纤维条索形成; 预防组较模型组肝纤维化程度轻; 治疗组显示正常肝细胞数量增多, 肝纤维化程度明显减轻. 模型组TGF- β 1、 α -SMA阳性反应物与正常对照组相比显著增加(TGF- β 1, 60 d: 0.269 vs 0.155; 90 d: 0.306 vs 0.155; 180 d: 0.336 vs 0.160; α -SMA, 60 d: 0.269 vs 0.150; 90 d: 0.299 vs 0.155; 180 d: 0.322 vs 0.160, 均 $P<0.01$); 治疗组TGF- β 1、 α -SMA阳性反应物与模型组相比显著降低(0.220, 0.203, 0.185 vs 0.336, $P<0.01$; 0.245, 0.211, 0.185 vs 0.322, $P<0.01$).

结论: 植物药HTGK对肝硬化的形成具有积极的干预作用.

关键词: 肝硬化; 植物药; 转化生长因子- β 1; α -平滑肌肌动蛋白; 小鼠

杨锐华, 许晴, 乔岩岩, 贾洪章, 史小林. 植物药洪天肝康防治小鼠肝硬化的药效. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 582-589
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/582.asp>

0 引言

肝硬化是严重危害人类健康的常见病之一, 也是导致肝癌的主要病因, 而肝纤维化是多种慢性肝病发展为肝硬化的必经阶段, 因此防治肝纤维化和肝硬化是当今医学领域的重要课题. 各种病因引起肝细胞弥漫性炎性坏死、再生、诱发肝脏广泛地纤维结缔组织增生、肝小叶结构破坏、假小叶形成, 纤维间隔包绕再生的肝细胞形成结节, 成为肝硬化^[1-4]. 近年来, 国际上虽然对肝硬化的病原学治疗如抗乙型肝炎病毒治疗取得了一定的成效, 但西医治疗肝硬化尚无特效疗法^[5-13], 而中药却在治疗上表现出独特的优势. 近年来国内对中药及中药提取物靶向制剂的研究取得了较大的进展, 但大多处在基础研究阶段, 而且对中药制剂的研究大多数是以天然单一有效成分为原料药物. 深化肝硬化的中

医病因病机学研究已成为提高肝硬化临床疗效亟待解决的重要问题. 首都医科大学与北京洪天医药技术研究所共同成功研制了抑制肝纤维化、逆转肝硬化的植物药洪天肝康(Hong Tian Gan Kang, HTGK). HTGK是应用现代工艺方法提取黄芪、半枝莲、白芍等纯植物原料中的皂甙、黄酮等有效活性成分, 依据益气解毒, 扶正祛邪维持机体的动态平衡的中医理论, 达到抑制肝纤维化和逆转肝硬化促进正常肝细胞增殖的药效作用, 最终达到防治肝硬化的目的. 为进一步证实HTGK逆转肝硬化的体内疗效, 我们将制备肝硬化的动物模型, 以动态观察植物药HTGK在肝硬化形成过程中对肝组织细胞的影响, 并探讨其可能的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级4 wk龄ICR♀小鼠80只, 体质量20-30 g, 购自首都医科大学动物中心. HTGK为北京洪天力药业有限公司提供. 分析纯CCl₄为北京现代东方精细化学品有限公司生产. 兔抗鼠转化生长因子- β 1(transforming growth factor, TGF- β 1)抗体, 小鼠抗小鼠单克隆 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体, 购自武汉博士德生物工程有限公司.

1.2 方法 将80只小鼠随机分成4组, 正常对照组, 模型组, 预防组, 治疗组, 每组20只. 肝硬化组: 每5 d进行小鼠ip 200 mL/L CCl₄橄榄油溶液5 mL/kg. 预防组在制备肝硬化模型的同时(时间剂量同模型组), 每日给予80 mg/kg HTGK灌服, 每日分2次灌服. 治疗组造模180 d后, 给予80 mg/kg HTGK灌服, 每日分2次灌服, 同时继续ip 200 mL/L CCl₄(时间剂量同模型组). 水合氯醛5 mL/kg将小鼠麻醉, 脱毛剂备皮, 将小鼠固定于操作台上, 使用高分辨率小动物超声系统(Vevo 770™), 704探头扫描肝脏, 采集图像并进行比较分析. 肝硬化组分别于d 60、90、180; 预防组分别于d 60、90、180; 治疗组分别于d 30、60、90断髓取肝脏, Bouin液固定, 常规石蜡包埋.

1.2.1 组织病理学: 将石蜡包埋的肝组织, 制成4 μ m厚的切片. 分别进行HE染色, VG(Van Gieson)染色和PAS(periodic acid-schiff)反应.

1.2.2 免疫组织化学: 切片脱蜡入水, 柠檬酸钠缓冲液热抗原修复, 30 mL/L H₂O₂封闭内源性过氧化物酶, 100 mL/L正常山羊血清抑制非特异性表达, 分别滴加一抗(兔抗鼠TGF- β 1抗体, 稀释度1:100; 小鼠抗小鼠单克隆 α -SMA抗体, 稀

■研发前沿

当今研发热点集中在以下几个方面: 肝硬化的基因治疗, 肝干细胞移植, 中药复方多方位的靶向治疗.

■创新盘点

本文通过动物体内实验,证实了植物药洪天肝康可有效逆转肝纤维化,并能刺激肝组织细胞的增殖。研究结果证实复方植物药具有一药多靶的作用,是当今西医治疗所不能比拟的。

释度1:100), 4℃过夜, 分别滴加二抗(生物素化山羊抗兔IgG, 稀释度1:200; 山羊抗小鼠IgG抗体-HRP多聚体, 稀释度1:200), DAB显色。阴性对照以PBS替代TGF-β1和α-SMA抗体。应用LEICA Q500IW自动图像分析仪检测40倍物镜下, 测定免疫反应阳性细胞的吸光度(A)。并求其平均吸光度A值。

统计学处理 实验所得数据采用SPSS11.0统计软件进行单因素方差分析及其相关性分析。

2 结果

2.1 小鼠肝脏病变观察 正常对照组小鼠肝脏表面光亮, 颜色暗红, 边缘锐利, 大小及各叶的比例均正常, 模型组小鼠肝脏表面光亮度下降, 表面有小米粒样改变, 呈暗紫红色, 边缘圆钝, 质脆, 体缩小, 有的与周围组织有黏连, 且脾肿胀明显。预防组小鼠肝脏表面较光滑, 边缘微钝, 呈浅褐色, 肝肿大不明显, 未见明显脾肿胀。治疗30 d小鼠肝脏肿大, 表明粗糙, 呈深褐色; 治疗60 d小鼠肝脏表面逐渐光滑, 颜色呈浅褐色; 治疗90 d小鼠肝脏肿大不明显, 呈暗红色。与正常对照组比, 模型组肝表面呈中度锯齿状回声, 肝实质回声明显增强, 其中细点状分布明显增多, 预防组: 肝表面呈低度锯齿状回声, 肝实质回声减弱, 治疗组: 肝表面锯齿状回声不明显, 肝实质回声减弱, 其中点状分布不明显(图1)。

HE染色 正常对照组肝脏肝小叶结构正常, 肝细胞索排列规则有序, 未见脂肪变性、坏死, 无纤维增生; 模型组可见肝小叶结构紊乱, 肝细胞索失去放射状肝索结构, 纤维结缔组织增生形成纤维条索, 纤维宽窄不一, 分隔肝组织形成假小叶, 纤维间隔内可见慢性炎性细胞浸润, 部分肝细胞呈脂肪变; 预防组可见纤维组织增生减轻, 间隔内少量炎性细胞浸润, 肝细胞空泡样变性; 治疗组30 d, 可见纤维组织增生减轻, 大量的肝细胞均呈空泡样或脂肪样变性, 核固缩, 中央静脉周围可见形态趋于正常的肝细胞; 治疗组60 d, 变性坏死的肝细胞减少, 出现大量形态近似正常的肝细胞; 治疗90 d: 形态近似正常的肝细胞进一步增加。VG染色正常对照组未见明显的呈红褐色的胶原纤维; 模型组可见胶原纤维显著增多, 主要分布于被膜下、肝小叶间和中央静脉周围; 与模型组相比, 预防组和治疗组胶原纤维数量明显减少, 尤治疗组减少明显(图2)。PAS染色正常对照组肝细胞内含较多的呈紫红色的PAS阳性反应物; 模型组可见肝细胞内的PAS阳

表1 各组小鼠肝脏内TGF-β1、α-SMA平均光密度变化表(mean ± SD)

分组	正常对照组	模型组	预防组	治疗组
TGF-β1				
60 d	0.155	0.269 ^b	0.241 ^a	
90 d	0.155	0.306 ^b	0.264 ^a	
180 d	0.160	0.336 ^b	0.280 ^a	
治疗30 d				0.220 ^d
治疗60 d				0.203 ^d
治疗90 d				0.185 ^d
α-SMA				
60 d	0.150	0.269 ^b	0.240 ^a	
90 d	0.155	0.299 ^b	0.257 ^a	
180 d	0.160	0.322 ^b	0.278 ^a	
治疗30 d				0.245 ^d
治疗60 d				0.211 ^d
治疗90 d				0.185 ^d

^aP<0.05 vs 模型组; ^bP<0.01 vs 正常对照组; ^dP<0.01 vs 模型组180 d。

性反应物显著减少; 与模型组相比, 预防组和治疗组肝细胞内的PAS阳性反应物增多, 尤治疗组增多明显。

2.2 免疫组织化学标本观察 正常对照组肝脏中偶见TGF-β1表达; 模型组肝组织TGF-β1蛋白广泛分布, 尤集中于肝脏汇管区和增生的胶原间质, 着色呈均匀的浅棕色至深棕色; 预防组和治疗组阳染程度较模型组减轻, 尤治疗组明显(图3)。正常对照组肝脏中α-SMA阳性细胞较少, 多分布在小静脉周围; 模型组α-SMA蛋白分布广泛, 尤集中于增生的胶原间质, 着色呈均匀的浅棕色至深棕色; 预防组和治疗组(图4)阳染程度较模型组减轻, 尤治疗组明显。TGF-β和α-SMA平均吸光密度见表1。

3 讨论

慢性肝病所致的持续或反复的肝实质炎症及坏死, 可引起纤维结缔组织大量增生。因其降解活性相对或绝对不足, 导致大量细胞外基质的沉积形成肝纤维化。肝纤维化同时伴有肝小叶结构的破坏(肝再生结节), 则称肝硬化。本实验研究借助西医对肝硬化鉴定指标, 即肝脏结构被损坏、纤维化组织增生、纤维性结节的出现为标准, 观察植物药HTGK防治肝硬化的药效作用。

中医早在两千多年《灵枢·水胀篇》指出: “色苍黄, 腹筋起, 此其候也”, 说明前人对肝硬化已有深刻认识。现代中医认为肝硬化的基

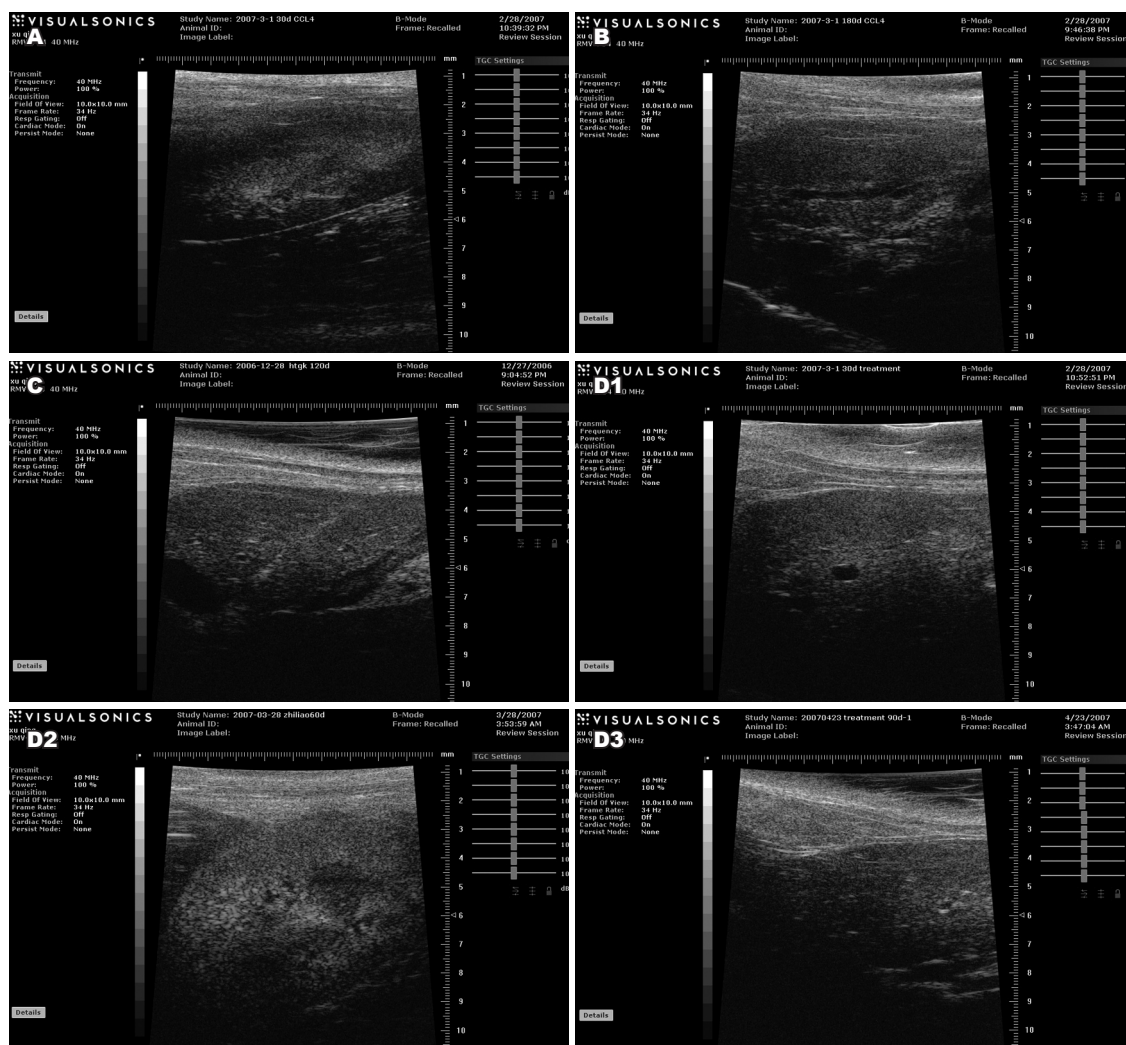


图 1 各组小鼠肝脏B超变化结果. A: 正常对照组; B: 模型180 d; C: 预防组180 d; D1: 治疗30 d; D2: 治疗60 d; D3: 治疗90 d.

应用要点

本文通过动物体内试验验证洪天肝康疗效, 为进一步临床应用提供可靠依据。

本病机是正衰邪盛, 肝郁脾肾气血虚, 导致血瘀。血瘀表现在肝硬化的病理上就是肝纤维化的形成。故治疗以益气养阴、柔肝舒郁, 佐以活血化瘀为主。HTGK属植物药, 采取益气解毒, 扶正祛邪的中医理论, 应用现代工艺提取黄芪、半枝莲、白芍等纯植物原料中的皂甙、黄酮等有效的活性成分, 通过健脾益气、活血化瘀、疏肝理气、软坚散结、利水消肿来维持机体的动态平衡, 防治肝硬化的形成。皂甙、黄酮已被证实具有保肝护肝、抗肿瘤^[14]、抗氧化、抗菌、抗病毒等作用^[15-18]。Kimura *et al*^[19]发现皂甙及类似物是肝细胞分裂素, 能诱导肝细胞DNA的合成。皂甙对鼠和人类肝脏特有的有机阴离子转运多肽具有抑制作用, 并且是他的一种运输底物^[20]。天然黄酮类化合物是植物体多酚类的内信号分子及中间体或代谢物。现代药理研究表明, 该类化学物质在心血管系统、内分泌系统和抗肿瘤方面具有明显的药理作用。特别是黄酮类化合

物的抗氧化性质, 引起学者们的广泛关注。

我们在制备肝硬化模型时, 使用HTGK灌服进行干预, 结果预防(干预)组各项指标均优于模型组, 特别是沿汇管区周的纤维增生程度显著降低, 而肝细胞内糖原含量可见明显增加。肝糖原是由许多葡萄糖分子聚合而成的物质, 正常状态下, 小肠黏膜细胞吸收单糖后, 由门静脉到达肝脏, 在肝内转变为肝糖原而贮存。当机体需要时, 肝细胞又能把肝糖原分解为葡萄糖, 转化为能量, 所以患肝病时常可见肝糖原的改变, 因此肝糖原的含量变化可作为肝细胞功能状态的指标之一。

已有研究证实肝细胞变性坏死后, 可激活单核吞噬细胞系统产生各种细胞因子, 如TGF- β 1、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)等, 细胞因子介导的细胞-细胞相互作用, 以及基质-细胞相互作用引起

同行评价

本文书写流畅,层次分明,内容详实,具有一定的参考价值.

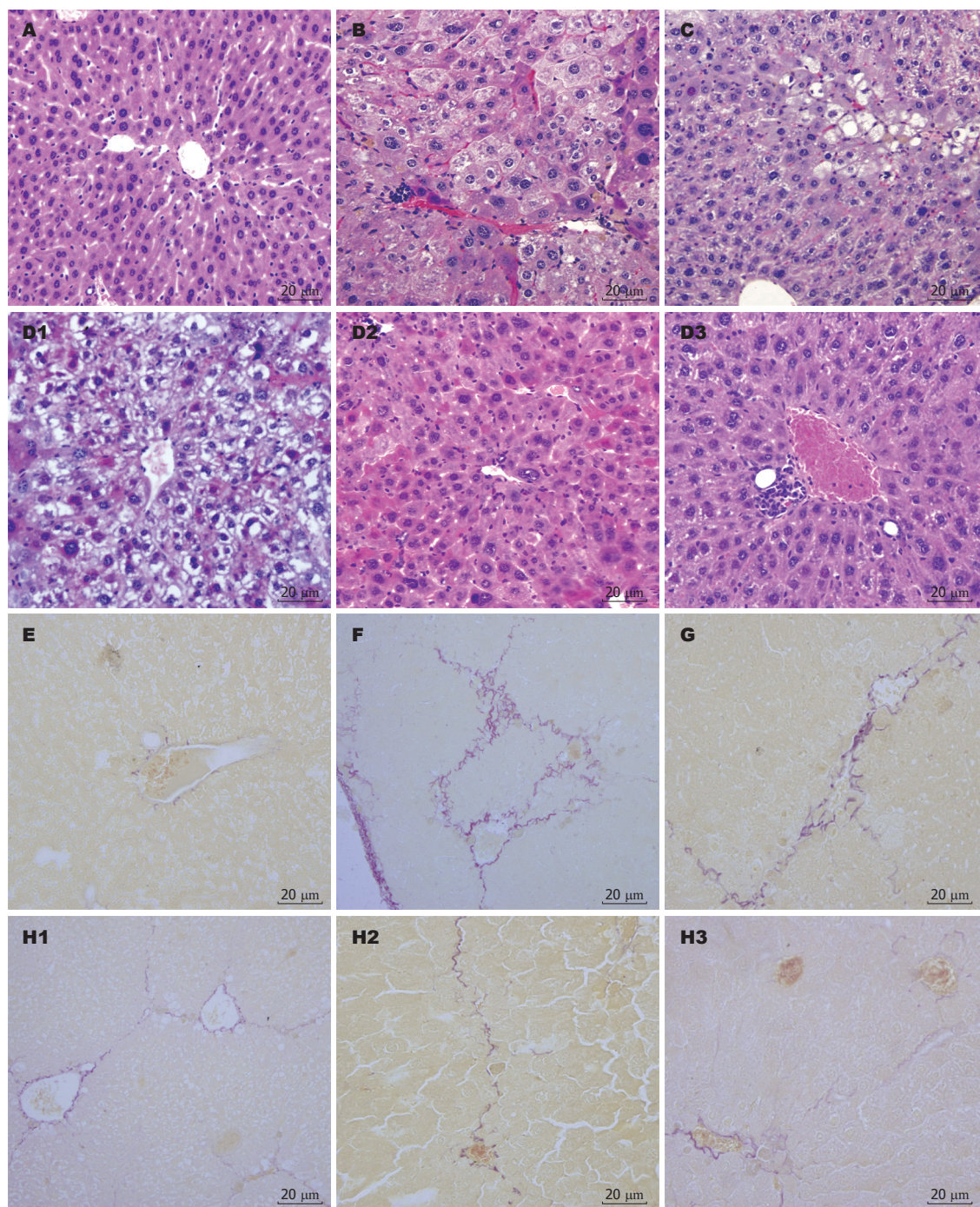


图2 各组小鼠肝脏HE染色结果. A: 正常对照组; B: 模型180 d; C: 预防组180 d; D1: 治疗30 d; D2: 治疗60 d; D3: 治疗90 d; E: 正常对照组; F: 模型180 d; G: 预防组180 d; H1: 治疗30 d; H2: 治疗60 d; H3: 治疗90 d.

的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活, 转化为肌纤维细胞(myofibroblastic-like cell, MFBLC), 表达多种细胞因子及受体, 并大量合成肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 而ECM的降解可引起肝纤维化的形成^[21-24]. 甚至肝小叶改建, 假小叶形成, 导致肝硬化发生. 生理状况下, 位于肝窦间隙的HSC处于静止状态, 与维生素A的贮存和代谢有关. 肝损伤后, HSC被活化, 胞质中肌性骨架蛋白, 如 α -SMA表达

增多, 分泌胶原等ECM的能力明显增强, 因此, HSC是肝纤维化发生发展的核心环节. α -SMA是HSC活化的重要标志^[25-26]. TGF- β 1是组织修复和肝纤维化的重要细胞因子^[27-29], 调控HSC的活化、增殖. 有研究表明, 肝组织TGF- β 1表达水平与肝组织纤维化程度密切相关, 在反映早期肝纤维化方面较透明质酸、层黏连蛋白、IV型胶原三项常规指标更敏感. TGF- β 1是维持肝脏内环境的相对稳定的细胞因子之一, TGF- β 1

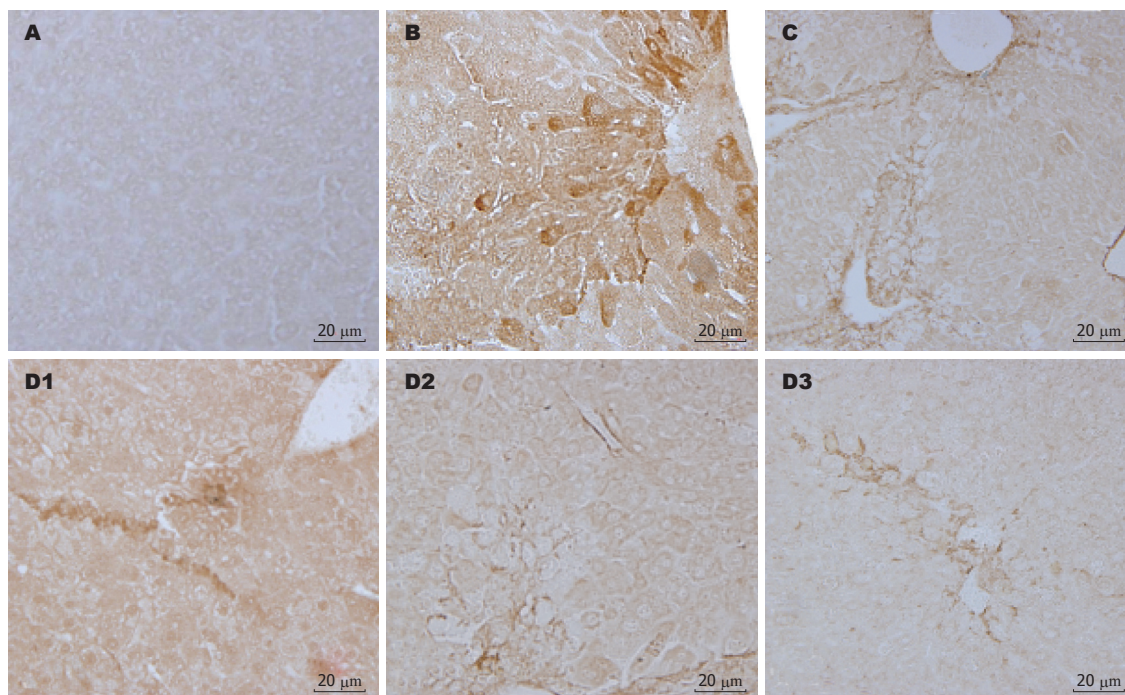


图 3 各组小鼠肝脏免疫组织化学TGF- β 1显色结果. A: 正常对照组; B: 模型180 d; C: 预防组180 d; D1: 治疗30 d; D2: 治疗60 d; D3: 治疗90 d.

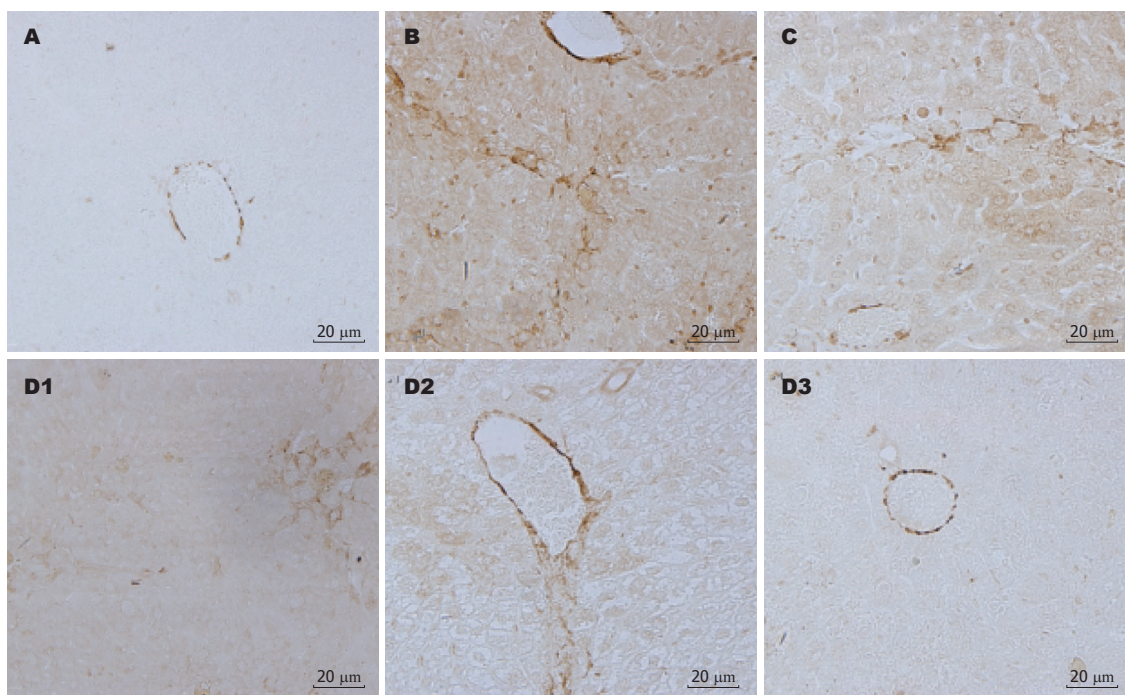


图 4 各组小鼠肝脏免疫组织化学 α -SMA显色结果. A: 正常对照组; B: 模型180 d; C: 预防组180 d; D1: 治疗30 d; D2: 治疗60 d; D3: 治疗90 d.

具有免疫调节、细胞分化、ECM形成等多种作用。TGF- β 1在炎症早期具有免疫刺激功能, 在炎症中后期具有免疫抑制活性, 能抑制Th1细胞亚群的激活与分化, 减少白介素2, 白介素12(IL2, IL12)和干扰素 γ (IFN γ)等细胞因子的分泌^[30]。Peter博士认为肝病患者体内普遍缺乏免疫诱导

素, 导致肝脏长期处于免疫缺陷状态, 这也是肝脏疾病产生和久治不愈的根本原因。如能让肝脏产生免疫力, 才能从源头上清除肝病毒素, 使肝病转阴后不复发。

本实验结果显示, HTGK下调TGF- β 1蛋白表达方面作用显著, 可能是在降低炎性反应的

同时阻止了HSC活化,导致TGF- β 1蛋白表达下调,胶原合成减少,通过解除免疫抑制增强机体免疫功能、促进肝细胞修复、改善机体整体的抗病能力,但最终解析HTGK促进硬化肝组织结构修复的作用机制还有待于进一步研究。

药物的靶向性是指药物直接作用于靶区(靶器官、靶组织、靶细胞),靶向给药可提高疗效,降低全身毒副作用^[31-32]。HTGK的研制使用了入肝经的植物药材和药引,研究结果证实HTGK能有效的抗肝纤维化、防止肝硬化形成。通过我们的实验研究进一步证实对中医药的研究必须立足于中医理论的整体观,在解决病变部位这一主要矛盾外,同时要调整机体的平衡,增强免疫力,以达到标本兼治的目的。中医药理论既古老又现代,在现代化技术发展的今天仍指导着医药现代化的发展,并为靶向用药的研究指明了方向。

4 参考文献

- Hsu YC, Chiu YT, Cheng CC, Wu CF, Lin YL, Huang YT. Antifibrotic effects of tetrandrine on hepatic stellate cells and rats with liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 99-111
- Tillmann HL. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 125-140
- Zhang LJ, Zheng WD, Shi MN, Wang XZ. Effects of interleukin-10 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells in fibrotic rat liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1918-1923
- Lin YL, Lee TF, Huang YJ, Huang YT. Antiproliferative effect of salvianolic acid A on rat hepatic stellate cells. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 933-939
- Bergheim I, Guo L, Davis MA, Lambert JC, Beier JL, Duveau I, Luyendyk JP, Roth RA, Arteel GE. Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: Critical role of plasminogen activator inhibitor-1. *Gastroenterology* 2006; 130: 2099-2112
- Liu JY, Chen CC, Wang WH, Hsu JD, Yang MY, Wang CJ. The protective effects of Hibiscus sabdariffa extract on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 336-343
- Jonassen TE, Christensen S, Marcussen N, Petersen JS. Intrarenal octreotide treatment prevents sodium retention in liver cirrhotic rats: evidence for direct effects within the thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F537-F545
- Ruddell RG, Oakley F, Hussain Z, Yeung I, Bryan-Lluka LJ, Ramm GA, Mann DA. A role for serotonin (5-HT) in hepatic stellate cell function and liver fibrosis. *Am J Pathol* 2006; 169: 861-876
- Liu SQ, Yu JP, Chen HL, Luo HS, Chen SM, Yu HG. Therapeutic effects and molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract on liver fibrosis in rats. *Am J Chin Med* 2006; 34: 99-114
- Li Q, Liu DW, Zhang LM, Zhu B, He YT, Xiao YH. Effects of augmentation of liver regeneration recombinant plasmid on rat hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2438-2443
- Jeong DH, Lee GP, Jeong WI, Do SH, Yang HJ, Yuan DW, Park HY, Kim KJ, Jeong KS. Alterations of mast cells and TGF- β 1 on the silymarin treatment for CCl₄-induced hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1141-1148
- Oakley F, Meso M, Iredale JP, Green K, Marek CJ, Zhou X, May MJ, Millward-Sadler H, Wright MC, Mann DA. Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2005; 128: 108-120
- Di Sario A, Bendia E, Taffetani S, Omenetti A, Candelaresi C, Marziani M, De Minicis S, Benedetti A. Hepatoprotective and antifibrotic effect of a new silybin-phosphatidylcholine-Vitamin E complex in rats. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 869-876
- Salvi M, Fiore C, Armanini D, Toninello A. Glycyrrhetic acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 2375-2379
- Lin JC. Mechanism of action of glycyrrhizic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro. *Antiviral Res* 2003; 59: 41-47
- Romero MR, Efferth T, Serrano MA, Castaño B, Macias RI, Briz O, Marin JJ. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system. *Antiviral Res* 2005; 68: 75-83
- Cherng JM, Lin HJ, Hsu YH, Hung MS, Lin JC. A quantitative bioassay for HIV-1 gene expression based on UV activation: effect of glycyrrhizic acid. *Antiviral Res* 2004; 62: 27-36
- Tandon A, Tandon BN, Bhujwala RA. Clinical spectrum of acute sporadic hepatitis E and possible benefit of glycyrrhizin therapy. *Hepatol Res* 2002; 23: 55-61
- Kimura M, Inoue H, Hirabayashi K, Natsume H, Ogihara M. Glycyrrhizin and some analogues induce growth of primary cultured adult rat hepatocytes via epidermal growth factor receptors. *Eur J Pharmacol* 2001; 431: 151-161
- Ismair MG, Stanca C, Ha HR, Renner EL, Meier PJ, Kullak-Ublick GA. Interactions of glycyrrhizin with organic anion transporting polypeptides of rat and human liver. *Hepatol Res* 2003; 26: 343-347
- Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- Zhang X, Yu WP, Gao L, Wei KB, Ju JL, Xu JZ. Effects of lipopolysaccharides stimulated Kupffer cells on activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 610-613
- Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159
- Gaca MD, Zhou X, Issa R, Kiriella K, Iredale JP, Benyon RC. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol* 2003; 22: 229-239
- Mathurin P, Xiong S, Kharbanda KK, Veal N, Miyahara T, Motomura K, Rippe RA, Bachem MG, Tsukamoto H. IL-10 receptor and coreceptor

- expression in quiescent and activated hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G981-G990
- 26 Uchio K, Tuchweber B, Manabe N, Gabbiani G, Rosenbaum J, Desmoulière A. Cellular retinol-binding protein-1 expression and modulation during in vivo and in vitro myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells and portal fibroblasts. *Lab Invest* 2002; 82: 619-628
- 27 Breitskopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 121S-131S
- 28 Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int* 2006; 26: 8-22
- 29 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- 30 Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, Neurath MF. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 2006; 55: 671-680
- 31 Phillips KA, Veenstra DL, Sadee W. Implications of the genetics revolution for health services research: pharmacogenomics and improvements in drug therapy. *Health Serv Res* 2000; 35: 128-140
- 32 Muvaffak A, Gurhan I, Gunduz U, Hasirci N. Preparation and characterization of a biodegradable drug targeting system for anticancer drug delivery: microsphere-antibody conjugate. *J Drug Target* 2005; 13: 151-159

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

欢迎订阅 2008 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

《世界华人消化杂志》报道消化疾病的评论及临床和基础研究,包括消化肿瘤学、消化感染病学、消化内科学、消化外科学、消化内镜学、消化影像学、消化介入治疗学、消化中医药、中西医结合学、消化基础研究、消化病理学、消化循证医学等内容。

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号 CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8, 18, 28日,月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023, 北京市2345信箱。联系电话: 010-85381901-638; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>。

小鼠胰腺腺泡细胞系MPC-83中功能性G蛋白偶联受体的缺失

程海立, 王琳, 崔宗杰

■背景资料

胰腺腺泡细胞合成、分泌消化酶, 为动物对食物进行消化所必需。胰腺腺泡细胞表面G蛋白偶联受体(GPCR)调控消化酶的分泌。胰腺腺泡细胞系是开展这方面研究的重要工具。目前应用最广泛的是Longnecker *et al* 通过重氮丝氨酸诱导而于1979年建立的大鼠胰腺腺泡肿瘤细胞系AR4-2J。

程海立, 王琳, 崔宗杰, 北京师范大学细胞生物学研究所 北京市 100875

程海立, 中国协和医科大学药物研究所硕士在读, 主要从事微生物与生化药理学方向的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30472048, No. 3054042524
北京市自然科学基金资助项目, No. 6062014

作者贡献分布: 实验操作由程海立和王琳完成; 项目构思、实验指导和论文定稿由崔宗杰负责。

通讯作者: 崔宗杰, 100875, 北京市, 北京师范大学细胞生物学研究所, zjcui@bnu.edu.cn

电话: 010-58809162

收稿日期: 2007-09-15 修回日期: 2008-01-23

Complete loss of functional G protein-coupled receptors in mouse pancreatic acinar cell MPC-83

Hai-Li Cheng, Lin Wang, Zong-Jie Cui

Hai-Li Cheng, Lin Wang, Zong-Jie Cui, Institute of Cell Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30472048, No. 3054042524, and the Natural Science Foundation of Beijing, No. 6062014

Correspondence to: Zong-Jie Cui, Institute of Cell Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China. zjcui@bnu.edu.cn

Received: 2007-09-15 Revised: 2008-01-23

Abstract

AIM: To study G-protein-coupled receptor (GPCR) in mouse exocrine pancreatic acinar cell line MPC-83.

METHODS: Cytoplasmic calcium concentration in mouse exocrine pancreatic acinar cell line MPC-83 was measured both before and after stimulation with GPCR agonists.

RESULTS: Acetylcholine (ACh, 25 nmol/L) and cholecystokinin (CCK, 5 pmol/L) induced regular calcium oscillations in freshly isolated normal mouse pancreatic acinar cells. When GPCR agonists CCK (1 μ mol/L), vasopressin (VP, 1 μ mol/L), substance P (5 μ mol/L), histamine (10 μ mol/L), phenylephrine (PE, 10 μ mol/L) and ACh 100 μ mol/L were added to MPC-83 cells, no change of intracellular calcium concentration

was detected. After 100 nmol/L dexamethasone pre-treatment of MPC-83 cells for 72 h, MPC-83 cell proliferation was reduced, but still no calcium increases were detected after stimulation with GPCR agonists 1 μ mol/L CCK, 1 μ mol/L VP and 5 μ mol/L substance P.

CONCLUSION: The pancreatic acinar tumor cell line MPC-83 from Kunming mice have completely lost their functional GPCR which are normally present in pancreatic acinar cells, and these cells are in extreme de-differentiation state.

Key Words: Pancreatic acinar cell line; G protein-coupled receptor; Cytoplasm calcium oscillation; Fura-2; De-differentiation; MPC-83 cells

Cheng HL, Wang L, Cui ZJ. Complete loss of functional G protein-coupled receptors in mouse pancreatic acinar cell MPC-83. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 590-595

摘要

目的: 研究小鼠胰腺腺泡细胞系MPC-83细胞中功能性G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)。

方法: 培养小鼠胰腺腺泡细胞系MPC-83细胞, 检测其刺激前后胞质游离钙离子浓度的变化。

结果: ACh 25 nmol/L刺激新鲜分离的正常小鼠胰腺腺泡细胞, 胞质钙离子浓度发生规则、振荡样升高; CCK 5 pmol/L具有类似作用。GPCR激动剂CCK 1 μ mol/L、VP 1 μ mol/L、P物质5 μ mol/L、组织胺10 μ mol/L、PE 10 μ mol/L和ACh 100 μ mol/L分别刺激MPC-83细胞, 胞质钙离子没有发生任何增加。地塞米松100 nmol/L与MPC-83细胞共孵育72 h, MPC-83细胞增殖速度明显降低, 但GPCR配体CCK、VP、P物质仍然不引起胞质钙离子浓度的增加。

结论: 从昆明小鼠胰腺外分泌部肿瘤分离出来的胰腺腺泡细胞系MPC-83, 正常的G蛋白偶联受体完全缺失, 处于极度去分化状态。

■同行评议者

施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科

关键词: 胰腺腺泡细胞; G蛋白偶联受体; 胞质钙离子振荡; Fura-2; 去分化; MPC-83细胞

程海立, 王琳, 崔宗杰. 小鼠胰腺腺泡细胞系MPC-83中功能性G蛋白偶联受体的缺失. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 590-595

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/590.asp>

0 引言

胰腺腺泡细胞合成、分泌多种消化酶如淀粉酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、脂酶、核酸酶^[1]. 消化酶/酶原的合成和分泌受到胰腺腺泡细胞表面多种G蛋白偶联受体(GPCR)的调控, 如CCK1受体、M3受体、P物质受体^[2]. 刺激新鲜分离的胰腺腺泡细胞表面的GPCR, 可以得到接近在体状态的消化酶分泌水平^[3]. 但在实际工作中, 往往也需要可传代的、近似生理状态的胰腺腺泡细胞系.

目前ATCC收录的胰腺外分泌细胞系有6种, 分别是PANC-1、SW1990、ARIP、DSL-6A/C1、DSL-6B/C2和AR4-2J^[4]. PANC-1、SW 1990来自人^[5-6], 其余4种来自大鼠^[7-8]; 没有来自小鼠的胰腺外分泌细胞系. 6种胰腺外分泌细胞系中, SW1990是由脾转移的肿瘤细胞, PANC-1、DSL-6A/C1、DSL-6B/C2是胰腺导管细胞^[5-7]. ARIP和AR4-2J是大鼠胰腺腺泡肿瘤细胞系; AR4-2J既有致瘤性, 也能分泌淀粉酶和其他胰腺消化酶^[8]. 近年也有人认为ARIP具有导管细胞的特性^[9].

AR4-2J是Longnecker *et al*^[10]建立的重氮丝氨酸诱导的大鼠胰腺腺泡肿瘤细胞系. AR4-2J同时具有外分泌和神经内分泌细胞的特性^[11], 也可被诱导向胰岛细胞表型分化^[12]. 地塞米松(dexamethasone, Dex)处理后, AR4-2J的外分泌表型加强, 胰岛内分泌表型减弱^[13]. Dex处理6 h后, 淀粉酶分泌开始上升, 细胞生长变缓^[12-14].

AR4-2J细胞典型地含有电压依赖性钙离子通道L、P、N^[15]. Ghrelin刺激AR4-2J细胞导致其胞内钙离子浓度的双相增加, L型钙离子通道在第二相中具有关键作用^[16]. CCK刺激AR4-2J, 诱发钙振荡的出现^[17]和淀粉酶的分泌^[18]. 植物血凝素抑制CCK-8与AR4-2J细胞CCK受体的结合^[19].

我国科学家建立的小鼠胰腺腺泡肿瘤细胞系MPC-83, 来自1983年发现的1例♂昆明种小鼠胰腺自发性瘤^[20-22]. MPC-83细胞可在小鼠皮下连续传代220代^[21]. MPC-83细胞, 在胞质含酶原颗

粒和丰富的脂酶颗粒^[21]. MPC-83皮下移植传代后仍然具有胰腺腺泡细胞消化酶活性^[22]. 研究发现, MPC-83可作为生物反应调节剂(BRM)抗肿瘤实验研究的细胞模型^[23].

AR4-2J建系后到目前为止, 以AR4-2J为研究对象的论文超过1000篇. 但是对MPC-83细胞基本特性的研究, 尚鲜见报道. 因而本工作的目的是研究MPC-83细胞是否存在相关的功能性GPCR.

正常胰腺腺泡细胞表面最主要分泌刺激物(secretagogue)受体是CCK1受体和M3受体. 两种都通过Gq/11与PLC β 信号系统偶联^[2], 低浓度ACh、CCK刺激引发胞内游离钙离子浓度的振荡性升高^[3,24-26]. 随着ACh和CCK刺激浓度的增加, 钙离子浓度的振荡性升高逐渐转换为高台样升高^[3,26-27]. 这种浓度依赖性变化在其他细胞也普遍存在, 如淋巴细胞、肝细胞、成纤维细胞和胰岛 β 细胞^[28]. 所以本文通过检测胞质钙离子浓度的升高, 来判断MPC-83细胞是否具有相关的功能性GPCR.

1 材料和方法

1.1 材料 胆囊收缩素八肽(CCK-8)、血管加压素(VP)、苯肾上腺素(PE)、乙酰胆碱(ACh)、P物质(substance P)、组织胺(histamine)、胰蛋白酶(trypsin)均为美国Sigma-Aldrich公司产品. Fura-2 AM为美国Molecular Probes(Eugene, OR)公司或AnaSpec(San Diego, CA, USA)产品. 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid(HEPES)为德国Boehringer Mannheim公司产品.

小鼠胰腺腺泡肿瘤细胞系MPC-83购自协和医科大学肿瘤研究所细胞室, 用含100 mL/L胎牛血清(FBS, Hyclone)的RPMI 1640培养液, 在50 mL/L CO₂培养箱中37℃培养. MPC-83细胞传代开始时1 d换培养液1次, 长至50%以上闭合度后, 至少每12 h换液一次. 培养所用RPMI 1640培养基(Invitrogen), 配制时加入HEPES 10 mmol/L, 青霉素和各链霉素100 U/L, NaHCO₃ 2 g/L, pH值7.2. 细胞传代时用0.25%胰酶/EDTA 0.53 mmol/L消化. 细胞冻存时成份为60% RPMI 1640, 30% FBS, 10% DMSO.

1.2 方法 正常胰腺腺泡的分离见文献报道^[3, 26]. 分离腺泡细胞用胶原水解酶P(Roche)和机械吹打, 分离后用150线的尼龙网或不锈钢网过滤. 消化后残留的胶原水解酶, 通过在含有4%牛血

■ 相关报道

我国科学家胡美英 *et al* 于1983年发现1例雄性昆明种小鼠胰腺自发性瘤MPC-83, 并可连续传代. 但是对于MPC-83的细胞生理学, 所知甚少.

■ 研究前沿

G蛋白偶联受体(GPCR)种类繁多,其基因占人类基因组的5%,临床用药的1/3作用于约60种常见的GPCR。正常胰腺腺泡细胞表面最主要分泌刺激物(secretagogue)受体CCK1受体和M3受体等都通过Gq/11与PLC β 信号系统偶联,受到低浓度激动剂刺激后引发胞质游离钙离子浓度的振荡性升高。因而可以通过检测钙振荡的变化,来判断MPC-83细胞是否具有相关的功能性GPCR。这对于正常、肿瘤胰腺腺泡细胞差异性研究具有重要意义,是当前肿瘤生物学研究的热点之一。

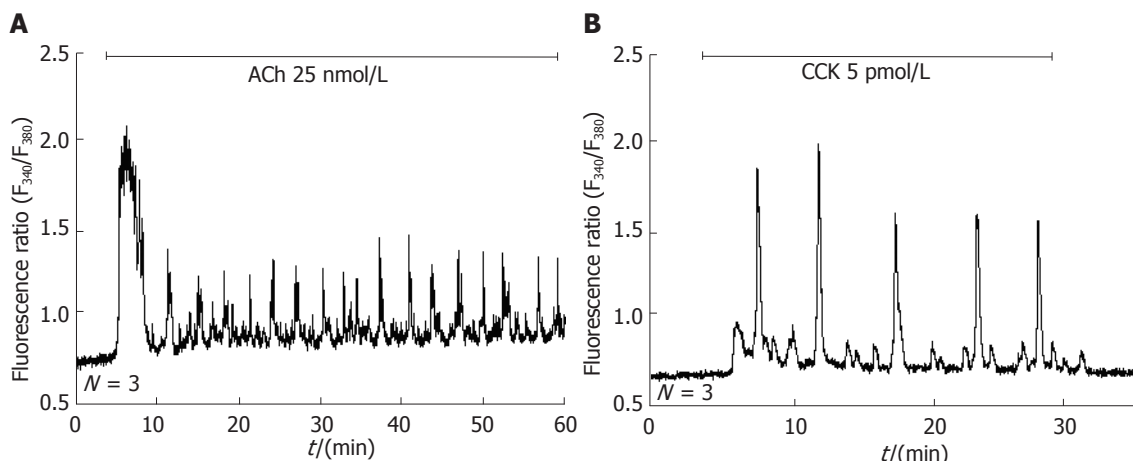


图1 ACh、CCK在正常小鼠胰腺腺泡细胞诱发胞质规则钙振荡。A: ACh 25 nmol/L; B: CCK 5 pmol/L。横条表示给药时间,每个记录是3次相同试验的典型结果。

清白蛋白(BSA)的缓冲液中离心而去除。

1.2.1 细胞胞质钙离子浓度的测量: 细胞用Fura-2 AM(终浓度5 μ mol/L)加载1 h,在单细胞钙离子测量系统(DelatRam V, Photon Technology Incorporation, New Jersey, USA)的倒置荧光显微镜(Olympus IX70)下,检测细胞胞质钙浓度的变化。单色仪交替以340 nm/380 nm波长激发Fura-2,采集荧光发射波长>510 nm,钙离子浓度以荧光强度比 F_{340}/F_{380} 表示。实验过程中用缓冲液灌流细胞15-20 min,记录静息状态下的钙离子浓度的基础值,之后灌流含不同浓度刺激物的缓冲液,刺激细胞。灌流细胞用缓冲液成份如下(mmol/L): NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.5, $MgCl_2$ 1.13, NaH_2PO_4 1.0, D-葡萄糖5.5, HEPES 10, pH7.4, 充氧30 min后使用。试验过程中通过Felix32软件(Photon Technology Incorporation, New Jersey, USA)自动得到以荧光强度比值 F_{340}/F_{380} 为纵坐标,时间为横坐标的钙离子浓度随时间动态变化图。数据后期处理使用SigmaPlot软件重新做图和标注。

1.2.2 Dex处理: 对于形态学实验,首先用Dex 100 nmol/L处理3 d,之后将对照和Dex 100 nmol/L处理过的MPC-83细胞在盖玻片爬片,12 h后细胞贴壁,加载MitoTracker(100 nmol/L)1 h。加载MitoTracker的细胞在FV300(Olympus, Japan)激光共聚焦显微镜(IX70, Olympus, Japan)成像。对于细胞增殖实验,将细胞在24孔培养板接种,在平行孔中分别接种细胞后,对照细胞加正常培养基,实验组加含Dex 100 nmol/L的培养基。在不同时间将细胞用胰酶消化后记数。每组实验都进行平行3组实验。

统计学处理 细胞记数后用SigmaPlot做图,

绘制细胞生长曲线,细胞数以mean \pm SE表示。细胞生长曲线中细胞数目的差异用Student's *t*检验进行统计学分析, $P<0.05$ 时为差异显著。

2 结果

2.1 ACh、CCK在新鲜分离的正常小鼠胰腺腺泡细胞引发规则钙振荡 新鲜分离的正常小鼠胰腺腺泡细胞,经ACh 25 nmol/L刺激后,出现规则的钙离子浓度的振荡样增加;CCK 5 pmol/L刺激也出现规则钙振荡(图1)。这些结果说明,在正常的新鲜分离的小鼠胰腺腺泡细胞,分泌刺激物(secretagogue) ACh、CCK都引发规则钙振荡;显示在正常细胞,存在功能性的胆碱能和CCK受体(图1)。

2.2 不同GPCR配体对小鼠胰腺腺泡肿瘤细胞MPC-83胞质钙离子浓度的影响 为了验证在培养的MPC-83细胞,是否存在胆碱能和CCK受体,首先用CCK、ACh刺激MPC-83细胞。低浓度ACh 25 nmol/L、CCK 5 pmol/L没有任何作用(结果未显示);当浓度分别增加到ACh 100 μ mol/L、CCK 1 μ mol/L,也没有发现胞质钙离子浓度的明显增加(图2A-B)。其他GPCR受体激动剂P物质5 μ mol/L、组织胺10 μ mol/L、phenylephrine(PE) 10 μ mol/L、vasopressin(VP) 1 μ mol/L高浓度刺激,钙离子浓度也都没有发生明显变化(图2C-F)。其中在一个细胞,ACh刺激后有轻微增加(图2B);但是在后续的两次试验中,这一增加也没有重复出现。

2.3 细胞促分化剂Dex对MPC-83细胞的作用 已知在大鼠胰腺腺泡细胞系AR4-2J,糖皮质激素Dex处理后,细胞趋于进一步分化的状态;细胞酶原颗粒增加^[14,29]。因而在本试验中,MPC-83细

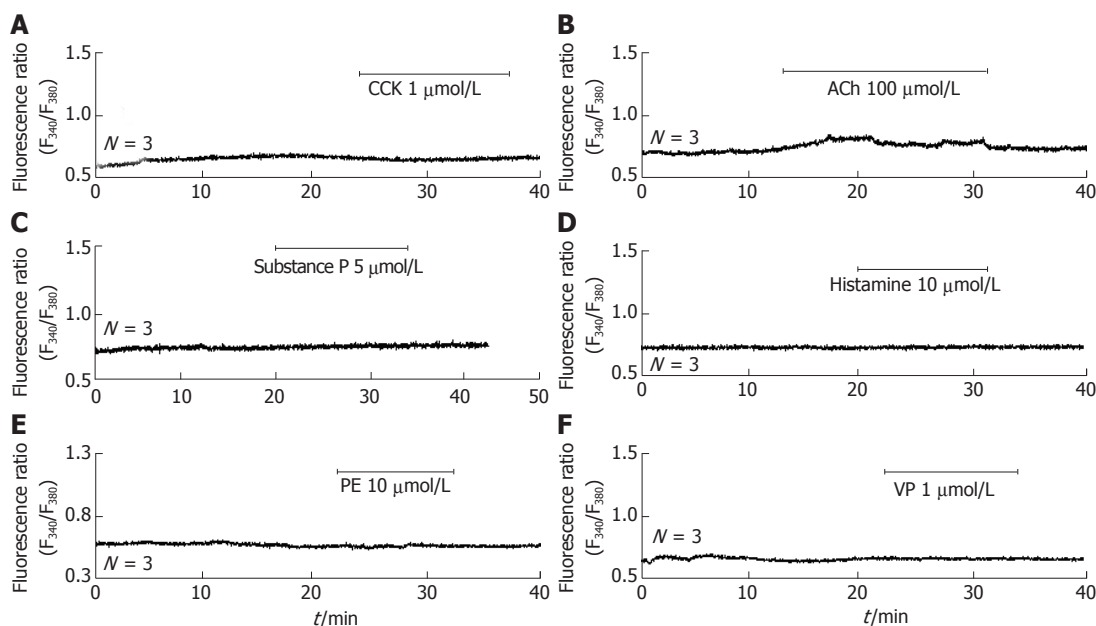


图2 受体激动剂刺激MPC-83细胞后,胞质钙离子浓度没有明显增加。A: CCK; B: ACh; C: P物质; D: 组织胺; E: PE; F: VP。横条表示给药时间,每个记录是3次相同试验的典型结果。

■名词解释

钙振荡:体内细胞受到生理性刺激后,所产生的最早的反应之一是胞质中钙离子浓度的升高。钙离子浓度的升高在单个细胞水平多以振荡的形式出现,即钙离子浓度随着时间的变化出现很规则的钙峰。钙振荡的出现使得胞质钙离子浓度可以进行多种方式的调制,如振幅调制(AM)、频率调制(FM)。因而通过振荡的方式胞质钙离子浓度变化可以编码成复杂多样的信号,使得钙离子可以特异性调控细胞的多种功能。

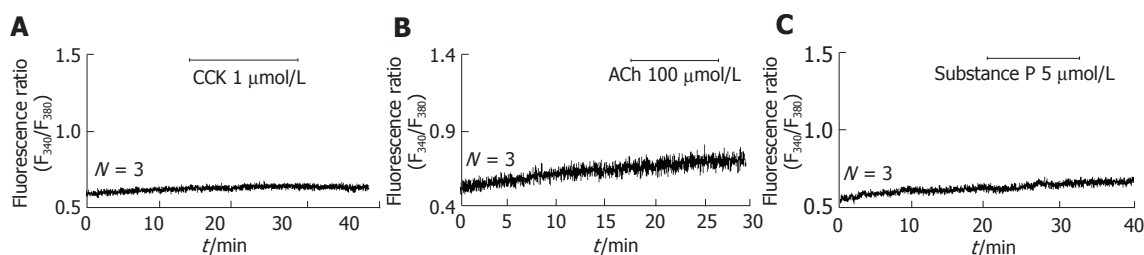


图3 CCK、ACh和P物质刺激Dex处理后的MPC-83细胞,胞质钙离子浓度没有增加。A: CCK; B: ACh; C: P物质。横条表示给药时间,图中每个记录代表3次实验的典型结果。

胞也用Dex进行了处理。用含有Dex 100 nmol/L的RPMI 1640培养基,培养MPC-83细胞72 h后,发现MPC-83细胞对CCK 1 $\mu\text{mol/L}$ 、ACh 100 $\mu\text{mol/L}$ 和P物质 5 $\mu\text{mol/L}$ 仍然没有任何反应(图3A-C)。这些结果揭示,糖皮质激素Dex在MPC-83细胞,不能有效诱导CCK、ACh和P物质受体的表达。从形态学上来看,Dex处理后,细胞没有发生明显变化。MitoTracker荧光成像发现,MPC-83细胞胞质充满线粒体;Dex处理后,线粒体有增多的趋势(图4)。MPC-83细胞的生长曲线呈典型的S型曲线;Dex处理后,生长曲线明显变缓,细胞生长速度从第48小时开始有显著差异(图5)。

3 讨论

本项工作研究昆明小鼠胰腺腺泡细胞肿瘤来源的细胞系MPC-83,可能存在的G蛋白偶联受体。研究发现:1/MPC-83细胞用ACh、CCK、P物质、组织胺、VP、PE刺激都没有引发胞质钙离子浓度的变化;2/Dex 100 nmol/L处理72 h,

ACh、CCK、P物质仍然没有反应;3/Dex处理后,MPC-83细胞整体形态没有明显变化,但是线粒体密度有增加的趋势;4/Dex处理后,MPC-83细胞生长速度明显变缓;5/作为对照,低浓度的ACh和CCK在新鲜分离的正常小鼠胰腺腺泡细胞,可以诱发出规则钙振荡。

已知CCK在生理浓度(5-50 pmol/L)可引发新鲜分离的啮齿类胰腺腺泡细胞产生规则钙振荡,>50 pmol/L引发 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的高台样升高^[3,26-27]。ACh也具有类似的浓度依赖关系,纳摩尔水平(如25 nmol/L)的ACh,就可以有效诱导啮齿类胰腺腺泡细胞中钙振荡的出现;更高浓度导致钙离子的高台样升高^[3,26-27]。ACh和CCK分别通过M3型胆碱能受体和CCK1型CCK受体,发挥作用^[25]。在本试验中,刺激MPC-83细胞的ACh、CCK浓度分别增加到100 $\mu\text{mol/L}$ 和1 $\mu\text{mol/L}$ 后,MPC-83细胞仍然没有钙离子浓度的明显升高。这说明在MPC-83细胞,不存在功能性ACh和CCK受体。同样,高浓度的G蛋白偶联受体激动

■同行评价

本研究紧密围绕临床实践,具有一定的临床指导意义。

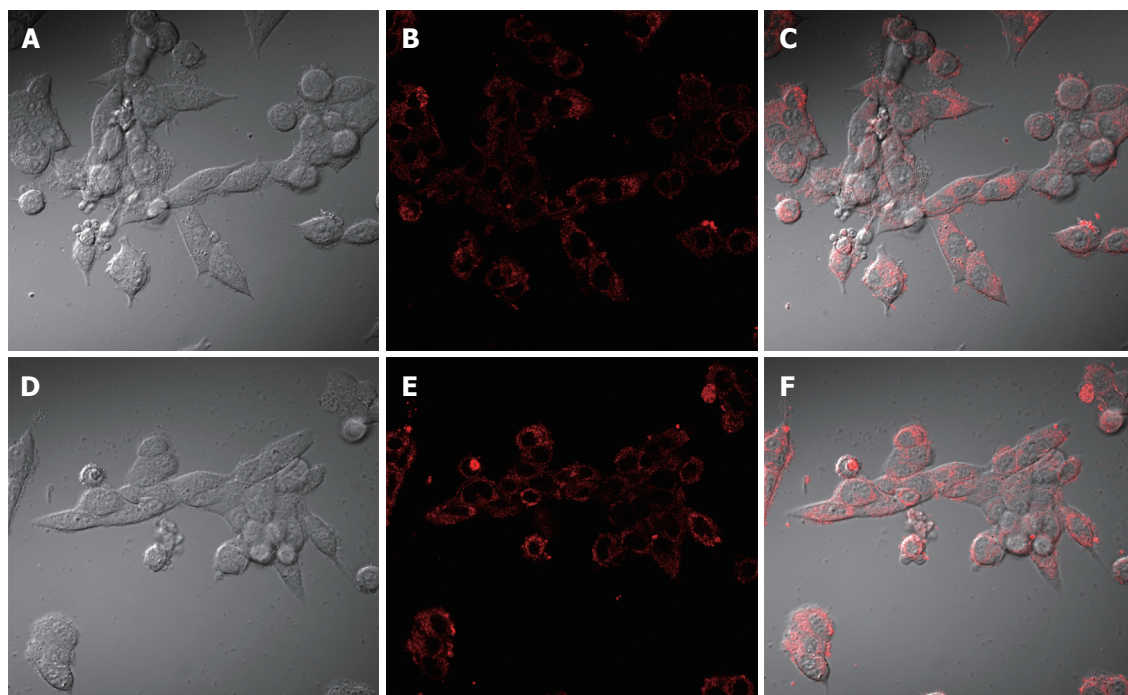


图4 Dex处理对MPC-83细胞形状和增殖的影响, Dex 100 nmol/L加入MPC-83细胞培养液72 h后, 加载MitoTracker, 分别将对照细胞(A, B, C)和Dex处理过的细胞(D, E, F)进行共聚焦成像。A, D: 明场图; B, E: 荧光图; C, F: 明场和荧光的叠加图。

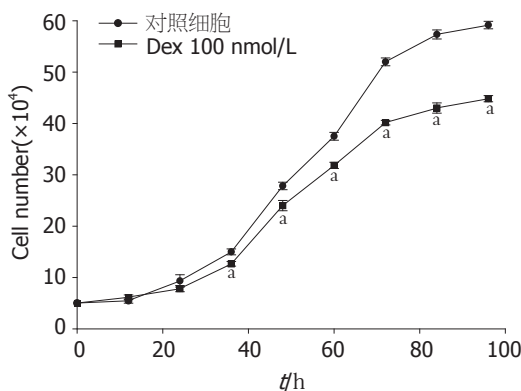


图5 Dex 100 nmol/L对MPC-83细胞增殖的影响。没有加Dex和加Dex的细胞, 每隔12 h各取三孔计数, 绘制生长曲线。^a $P < 0.05$ vs 对照细胞。

剂VP、P物质、组织胺和PE, 也不刺激MPC-83细胞胞质钙离子浓度的明显增加。在所有实验结束后蒸馏水灌流, 都导致胞质钙离子的大幅增加(没有显示), 说明MPC-83细胞存在水通道。综合考虑以上实验结果, 昆明小鼠胰腺腺泡细胞系MPC-83, 不含功能性G蛋白偶联受体, 细胞处于高度去分化状态。

肿瘤细胞增殖迅速, 使细胞的原有功能受到抑制。肿瘤细胞增殖越快, 其分化程度越低。MPC-83细胞生长旺盛, 用含胎牛血清100 mL/L的RMPI 1640培养基培养, 细胞需12 h换液一次, 两天可传代一次。检测MPC-83细胞静息状态下胞质钙离子浓度的试验证实, 对细胞进行灌流,

胞质钙离子浓度保持不变。但是在1次试验中(共6次), 记录到细胞的自发钙振荡(结果没有显示)。

在重氮丝氨酸诱导的大鼠胰腺腺泡肿瘤细胞AR4-2J, Dex处理抑制AR4-2J细胞的增殖, 但是细胞的淀粉酶含量增加, Dex有效促进AR4-2J向外分泌表型分化^[29-30]。在本实验中, 用Dex 100 nmol/L处理MPC-83细胞, 处理过的细胞对CCK、ACh、P物质的刺激仍然没有任何反应。

Dex处理MPC-83细胞72 h后, 处理细胞与正常细胞比较, 线粒体密度有明显增加。生长曲线比较显示, Dex处理过的MPC-83细胞, 其增殖速度明显变缓。说明和AR4-2J一样, Dex能够抑制MPC-83细胞的增殖, 并促进其分化。

至于MPC-83细胞为何不含功能性的G蛋白偶联受体, 将来需要进行更加深入的研究。有几个可能: G蛋白偶联受体得到表达, 但是所偶联的G蛋白、或磷脂水解酶C缺失, 或者GPCR-G-PLC都存在, 但是钙离子信号系统的相关蛋白如IP3R、SERCA/PMCA缺失。尽管如此, MPC-83细胞可能具有AR4-2J细胞所不具备的优点。MPC-83细胞没有内源性的胰腺腺泡细胞促分泌(secretagogue)受体, 因而这一细胞系可以用来表达外源性的G蛋白偶联受体, 并研究这些外源表达的受体, 如何随着表达程度的变化调控细胞消化酶的分泌。也可用MPC-83细胞来重构胰腺

腺泡细胞的钙离子振荡系统, 分析钙振荡发生的分子基础。

4 参考文献

- Petersen OH, Burdakov D, Tepikin AV. Polarity in intracellular calcium signaling. *Bioessays* 1999; 21: 851-860
- Iacovelli L, Salles M, Mariggio S, de Blasi A. Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *FASEB J* 1999; 13: 1-8
- An YP, Xiao R, Cui H, Cui ZJ. Selective activation by photodynamic action of cholecystokinin receptor in the freshly isolated rat pancreatic acini. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 872-880
- Silver K, Yao F. ARIP cells as a model for pancreatic beta cell growth and development. *Pancreas* 2001; 22: 141-147
- Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 1975; 15: 741-747
- Kyriazis AP, McCombs WB 3rd, Sandberg AA, Kyriazis AA, Sloane NH, Lepera R. Establishment and characterization of human pancreatic adenocarcinoma cell line SW-1990 in tissue culture and the nude mouse. *Cancer Res* 1983; 43: 4393-4401
- Pettengill OS, Faris RA, Bell RH Jr, Kuhlmann ET, Longnecker DS. Derivation of ductlike cell lines from a transplantable acinar cell carcinoma of the rat pancreas. *Am J Pathol* 1993; 143: 292-303
- Jessop NW, Hay RJ. Characteristics of two rat pancreatic exocrine cell lines derived from transplantable tumors. *In Vitro* 1980; 16: 212
- Anastasi E, Santangelo C, Bulotta A, Dotta F, Argenti B, Mincione C, Gulino A, Maroder M, Perfetti R, Di Mario U. The acquisition of an insulin-secreting phenotype by HGF-treated rat pancreatic ductal cells (ARIP) is associated with the development of susceptibility to cytokine-induced apoptosis. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 367-376
- Longnecker DS, Lilja HS, French J, Kuhlmann E, Noll W. Transplantation of azaserine-induced carcinomas of pancreas in rats. *Cancer Lett* 1979; 7: 197-202
- Christophe J. Pancreatic tumoral cell line AR42J: an amphicrine model. *Am J Physiol* 1994; 266: G963-G971
- Qiu X, Valentijn JA, Jamieson JD. Carboxyl-methylation of Rab3D in the rat pancreatic acinar tumor cell line AR42J. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 708-714
- Zhu M, Breslin MB, Lan MS. Expression of a novel zinc-finger cDNA, IA-1, is associated with rat AR42J cells differentiation into insulin-positive cells. *Pancreas* 2002; 24: 139-145
- Eum WS, Li MZ, Sin GS, Choi SY, Park JB, Lee JY, Kwon HY. Dexamethasone-induced differentiation of pancreatic AR42J cell involves p21(waf1/cip1) and MAP kinase pathway. *Exp Mol Med* 2003; 35: 379-384
- Cui ZJ. Types of voltage-dependent calcium channels involved in high potassium depolarization-induced amylase secretion in the exocrine pancreatic tumour cell line AR4-2J. *Cell Res* 1998; 8: 23-31
- Lai JK, Cheng CH, Ko WH, Leung PS. Ghrelin system in pancreatic AR42J cells: its ligand stimulation evokes calcium signalling through ghrelin receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 887-900
- Yu JH, Lim JW, Kim KH, Morio T, Kim H. NADPH oxidase and apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar AR42J cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 590-602
- Ikeda Y, Fukuoka S. Phosphatidic acid production, required for cholecystokinin octapeptide-stimulated amylase secretion from pancreatic acinar AR42J cells, is regulated by a Wort-sensitive process. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 943-947
- Damm I, Mikkat U, Kirchhoff F, Bockmann S and Jonas L. Inhibitory effect of the lectin wheat germ agglutinin on the binding of 125I-CCK-8s to the CCK-A and -B receptors of AR42J cells. *Pancreas* 2004; 28: 31-37
- 胡美英, 梁明达, 贾伟, 王祝仙, 周克敏. 小鼠可移植性胰腺腺泡细胞癌株(MPC-83)的建立及其特性研究. 昆明医学院学报 1985; 6: 1-6
- 胡美英, 梁明达, 贾伟, 王祝仙. 小鼠可移植性胰腺腺泡细胞癌株(MPC-83)的建立及其特性研究. 中华肿瘤杂志 1986; 8: 1-3
- 杨志伟, 贾伟, 王祝仙. 小鼠胰腺腺泡细胞癌株长期保种传代探讨. 云南医药 2001; 22: 7-8
- Liu ZY, Wang ZG, Zhang W, Tian HM, Li H, Na DY, Cao DY, Liu Y and Li M. Antitumor effect of BRM. *Chin J Cancer Res* 2002; 14: 195-201
- Thorn P, Lawrie AM, Smith PM, Gallacher DV, Petersen OH. Local and global cytosolic Ca²⁺ oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. *Cell* 1993; 74: 661-668
- Williams JA, Sans MD, Tashiro M, Schafer C, Bragado MJ, Dabrowski A. Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells. *Pharmacol Toxicol* 2002; 91: 297-303
- Xiao R, Cui ZJ. Mutual dependence of VIP/PACAP and CCK receptor signaling for a physiological role in duck exocrine pancreatic secretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R189-R198
- Habara Y, Kanno T. Stimulus-secretion coupling and Ca²⁺ dynamics in pancreatic acinar cells. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 843-850
- Herbst M, Sasse P, Greger R, Yu H, Hescheler J, Ullrich S. Membrane potential dependent modulations of calcium oscillations in insulin-secreting INS-1 cells. *Cell Calcium* 2002; 31: 115-126
- Swarovsky B, Steinhilber W, Scheele GA, Kern HF. Coupled induction of exocrine proteins and intracellular compartments involved in the secretory pathway in AR4-2J cells by glucocorticoids. *Eur J Cell Biol* 1988; 47: 101-111
- Estival A, Pradel P, Wicker-Planquart C, Vaysse N, Puigserver A, Clemente F. Regulation of amylase and chymotrypsinogen expression by dexamethasone and cerulein in serum-free-cultured pancreatic acinar AR4-2J cells. Influence of glucose. *Biochem J* 1991; 279 (Pt 1): 197-201

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

MAdCAM-1及NF- κ B在小鼠恶唑酮结肠炎中的表达及一氧化氮供体的干预作用

张丽航, 欧阳钦

■背景资料

MAdCAM-1与淋巴细胞表面配体 $\alpha 4\beta 7$ -整合素及L-选择素的结合, 参与了淋巴细胞附壁滚动, 活化与黏附, 介导特定淋巴细胞亚群向肠道黏膜淋巴组织如派伊尔结及固有层的归巢. 淋巴细胞向肠道的渗出, 诱导并维持肠道的慢性炎症.

张丽航, 上海市嘉定区中心医院消化内科 上海市 201800
欧阳钦, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041
张丽航, 2007年四川大学华西临床医学院硕士, 主要从事炎症性肠病的研究.

作者贡献分布: 此课题主要由欧阳钦老师指导, 张丽航操作完成.

通讯作者: 张丽航, 201800, 上海市嘉定区城北路1号, 上海市嘉定区中心医院消化内科. lihangz04@163.com

电话: 021-69987008-3218

收稿日期: 2007-08-15 修回日期: 2008-01-23

Expression of MAdCAM-1 and nuclear factor kappa B and the intervention effect of nitric oxide donor in oxazolone-induced colitis

Li-Hang Zhang, Qin Ouyang

Li-Hang Zhang, Department of Gastroenterology, Jiading District Central Hospital, Shanghai 201800, China

Qin Ouyang, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Li-Hang Zhang, Department of Gastroenterology, Jiading District Central Hospital, 1 Chengbei Road, Jiading District, Shanghai 201800, China. lihangz04@163.com

Received: 2007-08-15 Revised: 2008-01-23

Abstract

AIM: To investigate the expression of MAdCAM-1 and nuclear factor kappa B (NF- κ B) as well as the intervention of nitric oxide (NO) donor DETA NONOate and GTN in oxazolone-induced colitis.

METHODS: Thirty two C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups: group A, B, C and D. The oxazolone experimental colitis model was established in group B, C and D. Mice of group C were treated with GTN and group D with DETA NONOate. The disease activity index (DAI), macroscopic score and histological score in each group were evaluated. The expression of MAdCAM-1 and NF- κ B were determined by immunohistochemical staining. The plasma nitric oxide (NO) levels and the MPO activity in colonic tissues were also analyzed.

RESULTS: The DAI in group B and C increased since oxazolone was administered rectally, but it did not changed obviously in group D. The macroscopic score, the histological score, the expression of NF- κ B, the expression of MAdCAM-1 and the MPO activity in group B (3.13 ± 0.84 , 20.31 ± 2.63 , 30.29 ± 8.68 , 17.60 ± 6.53 , 3.83 ± 0.60), which were significantly higher than those in group A, respectively (0.38 ± 0.52 , 0.88 ± 0.83 , 7.38 ± 2.29 , 4.08 ± 1.30 , 1.75 ± 0.25 , $P < 0.01$) and group D (1.38 ± 0.52 , 11.13 ± 1.48 , 12.60 ± 3.54 , 8.42 ± 2.16 , 2.76 ± 0.48 , $P < 0.01$), but similar to those of group C. The level of plasma NO in group B was significantly higher than that of group A (54.51 ± 22.28 vs 32.17 ± 14.88 , $P < 0.05$), but significantly lower than that of group D and C (54.51 ± 22.28 vs 88.53 ± 24.77 , 80.12 ± 19.79 , all $P < 0.05$). There were significant positive correlations between the expression of MAdCAM-1 and the histological score, the MPO activity and IOD of NF- κ B ($r = 0.786$, $r = 0.833$, $r = 0.833$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of MAdCAM-1 increases significantly in lumina propria of colonic tissues in oxazolone-induced colitis of mice. According to these results, DETA NONOate may serve as a valuable biological agent for UC treatment.

Key Words: Oxazolone; MAdCAM-1; Nuclear factor kappa B; Nitric oxide; Ulcerative colitis

Zhang LH, Ouyang Q. Expression of MAdCAM-1 and nuclear factor kappa B and the intervention effect of nitric oxide donor in oxazolone-induced colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 596-601

摘要

目的: 探讨MAdCAM-1在恶唑酮结肠炎中的表达及一氧化氮供体DETA NONOate和GTN对恶唑酮结肠炎的干预作用.

方法: 32只C57BL/6小鼠随机分为正常对照组(A)、恶唑酮结肠炎组(B)、GTN干预组(C)和DETA NONOate干预组(D). 除正常对照组外,

■同行评议者

李永哲, 副教授, 中国医学科学院中国协和医科大学, 北京协和医院检验科

其余3组均建立小鼠恶唑酮结肠炎模型, 两个一氧化氮供体干预后处死小鼠. 评价DAI、大体评分和组织学评分; 免疫组织化学法检测MAdCAM-1及NF- κ B; 硝酸还原酶法测定血清中NO含量; 测定结肠组织MPO活性.

结果: B组小鼠DAI评分自灌肠之日起逐渐增高, 而D组则变化不明显. B组小鼠大体评分、组织学评分、NF- κ B的表达、MAdCAM-1的表达、MPO活性(3.13 ± 0.84 , 20.31 ± 2.63 , 30.29 ± 8.68 , 17.60 ± 6.53 , 3.83 ± 0.60)均分别高于A组(0.38 ± 0.52 , 0.88 ± 0.83 , 7.38 ± 2.29 , 4.08 ± 1.30 , 1.75 ± 0.25 , $P < 0.01$)和D组(1.38 ± 0.52 , 11.13 ± 1.48 , 12.60 ± 3.54 , 8.42 ± 2.16 , 2.76 ± 0.48 , $P < 0.01$), 而C组则与B组相近. B组小鼠血清NO浓度高于A组(54.51 ± 22.28 vs 32.17 ± 14.88 , $P < 0.05$), 而低于D组和C组(54.51 ± 22.28 vs 88.53 ± 24.77 , 80.12 ± 19.79 , 均 $P < 0.05$). B组MAdCAM-1的表达与组织学评分、MPO活性、NF- κ B P65 I Δ 值呈正相关($r = 0.786$, $r = 0.833$, $r = 0.833$, $P < 0.05$).

结论: 小鼠恶唑酮结肠炎中结肠固有层MAdCAM-1的表达增加, DETA NONOate可能是治疗溃疡性结肠炎的有价值药物.

关键词: 恶唑酮; MAdCAM-1; 核因子- κ B; 一氧化氮; 溃疡性结肠炎

张丽航, 欧阳钦. MAdCAM-1及NF- κ B在小鼠恶唑酮结肠炎中的表达及一氧化氮供体的干预作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 596-601
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/596.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammation bowel disease, IBD)是一种病因未明的慢性反复发作的非特异性肠道炎症性疾病, 活动期的特征性表现为大量白细胞在肠黏膜间质内广泛浸润. 黏膜地址素细胞黏附分子-1(mucosal addressin cell adhesion molecule-1, MAdCAM-1)是一种选择性表达于肠道血管内皮的黏附分子, 极少表达于肠外组织, 他与淋巴细胞表面配体的结合, 参与了淋巴细胞附壁滚动和黏附, 介导特定淋巴细胞亚群向肠道黏膜淋巴组织的归巢. 一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种多效性的自由基信号分子. 有研究报道NO供体可以抑制MAdCAM-1在肠道的表达. 本文主要研究恶唑酮(oxazolone)结肠炎动物模型结肠黏膜上皮MAdCAM-1的表达和NO供体二亚乙基三胺-NO(Diethylenetriamine

NONOate, DETA NONOate)对MAdCAM-1表达的影响, 观察其用于治疗的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 32只C57BL/6 δ 小鼠, 周龄6-8 wk, 购自四川大学华西试验动物中心. 恶唑酮(oxazolone)(Sigma公司), DETA NONOate(Cayman Chemical公司), 硝酸甘油(glyceryl trinitrate, GTN)(华西药房), MAdCAM-1抗体(MECA-367)(BD Pharmingen公司), 核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)P65mAb(Sant Cruz公司), 免疫组化染色试剂盒(SP-9000)(北京中杉金桥生物技术有限公司), 浓缩型3, 3', -二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司), NO试剂盒、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒隐血检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), UV-2201紫外-可见分光光度计(岛津公司), BX41-32H02-FLB3荧光显微镜和DP12-PC微镜数码相机系统(Olympus公司).

1.2 方法

1.2.1 动物模型及干预方法: 将32只实验小鼠随机分为4组: 正常对照组、恶唑酮结肠炎组、GTN干预组和DETA NONOate干预组. 参照Heller *et al*^[1]描述的方法建立恶唑酮模型, 0, 1 d应用3%(w/v)恶唑酮酒精溶液灌肠150 μ L/只致敏. GTN及DETA NONOate干预组于小鼠灌肠前24 h开始, 每天分别以GTN 2 mg/(kg·d)和DETA NONOate 1 mg/(kg·d) ip, 共4次至处死.

1.2.2 观察, 收集标本及结肠炎症的评价: 每日记录各组小鼠体重, 大便性状变化, 检查小鼠粪便隐血. 灌肠后3 d小鼠心脏取血, 立即离心取血清, -20 $^{\circ}$ C冰箱保存. 小鼠开腹分离结肠及回盲部, 肉眼观察肠黏膜有无损伤、充血水肿及溃疡, 估算溃疡面积与受损面积之比. 选择炎症严重部位取1 cm左右组织福尔马林固定, 石蜡包埋待检. 取一段新鲜结肠组织, 检测MPO. 按Okayasu评分标准计算疾病活动指数(disease activity index, DAI)^[2]; 大体损伤按Ekstrom标准^[3], 组织学损伤按韩英 *et al*^[4]标准.

1.2.3 MPO测定: 准确称量结肠组织重量, 以十六烷基三甲基溴化铵(HTAB)溶液制备50 g/L组织匀浆, 加入邻联茴香胺-H₂O₂反应体系中, 通过邻联茴香胺供氢后生成黄色化合物, 比色测定各管A值, 从而推算出MPO的活力.

1.2.4 NO的测定: 取0.1 mL血清置测定管, 0.1

■ 相关报道

多个对IBD患者及动物模型的研究中, 均发现在IBD肠道血管内皮细胞MAdCAM-1的表达明显增高, 而且UC与CD的表达模式是不同的; MAdCAM-1在多种动物结肠炎模型的表达均增加, 而免疫中和MAdCAM-1在结肠炎模型中可以缓解炎症和黏膜的损害.

■ 创新盘点

已有研究应用抗体及反义核苷酸抑制MAdCAM-1的表达及应用NO抑制其他黏附分子表达的研究,但至今尚未有应用NO抑制MAdCAM-1表达的报道。由于MAdCAM-1特异性表达于胃肠道,以MAdCAM-1为靶标的生物治疗可以减少以其他黏附分子为靶标的生物治疗所带来的肠道外副作用。

表 1 各组小鼠大体及组织学评分, MPO活性和NO浓度的比较(mean ± SD, $n = 8$)

分组	大体评分	组织学评分	MPO活性(U/g)	血清NO浓度($\mu\text{mol/L}$)
正常对照组	0.38 ± 0.52 ^b	0.88 ± 0.83 ^b	1.75 ± 0.25 ^b	32.17 ± 14.88 ^a
恶唑酮结肠炎组	3.13 ± 0.84	20.31 ± 2.63	3.83 ± 0.60	54.51 ± 22.28
GTN干预组	2.88 ± 0.84	18.81 ± 2.48	3.55 ± 0.59	80.12 ± 19.79 ^a
DETA NONOate干预组	1.38 ± 0.52 ^{bd}	11.13 ± 1.48 ^{bc}	2.76 ± 0.48 ^{bc}	88.53 ± 24.77 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 恶唑酮结肠炎组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs GTN组干预组。

mL硝酸钾标准液置标准管, 0.1 mL双蒸水置空白管, 试剂按说明书操作, 于550 nm波长处比色, 分别读取测定管和标准管吸光值, 计算NO含量。

1.2.5 免疫组化检测NF- κ B和MAdCAM-1: 结肠组织石蜡切片常规脱蜡、水化; 高压抗原热修复, 修复液为0.01 mmol/L柠檬酸盐缓冲液; 用30 mL/L H_2O_2 消除内源性过氧化物酶活性; 正常山羊血清封闭; NF- κ B一抗为小鼠IgG mAb(稀释度1:500), 4℃冰箱过夜, MAdCAM-1一抗为小鼠来源的抗小鼠IgG2 α 抗体(稀释度1:50), 37℃孵育2.5 h; 滴加各自相应生物素化二抗; 滴加辣根酶标记链霉卵白素; DAB显色, 苏木素复染, 梯度酒精脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片。每次实验均设立空白对照, 以0.01 mol/L PBS代替一抗作为空白对照。应用ImagePro-Plus生物图像分析软件统计免疫组化切片累积光密度(integrated optical density, IA)值。

统计学处理 应用软件SPSS13.0进行统计分析, 计量资料采用mean ± SD表示。计量资料的多组间用ONE-WAY ANOVA, 两组间采用 t 检验, 两组间相关性用Spearman秩相关分析。双侧检验, 以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量和DAI评分变化 正常对照组小鼠体质量逐渐增高, 大便性状正常, 而唑酮结肠炎组和GTN组小鼠灌肠后体质量明显下降, 表现为稀便或不成形黏肛便, 便血或粪便隐血阳性, DAI评分逐渐升高, DETA NONOate干预组小鼠体质量较轻, DAI评分比恶唑酮结肠炎组低。

2.2 大体和组织学观察及评分 正常对照组小鼠结肠黏膜无充血水肿、糜烂及溃疡形成, 而恶唑酮结肠炎组和GTN治疗组小鼠结肠黏膜可见明显充血水肿、糜烂, 浅小溃疡多少不等, 附有脓性分泌物, 病变连续分布, 大体评分高于正常对照组($P < 0.01$), DETA NONOate干预组小鼠可见充血水肿, 但糜烂及溃疡少见, 无脓性分泌物,

大体评分较恶唑酮结肠炎组及GTN干预组均低($P < 0.01$)。组织学上, 正常对照组小鼠结肠黏膜上皮完整, 腺体形态正常、排列整齐, 黏膜及黏膜下层无炎症细胞浸润, 未见糜烂及溃疡。恶唑酮结肠炎组及GTN干预组小鼠结肠黏膜上皮损伤、缺失、糜烂及溃疡形成, 腺体变形、排列紊乱, 黏膜及黏膜下层见密集分布的淋巴细胞和单核细胞浸润。DETA NONOate干预组小鼠可见结肠黏膜上皮损伤, 偶见糜烂, 未见溃疡形成, 腺体排列基本正常, 黏膜及黏膜下层白细胞浸润少(表1)。

2.3 MPO活性 恶唑酮结肠炎组小鼠结肠组织的MPO活性较正常对照组小鼠明显增高($P < 0.01$), 而DETA NONOate干预组小鼠结肠组织的MPO活性较恶唑酮结肠炎组($P < 0.01$)及GTN干预组小鼠低($P < 0.05$, 表1)。

2.4 血清NO浓度 恶唑酮结肠炎组小鼠血清NO浓度较正常对照组小鼠增高($P < 0.05$), GTN干预组和DETA NONOate干预组小鼠血清NO浓度高于恶唑酮结肠炎组($P < 0.05$, 表1)。

2.5 小鼠结肠黏膜NF- κ B P65和MAdCAM-1的表达 正常对照组小鼠结肠黏膜上皮细胞、隐窝上皮、固有层单个核细胞只微弱或不表达NF- κ B P65, 而恶唑酮结肠炎组小鼠结肠黏膜NF- κ B P65表达增强, 且上皮表达呈连续分布, 阳性细胞胞质和胞核都含有棕黄色颗粒, 以胞核表达为主。用GTN干预后, 小鼠结肠黏膜NF- κ B P65表达无明显改变, 而用DETA NONOate干预后结肠黏膜NF- κ B P65表达明显降低, IA值与恶唑酮结肠炎组相比有统计学意义($P < 0.01$)。正常对照组小鼠结肠派伊尔结(PP), 黏膜固有层中血管没有或者很少表达MAdCAM-1, 黏膜上皮细胞不表达MAdCAM-1, 恶唑酮结肠炎组和GTN干预组小鼠结肠PP, 黏膜固有层中血管内皮均明显地表达MAdCAM-1, IA值明显高于正常对照组($P < 0.01$), 而DETA NONOate干预组小鼠结肠PP, 黏膜固有层中血管MAdCAM-1表达明显降低,

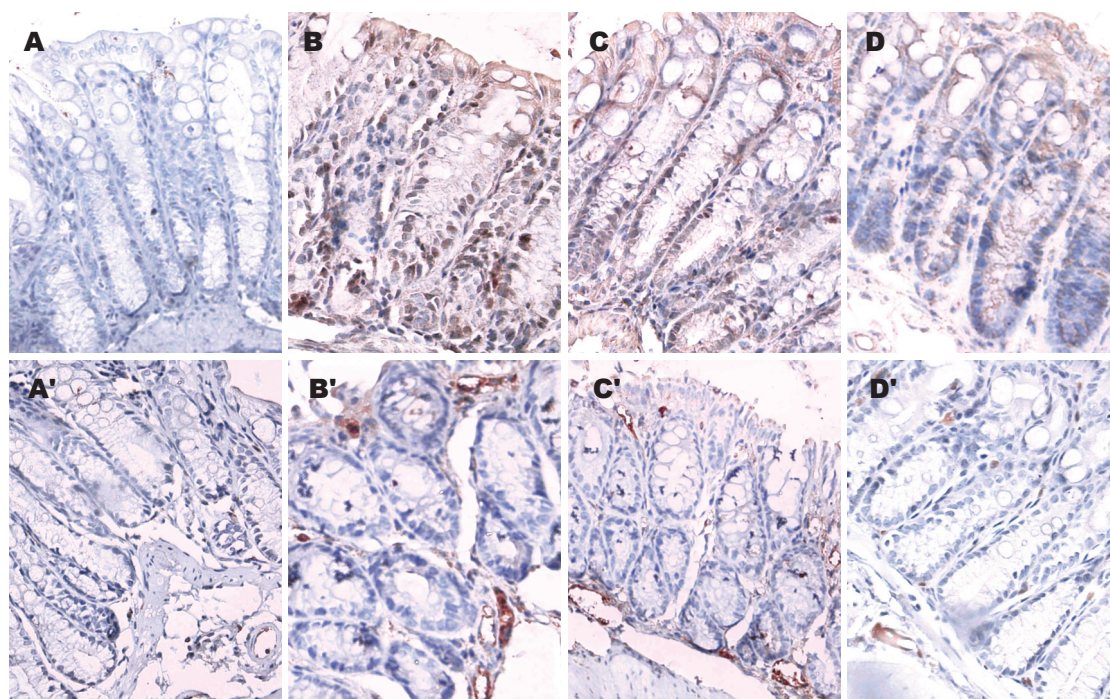


图1 各组结肠黏膜NF-κB P65(A-D)和MAdCAM-1(A'-D')的表达(×400). A: 正常对照组; B: 恶唑酮模型组; C: GTN干预组; D: DETA NONOate干预组.

■名词解释

淋巴细胞归巢: 是淋巴细胞的定向游动, 包括成熟淋巴细胞向外周淋巴器官归巢, 淋巴细胞再循环, 以及淋巴细胞向炎症部位迁移. 其分子基础是称之为淋巴细胞归巢受体的黏附分子与内皮细胞上相应的血管地址素黏附分子的相互作用.

表2 各组小鼠NF-κB P65和MAdCAM-1 I4值的比较 (mean ± SD, n = 8)

分组	I4值	
	NF-κB P65	MAdCAM-1
正常对照组	7.38 ± 2.20 ^d	4.08 ± 1.30 ^d
恶唑酮结肠炎组	30.29 ± 8.68	17.60 ± 6.53
GTN干预组	26.81 ± 8.56	14.37 ± 5.85
DETA NONOate干预组	12.60 ± 3.54 ^{bd}	8.42 ± 2.16 ^{ad}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs GTN组干预组; ^dP<0.01 vs 恶唑酮结肠炎组.

I4值与恶唑酮结肠炎组及GTN组相比都有统计学意义($P<0.05$). 而且, MAdCAM-1 I4值与组织学评分($r = 0.786$, $P<0.05$)、MPO活性($r = 0.833$, $P<0.05$)和NF-κB P65累积光密度值($r = 0.833$, $P<0.05$)均呈正相关(图1, 表2).

3 讨论

炎症性肠病组织学上均有白细胞, 特别是淋巴细胞, 自血管向肠道组织内的渗出, 从而导致慢性肠道炎症, 淋巴细胞向肠道组织的归巢是由各种归巢受体调节的. 在正常情况下, 人类MAdCAM-1分子特异性地表达于派伊尔结(peyer's patch, PP)、肠系膜淋巴结的高内皮静脉, 以及大、小肠黏膜固有层中的扁平血管内皮细胞表面, 极少表达于肠道外组织^[5].

本研究发现, MAdCAM-1在恶唑酮结肠炎结肠黏膜固有层及黏膜下层微血管的表达明显高于正常对照组, 并且与组织学评分、MPO活性和NF-κB P65 I4值呈正相关. 这与以往的研究结果是相吻合的, Arihiro *et al*^[6]对手术切除标本MAdCAM-1的表达研究发现, IBD炎症黏膜的小静脉丰富地表达MAdCAM-1. 在人类IBD中, MAdCAM-1表达的增加提示其可能介导淋巴细胞与内皮细胞的结合及向炎症部位的渗出.

最近, 开发阻断淋巴细胞向肠黏膜浸润的药物成为一类新型的生物治疗方向, 针对黏附分子的生物治疗剂开始应用于临床试验, 如抗细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)反义寡核苷酸(ISIS-2302, Alicaforsen)^[7]和抗α4-整合素的抗体(Natalizumab), 但是有报道应用Natalizumab可能导致致死性的进行性多灶性白质脑病^[8]. 由于MAdCAM-1在胃肠道表达的选择性, 使MAdCAM-1成为一个值得考虑的靶标. 已有研究应用抗体^[5]及反义核苷酸^[9]抑制MAdCAM-1的表达研究, 但至今还没有应用NO抑制MAdCAM-1表达的报道.

以往的研究提示肠道炎症时存在内皮细胞功能异常及NO合成的失调^[10]. 在TNBS诱导的结肠炎模型中, NO-美沙拉嗪(NCX-456)比美

■同行评价

本文研究内容较新, 实用性强, 具有一定的临床参考价值.

沙拉嗪更有效地缓解了肠道的炎症^[11], 提示NO可能在结肠炎中具有重要的保护作用. DETA NONOate属于NO供体中的偶氮烯醇盐类(Diazeniumdiolates, NONOates), 这一类药物可以预知NO的释放速率, 在溶液中可自发产生NO. 在0.1 mol磷酸盐缓冲液(pH7.4)中, DETA NONOate的半衰期在37℃及22-25℃中分别是20 h及56 h. 本实验显示长效的DETA NONOate比短效的GTN可以更有力地抑制MAdCAM-1在肠道组织的表达, 从而起抗炎的作用, 而且持续的NO对MAdCAM-1的抑制是必须, 这与Oshima *et al*^[12]的研究结果相符. 同时, 也有研究提示DETA NONOate可以通过抑制ICAM-1, P-选择素等黏附分子的表达, 减少白细胞的聚集及致炎因子的合成, 从而显著地改善DSS结肠炎^[13].

本实验发现MAdCAM-1的表达与NF-κB的表达呈正相关. 对小鼠内皮细胞培养基及多种动物结肠炎模型的研究都表明, 在应用肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α, TNF-α), 白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)等炎症因子刺激后, MAdCAM-1的表达增加, 然而, 其信号传导途径仍未完全清楚, 研究提示可能需要NF-κB的活化. TNF-α, IL-1β与其对应受体相互作用, 通过激活NF-κB诱导激酶(NF-κB-inducing kinase, NIK), 最终导致NF-κB抑制因子(inhibitor-κB, IκBα)的降解, IκBα与NF-κB p50/p65异二聚体脱离, NF-κB移位至细胞核, 结合到hMAdCAM-1基因后激活了MAdCAM-1的基因转录^[14-15]. NO供体可能通过清除细胞因子诱导的信号性氧化剂或抑制信号途径中对多肽如IκB的共价修饰, 从而抑制NF-κB对MAdCAM-1转录的激活. 其他信号通路如p38, p42/44丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)和转录因子如SP1可能也参与NF-κB依赖基因的活化和NO介导细胞因子对MAdCAM-1的调节作用^[16]. 对这些信号途径的理解可能使我们更好地揭示MAdCAM-1在IBD中的作用.

MAdCAM-1分子在肠道黏膜组织的选择性表达提示其在肠道黏膜免疫中具有重要作用, 以MAdCAM-1为靶标的生物治疗可以减少副作用. 对MAdCAM-1分子在IBD慢性炎症中的表达及抑制其表达的研究, 有利于进一步认识IBD发病的病理生理过程, 为设计以MAdCAM-1分子为基础的预防与治疗措施提供全新的思路.

4 参考文献

1 Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS,

- Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002; 17: 629-638
- 2 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98: 694-702
- 3 Ekstrom GM. Oxazolone-induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosalicylic acid. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 174-179
- 4 韩英, 村田有志, 伊东重豪, 栋方昭博. 长期应用尼古丁对恶唑酮诱导的实验性小鼠肠炎模型的影响及其机制探讨. *中华消化杂志* 2001; 21: 473-476
- 5 Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J, McEvoy LM, Butcher EC, Kassam N, Mackay CR, Newman W, Ringler DJ. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1997; 151: 97-110
- 6 Arihiro S, Ohtani H, Suzuki M, Murata M, Ejima C, Oki M, Kinouchi Y, Fukushima K, Sasaki I, Nakamura S, Matsumoto T, Torii A, Toda G, Nagura H. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Pathol Int* 2002; 52: 367-374
- 7 Yacyshyn BR, Chey WY, Goff J, Salzberg B, Baerg R, Buchman AL, Tami J, Yu R, Gibiansky E, Shanahan WR. Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease. *Gut* 2002; 51: 30-36
- 8 MacDonald JK, McDonald JW. Natalizumab for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; : CD006097
- 9 Goto A, Arimura Y, Shinomura Y, Imai K, Hinoda Y. Antisense therapy of MAdCAM-1 for trinitrobenzenesulfonic acid-induced murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 758-765
- 10 Kocaman O, Sahin T, Aygun C, Senturk O, Hulagu S. Endothelial dysfunction in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 166-171
- 11 Santucci L, Wallace J, Mencarelli A, Farneti S, Morelli A, Fiorucci S. Different sensitivity of lamina propria T-cell subsets to nitric oxide-induced apoptosis explains immunomodulatory activity of a nitric oxide-releasing derivative of mesalamine in rodent colitis. *Gastroenterology* 2005; 128: 1243-1257
- 12 Oshima T, Jordan P, Grisham MB, Alexander JS, Jennings M, Sasaki M, Manas K. TNF-alpha induced endothelial MAdCAM-1 expression is regulated by exogenous, not endogenous nitric oxide. *BMC Gastroenterol* 2001; 1: 5
- 13 Salas A, Gironella M, Salas A, Soriano A, Sans M, Iovanna J, Pique JM, Panes J. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2002; 82: 597-607
- 14 Ando T, Jordan P, Wang Y, Itoh M, Joh T, Sasaki M, Elrod JW, Carpenter A, Jennings MH, Minagar A, Alexander JS. MAdCAM-1 expression and regulation in murine colonic endothelial cells in vitro. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 258-264
- 15 Oshima T, Pavlick KP, Laroux FS, Verma SK, Jordan P, Grisham MB, Williams L, Alexander

- JS. Regulation and distribution of MAdCAM-1 in endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C1096-C1105
- 16 Teramoto K, Miura S, Tsuzuki Y, Hokari R, Watanabe C, Inamura T, Ogawa T, Hosoe N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Increased lymphocyte trafficking to colonic microvessels is dependent on MAdCAM-1 and C-C chemokine mLAR/CCL20 in DSS-induced mice colitis. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 421-428

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志个性化服务订购活动

本刊讯 为了满足读者的多样化需求, 解决一些作者因为资金不足而导致订阅印刷版的困难, 自2007年开始, 世界华人消化杂志(*WCJD*), 推出以下个性化服务策略来为广大读者服务.

1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

*WCJD*旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail发送精彩专家述评PDF; (2)2007年底将精彩专家述评专辑一本挂号邮寄用户收. 定价: 50元/年.

2 *WCJD*电子杂志

*WCJD*旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒PDF电子杂志(1-36期). 定价: 180元/年.

3 *WCJD*网络版杂志

*WCJD*旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒网络版杂志(1-36期). 定价: 160元/年.

4 *WCJD*印刷版杂志

*WCJD*印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

6 汇款的方式

邮局汇款: 世界胃肠病学杂志社收, 100023, 北京市2345信箱. 附言注明订购的内容.

银行汇款: 户名: 北京百世登生物医学科技有限公司; 开户银行: 中国工商银行北京商务中心区支行国贸大厦分理处; 账号: 0200041609020180741. 附言注明: 订购的内容和发票的抬头.

总之, *WCJD*将尽自己的最大努力, 满足广大读者的需求, 同时欢迎更多个性化服务的意见和建议E-mail发至: h.n.zhang@wjgnet.com. 谢谢! (世界胃肠病学杂志社 2008-02-28).

PRL-3真核绿色荧光蛋白表达载体的构建及其在结肠癌SW480细胞中的表达

柳玉红, 李建明, 周 军, 丁彦青

■背景资料

大肠癌是一种常见、严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤。转移是导致大肠癌患者死亡的重要原因。因此, 阐明大肠癌转移机制, 控制转移是当前研究的重要方向。研究证明, 肿瘤转移过程中有众多的基因参与, PRL-3在大肠癌发生发展中起重要作用。PRL-3属于蛋白酪氨酸磷酸酶家族(PTP)成员, 是现已发现与大肠癌转移相关的少数特异性表达分子之一。PRL-3作为大肠癌转移研究中的“魅力”基因受到广泛关注。

柳玉红, 李建明, 周军, 丁彦青, 南方医科大学南方医院病理科, 南方医科大学基础医学院病理学教研室, 广东省分子肿瘤病理重点实验室, 教育部广东省共建人类重大疾病转录组学和蛋白组学重点实验室 广东省广州市 510515

柳玉红, 南方医科大学在读博士研究生, 主要从事肿瘤病理的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30500241, No. 30670968, No. 30700286

作者贡献分布: 柳玉红与周军对此文所作贡献均等; 此课题由柳玉红, 李建明, 周军, 丁彦青设计; 研究过程由柳玉红及周军操作完成; 数据分析由柳玉红及李建明完成; 本论文写作由柳玉红及李建明完成。

通讯作者: 李建明, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院病理科, 南方医科大学基础医学院病理学教研室, 广东省分子肿瘤病理重点实验室, 教育部广东省共建人类重大疾病转录组学和蛋白组学重点实验室。lixinyue@fimmu.com
电话: 020-62789362

收稿日期: 2007-10-16 修回日期: 2008-01-25

Construction of pEGFP-N1-PRL-3 vector and its expression in SW480 cells

Yu-Hong Liu, Jian-Ming Li, Jun Zhou, Yan-Qing Ding

Yu-Hong Liu, Jian-Ming Li, Jun Zhou, Yan-Qing Ding, Department of Pathology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Molecular Tumor Pathology; Key Laboratory of Transcriptome and Proteome for Human Major Diseases supported by the Ministry of Education and Guangdong Province; Department of Pathology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500241, No. 30670968, No. 30700286

Correspondence to: Jian-Ming Li, Department of Pathology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Molecular Tumor Pathology; Key Laboratory of Transcriptome and Proteome for Human Major Diseases supported by the Ministry of Education and Guangdong Province; Department of Pathology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. lixinyue@fimmu.com

Received: 2007-10-16 Revised: 2008-01-25

Abstract

AIM: To construct the eukaryotic fluorescent expression vector of PRL-3 pEGFP-N1-PRL-3 and establish the PRL-3 gene over-expression cell model of human colon carcinoma.

METHODS: PRL-3 full length cDNA was amplified by RT-PCR with total RNA extracted from

human colon carcinoma SW480 cells as template, and cloned into pGEM-T easy vector or eukaryotic expression vector pEGFP-N1. Recombinant plasmid of pEGFP-N1-PRL-3 was identified by restriction endonuclease analysis and DNA sequencing. pEGFP-N1-PRL-3 plasmid was transfected into SW480 cells. PRL-3 over-expression in SW480 cells was screened by G418 selection. PRL-3 expression was determined by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) analysis.

RESULTS: The recombinant pEGFP-N1-PRL-3 plasmid with entirely coding elements of human PRL-3 gene was constructed and identified by restriction endonuclease analysis and DNA sequencing. The PRL-3 expression in SW480 cells was 2.78-fold that of control group.

CONCLUSION: Establishment of PRL-3 gene over-expression cell model of human colon carcinoma provides a fundamental tool to study the role of PRL-3 gene in metastasis of human colorectal carcinoma.

Key Words: PRL-3; Eukaryotic expression; Green fluorescent protein; Stable transfection

Liu YH, Li JM, Zhou J, Ding YQ. Construction of pEGFP-N1-PRL-3 vector and its expression in SW480 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 602-606

摘要

目的: 构建蛋白酪氨酸磷酸酶-3(PRL-3)绿色荧光蛋白真核表达载体pEGFP-N1-PRL-3, 为PRL-3基因功能研究奠定基础。

方法: 设计人PRL-3特异性引物, 提取人大肠癌细胞系SW620细胞总RNA, 应用RT-PCR方法获取人PRL-3全长cDNA, 分别克隆至T载体及真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-N1, 应用PCR、酶切及DNA测序进行鉴定, 确认后转染大肠癌细胞SW480, 应用G418进行筛选获取PRL-3稳定表达细胞克隆, 应用荧光定量PCR检测PRL-3基因表达。

■同行评议者

徐智, 教授, 北京大学第三医院外科

结果: 获得522 bp的PRL-3基因编码序列并成功构建了真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-N1-PRL-3, 该重组载体能够在SW480细胞中稳定表达。

结论: 成功构建真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-N1-PRL-3和建立PRL-3稳定表达SW480细胞, 为进一步深入研究PRL-3基因在大肠癌发生发展中的作用奠定基础。

关键词: 蛋白酪氨酸磷酸酶-3; 真核表达; 绿色荧光蛋白; 稳定转染

柳玉红, 李建明, 周军, 丁彦青. PRL-3真核绿色荧光蛋白表达载体的构建及其在结肠癌SW480细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 602-606
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/602.asp>

0 引言

蛋白酪氨酸磷酸酶-3(phosphatase of regenerating liver-3, PRL-3), 属于PRL家族, 是一种相对分子质量只有20 kDa的蛋白磷酸酶, 正常情况下在心脏和骨骼肌中都有表达。新近的研究表明PRL-3与肿瘤转移有非常密切的关系^[1], 尤其是他在大肠癌的侵袭转移中的作用更加引人注目^[2-3]。有研究认为PRL-3在肿瘤侵袭转移中的作用与其促进细胞增殖、迁移、侵袭及黏附有关, 而且他能增强细胞生长、迁移以及肿瘤的浸润和转移能力^[4-9]。绿色荧光蛋白(GFP)是20世纪90年代中期发展起来的一种全新的报告分子^[2]。GFP分子质量小, 易与其他目的基因形成融合基因, 对细胞无毒副作用, 而且其化学性质稳定, 使用方便, 可以在活体细胞中定时观察, 因而连接有GFP的载体pEGFP-N1在分子生物学中被广泛应用。为进一步研究探讨PRL-3基因在结直肠癌的发生发展和侵袭转移中的作用, 我们克隆了人PRL-3基因并构建了真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP-N1-PRL-3, 并将其转染真核细胞, 观察其表达情况, 为进一步的工作奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 TRIzol试剂和RT-PCR试剂盒为Invitrogen公司产品; 克隆载体pGEM-T Easy Vector、AMV逆转录酶为Promega公司产品; PrimeSTAR HS DNA高保真酶、限制性内切酶、T4连接酶、标准分子质量DNA Marker、质粒小量提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、DNA片段纯化试剂盒、PrimeScript™ RT Reagent Kit、SYBR^R Premix Ex Taq™荧光定量

PCR试剂盒均购自TaKaRa公司; pEGFP-N1购自Clontech公司、SW480人大肠癌细胞、大肠杆菌DH5a、BL21(DE3)菌株均为本室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成: 根据已报道的PRL-3基因序列(GenBank Accession Number: NM_032611), 依据PCR引物设计原则和PrimeSTAR HS DNA高保真酶的特性, 利用在线引物设计工具(<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>)设计能特异性扩增人PRL-3 cDNA全长的引物序列, 同时分别在上游引物和下游引物的5'端引入EcoR I 和BamH I 两酶切位点, 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 序列如下: P1: 5'-GAATTCTAATGGCTCGGATGAACCGC-3'; P2: 5'-GGATCCTACATAACGCAGCACCGGGT-3'。

1.2.2 RT-PCR: 取适量培养的大肠癌细胞株SW480, 加入1 mL TRIzol试剂, 提取总RNA, 以2 μg总RNA为模板, 按照试剂盒说明书进行反转录获得cDNA, 以cDNA产物为模板, P1和P2为引物, PCR扩增约522 bp的片段, 总反应体积为50 μL, 循环参数为: 94℃ 2 min; 94℃ 20 s, 56℃ 20 s, 72℃ 40 s, 30个循环, 再于72℃延伸5 min。取5 μL PCR产物行10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 PRL-3基因序列测定: PRL-3扩增产物使用Agarose Gel DNA Purification Kit回收DNA, 经加A尾处理后, 插入克隆载体pGEM-T Easy载体中, 构建pGEM-T- PRL-3, 然后转化DH5a感受态, 涂LB板(Amp⁺)后, 次日随机挑取5个克隆, 37℃水平摇床振荡培养, 小量提取质粒pGEM-T-PRL-3, 经PCR及EcoR I 和BamH I 双酶切鉴定, 鉴定正确的质粒交由上海英骏生物技术有限公司进行DNA序列测定。

1.2.4 pEGFP-N1-PRL-3真核表达载体的构建: pEGFP-N1和pGEM-T-PRL-3分别用EcoR I 和BamH I 酶切后, 琼脂糖电泳回收载体大片段和目的片段; 连接上述目的基因和载体片段, 构建pEGFP-N1-PRL-3原核表达载体, 转化DH5a感受态细胞, 用含KA⁺的LB平板筛选阳性克隆, 小量提取pEGFP-N1-PRL-3质粒, 经PCR及EcoR I 和BamH I 双酶切鉴定。

1.2.5 质粒测序鉴定和质粒中量提取: 对pEGFP-N1-PRL-3质粒进行测序鉴定, 与GenBank公布的序列(NM_032611)进行blast比对。无菌条件下, 分别取上述菌落扩增的新鲜菌液1 mL, 加入49 mL卡那霉素抗性LB培养基中, 37℃摇菌过

■研发前沿

PRL-3促进肿瘤转移的机制、PRL-3的作用底物及其相互作用蛋白是本课题领域的研究热点及重点。PRL-3促进细胞迁移和侵袭的机制是亟待解决的问题。

■相关报道

Saha *et al* 发现在结肠癌伴肝转移的组织中 PRL-3 高表达, 他们通过对结肠癌肝转移的组织标本进行基因表达连续分析(SAGE)发现在 18 例结肠癌伴肝转移的标本中 PRL-3 均高表达, 而在正常结肠上皮组织中 PRL-3 不表达, 认为该基因与结肠癌的肝转移有密切的关系。

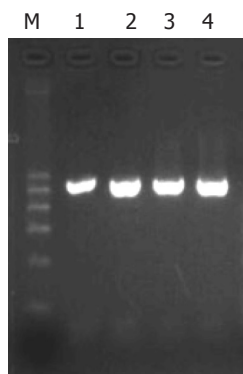


图 1 人PRL-3全长cDNA的克隆. M: 100 bp Marker; 1-4: PRL-3基因PCR产物.

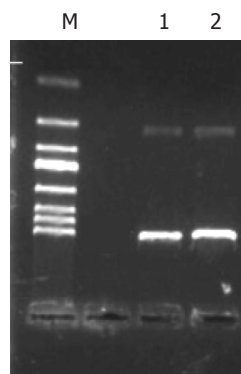


图 2 质粒pEGFP-N1-PRL-3酶切鉴定. M: DNA 250 bp Marker; 1-2: 重组质粒pEGFP-N1-PRL-3(EcoR I +BamH I).

夜. 次日, 4℃, 6000 *g* 离心 15 min 收集细胞, 按照 Qiagen 公司的质粒中量提取试剂盒说明书操作, 加入 4 mL Buffer P1 重悬细菌, 加入 4 mL Buffer P2, 轻柔混匀, 上下颠倒 4-6 次, 室温放置 4 min, 加入 4 mL 预冷的 Buffer P3, 上下颠倒 4-6 次, 冰上放置 15-20 min, 4℃ 15 000 *g* 离心 30 min, 将上清移至一个新离心管, 4℃ 15 000 *g* 再次离心 30 min. 用 4 mL Buffer QBT 平衡 QIAGEN-tip100 柱, 将第二次离心的上清移入 QIAGEN-tip100 柱内, 液体以自身的重力自然流出, 加入 10 mL Buffer QC 洗 QIAGEN-tip100 柱 2 次, 加入 Buffer QF 5 mL, 洗脱质粒, 收集此次的流出液, 加入 3.5 mL 异丙醇混匀, 立即 4℃ 15 000 *g* 离心 30 min, 弃上清, 加入 2 mL 700 mL/L 乙醇洗涤沉淀, 4℃ 15 000 *g* 离心 15 min, 弃上清, 空气干燥 5-10 min, 用 100 μL 灭菌水溶解沉淀, 测 A 值, -20℃ 保存备用.

1.2.6 细胞转染及克隆筛选: 转染前一天将 SW480 细胞接种至 24 孔板中, 2×10^5 个细胞/孔, 使细胞达到 90%-95% 汇合, 转染时用 Opti-MEM 培养基 400 μL 换去完全培养基. 分别用 50 μL 的 Opti-MEM 稀释 0.8 μg 质粒 DNA 和 2 μL LipofectamineTM 2000, 室温孵育 5 min, 将 50 μL 的 LipofectamineTM 2000 混合物加入质粒 DNA 中, 总体积为 100 μL, 轻轻混匀, 室温孵育 20 min, 将 100 μL 的 DNA-LipofectamineTM 2000 混合物加入 24 孔板孔中, 轻轻混匀, 培养 6 h 后更换完全培养基, 37℃ 孵育 48 h 后加入含 G418 (浓度为 800 mg/L) 的培养液, 进行筛选, 筛选 3 wk 后建成抗性单克隆, 挑取单克隆, 扩大培养. 以 pEGFP-N1 质粒为转染对照(mock).

1.2.7 荧光定量 PCR: 待细胞长至状态良好, 铺满瓶壁后, 用冰预冷的 PBS 洗 2 遍, 用 TRIzol 试剂常规提取细胞总 RNA, 提取的总 RNA 用 DNase I 去除痕量基因组 DNA. 按照 TaKaRa(PrimeScriptTM RT Reagent Kit) 逆转录试剂盒操作程序进行

逆转录反应, RNA 的量为 1 μg, 引物为 Oligo dT Primer、Random 6 mers. 反应条件为: 37℃ 15 min、85℃ 5 s. 荧光定量 PCR 反应体系为 25 μL, 内含终浓度为 500 ng 的 cDNA 模板、终浓度为 250 nmol/L 的上下游引物及 12.5 μL 的 2×SYBR Green PCR Master 混合物. PRL-3 上游引物: 5'-GAAGG CCAAGTT CTG TGA GG-3', 下游引物: 5'-TCCAGG TAGGTGAGCT GCTT-3', 扩增片段 186 bp(NM_032611), 以 β-actin 基因为内对照(NM_001101), 扩增产物 222 bp, 上游引物: 5'-GATGCAGAAGGAGAT CACTG-3', 下游引物: 5'-GGGTGTAACGCA ACTAAGTC-3'. 将反应管置 Mx3000PTM Real Time PCR 反应仪(Stratagene 公司)中, 反应条件为 95℃ 10 s、95℃ 5 s、55℃ 30 s, 45 个循环, 荧光信号监测. 定量的方法以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (C_t 代表循环阈值) 表示基因的表达量, 以空载体 EGFP-SW480 细胞为对照细胞, 公式如 $\Delta\Delta C_t = (C_{t(\text{target gene})} - C_{t(\beta\text{-actin})})_{\text{转染细胞}} - (C_{t(\text{target gene})} - C_{t(\beta\text{-actin})})_{\text{对照细胞}}$, 实验重复 3 次.

2 结果

2.1 人 PRL-3 cDNA 基因的扩增、克隆及序列测定 PCR 成功扩增出人 PRL-3 全长 cDNA, PRL-3 基因 PCR 产物的电泳结果可见大小为 522 bp 左右的特异性条带(图1).

2.2 真核表达载体 pEGFP-N1-PRL-3 的构建及鉴定 构建的质粒用 EcoR I 和 BamH I 双酶切鉴定, 得到约 4.7 kb 和 522 bp 左右的片段, 与预期结果一致(图2).

2.3 PRL-3 克隆载体的构建及鉴定 电泳回收目的片段插入 pGEM-T Easy 克隆载体中, 形成 pGEM-T-PRL-3, EcoR I 和 BamH I 双酶切鉴定得到正确克隆, 克隆测序结果与 GenBank 里的人 PRL-3 基因序列相一致(图3).

2.4 PRL-3 稳定表达细胞克隆的筛选和鉴定 用 pEGFP-N1-PRL-3 转染 SW480/EGFP 细胞, 转染

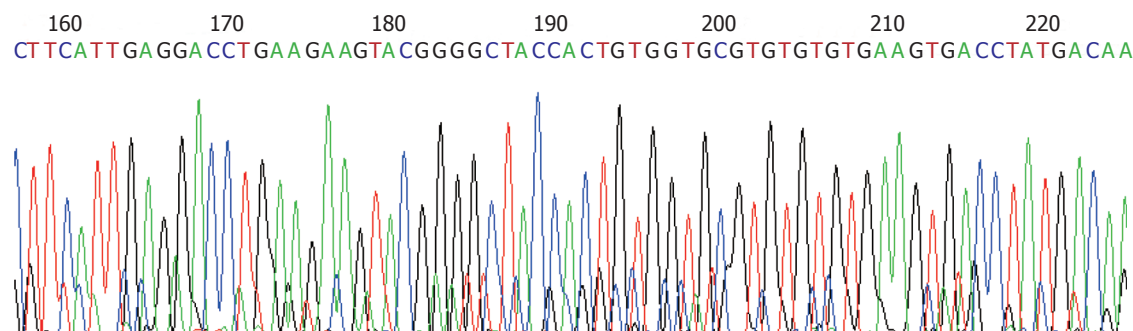


图3 PRL-3全长cDNA克隆的部分测序图.

■创新盘点
本文构建了真核绿色荧光蛋白表达载体, 为后续的转移机制研究奠定了基础.

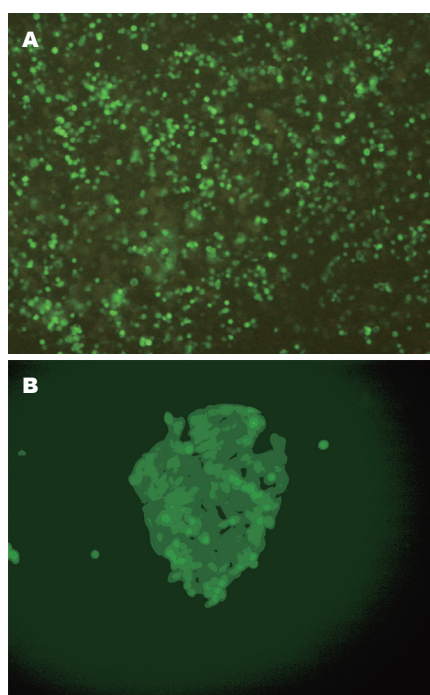


图4 荧光显微镜观察SW480细胞(×100). A: pEGFP-N1-PRL-3瞬时转染; B: pEGFP-N1-PRL-3稳定转染.

后48 h的瞬时转染图像, G418药物筛选3 wk后形成单克隆(图4), 克隆扩大培养后收集细胞进行荧光定量PCR检测. 荧光定量PCR的结果显示, 溶解曲线表明扩增的为特异序列, 通过公式计算稳定转染pEGFP-N1-PRL-3的细胞PRL-3基因表达增高, 是未转染细胞的2.78倍, 命名为SW480/PRL(图5).

3 讨论

PRL-3是现已发现与大肠癌转移相关的少数特异性表达分子之一^[2], 根据PRL-3基因和蛋白质的结构特征, 他属于一类新近发现的蛋白质酪氨酸磷酸酶家族成员, 该亚型有三个成员RPL-1、PRL-2及PRL-3. PRLs具有PTP活性位点标签序列HCXXGXXR, 因而归属于蛋白质酪氨酸磷酸酶家族. PRLs含有C-末端CAAX序列可

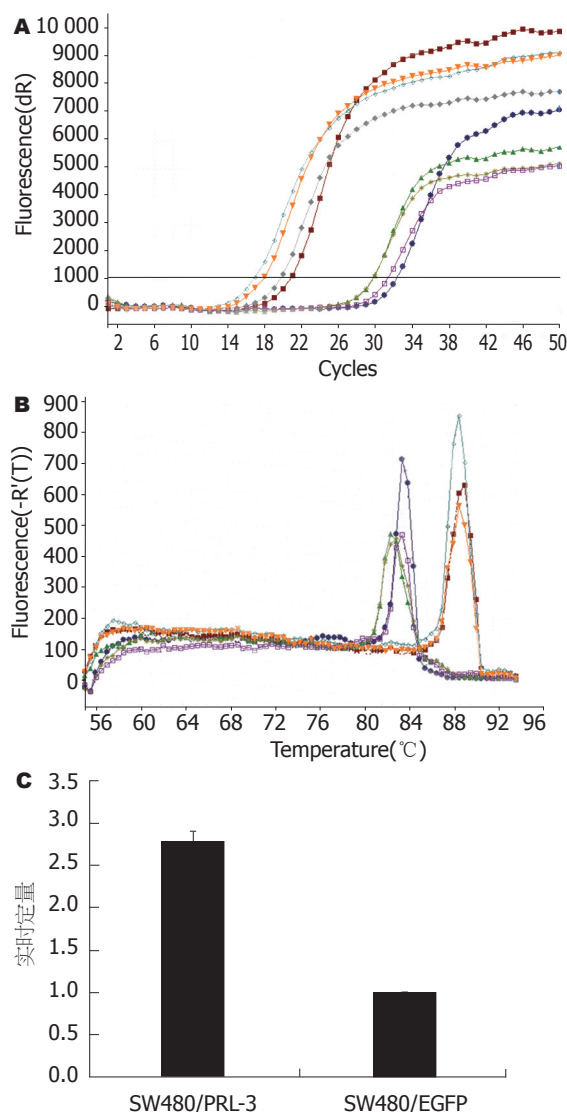


图5 应用荧光定量PCR对pEGFP-N1-PRL-3稳定转染SW480细胞单克隆进行鉴定. A: 荧光定量PCR扩增曲线; B: 荧光定量PCR溶解曲线; C: PRL-3基因表达的定量结果.

进行异戊烯化, PRLs以异戊烯化依赖方式存在于浆膜和内体(endosome)结构, 这一生物化学特征提示他们在细胞信号传递中发挥作用. 这三种蛋白质分子质量大约为20 kDa, 具有超过75%的同源性, 在功能上具有相似性^[10-12].

■应用要点

本研究克隆了人PRL-3基因并构建了GFP表达载体pEGFP-N1-PRL-3, 并将其转染真核细胞, 观察其表达情况, 为进一步的工作奠定了基础。

应用基因表达系列分析(SAGE)技术分析大肠癌肝转移基因表达谱时发现, PRL-3是在18例大肠癌肝转移标本中唯一持续高表达的基因^[2], 进一步发现, 无论具体转移的部位如何, 大多数大肠癌的转移标本中PRL-3的转录水平明显增加^[3]; 而该基因在正常大肠上皮中极少表达或不表达^[2-3]。不同的研究小组也已经分别证实这一结果^[13-14]。而其他研究还表明PRL-3参与胃癌的转移, 与卵巢癌的发生发展关系密切, 可促进小鼠黑色素瘤细胞运动和转移, 并可调节肿瘤细胞与细胞外基质的黏附^[4,6,15]。将转染野生型PRL-3的细胞经尾静脉注射入裸鼠体内, 1-2 wk内即可形成明显的肺转移, 甚至发生由广泛肺转移引起的动物死亡; 如果PRL-3失活则不引起明显的转移^[16]。可以说PRL-3与肿瘤转移的关系已明确, 但是对PRL-3生物学特性的了解仍很模糊, 从2001年Bert Vogelstein实验室发现PRL-3与大肠癌转移的独特联系开始^[2], 后续出现了一些PRL-3的相关研究, 但在对PRL-3生物学特性的了解方面一直没有突破。我们仍不知道PRL-3促进细胞迁移和侵袭的机制以及他参与的信号途径, 而这些问题的解决有利于揭示PRL-3的功能特性。因此, 本研究应用RT-PCR方法, 从培养的大肠癌细胞SW480中提取RNA, 逆转录为cDNA为模板, 扩增出目的基因, 经T载体克隆后, 成功构建了人PRL-3绿色荧光蛋白真核表达载体, 稳定转染人大肠癌SW480细胞, 为建立可视化动物转移模型及进一步从分子水平探讨大肠癌的发生发展机制提供了有效的工具, 具有重要的实验价值。

4 参考文献

- 1 Wang L, Peng L, Dong B, Kong L, Meng L, Yan L, Xie Y, Shou C. Overexpression of phosphatase of regenerating liver-3 in breast cancer: association with a poor clinical outcome. *Ann Oncol* 2006; 17: 1517-1522
- 2 Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 2001; 294: 1343-1346
- 3 Bardelli A, Saha S, Sager JA, Romans KE, Xin B, Markowitz SD, Lengauer C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B. PRL-3 expression in metastatic cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5607-5615
- 4 Wu X, Zeng H, Zhang X, Zhao Y, Sha H, Ge X,

- Zhang M, Gao X, Xu Q. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells. *Am J Pathol* 2004; 164: 2039-2054
- 5 Zeng Q, Dong JM, Guo K, Li J, Tan HX, Koh V, Pallen CJ, Manser E, Hong W. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis. *Cancer Res* 2003; 63: 2716-2722
- 6 Miskad UA, Semba S, Kato H, Yokozaki H. Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric carcinomas: close correlation with invasion and metastasis. *Pathobiology* 2004; 71: 176-184
- 7 Rouleau C, Roy A, St Martin T, Dufault MR, Boutin P, Liu D, Zhang M, Puorro-Radzwil K, Rulli L, Reczek D, Bagley R, Byrne A, Weber W, Roberts B, Klinger K, Brondyk W, Nacht M, Madden S, Burrier R, Shankara S, Teicher BA. Protein tyrosine phosphatase PRL-3 in malignant cells and endothelial cells: expression and function. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 219-229
- 8 Guo K, Li J, Wang H, Osato M, Tang JP, Quah SY, Gan BQ, Zeng Q. PRL-3 initiates tumor angiogenesis by recruiting endothelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2006; 66: 9625-9635
- 9 Fiordalisi JJ, Keller PJ, Cox AD. PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility. *Cancer Res* 2006; 66: 3153-3161
- 10 Diamond RH, Cressman DE, Laz TM, Abrams CS, Taub R. PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3752-3762
- 11 Cates CA, Michael RL, Staybrook KR, Harvey KA, Burke YD, Randall SK, Crowell PL, Crowell DN. Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* 1996; 110: 49-55
- 12 Zeng Q, Si X, Horstmann H, Xu Y, Hong W, Pallen CJ. Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *J Biol Chem* 2000; 275: 21444-21452
- 13 Peng L, Ning J, Meng L, Shou C. The association of the expression level of protein tyrosine phosphatase PRL-3 protein with liver metastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 521-526
- 14 Kato H, Semba S, Miskad UA, Seo Y, Kasuga M, Yokozaki H. High expression of PRL-3 promotes cancer cell motility and liver metastasis in human colorectal cancer: a predictive molecular marker of metachronous liver and lung metastases. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7318-7328
- 15 Polato F, Codegoni A, Fruscio R, Perego P, Mangioni C, Saha S, Bardelli A, Broggin M. PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6835-6839
- 16 Guo K, Li J, Tang JP, Koh V, Gan BQ, Zeng Q. Catalytic domain of PRL-3 plays an essential role in tumor metastasis: formation of PRL-3 tumors inside the blood vessels. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 945-951

■同行评价

本研究设计合理, 方法新颖, 结果可靠, 文笔流畅, 对进一步研究有铺垫作用。

编辑 孙学英 电编 郭海丽

红霉素和阿齐霉素对大鼠胃肠感觉传入的影响

肖刚, 李静, 邓丽君, 陆杰

肖刚, 李静, 邓丽君, 陆杰, 重庆医科大学生理教研室 重庆市 400016

肖刚, 2005届重庆医科大学硕士研究生, 主要从事神经电生理研究。

作者贡献分布: 此课题是由肖刚、陆杰共同设计; 研究过程主要由肖刚完成; 资料查找和数据统计由肖刚、邓丽君和李静共同完成; 论文写作由肖刚和陆杰完成。

通讯作者: 陆杰, 400016, 重庆市, 重庆医科大学生理学教研室. mrlujie49@163.com

电话: 023-68485079

收稿日期: 2007-10-01 修回日期: 2007-01-20

Effect of erythromycin and azithromycin on sensation afferent nerve functions of gastrointestinal tract in rats

Gang Xiao, Jing Li, Li-Jun Deng, Jie Lu

Gang Xiao, Jing Li, Li-Jun Deng, Jie Lu, Department of Physiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Jie Lu, Department of Physiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. mrlujie49@163.com

Received: 2007-10-01 Revised: 2007-01-20

Abstract

AIM: To investigate the effect of erythromycin and azithromycin on sensation afferent nerve functions of gastrointestinal tract in rats and its corresponding mechanism.

METHODS: Sixty-four rats were randomly divided into erythromycin group, azithromycin group, control group, low dose group (0.1 mg/kg), medium dose group (0.5 mg/kg) and high dose group (1 mg/kg). Spontaneous afferent nerve discharge and gastric distention-induced afferent nerve discharge of subdiaphragmatic vagus nerve were recorded half an hour before and after intravenous injection of different doses of erythromycin and azithromycin.

RESULTS: Intravenous low erythromycin and azithromycin dose had no obvious exciting effect on spontaneous afferent nerve discharge and gastric distention-induced afferent nerve discharge of subdiaphragmatic vagus nerve after 20 min. Intravenous medium and high erythro-

mycin and azithromycin dose had obvious exciting effect on spontaneous afferent nerve discharge (erythromycin: 8.34 ± 0.37 , 8.54 ± 0.26 vs 7.78 ± 0.23 , 7.84 ± 0.27 ; azithromycin: 8.57 ± 0.43 , 8.28 ± 0.38 vs 7.74 ± 0.21 , 7.86 ± 0.30) and gastric distention-induced afferent nerve discharge of subdiaphragmatic vagus nerve (erythromycin: 8.54 ± 0.34 , 8.61 ± 0.20 vs 8.13 ± 0.36 , 8.19 ± 0.21 ; azithromycin: 8.54 ± 0.30 , 8.42 ± 0.21 vs 8.24 ± 0.22 , 8.22 ± 0.19), which was statistically significant compared with the control and low dose groups.

CONCLUSION: Erythromycin and azithromycin have significant effects on sensation afferent nerve functions of gastrointestinal tract in rats.

Key Words: Erythromycin; Azithromycin; Vagus nerve; Gastrointestinal sensation

Xiao G, Li J, Deng LJ, Lu J. Effect of erythromycin and azithromycin on sensation afferent nerve functions of gastrointestinal tract in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 607-612

摘要

目的: 用电生理方法研究红霉素和阿齐霉素对胃肠感觉传入的影响。

方法: 64只SD成年大鼠随机分成8组($n = 8$): 红霉素组: 对照、小剂量(0.1 mg/kg)、中剂量(0.5 mg/kg)、大剂量(1 mg/kg)组。阿齐霉素组: 分组和剂量均与红霉素相同。经颈静脉注射生理盐水、红霉素、阿齐霉素, 观察记录注药前和注药后30 min内膈下迷走神经传入自发放电和扩胃诱发发放电两种状态下的变化。

结果: 静脉注射小剂量红霉素和阿齐霉素自发放电和对扩胃诱发发放电均无显著变化, 20 min后中、大剂量红霉素和阿齐霉素注药后自发放电(红霉素: 8.34 ± 0.37 , 8.54 ± 0.26 vs 7.78 ± 0.23 , 7.84 ± 0.27 ; 阿齐霉素: 8.57 ± 0.43 , 8.28 ± 0.38 vs 7.74 ± 0.21 , 7.86 ± 0.30)和对扩胃诱发发放电均增强(红霉素: 8.54 ± 0.34 , 8.61 ± 0.20 vs 8.13 ± 0.36 , 8.19 ± 0.21 ; 阿齐霉素: 8.54 ± 0.30 , 8.42 ± 0.21 vs 8.24 ± 0.22 , 8.22 ± 0.19)与相应的对照组和小剂量组间差异有统

■背景资料

红霉素和阿齐霉素在临床上广泛应用, 胃肠道副反应常见, 大量资料表明, 红霉素是胃动素激动剂, 促进胃肠道运动。但对胃肠感觉的影响尚不清楚, 所以本文就红霉素和阿齐霉素对胃肠感觉的影响展开研究。

■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; 周士胜, 教授, 大连大学医学院医学研究中心

■创新盘点

以前不少作者鉴于手术及记录方便选择颈部迷走神经作为各种研究的对象,但其缺点是他含有的成份十分复杂,他除了传导胃肠道信息外,来自心血管、肺、气管等脏器的传入和传出冲动也混杂其中。由于膈下迷走神经主要是支配胃和小肠,并接受胃和小肠的感觉传入,所以记录膈下迷走神经放电对了解红霉素与胃肠道的神经支配之间的联系更具说服力。因此本实验选择了膈下迷走神经作为电生理直接观察对象,研究了红霉素对膈下迷走神经传入冲动的影响及其相关机制。

计学意义。

结论:红霉素和阿齐霉素能显著增加胃肠感觉传入。

关键词:红霉素;阿齐霉素;迷走神经;胃肠感觉

肖刚,李静,邓丽君,陆杰.红霉素和阿齐霉素对大鼠胃肠感觉传入的影响.世界华人消化杂志 2008; 16(6): 607-612

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/607.asp>

0 引言

大环内酯类抗生素有多种,如红霉素(erythromycin, EM)、克拉霉素、罗红霉素和阿齐霉素(azithromycin, AZM)等,他们具有良好的抗菌作用,在临床上应用广泛,但胃肠道反应常见,红霉素最为明显,阿齐霉素等新品种则相对较轻^[1-2]。在体实验表明红霉素等大环内酯可使胃肠蠕动增加,排空加快^[3],离体状态下可使胃肠平滑肌收缩功能增强^[4]。研究表明离体状态下红霉素的作用主要是通过胃动素受体发挥,而在体情况下,部分由迷走神经参与作用^[5]。临床研究表明用小剂量红霉素来治疗糖尿病胃轻瘫^[6]和早产儿喂养困难等,疗效显著^[7]。有资料表明阿齐霉素同样也是胃动素受体激动剂,具有促进胃排空的作用,并且比红霉素作用时间更长,不易于其他药物发生相互作用,有希望开发为新的治疗胃瘫的药物^[8]。他们在发挥促进胃肠运动的作用中,迷走神经的感觉传入是否发挥作用,目前还未见报道,所以本实验用这两种药物作为研究,观察大环内酯类抗生素对胃肠感觉传入的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠64只,体质量200-250 g,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供,红霉素标准品(编号130307-200215)中国药品生物制品检定所生产,阿齐霉素(编号021020)金华立信医药有限公司生产。

1.2 方法 实验前大鼠禁食24 h,自由饮水,随机分为红霉素组和阿齐霉素组,每组32只,各组再分成4组($n=8$),即对照组、小剂量(0.1 mg/kg)、中剂量(0.5 mg/kg)和大剂量(1 mg/kg)组。大鼠用200 g/L乌拉坦ip麻醉,6 mL/kg体质量。颈部正中切开,气管插管,备人工呼吸用。一侧颈静脉插管输液,备注射药物用。腹部剑突下皮肤正中切口,于胃大弯膜部作切口,将扩张用的水囊经胃大弯切口置入胃体部。实验时向水囊内

注水2-3 mL(0.5 mL/s,水温保持37℃左右)扩张胃,并维持扩张状态20 s作为对胃壁机械感受器的刺激。在上腹部食道根部分离出膈下迷走神经前支,并用镊子夹伤神经中枢端。用双极铂金丝电极(直径0.3 mm,极间距2 mm)钩上神经前支,引导膈下迷走神经的传入电活动,神经周围用温石蜡油保温并防止神经干燥。引导的电位输入AVB-11生物电放大器放大后,在VC-10型记忆示波器上显示,并用DAB-1100直方图仪的Windows-discriminator选择综合电位中的一类电位,作脉冲计数直方图处理。将神经放电直方图用RJG-4022记录仪记录,BI-2000图象分析系统计算记录到的直方图面积。

整个实验中动物肛温保持在38℃左右,并持续监测心电图。手术操作完成后,各项指标在稳定15 min后进行记录作为对照。

统计学处理 实验中所记录的直方图测算面积后,进行自然对数(ln)转换成正态分布。数据用对数值的mean±SD表示,采用SPSS统计软件作单向方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 红霉素 静脉注射小剂量红霉素自发放电无显著变化。中、大剂量组注药后自发放电增多,分别于5 min和10 min后开始有统计学意义,中、大剂量两组间无显著差异,而两者与对照组和小剂量组间差异有统计学意义(表1,图1)。

静脉注射小剂量红霉素对扩胃诱发放电无显著影响。中、大剂量组注药后扩胃诱发放电增强,于15 min开始有统计学意义,直至30 min仍维持在较高水平,但两组间无差异显著性而与对照组和小剂量组间差异有统计学意义(表2,图1)。

2.2 阿齐霉素 静脉注射小剂量阿齐霉素自发放电无显著变化。中、大剂量组注药后自发放电增强,分别于10 min和20 min开始有统计学意义,但两组间差异无显著性而与对照组和小剂量组间有统计学意义(表3,图2)。

静脉注射小剂量阿齐霉素对扩胃诱发放电均无显著影响。中、大剂量组注药后扩胃诱发放电增强,分别于15 min和20 min具有统计学意义,但此两组间无差异显著性而与对照组和小剂量组间有统计学意义(表4,图2)。

2.3 红霉素和阿齐霉素对膈下迷走神经传入放电的影响比较 相同剂量红霉素与阿齐霉素比较

表 1 红霉素对膈下迷走神经自发传入放电的影响

分组	对照组	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
对照组	7.85 ± 0.15	7.79 ± 0.16	7.74 ± 0.25	7.80 ± 0.23	7.72 ± 0.35	7.78 ± 0.23	7.71 ± 0.40	7.75 ± 0.46
0.1 mg/kg	7.84 ± 0.22	7.85 ± 0.22	7.84 ± 0.19	7.90 ± 0.24	7.89 ± 0.32	7.84 ± 0.27	7.90 ± 0.22	7.81 ± 0.42
0.5 mg/kg	7.85 ± 0.30	8.01 ± 0.29	8.23 ± 0.17 ^{ac}	8.24 ± 0.28 ^{bc}	8.32 ± 0.26 ^{bd}	8.34 ± 0.37 ^{bd}	8.48 ± 0.34 ^{bd}	8.51 ± 0.25 ^{bd}
1 mg/kg	7.85 ± 0.45	7.85 ± 0.36	8.18 ± 0.36	8.27 ± 0.21 ^a	8.48 ± 0.24 ^{bd}	8.54 ± 0.26 ^{bd}	8.55 ± 0.25 ^{bd}	8.62 ± 0.46 ^{bd}

组间: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照. 组间: ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照.

表 2 红霉素对膈下迷走神经扩胃诱发传入放电的影响

分组	对照组	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
对照组	8.31 ± 0.13	8.21 ± 0.23	8.18 ± 0.22	8.23 ± 0.16	8.13 ± 0.29	8.13 ± 0.36	8.06 ± 0.52	8.13 ± 0.30
0.1 mg/kg	8.32 ± 0.23	8.28 ± 0.25	8.17 ± 0.27	8.20 ± 0.22	8.13 ± 0.15	8.19 ± 0.21	8.10 ± 0.19	8.10 ± 0.30
0.5 mg/kg	8.30 ± 0.34	8.36 ± 0.25	8.40 ± 0.27	8.49 ± 0.22	8.59 ± 0.26 ^{ad}	8.54 ± 0.34 ^{ad}	8.69 ± 0.28 ^{bd}	8.70 ± 0.20 ^{bd}
1 mg/kg	8.14 ± 0.40	8.16 ± 0.37	8.41 ± 0.34	8.39 ± 0.27	8.56 ± 0.22 ^{bd}	8.61 ± 0.20 ^{bd}	8.62 ± 0.22 ^{bd}	8.74 ± 0.32 ^{bd}

组间: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照. 组间: ^d $P < 0.01$ vs 对照.

表 3 阿齐霉素对膈下迷走神经自发传入放电的影响

分组	对照组	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
对照组	7.85 ± 0.31	7.85 ± 0.23	7.80 ± 0.17	7.81 ± 0.21	7.79 ± 0.20	7.74 ± 0.21	7.77 ± 0.26	7.78 ± 0.20
0.1 mg/kg	7.85 ± 0.41	7.84 ± 0.31	7.87 ± 0.33	7.86 ± 0.24	7.90 ± 0.31	7.86 ± 0.30	7.83 ± 0.21	7.83 ± 0.40
0.5 mg/kg	7.87 ± 0.08	7.85 ± 0.30	8.15 ± 0.33	8.33 ± 0.23 ^{bd}	8.43 ± 0.31 ^{bd}	8.57 ± 0.43 ^{bd}	8.40 ± 0.38 ^{bd}	8.36 ± 0.28 ^{bd}
1 mg/kg	7.85 ± 0.22	7.94 ± 0.34	7.93 ± 0.41	7.90 ± 0.24	7.98 ± 0.39	8.28 ± 0.38 ^{ac}	8.28 ± 0.38 ^{ac}	8.47 ± 0.31 ^{bd}

组间: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照. 组间: ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照.

表 4 阿齐霉素对膈下迷走神经扩胃诱发传入放电的影响

分组	对照组	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
对照组	8.28 ± 0.12	8.32 ± 0.08	8.33 ± 0.14	8.30 ± 0.14	8.26 ± 0.16	8.24 ± 0.22	8.27 ± 0.13	8.29 ± 0.12
0.1 mg/kg	8.29 ± 0.28	8.30 ± 0.26	8.25 ± 0.29	8.22 ± 0.28	8.29 ± 0.16	8.22 ± 0.19	8.21 ± 0.23	8.21 ± 0.20
0.5 mg/kg	8.31 ± 0.20	8.30 ± 0.24	8.42 ± 0.19	8.49 ± 0.23	8.53 ± 0.23 ^{ac}	8.54 ± 0.30 ^{ad}	8.57 ± 0.21 ^{ad}	8.54 ± 0.26 ^{ad}
1 mg/kg	8.30 ± 0.17	8.28 ± 0.23	8.33 ± 0.18	8.29 ± 0.27	8.36 ± 0.36	8.42 ± 0.21 ^{ac}	8.59 ± 0.20 ^{ad}	8.67 ± 0.22 ^{bd}

组间: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照. 组间: ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照.

(图3A-B), (1)红霉素起效时间要早于阿齐霉素:红霉素引起自发放电显著增加的起始时间中剂量5 min和大剂量10 min, 而阿齐霉素在中剂量和大剂量分别为10 min和20 min放电显著增加. 对扩胃诱发放电的影响, 红霉素发挥显著作用的起始时间在中剂量和大剂量分别为15 min和10 min, 而阿齐霉素分别为15 min和25 min. (2)两者的作用强度不同: 无论中剂量还是大剂量, 红霉素的作用都大于阿齐霉素, 并且随剂量增大, 差异显著性也增加. (3)中剂量作用峰值不同,

对自发放电和扩胃诱发放电的影响, 阿奇霉素在20 min和25 min有一高峰, 随后稍有回落, 最终作用强度弱于红霉素.

3 讨论

胃肠感觉的初级传入神经元有内源性和外源两大类, 内源性初级传入神经元属肠神经系统, 位于肌间神经丛和黏膜下神经丛, 感受胃肠腔内化学物质变化、黏膜和肌层的扭曲变形^[9]. 胃肠内在神经系统相对完整独立但又受外源性神经

■应用要点

本文对胃肠感觉传入的研究, 有利于大家全面了解胃肠激素的功能, 同时也提示迷走神经不仅在胃肠运动和胃肠液分泌中有重要作用, 在激素发挥作用时, 迷走神经的感觉传入也发挥了重要作用, 所以即使在对胃肠溃疡病的治疗中, 作迷走神经切除术也应慎重.

■名词解释

1 自发传入放电: 在没有给予外来刺激的情况下, 神经纤维上记录到的自发产生的放电现象。

2 扩胃诱发放电: 给予人为扩张刺激即扩张胃诱发神经纤维产生的放电现象。

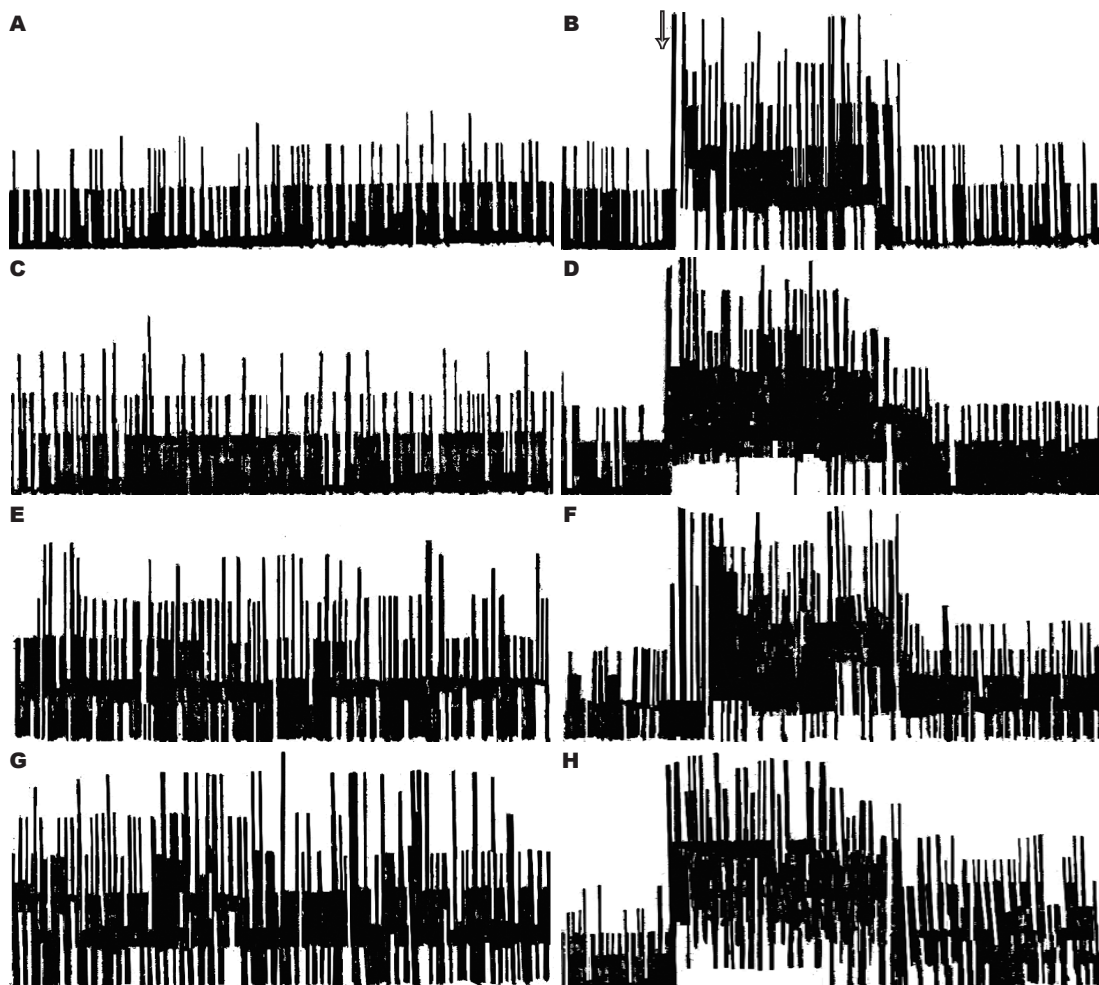
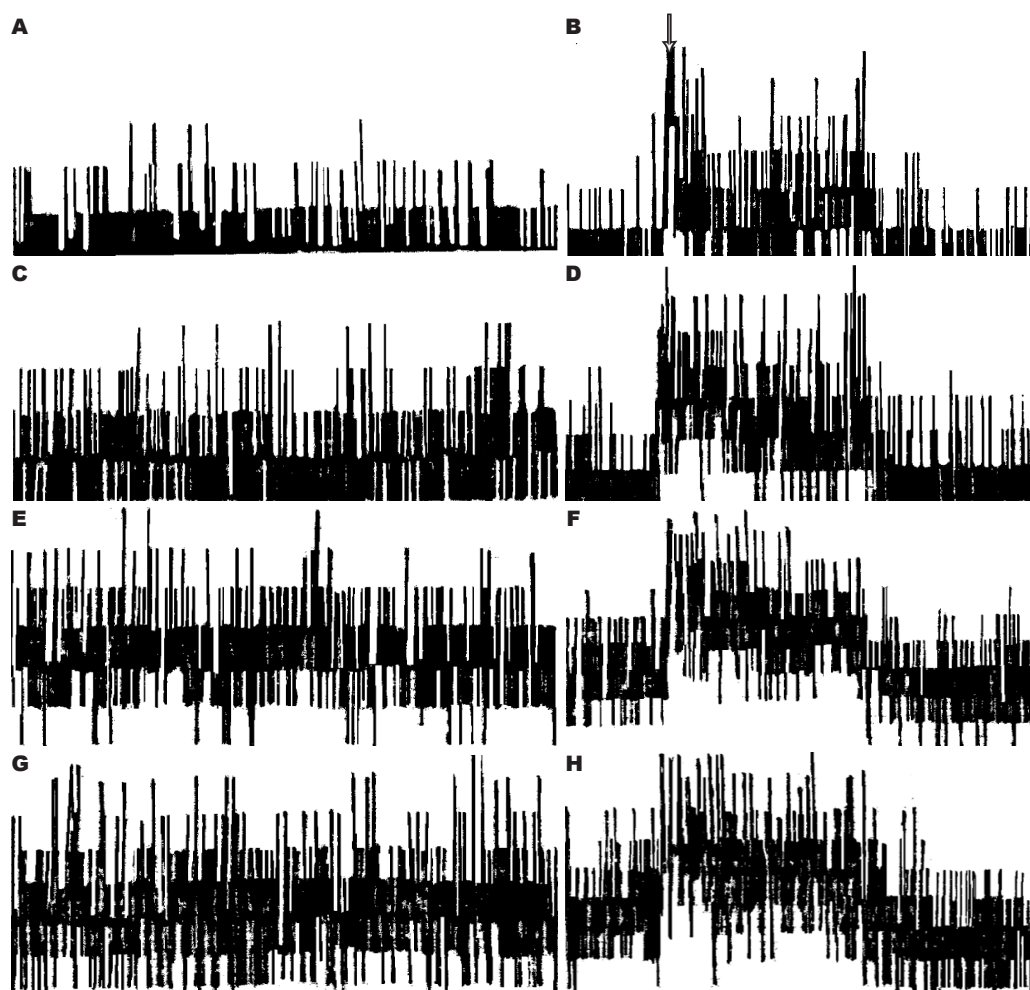


图 1 0.5 mg/kg红霉素对膈下迷走神经传入放电的影响. 图中可见在静脉注射红霉素0.5 mg/kg后自发放电增强, 扩胃诱发放电也增强(箭头表示开始扩胃). A, C, E, G: 自发放电; B, D, F, H: 扩胃诱发放电. A-B: 对照; C-D: 10 min; E-F: 20 min; G-H: 30 min.

系统控制. 外源性神经元主要包括迷走神经初级传入神经元和脊髓初级传入神经元以及肠离心神经元, 这些神经元分别感受消化道内容物的化学特性和肌肉的紧张性, 并将其信号通过迷走神经传入纤维上传至节状神经节孤束核、迷走神经背核、延髓最后区, 此感觉路径主要感受生理性刺激. 浆膜及肠系膜受体感受胃肠的运动和变形、扭曲, 信号通过脊髓背根传入中枢, 此路径主要传导伤害性刺激^[10]. 另外, 肠离心神经元于肠壁投射至椎前神经节, 通过交感神经传至中枢^[11]. 内在神经系统和外来神经系统相互协调, 完成对胃肠功能的调节. 一个或者多个环节出现问题, 便会产生各种胃肠功能障碍.

本实验中观察到, 静脉注射中剂量红霉素和阿齐霉素对膈下迷走神经传入放电有明显作用, 无论是自发还是扩胃诱发放电在注药后 5 min均增强, 30 min后维持在较高水平. 但在剂量达到1 mg/kg后胃肠感觉传入放电增加反而迟

后, 并且本课题组也曾将剂量逐渐增加最大至 10 mg/kg, 直视状态下能明显观察到胃十二指肠蠕动, 迷走神经传入放电增加依然较0.5 mg/kg迟后, 这也提示红霉素和阿齐霉素对膈下迷走神经传入放电的影响不具有剂量依赖性, 作用机制可能有差异. 而先前就胃动素对胃肠运动功能的研究资料也表明, 胃动素对胃的作用不是剂量依赖性的^[12]. 另外杨春敏 *et al*^[13]就红霉素对狗消化间期和餐后胃肠运动影响的研究中发现在消化间期静脉注射红霉素0.5 mg/kg时、引起的胃和十二指肠肠收缩与自发MMCIII相一致, 随剂量增大至10 mg/kg则胃十二指肠持续收缩、或逆行收缩、甚至出现恶心呕吐. 这提示静脉注射0.5 mg/kg红霉素接近于生理剂量, 1 mg/kg及以上则可能属超生理剂量. 同样, 在用红霉素治疗喂养困难的早产儿时也发现不同剂量组3-5 mg/(kg·d), 6-9 mg/(kg·d), 10-15 mg/(kg·d)静脉缓慢滴注3-5 μ g/(kg·min), 最小剂



同行评价

本文从新的角度研究大环内酯类抗生素的胃肠道不良反应, 具有一定理论价值。

图 2 0.5 mg/kg阿齐霉素对膈下迷走神经传入放电的影响. 图中可见静脉注射阿齐霉素0.5 mg/kg后, 自发放电和扩胃诱发放电增强(箭头表示开始扩胃). A, C, E, G: 自发放电; B, D, F, H: 扩胃诱发放电. A-B: 对照; C-D: 10 min; E-F: 20 min; G-H: 30 min.

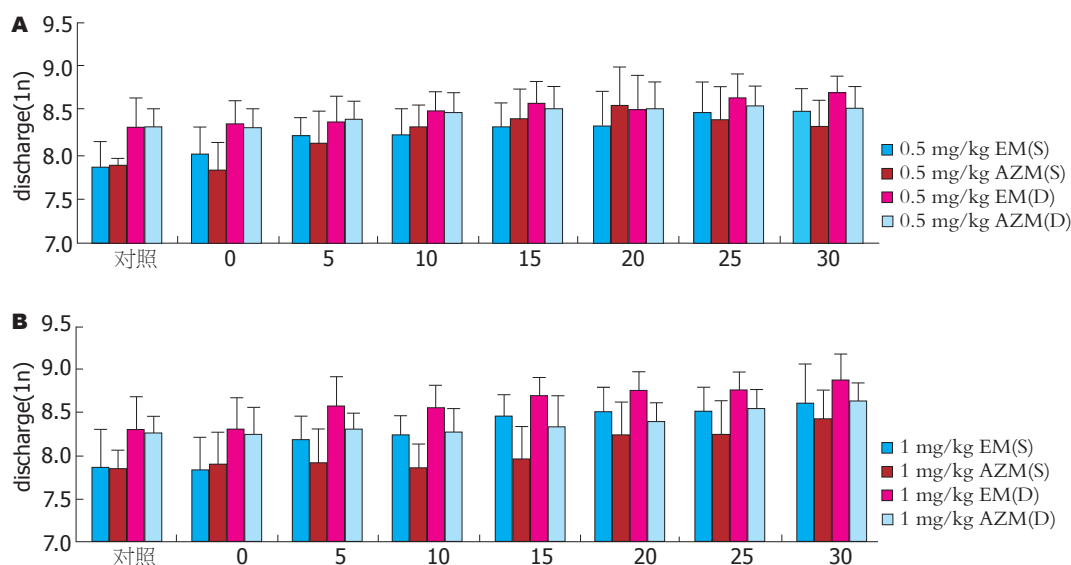


图 3 EM与AZM比较(S: 自发传入放电, D: 扩胃诱发传入放电). A: 0.5 mg/kg EM与0.5 mg/kg AZM比较; B: 1 mg/kg EM与1 mg/kg AZM比较.

量组3-5 mg/(kg·d)效果最好^[7]. 所以我认为, 红霉素在接近生理剂量作用下, 胃肠感觉传入增

强有跟胃肠运动功能是协调一致的, 产生生理反应较快; 而在超生理剂量作用下, 胃肠感觉的

生理反应被抑制,感觉传入的增加是继发于药物引起的胃十二指肠持续收缩、或逆行收缩等不良反应。但详细机制尚待进一步证实。

红霉素和阿齐霉素同为胃动素受体激动剂,可作用于胃窦、平滑肌和胃肠神经系统胃动素受体^[14]引起膈下迷走神经传入放电增强,表明他们对胃肠感觉是有促进作用的。以往的研究资料已经证实,胃动素和红霉素均可通过外周或者中枢^[15-16]使胃肠运动功能增强。运动与感觉总是相互联系的,所以红霉素及其衍生物促进两者之间的良性互动,改善胃肠功能,对于治疗糖尿病胃轻瘫、早产儿喂养困难等是有利的。

但他们在作用上也有一定差别,红霉素在结构上更接近胃动素,作用时间更早,强度更大,这与他们在临床应用时引起的胃肠反应强弱是一致的。所以相同剂量阿齐霉素对胃肠运动和胃肠感觉的影响均比红霉素更小,加上他不影响肝脏细胞色素氧化酶CYP450的活性^[17-18],更有希望成为新一代促胃动力药。这些可能都对治疗糖尿病胃轻瘫、早产儿喂养困难等有利。而对于大环内酯类抗生素对感觉传导的各个环节的影响及分子机制,所引起胃肠感觉传入冲动增多有何生理意义也有待进一步探索。

本试验是在乌拉坦麻醉的大鼠上进行的,乌拉坦麻醉对自主神经传出有兴奋^[19]或者抑制^[20]作用,各种报道不相一致,我们采用夹闭传出端的方法阻断了膈下迷走神经的传出放电,而只记录传入放电,避免了传出放电的干扰,并且从对照组观察,试验记录过程中乌拉坦麻醉对传入放电的影响无统计学意义,所以此方法反应的结果真实可信。

4 参考文献

- 1 王荣环. 大环内酯类抗生素的不良反应分析. 天津医科大学学报 2004; 10: 236-237
- 2 李华, 林兆雄. 90例红霉素不良反应回顾性分析. 广东药学院报 2000; 16: 231-232
- 3 Ohwada S, Satoh Y, Kawate S, Yamada T, Kawamura O, Koyama T, Yoshimura S, Tomizawa N, Ogawa T, Morishita Y. Low-dose erythromycin reduces delayed gastric emptying and improves gastric motility after Billroth I pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 2001; 234: 668-674
- 4 Huang J, Zhou H, Mahavadi S, Sriwai W, Lyall V, Murthy KS. Signaling pathways mediating gastrointestinal smooth muscle contraction and MLC20 phosphorylation by motilin receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G23-G31
- 5 Mathis C, Malbert CH. Erythromycin gastrokinetic activity is partially vagally mediated. *Am J Physiol* 1998; 274: G80-G86
- 6 刘凤林, 王志刚, 秦新裕, 陈绍亮. 红霉素促进糖尿病大鼠胃排空的研究. 中华实验外科杂志 2002; 19: 312-313
- 7 黄爱萍, 叶晓霓, 同建霞. 不同剂量红霉素治疗新生儿喂养困难的临床研究. 右江医学 2006; 34: 154-155
- 8 Moshiree B, Nicholas G, Verne GN, Philip P, Toskes PP. Azithromycin as novel treatment for gastroparesis? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: S321-S326
- 9 Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 2004; 72: 143-164
- 10 Berthoud HR, Blackshaw LA, Brookes SJ, Grundy D. Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 28-33
- 11 Szurszewski JH, Ermilov LG, Miller SM. Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i6-i10
- 12 陈元方. 胃肠肽类激素基础与临床. 第1版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版, 1997: 328
- 13 杨春敏, 张秀荣, 毛高平, 张映辉, 曹传平, 步晓华. 红霉素对狗消化间期和餐后胃肠运动的影响及机制探讨. 中国药理学通报 2001; 17: 186-190
- 14 Depoortere I. Motilin and motilin receptors: characterization and functional significance. *Verh K Acad Geneesk Belg* 2001; 63: 511-529
- 15 唐明, 张洪燕, 蒋正尧, 徐路, T.L. Peeters. 中枢外源性胃动素对大鼠脑干胃相关神经元电活动及胃运动的影响. 生理学报 2000; 52: 416-420
- 16 孙向荣, 唐明, 蒋正尧. 胃动素受体激动剂红霉素对大鼠下丘脑葡萄糖反应神经元的作用. 中国应用生理学杂志 2005; 21: 248-251
- 17 Ito K, Ogihara K, Kanamitsu S, Itoh T. Prediction of the in vivo interaction between midazolam and macrolides based on in vitro studies using human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 945-954
- 18 Pai MP, Graci DM, Amsden GW. Macrolide drug interactions: an update. *Ann Pharmacother* 2000; 34: 495-513
- 19 张引国, 魏洁. 乌拉坦麻醉深度与家兔心脏自主神经功能的关系. 心脏杂志 2006; 18: 626-628, 635
- 20 戴生明, 单坤坤, 刘建国, 殷明, 苏定冯. α -氯醛糖、乌拉坦和戊巴比妥钠对大鼠压力反射的影响. 中国药理学通报 1998; 14: 345-347

编辑 李军亮 电编 郭海丽

兔肝VX2瘤活体二维多体素¹H-MRS的成像技术

颜荣华, 肖恩华, 梁斌

颜荣华, 肖恩华, 梁斌, 中南大学湘雅二医院放射科 湖南省长沙市 410011

颜荣华, 中山大学博士在读, 主要从事影像学研究.

国家十五科技攻关课题资助项目, No. 2007BAI05B06

国家自然科学基金资助项目, No. 30070235, No. 30470508

湖南省自然科学基金资助项目, No. 06JJ20081

湖南省科技厅基金资助项目, No. 04-SK-306-2

湖南省中医药管理局基金资助项目, No. 202064, No. 204057

作者贡献分布: 颜荣华与肖恩华对此文所作贡献两均等; 此课题由肖恩华与颜荣华设计; 研究过程由颜荣华与梁斌操作完成; 研究所用分析工具由颜荣华提供; 数据分析由颜荣华, 肖恩华, 梁斌完成; 本论文写作由肖恩华, 颜荣华完成.

通讯作者: 肖恩华, 410011, 湖南省长沙市人民中路139号, 中南大学湘雅二医院放射科. cjr.xiaoenhua@vip.163.com

电话: 0731-5292116 传真: 0731-5533525

收稿日期: 2007-01-31 修回日期: 2008-01-22

Technology of *in vivo* two-dimension multi-voxel ¹H magnetic resonance spectroscopy for rabbit liver VX2 tumor

Rong-Hua Yan, En-Hua Xiao, Bin Liang

Rong-Hua Yan, En-Hua Xiao, Bin Liang, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Supported by: the National Key Technologies Research and Development Program of China during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2007BAI05B06; National Natural Science Foundation of China, No. 30070235, No. 30470508; the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 06JJ20081; the Foundation from Science and Technology Department of Hunan Province, No. 04-SK-306-2; and the Foundation from Administration of traditional Chinese medicine of Hunan Province, No. 202064, No. 204057

Correspondence to: En-Hua Xiao, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, 139 Renmin Middle Road, Changsha 410011, Hunan Province, China. cjr.xiaoenhua@vip.163.com

Received: 2007-01-31 Revised: 2008-01-22

Abstract

AIM: To investigate the best techniques of *in vivo* two-dimension multi-voxel ¹H magnetic resonance spectroscopy (2D ¹H-MRS) for rabbit liver VX2 tumor.

METHODS: The liver of 8 New Zealand white rabbits was implanted directly and respectively with VX2 tumor lump after abdominal cavity was opened. 2D ¹H-MRS acquisition *in vivo* and unenhanced MRI was performed respectively

from the 2nd week to 4th week after VX2 tumor was implanted. With knee coil, *in vivo* 2D ¹H-MRS acquisitions were performed respectively with different TR, different TE and different NEX at 1.5 T MR scanner when other parameters were the same. The distinction between groups was analyzed by SPSS11.0 with baseline and signal-noise ratio (SNR).

RESULTS: From the qualified MRS spectrum, there were up to 6 peaks which could be identified: methyl lipids (Lip1), methylene lipids (Lip2), methylene lipids with double carbon bond (Lip3), glutamine and glutamate complex (Glx), Choline (Cho), and glycogen and glucose complex (Glyu). Baseline and SNR had no significant differences between TR = 1000 ms, 2000 ms and 3000 ms. Baseline had no significant difference between TE = 30 ms and 144 ms. Except that SNR of Glx with 30 ms in TE was higher than that with 144ms in TE (1.95 ± 0.36 vs 1.24 ± 0.26 , $P < 0.05$), SNR of other metabolites were similar. With NEX increasing, the distinctions of baseline between NEX = 4, 8 and 16 were significant ($\chi^2 = 10.000$, $P < 0.01$). SNR of all metabolites increased when NEX was increased gradually. Both of baseline and SNR were the best when NEX was 16.

CONCLUSION: It's practical of *in vivo* two-dimension multi-voxel ¹H-MRS on the rabbit liver VX2 tumor by a 1.5 T MR scanner. Immobilization, pre-scan (reaching FWHM ≤ 10 Hz and WS $\geq 98\%$), knee coil, TR = 1000 ms, TE = 30 ms and NEX = 16 may be the best to acquire highly qualified spectra.

Key Words: Liver; VX2 tumor; Magnetic resonance spectroscopy; Magnetic resonance imaging; Imaging technology; Animal experiment

Yan RH, Xiao EH, Liang B. Technology of *in vivo* two-dimension multi-voxel ¹H magnetic resonance spectroscopy for rabbit liver VX2 tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 613-620

摘要

目的: 探讨兔肝VX2瘤活体二维多体素¹H-MRS (2D ¹H-MRS)最佳成像技术.

■背景资料

近年来国内外对肝脏活体¹H-MRS的研究逐渐增多, 但还远不及脑部和前列腺等器官, 尚处于实验阶段, 且多局限于肝脏弥漫性病变. 我们针对一些可能影响MRS信噪比和分辨率的因素, 结合既往的文献对有关扫描技术手段和参数的优选进行探讨.

■同行评议者

吕明德, 教授, 中山大学附属第一医院肝胆外科

■ 研发前沿

肝癌的磁共振研究以常规MRI研究为主,¹H-MRS的研究很少,尤其是针对肝肿瘤活体二维多体素¹H-MRS的检查技术,国内外尚缺乏系统性研究。

方法: 经腹腔瘤块种植法行肝内VX2瘤种植成功的新西兰大白兔8只, 2-4 wk内采用1.5 T磁共振仪行常规MRI平扫及活体2D ¹H-MRS检查。采用膝关节线圈, 在其他参数不变的条件下分别用不同的TR、TE和NEX进行活体2D ¹H-MRS扫描, 观察2D ¹H-MRS谱图, 以波谱图基线情况和信噪比为指标进行统计学分析。

结果: 在成功获得的可析性2D ¹H-MRS谱图上最多可看到6个主要的代谢物波峰: 脂质的甲基峰(Lip1)、脂质的亚甲基峰(Lip2)、含双碳键的脂质亚甲基峰(Lip3), 谷氨酰胺和谷氨酸复合物(Glx), 胆碱化合物(Cho), 糖原和葡萄糖复合物(Glyu)。TR逐渐延长(1000 ms、2000 ms、3000 ms)基线情况和信噪比无显著性差异。TE = 30 ms与TE = 144 ms的基线情况未见明显差异, 除了Glx的信噪比在TE = 30 ms时稍高(1.95 ± 0.36 vs 1.24 ± 0.26 , $P < 0.05$)以外, 其他几种代谢物的信噪比在不同TE无显著性差异。激励次数(number of excitation, NEX)增大(4次、8次、16次), 谱图基线差别较大($\chi^2 = 10.000$, $P < 0.01$), 主要代谢物信噪比均随着NEX的增大而增大。NEX = 16次时基线最平稳, 信噪比最高。

结论: 利用1.5 T磁共振仪进行兔肝VX2瘤活体2D ¹H-MRS检查可行, 为肝脏2D ¹H-MRS的临床应用提供了基础。通过加强制动、预扫描使匀场和抑水效果达到水峰FWHM ≤ 10 Hz, WS $\geq 98\%$ 、使用膝关节线圈、选择TR = 1000 ms、TE = 30 ms和较大的NEX(16次)等有利于成功获得较高质量的可析性波谱图。

关键词: 肝脏; VX2瘤; 磁共振波谱学; 磁共振成像; 影像技术学; 动物实验

颜荣华, 肖恩华, 梁斌. 兔肝VX2瘤活体二维多体素¹H-MRS的成像技术. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 613-620
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/613.asp>

0 引言

近年来国内外对肝脏活体¹H-MRS的研究逐渐增多, 但还远不及脑部和前列腺等器官, 尚处于实验阶段, 且多局限于肝脏弥漫性病变^[1-5]。肝癌的磁共振研究以常规MRI研究为主^[6-7], ¹H-MRS的研究很少, 尤其是针对肝肿瘤活体二维多体素¹H-MRS的检查技术, 国内外尚缺乏系统性研究。我们以兔肝VX2瘤为实验对象, 对活体二维多体素¹H-MRS(*in vivo* two-dimension multi-voxel ¹H magnetic resonance spectroscopy, 2D ¹H-MRS)有

关扫描技术手段和参数的优选进行探讨, 以期为该技术的临床应用奠定基础。

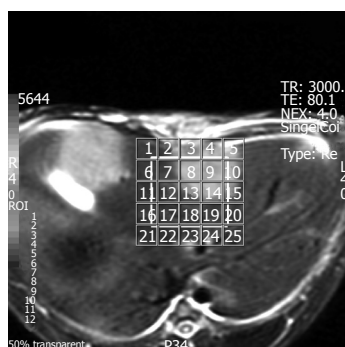
1 材料和方法

1.1 材料 健康的新西兰大白兔8只, 5-6 mo, 体重1.7-2.2 kg/只, 雌雄不限(由中南大学湘雅二医院动物实验中心提供)。VX2瘤株为VX2鳞状细胞癌(由第四军医大学友情提供), 均采用经腹腔瘤块种植法成功建立兔肝VX2瘤移植模型。种植后2-4 wk内对所有荷瘤兔进行常规MRI及2D ¹H-MRS检查, 所用机器为美国GE公司的1.5T Signa Twin Speed磁共振仪。所有荷瘤兔采用30 g/L戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉, 并留置针头, 在扫描过程中不断添加少量戊巴比妥钠以持续保持兔深度麻醉状态。常规行快速扰相梯度回波序列(FSPGR)T1WI和快速反转快速自旋回波脉冲序列(FRFSE)T2WI横断面扫描, 人膝关节线圈, 扫描参数如下: FSPGR T1WI: TR = 400 ms, TE = Minful, 矩阵 256×192 , FOV = $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$, 层厚5 mm, 间距0 mm, 激励次数(number of excitation, NEX) = 4次, 扫描时间5'12"; FRFSE T2WI: TR = 3000 ms, TE = 80 ms, 矩阵 320×256 , FOV = $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$, 层厚5 mm, 间距0 mm, NEX = 4, 扫描时间3'18"。

1.2 方法 2D ¹H-MRS预实验显示用人膝关节线圈+兔躯干周围紧密填塞随机器附带的填塞垫, 可达到对动物固定和腹部加压制动的效果; 预扫描匀场和抑水的效果达到水峰的半高宽(full width at half max, FWHM) ≤ 10 Hz, 抑水率(water suppression, WS) $\geq 98\%$ 时才获得较稳定的波谱。正式试验检测不同的TR, 不同的TE, 不同的NEX对2D ¹H-MRS的影响。8只兔分别用不同的TR: 1000 ms, 2000 ms和3000 ms, 而其他参数相同(表1)条件下进行2D ¹H-MRS扫描, 频率方向: A/P, 自动中心频率: 水, 自动水抑制优化。8只兔分别用不同的TE: 30 ms和144 ms, 而其他参数相同条件下进行2D ¹H-MRS扫描(表1)。8只兔分别用不同的NEX: 4次、8次和16次, 而其他参数相同条件下进行2D ¹H-MRS扫描(表1)。感兴趣区(voxel of interest, VOI): 以T2WI为波谱解剖定位图, VOI范围包括肿瘤中心部分、肿瘤周围部分及瘤周正常肝组织。同一个肿瘤每次扫描尽量选取大小、位置相同的VOI, 尽量避开大的胆管和血管, 远离膈肌、皮下脂肪和肠管(图1)。预扫描: 在每次扫描前, 均采用机器自动预扫描进行匀场和抑水, 达到FWHM ≤ 10 Hz, WS $\geq 98\%$ 时才进行正式的波谱采集。

表 1 兔肝VX2瘤不同TR、TE和NEX值2D ¹H-MRS成像参数

线圈	序列	TR(ms)	TE(ms)	NEX	FOV(cm)	相位矩阵	层厚(mm)	扫描时间
TR: 膝关节	STEAM	1000	30	8	10×10	10×10	10	13'28"
	STEAM	2000	30	8	10×10	10×10	10	26'56"
	STEAM	3000	30	8	10×10	10×10	10	40'24"
TE: 膝关节	STEAM	1000	30	8	10×10	10×10	10	13'28"
	STEAM	1000	144	8	10×10	10×10	10	13'28"
NEX: 膝关节	STEAM	1000	30	4	10×10	10×10	10	6'44"
	STEAM	1000	30	8	10×10	10×10	10	13'28"
	STEAM	1000	30	16	10×10	10×10	10	26'48"

图 1 2D ¹H-MRS 定位图及VOI.

机器自带的分析软件FuncTool 2测得. 具体方法是以0.49-0.70 ppm范围为无代谢物空白区, 测量每个体素内各个主要代谢物信号与无代谢物处背景噪声的比值. 以VOI内所有体素SNR的平均值作为该次扫描的SNR值.

统计学处理 采用SPSS11.0对所有数据进行统计学处理. 不同参数组MRS谱图的基线等级进行Friedman M检验. 不同参数组各代谢物的SNR首先进行正态性检验和方差齐性检验, 若符合条件则进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和LSD-*t*检验或两独立样本*t*检验. 若不符合条件, 则采用Kruskal-Wallis H检验和Wilcoxon秩和检验. $P<0.05$ 为差异有显著性意义, $P<0.01$ 为差异有极显著性意义.

2 结果

2.1 兔肝VX2瘤活体2D ¹H-MRS谱图特征 在成功获得的可析性2D ¹H-MRS谱图上(取值范围0.49-4.30 ppm)最多可看到6个主要的代谢物波峰, 其化学位移分别为: 脂质(Lipids)的3个峰, 包括甲基峰(Lip1), 位于0.8-1.1 ppm亚甲基峰(Lip2), 位于1.1-1.5 ppm和含双碳键的亚甲基峰(Lip3), 位于1.9-2.3 ppm谷氨酰胺和谷氨酸复合物(glutamine and glutamate complex, Glu+Gln, Glx), 位于2.10-2.49 ppm胆碱化合物(Choline, Cho), 位于3.1-3.3 ppm糖原和葡萄糖复合物(glycogen and glucose complex, Glyu), 位于3.35 ppm-3.90 ppm^[1,11-14]. 其中Lip2是波谱图上最高最明显的共振峰, Lip1峰常常与其紧密相连, 无明显分界, 有时仅表现为Lip2右侧一浅的“顿挫”, 而无独立的波峰, 测量时将Lip(1+2)作为一个联合峰共同测量, 简称为Lip. Lip3也与Glx峰两者相互重叠、融合, 分界不明显, 表现为圆钝的波峰, 有时顶端可见一小的“切迹”, 无尖锐的峰尖. 成功的波谱图上Cho峰和Glyu基本独立(图2).

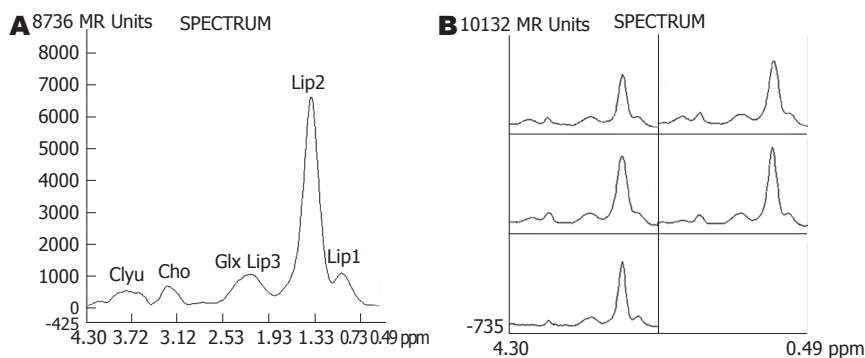
MRS采集所得的数据经机器自带的分析软件FuncTool 2处理, 可同时获得四种图形, 即化学位移图、波谱图、代谢图和以T2WI作为解剖图的代谢与解剖叠加图(简称代-解图). 观察不同参数扫描所获得的波谱图, 观察指标包括基线情况和代谢物波峰的信噪比(signal-to-noise ratio, SNR). 基线: 越平稳的基线代表波峰分析越可靠^[8]. 根据波谱图基线是否平稳、主要波峰是否可辨认及背景噪声对主要波峰的影响大小等综合判断, 将所得MRS波谱图的基线分为4个等级: 0级-基线光滑平稳, 代谢物波峰显示清晰, 靠近水峰和脂质(Lipids)峰处代谢物波峰无明显增宽、畸变, 主要代谢物波峰无明显重叠. 1级-基线轻度失稳, 但主要代谢物波峰可清晰辨认, 靠近水峰或脂质峰处基线上抬、代谢物波峰轻度增宽, 主要代谢物波峰稍有重叠, 重叠部分小于波峰的1/2. 2级-基线不稳, 包括脂质峰在内的波峰增宽, 共振峰移位或畸变, 相邻波峰重叠部分接近或大于波峰的1/2. 3级-基线严重变形, 波谱图杂乱无章, 代谢物波峰不可辨认. 波谱图经由两位放射学医师盲法观察并分别评价. 对于基线评价为2和3级的谱图由于其代谢物波峰明显失真, 难以明确界定, 不能用于下一步的分析^[9-10], 只有基线为0和1级的谱图才被视为成功的可析性波谱, 能被用于下一步指标的测量. SNR是代谢物平均信号值与背景噪声标准差的比值, 通过

■创新盘点

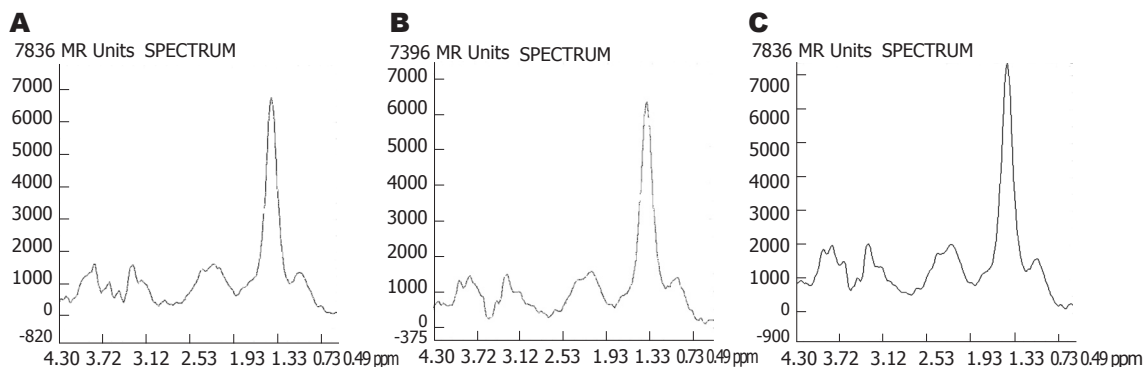
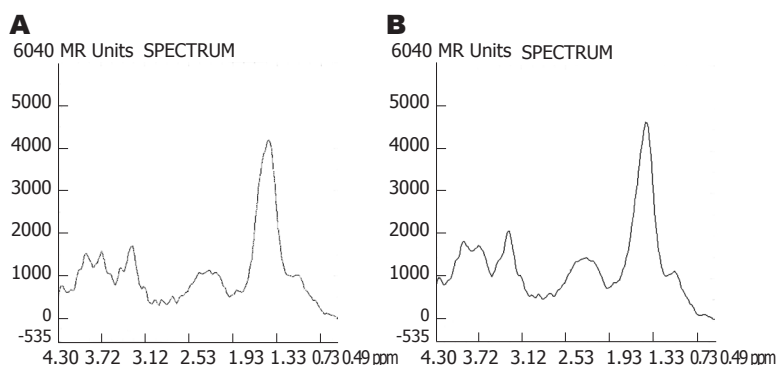
本文利用1.5 T磁共振仪对兔肝VX2瘤动物模型进行2D ¹H-MRS检查, 获得肝脏活体2D ¹H-MRS优选参数.

■应用要点

本研究为肝脏活体 $2D^1H$ -MRS临床应用中扫描技术和参数优选提供了基础。

图 2 $2D^1H$ -MRS波谱图.

A: 6个主要的代谢物波峰;
B: $2D^1H$ -MRS波谱图.

图 3 $2D^1H$ -MRS波谱图. A: TR = 1000 ms; B: TR = 2000 ms; C: TR = 3000 ms.图 4 $2D^1H$ -MRS波谱图. A: TE = 30 ms; B: TE = 144 ms.

2.2 TR, TE和NEX对 $2D^1H$ -MRS的影响 在其他参数相同的情况下, TR = 3000 ms和TR = 2000 ms的扫描时间分别是TR = 1000 ms时的3倍和2倍,但三者基线情况无显著性差异($\chi^2 = 3.429$, $P = 0.180$, 表2). 虽然TR = 3000 ms时, Lip, Glx, Cho和Gly的SNR值均比TR = 1000 ms和2000 ms时要稍高,但均没有统计学意义($P > 0.05$, 表3, 图3). 在其他参数相同的情况下, TE=30 ms和144 ms的基线情况无明显差别($\chi^2 = 0.200$, $P = 0.655$, 表2). 除了Glx的信噪比在TE = 30 ms时高于TE = 144 ms($P < 0.05$)以外,其他几种代谢物的信噪比无显著性差异(表4, 图4). 两者扫描时间相同. 在其他参数相同的情况下,随着NEX的增大,谱图基线情况明显改善($\chi^2 = 10.000$, $P = 0.007$, 表2),波峰的可分辨程度提高. 主要代谢物的SNR值也随着NEX的增大而明显增大($P < 0.01$). NEX = 16

次时所获得的波谱基线及SNR均明显优于NEX = 4次和8次(表5, 图5),但是,检查时间成倍增长.

3 讨论

我们利用1.5 T磁共振仪对兔肝VX2瘤动物模型进行 $2D^1H$ -MRS检查,成功获得的谱图曲线与文献报道的肝脏活体 1H -MRS检查所得的波谱曲线特征基本一致^[10-14],可观察到Lipids(包括Lip1, Lip2, Lip3), Glx, Cho和Gly等主要代谢物波峰,说明1.5T磁共振仪进行兔肝VX2瘤活体二维多体系 1H -MRS检查具有可行性. 由于 1H -MRS敏感性相对较低,并且受到硬件、软件、后处理技术和生理运动等因素的影响,肝脏的 1H -MRS成像的可靠性与常规应用的要求之间还存在较大的差距,波谱图像质量,包括分辨率及信噪比等都是限制其应用的关键. 除

表 2 兔肝VX2瘤不同TR、TE和NEX值2D ¹H-MRS扫描基线情况

基线	TR(ms)			TE(ms)		NEX(次)		
	1000	2000	3000	30	144	4	8	16
0	1	2	2	1	2	0	1	4
1	5	5	5	5	4	4	5	3
2	2	1	1	2	1	3	2	1
3	0	0	0	0	1	1	0	0

表 3 兔肝VX2瘤不同TR值2D ¹H-MRS扫描SNR情况(mean ± SD)

SNR	TR(ms)			F/χ^2	P
	1000	2000	3000		
Lip	5.73 ± 0.54	5.78 ± 1.26	6.43 ± 1.44	0.551	0.759
Glx	1.95 ± 0.36	1.78 ± 0.28	1.97 ± 0.53	0.624	0.732
Cho	2.20 ± 0.37	2.12 ± 0.25	3.18 ± 1.84	0.869	0.648
Glyu	2.01 ± 0.23	2.15 ± 0.41	3.54 ± 2.35	1.104	0.576

表 4 兔肝VX2瘤不同TE值2D ¹H-MRS扫描SNR情况(mean ± SD)

SNR	TE(ms)		t/z	P
	30	144		
Lip	5.73 ± 0.54	3.73 ± 0.79	-1.121	0.260
Glx	1.95 ± 0.36	1.24 ± 0.26	2.770	0.020
Cho	2.20 ± 0.37	1.88 ± 0.29	-0.801	0.423
Glyu	2.01 ± 0.23	1.54 ± 0.28	1.263	0.235

表 5 兔肝VX2瘤不同TR值2D ¹H-MRS扫描SNR情况(mean ± SD)

SNR	NEX(次)			F/χ^2	P
	4	8	16		
Lip	4.37 ± 0.63	5.73 ± 0.54	7.14 ± 1.09	11.100	0.004
Glx	1.50 ± 0.26	1.95 ± 0.36	2.38 ± 0.24	8.833	0.012
Cho	1.41 ± 0.43	2.20 ± 0.37	2.57 ± 0.78	8.625	0.013
Glyu	1.34 ± 0.26	2.01 ± 0.23	2.84 ± 0.81	12.599	0.002

■名词解释

ppm: 磁共振波谱的横坐标表示不同物质中质子的进动频率,以标准物的质子进动频率为基准,其他代谢物中质子进动频率与标准物中质子进动频率的差别,以百万分几(ppm)来表示。

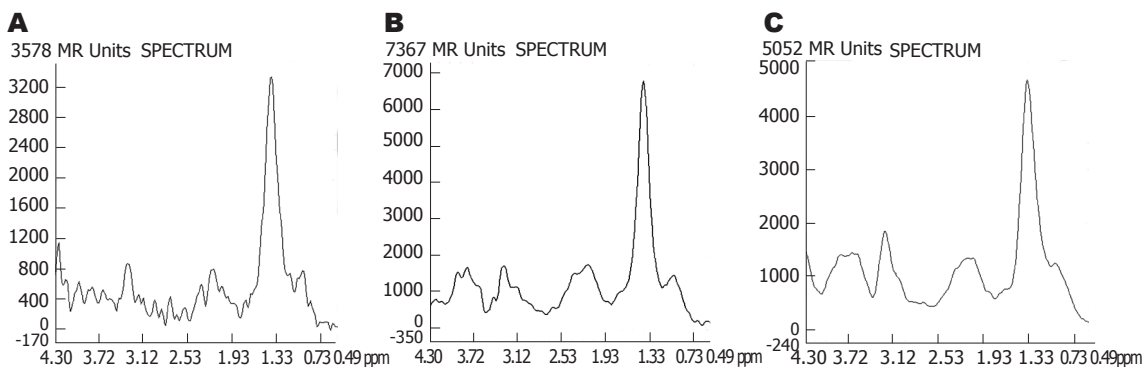


图 5 2D ¹H-MRS波谱图. A: NEX = 4; B: NEX = 8; C: NEX = 16.

了原子核的自然丰度和固有敏感性、代谢物在生物体内的浓度、原子核的化学位移范围、磁场强度等一些固定的和现有设备无法改变的因素外,检查对象的制动、匀场和抑水、线圈、VOI、TR、TE、NEX等检查技术和参数等都对多体素¹H-MRS扫描成败和谱图质量产生不同程度的影响.在目前有限肝脏活体¹H-MRS文献中,对参数和序列的选择缺乏系统的研究.我们针对一些可能影响MRS信噪比和分辨率的因素,结合既往的文献对有关扫描技术手段和参数的优选进行探讨.

多体素MRS的体素比单体素MRS更小,MRS数据所采集的范围针对的是多个很小的部分,检查部位微小的移动就可能造成MRS采集的失败.肝脏紧邻膈肌,易受呼吸运动的影响,多体素MRS检查时间又比较长,所以对制动的要求更

高,检查对象的严格制动、克服呼吸运动干扰成为成功获得可析性波谱的重要前提^[15-16].我们采取了持续深度麻醉和腹部周围紧密加压的方法.耳缘静脉麻醉荷瘤兔后留置针头,推注少量肝素防止凝血,在MR扫描过程中不断添加少量3%戊巴比妥钠,可使动物在较长时间的检查过程中持续保持深度麻醉状态,明显减弱呼吸幅度,而且防止了一次性注射大量的戊巴比妥钠造成兔麻醉过量死亡.同时,我们在动物躯干周围紧密填塞填塞垫,增加躯体的占空比,使腹部恰好位于线圈中央,既限制了躯体的活动,又减小了呼吸运动幅度.我们曾尝试未用填塞垫加压就进行扫描,发现所得波谱曲线均表现为基线严重变形,呈锯齿状,不能明确显示代谢物波峰,由此证明腹部加压、严格制动对于成功获得高质量波谱确有帮助.MRS是利用化学位移的微

■同行评价

本研究采用的技术先进,对临床肿瘤检测及治疗有重要意义。

小变化采集信号,而原子核化学位移的变化极为微小,一旦磁场不均匀就会造成信号难以测量。非常均匀的磁场是获得高分辨率可析性波谱的必要条件^[17]。同时,肝脏¹H-MRS研究的代谢产物的含量都很低,明显低于体内水的含量,若水抑制效果差,代谢物的共振峰会受到水峰的影响,甚至淹没^[2]。¹H-MRS通常用水峰FWHM和WS等指标来判断磁场均匀性和抑水程度。匀场效果越好,FWHM的值越小,抑水越充分,WS的值越高,波谱的基线就越平稳。本研究使用机器自动预扫描完成匀场和抑水过程。我们发现,预扫描后FWHM太高,抑水WS太低,所得谱图均质量不高,靠近水峰处基线上升明显,邻近的Glyu峰甚至Cho峰都会受到影响,明显上抬、增宽、畸变。FWHM \leq 10Hz, WS \geq 98%时情况改善。所以在本实验中我们限定只有当预扫描效果达到FWHM \leq 10Hz, WS \geq 98%时才进行波谱采集,对于首次预扫描不成功或未达到上述标准者,再进行一次预扫描,若仍未达到则调整VOI的位置。必要时手动高阶匀场,务必使每一次均能达到好的匀场和抑水效果后再进行正式的扫描。

尽管头部线圈是进行头部MRS检查的标准线圈,也是最为成熟的线圈,而GPFLEX表面线圈也是肝脏成像最常用的线圈,但是我们在预实验中比较了三种线圈后,发现对于兔这一类体积较小的实验动物,头部线圈相对太大,而柔软线圈活动度大,固定难度大,两者都不利于制动。固定和腹部加压制动效果最好的就只有人膝关节线圈。同时,众所周知,接收线圈大,被检测组织小,信噪比就会降低,用小的线圈接受信号,可使信噪比提高,所以膝关节线圈理论上也是信噪比最好的线圈。¹H-MRS的VOI的信号强度与所检测的质子核的数量成正比,VOI增大可以提高信噪比,本研究中采用的实验动物-兔,本身的肝脏体积就明显小于人类肝脏,而且VOI还要包括肿瘤、瘤周和邻近正常肝组织三个部分,所以VOI需要尽量大,以提高信噪比,利于多个部位的对比。与此同时,VOI的位置也很重要,临近如空气和骨等两种相差显著的组织造成的磁敏感性不同可使局部磁场不均匀,引起共振峰的增宽畸变^[18-19]。所以,VOI应尽量避免大的血管和胆管,减少其引起的内磁场的均匀性;远离皮下脂肪组织,避免VOI外的脂肪等信号污染;远离肠管,避免肠道内气体对MRS采集造成影响;而且,VOI还要避开肿瘤内大的液化坏死

灶。我们发现当VOI内包括大的胆管、血管,或者太多肿瘤中心液化坏死区时,匀场和抑水效果都不好,提示VOI位置的选择对2D ¹H-MRS检查结果也有很大影响。

由于不同代谢物的T1和T2值不同,所以不同的TR和TE参数可以影响波谱的测量结果。TR时间主要根据代谢物的T1决定,大部分活体生物组织主要化合物的T1弛豫时间相近(1000-1500 ms)^[20-21]。长的TR时间允许更多的纵向弛豫,使更多磁化分量恢复到平衡位置。TR太短,纵向弛豫没有完全恢复,会影响信号强度;TR太长,则会增加扫描时间。如果TR时间恰好等于或稍长于T1时间,那么每次激励后的磁共振信号更强。本实验在其他参数不变的条件下,分别以TR = 1000 ms, 2000 ms和3000 ms进行采集,结果基线情况并未随TR时间的延长而改善,TR的改变对SNR影响也不大,可能与TR = 1000 ms已与肝内大部分代谢物的T1时间相近有关,也可能是我们的动物数太少,尚不能体现长TR的优势。但是TR = 3000 ms和2000 ms的采集时间明显延长,分别比TR = 1000 ms时长3倍和2倍。权衡利弊之后,我们认为TR取1000 ms更合适。Inglese *et al*^[22]比较了TE=30 ms, 144 ms和288 ms时脑部2D ¹H-MRS(PRESS序列)的结果,发现TE为30 ms时脑内所有代谢物的信噪比最高,但是,虽然TE = 288 ms时SNR最低,其可重复性却最好,作者认为在临床应用中脑部¹H-MRS检查采用长TE(270 ms或288 ms)会更有利于显示长T2代谢物的单峰。而Longo *et al*^[2]测量肝脏的脂肪浸润时,发现在TR = 3000 ms时,TE由50 ms到200 ms逐步延长时,脂质的信号强度会逐渐变小。短TE可以增加信噪比,使得一些化合物容易检测,脂质、谷氨酰胺和谷氨酸复合物、肌醇等物质信号显示更充分。当TE大于3倍的T2时,由于复杂信号的相互作用,可导致共振信号反向去相位,会使某些化合物难以检测。一般认为短TE适合绝大多数代谢物的T2时间^[2,12],但长TE时波谱基线较平稳^[23-24]。我们的研究发现,在兔肝VX2瘤2D ¹H-MRS检查中,TE的改变对MRS谱图基线情况和对波谱主要代谢物波峰分辨能力的影响不大。除了Glx的信噪比在短TE时好外,其他主要代谢物的信噪比均没有显著性差异。这一无统计学意义的结果也可能与本研究例数太少有关。结合既往的文献,我们认为取短TE(30 ms)更适于兔肝VX2瘤2D ¹H-MRS成像。

由于在磁共振信号采集过程中噪声的累积

是随机的, 而信号的累积是相关的, 当脉冲重复采集信号时, 除了射频脉冲的相位, 其他参数均没有改变, 即在一对激励脉冲中, 用第1次相位脉冲采集的信号减去第2次反相位脉冲采集的信号, 使得第1个信号与第2个反相信号加在一起, 而其他不依赖于射频脉冲相位的错误信号将被删除. 因此在扫描过程中增加NEX会使信号在计算机中逐渐累加而增强, 而噪声被平均而分散, NEX增加n倍, 信噪比增加 $n^{1/2}$ 倍, 但是扫描时间也会增加n倍. 在本研究中我们发现NEX的改变对于兔肝VX2瘤2D ¹H-MRS检查结果的影响较大, NEX由4次增加到8次, 再增加到16次, 波谱曲线的基线逐渐变得平稳, 波峰之间的重叠减少, 对代谢物波峰的分辨能力提高, 信噪比增加, 波谱质量提高, 证实NEX是2D ¹H-MRS检查的重要影响因素之一, 增大NEX可以成功获得高质量的波谱图. 但是随着NEX增大, 检查时间也随之成倍增长, 由于本研究中我们采取了一系列加强制动、持续深度麻醉的措施, 所以每次26 min 48 s的扫描时间尚在动物实验可接受的范围内. 为获得成功的可析性波谱, 更好的观察实验动物模型的多体素¹H-MRS特征, 我们认为在本次实验研究中NEX设定为16次更为有利. 但是检查时间过长势必会对¹H-MRS临床应用的开展和推广产生阻碍, 所以关于临床检查中NEX的选择仍有待于进一步的研究.

总之, 利用1.5T磁共振仪进行兔肝VX2瘤活体2D ¹H-MRS检查具有可行性. 通过加强制动, 预扫描匀场和抑水效果达到水峰FWHM \leq 10 Hz、WS \geq 98%, 使用人膝关节线圈, 选择TR = 1000 ms, TE = 30 ms和较大的NEX(16次)等有利于兔肝VX2瘤活体2D ¹H-MRS检查成功获得较高质量的可析性波谱. 本研究为肝脏活体2D ¹H-MRS临床应用中扫描技术和参数优选提供了基础.

4 参考文献

- 1 Cho SG, Kim MY, Kim HJ, Kim YS, Choi W, Shin SH, Hong KC, Kim YB, Lee JH, Suh CH. Chronic hepatitis: in vivo proton MR spectroscopic evaluation of the liver and correlation with histopathologic findings. *Radiology* 2001; 221: 740-746
- 2 Longo R, Ricci C, Masutti F, Vidimari R, Crocè LS, Bercich L, Tiribelli C, Dalla Palma L. Fatty infiltration of the liver. Quantification by 1H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography. *Invest Radiol* 1993; 28: 297-302
- 3 Taylor-Robinson SD, Sargentoni J, Bell JD, Saeed N, Changani KK, Davidson BR, Rolles K, Burroughs AK, Hodgson HJ, Foster CS, Cox IJ. In vivo and in vitro hepatic 31P magnetic resonance spectroscopy and electron microscopy of the cirrhotic liver. *Liver* 1997; 17: 198-209
- 4 范明霞, 田建明, 陆建平, 金爱国, 曾浩. 活体 ¹H磁共振波谱分析在大鼠脂肪肝中应用价值的初步研究. *中国医学影像技术* 2004; 20: 1503-1505
- 5 Roser W, Stock KW. 1H MRS of liver and brain in a patient with AL amyloidosis. *Magn Reson Imaging* 1997; 15: 993-996
- 6 张冬, 孙清荣, 易习之, 夏良. 原发性肝癌的MRI表现. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 623-624
- 7 Jia-He Yang, Tian-Geng You, Nan Li, Qi-Jun Qian, Ping Wang, Zhen-Lin Yan, Meng-Chao Wu. Relationship between the imaging features and pathologic alteration in hepatoma of rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 69-72
- 8 Kreis R, Ernst T, Ross BD. Development of the human brain: in vivo quantification of metabolite and water content with proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 1993; 30: 424-437
- 9 Gonen O, Gruber S, Li BS, Mlynárik V, Moser E. Multivoxel 3D proton spectroscopy in the brain at 1.5 versus 3.0 T: signal-to-noise ratio and resolution comparison. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22: 1727-1731
- 10 Kuo YT, Li CW, Chen CY, Jao J, Wu DK, Liu GC. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of large focal hepatic lesions and metabolite change of hepatocellular carcinoma before and after transcatheter arterial chemoembolization using 3.0-T MR scanner. *J Magn Reson Imaging* 2004; 19: 598-604
- 11 Tarasow E, Siergiejczyk L, Panasiuk A, Kubas B, Dzienis W, Prokopowicz D, Walecki J. MR proton spectroscopy in liver examinations of healthy individuals in vivo. *Med Sci Monit* 2002; 8: MT36-MT40
- 12 Bárány M, Langer BG, Glick RP, Venkatasubramanian PN, Wilbur AC, Spigos DG. In vivo H-1 spectroscopy in humans at 1.5 T. *Radiology* 1988; 167: 839-844
- 13 Bell JD, Cox IJ, Sargentoni J, Peden CJ, Menon DK, Foster CS, Watanapa P, Iles RA, Urenjak J. A 31P and 1H-NMR investigation in vitro of normal and abnormal human liver. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1225: 71-77
- 14 Lim AK, Hamilton G, Patel N, Bell JD, Taylor-Robinson SD. H MR spectroscopy in the evaluation of the severity of chronic liver disease. *Radiology* 2003; 226: 288-289
- 15 Katz-Brull R, Rofsky NM, Lenkinski RE. Breathhold abdominal and thoracic proton MR spectroscopy at 3T. *Magn Reson Med* 2003; 50: 461-467
- 16 Star-Lack JM, Adalsteinsson E, Gold GE, Ikeda DM, Spielman DM. Motion correction and lipid suppression for 1H magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 2000; 43: 325-330
- 17 吴光耀, 孙骏谟, 田志雄. 活体质子磁共振波谱技术分析. *国外医学-临床放射学分册* 2001; 24: 347-350
- 18 Li S, Williams GD, Frisk TA, Arnold BW, Smith MB. A computer simulation of the static magnetic field distribution in the human head. *Magn Reson Med* 1995; 34: 268-275
- 19 Li S, Dardzinski BJ, Collins CM, Yang QX, Smith MB. Three-dimensional mapping of the static magnetic field inside the human head. *Magn Reson Med* 1996; 36: 705-714
- 20 Kreis R, Ernst T, Ross BD. Development of the human brain: in vivo quantification of metabolite

- and water content with proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 1993; 30: 424-437
- 21 Wansapura JP, Holland SK, Dunn RS, Ball WS Jr. NMR relaxation times in the human brain at 3.0 tesla. *J Magn Reson Imaging* 1999; 9: 531-538
- 22 Inglese M, Spindler M, Babb JS, Sunenshine P, Law M, Gonen O. Field, coil, and echo-time influence on sensitivity and reproducibility of brain proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 684-688
- 23 Frahm J, Bruhn H, Hanicke W, Merboldt KD, Mursch K, Markakis E. Localized proton NMR spectroscopy of brain tumors using short-echo time STEAM sequences. *J Comput Assist Tomogr* 1991; 15: 915-922
- 24 方虹, 郭庆林, 张贵祥, 赵海涛, 俞高龙, 赵喜平, 葛雅丽. 正常人脑不同区域 ^1H 磁共振波谱研究. *中华放射学杂志* 1997; 31: 35-39

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

山西省对世界华人消化杂志编辑标准 质量评估的结果 (2007)

本刊讯 根据山西省科技期刊编辑标准质量评估的结果, 世界华人消化杂志(世界华人消化杂志, *WCJD*)2006年在政治, 出版标准, 期刊学术标准和科技期刊编辑标准中存在的问题总结如下, 希望得到更多读者和作者的监督和指正.

1 存在的问题

不管是在广告中还是在编辑中均存在错别字, 如14期1432页胆源性写成了胆原性, 21期2641页反映肿瘤写成了反应肿瘤; 在数字小数点处理问题上也不够规范, 统一和严谨, 如在14期1431页此问题就很明显; 在参考文献的校对和审读中还不够认真, 仔细, 如4期452页参考文献4, 7英文作者名没有大写, 参考文献6英文刊名没有大写; 34期3334页参考文献20刊名没有斜体, 在文章的校对和审读中, 编辑没有严格的执行标准, 如已经规定它改为他, 粘膜改为黏膜, 适应证和综合症的症都改为证, 但在21期和34期封4还存在这些错误; 在标点符号的使用上科学性还不够高, 在4期457页脾、肾和21期2142页分为内引流组、外引流组中的顿号被使用成了逗号.

2 有争议的问题

关于天, 月, 周, 等的中英文用法, 有的建议都用中文, 有的建议用英语, 但英语的缩写也不一样, 如周有的认为是wk, 有的认为是w; 在疗程和疗效, 食管和食道, 消化系与消化道, 抗菌素和抗生素的统一上意见还不够明确, 有待进一步的规范.

今后在更加科学, 统一, 规范的科学编辑标准下, 我们在态度上会认真, 在思想中争创新, 在编辑上更严谨, 在审读中更全面, 在校对中更细心, 避免同样的错误发生, 给大家献上更好更规范的文章. (世界华人消化杂志科学编辑: 程剑侠 2008-02-28)

新型核苷类似物 β -L-D4A对人DNA聚合酶 β 和 δ 的作用及其机制

李岩, 林菊生, 张颖慧, 王晓燕, 何星星, 汪鸿, 高玲玲

李岩, 林菊生, 张颖慧, 王晓燕, 何星星, 汪鸿, 高玲玲, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030

李岩, 湖北省武汉市同济医院消化内科博士, 主要从事肝脏病学研究。

国家自然科学基金重点资助项目, No. 30330680

作者贡献分布: 本课题由林菊生, 李岩, 张颖慧, 王晓燕, 何星星, 汪鸿, 高玲玲设计; 研究过程中酶的提纯由李岩, 张颖慧共同完成, 药物实验部分由李岩操作完成; 数据分析由李岩, 王晓燕完成; 本论文写作由李岩, 林菊生, 张颖慧完成。

通讯作者: 林菊生, 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肝病研究所。

fengshuwenliyan@yanhoo.com.cn

电话: 027-83663661 传真: 027-83663661

收稿日期: 2007-12-11 修回日期: 2008-01-25

Effect of β -L-D4A on human DNA polymerases β and δ and its mechanism

Yan Li, Ju-Sheng Lin, Ying-Hui Zhang, Xiao-Yan Wang, Xing-Xing He, Hong Wang, Ling-Ling Gao

Yan Li, Ju-Sheng Lin, Ying-Hui Zhang, Xiao-Yan Wang, Xing-Xing He, Hong Wang, Ling-Ling Gao, Institute of Liver Diseases, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30330680

Correspondence to: Professor Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Medical College, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. fengshuwenliyan@yanhoo.com.cn

Received: 2007-12-11 Revised: 2008-01-25

Abstract

AIM: To purify and characterize the DNA polymerase δ and investigate the side effects of β -L-D4A (a novel nucleoside analog) on human DNA polymerases β and δ .

METHODS: Human DNA polymerase δ was separated from crude extract of human HeLa cells by ion exchange chromatography. Detailed kinetic parameters were determined for β -L-D4A against DNA polymerases β and δ .

RESULTS: Human DNA polymerase δ was

purified and characterized with a yield of 15% and a specific activity of 1911 Ukat/mg. When β -L-D4A was used as an inhibitor, the kinetic parameters of human DNA polymerases β and δ were $K_m = 1.86 \mu\text{mol/L}$ and $2.45 \mu\text{mol/L}$, $IC_{50} = 25.21 \mu\text{mol/L}$ and $150.1 \mu\text{mol/L}$, $K_i = 24.03 \mu\text{mol/L}$ and $132.7 \mu\text{mol/L}$, respectively, suggesting that the inhibitory effect of β -L-D4A on human DNA polymerases β and δ was less than that of lamivudine.

CONCLUSION: β -L-D4A is a competitive inhibitor of DNA polymerases β and δ . Its toxic side effects on DNA polymerases β and δ are less than lamivudine. It can be expected to become a high efficient and low toxic anti-HBV agent.

Key Words: Nucleoside; β -L-D4A; Human DNA polymerase β and δ ; Enzyme kinetics; Side effect

Li Y, Lin JS, Zhang YH, Wang XY, He XX, Wang H, Gao LL. Effect of β -L-D4A on human DNA polymerases β and δ and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 621-628

摘要

目的: 对人DNA聚合酶 δ 进行纯化和鉴定, 通过检测 β -L-D4A对人DNA聚合酶 β 和 δ 的作用, 观察 β -L-D4A的毒副作用。

方法: 运用多次离子交换层析的方法提取、纯化人HeLa细胞的DNA聚合酶 δ ; 检测 β -L-D4A对人DNA聚合酶 β 和 δ 的酶动力学作用。

结果: 提纯并鉴定了DNA聚合酶 δ , 收得率是15%, 比活力是1911 Ukat/mg。 β -L-D4A为抑制剂时, 对人DNA聚合酶 β 和 δ 的酶动力学参数分别是 $K_m = 1.86 \mu\text{mol/L}$, $2.45 \mu\text{mol/L}$, $IC_{50} = 25.21 \mu\text{mol/L}$ 和 $150.1 \mu\text{mol/L}$, $K_i = 24.03 \mu\text{mol/L}$ 和 $132.7 \mu\text{mol/L}$, 结果均提示 β -L-D4A对DNA聚合酶 β 和 δ 的抑制作用远小于拉米夫定。

结论: β -L-D4A是人DNA聚合酶 β 和 δ 的竞争

■背景资料

现在对HBV病毒感染的治疗缺乏有效的高效低毒的药物。在我们的前期实验中新型核苷类化合物- β -L-D4A具有强大的抑制病毒逆转录酶的作用。为对该化合物进行系统的全面的评估, 本文进行了酶的动力学研究, 观察药物对纯化的正常人DNA聚合酶的抑制作用, 以便于作出全面的评价。

■同行评价者

高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

■研发前沿

近年来对慢性HBV感染治疗的研究热点集中在2', 3'双脱氧核苷(DDNs)。据报道新型核苷类化合物- β -L-D4A在体外实验中对2.2.15细胞具有高效的抑制病毒复制的作用, 但对于该药物毒副作用尚无相关报道。

性抑制剂, 他对这两种酶的毒副作用远小于拉米夫定, 可望成为更高效低毒的抗HBV类药物。

关键词: 核苷类; β -L-D4A; 人DNA聚合酶 β 和 δ ; 酶动力; 毒副作用

李岩, 林菊生, 张颖慧, 王晓燕, 何星星, 汪鸿, 高玲玲. 新型核苷类似物 β -L-D4A对人DNA聚合酶 β 和 δ 的作用及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 621-628

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/621.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种全球性广泛传播的传染病^[1], 我们在前一项国家自然科学基金课题“抗乙肝病毒药物筛选模型和新化合物的研究”的强力资助下^[2], 发现一种新型抗HBV化合物(β -L-D4A)。我们对其体外抗HBV作用进行研究, 发现它具有比拉米夫定具有更强的抑制HBV DNA复制的作用^[3-4]。因为核苷及核苷类似物在抗病毒逆转录酶的同时, 其最大的副作用就是对正常组织中存在的DNA聚合酶也有抑制作用, 从而对宿主细胞和线粒体具有较大的毒性, 因此本课题对该药物进行毒副作用的研究^[5]。

迄今为止, 在哺乳类细胞中已发现数十种DNA聚合酶, 其中负责DNA修复的关键酶是DNA聚合酶 β ^[6], 而DNA聚合酶 δ 则是领头链的主要复制酶, 在染色体DNA复制中起着重要作用, 而且他与染色体DNA的修复也密切相关^[7-8]。鉴于这两种DNA聚合酶的重要作用, 本课题购买DNA聚合酶 β 并于国内首次提纯DNA聚合酶 δ 并鉴定其活性和纯度, 采用体外DNA聚合酶活性抑制实验来测定我们发现的新型化合物(β -L-D4A)的毒副作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人DNA聚合酶 β 购自R&D公司。 β -L-D4A三磷酸盐由武汉大学药学院协助化学合成, 拉米夫定三磷酸盐由美国Yale大学药学院YC. Cheng教授提供。 HeLa细胞由华中科技大学同济医学院免疫教研室馈赠, 二乙氨基乙基纤维素即DEAE纤维素(DE-52)和磷酸纤维素(P11)购自Whatman公司, 羟基磷灰石(HTP)购自Bio-Rad公司, 检测酶活性所需要的底物 α -³²P-dTTP购自Amersham, 活化小牛胸腺DNA购自Sigma公司, 抗DNA聚合酶 δ 的mAb购自ABR-Affinity BioReagents, 其他试剂购自Gibco。

1.2 方法

1.2.1 人DNA pol δ 的纯化及鉴定: 无特殊说明, 所有的缓冲液均包含1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA和0.01% NP-40, 在P11层析中不加NP-40, 而在HTP层析步骤中不加EDTA。所有的步骤均在0-4℃进行。(1)细胞处理: 细胞进行常规培养, 收集处于对数生长期的HeLa细胞进行冰冻, 取40 g冰冻HeLa细胞于冰上重悬于含有50 mmol/L Tris-Cl(pH7.9), 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 300 mL/L甘油的溶液中, 用Dounce匀浆器30 min冰上匀浆进行破细胞。收集所得液体, 加入KCl使其终浓度为200 mmol/L, 缓慢搅拌10 min, 40 000 g离心60 min, 收集上清, 加入EDTA使其终浓度为2 mmol/L, 获得成分A。测定活性和蛋白浓度。(2)P11处理: 将上步所得成分A用Hepes调整pH为7.2, 用4倍体积的10 mmol/L Hepes(pH7.2), 100 mL/L丙三醇稀释。加入80 mL已用50 mmol/L Hepes(pH7.2), 100 mL/L丙三醇平衡好的P11中, 缓慢混合1 h, 4000 r/min离心5 min, 弃上清。沉淀用400 mL的Tris-Cl(pH7.6), 50 mmol/L KCl的缓冲液进行重悬和再沉淀。沉淀再次重悬于160 mL含有0.4 mol/L KCl的平衡液中, 4000 r/min离心5 min, 保留上清, 该步骤重复2次, 将两次所得上清混合后, 用滤网除去溶液中所含的P11颗粒, 获得成分B。取少量测定蛋白量及酶活性。(3)HTP层析: 将上步成分B加入已用50 mmol/L Tris-Cl(pH7.6)和0.2 mol/L KCl平衡好的P11柱子(2.6 cm×30 cm)上(参见Bio-Rad公司试剂说明书), 2倍于柱子体积的相同平衡液进行洗脱。然后, 选用含有0.2 mol/L KCl的5倍于柱子体积的0.005-0.04 mol/L阶梯浓度梯度的pH7.6的KPO₄进行洗脱。收集洗脱液, 并进行测定A₂₈₀, 结果显示在0.015-0.02 mol/L KPO₄出现了一个较宽的峰值。将峰值处所得溶液分别收集后, 将其余所得成分用固体蔗糖浓缩12 h, 使其体积为1/5, 然后加到500 mL Tris-Cl(pH7.6)中透析12 h, 得到成分C。取少量测定蛋白量及酶活性。(4)DE-52层析: 将上步所得C用Tris-OH调整pH为8.5, 用4倍体积的10 mmol/L Tris-Cl(pH8.5)稀释后, 加入到已用50 mmol/L Tris-Cl(pH8.5)平衡好的DE-52的柱子(1.2 cm×10 cm)上, 用2倍于柱子体积的相同平衡液进行洗脱。然后, 选用含有50 mmol/L Tris-Cl(pH8.5)的8倍于柱子体积的0.01-0.35 mol/L阶梯浓度梯度的KCl进行洗脱。收集洗脱液, 并进行测定A₂₈₀, 结果显示在0.1 mol/L KCl处出现了一个尖锐的峰值, 用15倍柱子体积的0.1 mol/L KCl缓冲液再次洗脱,

表 1 DNA聚合酶 δ 的每一步纯化结果检测

步骤	总蛋白/mg	总活力/Ukat	比活力/(Ukat/mg)	纯化倍数	收得率(%)
细胞粗提成分	88	4460	51	1	100
P11处理后成分	30	3321	110	2	74
HTP层析	13	2558	197	4	57
DE52层析	0.36	688	1911	37	15

收集洗脱液, 与0.05-0.15 mol/L处所得洗脱溶液相混合, 取少量测定蛋白量及酶活性. (5)蛋白浓度测定: 用Bradford法试剂盒测定, 按照使用说明进行操作. (6)酶活性检测反应体系: 反应体系包括: DNA pol δ 2 μ L, 50 μ mol/L dCTP, 50 μ mol/L dGTP, 50 μ mol/L dATP, 50 μ mol/L α - 32 Pd TTP(100 cpm/pmol), 100 mg/L活化DNA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.5 mmol/L $MnCl_2$, 100 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L DTT, 总反应体系为50 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育15 min后, 转到DE81滤纸上, 50 g/L Na_2HPO_4 洗涤3次, 每次10 min, 双蒸水洗涤2次, 每次5 min, 最后用液闪法进行计数测定. (7)SDS-PAGE变性-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 堆积胶5%, 所用电压为80 V, 分离胶为10%, 电压120 V, 考马斯亮蓝染色, 脱色后在凝胶成像系统下拍摄. (8)Western blot: DE52层析后组分进行Western blot, 4 $^{\circ}$ C转移过夜, 50 g/L脱脂奶粉封闭30 min, 鼠抗DNA聚合酶 δ (1:1000)室温孵育1.5 h, 羊抗鼠二抗孵育, 最后用DAB在膜上显色.

1.2.2 药物对DNA pol β 和 δ 的活性抑制测定: (1)测定 K_m : 以拉米夫定的三磷酸盐为对照, 选择1, 3, 5, 7, 10 μ mol/L α - 32 Pd TTP(100 cpm/pmol), 加入药物10 μ mol/L, 其他条件同酶活性检测反应体系, 当进行DNA pol β 的测定时, 将DNA pol δ 换成等单位的DNA pol β , 进行液闪测定. 数据选用Graphpad prism 4 Demo软件进行Lineweaver-Burk双倒数作图求得 K_m . (2)测定 IC_{50} : 参照所求 K_m , α - 32 Pd TTP(100 cpm/pmol)浓度为3 μ mol/L, 药物浓度进行浓度梯度设定, 其他同酶活性检测反应体系, 同样当进行DNA pol β 的测定时, 将DNA pol δ 换成等单位的DNA pol β , 进行液闪测定. 抑制率(%) = (1-药物组液闪计数/空白对照液闪计数) \times 100%. (3)测定 K_i : 参照所求 IC_{50} , 选择五个不同的药物浓度梯度, 分别与2和5 μ mol/L α - 32 Pd TTP(100 cpm/pmol)作用, 其余试剂同酶活性检测反应体系, 同样当进行DNA pol β 的测定时, 将DNA pol δ 换成等单位的

DNA pol β , 测定液闪计数. 用Dixon作图法求 K_i .

2 结果

2.1 纯化并鉴定DNA聚合酶 δ

2.1.1 HTP层析: 细胞的处理及P11处理的目的是去除大量的核酸及杂蛋白. HTP层析柱经梯度 KPO_4 洗脱后依次测定收集管内的洗脱液 A_{280} 值, 发现当用0.015 mol/L洗脱时, 在第21管开始逐渐出现一个较大的洗脱峰, 33管附近出现一个小的洗脱峰, 到用0.025 mol/L KPO_4 缓冲液洗脱大约45管时 A_{280} 开始明显下降. 说明该蛋白主要集中在从0.015 mol/L至0.02 mol/L KPO_4 缓冲液洗脱的部分, 分别收集两峰部分的洗脱液, 进行酶的活性鉴定, 证实了前一个峰含有目的蛋白组分, 后一个峰则为杂蛋白. 用Bradford法试剂盒测定蛋白浓度, 经计算蛋白量是13 mg(图1A).

2.1.2 DE52层析: DE52层析柱经梯度KCl洗脱时测定 A_{280} 值, 结果显示峰值集中在21-30管的收集液中, 这时所用的KCl缓冲液浓度是0.1 mol/L, 收集0.05-0.15 mol/L KCl洗脱的11-40管洗脱液, 取少量测定蛋白量及酶活性, 证实其正是目的蛋白, 量为0.36 mg(图1B).

2.1.3 SDS-PAGE和Western blot: 将每个步骤所得蛋白浓缩后进行SDS-PAGE电泳, 发现其杂蛋白条带逐渐减少, 最后显示仅余一条蛋白带, 为鉴定该条带是否为目的蛋白, 对DE52层析后组分进行Western blot, 证实了该蛋白确实是目的蛋白DNA聚合酶 δ , 说明该蛋白得到了有效的纯化(图2-3).

2.1.4 纯化过程中对每一步的总蛋白、总活力、比活力、纯化倍数以及收得率进行比较: 随着纯化步骤的深入, 总蛋白和总活力呈逐步下降的趋势, 而比活力和纯化倍数则逐步升高, 收得率则逐步降低, 表明杂蛋白逐渐减少而目的蛋白逐步得到纯化(表1).

2.2 β -L-D4A对DNA聚合酶 β 和 δ 的酶动力学作用

2.2.1 K_m 的测定: β -L-D4A对DNA聚合酶 β 的作用, 无任何抑制剂时, 其直线回归方程为

■ 相关报道

既往研究显示, 绝大多数抗HBV或HIV的核苷类化合物在不同程度的抗病毒复制的同时, 也对正常人体内的人DNA聚合酶产生抑制作用, 而抑制作用的强度限制了很多具有高效抗病毒化合物的应用.

■创新盘点

本研究首次采用国际上公认的研究核苷类化合物毒副作用的系统来评价新型的化合物-β-L-D4A的安全性。

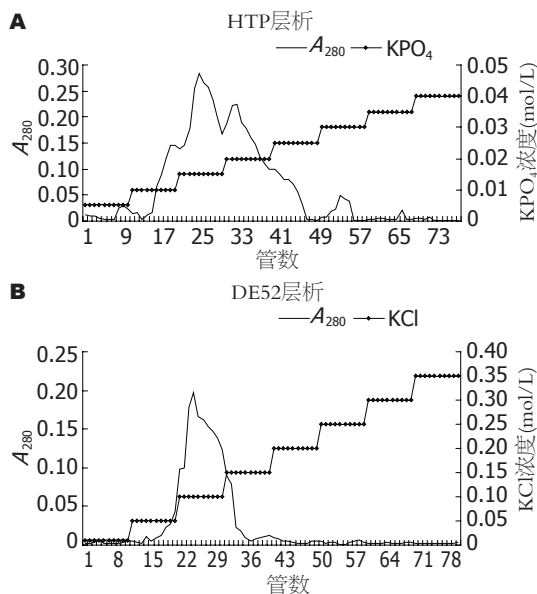


图1 洗脱峰由每次层析的 A_{280} 测定和洗脱液的浓度梯度决定。

$y = 7.981x + 6.051$ ($r^2 = 0.9962$), 经计算得 K_m 值为 $1.33 \mu\text{mol/L}$; 拉米夫定做抑制剂时, $y = 11.640x + 6.165$ ($r^2 = 0.9992$), K_m 值为 $1.89 \mu\text{mol/L}$, 而β-L-D4A是抑制剂时, $y = 10.984x + 5.918$ ($r^2 = 0.9994$), K_m 值为 $1.86 \mu\text{mol/L}$ 如图4A). β-L-D4A对DNA聚合酶δ的作用, 无任何抑制剂时, 其直线回归方程为 $y = 8.889 + 17.486x$ ($r^2 = 0.9994$)经计算得 K_m 值为 $1.96 \mu\text{mol/L}$; 拉米夫定做抑制剂时, $y = 9.162 + 26.666x$ ($r^2 = 0.9992$), K_m 值为 $2.91 \mu\text{mol/L}$, 而β-L-D4A是抑制剂时, $y = 8.766 + 21.467x$ ($r^2 = 0.9994$), K_m 值为 $2.45 \mu\text{mol/L}$ (图4B).

2.2.2 IC_{50} 的测定: 采用半对数作图, β-L-D4A对DNA聚合酶β的作用, 拉米夫定的 IC_{50} 是 $20.14 \mu\text{mol/L}$, 而β-L-D4A的 IC_{50} 是 $25.21 \mu\text{mol/L}$ (图5A). β-L-D4A对DNA聚合酶δ的作用, 拉米夫定的 IC_{50} 是 $127.5 \mu\text{mol/L}$, 而β-L-D4A的 IC_{50} 是 $150.1 \mu\text{mol/L}$. β-L-D4A对两种酶的半数抑制浓度均大于拉米夫定(图5B).

2.2.3 K_i 的测定: 图中两直线交点的横坐标的绝对值即是 K_i . 图6是化合物对人DNA聚合酶β的 K_i 测定. 图6A是拉米夫定, 两条直线回归方程分别是: $y = 0.490x + 8.130$ ($r^2 = 0.9992$), $y = 0.394x + 6.567$ ($r^2 = 0.9994$), 计算得 $K_i = 16.15 \mu\text{mol/L}$, 图6B是β-L-D4A, 两条直线回归方程分别为: $y = 0.105x + 6.555$ ($r^2 = 0.9970$), $y = 0.037x + 4.926$ ($r^2 = 0.9944$), 计算得 $K_i = 24.03 \mu\text{mol/L}$. 图7是化合物对人DNA聚合酶δ的 K_i

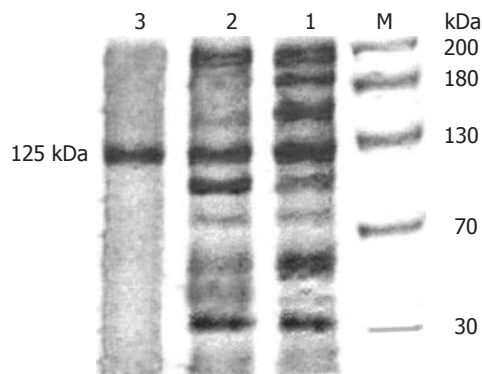


图2 将每一步提纯后组分进行SDS-PAGE电泳. 1: P11处理后组分; 2: HTP层析后组分; 3: DE52层析后组分; M: Marker.



图3 对SDS-PAGE中DE52处理后组分用抗DNA聚合酶δ抗体进行Western blot, 证实其成分是DNA聚合酶δ. 1-3均是DE52处理后组分.

测定, 图7A是拉米夫定, 两条直线回归方程分别为: $y = 0.078x + 22.896$ ($r^2 = 0.9948$), $y = 0.018x + 17.520$ ($r^2 = 0.995$), 计算得 $K_i = 89.6 \mu\text{mol/L}$. 而图7B是β-L-D4A, 两条直线回归方程分别为: $y = 0.121x + 21.432$ ($r^2 = 0.9986$), $y = 0.049x + 11.944$ ($r^2 = 0.9923$), 计算得 $K_i = 132.7 \mu\text{mol/L}$.

3 讨论

近年来, 对HBV感染的治疗主要是α-干扰素和核苷类化合物^[9]. 前者的持久应答率低, 需要胃肠外投药, 以及高费用等缺点限制了其应用^[10-11]. 核苷类化合物如拉米夫定(3TC), 治疗费用较低, 而且可以经口服用, 比较方便, 但实验研究与临床应用结果均表明, 停药后病毒复制又重新恢复, 而且耐药株与变异株的产生随着用药时间的延长而增加^[12-13]. 因此, 抗HBV新药的研制是一项十分紧迫的研究课题. 前期实验中β-L-D4A强大的抑制病毒逆转录酶的作用, 使其有可能成为新型的我国自主研发开发的临床药物^[14-15]. 为对该药物做系统的全面的评估, 我们采用现在国际上公认的对核苷类药物毒副作用机制的研究体系即体外进行药物对酶的动力学研究, 观察药物对纯化的正常DNA聚合酶的抑制作用, 以便于作出全面的评价^[16].

在真核生物中存在着多种DNA聚合酶, 如DNA聚合酶α参与染色体DNA的复制^[17-18], DNA聚合酶β主要负责修复^[19-20], DNA聚合酶γ负责线

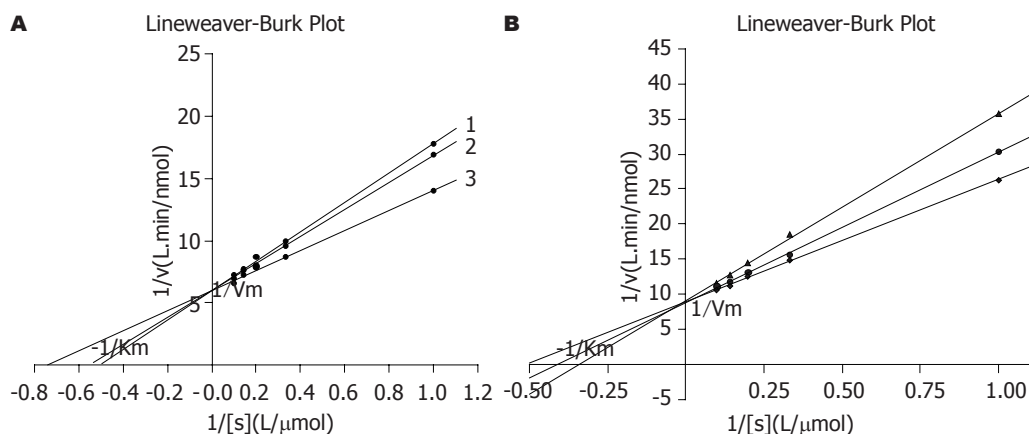


图 4 药物对人DNA聚合酶的 K_m 测定. A: DNA聚合酶 β ; B: DNA聚合酶 δ ; 1: 3TC; 2: β -L-D4A; 3: 无抑制剂.

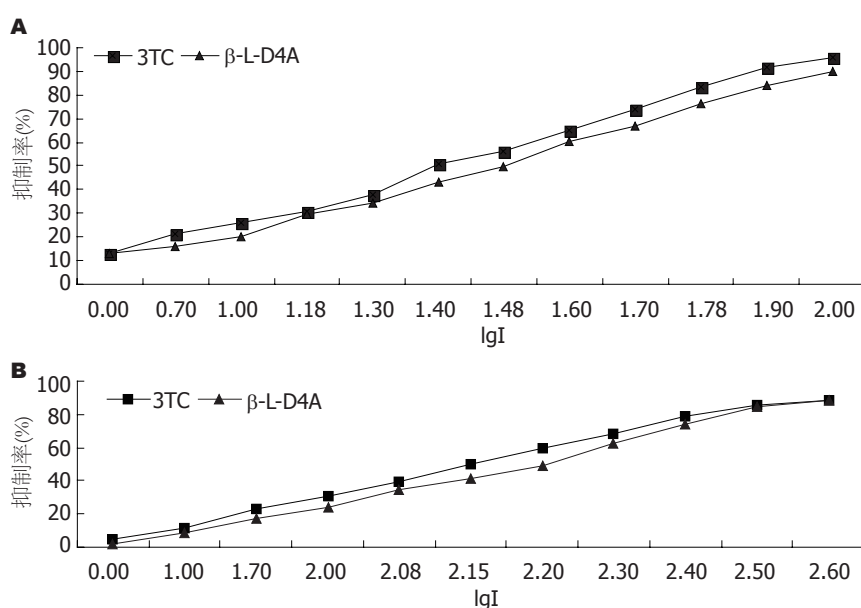


图 5 IC_{50} 半对数作图测定. A: DNA聚合酶 β ; B: DNA聚合酶 δ ; I: 抑制剂浓度($\mu\text{mol/L}$).

立体DNA的复制^[21-22], 而DNA pol δ 则参与了复制和修复两个重要过程^[23-24]. 因为他是细胞核染色体DNA领头链的主要复制酶, 同时也具有非常独特的内在的 $3' \rightarrow 5'$ 核酸外切酶的活性^[25]. 这四种DNA聚合酶占DNA聚合酶总量的90%以上, 因此, 我们对这四种主要的DNA聚合酶进行了研究, 其中DNA聚合酶 α 和 γ 已投稿, 本研究主要报告 β 和 δ 的研究结果.

在检测所有样本中DNA聚合酶活性之前, 必须建立体外检测酶活性的最佳条件. DNA聚合酶的最佳反应体系是: Mn^{2+} , 0.5 mmol/L; 50 mmol/L Tris-HCl; pH7.5; 37°C; 1 mmol/L β -巯基乙醇和1 mmol/L EDTA. 缓冲液中 β -巯基乙醇、EDTA和乙二醇的加入对保持缓冲液的稳定性和酶活性具有重要意义. 尽管离子交换层析的柱反应对条件改变相当敏感, 但是摸索到合适条件时, 层析分离的方法简单且具有重复性.

在本实验中, 经过SDS-PAGE有一条 M_r 125 000的带, 与不同方法获得的不尽相同. 这主要是因为酶的翻译后修饰有关, 而且在纯化过程中, 广泛的蛋白水解作用也会导致酶形式的不同^[26]. 从结果中我们可以看到, 随着纯化的一步进行, 总蛋白和总活力在减少, 而比活力逐渐增加. SDS-PAGE中, 条带逐渐减少直至一条, M_r 125 000, Western blot证实了其特异性, 而比活力为1911 Ukat/mg则证实了该纯化方法是有效的. 所得的DNA pol δ 为核苷类药物毒副作用的研究打下了基础.

一般认为, 核苷类化合物在进入细胞后, 经过磷酸化由一磷酸化合物至二磷酸化合物, 最后形成三磷酸化合物才能类似于正常的核苷酸参与到核苷酸链的延伸反应, 从而达到DNA链的终止反应. 因此, 我们选择了两种药物的三磷酸形式进行本实验^[27-28].

应用要点

新型核苷类化合物- β -L-D4A有望成为新的更高效低毒的抗HBV病毒的药物.

■同行评价

本文创新性强,内容详实,具有一定的临床参考价值.

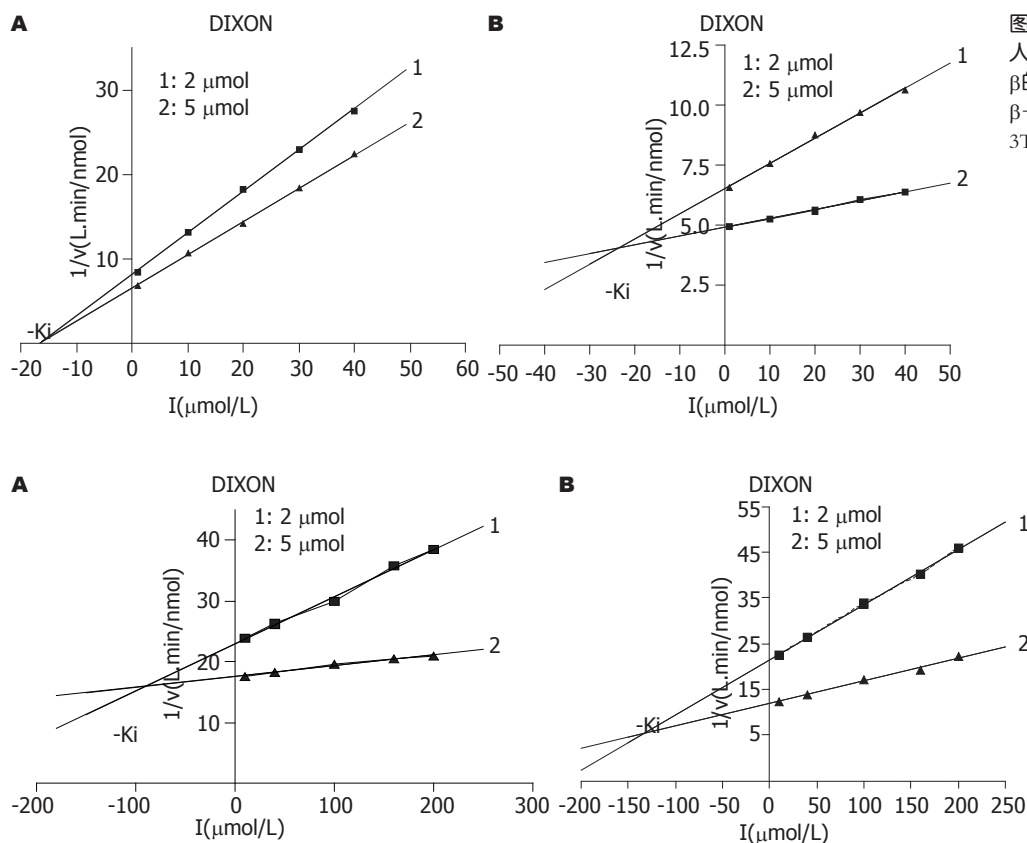


图 6 药物对人DNA聚合酶 β 的 K_i 测定: A: β -L-D4A; B: 3TC.

图 7 药物对人DNA聚合酶 δ 的 K_i 测定: A: β -L-D4A; B: 3TC.

本实验结果显示: 两种药物对两种酶DNA聚合酶 β 和 δ K_m 的测定显示三条直线均交于y轴, 而在x轴的截距各不相同, 即抑制剂的加入, 改变了 K_m , 而最大反应速度 V_{max} 不变, 提示拉米夫定和 β -L-D4A均是两种DNA聚合酶的竞争性抑制剂. 这提示拉米夫定和 β -L-D4A可能都是在抑制HBV DNA复制的过程中, 由于DNA聚合酶 β 和 δ 具有与HBV逆转录酶相同的作用底物, 因此对DNA聚合酶 δ 也形成了竞争性的抑制.

两个药物对DNA聚合酶 β 和 δ 的 IC_{50} 的测定结果显示, β -L-D4A抑制酶活性降低为50%时的药物浓度分别是25.21 $\mu\text{mol/L}$ 和150.1 $\mu\text{mol/L}$, 均大于拉米夫定的20.14和127.5 $\mu\text{mol/L}$, 明显说明拉米夫定比 β -L-D4A具有更强的抑制作用.

因为 IC_{50} 的测定与底物和药物浓度梯度设置密切相关, 为了更客观的研究两个药物的抑制作用, 我们对两个药物的 K_i (抑制常数)进行了测定. 结果显示 β -L-D4A对DNA聚合酶 β 和 δ 的 K_i 分别为24.03 $\mu\text{mol/L}$ 和132.7 $\mu\text{mol/L}$, 均大于拉米夫定的16.15 $\mu\text{mol/L}$ 和89.6 $\mu\text{mol/L}$, 证实了 β -L-D4A对两种DNA聚合酶的抑制作用均更弱.

核苷及核苷类似物是一些化学合成类似于天然核苷的药物^[29-30]. 他抗乙肝病毒复制主要有

通过抑制逆转录作用干扰负链DNA的合成和作用于闭合环状DNA^[31]. 实验表明核苷类药物对闭合环状DNA作用不佳, 他主要是掺入新合成的HBV的DNA链中导致链终止, 从而抑制病毒复制^[32]. 而且, 他们竞争性地抑制病毒的DNA依赖的逆转录酶活性^[33-34]. 因为, 正常细胞的DNA聚合酶 β 和 δ 与HBV DNA聚合酶在作用底物和机制上的相似性, 核苷类药物在抑制病毒聚合酶时同样会竞争性抑制正常的DNA聚合酶 β 和 δ 的活性^[35-36].

我们从 K_m , IC_{50} , K_i 等不同的酶动力学参数对拉米夫定和 β -L-D4A都进行了抑制作用的评价, 均显示拉米夫定具有更强的抑制DNA聚合酶 β 和 δ 的作用, 提示拉米夫定对宿主细胞具有更大的毒副作用.

因此, 我国自主研发开发的新型核苷类化合物 β -L-D4A可望成为更高效低毒的抗HBV类药物, 亦有望同拉米夫定联合用药提高疗效或减短用药疗程, 并减少变异株和耐药株的出现.

4 参考文献

- 1 Anderson RD, Chinnakotla S, Guo L, Perrillo RP, Klintmalm GB, Davis GL. Intramuscular hepatitis B immunoglobulin (HBIG) and nucleosides for

- prevention of recurrent hepatitis B following liver transplantation: comparison with other HBIG regimens. *Clin Transplant* 2007; 21: 510-517
- 2 Wu JM, Lin JS, Xie N, Liang KH. Inhibition of hepatitis B virus by a novel L-nucleoside, beta-L-D4A and related analogues. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1840-1843
 - 3 Wu JM, Lin JS, Xie N, Jiang FC, Liang KH. Effect and mechanism of beta-L-D4A (a novel nucleoside analog) against hepatitis B virus. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 268-270
 - 4 Wu JM, Lin JS, Xie N, Qiu GF, Hu XM. Synthesis of a novel L-nucleoside, beta-L-D4A and its inhibition on the replication of hepatitis B virus in vitro. *Yao Xue Xue Bao* 2005; 40: 825-829
 - 5 Oshige M, Takenouchi M, Kato Y, Kamisuki S, Takeuchi T, Kuramochi K, Shiina I, Suenaga Y, Kawakita Y, Kuroda K, Sato N, Kobayashi S, Sugawara F, Sakaguchi K. Taxol derivatives are selective inhibitors of DNA polymerase alpha. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 2597-2601
 - 6 Vens C, Hofland I, Begg AC. Involvement of DNA polymerase beta in repair of ionizing radiation damage as measured by in vitro plasmid assays. *Radiat Res* 2007; 168: 281-291
 - 7 Parsons JL, Preston BD, O'Connor TR, Dianov GL. DNA polymerase delta-dependent repair of DNA single strand breaks containing 3'-end proximal lesions. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 1054-1063
 - 8 Luciani MG, Campregher C, Fortune JM, Kunkel TA, Gasche C. 5-ASA affects cell cycle progression in colorectal cells by reversibly activating a replication checkpoint. *Gastroenterology* 2007; 132: 221-235
 - 9 Marcellin P, Lada O, Asselah T. Treatment of chronic hepatitis B with the combination of pegylated interferon with lamivudine. *Hepatol Res* 2007; 37: S55-S61
 - 10 Kao JH. Appropriate use of interferon for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2007; 37: S47-S54
 - 11 Akyuz F, Kaymakoglu S, Demir K, Aksoy N, Karaca C, Danalioglu A, Onel D, Badur S, Besisik F, Cakaloglu Y, Okten A. Lamivudine monotherapy and lamivudine plus interferon alpha combination therapy in HBeAg negative chronic hepatitis B not responding to previous interferon alpha monotherapy. *Acta Gastroenterol Belg* 2007; 70: 20-24
 - 12 Lu HY, Zhuang LW, Yu YY, Ivan H, Si CW, Zeng Z, Li J, Hou DM, Chen XY, Han ZH, Chen Y. Intrahepatic HBV DNA as a predictor of antiviral treatment efficacy in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2878-2882
 - 13 Hou J, Schilling R, Janssen HL, Hansen BE, Heijtkink R, Sablon E, Williams R, Lau GK, Schalm SW, Naoumov NV. Genetic characteristics of hepatitis B virus genotypes as a factor for interferon-induced HBeAg clearance. *J Med Virol* 2007; 79: 1055-1063
 - 14 Wu J, Lin JS, Chen BT, Zheng XM, Zhao HB, Liang KH. Establishment and identification of highly expressing and replicating hepatitis B virus genome transgenic mouse models. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 338-340
 - 15 Wu JM, Lin JS, Jiang FC, Zhang JY, Liang KH. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by a novel nucleoside analogue (beta-L-D4A). *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 446
 - 16 Wang Z, Bennett EM, Wilson DJ, Salomon C, Vince R. Rationally designed dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase. *J Med Chem* 2007; 50: 3416-3419
 - 17 Beckman J, Kincaid K, Hocek M, Spratt T, Engels J, Cosstick R, Kuchta RD. Human DNA polymerase alpha uses a combination of positive and negative selectivity to polymerize purine dNTPs with high fidelity. *Biochemistry* 2007; 46: 448-460
 - 18 Maeda N, Kokai Y, Ohtani S, Sahara H, Kuriyama I, Kamisuki S, Takahashi S, Sakaguchi K, Sugawara F, Yoshida H, Sato N, Mizushima Y. Anti-tumor effects of dehydroaltenusin, a specific inhibitor of mammalian DNA polymerase alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 390-396
 - 19 Crespan E, Hubscher U, Maga G. Error-free bypass of 2-hydroxyadenine by human DNA polymerase lambda with Proliferating Cell Nuclear Antigen and Replication Protein A in different sequence contexts. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 5173-5181
 - 20 Hu DL, Tang HW, Liang HR, Tang DS, Liu YM, Ji WD, Yuan JH, He Y, Zhu ZY, Yang JP, Fang DK, Sha Y, Tu XZ, Zhuang ZX. Possible role of DNA polymerase beta in protecting human bronchial epithelial cells against cytotoxicity of hydroquinone. *Biomed Environ Sci* 2007; 20: 171-177
 - 21 Luoma PT, Eerola J, Ahola S, Hakonen AH, Hellström O, Kivistö KT, Tienari PJ, Suomalainen A. Mitochondrial DNA polymerase gamma variants in idiopathic sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2007; 69: 1152-1159
 - 22 Yakubovskaya E, Lukin M, Chen Z, Berriman J, Wall JS, Kobayashi R, Kisker C, Bogenhagen DF. The EM structure of human DNA polymerase gamma reveals a localized contact between the catalytic and accessory subunits. *EMBO J* 2007; 26: 4283-4291
 - 23 Rytönen AK, Vaara M, Nethanel T, Kaufmann G, Sormunen R, Läärä E, Nasheuer HP, Rahmeh A, Lee MY, Syväoja JE, Pospiech H. Distinctive activities of DNA polymerases during human DNA replication. *FEBS J* 2006; 273: 2984-3001
 - 24 Friedberg EC. The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 143-147
 - 25 Chen J, Zacharek A, Li Y, Li A, Wang L, Katakowski M, Roberts C, Lu M, Chopp M. N-cadherin mediates nitric oxide-induced neurogenesis in young and retired breeder neurospheres. *Neuroscience* 2006; 140: 377-388
 - 26 Wu T, Froeyen M, Kempeneers V, Pannecouque C, Wang J, Busson R, De Clercq E, Herdewijn P. Deoxythreosyl phosphonate nucleosides as selective anti-HIV agents. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 5056-5065
 - 27 Uckun FM, Qazi S, Venkatachalam T. N'-[2-(2-thiophene) ethyl]-N'-[2-(5-bromopyridyl)]thiourea (HI-443), a rationally designed non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor compound with potent anti-HIV activity. *Arzneimittelforschung* 2007; 57: 278-285
 - 28 Parikh UM, Zelina S, Sluis-Cremer N, Mellors JW. Molecular mechanisms of bidirectional antagonism between K65R and thymidine analog mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS* 2007; 21: 1405-1414
 - 29 Caccamo L, Agnelli F, Reggiani P, Maggi U, Donato MF, Gatti S, Paone G, Melada E, Rossi G. Role of lamivudine in the posttransplant prophylaxis of chronic hepatitis B virus and

- hepatitis delta virus coinfection. *Transplantation* 2007; 83: 1341-1344
- 30 Kawaoka T, Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Arase Y, Sezaki H, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Ikeda K, Kumada H. Efficacy of lamivudine therapy in elderly patients with chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol* 2007; 42: 395-401
- 31 Fung J, Lai CL, Yuen JC, Wong DK, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen MF. Adefovir dipivoxil monotherapy and combination therapy with lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B in an Asian population. *Antivir Ther* 2007; 12: 41-46
- 32 Gish RG. Improving outcomes for patients with chronic hepatitis B. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 14-22
- 33 Leemans WF, Janssen HL, de Man RA. Future perspectives for the management of chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2554-2567
- 34 de Baar MP, de Rooij ER, Smolders KG, van Schijndel HB, Timmermans EC, Bethell R. Effects of apricitabine and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors on replication of mitochondrial DNA in HepG2 cells. *Antiviral Res* 2007; 76: 68-74
- 35 Qi X, Xiong S, Yang H, Miller M, Delaney WE 4th. In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents. *Antivir Ther* 2007; 12: 355-362
- 36 D'Ugo E, Kondili LA, Canitano A, Catone S, Giuseppetti R, Gallinella B, Palmieri G, Orobello S, Argentini C, Glück R, Rapicetta M. Rapid emergence of a viral resistant mutant in WHV chronically infected woodchucks treated with lamivudine and a pre-S/S CHO-derived hepatitis B virus vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 4895-4902

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

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

1 征稿内容

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

2 征稿要求

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

3 联系方式

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

配对胃癌组织中S100A4的表达

黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 王卫华, 王孟薇

黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 王卫华, 王孟薇, 中国人民解放军总医院老年消化科 北京市 100853

黄海力, 博士, 主治医师, 主要从事胃癌发病机制的研究。

通讯作者: 黄海力, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院西院老年消化科. hailiuhuang301@yahoo.com.cn
电话: 010-66939443

收稿日期: 2007-12-13 修回日期: 2008-01-29

S100A4 gene expression in matched gastric cancer samples

Hai-Li Huang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Wei-Hua Wang, Meng-Wei Wang

Hai-Li Huang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Wei-Hua Wang, Meng-Wei Wang, Department of Geriatric Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Dr. Hai-Li Huang, Department of Geriatric Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. hailiuhuang301@yahoo.com.cn

Received: 2007-12-13 Revised: 2008-01-29

Abstract

AIM: To examine the expression of S100A4 protein in gastric cancer and its correlation with the prognosis and clinical pathology.

METHODS: Archival tissues from 80 patients with gastric cancer were retrieved. Matched samples including adjacent normal gastric tissues, primary tumor and metastasis lymph node tissues were applied in tissue array technology, and investigated immunohistochemically. The correlations of S100A4 protein expression with clinicopathologic factors and survival were analyzed.

RESULTS: The positive rates of S100A4 protein in non-neoplastic mucosa, primary tumor and metastasis lymph node tissues were 7.5%, 23.8%, and 30.0%, respectively ($P = 0.001$). In primary tumor lesions, S100A4 expression was correlated significantly with the deeper invasion and TNM stages ($P = 0.051$). S100A4 expression in lymph node metastasis tissues was associated with a poor survival ($P = 0.0009$). In multivariate Cox's regression analysis, S100A4 expression was significantly variable ($P = 0.031$, $OR = 1.756$) in

lymph node metastasis tissues and was an independent prognostic factor in patients ($P = 0.030$, $OR = 2.103$).

CONCLUSION: S100A4 protein expression may be a late event that takes part in the progression of gastric cancer. The status detection of S100A4 protein expression in metastasis lymph node tissues may enhance the accuracy to prognosticate gastric cancer patients.

Key Words: Gastric cancer; Tissue microarray; Immunohistochemistry; S100A4 protein

Huang HL, Wu BY, You WD, Wang WH, Wang MW. S100A4 gene expression in matched gastric cancer samples. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 629-634

摘要

目的: 分析配对胃癌组织中S100A4的蛋白与胃癌临床病理及预后的相关性。

方法: 构建胃癌组织芯片, 免疫组化方法检测S100A4蛋白在80例胃癌组织以及配对切缘正常胃黏膜和转移淋巴结组织中的表达, 分析S100A4表达与胃癌临床病理及预后的相关性。

结果: S100A4在切缘正常胃黏膜、癌灶、淋巴结转移灶表达阳性率依次为7.5%、23.8%、30.0%, 差异具有显著性($P = 0.001$); 癌灶中S100A4表达与肿瘤浸润深度及TNM分期相关($P = 0.051$), 与预后无关; 转移淋巴结组织中S100A4表达出现分化($P = 0.031$, $OR = 1.756$), 阳性表达者预后差($P = 0.0009$), 并且是独立预后影响因子($P = 0.030$, $OR = 2.103$)。

结论: S100A4表达参与了胃癌的进展过程, 转移淋巴结中S100A4蛋白的表达状况对胃癌预后判断价值优于原发灶的表达。

关键词: 胃癌; 组织芯片; 免疫组化; S100A4蛋白

黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 王卫华, 王孟薇. 配对胃癌组织中S100A4的表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16(6): 629-634
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/629.asp>

■背景资料

胃癌的发病率在发展中国家居所有恶性肿瘤首位。虽然在其发病机制方面进行了广泛的探索与研究, 找到一些能够影响胃癌侵袭和预后的分子标志物, 然而目前仍缺乏比较特异的公认的指标来判断胃癌的预后。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

■ 研究前沿

S100A4属于S100蛋白家族,大量研究表明S100A4是一个与多种肿瘤侵袭和预后密切相关的蛋白分子.虽然其发挥作用的机制目前仍不完全清楚,但主要涉及改变肿瘤细胞骨架蛋白、促进肿瘤细胞周围血管生成以及基质降解、影响p53蛋白的磷酸化等.

0 引言

S100A4又名Mts1, p9Ka, fibroblast specific protein-1(FSP1), 是S100家族中研究最多的与肿瘤相关的一个蛋白.多方面的证据表明S100A4能够促进肿瘤的浸润和转移,影响预后^[1-3].其具体作用机制还不十分明确,已有的证据表明该分子主要是与一些细胞骨架蛋白起作用^[4-6].S100A4还能够与野生型p53蛋白结合,使p53蛋白的磷酸化,同时抑制p53的DNA结合活性,使p53下游的靶基因如P21/WAF, MDM2, 血小板凝血酶敏感蛋白(thrombospondin-1)等表达下调,从而对肿瘤细胞的凋亡及增殖浸润发挥间接的调节作用^[7-8].新近的研究还发现S100A4能够调节MMP, TIMP表达以及促进血管形成以及调节肿瘤细胞周围基质重构的作用^[9-12].在多数肿瘤,如:乳腺癌,结肠癌,肺癌,胰腺癌,胆囊癌,甲状腺癌等肿瘤中, S100A4表达高于对应正常黏膜,并且与肿瘤的浸润,转移以及预后有关^[13-20].在胃癌中尤其是对预后的影响方面,少见报道,为进一步了解S100A4与胃癌发生、发展的关系,我们对有淋巴结转移的胃癌患者用免疫组化方法检测S100A4在配对胃癌组织中的表达.

1 材料和方法

1.1 材料 构建组织芯片的80例标本均来源于解放军总医院1992/2002年胃癌手术患者;患者均为首次发现胃癌,术前没有经过放化疗或免疫治疗,影像学检查均未发现有远隔脏器转移;手术切除彻底,手术标本残端及切缘均未见有残留癌细胞.80例患者中男性62例,女性18例;胃底和贲门癌16例(20.0%),胃体癌18例(22.5%),胃窦及幽门癌46例(57.5%);黏膜或者黏膜下层浸润者15例(18.8%),浸润至肌层和浆膜层者65例(81.3%);80例患者均有淋巴结转移,按照UICC1997年胃癌TNM分期, I, II, III期例数分别为15例(18.8%), 23例(28.8%), 42例(52.5%).截止到2004-12, 患者平均随访时间为43 mo, 所有患者中死亡38例, 存活42例, 最长生存时间为153 mo. 主要试剂: S100A4 Rabbit Polyclonal Antibody(NeoMarkers).

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的构建: 石蜡标本切缘黏膜、原发肿瘤病灶、淋巴结转移灶分别选择两个区域打孔, 每个组织芯的直径为1 mm.

1.2.2 免疫组化: 芯片常规脱蜡水化, 枸橼酸抗原修复液98℃微波修复15 min. S100A4抗体1:200

表1 S100A4在配对切缘黏膜、癌灶以及转移淋巴结中的表达($n=88$)

组织	S100A4	
	阴性 $n(\%)$	阳性 $n(\%)$
正常黏膜	74(92.5)	6(7.5)
胃癌	61(76.3)	19(23.8) ^a
转移淋巴结	56(70.0)	24(30.0) ^a

^a $P<0.05$ vs 正常黏膜.

稀释, 采用SP法(PV-9000二步法免疫组化染色试剂盒, 购自Zymed公司), 操作按照试剂盒说明进行, DAB显色. 以TBS代替一抗作为阴性对照. 阳性判断: 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 记0分, 10%-50%记1分, 50%-70%记2分, $\geq 70\%$ 记3分; 信号强弱的判断标准为: 阴性或者基本无显色, 0分, 弱阳性1分, 阳性2分, 强阳性3分. 两项评分相乘: ≤ 2 为阴性, ≥ 3 为阳性.

统计学处理 采用SPSS12.0软件进行统计学分析. S100A4表达在肿瘤, 对应正常和转移淋巴结组织中表达差异以及与临床病理类型之间的差异比较用卡方检验. 生存率曲线的绘制用Kaplan-Meier方法, 对生存率影响的单因素分析用log-rank检验. 多因素生存分析用COX逐步回归估计各危险因素的相对危险度及95%可信区间. $P\leq 0.05$ 为差异具有显著性.

2 结果

2.1 S100A4蛋白在切缘正常胃黏膜、癌灶以及转移淋巴结中免疫组化染色状况 正常腺体几乎无表达, 肿瘤表达强于正常, 但阳性率不到50%, 且基本为弱阳性表达. 阳性部位主要分布于细胞质中, 少部分细胞核也阳性着色. 血管平滑肌细胞和间质细胞表达明显强于胃腺细胞和肿瘤细胞(图1).

切缘正常黏膜, 胃癌组织以及转移淋巴结阳性率分别为7.5%, 23.8%, 30.0%, 卡方检验胃癌及转移淋巴结中S100A4表达高于正常黏膜, 差异具有显著性($\chi^2=13.28$, $P=0.001$, 表1); 转移淋巴结和胃癌组织提示两者之间S100A4表达无差异($P=0.373$). 80例患者中, 48例患者S100A4在切缘、癌灶以及转移淋巴结灶中表达一致, 32例患者出现表达的变化(图2); 癌灶相比于配对的正常黏膜, 20%出现表达升高, 76.3%表达不变, 3.8%表达下降; 而转移淋巴结灶相对于配对癌灶, 12.5%表达升高, 81.3%表达不变, 6.3%出现表达下降(表2).

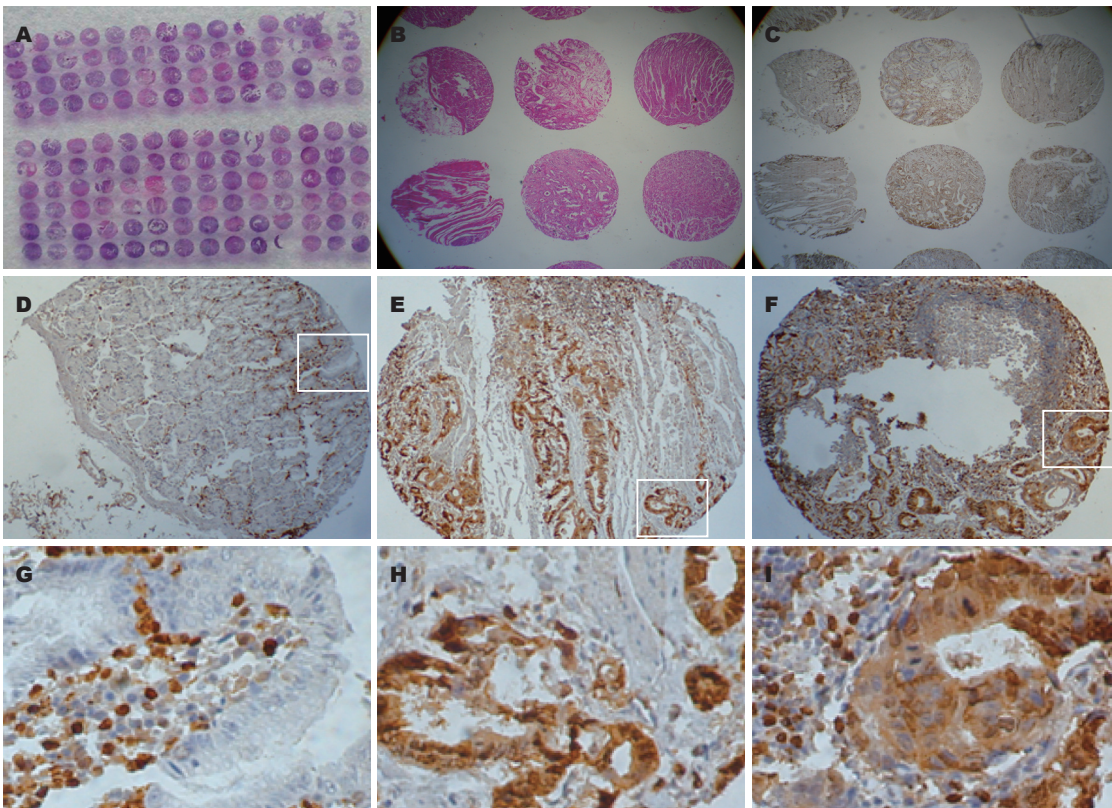


图 1 S100A4在正常黏膜, 癌灶以及转移淋巴结中的HE染色及免疫组化结果. A, D, G: 正常黏膜; B, E, H: 癌灶; C, F, I: 转移淋巴结. A-C: 组织芯片HE染色及免疫组化大体图; D-F: 低倍镜放大($\times 40$ 倍); G-I: 对应局部中倍镜放大($\times 200$ 倍).

表 2 80例配对组织中S100A4表达的变化(n, %)

分类	表达升高	表达不变	表达下降
原发灶 vs 切缘	16(20.0)	61(76.3)	3(3.8)
转移灶 vs 原发灶	10(12.5)	65(81.3)	5(6.3)

2.2 S100A4蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 肿瘤组织中S100A4表达与浸润深度和TNM分期相关, 随肿瘤的进展表达升高($P = 0.051$, 表3).

2.3 S100A4蛋白表达与预后的关系 单因素生存分析, 肿瘤组织中S100A4表达状况与生存率之间未显示统计学意义($P = 0.235$); 但淋巴结转移灶中, S100A4阳性表达者生存率显著低于阴性者, ($P = 0.002$), 阳性者3年生存率为30.43%, 阴性者为64.18%; 进一步分析表明, 原发灶表达阴性而转移淋巴结中表达阳性者, 预后最差; 原发灶表达阳性而转移淋巴结中表达阴性者, 预后最好 ($P = 0.082$, 图3). 引入性别、肿瘤大小、浸润深度、肿瘤部位、肿瘤分化、有无癌栓、TNM分期、S100A4在转移淋巴结中表达等因素进行多因素生存分析, 显示除TNM分期以外, 淋巴结中S100A4表达状况为独立预后影响因素(表4).

表 3 S100A4表达与胃癌临床病理因素之间的关系

病理类型	n	胃癌组织中S100A4表达(%)	
		-	+
肿瘤大小			
<4.39	33	78.8	21.2
>4.39	47	74.5	25.5
肿瘤分化			
中高分化	8	50.0	50.0
中分化	5	80.0	20.0
中低分化	59	79.7	20.3
印戒黏液	8	75.0	25.0
浸润深度			
黏膜及黏膜下层	15	100.0	0.0
肌层	23	73.9	26.1
全层	42	69.0	31.0
TNM分期			
I	15	100.0	0.0
II	23	73.9	26.1
III	42	69.0	31.0

3 讨论

S100A4蛋白与肿瘤相关性的研究非常广泛, 虽然其具体机制仍有待于进一步研究, 但目前比较一致的结论是该分子能够促进多种肿瘤的进

■**相关报道**
S100A4在胃癌中的研究少见, S100A4在胃癌发生、发展过程中其表达的趋势如何仍不明确. 少见的几篇研究认为S100A4表达与胃癌淋巴结转移及预后相关, 但国内未见S100A4与胃癌预后的研究.

■**创新盘点**
与既往多数研究不同, 本研究中, 采取了80例切缘、原发灶、转移淋巴结灶的患者进行了配对分析, 这样一方面能够减少因个体遗传异质性带来的影响, 另一方面可以观察到该分子在肿瘤发展过程中连续性的表达变化.

应用要点

本研究发现:
(1) S100A4蛋白主要在进展期胃癌中表达升高,但升高比例仅为20%,因此该分子表达的变化在胃癌中只是一个散发的晚期事件。
(2) S100A4在胃癌的进展及转移过程中可能出现表达的分化,更有意义的发现是从转移淋巴结组织中检测该分子的表达状况比胃癌组织中检测更具有预后判断价值,这拓展了大家研究S100A4乃至其他肿瘤预后标志物检测视野。

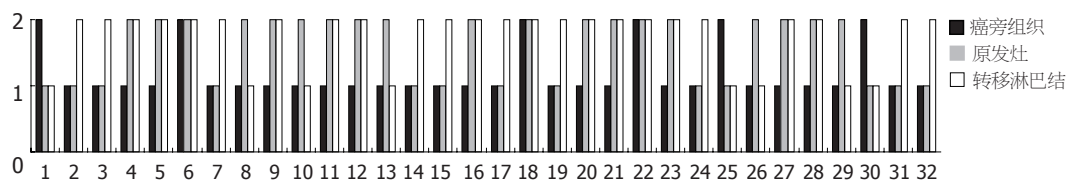


图2 32例患者切缘黏膜, 原发癌灶以及转移淋巴结灶中S100A4表达的改变。

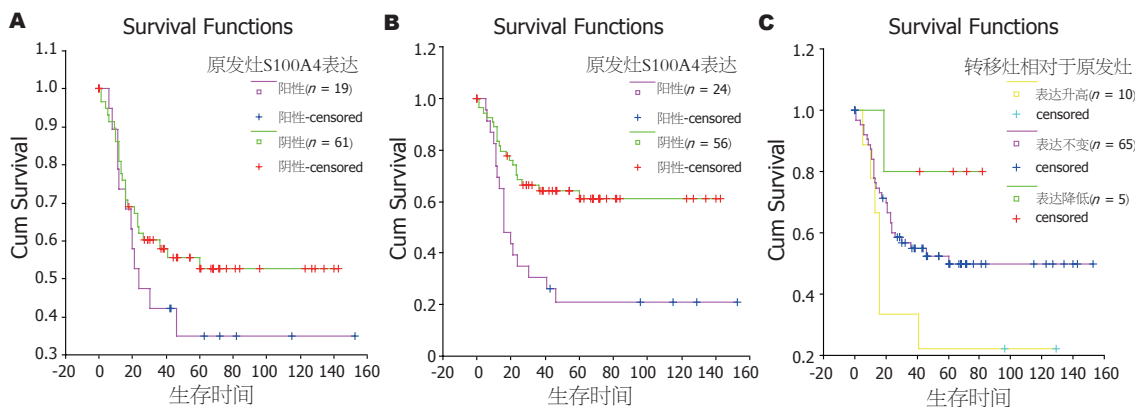


图3 S100A4在组织中表达与胃癌预后的关系。A: 肿瘤组织中不同S100A4表达状况的生存曲线; B: 转移淋巴结组织中不同S100A4表达状况的生存曲线; C: 转移淋巴结组织相对于配对肿瘤组织S100A4表达变化状况的生存曲线。

展并且与预后有关^[20-24]。S100A4在胃癌中的研究少见, 少见的几篇研究认为S100A4表达与胃癌淋巴结转移及预后相关^[25-27], 国内未见S100A4与预后的研究^[28-30]。与既往多数研究不同, 本研究中, 采取了80例切缘、原发灶、转移淋巴结灶的患者进行了配对分析, 这样一方面能够减少不同的遗传异质性带来的影响, 另一方面可以观察到该分子在肿瘤发展过程中持续性的表达变化。

不同类型肿瘤中, S100A4阳性表达率在30%-70%左右, 在胃癌中约为50-70%^[25-29]。本研究中S100A4在胃癌中阳性率为23.8%, 低于以往研究, 可能与阳性判断标准不同以及病例数不同有关。值得一提的是胃组织的间质中淋巴细胞和血管平滑肌细胞呈现强阳性显色, 这与其他研究中结论一致。S100A4在76.25%胃癌原发灶中表达与切缘组织相同, 仅20%出现表达升高, 同时原发灶中的表达与胃癌的浸润和TNM分期有关($P = 0.051$), 说明该分子表达的变化在胃癌中只是一个散发的晚期事件, 只与部分胃癌的进展有关。S100A4淋巴结转移灶中相对于原发癌灶的表达无统计学差异(30% vs 23.8%), 多数表达没有发生改变65例(81.25%), 有10例(12.50%)患者原发癌灶表达为阴性, 在淋巴结转移灶中出现阳性表达, 而5例(6.25%)在原发癌灶表达阳性者在转移灶中表达阴性, 这可能是转

表4 有淋巴结转移的胃癌多因素生存分析

肿瘤参数	Cox's统计值	P	相对危险度 (Relative risk)	95%置信区间 (CI 95%)
S100A4表达	4.722	0.030	2.103	1.076-4.110
TNM分期	4.633	0.031	1.756	1.052-2.931

移过程中发生的获得性改变, 也可能是原发灶异质性细胞转移的结果。

在胃癌原发灶中, S100A4表达阳性者预后更差, 但没有显示出统计学差异($P = 0.235$), 而有趣的是S100A4在淋巴结转移灶中的表达状况却与预后相关($P = 0.002$), 在多因素生存分析中, 即使引入TNM分期等进行分析, 其表达状况仍是独立预后影响因子($P = 0.003$, $OR = 2.103$), 阳性者3年生存率为30.43%, 阴性者为64.18%。进一步分析表明淋巴结转移灶中相对于原发癌灶表达升高者预后要比表达下降者差, 10例表达升高的患者中7例均在41 mo内死亡, 而5例表达下降者中仅1例在19 mo死亡, 其余均存活42 mo以上。这提示我们, 一些基因在肿瘤转移的过程中可能会出现一些获得性表达或者表达缺失, 而这种表达变化会对后续的肿瘤的进展或者预后产生影响; 另外一种可能的解释就是原发癌灶存在分子表达的异质性, 而转移灶的分析能更客观的反映了转移肿瘤细胞对预后影响的

特性.

总之, 相对于既往S100A4在肿瘤中的研究, 本研究提示S100A4在胃癌的进展及转移过程中可能出现表达的分化, 并且对预后产生影响; 该分子在转移淋巴结中的表达分析比原发癌灶的分析更能反映预后.

4 参考文献

- Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005; 92: 1955-1958
- Tarabykina S, Griffiths TR, Tulchinsky E, Mellon JK, Bronstein IB, Kriajevska M. Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 217-228
- Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 2006; 281: 677-680
- Kriajevska MV, Cardenas MN, Grigorian MS, Ambartsumian NS, Georgiev GP, Lukanidin EM. Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 19679-19682
- Ford HL, Silver DL, Kachar B, Sellers JR, Zain SB. Effect of Mts1 on the structure and activity of nonmuscle myosin II. *Biochemistry* 1997; 36: 16321-16327
- Li ZH, Bresnick AR. The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Res* 2006; 66: 5173-5180
- Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 2001; 276: 22699-22708
- Chen H, Fernig DG, Rudland PS, Sparks A, Wilkinson MC, Barraclough R. Binding to intracellular targets of the metastasis-inducing protein, S100A4 (p9Ka). *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 1212-1217
- Andersen K, Maelandsmo GM, Hovig E, Fodstad O, Loennechen T, Winberg JO. Interleukin-1 alpha and basic fibroblast growth factor induction of matrix metalloproteinases and their inhibitors in osteosarcoma cells is modulated by the metastasis associated protein CAPL. *Anticancer Res* 1998; 18: 3299-3303
- Mathisen B, Lindstad RI, Hansen J, El-Gewely SA, Maelandsmo GM, Hovig E, Fodstad O, Loennechen T, Winberg JO. S100A4 regulates membrane induced activation of matrix metalloproteinase-2 in osteosarcoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 701-711
- Schmidt-Hansen B, Ornas D, Grigorian M, Klingelhofer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004; 23: 5487-5495
- 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
- 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
- Lee WY, Su WC, Lin PW, Guo HR, Chang TW, Chen HH. Expression of S100A4 and Met: potential predictors for metastasis and survival in early-stage breast cancer. *Oncology* 2004; 66: 429-438
- de Silva Rudland S, Martin L, Roshanlall C, Winstanley J, Leinster S, Platt-Higgins A, Carroll J, West C, Barraclough R, Rudland P. Association of S100A4 and osteopontin with specific prognostic factors and survival of patients with minimally invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1192-1200
- Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Kreipe H, von Wasielewski R. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2002; 123: 1478-1484
- Flatmark K, Pedersen KB, Nesland JM, Rasmussen H, Aamodt G, Mikalsen SO, Bjornland K, Fodstad O, Maelandsmo GM. Nuclear localization of the metastasis-related protein S100A4 correlates with tumour stage in colorectal cancer. *J Pathol* 2003; 200: 589-595
- Kimura K, Endo Y, Yonemura Y, Heizmann CW, Schafer BW, Watanabe Y, Sasaki T. Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2000; 16: 1125-1131
- Matsubara D, Niki T, Ishikawa S, Goto A, Ohara E, Yokomizo T, Heizmann CW, Aburatani H, Moriyama S, Moriyama H, Nishimura Y, Funata N, Fukayama M. Differential expression of S100A2 and S100A4 in lung adenocarcinomas: clinicopathological significance, relationship to p53 and identification of their target genes. *Cancer Sci* 2005; 96: 844-857
- Miyazaki N, Abe Y, Oida Y, Suemizu H, Nishi M, Yamazaki H, Iwasaki M, Inoue H, Ueyama Y, Nakamura M. Poor outcome of patients with pulmonary adenocarcinoma showing decreased E-cadherin combined with increased S100A4 expression. *Int J Oncol* 2006; 28: 1369-1374
- Sato N, Fukushima N, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, van Heek NT, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol* 2004; 164: 903-914
- Oida Y, Yamazaki H, Tobita K, Mukai M, Ohtani Y, Miyazaki N, Abe Y, Imaizumi T, Makuuchi H, Ueyama Y, Nakamura M. Increased S100A4 expression combined with decreased E-cadherin expression predicts a poor outcome of patients with pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2006; 16: 457-463
- Davies BR, O'Donnell M, Durkan GC, Rudland PS, Barraclough R, Neal DE, Mellon JK. Expression of S100A4 protein is associated with metastasis and reduced survival in human bladder cancer. *J Pathol*

■名词解释

S100A4: 有多种别名, pEL98、mts1、p9Ka、calvasculin、FSP1、CAPL. S100A4分子是S100蛋白家族的成员之一, 该家族成员蛋白质分子N末端和C末端具有特征性EF-手型基序(即螺旋-环-螺旋结构域, helix-loop-helix domain).

■同行评价

该文选题新颖, 研究方法设计合理, 观察指标较系统, 数据客观, 结论明确, 有较好的学术价值, 该研究结论对于胃癌的预后评估有一定临床意义。

- 2002; 196: 292-299
- 24 Zou M, Famulski KS, Parhar RS, Baitei E, Al-Mohanna FA, Farid NR, Shi Y. Microarray analysis of metastasis-associated gene expression profiling in a murine model of thyroid carcinoma pulmonary metastasis: identification of S100A4 (Mts1) gene overexpression as a poor prognostic marker for thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 6146-6154
- 25 Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Kinoshita K, Ninomiya I, Sugiyama K, Heizmann CW, Schafer BW, Sasaki T. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4234-4242
- 26 Lee OJ, Hong SM, Razvi MH, Peng D, Powell SM, Smoklin M, Moskaluk CA, El-Rifai W. Expression of calcium-binding proteins S100A2 and S100A4 in Barrett's adenocarcinomas. *Neoplasia* 2006; 8: 843-850
- 27 Cho YG, Nam SW, Kim TY, Kim YS, Kim CJ, Park JY, Lee JH, Kim HS, Lee JW, Park CH, Song YH, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Overexpression of S100A4 is closely related to the aggressiveness of gastric cancer. *APMIS* 2003; 111: 539-545
- 28 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
- 29 孙秀菊, 王舒宝, 赵彦艳, 徐惠绵, 李福才, 孙开来. S100A4蛋白表达与胃癌侵袭转移关系的研究. *中国肿瘤临床* 1999; 26: 589-592
- 30 孙秀菊, 孙开来, 陈峻青, 李福才, 赵彦艳. nm23H1和S100A4 mRNA表达与胃癌细胞体外侵袭力的关系. *中国医科大学学报* 2001; 30: 161-163

编辑 师忠芳 电编 郭海丽

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

• 消息 •

WCJD 和 WJG 2008 年对同行评议 实行公开策略

本刊讯 世界华人消化杂志(WCJD)和World Journal of Gastroenterology (WJG)为了确保刊出文章的质量, 于2008年16卷第2期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。如: 同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科。(总编辑: 马连生 2008-02-28)

白介素6基因启动子-572C/G多态性与非酒精性脂肪肝炎的关系

马瑞宏, 黄颖秋

马瑞宏, 黄颖秋, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科 辽宁省本溪市 117000

马瑞宏, 佳木斯大学临床医学院硕士, 医师, 2005年赴日本高知医科大学学习, 主要从事非酒精性脂肪肝炎的研究。

通讯作者: 马瑞宏, 117000, 辽宁省平山区本溪市人民路29号, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科。

maruihong120@yahoo.com.cn

电话: 0414-2215138

收稿日期: 2007-11-07 修回日期: 2008-01-31

C/G homozygotes of interleukin-6 single nucleotide polymorphism at -572 are associated with nonalcoholic steatohepatitis

Rui-Hong Ma, Ying-Qiu Huang

Rui-Hong Ma, Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel and Iron (Group) Co., Benxi 117000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Rui-Hong Ma, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel and Iron Co., 29 Renmin Road, Pingshan District, Benxi 117000, Liaoning Province, China. maruihong120@yahoo.com.cn

Received: 2007-11-07 Revised: 2008-01-31

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the C/G genotypes of interleukin-6 (IL-6) single nucleotide polymorphism (SNP) at 572 and the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

METHODS: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine a common polymorphism of the human IL-6 gene -572C/G in 104 controls and NASH 78 patients. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the concentration of serum IL-6 in 78 patients with NASH.

RESULTS: Homozygotes for -572C of IL-6 gene were more frequent in NASH patients than in controls (0.564 vs 0.404, $P < 0.05$). Level of IL-6 was significantly higher in NASH patients with IL-6 -572C/C genotype than that in NASH pa-

tients with other genotypes (6.54 ± 4.21 vs 4.68 ± 2.88 , $P < 0.05$). The significant difference in HOMA-IR was not seen in three genotypes.

CONCLUSION: The C/G homozygotes of IL-6 single nucleotide polymorphism at -572 have something to do with the pathogenesis of NASH.

Key Words: Interleukin-6; Single nucleotide polymorphism; Insulin resistance; Nonalcoholic steatohepatitis

Ma RH, Huang YQ. C/G homozygotes of interleukin-6 single nucleotide polymorphism at -572 are associated with nonalcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 635-639

摘要

目的: 探讨白介素6(IL-6)基因启动子-572C/G多态性与非酒精性脂肪肝炎(NASH)相关性。

方法: 应用聚合酶联反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法, 分别检测NASH患者78例和正常者104例IL-6基因启动子-572C/G多态性的变异。采用ELISA法检测NASH患者组IL-6血清含量。

结果: IL-6基因启动子-572位点的C等位基因频率高于健康对照组, 两组基因分布频率有显著统计学差异(0.564 vs 0.404 , $P < 0.05$); NASH患者组中CC基因型携带者IL-6血清含量显著高于其他基因型携带者(6.54 ± 4.21 vs 4.68 ± 2.88 , $P < 0.05$), 但HOMA-IR及BMI与其他两组基因型相比较并无显著统计学差异。

结论: IL-6基因启动子-572位点的C等位基因与NASH发病具有一定程度相关性。

关键词: 白细胞介素6; 单核苷酸多态性; 胰岛素抵抗; 非酒精性脂肪肝炎

马瑞宏, 黄颖秋. 白介素6基因启动子-572C/G多态性与非酒精性脂肪肝炎的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16(6): 635-639
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/635.asp>

■背景资料

目前认为NASH发病机制主要包括胰岛素抵抗、氧化应激作用、脂质过氧化作用等方面。其中氧化应激机制关于细胞因子如TNF- α 、白细胞介素等的研究成为近年研究的热点, IL-6是一种重要的促炎细胞因子, 该基因启动子区存在基因变异及基因多态性, 有研究表明IL-6参与胰岛素抵抗的形成。

■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

■创新盘点

鉴于IL-6、胰岛素抵抗及NASH存在待证实的交叉关系,本文从IL-6基因启动子-572C/G多态性着手,观察我国人群中该基因频率及与胰岛素抵抗、NASH的相关性。

0 引言

非酒精性脂肪肝(NASH)是一种代谢综合征,常合并内脏性肥胖、血脂紊乱、高血压、糖调节异常和Ⅱ型糖尿病等多元代谢紊乱^[1-2],胰岛素抵抗(IR)是此类代谢综合征共同的病理生理特点。近年来发现多种炎症因子在IR发生发展中扮演重要角色,包括TNF- α 、IL-6等^[3]。而NASH兼具慢性炎症性疾病特点,炎症因子在其发病中应具有一定作用,此方面研究较少。本文试图就IL-6基因启动子第572C/G等位基因单核苷酸多态性与NASH疾病及IR相关性做初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 选取无亲缘关系182人,其中经临床血液检查结合超声及CT证实NASH患者组78例,男39例,女39例,年龄 44.08 ± 15.93 岁,体质指数(BMI) 28.93 ± 4.56 ;健康对照组(NC)104例,男53例,女51例,年龄 42.12 ± 16.34 岁;BMI 28.90 ± 4.31 。

1.2 方法

1.2.1 NASH的诊断条件: (1)非酒精性; (2)CT诊断脂肪肝; (3)除外其他肝脏原因疾病包括药物性肝损害^[4]。

1.2.2 临床血指标检查: 所有受试者均空腹12 h后抽取肘部静脉血,各3份,每份3 mL,抗凝处理后用于模板DNA的制备,不抗凝处理分别用于血IL-6浓度检测及其临床血指标检查。

1.2.3 模板DNA的制备: 抽取受试者外周静脉血3 mL,经抗凝处理后,加入9 mL红细胞溶血剂,红细胞充分溶解后,再加入2 mL白细胞溶解剂,隔夜后,将667 μ L的蛋白质沉淀剂加入上述未出现沉淀等异常现象的溶液内,离心后取上清液,加入2-丙醇(2-propanol)2 mL,振荡至液体澄清,可见白色絮状物出现,即为DNA。

1.2.4 PCR-RFLP分析及DNA序列测定: 利用已制备的两组受试者的DNA,应用PCR扩增包括IL6基因启动子第572位点等位基因在内的163 bp长度片段。从GenBank(NM000600)中查取人IL6基因序列(略),使用primer Premier 5.0 Demo软件进行在线引物设定。引物序列为: 上游引5'GGAGACGCCTTGAAGTAACTGCG3',下游引物为5'GAGTTTCCTCTGACTCCATCGCAG3',购自日本北海道sequence株式会社。PCR反应体系含Taq PCR Mixture 1.5 μ L(QIAGEN Taq PCR core kit试剂盒);上游引物600 pmol,下游引物600 pmol;模板DNA<1 μ g;加超纯水至30 μ L。PCR

扩增循环: 94 $^{\circ}$ C预变性10 min, 94 $^{\circ}$ C 60 s, 51 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C终止, 36个循环。取PCR扩增产物3 μ L, 40 g/L琼脂糖凝胶电泳10 min, 电压100 V, Kodak电泳图像分析系统EDAS290比较PCR扩增产物,并根据Marker条带位置确定PCR扩增产物是否为目的基因片段。另取PCR扩增产物3 μ L, 混入0.5 μ L 10 \times Buffer G, 0.5 μ L限制性内切酶Mbi I (Fermentas, Burlington, Canada), 4 μ L超纯水,对PCR扩增产物进行酶切,条件是37 $^{\circ}$ C, 6 h,酶切产物经40 g/L琼脂糖凝胶电泳10 min, 电压100 V, Kodak电泳图像分析系统,观察带型并拍照。

1.2.5 血液实验室检查: 对78例NASH患者进行空腹12 h临床血指标检查。包括应用酶联免疫测定法测定IL-6血清水平(Fermentas, Burlington Canada),同时用全自动生化仪测定血清白蛋白、血清丙氨酸转氨酶(ALT)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)值,空腹血糖(FPG,葡萄糖氧化酶法)、空腹胰岛素(FINS,胰岛素放射免疫试剂盒Fermentas, Burlington Canada,放射免疫分析法)。测量身高、体重、腰围及血压,并计算出体质指数(BMI = 体重kg/身高的平方 m^2)。采用稳态模式评估法(HOMA公式)评价胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),计算公式如下: $HOMA-IR = FPG \times FINS / 22.5$ 。

统计学处理 应用SPSS10.0软件包,文中有关变量用mean \pm SD。HOMA-IR经对数转换后进行分析,相对危险度和相关分析采用软件包中的比值比(odds ratio, OR)和Chi-square检验。 $P < 0.05$ 具有显著差异性。

2 结果

2.1 IL-6基因启动子-572C/G多态性分析 两组受试者均可检测到预计的163 bp片段,且均符合Hardy-Weinberg平衡检验及卡方Chi-square检验($P > 0.05$)。限制性内切酶Mbi I对IL-6基因PCR扩增产物酶切后存在三种基因型: CC(缺乏Bpi I酶切位点,仅见与扩增产物一样的163 bp片段)、GC(可见163 bp片段,101 bp片段和62 bp片段)、GG(可见101 bp片段和62 bp片段)见图2。NASH患者组与正常对照组相比,C等位基因频率有显著差异性(56.4% vs 40.4%, $P < 0.05$)。NASH患者组的CC基因型频率要显著高于正常对照组(35.9% vs 17.3%, $P < 0.05$,表1),通过CT诊断脂肪肝(图1)。

2.2 NASH患者组的三组基因型临床数据分析 依据基因PCR扩增产物酶切后3种基因型(图2),将

表 1 NASH患者组和NC组IL-6基因启动子第-572位点基因型及C/G等位基因的分布

分组	n	等位基因		基因型		
		G	C	G/G	C/G	C/C
NASH	78	34(0.436)	44(0.564) ^a	20(0.256)	30(0.385)	28(0.359) ^a
NC	104	62(0.596)	42(0.404)	40(0.385)	46(0.442)	18(0.173)

^a*P*<0.05 vs NC组.

表 2 NASH患者三组基因型临床数据间的比较

基因型	C/C	C/G	G/G	<i>P</i> 值
年龄	44.8 ± 14.8	49.2 ± 15.3	35.4 ± 16.5	>0.05
性别(M/F)	14/14	14/16	11/9	>0.05
腰围(cm)	90.6 ± 15.0	81.4 ± 15.1	99.2 ± 16.3	>0.05
BMI	30.1 ± 4.8	27.0 ± 3.2	30.2 ± 5.6	>0.05
收缩压(mmHg)	132.1 ± 13.53	124.1 ± 16.3	138.2 ± 16.2	>0.05
舒张压(mmHg)	80.2 ± 11.7	72.9 ± 10.3	81.3 ± 10.2	>0.05
ALT(IU/L)	93.2 ± 61.1	76.1 ± 38.1	117.4 ± 65.0	>0.05
白蛋白(g/L)	42.1 ± 3.1	43.3 ± 2.2	45.4 ± 4.0	>0.05
TG(mg/dL)	169.3 ± 103.2	178.6 ± 111.2	136.7 ± 61.1	>0.05
TC(mg/dL)	211.3 ± 37.2	208.7 ± 56.3	175.5 ± 35.4	>0.05
HDL-Chol(mg/dL)	47.4 ± 13.9	47.7 ± 14.9	42.1 ± 10.6	>0.05
IL-6(ng/L)	6.54 ± 4.21	4.72 ± 3.1	4.63 ± 2.66	<0.05
空腹血糖FPG(mg/dL)	114.6 ± 35.5	100.7 ± 14.4	104.4 ± 16.2	>0.05
空腹胰岛素FINS(mU/L)	13.4 ± 10.5	9.9 ± 8.7	13.0 ± 9.6	>0.05
HOMA-IR	3.16 ± 1.79	3.01 ± 2.72	3.24 ± 2.42	>0.05

■应用要点

本文为阐明IL-6在NASH发病机制中的作用提供新证据。

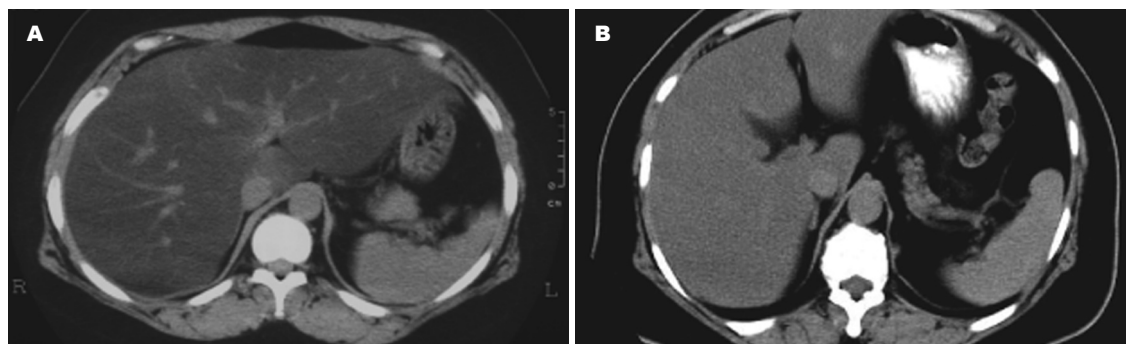


图 1 NASH患者CT影像.

NASH患者分为CC组、GC组和GG组, 3组基因型临床资料数据见表2. CC组与其他两组相比血清IL-6水平明显高于其他两组(6.54 ± 4.21 ng/L vs 4.68 ± 2.88 ng/L, $P < 0.05$). GG基因组的HOMA-IR, BMI与其他两组基因型相比无显著统计学差异, resistin基因三种酶切产物电泳见图3.

3 讨论

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)是指除过量饮酒及其他明确损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞

大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征^[5], NASH是NAFLD病程进展的一个阶段. NASH发病机制至今不明确, 目前认为它是一种遗传、环境及代谢应激相关性疾病, 广为接受的是二次打击学说^[6], 该学说主要包括胰岛素抵抗、氧化应激作用、脂质过氧化作用等方面机制. 其中氧化应激机制中关于细胞因子如TNF- α 、白介素等的研究成为近年研究的热点, 而这些研究都与NASH的分子机制有着千丝万缕的联系^[7-9]. IL-6是一种重要的促炎细胞因子, 作为炎症细胞

■名词解释

NASH二次打击学说: 第一次打击使脂肪在肝内过量堆积, 引起脂肪变性, 与胰岛素抵抗有关, 第二次打击包括氧化应激和脂质过氧化, 这是由促氧化物和抗氧化物失衡所致。这其中涉及了基因遗传易感性、多种外界因素及多种细胞因子的相互作用, 中心环节是IR和氧化应激。

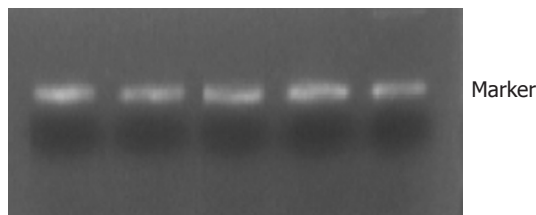


图2 PCR扩增resistin基因电泳。

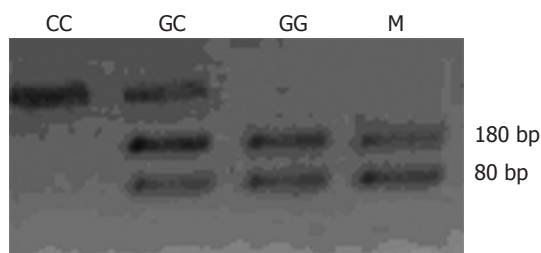


图3 resistin基因三种酶切产物电泳。

分化的主要调节因子可以上调黏附分子的表达, 从而加强炎症反应, 还可参与脂类代谢, 在调节免疫应答和炎症反应中起重要作用。IL-6基因位于第七号染色体短臂上, 含5个外显子和4个内含子。IL-6基因启动子区存在基因变异及基因多态性, 这种多态性与多种疾病存在密切相关性^[10-12], 其中有研究表明IL-6在胰岛素抵抗患者中升高, 参与胰岛素抵抗的形成^[13-15]。Fishman *et al*^[16]于1998年报导IL-6基因启动区174位点存在C/G多态性, 等位基因C纯合子形成IL-6减少, 而等位基因G的纯合子和杂合子形成IL-6增多, 携带GG纯合子人的血清中IL-6浓度大约是CC纯合子的2倍, 得出推论IL-6基因多态性与胰岛素抵抗有关, 随后欧美国家相继有报道支持这一研究^[17-20]。而在我国类似研究的结果却有着一定差距, IL-6基因174G/C多态性频率等位基因C明显少于欧美人群, 可能与胰岛素抵抗无关^[21-22]。鉴于IL-6、胰岛素抵抗及NASH存在待证实的交叉关系, 本文从IL-6基因启动子-572C/G多态性着手, 观察我国人群中该基因频率及与胰岛素抵抗、NASH的相关性。在本文的研究中IL-6基因启动子-572位点的CC、CG及GG基因型在NASH患者组中分别为0.359、0.385及0.256, 健康对照组中分别为0.173、0.442及0.385。两组基因分布频率有明显统计学差异($P<0.05$); NASH患者组中CC基因型携带者IL-6血清含量显著高于其他基因型携带者($6.54 \pm 4.21 \text{ ng/L}$ vs $4.68 \pm 2.88 \text{ ng/L}$, $P<0.05$), 但HOMA-IR及BMI与其他两组基因型相比较并无显著统计学差异。

NASH的病因机制复杂, 参与的基因很多, 而研究单个基因多态性时, 可能会因样本的选择及数量不足、基因突变频率低及外界环境影响而致研究结果受到局限, 在以后的研究中可采取增加样本数量及联合相关基因研究。

4 参考文献

- 1 Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 3-20
- 2 Ratzliff V, Tahiri M, Bonyhay L. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Endocrinol (Paris)* 2005; 66: 1571-1580
- 3 Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997; 40: 1286-1292
- 4 橘本悦子, 谷仁辉. 非酒精性脂肪肝炎的诊断标准. 日本医学介绍 2007; 28: 146-148
- 5 范建高. 亚太地区非酒精性脂肪性肝病诊断与治疗共识简介. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 552-553
- 6 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 7 Casano-Sancho P, Lopez-Bermejo A, Fernandez-Real JM, Monros E, Valls C, Rodriguez-Gonzalez FX, Ricart W, Ibanez L. The tumour necrosis factor (TNF)-alpha-308GA promoter polymorphism is related to prenatal growth and postnatal insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 129-135
- 8 Yang X, Jansson PA, Pellme F, Laakso M, Smith U. Effect of the interleukin-6 (-174) g/c promoter polymorphism on adiponectin and insulin sensitivity. *Obes Res* 2005; 13: 813-817
- 9 Qi L, van Dam RM, Meigs JB, Manson JE, Hunter D, Hu FB. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1914-1920
- 10 Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1334-1339
- 11 Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Chiappelli M, Dolzani P, Martelli M, Bianchin M, Mariani E, Bolondi L, Licastro F. Associations of the -174 G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism with serum interleukin 6 and mortality in the elderly. *Biogerontology* 2005; 6: 415-423
- 12 Park BL, Lee HS, Kim YJ, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Shin HD. Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. *Exp Mol Med* 2003; 35: 76-82
- 13 Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 67: 291-300
- 14 Wolford JK, Colligan PB, Gruber JD, Bogardus C. Variants in the interleukin 6 receptor gene are associated with obesity in Pima Indians. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 338-343
- 15 Sato W, Horie Y, Watanabe S, Suzuki A. Tumor suppressor gene PTEN and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Nippon Rinsho* 2005; 63: 1475-1483
- 16 Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V,

- Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369-1376
- 17 Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Gutierrez C, Casamitjana R, Pugeat M, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes* 2000; 49: 517-520
- 18 Vozarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrell J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003; 112: 409-413
- 19 Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1154-1159
- 20 Esteve E, Villuendas G, Mallolas J, Vendrell J, Lopez-Bermejo A, Rodriguez M, Recasens M, Ricart W, San Millan JL, Escobar-Morreale H, Richart C, Fernandez-Real JM. Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with body mass index and with characteristics of the metabolic syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 88-91
- 21 杨冀衡, 罗国辉, 陆泽元, 胡雪松, 新霞, 张东辉, 许香广. 白细胞介素6基因174G/C多态性与胰岛素抵抗的关系. *中国动脉硬化杂志* 2005; 13: 101-104
- 22 刘永生, 王金凤, 于连慧, 刘和平, 孟繁超, 刘德铭. 白细胞介素6基因启动子-174G/C, 572C/G多态性与冠心病的相关性. *中国心血管病研究杂志* 2007; 5: 264-266

■同行评价

本文对非酒精性脂肪肝的基因多态性提供了一些有价值的信息, 具有一定的探索价值.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •**世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版**

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文 (<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>). 自2003-04-15至2007-12-31, 电子版的点击次数为21762951, 平均每天点击12743次. 总下载次数280505, 平均每天下载164次. (世界胃肠病学杂志社 2008-02-28)

肝移植患者血清中S-100 β 蛋白浓度变化及机制

龙波, 李妍, 陈卫民

■背景资料

随着肝移植的增多, 其术后并发症日益受重视。神经系统并发症发病率高, 影响预后和生存质量。以往的研究多集中于术后免疫抑制剂的神经毒副作用, 而忽视了移植手术过程中肝脏I/R、电解质紊乱和血液动力学改变对神经系统的影响。

龙波, 李妍, 陈卫民, 中国医科大学盛京医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110004

龙波, 2005年中国医科大学博士毕业, 副主任医师, 主要从事临床麻醉与器官保护。

作者贡献分布: 龙波与陈卫民对此文所作贡献均等; 此课题由龙波和陈卫民设计; 研究过程龙波和李妍完成; 数据分析由龙波和李妍完成; 本论文写作由龙波和陈卫民完成。

通讯作者: 陈卫民, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院麻醉科. chenwm@cmu2h.com

电话: 024-83955042 传真: 024-83955042

收稿日期: 2007-08-06 修回日期: 2008-01-23

Changes of serum S-100 β protein concentration in patients with original liver transplantation and its possible mechanism

Bo Long, Yan Li, Wei-Min Chen

Bo Long, Yan Li, Wei-Min Chen, Department of Anesthesiology, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Wei-Min Chen, Department of Anesthesiology, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chenwm@cmu2h.com

Received: 2007-08-06 Revised: 2008-01-23

Abstract

AIM: To detect the changes of S-100 β protein concentration in serum of the patients with original liver transplantation and discuss its possible reasons.

METHODS: Five patients of late-stage hepatic disease and with original liver transplantation were collected. The mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), cardiac output (CO), central venous pressure (CVP) and blood-gas analysis were recorded at preoperative, pre-clamp, anhepatic 10, 30 and 60 min, post-reperfusion 10, 90 min and the end of operation. The concentration of S-100 β and interleukin-1 β (IL-1 β) in serum was also tested at preoperation, the end of anhepatic phase, reperfusion 1 h, postoperative 24 h and 48 h.

RESULTS: Before operation, serum S-100 β level was in normal range and had no difference be-

tween patients, but increased 1 h after reperfusion (0.437 ± 0.148 mg/L vs 0.132 ± 0.061 mg/L); at 24 h, S-100 β level (0.480 ± 0.340 mg/L) was still higher than that before operation, and then it decreased gradually to the level of the end of anhepatic period at 48 h of postoperation (0.239 ± 0.090 mg/L). IL-1 β level increased to the highest level 24 h after reperfusion (63.7 ± 21.9 ng/L vs 32.2 ± 19.1 ng/L) and then decreased gradually. Thirty minutes after vena cava was clamped, MAP remained in normal level after drug adjustment, and HR was still higher than that before clamping. Meanwhile, cardiac output (CO) decreased significantly (5.4 ± 2.42 L/min vs 9.9 ± 2.33 L/min); at the first 10 min after reperfusion, CO was still lower than that before clamping (6.7 ± 1.81 L/min); all those were recovered to the preoperative level after treatment by blood vessel active drugs, hydragogue, etc. Partial pressure of carbon dioxide increased obviously during the earlier period after reperfusion; though sodium bicarbonate had been used during the last period of anhepatic phase and earlier period of reperfusion, the value of pH still decreased (i.e. acidemia) and then increased to the normal level before the end of operation; the level of ion remained in normal range on the whole after careful adjustment. Correlation analysis showed that the change of S-100 β had no apparent correlation with CO or IL-1 β ($r = -0.327$, $r = 0.248$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: The increase of S-100 β was due to the increase of permeability of blood brain barrier after reperfusion of the new liver and had no correlation with CO or IL-1 β .

Key Words: S100- β protein; Blood brain barrier; Hepatic transplantation

Long B, Li Y, Chen WM. Changes of serum S-100 β protein concentration in patients with original liver transplantation and its possible mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 640-644

摘要

目的: 探讨在肝移植患者血清中S-100 β 蛋白的

■同行评议者

邱双健, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

变化和原因。

方法: 本院临床肝功终末期进行肝移植的患者5例, 检测术前, 无肝期末, 供肝移植后1, 24, 48 h血中S-100 β 和IL-1 β 的浓度(双抗体夹心-ELISA法); 监测术前, 阻断前, 无肝期10、30、60 min, 肝脏再灌注后10、90min及术毕的HR、MAP、CO、CVP和血气分析。

结果: S100- β 术前均在正常范围, 新肝期1 h明显增高(0.437 ± 0.148 vs 0.132 ± 0.061 mg/L), 至24 h (0.480 ± 0.340 mg/L)仍高于术前水平, 48 h降至无肝期末水平(0.239 ± 0.09 mg/L)。IL-1 β 于新肝期24 h升至最高水平(63.7 ± 21.9 ng/L vs 32.2 ± 19.1 ng/L), 其后降低; 腔静脉阻断后30 min经药物调整MAP维持在正常水平, HR仍高于阻断前, CO明显降低(5.4 ± 2.42 L/min vs 9.9 ± 2.33 L/min); 再灌注后最初10 min CO仍旧低于术前水平(6.7 ± 1.81 L/min), 经治疗逐渐恢复至术前水平; 血中二氧化碳分压在新肝早期明显升高, 无肝期末及新肝早期虽然应用了碳酸氢钠注射液但pH值仍降低, 呈酸血症, 术毕前恢复正常; 离子经过调整基本均在正常范围。相关分析发现S-100 β 的变化与CO和IL-1 β 无明显相关($r = -0.327, r = 0.248, P > 0.05$)。

结论: 肝移植患者术后血清中S-100 β 蛋白的增加是血脑屏障通透性增加所致, 与IL-1 β 和CO的变化无明显关系。

关键词: S100- β 蛋白; 血脑屏障; 肝脏移植

龙波, 李妍, 陈卫民. 肝移植患者血清中S-100 β 蛋白浓度变化及机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 640-644
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/640.asp>

0 引言

随着肝移植手术的增多, 术后并发症的问题日益受关注, 特别是神经系统并发症发生率高达8/47, 平均在30%左右^[1], 严重影响患者的预后和生存质量。动物实验发现肝脏缺血再灌注的过程, 可通过氧化应激反应使脑组织发生超微结构的改变^[2], 血脑屏障通透性增加。但在临床肝移植患者中, 是否有血脑屏障的损害尚待证实。

S-100 β 蛋白是一种酸性钙结合蛋白, 存在于中枢神经胶质细胞、星形细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞及大胶质细胞, 被认为是脑的特异蛋白。正常状态他不能通过血脑屏障, 他出现在血中则表明血脑屏障通透性增加。IL-1 β 是体内最强的炎性介质之一, 生物学作用广泛, 在

缺血性脑损伤中起重要作用。本研究通过观察肝移植患者血中S-100 β 蛋白的变化, 结合围术期血液动力学参数, 电解质及血中IL-1 β 的改变, 探讨肝移植术后神经系统损伤和血脑屏障通透性改变与其他相关因素的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2004-10/2005-01进行原位肝移植患者5例, 男3例, 女2例。患者年龄从35-58(平均 50.4 ± 9.40)岁。所有患者均为乙肝肝硬化肝功终末期, 需肝移植治疗, 其中合并肝癌1例, 右侧胸腔积液2例。术前均无肝性脑病, 但1例一年前曾出现肝昏迷。外科手术均为同一组人员, 研究期间手术方式无改变, 无患者应用静脉转流。

1.2 方法

1.2.1 麻醉方法: 麻醉诱导应用咪唑安定3-5 mg, 芬太尼3 μ g/kg, 乙托咪脂0.1 mg/kg, 爱可松0.6 mg/kg, 维持应用吸入异氟醚0.6-1.0 MAC, 雷米芬太尼0.1-0.2 μ g/(kg·min), 间断给予咪唑安定, 阿端。机械通气, Detax监测呼出末二氧化碳(ETCO₂), 使其在35-40 mmHg之间。同时监测桡动脉压(MAP), 中心静脉压(CVP), 肺楔压(PCWP), 肺动脉压(PAP), 心输出量(CO), 心电图(ECG), 心率(HR)及脉搏血氧(SPO₂)。术中根据血液动力学的变化调整麻醉深度、输液及应用血管活性药物。

1.2.2 观察指标: S-100 β 和IL-1 β 的检测, 分别于术前, 无肝期末, 供肝移植后1, 24, 48 h采集颈内静脉血3 mL, 静置20 min后3000 r/min离心15 min, 取上清, 置于-80℃冰箱中保存待测。采用双抗体夹心-ELISA法检测。按说明书操作。术前, 阻断前, 无肝期10 min、30 min、60 min、肝脏再灌注后10 min、90 min及术毕监测HR、MAP、CO和CVP血液动力学指标。术前, 无肝期30 min, 肝脏再灌注后10 min及术毕采集1 mL动脉血做血气分析。

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 应用SPSS11.0统计学软件处理, 行单因素方差分析并t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况 5例患者手术时间为 8.37 ± 0.70 h, 无肝期为 78.80 ± 6.14 min, 术中出血量为 2000 ± 354 mL, 输入红细胞悬液 1860 ± 841 mL, 乳酸林格氏液 1580 ± 319 mL, 血浆代用品 840 ± 328 mL, 生理盐水 660 ± 134 mL。

■研究前沿

肝移植围术期血脑屏障是否有改变、神经细胞是否有损伤及与临床指标和炎性介质的变化的相关关系目前报道尚少。

■相关报道

研究已经证实了肝脏I/R后, 脑组织超微结构有改变, 皮层S-100 β 蛋白高表达, 提示肝脏I/R对中枢神经系统的损伤。还有肢体的I/R所致脑损伤, 肝移植过程中脑组织有局部氧饱和度降低等报道。

■应用要点

S-100 β 蛋白的变化对移植术后脑损伤的判定、预后的评估和用药方案的制定有重要参考价值。

表 1 血中S-100 β 和IL-1 β 的变化

	术前	无肝期末	新肝期		
			1 h	24 h	48 h
S-100 β (mg/L)	0.132 \pm 0.061	0.248 \pm 0.083	0.437 \pm 0.148 ^a	0.480 \pm 0.340 ^a	0.239 \pm 0.090
IL-1 β (ng/L)	32.2 \pm 19.1	26.8 \pm 15.4	38.4 \pm 22.4	63.7 \pm 21.9 ^c	24.0 \pm 22.3

^a P < 0.05 vs 术前; ^c P < 0.05 vs 术前、无肝期及术后48 h.

表 2 血液动力学变化

	术前	无肝期前	无肝期(min)			新肝期(min)		术毕
			10	30	60	10	90	
MAP (mmHg)	80 \pm 6.2	89 \pm 11.4	74 \pm 6.5 ^c	85 \pm 6.1	85 \pm 5.6	75 \pm 7.1 ^c	80 \pm 6.2	86 \pm 5.5
HR (bpm)	81 \pm 4	93 \pm 12	130 \pm 23 ^e	119 \pm 25 ^e	109 \pm 18 ^e	93 \pm 8	87 \pm 13	86 \pm 11
CVP (cmH ₂ O)	10 \pm 3.1	12 \pm 4.2	8 \pm 4.8	9 \pm 6.0	10 \pm 6.1	14 \pm 5.18 ^a	12 \pm 5.1	11 \pm 3.0
CO (L/min)	9.8 \pm 3.12	9.9 \pm 2.33	7.6 \pm 2.43	5.4 \pm 2.42 ^a	5.6 \pm 2.26 ^a	6.7 \pm 1.81 ^a	10.0 \pm 2.10	10.2 \pm 1.98

^a P < 0.05 vs 术前、无肝期前、新肝期90 min及术毕, ^c P < 0.05 vs 其他各点, ^e P < 0.05 vs 术前, ^a P < 0.05 vs 无肝期10 min.

表 3 血气分析

	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	pH	K ⁺ (mmol/L)	Na ⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)
术前	491 \pm 134	37 \pm 4.8	7.42 \pm 0.05	3.25 \pm 0.45	137 \pm 5.7	108 \pm 0.8
无肝期30 min	487 \pm 68	36 \pm 2.6	7.36 \pm 0.03 ^a	3.70 \pm 0.27	139 \pm 4.0	105 \pm 2.9
新肝期10 min	515 \pm 67	45 \pm 4.3 ^a	7.33 \pm 0.05 ^a	3.22 \pm 0.41	137 \pm 4.8	103 \pm 4.5
术毕	464 \pm 57	41 \pm 2.0	7.40 \pm 0.28	3.36 \pm 0.31	138 \pm 4.5	103 \pm 3.4

^a P < 0.05 vs 术前.

2.2 血中IL-1 β 及S-100 β 浓度变化 S100- β 术前均在正常范围, 新肝期1 h明显增高, 至24 h仍高于术前水平, 最高值为1.28 mg/L, 48 h降至无肝期末水平. IL-1 β 于新肝期24 h升至最高水平, 其后降低(表1).

2.3 血液动力学变化 腔静脉阻断后最初10 min MAP明显降低, HR增快, 随后经血管活性药物调整MAP维持在正常水平, 心率略有下降但仍高于阻断前水平, CO明显降低; 再灌注后最初10 min MAP再次降低, CO仍低于术前水平, HR恢复正常, CVP略有增高; 后经血管活性药利尿剂等治疗逐渐恢复至术前水平(表2).

2.4 各个时点血气分析及离子变化 血中二氧化碳分压在新肝早期明显升高, 无肝期末及新肝早期虽然应用了碳酸氢钠注射液但pH值仍有降低, 呈酸血症. 术毕前恢复正常. 离子经过调整基本均在正常范围(表3). 相关分析发现S-100 β 的变化与CO和IL-1 β 无明显相关($r = -0.327$, $r = 0.248$, $P > 0.05$).

3 讨论

肝移植的术后神经系统并发症的发病率高, 并以移植术后脑病最为常见^[3]. 研究发现, 尽管移植后肝功的恢复, 但仍存在轻微的脑损害^[4].

本研究中移植术后患者均有明显的烦躁不安, 1例出现妄想和幻觉. 目前对于脑损伤的评价可以通过脑电图, 计算机断层摄影术(CT), 磁共振成像(MRI), 经颅超声等措施获得. 但临床不易实施. 临床神经精神检查可能发现功能性亚临床脑损伤, 如认知障碍等, 但需要专科医生来进行. 术后早期患者在ICU病房处于镇静或麻醉未完全苏醒状态, 或呼吸机支持下, 进行临床检查评估难度很大. 因此本研究对移植术后脑损伤的判定、预后的评估、用药方案的制定有重要临床参考价值.

S-100 β 蛋白由Moore于1965年首次在牛脑中发现的一种酸性钙结合蛋白, 由 α 和 β 两个亚单位以反向平行的方式组成同源二聚体(S-100 $\alpha\alpha$, S-100 $\beta\beta$)和异源二聚体(S-100 $\alpha\beta$)^[5],

其中S-100 $\alpha\beta$ 主要存在于胶质细胞中, S-100 $\beta\beta$ 主要存在于神经胶质细胞和雪旺氏细胞中, S-100 $\alpha\beta$ 和S-100 $\beta\beta$ 常被统称为S-100 β 蛋白. S-100 β 是大分子蛋白质, 不能透过血脑屏障, 没有脑损伤时在血浆中浓度很低, 正常人低于0.2 $\mu\text{g/L}$. 当脑损伤时, 一方面S-100 β 蛋白本身的合成增加, 另一方面脑细胞破坏后S-100 β 进入脑脊液(CSF), 通过受损的血脑屏障再进入血浆, 使血浆中S-100 β 蛋白显著升高. S-100 β 已成为公认的血脑屏障破坏的一个标志蛋白^[6-9]. 高浓度的S-100 β 蛋白通过细胞内钙超载^[10]和使星形细胞中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达^[11-12], 而对中枢神经系统有毒性作用. 血浆中的S-100 β 蛋白不受年龄、溶血、低温、肝素、异丙酚等影响^[13-14]. 因此他是比神经烯醇化酶更为敏感的判定神经损伤的指标. 许多研究表明, 心脏手术后发生神经系统并发症的患者血清中S-100 β 水平异常显著升高, 并持续较长时间^[14-15].

在本观察中术前患者S-100 β 蛋白浓度均在正常范围, 即<0.2 $\mu\text{g/L}$, 但在开放腔静脉后1 h血中S-100蛋白浓度明显升高, 高于术前和无肝期水平, 并且持续24 h, 说明新肝再灌注后血脑屏障开放, 漏入血中的S-100蛋白增多. 新肝再灌注时可能有一些供肝毛细血管中原先释出的S-100 β 被“冲洗”入外周血, 因此开放后早期增高可能与此有一定的关系. 但S-100 β 在血中半衰期短约2 h, 术后24 h S-100 β 仍高于术前, 说明肝移植术后患者血脑屏障通透性增加, 并可能伴有神经细胞受损. 但S-100 β 增高数值较小, 仅2-3倍级, 故多数患者术后无明显的神经精神障碍症状. 而体外循环后有明确神经精神障碍脑损伤患者S-100 β 则呈十几倍级增加. 说明这5例肝移植患者神经损伤比较轻微, 并以血脑屏障通透性增加为主. 这与我们术中精细的麻醉管理, 精湛的手术技巧, 致使无肝期时间较短, 血流动力学波动较小, 同时应用减少再灌注损伤的药物, 如乌司他丁等有关.

以往的研究表明, 机体的某一器官严重缺血再灌注后不仅加剧该器官的损伤, 还可导致其他远隔部位的组织器官损伤, 如肢体或小肠的缺血再灌注可导致严重的肺损伤^[16-17]、脑损伤^[18], 严重时甚至可导致多器官功能衰竭. 同样肝脏缺血再灌注后血液动力学、凝血功能、电解质、酸碱平衡发生重大改变, 可导致急性肺损伤和心功能不全及其他肝脏外脏器功能改变, 甚至累及中枢神经系统^[19-21]. 肝移植过程中肝脏

缺血再灌注是术后脑损伤的原因之一. 动物实验发现, 大鼠肝脏缺血再灌注后脑组织出现超微结构的改变, 脑组织水肿, 以胶质细胞和毛细血管周围重, 形成宽亮带, 毛细血管基底膜疏电子性, 内皮细胞变性等^[2], 血脑屏障通透性增加, 脑组织内S-100 β 蛋白过度表达^[22]是其可能的机制之一. 再灌注后释放大量的炎性介质, IL-1 β 是体内最强的炎性介质之一, 生物学作用广泛, 诱导黏附分子表达, 吸引中性粒细胞聚集, 激活免疫细胞及内皮细胞产生多种细胞因子, 诱导炎性细胞因子的表达及分泌, 促进神经毒性物质产生和释放, 对神经胶质细胞和血脑屏障产生伤害^[23]. 本观察中IL-1 β 在血中浓度24 h才达峰值, 与S-100 β 的升高无明显相关, 观察例数较少可能是原因之一.

观察中还发现S-100 β 在血中浓度的升高与CO无关. Philips *et al*^[24]观察到肝移植患者在无肝期脑血流量的降低, 主要是由于脑血管的反应性下降所致. 肝脏病晚期损害脑血流自主调节功能, 在无肝期阻断腔静脉所致突然的血流动力学改变使脑灌注和氧合极易受影响. 因此, 即使MAP在正常范围其脑组织也可发生低灌注^[25]. 低氧再给氧也将会导致血脑屏障的破坏^[26], 这也是S-100 β 持续升高的原因之一.

总之, 肝移植患者术后血清中S-100 β 蛋白的增加是血脑屏障通透性增加所致, 同时可能伴有不同程度的神经细胞受损, 与IL-1 β 、CO和血气变化无明显关系.

4 参考文献

- 1 Stein DP, Lederman RJ, Vogt DP, Carey WD, Broughan TA. Neurological complications following liver transplantation. *Ann Neurol* 1992; 31: 644-649
- 2 龙波, 李存友, 陈卫民, 邢准, 潘丽丽, 孙文利, 张秉钧. 大鼠肝脏缺血再灌注后所致脑组织超微结构的改变与自由基的作用. *中国现代医学杂志* 2006; 23: 3553-3559
- 3 Saner FH, Sotiropoulos GC, Gu Y, Paul A, Radtke A, Gensicke J, Kavuk I, Malagó M, Broelsch CE. Severe neurological events following liver transplantation. *Arch Med Res* 2007; 38: 75-79
- 4 Pantiga C, Rodrigo LR, Cuesta M, Lopez L, Arias JL. Cognitive deficits in patients with hepatic cirrhosis and in liver transplant recipients. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2003; 15: 84-89
- 5 Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 1995; 37: 417-429
- 6 Kapural M, Krizanac-Bengez Lj, Barnett G, Perl J, Masaryk T, Apollo D, Rasmussen P, Mayberg MR, Janigro D. Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res* 2002; 940: 102-104
- 7 Marchi N, Rasmussen P, Kapural M, Fazio V, Kight

■名词解释

S-100 β 蛋白: 主要为星形胶质细胞分泌的小分子蛋白, 其过度表达有神经毒作用; 正常情况下不能通过血脑屏障, 在血中检测到高浓度的S-100 β 蛋白标志着血脑屏障的破坏和脑组织的损伤.

■同行评价

本研究紧密围绕
临床实践,对临床
具有一定的指导
价值。

- K, Mayberg MR, Kanner A, Ayumar B, Albeni B, Cavaglia M, Janigro D. Peripheral markers of brain damage and blood-brain barrier dysfunction. *Restor Neurol Neurosci* 2003; 21: 109-121
- 8 Vogelbaum MA, Masaryk T, Mazzone P, Mekhail T, Fazio V, McCartney S, Marchi N, Kanner A, Janigro D. S100beta as a predictor of brain metastases: brain versus cerebrovascular damage. *Cancer* 2005; 104: 817-824
- 9 Mussack T, Hauser C, Klauss V, Tató F, Rieger J, Ruppert V, Jochum M, Hoffmann U. Serum S-100B protein levels during and after successful carotid artery stenting or carotid endarterectomy. *J Endovasc Ther* 2006; 13: 39-46
- 10 Fulle S, Pietrangeli T, Marigliò MA, Lorenzon P, Racanicchi L, Mozzykmas J, Guarnieri S, Zucconi-Grassi G, Fanò G. Calcium and fos involvement in brain-derived Ca(2+)-binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells. *Exp Physiol* 2000; 85: 243-253
- 11 Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 2543-2547
- 12 Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 1997; 69: 2294-2301
- 13 Nygaard O, Langbakk B, Romner B. Age- and sex-related changes of S-100 protein concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder. *Clin Chem* 1997; 43: 541-543
- 14 Ali MS, Harmer M, Vaughan R. Serum S100 protein as a marker of cerebral damage during cardiac surgery. *Br J Anaesth* 2000; 85: 287-298
- 15 何庚戌, 李伯君, 要彤, 高长青. 血浆S-100蛋白在体外循环术后脑损伤评价中的意义. *中华胸心血管外科杂志* 2003; 19: 281-283
- 16 周君琳, 凌亦凌, 王俊霞, 张君岚, 史中立, 从斌, 岳凤鸣, 丁春华. 大鼠肢体缺血再灌注致肺损伤时肺组织中血红素氧合酶的表达. *中国病理生理杂志* 2001; 17: 438-440
- 17 郑珊, 张文颖, 孙波, 朱列伟. 肺表面活性物质治疗大鼠小肠缺血再灌注所致肺损伤. *中华小儿外科杂志* 2001; 22: 48-50
- 18 史中立, 凌亦凌, 姚玉霞, 张爱子, 周君琳, 谷振勇, 黄新莉. 大鼠肢体缺血再灌注所致脑损伤及其机制探讨. *中国病理生理杂志* 2001; 17: 451-453
- 19 Tanaka Y, Maher JM, Chen C, Klaassen CD. Hepatic ischemia-reperfusion induces renal heme oxygenase-1 via NF-E2-related factor 2 in rats and mice. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 817-825
- 20 Lin HI, Chou SJ, Wang D, Feng NH, Feng E, Chen CF. Reperfusion liver injury induces down-regulation of eNOS and up-regulation of iNOS in lung tissues. *Transplant Proc* 2006; 38: 2203-2206
- 21 张军明, 任艳华, 刘芬, 雷亚宁, 张婵, 钱旭. 肝门阻断对大鼠肠道肌间神经丛内NOS阳性神经元的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 87-91
- 22 郑晓春, 陈卫民, 盖成林. 肝门阻断再灌注后脑皮层组织和血清s100 β 蛋白的差异性改变及意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3046-3049
- 23 陈蔚, 邹长江. IL-1 β 在缺血致脑损伤中的主要作用机制. *生理科学进展* 2002; 33: 41-44
- 24 Philips BJ, Armstrong IR, Pollock A, Lee A. Cerebral blood flow and metabolism in patients with chronic liver disease undergoing orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 369-376
- 25 Plachky J, Hofer S, Volkmann M, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Regional cerebral oxygen saturation is a sensitive marker of cerebral hypoperfusion during orthotopic liver transplantation. *Anesth Analg* 2004; 99: 344-349, table of contents
- 26 Mark KS, Davis TP. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1485-H1494

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

WCJD 和 WJG 2008 年对作者贡献分布 实行公开策略

本刊讯 WCJD和WJG从2008年第16卷第2期开始实行在每篇文章的脚注内注明每个作者对文章的贡献率,如:作者贡献分布:陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献均等;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。(总编辑:马连生 2008-02-28)

MicroRNA与HBV相关性肝癌发生发展关系的研究进展

黄金明, 叶进, 陈立波

黄金明, 叶进, 陈立波, 华中科技大学协和医院 湖北省武汉市 430022

国家自然科学基金资助项目, No. 30672067

作者贡献分布: 本文由黄金明综述, 叶进审校, 陈立波进行指导及审校.

通讯作者: 陈立波, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学协和医院. libo_chen@hotmail.com

电话: 027-85351623

收稿日期: 2007-11-28 修回日期: 2008-01-25

Advances in research of microRNA- and HBV-related liver cancer

Jin-Ming Huang, Jin Ye, Li-Bo Chen

Jin-Ming Huang, Jin Ye, Li-Bo Chen, Union Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672067

Correspondence to: Li-Bo Chen, Union Hospital of Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. libo_chen@hotmail.com

Received: 2007-11-28 Revised: 2008-01-25

Abstract

MicroRNA is a kind of endogenous non-coding small RNA, is universally present in animals, plants and viruses and plays an important role in the development, proliferation, differentiation and apoptosis of organisms through complementary pairing with target mRNA, which can regulate its expression or translation. Recent studies indicate that miRNA is closely associated with tumors. Study on tumor-associated miRNA using techniques of experimental biology and bioinformatics is currently a hot subject of research. Recent studies on hepatocellular carcinoma(HCC) have shown that HCC is correlated with abnormal expression of several miRNAs, such as miRNA-122, -21, -195, -18, -199a. However, few studies on miRNA expression in HBV-infected diseases are available. This paper reviews researches on the association of microRNA with the development of liver cancer.

Key Words: MicroRNA; Liver cancer; Hepatitis B virus

Huang JM, Ye J, Chen LB. Advances in research of microRNA- and HBV-related liver cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(6): 645-652

摘要

MicroRNA(miRNA)是一类内源性非编码的小RNA, 广泛存在于动物、植物和病毒中. 通过与目标mRNA互补配对, 调控靶基因的表达或翻译, 在生物体的发育、增殖、分化和凋亡等方面发挥重要的生理作用. 最近研究表明miRNA与肿瘤发生存在密切关系. 利用实验生物学及生物信息学方法对与肿瘤相关的miRNA进行研究是当前研究的热点. 其中, 在肝癌中目前已发现若干miRNA如miRNA-122、-21、-195、-18、-199等的异常表达与之有关. 而在乙型肝炎病毒(HBV)感染相关疾病中的miRNA表达的研究尚不多见. 本文就MicroRNA与肝癌发生发展之间的关系作一综述.

关键词: 微小RNA; 肝癌; 乙型肝炎病毒

黄金明, 叶进, 陈立波. MicroRNA与HBV相关性肝癌发生发展关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 645-652

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/645.asp>

0 引言

MicroRNA(miRNA)是近年的一个研究热点, 随着研究的深入, 越来越多的miRNA被发现, 其中, miRNA与肿瘤的关系是很多研究的重点, 已经发现若干miRNA通过负调控基因的表达与慢性淋巴细胞性白血病、肺癌、乳腺癌、结肠癌高度相关. miRNA的正调控靶基因现象是最近的发现, 具体机制还不明确. 有学者提出了“癌microRNA”(OncomiRs)^[1-3]的观点, 即认为某些miRNA的异常表达在肿瘤的发生发展过程中充当了类似癌基因的角色. 肝癌, 特别是乙型肝炎相关性肝癌在我国的发病率高, 死亡率高, 严重危害人们的健康, 而乙型肝炎相关性肝癌目前尚无满意的治疗. 国内外学者对肝癌开展了广泛而深入的研究, 但乙肝病毒与肝癌发生发展的关系

■背景资料

自从1993年在线虫中发现第一个miRNA-lin4, 2001年阐明另一个miRNA-let-7在线虫发育中的功能以来, miRNA成为RNA干扰领域中的一大研究热点, 越来越多的证据表明, miRNA在生物的生理及病理过程中发挥着极其重要的作用.

■同行评议者

谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■ 研发前沿

在miRNA的研究中,探讨癌症的发生发展机制及病毒的感染致病中,miRNA所扮演的角色是学界关注的焦点。作为内源性的小RNA,寻找并筛选具体疾病中某些miRNA的异常表达,结合其调节靶基因表达的独特作用,可为癌症及HBV、HCV、HIV等难治性感染疾病提供新思路。

尚未完全阐明。近来研究表明miRNA可能在肝癌发生与进展中发挥重要作用。本文就miRNA与肝癌发生发展之间关系的研究作一综述。

1 miRNA介绍

miRNA亦称微小RNA,是一种广泛存在于真核生物中、大小约20-22个核苷酸(nt)的内源性单链小分子RNA,在生物进化过程中高度保守,在细胞中具有时空特异性表达模式。miRNA不编码蛋白,而是通过与靶基因序列特异性相互作用,在转录或翻译水平调节相关基因表达,参与发育、增殖、分化、凋亡等多种生物学过程^[4-5]。自1993年第一个miRNA编码基因lin-4由Lee *et al*^[6]在线虫体内发现以来,人们相继在烟草、果蝇、斑马鱼、哺乳动物与人体内^[7]发现了大量miRNA编码基因。据生物信息学预测,人类基因组内存在着约1000个miRNA基因,调控基因组内1/3左右基因的表达^[8]。至2007-12, Sanger最新的miRNA数据库Release10.1已收录了5395个miRNA,其中人类有851个(<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>)。

1.1 miRNA的生物合成 编码miRNA的基因大多位于染色体内含子、基因间区域或非编码mRNA外显子,一些miRNA在基因组中有多个位点,也有串联排列的,由RNA聚合酶II转录。在动物细胞核中,首先转录出一个很大的初始转录子(pri-miRNA),有的长达7000 nt。pri-miRNA被Drosha(一种核酸内切酶RNase III)处理成约70-80 nt的发夹状茎-环结构,即miRNA前体(pre-miRNA)。pre-miRNA由小分子单体G蛋白Ran-GTP依赖的转运蛋白exportin-5运输到胞质,被Dicer(另一种核酸内切酶RNase III)剪切成约22个核苷酸的双链miRNA^[9](图1)。双链miRNA被解旋酶解螺旋后,一条链被降解,另一条成为5'端有磷酸基团,3'端为羟基的成熟miRNA^[5]。

1.2 miRNA的作用机制 经典的研究认为,成熟miRNA进入miRNA诱导的基因沉默复合物(miRNA-induced silencing complex; miRISC)中与目标mRNA配对,主要通过两种机制来负调控目标基因的表达:(1)当miRNA和目的mRNA完全或几乎完全互补时,导致目的mRNA降解,此时的作用类似于小干扰RNA(siRNA)的功能;(2)当miRNA和目的mRNA不完全互补时,则负调控翻译过程,阻碍蛋白质翻译,而对靶基因mRNA没有影响^[9-11](图1)。第一种作用以线虫lin-4为代表,第二种作用方式以拟南芥miR-171

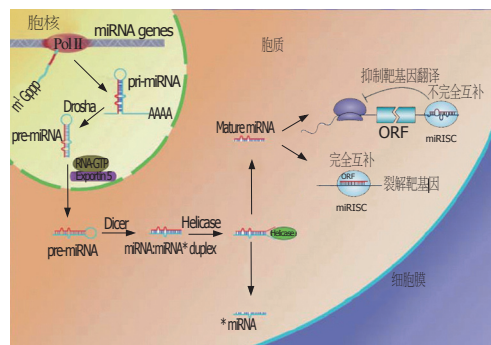


图1 经典的MicroRNA的生物合成及作用机制。在细胞核内,编码miRNA的基因首先由RNA聚合酶II转录出长达7000 nt的初始转录子(pri-miRNA),核酸内切酶Drosha将pri-miRNA处理成约70-80 nt的发夹状miRNA前体(pre-miRNA); pre-miRNA由转运蛋白exportin-5运输到胞质,被另一种核酸内切酶Dicer剪切成约22 nt的双链miRNA;双链miRNA被解旋酶(Helicase)解螺旋后,一条链被降解,另一条成为成熟miRNA(Mature miRNA)。在胞质内,miRNA进入miRNA诱导的基因沉默复合物(miRISC)通过碱基互补配对与靶mRNA结合。如果完全互补或基本完全互补,则裂解靶基因;如果不完全互补,则抑制靶基因的蛋白翻译。

为代表,而let-7则兼有两种机制。miRISC是一种核糖蛋白复合体(ribonucleoprotein complex, miRNP),蛋白成分主要是Ago家族,可介导miRNA 5'端第2-8核苷酸与mRNA 3'非翻译区(UTR)部分序列的结合。miRNA靠近5'端有一个与互补链不匹配的突起,这个突起显著的减弱了双链结构5'端稳定性。成熟miRNA总是趋向于选择双链中5'端相对更不稳定的序列,所以只有一条成熟的miRNA最终能结合到RISC中。另外,miRNA在靶mRNA识别过程中,miRNA 5'端的2-8 nt在与靶mRNA的结合中比3'端序列更为重要,被称为种子区(seed region)^[8],这也可能与5'端的突起有关。在极少的情况下,miRNA和互补链具有相似的稳定性,其分别结合到miRISC上的概率也相似。

miRNA及siRNA的这种沉默靶基因的理论目前受到了挑战。Li *et al*^[12]针对抑癌基因E-cadherin的启动子,设计出一系列含有21 nt的双链RNA(dsRNA),其中两种dsRNA(dsEcad-302和dsEcad-215)转染到两种人前列腺癌细胞株PC-3和DU-145,48 h后发现E-cadherin的mRNA和蛋白表达开始增加,转染3 d后细胞的活性逐渐降低;而相应的空白组及对照组E-cadherin表达及细胞活性均无变化。在PC-3细胞中单独用dsEcad-215转染,转然后10 d和13 d E-cadherin的表达仍升高14倍和3.8倍。同样针对p21、VEGF启动子分别设计的dsRNAs转染至PC-3、HeLa、MCF-7三种肿瘤细胞后,发现p21、VEGF的表

达有着不同程度的增加. 在进一步探究dsRNAs作用机制时, 发现dsRNAs对靶基因的正调控作用需要Ago 2蛋白的参与及H3K9的去甲基化. 最近的研究^[13]发现let-7及合成的miRcxcr4在细胞生长停滞时上调靶mRNA的表达, 而在增殖的细胞中抑制靶基因的表达, 认为在细胞周期中, miRNP对靶基因翻译的调控作用往返于抑制和激活之间. 这些研究颠覆了人们以往认为miRNA对基因仅负调控的观点, 为miRNA作用及作用机制的进一步研究开辟了一条新的道路. 但miRNA正调控靶基因的机制远不如负调控清楚, 还需更深入的研究. 有学者认为miRNA调节比蛋白水平的调节节省能量, 效果更快而且可逆, 大多数miRNA对靶基因起着微调作用, 少数miRNA调节可引起表型的明显改变. 不同组织或细胞在不同阶段表达不同的miRNA谱. 一个miRNA可调节数百个靶基因包括转录因子、细胞因子和受体等, miRNA和靶基因组成复杂的调节网络^[2].

1.3 miRNA的研究方法 针对miRNA研究的技术和方法可概括为两类: 即实验生物学方法和生物信息学方法, 前者的代表是发展了检测miRNA前体和成熟miRNA表达的实时荧光定量PCR(RT-PCR), 基因芯片(microarray)、锁定的核苷酸原位杂交(LNA-ISH)、基于珠流的流式细胞术(bead-based flow cytometry)以及小RNA的体外抑制和过表达技术; 后者的代表是发展了数个成熟的miRNA基因预测软件^[14-16](如miRseeker、MirScan、PalGrade、ProMiR、miRAlign)和miRNA靶基因预测软件^[17-21](如TargetScan、miRand、PicTa、miRNAPath、miRNAMap2.0)等. 数个功能得到成功诠释的小RNA分子(如miR-375和miR-223等^[22-23])均是两种方法完美结合的研究典范, 两者各有优势, 互为补充. 生物信息学为小RNA研究提供了有益的线索, 可以指导实验的进行, 但仍需通过实验方法加以确认, 而实验生物学虽然在研究对象的选择上受到约束, 不能很快对大量候选者进行逐个验证, 却能提供直接而有力的证据.

1.4 miRNA在生物生命活动过程中的调控作用 目前研究表明动物中miRNA参与生命过程中一系列的重要进程, 包括早期胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡以及在基因表达调控中的作用. 最经典的lin-4在线虫幼虫的第一、二期积累, 通过抑制靶基因lin-14和lin-28的翻译, 引发其进入第三幼虫期^[6]; 而存在于线虫幼虫第三、

四期的let-7通过抑制lin-41和hbl-1的转录, 引导线虫从幼虫向成虫的转变^[24-25]. Brennecke *et al*^[26]在果蝇体内鉴定出第一个与增殖相关的miRNA基因bantam及其靶基因hid, Bantam与hid mRNA的3'UTR互补结合, 阻止了hid的翻译, 抑制蛋白的表达, 最终表现为促进细胞增殖的作用. miR-1与血管生成^[27], miR-181与血细胞生成^[28], miR-430与神经发生^[29]等都得到了证实. 近年来, 发现miRNA与肿瘤的发生、发展密切相关^[1-3,30]. 研究表明miR-15、miR-16与慢性淋巴细胞性白血病^[31-32], miR-155、let-7与肺腺癌^[33-34], miR-10b、miR-27a与乳腺癌^[35-37], miR-21与多形性恶性胶质瘤、胃癌、结肠癌、乳腺癌、胰腺癌等^[38-39]均存在高度的相关性, 虽然详细机制还有待于进一步阐明, 但强烈提示miRNA在肿瘤研究领域有广阔前景.

2 miRNA与肝癌及HBV的相关研究

在我国乙型肝炎病毒(HBV)相关性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发病率、死亡率均排名于疾病谱前列, 严重危害人民健康^[40-42]. 近年来, 国内外对miRNA在肝癌发生发展中的调控作用进行了初步的研究.

2.1 肝癌组织与肝癌细胞系的miRNA表达 日本学者Murakami *et al*^[43]利用芯片技术对24例肝癌组织(HCC)、22例肝癌周边正常组织(NT)及9例慢性肝炎(CH)细针穿刺肝组织的miRNA表达谱进行分析发现, HCC与NT间表达有差异的miRNA有30个($P<0.01$). 其中, 相对于NT, HCC表达明显上调的有3个: miR-18、pre-miR-18、miR-224, HCC表达明显下调的有5种: miR-199a-3p、miR-195、miR-199a、miR-200a、miR-125a($P<0.001$). 该研究并指出与肝癌分化程度相关的miRNA有4个: miR-92、miR-20、miR-18、pre-miR-18, 他们的表达水平在分化差的HCC中最高, 在分化良好的HCC中最低; 而miR-99a的表达水平与分化程度呈正相关. 可见, miR-18与pre-miR-18在肝癌的发生和失分化中均扮演了一定的角色. 另外, 他们对其中的14例肝硬化(LC)和12例CH标本(22例NT中有14例LC, 3例CH, 5例无病理信息)分析发现miRNA表达谱存在显著差异($P<0.01$)的有12个(LC>CH: miR-28, miR-342, miR-126, miR-199a, miR-145b, miR-143, miR-368, pre-miR-372; LC<CH: miR-182, pre-miR-199b, miR-224, miR-15b). 但是, 对24例HCC的病因学(6例乙肝, 17例丙肝, 1

■创新盘点

本文针对我国HBV相关性肝癌发病高, 危害大的状况, 主要介绍了在miRNA研究领域肝癌及HBV感染的研究. 虽然目前国内外学者在这方面做了大量的工作, 但仍有大量的问题等待更多更深的研究去解答. 将HBV、肝癌与miRNA结合起来考虑是本文的一个创新.

■应用要点

本文在着重介绍miRNA与肝癌的关系之外,还简要介绍了miRNA的一些基本知识及研究方法,为读者提供全面完整的信息,更利于理解具体的研究论文。同时,对数个独立研究的总结分析,提出一些可能在HBV相关性肝癌中具有研究前景的miRNA。

例不祥)分析发现,HBV与HCV感染的肝癌组织miRNA表达谱无统计学差异。

国内孙凯 *et al*^[44]运用含114个miRNA的液相芯片及Luminex100检测系统对20对HCC及NT组织进行分析,结果miRNA表达谱中表达差异的有28个(上调6个,下调22个);全部标本中共存性差异表达miRNA有9个,其中上调2个:miR-222、miR-224,下调7个:miR-122a、miR-143、miR-145、miR-195、miR-199a、miR-199a-3p、miR-200a($P<0.01$)。并选取表达上调的miR-222及其预测靶基因CTGF(结缔组织生长因子)在2例标本中行RT-PCR及Western blot验证,发现CTGF的mRNA水平在HCC与NT组织中无差异,而蛋白水平在HCC中明显下降。提示miR-222通过转录后基因沉默机制抑制CTGF的蛋白表达,从而促进癌的浸润和转移。上述Murakami *et al*^[43]与孙氏的实验有多个miRNA表达一致如:上调的miR-224,下调的miR-195、miR-199a、miR-199a-3p、miR-200a。对这些在不同实验中表达一致的miRNA更应引起研究者的注意,同时也应认识到miRNA芯片的结果只是一个初步筛查,对筛选出的miRNA需要通过进一步的实验验证才有意义。

LIN28^[6]是线虫发育时序过程中的一个关键基因,Guo *et al*^[45]发现LIN28的同源基因LIN28B高表达于正常睾丸、胎肝、胚胎、临床肝癌组织以及6个肝癌细胞系(Huh7、HepG2、Alex、HLE、Huh6、Hep3B)中,外源性导入LIN28B可以促进肝癌细胞的增生,并推断LIN28B可能通过其3'非编码区与let-7互补结合而接受后者的调控,从而在细胞的生长和肿瘤的形成中发挥重要作用。

美国学者Kutay *et al*^[46]利用含245种miRNAs的芯片分析叶酸、甲基、胆碱缺乏性大鼠肝肿瘤(FMD)模型与正常鼠肝的miRNA差异表达,发现在癌组织中有23种miRNA表达上调,3种下调。其中在3例肿瘤组织中均升高达两倍及以上的有9种:miR-101b-2、-130、-130a、-172a-2、-219-1、-23a、-23b、-24、-328-1;在3例肿瘤组织中均降低一半的仅有miR-122,而miR-123与miR-235只在2例中降低。同时,对20例人肝癌组织测定表明,相对于癌周肝组织,有10例miR-122明显下降。在人和鼠的多个肝癌细胞系(HepG2、Hep3B、H-7;Hepa、H4)中,miR-122检测不到或表达极低。有研究表明miR-122作为

一个调节肝脏发育的“肝特异性miRNA”,在肝脏的发育、分化及维持肝脏正常功能中发挥重要的作用。在受精卵置入后12.5 d的小鼠即可检测到miR-122表达,其表达水平在出生前达到平台期,出生后以一种相当缓慢的方式升高,而应用反义寡聚核苷酸使miR-122失活后,出现肝脏功能受损,胆固醇合成降低,提示miR-122不仅参与肝脏分化的调节,还在维持肝脏正常功能中起着重要作用^[47]。miR-122也可以与丙肝病毒基因组相互作用调节丙肝病毒的表达,当miR-122被灭活,丙肝病毒复制水平明显降低^[48]。但在乙肝相关肝癌中miR-122的作用尚未见报道。

在Gramantieri *et al*^[49]的研究中,利用含有381种人类miRNA的芯片检测17例HCC和21例肝硬化肝组织(CL)标本,发现35种miRNA表达有统计学差异($P<0.05$)。相对于CL,miR-221在83%HCC中上调,let-7a-1、miR-122a在70%HCC中下调,Northern blot及RT-PCR进一步验证以上结果。通过TargetScan和PicTar软件分析Cyclin G1是miR-122a的一个作用靶点;在肝癌细胞系Hep3B、SNU449中,miR-122a用Northern blot不能检出,Cyclin G1蛋白用Western blot检测高表达。Cyclin G1与基因组的不稳定性相关^[50],在乳腺癌、结肠癌、平滑肌瘤组织中Cyclin G1蛋白高表达^[51-53]。因而miR-122a调控Cyclin G1功能的缺失可能在HCC发生与进展中具有重要作用。

*Gastroenterology*的一篇文章^[54]则阐述了miR-21通过下调抑癌基因PTEN(phosphatase and tensin homolog)促进肝癌的增生、迁移和侵袭;在肝癌细胞系中抑制miR-21,PTEN表达增加,则减少肿瘤细胞的增生、迁移和侵袭;将miR-21前体(pre-miR-21)转染在正常肝细胞中,可以观察到转染细胞的迁移能力增强。该研究也利用芯片技术证实了在人肝癌组织中miR-21显著高表达。

Pogribny *et al*^[55]使用致鼠肝癌剂tamoxifen喂食大鼠,诱导其发生肝癌,12 wk及24 wk后检测鼠肝中的miRNA表达谱,发现相对于对照组,喂食tamoxifen组有33个(20个上调,13个下调)在人、大鼠、小鼠中序列保守的miRNA表达异常($P<0.05$)。一些被认为具有癌基因作用的miRNA如:miR-16、-17-5p、-20a、-20b、-106a、-34等有明显上调($P<0.001$),并确认这些miRNA的相应靶基因如Bcl2、E2F1、RB1、NOTCH1的蛋

白表达下调($P<0.05$), 而上述蛋白在细胞周期调节、凋亡、DNA复制、染色质修饰以及肿瘤发生过程中发挥作用; 其他检测到上调的miRNA有miR-18、-199b、-193、-31、-345、-365、-375、-424、-92、-25、-362、-93、-324-5p、-15a, 下调的有miR-195、-422b、-152、-28、-191、-350、-361、-22-3p、-27a、-378、-203、-192、-194, 并认为miRNA的异常表达发生于肿瘤形成的早期阶段, 可以作为肿瘤形成过程的生物标志。

国内学者^[56]对59个相关miRNA进行分析, 发现在96例肝癌组织中3个miRNA有4处序列变异, 其中miR-106b存在2处已被鉴定的单核苷酸多态性(SNP), miR-192和let-7a-2各存在1处未报道过的变异。并且在癌旁组织中也发现相同变异, 提示这些变异可能是种系变异或自然的多态现象。而在8种肝癌细胞株中, 未发现miRNA的序列变异。故作者认为miRNA的变异在肝癌中少见, 不能认为是肝癌发生的一个主要机制。

2.2 HepG2.2.15与HepG2的miRNA表达 国内学者刘妍 *et al*^[57]利用人肝母细胞瘤细胞系HepG2及其转染HBV基因组的HepG2.2.15细胞的microRNA的表达谱差异来研究肝细胞中HBV复制的生物学机制, 结果显示HepG2.2.15细胞与HepG2细胞间差异表达的miRNA共27种(占5.3%), 按照HepG2.2.15与HepG2中表达强度排列, 其中表达上调的有7种(miR-181a、-196b、-181c、181d、-483、-183、-429), 表达下调的有20种(miR-129-3p、-15a、-195、-422b、-16、pre-miR-131、-15b、-523、-338、-516-3b、-422a、-520b、-212、-520c、-17-3p、-7、-202、-501、-198、pre-miR-166)。其中, 本实验miR-195的低表达与Murakami *et al*^[43]和孙凯 *et al*^[44]的研究中miR-195的低表达提示我们, miR-195的下调可能在HBV相关性肝癌的发生发展中起到重要的作用, 具体机制还需要进一步的研究。

2.3 miRNA与HBV的关系 病毒是一种极小的寄生生物, 只能依赖宿主细胞进行复制、转录、翻译以维持其生存, 但其复制等过程中可能会造成宿主细胞基因表达水平的改变。考虑到miRNA在基因表达调控中所起到的重要作用, 病毒这种只具有有限基因编码能力的生物同样可能利用miRNA调节宿主或自身某些基因的表达。2004年Pfeffer *et al*^[58]报道在EB病毒(Epstein-

Bar Virus)基因组中发现了5个miRNA, 这是首次发现病毒编码miRNA。到目前为止, 通过在病毒感染的细胞中利用cDNA克隆和生物信息学方法, 在疱疹病毒(herpesvirus)^[59-64]、多瘤病毒(polyomaviruses)^[65]、腺病毒(adenoviruses)^[66]以及逆转录病毒(retro-viruses)^[67]中发现上百个miRNA。其中, 在HCV和HIV等慢性病毒感染中, miRNA的重要作用已得到证实^[48,68-70]。有学者^[71]利用生物信息学技术, 从HBV基因组中仅找到了一个候选的病毒编码pre-miRNA, 推断其成熟miRNA序列为: CAUGUCCUACUGUUCAAGC-CUC; 但通过分析, 在人类基因组中没有找到潜在靶基因, 而在HBV病毒基因组中却找到了三个作用靶点。这提示我们HBV编码的miRNA可能通过调节自身mRNA的表达发挥病理生理作用, 但尚未见相关实验结果证实及报道。在病毒感染性疾病中, 宿主细胞中的miRNA可能在病毒生命活动周期中起着重要作用, 而病毒自身为了在宿主细胞中成功存活, 也必定会反过来调节宿主细胞miRNA的表达, 从而参与炎症、肿瘤等疾病的发生发展^[72]。

3 结论

miRNA作为一类内源性非编码的小RNAs, 通过与靶基因序列特异性相互作用, 在转录或翻译水平调节相关基因表达, 参与发育、增殖、分化、凋亡等多种生物学过程^[4-5]。与肿瘤相关的miRNA的研究是近年的研究热点^[1-3], 在白血病^[30-32]、肺癌^[33-35]、乳腺癌^[36-37]、肝癌^[38-39]等肿瘤中均证实有特定miRNA的异常表达。目前对肝细胞性肝癌的研究中已发现若干miRNA, 如miRNA-122^[43-44]、-21^[45-46]、-195^[47-48]、-18^[49]、-199a^[54-55]等的异常表达与之有关。在病毒感染性疾病中^[58-59], 宿主细胞中的miRNA可能在病毒生命活动周期中起着重要作用^[60-62], 而病毒自身为了在宿主细胞中成功存活, 也可能反过来调节宿主细胞miRNA的表达^[63-65], 从而参与炎症、肿瘤等疾病的发生发展^[66-70,72]。目前研究表明, 表达HBV的HepG2.2.15细胞株与不表达HBV的肝癌细胞株HepG2相比, 两者的若干miRNA表达水平存在显著差异^[57]。生物信息学提示^[71], HBV可以编码miRNA, 并且该miRNA能调节乙肝病毒自身的基因表达, 但尚需实验证实。乙肝相关性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 发病率、死亡率均排名于疾病谱前列^[40-42]。针对我国乙肝患者多的国情, 对该类人群开展miRNA相

同行评价

本文反映了MicroRNA与肝癌发生发展间关系的最新研究动态, 文笔流畅, 层次清楚, 是一篇较优秀的综述性文章。

关表达谱研究, 将为乙肝相关性肝癌的发生发展机制的研究提供一个新的方向。

4 参考文献

- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
- Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 4-9
- Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6: 60
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-858
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854
- Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 2005; 37: 766-770
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20
- Liu W, Mao SY, Zhu WY. Impact of tiny miRNAs on cancers. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 497-502
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 522-531
- Chen PY, Meister G. microRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biol Chem* 2005; 386: 1205-1218
- Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 17337-17342
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318: 1931-1934
- Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol* 2003; 4: R42
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D140-D144
- Doran J, Strauss WM. Bio-informatic trends for the determination of miRNA-target interactions in mammals. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 353-360
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-798
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2004; 2: e363
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005; 37: 495-500
- Chiromatzo AO, Oliveira TY, Pereira G, Costa AY, Montesco CA, Gras DE, Yosetake F, Vilar JB, Cervato M, Prado PR, Cardenas RG, Cerri R, Borges RL, Lemos RN, Alvarenga SM, Perallis VR, Pinheiro DG, Silva IT, Brandão RM, Cunha MA, Giuliani S, Silva WA Jr. miRNApath: a database of miRNAs, target genes and metabolic pathways. *Genet Mol Res* 2007; 6: 859-865
- Hsu SD, Chu CH, Tsou AP, Chen SJ, Chen HC, Hsu PW, Wong YH, Chen YH, Chen GH, Huang HD. miRNAmap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D165-D169
- Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432: 226-230
- Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni I. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005; 123: 819-831
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-906
- Lin SY, Johnson SM, Abraham M, Vella MC, Pasquinelli A, Gamberi C, Gottlieb E, Slack FJ. The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev Cell* 2003; 4: 639-650
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 2003; 113: 25-36
- Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets *Hand2* during cardiogenesis. *Nature* 2005; 436: 214-220
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303: 83-86
- Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, Hammond SM, Bartel DP, Schier AF. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 2005; 308: 833-838
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 11755-11760
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Alder H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-15529
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*

- 2006; 9: 189-198
- 34 Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 2007; 21: 1025-1030
- 35 Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-770
- 36 Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449: 682-688
- 37 Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, Safe S. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 11001-11011
- 38 Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 1351-1358
- 39 Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-2261
- 40 Merican I, Guan R, Amarapuka D, Alexander MJ, Chutaputti A, Chien RN, Hasnian SS, Leung N, Lesmana L, Phiet PH, Sjalfoellah Noer HM, Sollano J, Sun HS, Xu DZ. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 1356-1361
- 41 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma--cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 445-454
- 42 Luo RH, Zhao ZX, Zhou XY, Gao ZL, Yao JL. Risk factors for primary liver carcinoma in Chinese population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4431-4434
- 43 Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25: 2537-2545
- 44 孙凯, 黄晓卉, 甄茂川, 汪谦. 应用液相芯片分析肝细胞癌及癌旁组织小分子RNA表达谱差异. *中华实验外科学杂志* 2006; 23: 945-947
- 45 Guo Y, Chen Y, Ito H, Watanabe A, Ge X, Kodama T, Aburatani H. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene* 2006; 384: 51-61
- 46 Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* 2006; 99: 671-678
- 47 Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 2004; 1: 106-113
- 48 Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005; 309: 1577-1581
- 49 Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 6092-6099
- 50 Tanaka S, Diffley JF. Deregulated G1-cyclin expression induces genomic instability by preventing efficient pre-RC formation. *Genes Dev* 2002; 16: 2639-2649
- 51 Reimer CL, Borras AM, Kurdiani SK, Garreau JR, Chung M, Aaronson SA, Lee SW. Altered regulation of cyclin G in human breast cancer and its specific localization at replication foci in response to DNA damage in p53+/+ cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 11022-11029
- 52 Perez R, Wu N, Klipfel AA, Beart RW Jr. A better cell cycle target for gene therapy of colorectal cancer: cyclin G. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 884-889
- 53 Baek WK, Kim D, Jung N, Yi YW, Kim JM, Cha SD, Bae I, Cho CH. Increased expression of cyclin G1 in leiomyoma compared with normal myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 634-639
- 54 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647-658
- 55 Pogribny IP, Tryndyak VP, Boyko A, Rodriguez-Juarez R, Beland FA, Kovalchuk O. Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure. *Mutat Res* 2007; 619: 30-37
- 56 Yang J, Zhou F, Xu T, Deng H, Ge YY, Zhang C, Li J, Zhuang SM. Analysis of sequence variations in 59 microRNAs in hepatocellular carcinomas. *Mutat Res* 2008; 638: 205-209
- 57 刘妍, 张亮, 戴久增, 王琳, 赵建晴, 徐东平. 乙型肝炎病毒基因组转染HepG2细胞的microRNA表达研究. *解放军医学杂志* 2007; 32: 92-95
- 58 Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 2004; 304: 734-736
- 59 Cui C, Griffiths A, Li G, Silva LM, Kramer MF, Gaasterland T, Wang XJ, Coen DM. Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs. *J Virol* 2006; 80: 5499-5508
- 60 Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2005; 2: 269-276
- 61 Burnside J, Bernberg E, Anderson A, Lu C, Meyers BC, Green PJ, Jain N, Isaacs G, Morgan RW. Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the latency-associated transcript. *J Virol* 2006; 80: 8778-8786
- 62 Grey F, Antoniewicz A, Allen E, Saugstad J, McShea A, Carrington JC, Nelson J. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J Virol* 2005; 79: 12095-12099
- 63 Grundhoff A, Sullivan CS, Ganem D. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA* 2006; 12: 733-750
- 64 Cai X, Lu S, Zhang Z, Gonzalez CM, Damania B, Cullen BR. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

- expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 5570-5575
- 65 Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 2005; 435: 682-686
- 66 Sano M, Kato Y, Taira K. Sequence-specific interference by small RNAs derived from adenovirus VAI RNA. *FEBS Lett* 2006; 580: 1553-1564
- 67 Bennasser Y, Le SY, Yeung ML, Jeang KT. HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets. *Retrovirology* 2004; 1: 43
- 68 Appel N, Bartenschlager R. A novel function for a micro RNA: negative regulators can do positive for the hepatitis C virus. *Hepatology* 2006; 43: 612-625
- 69 Couturier JP, Root-Bernstein RS. HIV may produce inhibitory microRNAs (miRNAs) that block production of CD28, CD4 and some interleukins. *J Theor Biol* 2005; 235: 169-184
- 70 Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, Huang W, Squires K, Verlinghieri G, Zhang H. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med* 2007; 13: 1241-1247
- 71 Jin WB, Wu FL, Kong D, Guo AG. HBV-encoded microRNA candidate and its target. *Comput Biol Chem* 2007; 31: 124-126
- 72 Yeung ML, Bennasser Y, Jeang KT. miRNAs in the biology of cancers and viral infections. *Curr Med Chem* 2007; 14: 191-197

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号。

《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》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展。

从1993-2007《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。

《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能。

肝源性胰岛素抵抗的研究进展

黄涛, 秦波

黄涛, 秦波, 重庆医科大学附属第二医院感染科 重庆市 400010

作者贡献分布: 黄涛与秦波对此文所作贡献均等; 此课题由黄涛、秦波设计; 写作由黄涛完成; 秦波负责校对。

通讯作者: 秦波, 400010, 重庆市, 重庆医科大学附属第二医院感染科. cqjinbo@126.com

电话: 023-63693327

收稿日期: 2007-10-22 修回日期: 2008-02-04

Progress in hepatogenous insulin-resistance

Tao Huang, Bo Qin

Tao Huang, Bo Qin, Department of Infectious Diseases, the Second Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Correspondence to: Bo Qin, Department of Infectious Diseases, the Second Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China. cqjinbo@126.com

Received: 2007-10-22 Revised: 2008-02-04

Abstract

Chronic liver disease and insulin resistance are in close correlation and promote each other, which has been studied a lot in its field. In this article, we review the new progress in viral hepatitis, hepatic cirrhosis, hepatoma related to insulin resistance.

Key Words: Viral hepatitis; Hepatic cirrhosis; Hepatoma; Insulin resistance

Huang T, Qin B. Progress in hepatogenous insulin-resistance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 653-657

摘要

慢性肝病与胰岛素抵抗紧密相关, 互相促进, 已经成为近年来研究的热点, 本文就病毒性肝炎、肝硬化、肝癌等在胰岛素抵抗方面的新进展作一综述。

关键词: 病毒性肝炎; 肝硬化; 肝癌; 胰岛素抵抗

黄涛, 秦波. 肝源性胰岛素抵抗的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 653-657

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/653.asp>

www.wjgnet.com

0 引言

肝脏是葡萄糖代谢的主要器官^[1-3], 肝脏功能受损往往影响正常的糖代谢, 甚至可出现糖耐量减退或糖尿病, 这种继发于慢性肝功能损害的糖尿病统称为肝源性糖尿病^[4]. 资料显示, 约有50%-80%的慢性肝病患者存在糖耐量异常, 糖尿病比率可达10%-20%, 其中慢性病毒性肝炎继发糖尿病的发生率达17.5%^[5]. 而正常人群糖尿病发生率仅为0.6%. 在肝源性糖尿病的发病机制中胰岛素抵抗可能是最重要的因素, 胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指胰岛素(insulin, INS)分泌量在正常水平时刺激靶细胞摄取和利用葡萄糖的生理效应显著减弱, 或者是靶细胞维持摄取、利用葡萄糖的正常生理效应需要超常量的INS, 并且常与高胰岛素血症并存. 大量临床实验研究表明病毒性肝炎、脂肪肝、肝炎后肝硬化等与胰岛素抵抗有密切联系, 现就近几年两者之间关系的研究进展综述如下。

1 病毒性肝炎与胰岛素抵抗

1.1 乙型肝炎 近年来研究表明, 肝脏和胰腺有着相似的组织结构和胚胎起源. 肝炎病毒除损害肝脏外, 对胰腺也有直接损害和亲和力, 免疫复合物的沉积, 破坏胰岛β细胞的分泌功能, 致血糖升高, 从而引起胰岛素抵抗。

乙型肝炎病毒(HBV)是一种亲肝而又具有泛嗜性的病毒. 1981年Shimoda首先在血清HBsAg阳性的尸检胰腺组织中检出HBV DNA. 此后, 随着核酸分子杂交技术的不断进步, 在动物和尸检的肝外组织中不断检出HBV DNA. 陆立 *et al*^[6]在对12例乙型肝炎后肝硬化患者胰腺组织切片电镜下观察发现胰岛滤泡细胞α和β细胞均有所改变, 并伴有病毒颗粒存在, 提示DNA阳性可能会导致胰岛β细胞不能分泌成熟胰岛素, 而分泌更多的“假性胰岛素”, 同时乙型肝炎病毒感染导致机体免疫紊乱引起自身免疫性胰岛炎而所诱发产生的两种针对胰岛细胞及其细胞成分的自身免疫抗体即谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)和胰岛细胞抗体(ICA), 使β细胞功能受

■背景资料

近年来, 研究资料显示慢性肝病与糖尿病发病密切相关, 而胰岛素抵抗(IR)可能是发病机制的中心环节. 其中肝炎病毒感染胰岛抵抗的发病机制, 对治疗的影响已经引起广大学者关注. IR在HCV和HBV感染中的作用、影响和机制还不清楚, 有待深入研究. 而肝硬化以及非酒精性脂肪肝与胰岛素抵抗之间联系的研究相对全面. 近年来对由肝衰竭、肝癌并发胰岛素抵抗而引起的糖源性肝衰竭导致患者的死亡引起了许多学者的重视。

■同行评议者

龚国忠, 教授, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心

■研究前沿

慢性乙型和丙型肝炎病毒并发胰岛素抵抗已经引起相关专家的重视。病毒直接作用、炎症因子释放、脂肪代谢异常以及胰岛素信号转导障碍可能是导致IR的重要原因。而且IR还可促进肝病进展,并与病毒应答率相关,值得深入研究和探讨两者之间的机制。

损,β细胞胰岛素信号转导障碍,胰岛素分泌相对减少,导致葡萄糖的产生增多、利用下降,同时脂解作用增强,从而使血糖和血游离脂肪酸轻度的升高。升高的血糖和游离脂肪酸又会反馈作用于β细胞和外周其他靶组织,导致更强的胰岛素抵抗和β细胞功能障碍,形成恶性循环^[7]。

1.2 丙型肝炎 近年来研究发现丙型肝炎病毒(HCV)感染可能是独立于慢性肝病之外的糖尿病发展的附加危险因素^[8-9]。经过纵向研究证实,IR在糖尿病发病前10-20年就可能出现,他是糖尿病是否发生的最好预测因素。大量临床试验研究表明慢性丙型肝炎在未发展成肝硬化以前与健康对照组及慢性乙型肝炎组相比即存在明显的高胰岛素血症和IR。但是丙型肝炎病毒如何导致IR其机制尚不明确,目前认为两者的相关性主要有以下几点:

1.2.1 HCV的肝外复制: HCV也可在肝外如胰腺组织复制,可以造成胰腺组织及胰岛细胞破坏,导致β细胞功能降低, HCV感染可导致与病毒相关的自身免疫,造成交叉免疫反应,也会导致胰岛细胞破坏,β细胞功能降低,由于β细胞功能降低,使其在高血糖时分泌胰岛素功能下降,从而导致胰岛素抵抗。Masini *et al*^[10]已在HCV阳性伴随有形态学改变和体外糖刺激胰岛素反应减弱的患者的胰岛β细胞中发现有病毒样颗粒。

1.2.2 HCV铁沉积与IR: Valenti *et al*^[11]发现20%的丙型肝炎病毒感染的患者存在铁蛋白和(或)转铁蛋白饱和度的增高,而更多的患者则有肝脏铁沉积。肝脏铁含量的增加可能同时伴有胰腺铁沉积增多,使胰腺外分泌功能降低,影响胰岛素的分泌。同时也可能干扰肝内胰岛素的清除、下调胰岛素受体及其作用从而导致IR。

1.2.3 HCV与SOCS-3: 胰岛素与胰岛素受体结合后,胰岛素受体发生自身磷酸化而使胰岛素受体具有酪氨酸激酶的活性,引起胰岛素受体底物(IRS)磷酸化,由此把胰岛素信号逐级传递下去。IRS以IRS-1和IRS-2在胰岛素调节代谢的信号转导中的作用最重要。Kawaguchi *et al*^[12]研究发现丙型肝炎病毒核心诱导生成的SOCS-3(suppressor of cytokine signaling-3)通过蛋白化作用促进IRS-1、2蛋白体的降解,使IRS-1、2表达下调,抑制胰岛素信号的转导,而导致胰岛素抵抗。

1.2.4 TNF-α与IR: 许多文献报道丙型肝炎病毒感染的患者血清中细胞因子(如TNF-α)有较高水平^[13],研究发现丙型肝炎病毒感染的患者血清TNF-α及

其受体都显著升高^[14],此外在非糖尿病的丙肝患者的肝脏活检标本中显示肝胰岛素信号转导通路有显著的损害^[15],这与TNF-α作用效应极为相似^[16]。Shintani *et al*^[17]通过对感染了丙型肝炎核心基因的小鼠模型的研究发现,肿瘤坏死因子可以干扰胰岛素受体底物-1的酪氨酸磷酸化,也可能是引起胰岛素抵抗的原因之一。目前文献表明TNF-α导致胰岛素抵抗的机制有:(1)TNF-α抑制脂肪细胞中胰岛素受体及其底物的酪氨酸磷酸化^[16];(2)TNF-α促进脂解作用,增加血清中游离脂肪酸的浓度,导致肌肉和肝脏的胰岛素抵抗^[18];(3)TNF-α下调脂肪细胞编码蛋白如IRS-1、GLUT-4、PPAR-α的基因表达^[19];(4)TNF-α通过直接的毒性作用或通过引起β细胞的胰岛素抵抗来干扰胰岛β细胞功能^[18]。

1.2.5 HCV脂肪变与IR: 丙型肝炎病毒可直接导致脂肪肝变^[20],尤其是丙型肝炎病毒基因3型^[21],并且脂肪变的严重程度与丙型肝炎病毒的复制和HCV核心蛋白的表达相关。肝脏脂肪沉积也可导致胰岛素抵抗。但目前也有学者认为胰岛素抵抗是感染丙型肝炎病毒(HCV)患者发生脂肪变性的原因,而不是其结果。

1.2.6 HCV抗病毒治疗与IR: 目前许多研究发现感染HCV的患者经过抗病毒(干扰素加利巴韦林)治疗后,胰岛素抵抗得到明显的改善,提示对于这部分患者早期诊断和治疗IR不仅能够减轻病毒的复制而且还能够阻止病程进展以及增加干扰素加利巴韦林抗病毒治疗的持续病毒学应答率^[22]。

1.2.7 HCV基因型与IR: Pazienza *et al*^[23]通过分子生物学和生物化学技术在人肝癌细胞系(Huh-7)细胞里短暂表达HCV基因型3a或1b的核心蛋白来测量IRS-1和IRS-2的表达水平以及胰岛素信号转导通路中的其他因子。发现IRS-1的表达水平明显降低,而IRS-2表达水平无明显变化。其机制可能是基因3a型的HCV核心蛋白通过下调过氧化物酶增生物激活受体和上调SOCS-7(suppressor of cytokine signaling-7)促进IRS-1降解,而基因1b型的HCV核心蛋白则是通过激活哺乳类霉帕霉素靶分子(mammalian target of rapamycin mTOR)促IRS-1降解。提示3a或1b的HCV核心蛋白通过基因型特异机制下调IRS-1阻碍胰岛素信号转导导致胰岛素抵抗。

1.2.8 HCV与胰岛素信号转导通路: Aytug *et al*^[24]发现感染丙型肝炎病毒可以导致IRS-1和胰岛素受体后缺陷,肝脏的IRS-1酪氨酸磷酸化作用

和PI3激酶的联合或活化的胰岛素信号缺失,导致胰岛素抵抗。

总之,丙型肝炎促进胰岛素抵抗而后者以一种基因依赖的方式诱导干扰素抵抗,脂肪变和肝纤维化进展^[25]。

2 肝炎后肝硬化与胰岛素抵抗

许多临床试验研究都发现肝炎后肝硬化患者存在着糖代谢的异常,这种异常表现为葡萄糖耐量减低^[26], Kim *et al*^[27]发现肝硬化导致的胰岛素抵抗的程度明显高于其他2型糖尿病引起的胰岛素抵抗,造成这种异常的原因并不是由于胰岛素分泌不足,相反肝硬化患者胰岛素处于高水平状态,但胰岛素的敏感性却明显下降,存在着肝性胰岛素降解受损。其机制可能是:肝硬化时降解胰岛素减少对胰高血糖素、生长激素、儿茶酚胺、生长抑素等升高血糖的激素灭活作用减弱,降解减少,再加之肝内分流或侧支循环的形成,使上述激素在血中浓度升高,诱使胰岛素代偿性分泌增高;也可能此时肝脏葡萄糖转运蛋白(GLUT1和GLUT4)的减少,更加重肝硬化高胰岛素血症,导致胰岛素抵抗。同时肝炎后肝硬化肝细胞内质网超微结构异常改变,影响受体装配,受体成熟障碍,导致肝细胞膜上胰岛素受体数目减少^[28],受体与胰岛素的亲和力减低,以及受体后水平的一些关键酶的缺陷而发生肝源性糖尿病。近几年有学者提出门一腔静脉分流“逃逸”学说即门一腔静脉侧支循环的建立使体内多种物质都不必经过肝脏的代谢而直接进入体循环。首先,口服糖类可直接进入体循环,肝对葡萄糖的摄取率降低,出现葡萄糖“逃逸现象”,发生餐后高血糖;其次,侧支循环开放使胰岛素不通过肝脏直接进入体循环,影响了胰岛素的灭活途径,易出现高胰岛素血症;再次,血液中的胰岛素拮抗物质如胰高血糖素、糖皮质激素、生长激素及游离脂肪酸不必经肝脏清除,加重了胰岛素抵抗。

3 非酒精性脂肪肝(NAFD)与胰岛素抵抗

NAFLD疾病谱包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝硬化3种主要类型。目前认为脂代谢异常尤其是甘油三酯(TG)与IR所引发的高游离脂肪酸(FFA)、高胰岛素血症是NAFLD发病机制的中心环节^[29]。其中胰岛素抵抗是NAFLD发生的关键因素^[30]可通过抑制脂质氧化及提高脂肪酸和甘油三酯的合成等众多途径导致肝脏

脂肪变而不是肝脏纤维化^[31]而诱发NAFLD,研究发现脂联素水平的降低与胰岛素敏感性密切相关,血浆脂联素水平的降低在NAFLD的发病机制和胰岛素抵抗中起了重要的作用^[32]。有研究表明NAFLD患者脂联素水平降低,且与肝组织脂肪变性程度呈负相关^[33],并且脂肪组织脂联素基因mRNA表达与胰岛素抵抗指数呈负相关,说明NAFLD患者的胰岛素抵抗与脂肪组织脂联素基因mRNA表达下降有关,提示如果给予外源性脂联素可能是治疗胰岛素抵抗相关的NAFLD等代谢综合症的有效手段。同时脂肪因子^[34]、游离脂肪酸^[34]、瘦素^[35]、抵抗素^[36]等也是NAFLD发生胰岛素抵抗的致病因素。Duseja *et al*^[37]建议采用胰岛素耐量测验来评估NAFLD人群的胰岛素抵抗的程度以进行有效的临床干预和饮食控制。目前尚有学者提出胰岛素抵抗是NAFLD的致病因素而非结果,故目前两者之间的因果关系尚未完全阐明。

4 肝衰竭与胰岛素抵抗

肝衰竭患者极易并发细菌感染导致内毒素血症,而内毒素、细菌、病毒等促进炎症因子的产生而进一步加剧内毒素血症加重肝衰竭。内毒素血症早期除了升高血乳酸水平外,还可使肝脏与肌肉糖原合成和储存减少,引起胰岛素刺激的脂肪合成降低。同时内毒素可促进肌肉和肝脏基础葡萄糖摄取增强,但可使胰岛素刺激的葡萄糖摄取减少。表明内毒素可引起外周组织和肝脏对胰岛素的反应性降低,并且内毒素血症也可造成胰岛β细胞损伤和功能异常,这些都可能是肝衰竭时肝脏和肌肉胰岛素抵抗的重要机制。

5 肝癌与胰岛素抵抗

Yuan *et al*^[38]研究结果发现长期的胰岛素刺激Hep G₂细胞(人肝癌细胞)可以通过PI3K信号通路下调胰岛素的信号转导,使胰岛素信号转导受到抑制,导致胰岛素抵抗。此外,炎症因子NF-κB的瀑布效应可能也是肝癌导致胰岛素抵抗的原因之一,NF-κB是在B细胞中发现的结合于免疫球蛋白κ轻链增强子上的一种转导因子,能够与许多基因启动子区域的固定核苷酸序列结合而启动基因转录。近几年NF-κB在肝癌的发生发展中的作用引起了学者极大的兴趣,乙型肝炎病毒HBXAg可以通过ras-raf-map激酶通路激活NF-κB促使病毒复制和向恶性转变,抑制恶性细胞的凋亡,促进肝癌的发生发展^[39]。同时NF-κB可调控多种炎症因子如TNF-α、IL-6的过度表

■创新盘点

本文重点介绍肝炎病毒与胰岛素抵抗之间的相关性,总结近几年国内外对乙肝、丙肝与胰岛素抵抗的研究进展,使读者能更全面的了解肝炎病毒与胰岛素抵抗之间的关系,提出亟待解决的问题和指出下一步的研究方向。

■名词解释

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR): 是正常剂量的胰岛素产生低于正常生物学效应的一种状态,就是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄取和利用的效率下降,尤其是肌肉、脂肪组织对胰岛素不敏感,为维持血糖的稳定,机体代偿性分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症。

达,目前已有大量文献表明炎症因子与胰岛素抵抗有直接关系。活化后的NF- κ B可通过介导NO的合成及促进TNF- α 和IL-6的产生,而TNF- α 又可再激活NF- κ B产生级联瀑布效应使炎症反应扩大导致IR^[40]。

总之,慢性肝病可能与胰岛素抵抗互为因果,互相促进导致恶性循环。临床上两病合并较难治疗,但是经过正确的合理治疗、护理,可明显延缓病情的发展,也可大大降低病死率。病毒性肝炎患者经过正规的抗病毒治疗后胰岛素抵抗可以明显缓解甚至消失,这方面的进步有望为肝源性胰岛素抵抗治疗带来新的突破;今后亦可在慢性肝病抑制胰岛素信号转导机制方面进行进一步深入研究。

6 参考文献

- Picardi A, D'Avola D, Gentilucci UV, Galati G, Fiori E, Spataro S, Afeltra A. Diabetes in chronic liver disease: from old concepts to new evidence. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 274-283
- Roden M, Bernroider E. Hepatic glucose metabolism in humans—its role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 365-383
- Barthel A, Schmolli D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E685-E692
- Sibley SD, Palmer JP, Hirsch IB, Brunzell JD. Visceral obesity, hepatic lipase activity, and dyslipidemia in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3379-3384
- Kuriyama S, Miwa Y, Fukushima H, Nakamura H, Toda K, Shiraki M, Nagaki M, Yamamoto M, Tomita E, Moriwaki H. Prevalence of diabetes and incidence of angiopathy in patients with chronic viral liver disease. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40: 116-122
- 陆立, 时德仁, 周燕, 东传凌. 胰腺乙型肝炎病毒感染及其与糖尿病的关系. *临床军医杂志* 2001; 29: 71
- Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003; 46: 3-19
- Zein CO, Levy C, Basu A, Zein NN. Chronic hepatitis C and type II diabetes mellitus: a prospective cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 48-55
- Arao M, Murase K, Kusakabe A, Yoshioka K, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Tagaya T, Yamanouchi K, Ichimiya H, Sameshima Y, Kakumu S. Prevalence of diabetes mellitus in Japanese patients infected chronically with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2003; 38: 355-360
- Masini M, Campani D, Boggi U, Menicagli M, Funel N, Pollera M, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Torri S, Del Prato S, Mosca F, Filipponi F, Marchetti P. Hepatitis C virus infection and human pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes Care* 2005; 28: 940-941
- Valenti L, Pulixi EA, Arosio P, Cremonesi L, Biasotto G, Dongiovanni P, Maggioni M, Fargion S, Fracanzani AL. Relative contribution of iron genes, dysmetabolism and hepatitis C virus (HCV) in the pathogenesis of altered iron regulation in HCV chronic hepatitis. *Haematologica* 2007; 92: 1037-1042
- Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, Taniguchi E, Kumemura H, Hanada S, Maeyama M, Baba S, Koga H, Kumashiro R, Ueno T, Ogata H, Yoshimura A, Sata M. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 2004; 165: 1499-1508
- Elsammak M, Refai W, Elawaf A, Abdel-Fattah I, Abd Elatti E, Ghazal A. Elevated serum tumor necrosis factor alpha and ferritin may contribute to the insulin resistance found in HCV positive Egyptian patients. *Curr Med Res Opin* 2005; 21: 527-534
- Neuman MG, Benhamou JP, Bourliere M, Ibrahim A, Malkiewicz I, Asselah T, Martinot-Peignoux M, Shear NH, Katz GG, Akremi R, Benali S, Boyer N, Lecomte L, Le Breton V, Le Guldud G, Marcellin P. Serum tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta levels in chronic hepatitis C patients are immunomodulated by therapy. *Cytokine* 2002; 17: 108-117
- Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology* 2003; 38: 1384-1392
- Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 447-455
- Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004; 126: 840-848
- Greenberg AS, McDaniel ML. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2002; 32 Suppl 3: 24-34
- Ruan H, Hachohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 2002; 51: 1319-1336
- 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变性的机制及其意义. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 999-1003
- Bugianesi E, Marchesini G, Gentilecore E, Cua IH, Vanni E, Rizzetto M, George J. Fibrosis in genotype 3 chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease: Role of insulin resistance and hepatic steatosis. *Hepatology* 2006; 44: 1648-1655
- Parise ER, de Oliveira AC. Insulin resistance in chronic hepatitis C. *Arq Gastroenterol* 2007; 44: 178-184
- Pazienza V, Clement S, Pugnale P, Conzelman S, Foti M, Mangia A, Negro F. The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms. *Hepatology* 2007; 45: 1164-1171
- Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients

- with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology* 2003; 38: 1384-1392
- 25 Romero-Gomez M. Insulin resistance and hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7075-7080
- 26 Holstein A, Hinze S, Thiessen E, Plaschke A, Egberts EH. Clinical implications of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 677-681
- 27 Kim MG, Choi WC. Differential diagnosis of diabetes mellitus caused by liver cirrhosis and other type 2 diabetes mellitus. *Korean J Hepatol* 2006; 12: 524-529
- 28 时德仁, 陆立, 王建华, 东传凌, 从闻天. 肝硬变患者肝胰组织中HBV DNA的分布. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 751-754
- 29 Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 575-594
- 30 Duseja A, Murlidharan R, Bhansali A, Sharma S, Das A, Das R, Chawla Y. Assessment of insulin resistance and effect of metformin in nonalcoholic steatohepatitis--a preliminary report. *Indian J Gastroenterol* 2004; 23: 12-15
- 31 Sakurai M, Takamura T, Ota T, Ando H, Akahori H, Kaji K, Sasaki M, Nakanuma Y, Miura K, Kaneko S. Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2007; 42: 312-317
- 32 Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-118
- 33 Schneider JG, von Eynatten M, Schiekofer S, Nawroth PP, Dugi KA. Low plasma adiponectin levels are associated with increased hepatic lipase activity in vivo. *Diabetes Care* 2005; 28: 2181-2186
- 34 Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 2006; 119: S10-S16
- 35 Anderwald C, Muller G, Koca G, Fornsinn C, Waldhausl W, Roden M. Short-term leptin-dependent inhibition of hepatic gluconeogenesis is mediated by insulin receptor substrate-2. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1612-1628
- 36 Zhou L, Li Y, Xia T, Feng S, Chen X, Yang Z. Resistin overexpression impaired glucose tolerance in hepatocytes. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17: 189-195
- 37 Duseja A, Thumburu KK, Das A, Dhiman RK, Chawla YK, Bhadada S, Bhansali A. Insulin tolerance test is comparable to homeostasis model assessment for insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Indian J Gastroenterol* 2007; 26: 170-173
- 38 Yuan L, Ziegler R, Hamann A. Metformin modulates insulin post-receptor signaling transduction in chronically insulin-treated Hep G2 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 55-60
- 39 Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001; 82: 171-182
- 40 Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25: 4-7

■同行评价

本文行文流畅, 内容全面, 有一定的参考价值。

编辑 师忠芳 电编 郭海丽

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

●消息●

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价, 采用匿名方式. 通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿. 每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿). 文章等级评定: A级、B级、C级、D级、E级、不清楚. 其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚.

骨髓干细胞定向分化为肝样细胞的研究进展

刘志锋, 行治国, 丁亚楠, 陈强, 潘兴华

■背景资料

干细胞独特的生物学特性决定其具有广泛的应用价值, 骨髓干细胞成为近几年的研究热点, 被认为是治疗一些临床终末期疾病的新途径。

刘志锋, 行治国, 丁亚楠, 陈强, 潘兴华, 中国人民解放军成都军区昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心 昆明医学院昆明总医院临床学院 云南省昆明市 650032

作者贡献分布: 文献检索、资料分析和论文撰写主要由刘志锋、行治国、丁亚楠、陈强完成, 选题和审校由潘兴华完成。

通讯作者: 潘兴华, 650032, 云南省昆明市大观路212号, 中国人民解放军成都军区昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心, xinghuapan@yahoo.com.cn

电话: 0871-4774771

收稿日期: 2007-10-15 修回日期: 2008-02-02

Research progress in directional differentiation from bone marrow stem cells into hepatocyte-like cells

Zhi-Feng Liu, Zhi-Guo Xing, Ya-Nan Ding, Qiang Chen, Xing-Hua Pan

Zhi-Feng Liu, Zhi-Guo Xing, Ya-Nan Ding, Qiang Chen, Xing-Hua Pan, Research Center of Stem Cells, Tissue and Organ Engineering, Kunming General Hospital of Chengdu Military District of Chinese PLA, Clinical School of Kunming General Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Xing-Hua Pan, Research Center of Stem Cells, Tissue and Organ Engineering, Kunming General Hospital of Chengdu Military District of Chinese PLA, 212 Daguang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. xinghuapan@yahoo.com.cn

Received: 2007-10-15 Revised: 2008-02-02

Abstract

Recent researches indicate that bone marrow stem cells not only can differentiate into bone, cartilage, fat, muscle cells and various blood cells, but also can differentiate into cells of trans-germinal layer, such as ectoderm original neuronal cells, endoderm original hepatocytes, insular cells, under suitable microenvironment. It is called "plasticity" or "trans-differentiation". This paper reviews the research advances that bone marrow stem cell differentiation into hepatocyte-like cells and their clinical application in liver disease treatment.

Key Words: Bone marrow stem cells; Cell differentiation; Cell transplantation; Liver disease

Liu ZF, Xing ZG, Ding YN, Chen Q, Pan XH. Research progress in directional differentiation from bone marrow

stem cells into hepatocyte-like cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(6): 658-662

摘要

近年来研究表明, 在适宜的微环境下, 骨髓干细胞不但可以分化为骨、软骨、脂肪、肌细胞和各种血细胞, 而且还可以跨越胚层向外胚层起源的神经元细胞及内胚层起源的肝细胞、胰岛细胞等分化, 称为“可塑性(plasticity)”或“横向分化(trans-differentiation)”。本文就骨髓干细胞分化为肝样细胞及其临床治疗肝系疾病做一综述。

关键词: 骨髓干细胞; 细胞分化; 细胞移植; 肝病

刘志锋, 行治国, 丁亚楠, 陈强, 潘兴华. 骨髓干细胞定向分化为肝样细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 658-662

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/658.asp>

0 引言

目前, 终末期肝病的治疗十分棘手, 原位肝移植一直被认为是最理想的方法, 但由于其缺乏供体、手术风险大、费用昂贵、存在免疫排斥反应等因素限制了其广泛应用^[1-2]。近年来, 干细胞研究为利用干细胞移植治疗终末期肝病提供了新的思路。骨髓干细胞由于其可以跨越胚层横向分化为各种组织细胞^[3-20], 包括向肝样细胞分化, 并且具备取材方便、体外培养技术成熟等优点, 使其自体细胞移植在治疗终末期肝病方面更具广阔的应用前景, 备受广大研究者的青睐。

1 骨髓干细胞向肝样细胞分化

骨髓干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)是指骨髓起源的干细胞。主要有两种: 造血干细胞(hemopoietic stem cells, HSCs)和间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MSCs)。分化研究主要分体外和体内研究两个方面。

1.1 体外分化研究 骨髓干细胞体外分化研究主要集中在利用组合不同生长因子、使用不同

■同行评议者

唐晓鹏, 教授, 中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院感染科

的培养基、与肝细胞或肝非实质细胞共培养以及加入胆淤血清或肝衰竭患者血清等进行定向诱导。Oh *et al*^[21]从大鼠骨髓中分离到表达c-Met mRNA及癌胚抗原mRNA的细胞, 加入肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)诱导培养21 d后, 该细胞表达肝细胞特异性标记如细胞因子8(cytokeratin, CK8)和CK18。Lee *et al*^[22]在培养骨髓和脐血来源的MSCs时, 先加入表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF), 后加入烟酰胺、制瘤素M(oncostatin M, OSM)等进行诱导, 结果发现不同来源的MSCs均可分化为具有肝细胞功能的类肝样细胞。鲁学恒 *et al*^[23]和张瑞 *et al*^[24]利用组合不同生长因子进行诱导, 得出类似结果。应用不同培养基中也可以诱导出肝样细胞, Miyazaki *et al*^[25]在HGM培养基中加入HGF和EGF, 将骨髓中表达AFP和c-Met同时表达造血干细胞特异性标记CD34、Thy-1及c-kit等的细胞诱导分化为成熟肝细胞。Kang *et al*^[26]在低糖DMEM培养基中加入HGF和FGF-4, 可将大鼠骨髓MSCs分化为肝样细胞。骨髓干细胞与肝细胞或与肝组织液共培养方面也有一些研究。Inderbitzin *et al*^[27]从大鼠骨髓中分离出表达 β 2-微球蛋白-/Thy-1+的细胞亚群, 与肝细胞共培养, 结果发现该细胞亚群的氨代谢提高。Lange *et al*^[28]将大鼠的MSCs与鼠肝细胞共培养, 诱导2 wk后, RT-PCR检测发现有肝特异标记ALB和CK-18的RNA表达。Jang *et al*^[29]将雄性正常大鼠Fr25lin-PKH+HSC与雌性肝损伤大鼠的肝组织液共培养, 24 h后HSC表达肝转录因子(如AFP、GATA4)和成熟肝细胞标记(如CK18、ALB), FISH技术分析表明只有XYXY核型, 表明HSC参与受损肝脏的修复。另据实验表明, 利用肝病患者的血清进行诱导, 也取得相似结果。Yamazaki *et al*^[30]用5-氮杂胞苷处理小鼠骨髓细胞, 12 h后与肝脏非实质细胞共培养, 再用肝衰竭患者血清、OSM、HGF、地塞米松诱导2 wk, 发现肝样细胞集落表达肝细胞标志物。Cai *et al*^[31]研究发现含胆汁的血清也可以将骨髓MSCs诱导为肝细胞。张淑芹 *et al*^[32]将重型肝病患者血清与人骨髓MSCs共培养, 诱导后5 d、骨髓MSCs表现为肝细胞样细胞, 随着诱导培养时间的延长, 肝特异性标志物逐渐出现和成熟。AFP在7 d时表达水平最高, 培养14、21、28 d时表达逐渐减弱; Alb、CK-18和糖原随着诱导时间的延长, 表达逐渐增强。其他学者也做了相关研

究^[33-35], 都可以表明体外适宜条件可以促进骨髓干细胞向功能性肝样细胞分化。

1.2 体内分化研究 体内实验研究表明, 骨髓细胞或纯化后的骨髓干细胞可在体内转化为肝前体细胞或肝样细胞, 并能发挥肝细胞的部分功能。一些学者通过骨髓交叉移植方法证实动物肝脏中确实存在骨髓源性的成熟肝细胞^[36-39]。Lagasse *et al*^[40]将正常小鼠骨髓干细胞移植到延胡索酸乙酰乙酸羟化酶基因缺陷(fumarylacetoacetate hydrolase gene, FAH)小鼠体内, 发现肝功能明显改善, 分化的肝细胞具有正常功能。Avital *et al*^[41]利用免疫磁珠法分选出人和大鼠骨髓 β 2m-/Thy-1+细胞, 通过门静脉植入同系胆汁淤积大鼠肝内, 电镜下发现植入细胞具有与成熟肝细胞类似的细胞器超微结构, 并表达ALB、AFP、CK-18等肝细胞特异性标志, 而且能将氨转化为尿素。在肝损伤动物模型体内的分化研究也比较多, Wang *et al*^[42]研究发现, 肝损伤时造血干细胞也可向肝细胞横向分化, 而rhHGF对分化起促进作用。Yamamoto *et al*^[43]利用mAb从GFP转基因大鼠骨髓中分选出anti-Liv8阴性细胞, 经尾静脉移植入到持续性肝损伤的小鼠模型体内, 4 wk后发现多数移植细胞集中于门静脉周围的肝实质内, 同时表达Liv2和ALB。Sato *et al*^[44]研究发现人骨髓MSCs可以在烯丙醇大鼠肝损伤模型体内表达AFP、ALB、CK18/19和去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ACPR), FISH技术分析发现, 细胞中人Y染色体杂交信号阳性, 大鼠染色体杂交信号阴性。终末期肝病模型动物体内骨髓干细胞同样可以分化为肝样细胞。展玉涛 *et al*^[45]向肝纤维化模型大鼠体内自体移植骨髓Thy+CD3-CD45RA-细胞并进行间接荧光免疫组化和PKH26-GL标记, 结果发现标记细胞可以表达ALB、CK8。Abdel Aziz *et al*^[46]将雄性大鼠骨髓中CD29+ MSCs通过尾静脉移植入肝纤维化模型 δ 大鼠体内, RT-PCR检测证实雌性大鼠肝组织中Y染色体阳性, 肝功能检测血清ALB显著增加, 肝胶原基因表达显著下降, 羟脯氨酸下降。提示, MSCs在体内可以分化为肝样细胞, 并通过减少胶原沉积来发挥其抗纤维化作用。Terai *et al*^[47]在肝硬化小鼠体内注入GFP标记的骨髓细胞, 1 d后发现GFP阳性标记细胞定植在肝小叶门脉周围, 4 wk后肝脏中有25%的细胞为阳性标记细胞, 血清ALB明显升高。以上表明, 体内环境和肝脏本身微环境是促进骨髓干细胞向肝样细胞转化的关键因素, 分

■研发前沿

现阶段骨髓干细胞研究主要集中在特定条件下促使其向特定方向分化。而临床应用方面的研究尚处于起步阶段, 有待于进一步深入。

■创新盘点

本文就骨髓干细胞体内外向肝样细胞分化及其在肝系疾病治疗方面的研究, 进行一定的总结。

■应用要点

骨髓干细胞分化为肝样细胞的研究为临床干细胞治疗终末期肝病提供新的思路,而自体骨髓干细胞移植更具实用价值。

化的肝样细胞能够对损伤肝脏起到一定的修复作用。

关于分化机制存在很多说法。一些学者认为骨髓干细胞主要通过转分化为不同组织来源的细胞,从而修复损伤组织^[48-51]。另一些学者认为肝损伤时BMSC主要通过细胞融合产生肝细胞,而不是分化的结果^[52-55]。还有学者持否定态度,认为肝脏再生和修复时确实存在BMSC分化而来的肝细胞,但对肝脏再生作用不大^[56-57]。但是,大量研究还是倾向于BMSC能够分化为肝样细胞,并参与了损伤肝脏的修复,尽管分化机制目前尚不明确。

2 临床应用现状及存在问题

目前,骨髓干细胞自体移植在临床治疗终末期肝病方面的研究尚处起步阶段,但已呈现出巨大应用前景。曾伟等^{et al^[58]}对肝硬化失代偿期患者采集自体骨髓125 mL,提取干细胞总数约 8.43×10^6 ,经肝动脉注入肝内,结果发现症状明显好转,肝性脑病得到控制,肝功指标恢复正常,腹水、胸水减少。姚鹏^{et al^[59]}通过肝动脉插管对重症肝病患者进行自体MSCs移植,结果发现患者肝功能和凝血功能明显改善,临床症状明显好转,无并发症。Ivantes^{et al^[60]}对259例做过骨髓干细胞移植的丙型肝炎患者进行研究,移植后10年发现,有91例存活,而携带丙肝抗体患者的肝纤维化发生率降低。曹葆强^{et al^[61]}对20例肝硬化门静脉高压症患者进行脾切除、断流术或内镜食道曲张静脉套扎术时,埋置“门静脉导管-皮下药盒”,术后3-4 wk经移植通道输注自体骨髓细胞,后每隔1 mo输注1次,共3次,第3次输注后1 mo进行疗效评价,结果发现肝脏功能和肝纤维化血清学指标都得到显著改善,无不良反应和并发症。尽管自体骨髓干细胞移植临床应用现状喜人,但仍有一些问题急需解决:(1)如何进一步完善骨髓干细胞的体外分离、培养、鉴定等技术,确保其更好向肝细胞定向分化和扩增;(2)移植方式、部位、最佳时机的选择以及移植细胞的最佳数量有待进一步探讨;(3)需要建立一个有效的体内跟踪体系,以便更好地观察骨髓干细胞在体内的归巢和定位;(4)在细胞因子等调控下骨髓干细胞向肝细胞诱导分化的分子机制需进一步研究;(5)自体骨髓干细胞移植的长期疗效和安全性还有待进一步观察。

3 结论

干细胞在各个领域都逐步发挥出他无与伦比的

潜力。在终末期肝病治疗方面,自体骨髓干细胞移植具有取材方便、体外培养扩增容易、不易受病毒、肿瘤污染,无移植免疫排斥反应、创伤小,价格低廉等优点,与原位肝移植、生物人工肝等相比更具显著优势,因而具有更为广阔的应用前景。虽然发现BMSC具备向肝样细胞分化的潜能和有一些初步的临床观察结果,但涉及临床应用,目前还有许多基础理论和技术问题需要解决,比如移植治疗细胞的来源、数量和活性问题,细胞进入组织的途径和机制,BMSC向肝样细胞分化的调控机制,体内不同疾病状态下的微环境条件对BMSC迁移、定居、分化和功能的影响,长期疗效和可控性、安全性等。只有在解决基础理论问题的基础上,才有可能建立适于临床应用的技术方法。随着细胞工程、蛋白组学、基因工程、糖基工程和相关技术的发展及其在BMSC研究中的应用,BMSC横向分化为肝细胞的研究将逐步深入,骨髓干细胞自体移植技术将逐步完善,相信骨髓干细胞最终能够获得真正意义上向肝细胞分化,并达到病变肝的有效功能替代,结果将为临床治疗终末期肝病患者带来新的希望。

4 参考文献

- 1 Everhart JE, Lombardero M, Detre KM, Zetterman RK, Wiesner RH, Lake JR, Hoofnagle JH. Increased waiting time for liver transplantation results in higher mortality. *Transplantation* 1997; 64: 1300-1306
- 2 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504
- 3 Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002; 30: 896-904
- 4 Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 2615-2625
- 5 Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377
- 6 LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111: 589-601
- 7 Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530
- 8 Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama

- H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705
- 9 Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100: II247-II256
- 10 Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 999-1005
- 11 Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-98
- 12 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705
- 13 Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402
- 14 Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8: 403-409
- 15 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- 16 Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-1782
- 17 Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-1779
- 18 Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10711-10716
- 19 Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001; 128: 5181-5188
- 20 Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong Y, Nagasawa R, Okabe M, Maruyama N, Hosoya T, Ohno T. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1401-1409
- 21 Emond JC, Whittington PF, Thistlethwaite JR, Cherqui D, Alonso EA, Woodle IS, Vogelbach P, Busse-Henry SM, Zucker AR, Broelsch CE. Transplantation of two patients with one liver. Analysis of a preliminary experience with 'split-liver' grafting. *Ann Surg* 1990; 212: 14-22
- 22 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- 23 鲁学恒, 马力, 刘沛. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的实验研究. *中国医科大学学报* 2007; 36: 256-258
- 24 张瑞, 顾岩, 郭善禹. 体外诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的实验研究. *外科理论与实践* 2007; 12: 169-173
- 25 Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 24-30
- 26 Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3479-3484
- 27 Inderbitzin D, Avital I, Keogh A, Beldi G, Quarta M, Gloor B, Candinas D. Interleukin-3 induces hepatocyte-specific metabolic activity in bone marrow-derived liver stem cells. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 69-74
- 28 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005; 37: 276-279
- 29 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539
- 30 Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol* 2003; 39: 17-23
- 31 Cai YF, Zhen ZJ, Min J, Fang TL, Chu ZH, Chen JS. Selection, proliferation and differentiation of bone marrow-derived liver stem cells with a culture system containing cholestatic serum in vitro. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3308-3312
- 32 张淑芹, 范庆杰, 赵文静, 刘薇, 陈亚洁. 肝病患者血清诱导间充质干细胞表达肝细胞特异性标志物的实验研究. *中西医结合肝病杂志* 2006; 16: 229-230, 233
- 33 Mizuguchi T, Hui T, Palm K, Sugiyama N, Mitaka T, Demetriou AA, Rozga J. Enhanced proliferation and differentiation of rat hepatocytes cultured with bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189: 106-119
- 34 Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 98-104
- 35 Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-695
- 36 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 37 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes

■名词解释

1 细胞融合: 又称细胞杂交(cell hybridization), 是指两个或两个以上的细胞融合成一个细胞的现象。

2 自体干细胞移植: 在大剂量放、化疗前采集自体造血干细胞, 使之免受大剂量放、化疗造成的损伤, 并在大剂量放、化疗后回输。自体造血干细胞可取自骨髓, 亦可取自外周血, 前者称自体骨髓移植, 后者称自体外周血干细胞移植, 统称“自体干细胞移植”。

同行评价

本文对骨髓干细胞定向分化为肝样细胞的研究状况进行了综述,文笔流畅,表述较清晰,选题有一定新颖性,有一定的学术价值。

- 38 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 39 Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- 40 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
- 41 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 156-164
- 42 Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolte JA. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101: 4201-4208
- 43 Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 1110-1118
- 44 Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005; 106: 756-763
- 45 展玉涛, 魏来, 陈红松, 丛旭, 费然, 王宇. 骨髓干细胞在大鼠肝纤维化形成环境中的分化. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 673-675
- 46 Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Hasan NM. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007; 40: 893-899
- 47 Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134: 551-558
- 48 Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning Stem Cells* 2007; 9: 3-7
- 49 Tang DG, Tokumoto YM, Apperly JA, Lloyd AC, Raff MC. Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* 2001; 291: 868-871
- 50 Shen CN, Slack JM, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 879-887
- 51 Rideout WM 3rd, Wakayama T, Wutz A, Eggan K, Jackson-Grusby L, Dausman J, Yanagimachi R, Jaenisch R. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat Genet* 2000; 24: 109-110
- 52 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545
- 53 Kikyo N, Wolffe AP. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 1): 11-20
- 54 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901
- 55 Willenbring H, Grompe M. Embryonic versus adult stem cell pluripotency: in liver only fusion matters. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20: 393-394
- 56 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487
- 57 Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1: 11850-11853
- 58 曾伟导, 王平, 樊群. 自体骨髓干细胞移植治疗肝衰竭应用基础研究进展. *中西医结合肝病杂志* 2005; 3: 190-192
- 59 姚鹏, 胡大荣, 王帅, 闻炜, 周一鸣, 龚丽娟. 自体骨髓干细胞移植治疗慢性重症肝病60例. *实用医学杂志* 2005; 21: 2143-2145
- 60 Ivantes CA, Amarante H, Ioshii SO, Pasquini R. Hepatitis C virus in long-term bone marrow transplant survivors. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 1181-1185
- 61 曹葆强, 林继宗, 钟跃思, 黄绍斌, 林楠, 汤照峰, 吴祥元, 项鹏, 许瑞云. 自体骨髓细胞经门静脉移植治疗肝硬化与肝功能不全的临床研究. *中华普通外科杂志* 2007; 22: 386-389

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜NF- κ B DNA结合活性的作用

李红, 杜群, 王汝俊, 王文君, 李燕舞, 巫燕莉

李红, 广州中医药大学中药学院 广东省广州市 510006
杜群, 王汝俊, 李燕舞, 巫燕莉, 广州中医药大学脾胃研究所
广东省广州市 510405
王文君, 广州中医药大学临床药理研究所 广东省广州市
510405
国家自然科学基金资助项目, No. 30400613
作者贡献分布: 李红与杜群对此文所作贡献均等; 此课题由杜群,
李红, 王汝俊及王文君设计; 研究过程由李红, 杜群, 王文君, 李
燕舞及巫燕莉操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由杜群提
供; 数据分析由李红及杜群完成; 本论文写作由李红及杜群完成.
通讯作者: 杜群, 510405, 广东省广州市机场路12号大院, 广州
中医药大学脾胃研究所. duqun@gzhtcm.edu.cn
电话: 020-36585555
收稿日期: 2007-09-30 修回日期: 2008-01-15

Effect of Kuijieling decoction on DNA binding activity of nuclear factor kappa B in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis

Hong Li, Qun Du, Ru-Jun Wang, Wen-Jun Wang,
Yan-Wu Li, Yan-Li Wu

Hong Li, College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China
Qun Du, Ru-Jun Wang, Yan-Wu Li, Yan-Li Wu, Spleen and Stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Wen-Jun Wang, Clinical Pharmacology Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30400613

Correspondence to: Dr. Qun Du, Spleen and Stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. duqun@gzhtcm.edu.cn

Received: 2007-09-30 Revised: 2008-01-15

Abstract

AIM: To observe the changes of DNA binding activity of NF- κ B as well as the effects of Kuijieling Decoction(KD)on DNA binding activity of NF- κ B in colonic mucosa of ulcerative colitis (UC)model rats.

METHODS: Rat UC model was induced by trinitrobenzene-sulfonic acid (TNBS). The rats were randomly divided into normal control (NC) group, model control (MC) group, Kuijieling

low dose (KLD) group, Kuijieling medium dose (KMD)group, Kuijieling high dose (KHD) group and salazosulfapiridine (SASP) group. The rats were killed to get their fresh colonic mucosa and extract nuclear proteins after 10 days of treatment. Relative activity of NF- κ B was detected by ELISA with a Trans AM TM NF- κ B p65 kit.

RESULTS: The relative activity of NF- κ B was significantly higher in the MC group than in the NC group (0.440 ± 0.119 vs 0.261 ± 0.042 , $P < 0.01$). The relative activity of NF- κ B was significantly lower in the KHD and SASP groups (0.261 ± 0.056 and 0.269 ± 0.106) than in the MC group (0.440 ± 0.119 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: NF- κ B may be involved in the pathogenesis of UC, and KD can inhibit the relative activity of NF- κ B in colonic mucosa of rats with UC induced by TNBS. The inhibitory effects of KD on UC might be associated with the inhibition of NF- κ B activity.

Key Words: Kuijieling Decoction; Ulcerative colitis; Rat model; Nuclear factor- κ B

Li H, Du Q, Wang RJ, Wang WJ, Li YW, Wu YL. Effect of Kuijieling decoction on DNA binding activity of nuclear factor kappa B in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 663-666

摘要

目的: 观察溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠黏膜核因子- κ B(NF- κ B)DNA结合活性的变化特点及溃结灵对其的影响。

方法: 采用三硝基苯磺酸(TNBS)法制作UC大鼠模型, 大鼠随机分为以下六组: 正常对照组、模型对照组、溃结灵低、中、高剂量组、阳性药柳氮磺胺吡啶(SASP)组。治疗10 d后处死大鼠, 取新鲜结肠黏膜标本提取核蛋白, 利用以ELISA为基础的Trans AM TM NF- κ B p65试剂盒检测NF- κ B相对活性并进行统计学分析。

■背景资料

肾上腺皮质激素类药物和氨基水杨酸类药物治疗UC已有几十年历史, 目前仍是治疗UC的一线药物。虽有一些治疗UC新药问世, 但由于疗效及毒副作用问题, 只能作为二、三线药物使用。中药对UC有较好的治疗效果, 毒副作用小, 应用前景广阔, 但作用机制不明确严重限制了其推广使用。

■同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科; 江学良, 主任医师, 济南军区总医院消化科

■相关报道

Schreiber *et al*报道UC患者核内NF- κ B DNA结合活性明显升高. 治疗UC的经典用药肾上腺皮质激素和水杨酸类的药理作用新机制已被提出, 即能抑制NF- κ B活性. Murano *et al*采用NF- κ B p65蛋白反义核苷酸喂饲DSS结肠炎小鼠后, 小鼠的疾病活动指数明显改善, IL-1等细胞因子水平明显下降.

结果: 模型组结肠黏膜NF- κ B相对活性明显高于正常组(0.440 ± 0.119 vs 0.261 ± 0.042 , $P < 0.01$); 溃结灵高剂量组和SASP组结肠黏膜NF- κ B相对活性(0.261 ± 0.056 , 0.269 ± 0.106)明显低于模型组($P < 0.01$).

结论: NF- κ B参与了UC大鼠的发病过程, 溃结灵使TNBS法UC大鼠模型结肠黏膜NF- κ B相对活性明显降低, 这可能是其治疗UC作用的机制之一.

关键词: 溃结灵; 溃疡性结肠炎; 大鼠模型; 核因子- κ B

李红, 杜群, 王文俊, 王文君, 李燕舞, 巫燕莉. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜NF- κ B DNA结合活性的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 663-666

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/663.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称非特异性溃疡性结肠炎, 与克隆病(crohn's disease, CD)合称为炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD). UC可发生于任何年龄, 与结肠癌的发病有关, 且病程长, 病变程度轻重各异, 由于病因不明, 临床上常常表现反复发作而治愈难度大, 被世界卫生组织列为现代难治病之一. 脾胃研究所在多年临床实践的基础上, 以清热健脾活血为治则, 总结出治疗UC疗效较满意的中药复方溃结灵^[1], 实验研究发现该方的水提取液有明显的抗炎镇痛作用^[2].

随着近年对核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的研究, 正逐步揭示着IBD的发病机制, 通过抑制NF- κ B进而阻断IBD过激的炎症反应, 已成为众多学者研究的方向. 为了进一步研究溃结灵对UC的作用机制, 前期研究^[3]采用三硝基苯磺酸(trinitrobenzen sulphonic acid, TNBS)灌肠成功复制了UC大鼠模型, 并发现溃结灵对TNBS法UC大鼠模型有明显的治疗作用, 本研究在此基础上观察溃结灵对UC大鼠结肠黏膜NF- κ B的DNA结合活性的影响, 以期对溃结灵治疗UC的较深层次的作用机制进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠由广东省医学实验动物中心提供(合格证号: 粤监证字2005A010), 体质量180-220 g, SPF级环境饲养. 溃结灵药材购于采芝林连锁药店, 经广州中医药大学中药学院中

药标本中心张秋镇老师鉴定, 所购药材均符合中华人民共和国药典标准. 按组方比例称取药材, 常规方法制备水煎液. 大鼠低、中、高剂量按成人用量的5倍、10倍、20倍计算, 即4.6 g(生药量, 下同)/kg、9.2 g/kg、18.3 g/kg, 药物用蒸馏水配成460 g/L、920 g/L、1830 g/L. 柳氮磺胺吡啶(SASP, 上海三维制药有限公司, 批号: 200410001, 每片0.25 g): 用作阳性对照药物, 大鼠用量取10倍成人用量即0.5 g/kg, 药物用蒸馏水配成50 g/L. 5% TNBS(Sigma公司), 核蛋白提取试剂盒(Active motif公司), BCA-100蛋白质定量测定试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司), TransAM TM NF- κ B ELISA测定试剂盒(Active motif 公司). ZFMQ050PE型超纯水器(Millipore公司), 3K-30Z型高速冷冻离心机(Sigma公司), A5002型酶联免疫检测仪(Tecan公司).

1.2 方法

1.2.1 造模^[3-4]: 采用TNBS灌肠法制作UC大鼠模型. 取3 mo SD大鼠, 造模型前禁食24 h, 留取部分动物作为正常对照组, 其余大鼠乙醚麻醉, 用大鼠灌胃针头轻轻从肛门插入, 深度为8 cm, 推入TNBS溶液(含25 mL/L TNBS和500 mL/L乙醇)4 mL/kg体质量, 捏紧肛门平放5 min即可, 术后常规饲养.

1.2.2 给药方法与标本留取: 造模后第3天, 模型动物分为空白对照组, 溃结灵低、中、高剂量组和阳性药SASP组, 并同时开始按上述剂量给药, 给药体积为10 mL/kg. 空白对照组及正常对照组给等体积蒸馏水, 每天1次, 连续10 d. 末次给药24 h后, 脱颈椎法处死大鼠, 取距肛门8 cm结肠, 沿纵轴剪开, 刮取结肠黏膜组织, 每只大鼠刮取50 mg新鲜结肠黏膜后立即提取核蛋白.

1.2.3 采用以ELISA为基础的Trans AM TM NF- κ B p65试剂盒检测NF- κ B的DNA结合活性: 取新鲜结肠黏膜按试剂盒说明书提取细胞核蛋白, 用BAC-100蛋白质定量测定试剂盒测定蛋白浓度, 取核蛋白抽提物5 μ g并用细胞裂解液稀释至20 μ L, 加于预包被有NF- κ B特异的寡核苷酸双链探针的96孔板中, 于室温振荡(100 r/min)反应1 h, 洗板3次, 加稀释的NF- κ B p65单抗(稀释浓度为1:1000)100 μ L/孔, 室温反应1 h; 洗板后加稀释的辣根过氧化物酶交联的二抗(稀释浓度为1:1000)100 μ L/孔, 室温反应1 h; 洗板后加四甲基联苯胺底物液避光显色10 min; 加终止液终

止, 于全自动酶标仪450 nm处读吸光度(A), 以A值大小表示被测样品NF- κ B DNA结合活性的相对值. 阳性对照孔中加入试剂盒提供的Jurkat核蛋白2.5 μ g/孔. 在实验中设置竞争性对照, 以示检测的特异性: 特异性竞争抑制试验在加样孔中加入20 pmol/孔的野生型NF- κ B寡核苷酸双链针; 非特异竞争抑制试验则加入突变型寡核苷酸双链针, 其余步骤同前.

统计学处理 结果以mean \pm SD表示, 组间两两比较, 采用 t 检验分析.

2 结果

竞争性试验表明NF- κ B与目的片段结合有高度特异性. 实验结果显示模型组大鼠结肠黏膜NF- κ B的相对活性明显高于正常组, 溃结灵高剂量组、SASP组NF- κ B的相对活性明显低于模型组(表1).

3 讨论

细胞因子和细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAM)在UC发病中的作用已得到公认, 近年研究发现NF- κ B调控着UC患者细胞因子和CAM的释放, 从而参与了UC肠道的炎症和免疫反应, NF- κ B在IBD的发生发展中占举足轻重的地位^[5].

NF- κ B是与免疫球蛋白重链和 κ 轻链基因增强子序列(5'-GGGACTTTCC-3')特异结合的核蛋白因子. 在哺乳动物细胞中有两组共五种Rel/NF- κ B家庭成员: NF- κ B1(p50)、NF- κ B2(p52)为一组, 另一组包括RelA(p65)、RelB、c-Rel, 其中RelA(p65)具有显著的促炎活性^[6]. 这两组蛋白成员间可形成同源或异源二聚体. 最常见的二聚体是p50-p65异源二聚体, 也就是常说的NF- κ B^[7].

NF- κ B是在进化学上高度保守的一种转录因子, 广泛存在于各种组织中, 能与许多细胞基因的启动子和增强子中的 κ B转录序列位发生特异性结合, 参与众多免疫炎症反应有关的基因转录调控以及细胞凋亡、肿瘤细胞的黏附和转移等多种生理病理过程的基因调控, 参与多种包括IBD在内的多种炎症性疾病的发病. NF- κ B可以调控任何含有 κ B位点的基因转录, 包括细胞因子及其受体、CAM、促进或抑制凋亡蛋白、急性期反应蛋白、趋化分子、酶分子、转录因子等^[8-9]. 对IBD起主要致病作用的细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-

表 1 溃结灵对UC大鼠结肠黏膜NF- κ B DNA结合活性的作用(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	剂量(g/kg)	NF- κ B活性(A)
正常组	6	等体积水	0.261 \pm 0.042
模型组	8	等体积水	0.440 \pm 0.119 ^b
溃结灵治疗组			
低剂量	7	4.6	0.394 \pm 0.047
中剂量	7	9.2	0.344 \pm 0.081
高剂量	8	18.3	0.261 \pm 0.056 ^d
SASP组	8	0.5	0.269 \pm 0.106 ^d

^b P <0.01 vs 正常组; ^d P <0.01 vs 模型组.

α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)等在转录水平由NF- κ B调控^[10]. NF- κ B对CAM、趋化因子、环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)、一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等表达均有调控作用. 因此, NF- κ B在IBD的病理生理过程中可能起到枢纽作用. 研究表明, UC患者核内NF- κ B DNA结合活性明显升高^[11-12], 在UC患者中, NF- κ B已被活化并进入核内, 具有很强的与基因 κ B位点相结合的能力, 是细胞因子转录及释放的前提和关键. 而且绝大多数细胞因子基因启动子或增强子部位均有NF- κ B结合位点, 因此活化入核的NF- κ B即可与之结合并促进这些细胞因子的转录.

随着对NF- κ B的深入研究, 以此为靶标进行的IBD的治疗研究也已成为当前研究的热点, 通过抑制NF- κ B进而阻断UC过激的炎症反应已成为众多学者研究的方向. 许多临床经典用药如肾上腺皮质激素类(adrenal cortical hormones)、SASP及水杨酸类药物的药理作用新的机制已被提出, 即能抑制NF- κ B活性, 进而减少炎症前细胞因子而起到治疗UC的作用. 一些NF- κ B抑制剂也正在临床或实验研究, 如白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)可削弱TNF- α 诱导的I κ B激酶(I κ B kinase, IKK)活性^[13], IL-4可能抑制NF- κ B的核转位^[14], 抗氧化剂、蛋白酶体抑制剂也是抑制NF- κ B激活的一条非特异性途径, 但在IBD中的应用和疗效尚需进一步的研究. 针对这一通路的基因治疗的研究也正在开展, 已证实UC患者肠黏膜NF- κ B含有p65这一重要的亚单位, 他在调控靶基因的转录中起着关键性的作用, 因此采用靶向NF- κ B p65的反义寡核苷酸抑

■创新盘点

本文观察了清热健脾活血治则中药复方溃结灵对UC大鼠模型结肠黏膜NF- κ B p65蛋白DNA结合活性的影响, 发现溃结灵对UC大鼠模型过度激活的NF- κ B有抑制作用, 揭示了其治疗UC的部分机制, 尚未见类似的文献报道.

■应用要点

以往的中药抗UC的作用机制研究多从免疫角度尤其是细胞因子角度进行探讨, 但参与UC发病的细胞因子数量众多, 机制极其复杂, TLRs/NF- κ B通路调控众多基因的转录, 能在一个较高水平发挥调控细胞因子水平总环节的作用, 对其进行研究会明显增加药物研究的有效性和针对性, 突破以往研究模式, 本文对中药抗UC作用机制研究有借鉴意义.

■同行评价

本文研究内容新颖, 分析严谨, 具有一定的学术价值.

制或封闭p65 mRNA的表达, 减少p65蛋白的合成, 从而减少细胞因子的释放, 对于治疗UC具有十分重要的治疗价值. Murano *et al*^[15]发现采用p65反义寡核苷酸喂饲右旋葡聚糖硫酸(dextran sulfate sodium, DSS)结肠炎小鼠后, 小鼠的疾病活动指数(disease activity index, DAI)明显改善, IL-1、IL-6、TNF- α 水平明显下降, Western blot检测发现NF- κ B p65蛋白表达明显减少. Probert *et al*^[16]在离体的UC患者固有层单个核细胞(lamina propria mononuclear cells, LPMC)的研究中发现: p65反义寡核苷酸可以明显降低NF- κ B p65的表达, 在人体细胞上证实了p65反义寡核苷酸的药用价值, 为p65反义寡核苷酸作为UC治疗新药提供了实验依据. 由于NF- κ B在UC发病中的重要作用, 抗UC中药对NF- κ B激活的研究成为当前研究的热点, 抑制NF- κ B激活可能是部分中药作用的机制.

本研究表明, UC模型大鼠NF- κ B DNA结合活性明显高于正常对照组, 溃结灵高剂量组NF- κ B DNA结合活性明显低于模型对照组, 表明TNBS所致大鼠UC的发生与NF- κ B的活化密切相关, 溃结灵对UC大鼠模型过度激活的NF- κ B有抑制作用, 这可能是溃结灵治疗UC大鼠的作用机制之一.

4 参考文献

- 1 黄志新, 劳绍贤, 崔琦珍, 王汝俊, 胡旭光. 溃结灵颗粒治疗活动期溃疡性结肠炎的临床与实验研究. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 141-143
- 2 胡旭光, 王汝俊, 杜群, 巫燕莉. 溃结灵的抗炎与镇痛作用研究. 现代中西医结合杂志 2003; 12: 128-129
- 3 杜群, 李红, 王建华, 王汝俊. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠治疗作用的病理学观察. 中药新药与临床药理 2007; 18: 173-175
- 4 郑礼, 高振强, 王淑仙. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验

- 研究. 中国药理学通报 1998; 14: 370-372
- 5 张可, 邓长生, 朱尤庆. NF- κ B与炎症性肠病. 国外医学•消化系疾病分册 2003; 23: 94-96
- 6 Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683
- 7 黄文林, 朱孝峰. 信号传导. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 138
- 8 吴礼国, 欧阳钦, 甘华田. Rel/NF- κ B信号传导通路与溃疡性结肠炎生物治疗策略的关系. 国外医学•消化系疾病分册 2004; 24: 335-337
- 9 Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* 2005; 118: 4589-4592
- 10 Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 167: 1609-1616
- 11 甘华田, 欧阳钦, 陈友琴, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 κ 基因结合核因子的活化及抗炎药物的作用. 中华医学杂志 2002; 82: 384-388
- 12 刘一品, 李延青. 核因子- κ B的表达在溃疡性结肠炎发病机制中的意义. 胃肠病学 2006; 11: 103-106
- 13 Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 31868-31874
- 14 Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996; 2: 998-1004
- 15 Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 51-58
- 16 Probert CS, Hearing SD, Schreiber S, Kuhbacher T, Ghosh S, Arnott ID, Forbes A. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut* 2003; 52: 998-1002

编辑 李军亮 电编 郭海丽

激光诱导大鼠大肠早癌组织自体荧光光谱特征

黄秋林, 张阳德

黄秋林, 南华大学附属第一医院普通外科 湖南省衡阳市 421001

张阳德, 中南大学卫生部肝胆肠外科研究中心 湖南省长沙市 410008

通讯作者: 黄秋林, 421001, 湖南省衡阳市南华大学附属第一医院普通外科. hql107@hotmail.com

电话: 0734-8279034

收稿日期: 2007-09-02 修回日期: 2008-01-15

Characteristics of laser-induced autofluorescence spectra in early colorectal carcinoma

Qiu-Lin Huang, Yang-De Zhang

Qiu-Lin Huang, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Yang-De Zhang, National Hepatobiliary and Enteric Surgery Research Center of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Qiu-Lin Huang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. hql107@hotmail.com

Received: 2007-09-02 Revised: 2008-01-15

Abstract

AIM: To analyze the characteristics of laser-induced autofluorescence spectra in early colorectal carcinoma.

METHODS: An animal model of colorectal carcinoma was established by injecting DMH in abdominal cavity of Sprague-Dawley rats. Samples were collected from normal, early-stage and advanced carcinoma tissues, respectively. The characteristics of their laser-induced autofluorescence spectra were analyzed.

RESULTS: A total of 226 samples were collected, including 64 normal colorectal tissue samples, 78 early-stage and 84 advanced colorectal carcinoma tissue samples. Spectra peaks were observed at about 460 nm and 505 nm in different groups. The wavelength at 460 nm in normal tissue samples differed significantly from those in early stage and advanced colorectal cancer tissue samples (457.66 ± 3.28 vs 467.87 ± 7.71 , 468.60 ± 4.53 , $P < 0.05$). Spectra peaks were found at

635 nm in 73% advanced colorectal carcinoma tissue samples and 69% early-stage colorectal carcinoma tissue samples, but not in normal colorectal tissue samples. The mean wavelength at 460 nm was longer in normal colorectal tissue samples than in early stage and advanced colorectal carcinoma tissue samples (457.66 ± 3.28 vs 467.87 ± 7.71 , 468.60 ± 4.53 , $P < 0.05$). The values of I_{635}/I_{460} and I_{635}/I_{600} in early-stage (1.9507 ± 1.1460 , 0.4215 ± 0.2582) and advanced carcinoma tissue samples (2.1368 ± 1.4721 , 0.4482 ± 0.2309) were higher than those in normal colorectal tissue samples (0.7494 ± 0.1077 , 0.1416 ± 0.0439 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The characteristics of laser-induced autofluorescence spectra are different in normal colorectal tissue, early-stage and advanced colorectal carcinoma tissue, and can be used to diagnose early-stage colorectal carcinoma.

Key Words: Laser; Autofluorescence; Spectrum; Early-stage colorectal carcinoma

Huang QL, Zhang YD. Characteristics of laser-induced autofluorescence spectra in early colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 667-670

摘要

目的: 探索激光诱导大鼠早癌组织自体荧光光谱特征。

方法: 采用二甲胍ip法建立SD大鼠大肠癌动物模型, 对大鼠结肠和直肠可疑病变或肿块部位用370 nm激光照射, 诱导组织产生自体荧光并收集光谱后取材, 根据病理诊断分为正常组、早期癌组、进展期癌组, 分析各组光谱特征。

结果: 正常64例, 早期癌78例, 进展期癌84例, 共226例。各组光谱在460 nm和505 nm处附近有波峰; 正常组460 nm左右波峰对应的波长与早期癌组、进展期癌组对应波长比较差异有显著性(457.66 ± 3.28 vs 467.87 ± 7.71 , 468.60 ± 4.53 , $P < 0.05$)。73%(61/84)的进展期大肠癌

■背景资料

自体荧光光谱分析法诊断恶性肿瘤的研究日趋活跃。大肠癌是临床上常见恶性肿瘤之一, 但由于常用的检查方法较难发现早期大肠癌, 因而大肠早癌自体荧光光谱特性如何仍未被揭示, 导致该技术在临床中应用受到了限制。

■同行评议者

徐智, 教授, 北京大学第三医院外科

■研发前沿

本文采用大肠癌动物模型,激光诱导大肠正常组织、早期大肠癌组织和进展期大肠癌产生自体荧光,收集各组组织自体荧光光谱加以分析,以揭示各组自体荧光光谱之间差异,为自体荧光光谱技术用于大肠早癌的诊断提供依据。

组织、69%(54/78)的早期大肠癌组织荧光光谱在635 nm附近有荧光峰,而正常组织缺乏该峰。早期癌组和进展期癌组自体荧光在460 nm处的荧光强度比在正常组相应强度弱。早期癌组和进展期癌组 I_{635}/I_{460} (1.9507 ± 1.1460 , 2.1368 ± 1.4721)和 I_{635}/I_{600} 值(0.4215 ± 0.2582 , 0.4482 ± 0.2309)分别较正常组 I_{635}/I_{460} 和 I_{635}/I_{600} 值大且差异有显著性(0.7494 ± 0.1077 , 0.1416 ± 0.0439 , $P < 0.05$)。

结论:激光诱导的大鼠大肠正常组织与大肠癌组织(包括早期和进展期大肠癌)自体荧光光谱之间存在差异,自体荧光光谱部分特征可用于大肠癌早期诊断。

关键词:激光;自体荧光;光谱;早期大肠癌

黄秋林, 张阳德. 激光诱导大鼠大肠早癌组织自体荧光光谱特征. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 667-670
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/667.asp>

0 引言

本研究采用调Q式钛宝石激光器激发大肠癌模型大鼠大肠组织产生自体荧光并收集其光谱,分析大肠早癌组织的光谱特征,为自体荧光光谱技术诊断早期大肠癌提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠60只,6-7周龄,体质量170 g左右,雌雄各半,由中南大学湘雅医学院动物学部提供。1,2-二甲胂(DMH·2HCl)为美国Acros公司产品,乙二胺四乙酸二钠(EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、戊巴比妥钠、氢氧化钠和氯化钠均为分析纯。卫生部肝胆肠外科研究中心研制的大肠早癌自体荧光内镜定位诊断系统(主要组成器件:激发波长为370 nm的调Q式钛宝石激光器、光纤、多色仪、增强型光电二极管、探头控制器、脉冲发生器、计算机和激光器电源,美国Princeton Instruments公司光谱分析软件,大肠早癌荧光检测数据处理软件)、手术显微镜等。

1.2 方法 大肠癌动物模型建立方法采用二甲胂诱导法^[1]: ip 3.5 g/L二甲胂(DMH)溶液,25 mg/kg,1次/wk,共18 wk。实验步骤:(1)麻醉:用30 g/L戊巴比妥钠按40 mg/kg注射到DMH诱导18 wk的大鼠腹腔内;(2)解剖大鼠:纵行切开腹壁,自肛门沿结直肠对系膜缘纵行剪开结直肠肠壁,清除肠道粪便;手术显微镜辅助下观察肠道病变;(3)对大肠内肿块、可疑病变及“正常组织”利用激光诱发组织自体荧光诊断系统光纤

探头垂直于病变方向轻轻接触其表面。370 nm激光照射检测部位,收集400-700 nm范围的荧光光谱,每一组织块收集3条完整波段的光谱;(4)全层切取荧光检测后的肠壁组织,编号,部分用40 g/L的甲醛固定,送病理切片,HE染色,两名病理医师阅片;按病理切片结果进行分组,分为正常组、早期癌组、进展期癌组,并收集各组组织荧光光谱。(5)荧光光谱图像数据处理:利用大肠早癌荧光检测数据处理软件将荧光光谱进行归一化及光谱参数数据化处理。同一采集部位的荧光光谱的波峰强度及相对应的波长用各自的3条自体荧光波峰强度和波长的平均值表示。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示,SPSS 10.0版统计软件分析。多组样本间的样本均数比较用单向方差分析的多重比较方法。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理和大肠自体荧光光谱收集结果 正常大肠组织64例,早期大肠癌78例,进展期大肠癌84例。收集了正常组、早期癌组、进展期癌组在体自体荧光光谱各192条、234条和252条。各组典型图谱及处理图见图1。

2.2 大肠组织自体荧光光谱特征

2.2.1 波形:正常组、早期癌组和进展期癌组收集的自体荧光光谱形态上存在一定差异。各组光谱大多数在460 nm、505 nm和542 nm左右处有波峰;460 nm波峰较505 nm和542 nm处波峰明显,542 nm处波峰较小。大肠癌组织的自体荧光光谱460 nm左右处的光谱曲线较正常组织要平坦,其波峰较正常组织不明显。在正常组自体荧光光谱无635 nm左右的荧光峰。73%(61/84)的进展期大肠癌组织、69%(54/78)的早期癌大肠组织的荧光光谱(未经归一化和平滑处理)存在635 nm左右处有荧光峰。

2.2.2 波峰位置:(1)早期癌组和进展期癌组组织自体荧光光谱在460 nm左右处的波峰位置(λ_{460})与正常组比较有统计学差异($P < 0.05$)。各组比较,505 nm左右处的波峰对应波长 λ_{505} 无显著性差异($P > 0.05$,表1)。

2.2.3 大肠癌荧光检测结果:波峰强度绝大多数大肠在体组织自体荧光光谱在460 nm左右处有最大峰强度,个别大肠癌组织在635 nm处有最大峰强度。正常组织在460 nm左右处自体荧光强度一般较大肠癌组织要强。大肠癌组织该处

表 1 各组间大肠组织自体荧光光谱 λ_{460} 值与 λ_{505} 值

分组	n	λ_{460}	λ_{505}
正常组	64	457.66 ± 3.28	509.00 ± 1.25
早期癌组	78	467.87 ± 7.71 ^a	508.54 ± 0.80
进展期癌组	84	468.60 ± 4.53 ^a	509.08 ± 1.21

^a $P < 0.05$ vs 正常组.表 2 各组大肠组织自体荧光光谱 I_{635}/I_{600} 和 I_{635}/I_{460} 值

分组	I_{635}/I_{600}	I_{635}/I_{460}
正常组	0.7494 ± 0.1077	0.1416 ± 0.0439
早期癌组 ^a	1.9507 ± 1.1460	0.4215 ± 0.2582
进展期组 ^a	2.1368 ± 1.4721	0.4482 ± 0.2309

^a $P < 0.05$ vs 正常组.

的光谱相对正常组织要低平(图1A-C).

2.2.4 各组在体组织自体荧光光谱 I_{635}/I_{600} 值和 I_{635}/I_{460} 值差异: I_{635}/I_{600} 表示635 nm左右处的荧光(峰)强度比上600 nm处荧光强度, I_{635}/I_{460} 表示635 nm处的荧光(峰)强度比上460 nm左右处荧光(峰)强度(表2).

3 讨论

大肠癌在临床上是常见的肿瘤之一, 由于早期诊断较困难, 其术后5年的生存率只有40%-50%, 因而提高大肠癌患者生存率的关键在于提高早期大肠癌的检出率. 自体荧光分析法因为其具有灵敏、快速、简便、无创伤等优点被作为恶性肿瘤诊断方法的研究日趋活跃, 并被证明有较好的应用价值^[2-3]. 同样研究发现大肠癌与正常组织自体荧光光谱特征存在明显差异^[4-5], 从而使之成为大肠癌诊断提供了一种新的诊断思路^[6], 但由于临床上早期大肠癌发现困难, 故有关大肠早癌自体荧光光谱特征研究极少. 本研究利用二甲胍ip建立大肠早癌动物模型, 对激光诱导的大肠正常组织、早期大肠癌及进展期大肠癌组织荧光光谱特征差异进行了研究. 本研究发现正常组织、早期大肠癌及进展期大肠癌组织荧光光谱在460 nm、505 nm及542 nm左右处大多有波峰, 同时发现大肠癌组织自体荧光该处的光谱比较平坦, 荧光强度要弱于正常组织. 一般认为460-505 nm左右处的荧光峰与多种物质有关^[7], 在肿瘤的发展过程中这些物质的改变是自体荧光光谱波峰特征改变的基础.

本研究也发现在正常组织自体荧光光谱中

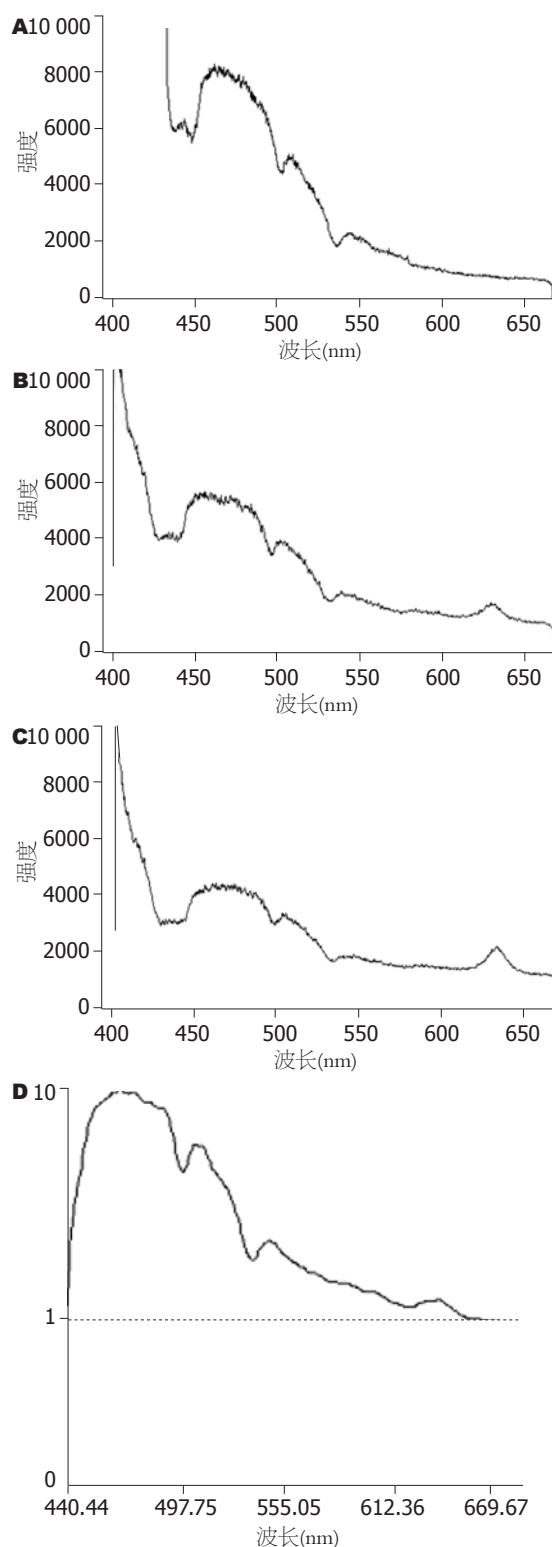


图 1 大鼠大肠组织自体荧光图谱. A: 正常组; B: 早期癌组; C: 进展期癌组; D: 大肠癌荧光检测数据处理软件光谱归一化处理.

红光区635 nm处缺乏荧光峰, 而早期癌和进展期癌组织光谱部分存在该荧光峰. 研究表明该处的荧光峰波长与卟啉的自体荧光峰相应波长相同, 因此认为是由卟啉引起. 事实也证明大肠正常组织和癌组织中卟啉含量有明显差异^[8], 因

应用要点

本文通过研究正常大肠组织、各期大肠癌组织间自体荧光光谱特征差异, 以揭示大肠早癌自体荧光光谱特征, 为激光诱导大肠组织自体荧光光谱技术用于大肠早癌的诊断提供依据.

■名词解释

自体荧光: 当生物组织受到一定波长激光照射时, 分子可吸收能量, 发生分子内能级跃迁, 并跃迁至高能级, 当他回到最低电子激发态, 把部分能量通过发射相应的光子的形式来释放时, 就发射出分子荧光, 即“自体荧光”。

■同行评价

本研究设计合理, 实验方法正确, 数据可靠, 内容翔实, 统计分析准确, 讨论切题, 具有一定的临床应用价值。

此大肠癌组织的荧光光谱在635 nm处的荧光峰出现为大肠癌的诊断提供良好的指标。本研究发现各组光谱在505 nm处波峰的相应波长比较无显著性差异, 因而利用该峰位置用于鉴别大肠良恶病变的可能性不大。而在460 nm处早期大肠癌和进展期大肠癌组自体荧光光谱的波峰对应的波长较正常组织红移约10 nm, 且差异有显著性, 早期及进展期大肠癌组织的自体荧光光谱在460 nm处的荧光峰对应波长较正常组织的自体荧光光谱在460 nm处的荧光峰对应波长要长, 因此这一大肠癌组织自体荧光光谱特征可以用于作为区分大肠癌(包括早期大肠癌)与正常组织的参数。该研究发现早期大肠癌及进展期大肠癌组织荧光光谱在460 nm、505 nm及542 nm左右波峰强度大体上要弱于正常组织荧光强度。可能由于肿瘤细胞的浸润, 黏膜层的增厚及某些荧光物质相对量的变化, 所导致自体荧光强度的改变^[9-10], 这为自体荧光技术诊断肿瘤打下了基础^[11]。但由于大肠组织生化与形态特征的个体差异较大, 不同患者的同类型组织样本之间的荧光光谱强度差异很大, 再加上结肠组织的不规则性导致每个样本测量时的测量结构不能保证完全相同。故通过光谱绝对强度差异来作为诊断判别依据都是不可靠的, 故部分研究者采用比值选取方法^[12], 以消除该因素的影响。在本研究中利用 I_{635}/I_{600} 和 I_{635}/I_{460} 两比值, 发现早期和进展期癌组的自体荧光光谱两比值均数与正常组比较大, 且差异有显著性。因此利用组织自体荧光光谱在该波段处的强度比可作为区分正常组织与大肠癌组织(包括早期大肠癌)的参数。

总之, 本研究发现激光诱导大肠正常组织、早期癌及进展期癌组织自体荧光某些光谱特征存在差异, 为激光诱导自体荧光光谱诊断大肠早癌提供了理论依据。

参考文献

- 1 Kanna PS, Mahendrakumar CB, Chakraborty T, Hemalatha P, Banerjee P, Chatterjee M. Effect of vanadium on colonic aberrant crypt foci induced in rats by 1,2 dimethyl hydrazine. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1020-1027
- 2 Hanibuchi M, Yano S, Nishioka Y, Miyoshi T, Kondo K, Uehara H, Sone S. Autofluorescence bronchoscopy, a novel modality for the early detection of bronchial premalignant and malignant lesions. *J Med Invest* 2007; 54: 261-266
- 3 Li Y, Arens C, Glanz H. Autofluorescence endoscopy for diagnosing early laryngeal cancer and its precursor lesions. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2005; 40: 696-700
- 4 翟力平, 李世荣, 高革, 张继光, 丁华野, 华益慰. 激光诱发荧光光谱诊断结肠癌的可行性研究. *中华肿瘤杂志* 1998; 20: 76-77
- 5 Chwirot BW, Kowalska M, Plóciennik N, Piwiński M, Michniewicz Z, Chwirot S. Variability of spectra of laser-induced fluorescence of colonic mucosa: its significance for fluorescence detection of colonic neoplasia. *Indian J Exp Biol* 2003; 41: 500-510
- 6 Li X, Guo X, Wang D, Wang Y, Li X, Lei M, Lin J. Study of method and system for diagnosis of cancer using autofluorescence and Raman spectroscopy. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2005; 5: 5453-5456
- 7 Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioka NS, Deutsch TF. Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Lasers Surg Med* 1992; 12: 63-78
- 8 张阳德, 王绍闯, 李年丰, 赵劲风, 张波, 黄林, 谭亮, 刘蔚东. 组织原卟啉IX与小鼠大肠癌在体自体荧光差异的相关性研究. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 1324-1326
- 9 Huang Z, Zheng W, Xie S, Chen R, Zeng H, McLean DI, Lui H. Laser-induced autofluorescence microscopy of normal and tumor human colonic tissue. *Int J Oncol* 2004; 24: 59-63
- 10 Izuishi K, Tajiri H, Fujii T, Boku N, Ohtsu A, Ohnishi T, Ryu M, Kinoshita T, Yoshida S. The histological basis of detection of adenoma and cancer in the colon by autofluorescence endoscopic imaging. *Endoscopy* 1999; 31: 511-516
- 11 曹建彪, 李世荣, 李静, 晨智敏, 张红光, 李雅君, 高革. 激光诱发大肠恶性肿瘤自体荧光光谱分析. *中华消化内镜杂志* 1999; 16: 146-148
- 12 Wang CY, Lin JK, Chen BF, Chiang HK. Autofluorescence spectroscopic differentiation between normal and cancerous colorectal tissues by means of a two-peak ratio algorithm. *J Formos Med Assoc* 1999; 98: 837-843

编辑 李军亮 电编 何基才

卡培他滨联合甲酰四氢叶酸钙和奥沙利铂治疗进展期胃癌28例

殷国建, 王少峰, 兰康华, 沈琼

殷国建, 王少峰, 兰康华, 沈琼, 苏州大学附属第二医院消化科 江苏省苏州市 215004

作者贡献分布: 此课题由殷国建与王少峰、兰康华设计; 研究过程及数据分析由殷国建与王少峰、兰康华、沈琼完成; 本论文写作由殷国建与王少峰完成。

通讯作者: 王少峰, 215004, 江苏省苏州市三香路1055, 苏州大学附属第二医院消化内科。sfwang68@yahoo.com.cn

电话: 0512-67783877 传真: 0512-68284303

收稿日期: 2007-09-21 修回日期: 2008-02-20

Capecitabine in combination with leucovorin and oxaliplatin as adjuvant chemotherapy in the treatment of advanced gastric cancer

Guo-Jian Yin, Shao-Feng Wang, Kang-Hua Lan, Qiong Shen

Guo-Jian Yin, Shao-Feng Wang, Kang-Hua Lan, Qiong Shen, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Suzhou University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Shao-Feng Wang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Suzhou University, 1055 Sanxiang Road, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. sfwang68@yahoo.com.cn

Received: 2007-09-21 Revised: 2008-02-20

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and toxicity of capecitabine in combination with leucovorin and oxaliplatin regimen (CAPE-LV-OXA) as the adjuvant chemotherapy in the treatment of patients with advanced gastric cancer.

METHODS: Twenty-eight patients with advanced gastric cancer were enrolled in the study. Patients were administrated with oral capecitabine 1250 mg/(m²·d) (d₁₋₁₄) and oral leucovorin 90 mg/d (d₁₋₁₄), and intravenous oxaliplatin 85 mg/m² (d₁) in a 21-day cycle regimen for 2-6 cycles.

RESULTS: Twenty-five patients were evaluable for efficacy and toxicity. There was no complete response, while 13 patients had partial responses, with an overall response rate of 52%. The me-

dian time to progression (TTP) was 5.4 months (range 2-13 months). The median survival time was 10.3 months (range 3-25 months). Therapy was generally well tolerated, and the most common adverse effects were gastrointestinal response, neutropenia, and hand-foot syndrome. There was no chemotherapy-related death.

CONCLUSION: CAPE-LV-OXA regimen is an effective and well-tolerated chemotherapy regimen for advanced gastric cancer.

Key Words: Advanced gastric cancer; Chemotherapy; Capecitabine; Oxaliplatin; Leucovorin

Yin GJ, Wang SF, Lan KH, Shen Q. Capecitabine in combination with leucovorin and oxaliplatin as adjuvant chemotherapy in the treatment of advanced gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 671-674

摘要

目的: 观察卡培他滨(CAPE)联合甲酰四氢叶酸钙(LV)和奥沙利铂(OXA)化疗方案(CAPE-LV-OXA)治疗进展期胃癌(AGC)的临床疗效和毒副作用。

方法: AGC患者28例接受CAPE-LV-OXA方案治疗, *po* LV 90 mg/d及CAPE 1250 mg/(m²·d), d₁₋₁₄; OXA 85 mg/m², 静脉滴注2 h, d₁; 每3 wk为1个疗程。2-6个疗程后观察疗效及其不良反应。

结果: 可评价疗效25例, 完全缓解0例, 部分缓解13例, 稳定7例, 进展5例, 有效率(RR)为52%(13/25), 中位肿瘤进展时间(TTP)为5.4(2-13) mo, 中位生存时间(MST)为10.3(3-25) mo。毒副作用主要为胃肠道反应、骨髓抑制、手足综合征和黏膜炎等, 多为I-II度毒性反应, 所有III度毒副作用4例, 对症治疗或停止治疗后可缓解。无化疗相关死亡者。

结论: CAPE-LV-OXA方案在AGC的治疗中疗效较为肯定, 且耐受性良好。

关键词: 进展期胃癌; 化疗; 卡培他滨; 奥沙利铂; 甲

■背景资料

联合化疗一直是治疗进展期胃癌患者的主要手段, 上世纪末铂类+5-FU+LV被认为主体方案之一, 而进入21世纪以来随着紫杉醇、伊立替康、奥沙利铂和卡培他滨等新药的应用, 导致了多种多样的联合方案。

■同行评议者

许玲, 副教授, 第二军医大学长征医院中医科; 唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

■研发前沿

OXA与CAPE是治疗AGC疗效较好且毒副反应较轻的新一代药物,有望组成新的化疗方案CAPE-LV-OXA,但关于该方案临床应用的文献报道较少, LV与CAPE在体内是否具有协同作用及三者联用的疗效均不甚明确,有待进一步研究。

酰四氢叶酸钙

殷国建, 王少峰, 兰康华, 沈琼. 卡培他滨联合甲酰四氢叶酸钙和奥沙利铂治疗进展期胃癌28例. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 671-674

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/671.asp>

0 引言

我国是胃癌高发的国家,胃癌的死亡率高居多种恶性肿瘤首位。目前大多数患者确诊时已是晚期,丧失了早期根治的手术治疗机会,联合化疗成了这部分患者治疗的主要手段,临床上铂类+5-FU+LV被公认是治疗进展期胃癌(advanced gastric cancer, AGC)的主体方案。进入21世纪以来,随着紫杉醇^[1](Tax)、伊立替康^[2](CPT-11)、奥沙利铂^[3](oxaliplatin, OXA)和卡培他滨^[4](capecitabine, CAPE)等新药的应用,产生了多种新的联合方案。目前许多研究结果表明,作为CDDP及5-FU的新一代药物OXA与CAPE,是治疗AGC疗效较好且毒副反应较轻的2种新药,有望取代联合方案中的5-FU和CDDP。2004-06/2007-01我院联合应用这两种药物及甲酰四氢叶酸钙(leucovorin, LV)治疗AGC疗效较好,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 初诊治AGC患者28例,男17例,女11例,年龄43-76(中位年龄63)岁。均经病理学检查确诊,中分化腺癌9例,低分化腺癌17例,印戒细胞癌2例;全组病例均有可测量的肿瘤病灶,肺转移4例,肝转移11例,腹腔淋巴结转移19例,腹腔转移6例,盆腔转移4例,锁骨上淋巴结转移2例。TNM分期全部为IV期。全组病例化疗前KPS评分均>70分,心电图、肝、肾、肺功能、血象均在正常范围,预计生存时间在3 mo以上且可以评价近期疗效。

1.2 方法 AGC患者28例接受CAPE-LV-OXA方案治疗:CAPE(希罗达, Xeloda, 上海罗氏公司产品), 1250 mg/m², 分早晚2次饭后30 min po, 连服2 wk后休息1 wk; LV(同奥, 江苏恒瑞医药公司), 90 mg/d, 连服2 wk后休息1 wk; OXA(艾恒, 江苏恒瑞医药公司), 85 mg/m², 静脉滴注持续2 h, d1; 3 wk为1周期。化疗期间常规给予5-HT₃拮抗剂及胃复安等止吐治疗;每周监测血常规、肝肾功能,白细胞<4×10⁹/L时给予粒细胞集落刺激因子等治疗。治疗2-6疗程后评价病灶,确定疗效;肿瘤缓解、稳定者继续接受该方案治疗,进展

者终止化疗。所有病例化疗后复查胃镜、B超、腹部和/或胸部CT,参照WHO标准(1981)进行评定,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SR)和进展(PD)。中位肿瘤进展时间(TTP)为自治疗开始至肿瘤病灶出现进展的时间,中位生存时间(MST)为开始治疗至死亡的时间,有效率(RR)为CR+PR的例数占所有病例的百分数;不良反应按WHO抗癌药物毒性分度(0-IV)标准进行评价。手足综合征按照Blum *et al*^[5]1999年报道的分级标准分为I-III度:I度为麻木、感觉迟钝、麻刺感、无痛肿胀等手足不便,但不影响正常活动;II度为手足明显的疼痛、红斑和肿胀,并影响了患者的日常生活行为;III度为手足明显脱屑、水疱或严重的疼痛以致不能工作,日常生活行为受到严重影响。

2 结果

2.1 治疗效果 AGC患者28例使用CAPE-LV-OXA方案化疗共102周期,其中2例患者因手足综合征拒绝进一步化疗,完成2个周期者4例,其中1例患者失访,3个周期7例,4个周期11例,5个周期3例,6个周期2例。可评价疗效者25例;CR 0例(0%), PR 13例(52%), SD 7例(28%), PD 5例(20%), RR为52%(13/25)。TTP为5.4(2-13) mo, MST为10.3(3-25) mo。

2.2 毒副反应 最常见的毒副反应为胃肠道反应,主要表现为恶心呕吐,总发生率为88%(22/25),wk 1明显,给予5-HT₃拮抗剂及胃复安等止吐治疗可缓解;白细胞减少总发生率为76%(19/25),其中I-II度发生率为68%(17/25),III度为8%(2/25),给予粒细胞集落刺激因子等治疗能够恢复;血小板减少发生率20%(5/25);手足综合征发生率亦较高,为48%(12/25),给予VitB6等治疗后多可缓解,2例III度患者终止化疗后缓解;口腔黏膜炎发生率为24%(6/25);肌肉关节痛20%(5/25);肝功能异常20%(5/25);末梢神经炎16%(4/25);腹泻8%(2/25)。25例患者均未见IV度毒副反应,无化疗相关性死亡(表1)。

3 讨论

尽管20余年来全世界范围内进行了许多关于化学治疗AGC的临床研究,但仍没有形成一个标准联合化疗方案^[6]。目前国内外采用较为广泛的一类联合化疗方案是铂类+5-FU+LV。而随着近年来新的化疗药物OXA、CAPE等的应用,新的化疗方案如OXA+5-FU+LV及CAPE+OXA被陆

■相关报道

Cutsem *et al*关于CAPE的一项随机对照研究表明,CAPE+LV组相对于单用CAPE组而言, LV对肿瘤反应率和平均TTP似乎并无影响,表明CAPE与LV在体内不具有协同作用;而这与体内FU与LV具有明确的协同作用相悖。而Chao *et al*曾经联用UFT、Tax、LV治疗AGC患者,结果发现疗效较好,耐受性良好。

表 1 CAPE-LV-OXA方案治疗AGC患者毒副反应情况

毒副反应	I 度	II 度	III 度	IV 度
恶心呕吐	14	8	0	0
白细胞减少	10	7	2	0
血小板减少	5	0	0	0
手足综合症	7	3	2	-
口腔黏膜炎	4	2	0	0
肌肉关节痛	5	0	0	0
肝功能异常	5	0	0	0
末梢神经炎	4	0	0	0
腹泻	2	0	0	0

续用于治疗AGC且取得了较好的效果,但是关于CAPE+5-FU+LV三联方案的报道很少。OXA作为第三代铂类抗肿瘤药物,以1,2-二氨基环己烷基团(DACH)取代顺铂(DDP)的NH₄及以草酸基取代Cl为结构特点,又称草酸铂,其抑制DNA作用更强,与顺铂无交叉耐药,与5-FU有协同作用,毒性明显低于顺铂,主要的不良反应为神经毒性,可用谷胱甘肽、钙镁合剂等预防。多项研究发现应用FUFOX方案(OXA、LV、5-FU)疗效肯定,耐受性良好^[7]。Cavanna *et al*^[8]治疗AGC患者56例,结果CR 1例(1.8%), PR 23例(41.1%), RR 42.9%, SD 20例(35.7%), PD 12例(21.4%), TTP 6 mo, MST 10 mo; III-IV度毒副反应包括骨髓抑制、胃肠道反应、口炎、外周神经毒性等,无化疗相关性死亡。

CAPE为新一代氟尿嘧啶类药物, *po*后在小肠完整吸收,生物利用度高,其本身无细胞毒性,通过体内三步酶链反应,最后由胸苷磷酸化酶(TP)代谢产生5-FU,而瘤体内TP浓度明显高于正常组织,胃癌中的比例可比正常组织高6倍左右,因此达到选择性杀伤癌细胞目的。最常见的毒副反应为手足综合征,由Lokich *et al*在1984年首次描述,表现为皮肤麻木、瘙痒、疼痛、红斑、肿胀、蜕皮、溃疡、水泡等,发生率大约为50%^[9]。2002年一项大规模多中心CAPE和5-FU/LV联合治疗结直肠癌比较性研究显示,CAPE治疗组有效率显著高于5-FU/LV治疗组(分别为25.7%和16.7%, $P<0.002$),并且除手足综合征发生较多外,其他毒副反应显著低于5-FU/LV治疗组^[10]。另外一项国外临床III期研究表明,与静脉5-FU单用或联用铂类相比,CAPE疗效相当甚至更高,毒副反应相近,使用则更为方便^[11];如联合使用OXA及Tax等则可增加CAPE抗癌效应,Chao *et al*^[12]联用另一种新一代氟尿嘧啶口

服药物替加氟(UFT)及Tax、LV治疗55例AGC患者,结果发现RR 50%, TTP 4.4 mo, MST 9.8 mo, 耐受性良好。然而2000年Van Cutsem *et al*^[13]关于CAPE的一项随机对照研究表明CAPE+LV组(35例)相对于单用CAPE组(34例)而言, LV对肿瘤反应率和平均TTP似乎并无影响,两组都有51%-63%的患者疾病达到稳定状态。

我们采用CAPE-LV-OXA方案治疗AGC,发现其疗效肯定,耐受性良好,且临床应用较为方便。25例可评价疗效患者中,有效率为52%(13/25),中位肿瘤进展时间(TTP)为5.4(2-11) mo,中位生存时间(MST)为10.3(3-25) mo;毒副反应主要表现为消化道反应、骨髓抑制、手足综合症、黏膜炎及外周神经毒性等,但大多为I-II度,且为可逆性,给予对症治疗基本均能缓解,没有发生化疗相关的死亡。但本方案与有关文献报道的CAPE+OXA方案相比,在总的RR、TTP、MST等方面似乎没有明显的改善^[14-15],这可能与药物的剂量及相对剂量、药物代谢动力学的复杂性、病例的选择有关,或者是因为LV体内并不能增强CAPE抗癌活性所致;这提示我们需要进一步去研究LV在以新一代5-FU类药物为基础的联合化疗方案中的效用。

4 参考文献

- 1 Ajani JA. Docetaxel in combination for advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002; 5 Suppl 1: 31-34
- 2 Sato A, Shimada K, Nakamachi M, Wada M, Koda T, Matsukawa M. Chemotherapy of irinotecan (CPT-11) combined with cisplatin in patients with advanced gastric cancer. *Nippon Rinsho* 2001; 59 Suppl 4: 375-380
- 3 Zaniboni A, Meriggi F. The emerging role of oxaliplatin in the treatment of gastric cancer. *J Chemother* 2005; 17: 656-662
- 4 Walko CM, Lindley C. Capecitabine: a review. *Clin Ther* 2005; 27: 23-44
- 5 Blum JL, Jones SE, Buzdar AU, LoRusso PM, Kuter I, Vogel C, Osterwalder B, Burger HU, Brown CS, Griffin T. Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 485-493
- 6 Ohtsu A. Current status and future prospects of chemotherapy for metastatic gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005; 8: 95-102
- 7 Kim DY, Kim JH, Lee SH, Kim TY, Heo DS, Bang YJ, Kim NK. Phase II study of oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin in previously platinum-treated patients with advanced gastric cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 383-387
- 8 Cavanna L, Artioli F, Codignola C, Lazzaro A, Rizzi A, Gamboni A, Rota L, Rodino C, Boni F, Iop A, Zaniboni A. Oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV) in patients with metastatic gastric cancer (MGC). *Am J Clin Oncol* 2006; 29: 371-375
- 9 Lokich JJ, Moore C. Chemotherapy-associated

■创新盘点

本文是一项连续性的病例研究报道,采用的化疗方案为口服给药CAPE-LV及静脉给药OXA,临床应用较为方便。

■应用要点

CAPE-LV-OXA方案治疗AGC,其疗效肯定,耐受性良好,且由于前两者的口服给药途径,使得临床上AGC患者在化疗过程中的生活质量得到一定提高,有望成为AGC患者的常规门诊化疗方案。

■同行评价

本文可读性和科学性较强,符合伦理学要求,具有一定的临床参考价值.

- palmar-plantar erythrodysesthesia syndrome. *Ann Intern Med* 1984; 101: 798-799
- 10 Twelves C. Capecitabine as first-line treatment in colorectal cancer. Pooled data from two large, phase III trials. *Eur J Cancer* 2002; 38 Suppl 2: 15-20
- 11 Dhillon S, Scott LJ. Capecitabine: in advanced gastric or oesophagogastric cancer. *Drugs* 2007; 67: 601-610
- 12 Chao Y, Li CP, Chao TY, Su WC, Hsieh RK, Wu MF, Yeh KH, Kao WY, Chen LT, Cheng AL. An open, multi-centre, phase II clinical trial to evaluate the efficacy and safety of paclitaxel, UFT, and leucovorin in patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 2006; 95: 159-163
- 13 Van Cutsem E, Findlay M, Osterwalder B, Kocha W, Dalley D, Pazdur R, Cassidy J, Dirix L, Twelves C, Allman D, Seitz JF, Schölmerich J, Burger HU, Verweij J. Capecitabine, an oral fluoropyrimidine carbamate with substantial activity in advanced colorectal cancer: results of a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1337-1345
- 14 Qian J, Qin SK, Mei JF, Chen YX, Shao ZJ, He ZM. Oxaliplatin plus capecitabine as a second line chemotherapy for patients with advanced gastric cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004; 26: 746-748
- 15 Park YH, Kim BS, Ryoo BY, Yang SH. A phase II study of capecitabine plus 3-weekly oxaliplatin as first-line therapy for patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 959-963

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2007)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年从6500种统计刊源析出的290余万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2006-01/12全文下载记录(2.1亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号:ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称:医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2611, 影响因子为0.460, 5年影响因子为0.482, 即年指标为0.148, 他引总引比为0.80, 被引期刊数为585, 被引半衰期为4.6, 2006载文量为696, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为17.7. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

功能性胃肠病的腹痛分型、鉴别诊断与罗马Ⅲ诊断标准的应用

廖常奎, 王佩秋

廖常奎, 王佩秋, 四川省妇幼保健院 四川省妇女儿童医院内科 四川省成都市 610031

作者贡献分布: 此课题由廖常奎设计; 研究材料收集由廖常奎、王佩秋共同完成; 数据分析和本论文写作均由廖常奎完成。

通讯作者: 廖常奎, 610031, 四川省成都市金牛区抚琴西路338号, 四川省妇幼保健院, 四川省妇女儿童医院内科。ckliao2004@126.com

电话: 028-87738249 传真: 028-87735539

收稿日期: 2007-11-26 修回日期: 2008-01-16

Application of Rome III criteria in typing and differential diagnosis of abdominal pain of functional gastrointestinal disorders

Chang-Kui Liao, Pei-Qiu Wang

Chang-Kui Liao, Pei-Qiu Wang, Department of Internal Medicine, Sichuan Provincial Hospital of Women and Children, Chengdu 610031, Sichuan Province, China

Correspondence to: Chang-Kui Liao, Department of Internal Medicine, Sichuan Provincial Hospital of Women and Children, 338 Fuqing West Road, Jinniu District, Chengdu 610031, Sichuan Province, China. ckliao2004@126.com

Received: 2007-11-26 Revised: 2008-01-16

Abstract

AIM: To study the application of Rome III criteria in typing and differential diagnosis of abdominal pain of functional gastrointestinal disorders (FGID).

METHODS: Abdominal pain in 85 cases of functional abdominal pain syndrome (FAPS), 128 cases of irritable bowel syndrome (IBS), and 50 cases of functional dyspepsia (FD) were typed and differentially diagnosed based on Rome III criteria according to the general condition as well as symptoms and signs of patients, and predisposing factors of abdominal pain.

RESULTS: Abdominal pain in FAPS, mainly localized at the abdominal median line and characterized by a shorter period of attack, serious symptoms and young age due to certain social and psychological impact factors, was not found to be related with eating and defecation.

The incidence of IBS manifested mainly as abdominal pain and FD was 43.75% and 76.00%, respectively. Gastrointestinal motility disorders in IBS and FD were closely related with eating and defecation. All the patients had similar background of psychological and mental behavioral disorder manifested as disturbance of perception in reduced gastrointestinal pain threshold value.

CONCLUSION: Typing and differential diagnosis of abdominal pain can be made according to its location, specific gastrointestinal motility disturbance related to eating and defecation, attack cycle, and extent of pain in FGID, IBS and FD.

Key Words: Rome III criteria; Functional gastrointestinal disorders; Gastrointestinal function disorder; Functional abdominal pain

Liao CK, Wang PQ. Application of Rome III criteria in typing and differential diagnosis of abdominal pain of functional gastrointestinal disorders. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 675-679

摘要

目的: 探讨功能性胃肠病(FGID)的腹痛分型、症状学鉴别诊断及相应罗马Ⅲ诊断标准的应用。

方法: 将功能性腹痛综合征(FAPS)85例、肠易激综合征(IRS)128例和功能性消化不良(FD)50例的患者,按一般情况、发病诱因和临床症状作表格登记调查,参照罗马Ⅲ诊断标准进行腹痛分型及鉴别诊断,并分析讨论其胃肠道动力学障碍、感知异常症状和发病机制。

结果: FAPS腹痛部位主要集中于腹中线,其与进食排便基本无关、发作周期较短、程度较重、年龄较青及社会-心理影响因子较重;以腹痛表现为主的IRS与FD相互重叠发生率为43.75%和76.00%,与进食排便相关的胃肠道动力障碍样症状明显;所有患者均有相似的精神心理行为失调背景作为胃肠道疼痛阈值降低的感知异常表现。

■背景资料

功能性胃肠病(FGID)是一种很常见的疾病,其中相当一部分患者以腹痛或腹部不适作为首要症状到医院就诊,因病因和处理原则有所不同,这就对临床提出了分型和鉴别诊断的要求。

■同行评议者

陈卫昌,教授,苏州大学附属第一医院消化内科

■研究前沿

目前对FGID关注的重点是从神经胃肠病学角度来认识本病,脑-肠轴双向作用是基础性的病理生理机制;未来几年胃肠动力相关性疾病领域的热点是IBS和胃食管反流病,而IBS存在黏膜免疫反应和炎症变化,今后可能对IBS有新的定义和评价

结论: 根据腹痛部位、与进食排便相关的特异胃肠道动力障碍、发作周期和疼痛程度一般可对三组FGID腹痛做出分型和鉴别。

关键词: 罗马Ⅲ诊断标准; 功能性胃肠病; 胃肠功能紊乱; 功能性腹痛

廖常奎, 王佩秋. 功能性胃肠病的腹痛分型、鉴别诊断与罗马Ⅲ诊断标准的应用. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 675-679
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/675.asp>

0 引言

新近颁布的功能性胃肠病罗马Ⅲ诊断标准^[1]与罗马Ⅱ诊断标准^[2]相比,对功能性胃肠病有了更全面、客观和实用的评价,其中将功能性腹痛综合征(functional abdominal pain syndrome, FAPS)单独列为一类。事实上,功能性腹痛是一组常见的属于胃肠综合征或功能性胃肠紊乱疾病(functional gastrointestinal disorders, FGIDs),在病理解剖方面无器质性病变基础,涉及包括功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)、肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)和FAPS等方面的诊断。腹痛症状往往是FGID患者就诊的主要原因,但各种功能性腹痛在症状学上有所重叠,诊断条件有差异。腹痛发生机制的核心是胃肠功能紊乱及生物-心理-社会概念的形成,因此病征之间有共性,具有胃肠动力障碍性疾病(disorders of gastrointestinal motility, DGIM)特征,属于神经胃肠病学范畴,均可能有动力和感知异常及中枢和周围神经异常^[3]。本研究旨在通过对各种功能性腹痛的症状学和特征分析,对有关罗马Ⅲ诊断标准应用进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 参考罗马Ⅲ诊断标准收集2003-06/2007-05 475例FGID女性患者,根据病因分组:(1)符合FAPS诊断的患者85例,年龄17-49(平均 26 ± 9)岁,病程0.5-2年;(2)符合IBS诊断的患者248例,病程1-20年,因腹痛就诊者128例(51.61%),年龄21-62(平均 34 ± 12)岁,其中56例重叠FD(43.75%)。主要症状表现为最近3 mo反复发作的腹痛或不适,伴有便后症状缓解、发作时伴有排便频率或大便性状改变;(3)符合FD诊断的患者142例,病程8 mo-10年,因腹痛就诊50例(35.21%),年龄19-58(平均 31 ± 15)岁,有38例重叠IBS(76.00%)。症状表现包括每周数次的餐后饱胀不适,早饱并伴有上腹胀暖气、呃逆的餐后不适综合征和与进食有关或无关的上腹痛、烧

灼痛的上腹疼痛综合征。以上腹痛患者共同的临床表现有主要靠近腹中线的上腹痛、脐周腹痛或中下腹痛,伴或不伴有餐后痛、排便缓解、上腹饱胀或腹胀、暖气恶心等症状,腹痛呈间歇性或持续性,严重者体质量降低。

1.2 方法 设计调查项目有:(1)一般项目,如年龄、病程、职业、受教育情况、经济、婚姻状况等;(2)4 wk内引起发病就诊的相关情况,如进食排便、情绪焦虑、失眠疲劳、压力竞争以及生活习惯、慢性病史等;(3)腹痛表现,包括腹痛部位、伴随症状(恶心呕吐或腹胀)、间歇持续、大便情况(排便后是否缓解)及腹部不适等。腹痛分级评估:记录患者腹痛发作期间情况,分为轻微(很少时间,或仅有不适症状)、轻度(偶尔)、中度(有时)、中-重度(间断)、重度(经常,或近乎持续性)。轻微和轻度包含腹部不适。

统计学处理 计数比例用百分率(%)表示;计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,采用 t 检验,计数资料用 χ^2 检验,采用行 \times 列表和四格表。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 研究对象的一般情况 三组腹痛患者的一般情况见表1。FAPS组与IBS和FD腹痛组各项指标相比,平均年龄小,病程较短,未婚者发生率高。各组腹痛患者发病中受职业因素影响最大的是非体力劳动($P < 0.01$),教育程度和经济状况以高中、大专文化及中等经济状况影响因素较大($P < 0.05$)。

2.2 各组腹痛患者发病情况及腹痛程度 IBS患者腹痛发生率高于FD患者(51.61% vs 35.21%, $P < 0.01$)。各组腹痛患者在烦躁焦虑、睡眠不良、心理社会应急等诱发因素上无明显差异。FAPS与FD腹痛发生部位主要位于靠近腹中线的中上腹部及脐周腹部,与IBS有显著差异($P < 0.01$),伴随腹胀厌食症状较多。IBS疼痛部位多不固定,呈局限性或弥漫性,以左下腹多见,伴有排便频率和性状改变,便后缓解率明显高于FAPS($P < 0.01$),与FD比较无明显差异($P > 0.05$)。FD受进食影响诱发疼痛明显重于FAPS和IBS($P < 0.01$)(表2)。各组腹痛程度分级表现:FAPS多数为中度、中-重度和重度,IBS主要为轻度、中度和中-重度程度,FD有轻微、轻度、中度和中-重度程度。不同组别腹痛程度之间有显著性差异($P < 0.01$,表3)。

2.3 IBS与FD共存情况 IBS与FD组腹痛患者相互重叠率较高,其中IBS重叠FD 56例(43.75%),反

表 1 腹痛一般情况调查(%)

比较项目	FAPS组	IBS组	FD组	合计
<i>n</i>	85	128	50	263
平均年龄(岁)	26±9	34±12	31±15	
病程(年)	0.5-2	1-20	0.67-10	
职业				
体力	15(17.24)	19(14.94)	12(23.53)	46(17.32)
非体力	47(55.17) ^b	74(57.47) ^b	22(44.12) ^b	143(54.19) ^b
其他	24(27.59)	35(27.59)	16(32.35)	75(28.49)
学历				
初中及以下	18(20.69)	27(20.69)	19(38.24)	64(24.02)
高中及大专	45(53.45) ^a	77(59.77) ^a	18(35.29) ^a	140(53.07) ^a
大学	22(25.86)	25(19.54)	13(26.47)	60(22.91)
婚姻情况				
已婚	31(36.21)	80(62.07)	31(61.76)	142(53.63)
未婚	54(63.79)	49(37.93)	19(38.24)	122(46.37)
经济状况				
较差	18(20.69)	28(21.84)	6(11.77)	52(20.67)
中等	50(58.62) ^a	66(51.72) ^a	27(52.94) ^a	143(54.19) ^a
良好	18(20.69)	34(26.44)	18(35.29)	70(26.26)

^a*P*<0.05 vs 初中及以下、大学和较差、良好经济状况; ^b*P*<0.01 vs 体力和其他职业。

表 2 三组腹痛患者发病诱因及发病情况对照(%)

分组	<i>n</i>	烦躁焦虑	睡眠不良	应急诱发	上腹中线痛	腹胀厌食	进食影响	排便缓解
FAPS	85	44(51.72)	44(51.72)	50(58.62)	57(67.24) ^b	35(41.38)	9(10.34)	10(12.07)
IBS	128	68(52.87)	76(59.77)	80(62.07)	41(32.18)	82(64.37)	31(24.14)	97(75.86) ^c
FD	50	25(50.00)	31(61.77)	32(64.71)	40(79.41) ^b	38(76.47)	38(76.47) ^a	19(38.24)

^a*P*<0.05 vs FAPS和IBS组; ^b*P*<0.01 vs IBS组; ^c*P*<0.05 vs FAPS。

之重叠38例(76.00%), 基本符合文献(23%-47% vs 29%-90%)以及以往作者IBS有41.75%重叠FD的报道。腹痛患者IBS与FD的共存情况反映出两组患者具有共同的DGIM机制。

3 讨论

三组FGID腹痛患者的症状有较大重叠性。以往对无器质性病变的腹痛患者容易遗漏或疏忽FAPS诊断, 罗马Ⅲ诊断标准对此判别的条件之一是不符合可能解释疼痛的其他功能性胃肠病标准, 就本文研究而言, 实质是剔除涉及与进食、排便有关和有IBS和FD特异性胃肠道功能障碍所引起的腹痛, 因而FAPS相对具有独立性。本调查表明FAPS具有以下特点: 1)病程或腹痛发作时间较短, 两次或以上的腹痛之间无联系, 有孤立性症状发作特征; 2)年龄较轻, 以青壮年为主, 症状多呈痉挛性疼痛; 3)部位主要分布在

腹中线, 多为脐周, 疼痛分级评估较重; 4)腹痛较少受进食影响, 排便后是否缓解亦无特异性。三组腹痛较为明确的有关病理生理机制: 1)生物-社会-心理背景, 包括职业、受教育程度、婚姻情况和经济状况等。表1显示三组腹痛患者在非体力劳动、高中、大专文化程度及中等经济状况者等人群中发生率较高, 这些人群社会地位不稳定, 精神心理行为亚健康或不健康, 多受社会文化因素、精神情绪波动、焦虑烦躁和慢性社会应急事件等诱因的影响。其中FAPS的发生年龄较小和未婚者较多, 因此心理行为障碍对FAPS的影响相对较大。2)脑-肠轴双向作用, 罗马Ⅲ诊断标准已将此机制作了进一步解释: CNS对正常内脏信号放大, 脑-肠轴双向信息传递将胃肠道与中枢的情感和认知中心联系在一起, 外部或内在的感受信息可影响胃肠道感觉、运动、分泌和炎症, 胃肠道的信息也会影响痛觉

■创新盘点

本文应用罗马Ⅲ诊断标准对FGID腹痛进行分型和鉴别诊断, 着重探讨FGID腹痛的分型特征及临床意义, 这是与其他FGID相关文章的不同之处。

■应用要点

罗马Ⅲ标准将原罗马Ⅱ标准包含溃疡型、动力障碍型和不定型的FD重新定义为餐后不适综合征和上腹疼痛综合征, 旨在重视和强调FAPS的重要性与独立性, 并给功能性腹痛以新的诊断定位, 这有助于临床工作对此有新的认识。

■名词解释

FAPS: 本质是一种胃肠源性疼痛或不适综合征, 仍然属于神经胃肠病学范畴, 符合心因性动力病概念, 但一般不具有FD和IBS与进食、排便有关的胃肠动力紊乱特征。

表 3 三组腹痛分级评估对照 $n(\%)$

分组	轻微	轻度	中度	中-重度	重度	合计
FAPS	4(5.88)	11(14.71)	19(22.35) ^b	26(30.59) ^b	25(29.41) ^b	85(100)
IBS	16(12.64)	31(24.14)	40(31.03)	29(22.99)	12(9.20)	128(100)
FD	7(14.71)	12(23.53)	19(38.24)	9(17.65)	3(5.88)	50(100)

^b $P < 0.01$ vs IBS和FD组。

中枢、情绪和行为。3)运动障碍与感觉过敏, 在本调查中, 三组腹痛患者都存在虽然影响因子有所不同但与腹胀厌食、进食排便有关的胃肠动力障碍和作为各种心因障碍为诱因引起疼痛阈值较正常胃肠道降低的内脏感觉异常现象。

此外, 各组腹痛发生的解剖学区域有一定特征性, 存在着重叠与泛化。FAPS与FD组腹痛部位多见于腹中线附近的上腹部或中上腹部, 同时较多有上消化道动力障碍。由于FAPS受排便过程影响较小, 左半结肠及直肠功能紊乱和刺激症状较少, 一般与IBS无重叠关系。而FD, 有学者^[6-7]认为最常见的病理生理过程是近端胃容受功能损害, 40%-70%有此异常, 同时肠道运动变化还有弥漫性改变, 较多重叠IBS。Bonapace *et al*^[9]报道11%FD患者有小肠转运时间延长, 31%有结肠转运时间延长。对于IBS腹痛, 较为统一的意见认为是由腹部不适或腹痛伴排便异常组成的一组肠功能紊乱综合征, 以大便习惯改变为主要特征, 常存在胃-结肠反射异常。文献^[8-10]述以腹痛为主的IBS患者结肠腔内压力增高, 结肠及直肠对腔内气囊扩张耐受性明显降低, 同时引起收缩阈值及痛阈降低、收缩幅度大、持续时间长, 94%患者因此疼痛强度增加。在重叠FD时, 这种腹痛可泛化到上腹部, 伴腹胀恶心表现。

三组患者腹痛分级程度也有所不同, FAPS患者中-重度和重度较多, 比IBS和FD有显著性差异, 这可能与中枢神经系统的内脏信号放大有关, 因为这些患者精神紧张、情绪波动和焦虑程度更重, 但确切机制尚不明。FD和IBS腹痛, 有研究认为与内脏感觉异常关系密切, 存在腹腔感觉(对化学、机械)敏感性增高^[11], 大约有1/3-2/3FD患者对胃扩张有感觉过敏, 较小的胃内容积可以使FD患者产生上腹部不适及疼痛^[12]。同样, IBS患者胃肠道感受各种刺激比正常人更为敏感, 50%-60%的患者内脏痛觉过敏^[13]。由于许多胃肠功能性疾病对感觉处理的缺陷可能发生在胃肠壁的机械感受器, 并通过多种神经介

质在不同水平上参与刺激各种受体, 予以放大后传入更高一级神经元或者中枢神经系统特定部位, 因此, FGID患者腹腔内脏对疼痛过敏和忍受性降低是系统改变的局部表现之一。

IBS与FD的共存是一种常见情况, FAPS是否IBS、FD有共存? 我们目前掌握的资料还不能对此说明。但是三组患者的疼痛发生机制从神经胃肠病学角度上看与心身疾病相关的情感综合征有关, 如抑郁、焦虑、疑病和应急等因素诱发, 因而符合“心因性动力病”^[14]概念。

本研究资料均来自女性, 由于强调心理社会因素在引起DGIM发病的作用, 因此女性在本病中占有特殊地位。流行病学调查显示, 无论是胃或肠道发病FGID都以女性为主^[15-16], 可见以女性作为研究对象的重要性。罗马III诊断标准将原包含餐后不适综合征和上腹疼痛综合征的功能性消化不良重新定义和划分, 旨在重视和强调FAPS的独立性与重要性, 并给予功能性腹痛以新的诊断定位, 这将有助于我们在面对这种尤其是女性患者常见病征时思路更加清晰及判断明确, 从而更好地指导临床工作。

4 参考文献

- 1 Drossman DA, Dumitrascu DL. Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; 15: 237-241
- 2 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II43-II47
- 3 Wingate D, Hongo M, Kellow J, Lindberg G, Smout A. Disorders of gastrointestinal motility: towards a new classification. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S1-S14
- 4 Talley NJ, Stanghellini V, Heading RC, Koch KL, Malagelada JR, Tytgat GN. Functional gastroduodenal disorders. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II37-II42
- 5 Thumshirn M, Camilleri M, Saslow SB, Williams DE, Burton DD, Hanson RB. Gastric accommodation in non-ulcer dyspepsia and the roles of *Helicobacter pylori* infection and vagal function. *Gut* 1999; 44: 55-64
- 6 Tack J. Functional Dyspepsia: Impaired Fundic Accommodation. *Curr Treat Options Gastroenterol*

- 2000; 3: 287-294
- 7 Bonapace ES, Maurer AH, Davidoff S, Krevsky B, Fisher RS, Parkman HP. Whole gut transit scintigraphy in the clinical evaluation of patients with upper and lower gastrointestinal symptoms. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2838-2847
- 8 Sinhamahapatra P, Saha SP, Chowdhury A, Chakrabarti SK, Ghosh A, Maiti B. Visceral afferent hypersensitivity in irritable bowel syndrome--evaluation by cerebral evoked potential after rectal stimulation. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2150-2157
- 9 Simren M, Abrahamsson H, Bjornsson ES. An exaggerated sensory component of the gastrocolonic response in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2001; 48: 20-27
- 10 Accarino AM, Azpiroz F, Malagelada JR. Selective dysfunction of mechanosensitive intestinal afferents in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995; 108: 636-643
- 11 Rhee PL, Kim YH, Son HJ, Kim JJ, Koh KC, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. The etiologic role of gastric hypersensitivity in functional dyspepsia in Korea. *J Clin Gastroenterol* 1999; 29: 332-335
- 12 Mertz H, Fullerton S, Naliboff B, Mayer EA. Symptoms and visceral perception in severe functional and organic dyspepsia. *Gut* 1998; 42: 814-822
- 13 Wingate D, Hongo M, Kellow J, Lindberg G, Smout A. Disorders of gastrointestinal motility: towards a new classification. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S1-S14
- 14 Talley NJ, Piper DW. A prospective study of social factors and major life event stress in patients with dyspepsia of unknown cause. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 268-272
- 15 Blanchard EB, Keefer L, Galovski TE, Taylor AE, Turner SM. Gender differences in psychological distress among patients with irritable bowel syndrome. *J Psychosom Res* 2001; 50: 271-275

■同行评价

本文罗马 III 诊断标准探讨功能性腹痛的特点,具有一定的临床指导意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志作者修改稿 增加科学新闻稿的内容

本刊讯 论文有一个供本专业以外的读者阅读的中英文科学新闻稿,与文章正文分开,篇幅可以达到1000以内,其中摘要75字以内。这个科学新闻稿,不含数字,缩写,首字母缩略语或计量单位,除非特别重要。他含有对研究工作的背景和原理所做的一个简短的介绍,接下来是对主要结论的一个陈述,陈述部分以"Here we show"或相似的语句开始。有趣的辅助性图片对科学新闻稿也是很有帮助的。

科学新闻稿发布在EurekAlert/AAAS新闻中心(<http://chinese.eurekalert.org/zh/index.php>)。EurekAlert!中文版是由美国科学协会(AAAS)主办的一项联机全球的新闻服务。EurekAlert!中文版,向大学、医疗中心、期刊、政府机构、企业和其他机构提供一个信息发布中心的服务。该机构可通过EurekAlert!中文版向媒体发布新闻。EurekAlert!中文版还向公众,提供新闻和信息来源。EurekAlert!中文版新闻涵盖所有科学、医学和技术领域。该中心为922个学术机构(包括世界华人消化杂志)提供科学新闻,并即刻传达给世界各地的5400位注册记者。这意味着您的工作会引起世界上所有主流媒体机构的关注,他们也许会选择在报纸或其他媒体中对您的工作进行特别报道。

我们的新闻发布服务将包括通讯作者的详细联系方式,重要基金资助论文及文章的文献出处著录和网页链接的信息。(总编辑:马连生 2008-02-28)

双胎妊娠合并急性脂肪肝1例

徐亚丽

■背景资料

妊娠期急性脂肪肝, 是妊娠晚期急性特发的严重并发症, 其发病率低, 起病急骤, 病情危重, 及早诊断, 合适治疗非常必要。

徐亚丽, 成都中医药大学硕士研究生 四川省成都市 610075
通讯作者: 徐亚丽, 610075, 四川省成都市, 成都中医药大学
十二桥路校区学生二公寓405室, 535527xyl@163.com
电话: 028-66603457
收稿日期: 2007-11-29 修回日期: 2008-02-08

Twin pregnancy complicated with acute fatty liver

Ya-Li Xu

Ya-Li Xu, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China
Correspondence to: Ya-Li Xu, Room 405, Student Apartment, Shierqiao Road School District, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China. 535527xyl@163.com
Received: 2007-11-29 Revised: 2008-02-08

Abstract

Twin pregnancy complicated with acute fatty liver was found in a woman of thirty-one years old, and skin itching, digestive symptoms and jaundice were main manifestations. Acute fatty liver of pregnancy (AFLP) is usually severe and termination of pregnancy plays a key role in the treatment of AFLP. Early diagnosis and suitable treating method may result in a favorable prognosis.

Key Words: Acute fatty liver; Pregnancy; Diagnosis; Prognosis

Xu YL. Twin pregnancy complicated with acute fatty liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 680-681

摘要

双胎妊娠合并急性脂肪肝患者1例, 以皮肤黏膜搔痒、消化道症状及黄疸为表现, 起病急, 病情重, 及早终止妊娠是治疗AFLP的关键, 诊断及时, 治疗得当, 预后良好。

关键词: 急性脂肪肝; 妊娠; 诊断; 预后

■同行评议者

黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

徐亚丽. 双胎妊娠合并急性脂肪肝1例. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 680-681
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/680.asp>

0 引言

妊娠期急性脂肪肝(acute fatty liver of pregnancy, AFLP)是妊娠晚期急性特发的严重并发症. 其发病率低, 起病急骤, 病情危重. 现报道1例AFLP, 结合文献加以讨论。

1 病例报告

患者曹某, 女, 31岁, 初产妇, 因停经34+5 wk, 呕吐4 d, 加重1 d于2007-09-14入院. 患者1个多月前出现皮肤黏膜搔痒, 双下肢水肿. 4 d前出现恶心, 呕吐, 今日呕吐加重, 呕出胃液带少量血丝. 既往否认肝炎结核等传染病史, 无外伤, 无药物食物过敏史. 入院查体: T: 36.6℃, P: 78次/分, R: 20次/分, BP: 108/68 mmHg, 神清合作, 皮肤巩膜轻度黄染, 心肺未见异常, 腹部膨隆, 肝脾未扪及, 双肾区无扣痛, 双下肢无水肿. 辅助检查: 血常规未见异常. 肝肾功: 肌酐: 242.8 μmol/L, 尿素: 9.7 mmol/L, 血尿酸: 657 μmol/L, ALP: 902 U/L, AST: 386 U/L, ALT: 297 U/L, LDH: 774 U/L, TBIL: 175.5 μmol/L, DBIL: 91.4 μmol/L, Na⁺: 129.1 mmol/L, Mg²⁺: 2.07 mmol/L, 总蛋白: 57.1 g/L, 白蛋白: 27.7 g/L, 脂肪酶: 166 U/L, 淀粉酶: 44 U/L. 凝血全套: PT: 15.2 s, APTT: 43.6 s. B超提示: 宫内双活胎. 胎儿一头位, 一臀位. 左肝、胆囊、胰腺显示不清. 右肾轻度积水. 2007-09-14行急诊剖宫术, 难产两活婴, 体质量均为2000 g, APGAR评分分别为: 4分-5分-8分, 5分-7分-9分. 子宫内黄染. 术中出血约400 mL, 术后阴道流血累计约400 mL. 查血常规: WBC: 21×10⁹/L, N: 81%, HGB: 91 g/L, PLT: 67×10⁹/L. 多次查D二聚体阳性, 凝血全套: APTT: 17.7 s, APTT: 51.5 s, FIB: 0.5 g/L. 血氨: 8.1 mmol/L. 肝肾功: 尿素: 11.0 mmol/L, 肌酐: 128.0 mmol/L, ALB: 25.1 g/L, AST: 51 U/L, ALT: 28 U/L, LDH: 615 U/L, ALP: 257 U/L, TBA: 197.3 μmol/L, TBIL: 139.8 μmol/L, DBIL: 77.2 μmol/L. 甲肝、戊肝标志物为阴性, 输血全套为阴性. 尿常规: 尿胆原弱阳性, 胆红素(+), 隐血(+), 尿蛋白(+), WBC: 8-10/HP, RBC: 0-2/HP. 彩超提示: 脂肪肝.

胆囊壁水肿增厚声像。右肾轻度积水,腹腔少量积液。CT示:脂肪肝表现,胰腺形态丰满,腹腔少量积液,胸腔少量积液。妊娠期合并急性脂肪肝诊断明确。治疗上给予输血小板、红细胞悬液、新鲜冰冻血浆、冷沉淀、白蛋白、维生素K1等。予补液、抗感染、保肝,退黄、抑酸等对症支持治疗。经内科治疗,患者恶心呕吐症状消失,皮肤巩膜黄染消退,复查肝肾功各项指标恢复正常出院。

2 讨论

本例的特点是头胎,双胎,男胎产妇,发生在妊娠晚期,起病急,以皮肤黏膜瘙痒、消化道症状及黄疸为表现,病情危重。

妊娠急性脂肪肝多发于妊娠中晚期,孕32-38(平均在35)wk,头胎妊娠,双胎或多胎妊娠者且为男胎者容易发病。其发病机制尚不明确,越来越多的研究表明AFLP与线粒体脂肪酸氧化功能障碍(fatty acide oxidation disorders, FAOD)有关^[1]。

AFLP临床表现可为疲乏不适,头痛等不典

型表现,病情发展迅速,可出现恶心、呕吐、黄疸,多部位出血,DIC,肝肾衰竭、肝性脑病等表现。实验室特点是肝脏的合成功能异常:低蛋白血症、弥散性血管内凝血、肝酶升高和白细胞计数升高;肝脏的分泌功能异常:高胆红素血症,血尿素氮、肌酐和尿酸增加,抗凝血酶III(ATIII)降低;肝脏的代谢功能异常:低血糖、高血氨和贫血。转氨酶通常是升高的^[2]。AFLP诊断主要依靠病史,症状体征、实验室检查,结合影像学检查。B超、CT影像学对诊断有一定的帮助,也可做肝脏穿刺活检。诊断时需排除急性病毒性肝炎,病史、血清肝炎病毒标志物等检查可协助鉴别诊断。

目前尚无特殊治疗,及早终止妊娠是治疗AFLP的关键。一旦明确诊断,应立即终止妊娠。内科治疗纠正凝血障碍,保护脏器功能,保肝等对症处理,支持治疗,处理并发症。

3 参考文献

- 1 王丽晖,吴广礼.妊娠急性脂肪肝最新研究进展.中国急救医学 2006; 26: 689-691
- 2 杨孜.妊娠急性脂肪肝的诊断和处理.中国医刊 2003; 38: 12-13

■同行评价

妊娠急性脂肪肝多发于妊娠中晚期,起病急,病情重,目前尚无特殊治疗,及早终止妊娠是治疗AFLP的关键。一旦明确诊断,应立即终止妊娠。因此,及时诊断,合适治疗非常有必要,本文报道一例较典型病例,并复习文献,可加深读者对该病的认识。

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起,世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.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。凡在在线办公系统注册的用户,将可获得世界华人消化杂志最新出版消息。

胰源性门脉高压伴乳糜腹水1例

郭佳, 黄宗文

■背景资料

乳糜腹水是指腹腔内积聚富含乳糜颗粒的腹水, 呈乳白色, 发病率很低。而重症急性胰腺炎后并发胰源性门脉高压、乳糜腹水在临床上更为罕见。查阅万方数据库2002年至今和CNKI数据库1984年至今无1例相关报道, 查阅维普数据库1989年至今只有1例慢性胰腺炎伴乳糜腹水的报道。因此临床上因少见易导致漏诊, 早期诊断对治疗及预后有一定帮助。

郭佳, 黄宗文, 四川大学华西医院中西医结合科 四川成都市 610041

通讯作者: 黄宗文, 610041, 四川成都市, 四川大学华西医院中西医结合科. huangzongwen@medmail.com.cn

收稿日期: 2007-08-01 修回日期: 2008-01-23

Pancreatic portal hypertension complicated with chylous ascites: one-case analysis

Jia Guo, Zong-Wen Huang

Jia Guo, Zong-Wen Huang, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Zong-Wen Huang, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. huangzongwen@medmail.com.cn

Received: 2007-11-29 Revised: 2007-02-08

Abstract

Chylous ascites is a rare clinical manifestation characterized by ascitic chylomicrons, ivory white, and its morbidity rate is much lower. Severe acute pancreatitis with pancreatic portal hypertension and chylous ascites is more infrequent, and early diagnosis is of great values.

Key Words: Chylous ascites; Severe acute pancreatitis; Portal hypertension

Guo J, Huang ZW. Pancreatic portal hypertension complicated with chylous ascites: one-case analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 682-683

摘要

乳糜腹水是指腹腔内积聚富含乳糜颗粒的腹水, 呈乳白色, 发病率较低。而重症急性胰腺炎后并发胰源性门脉高压、乳糜腹水在临床上更为罕见。早期诊断有重要意义。

关键词: 乳糜腹水; 重症急性胰腺炎; 门脉高压

郭佳, 黄宗文. 胰源性门脉高压伴乳糜腹水1例. 世界华人消化

杂志 2008; 16(6): 682-683

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/682.asp>

0 引言

乳糜腹水是指腹腔内积聚富含乳糜颗粒的腹水, 呈乳白色, 发病率约1:20000^[1]。而重症急性胰腺炎后并发胰源性门脉高压、乳糜腹水在临床上更为罕见。查阅万方数据库2002年至今和CNKI数据库1984年至今无1例相关报道, 查阅维普数据库1989年至今只有1例慢性胰腺炎伴乳糜腹水的报道, 为此将我院1例病例报道如下。

1 病例报告

患者35岁男性, 住院号906871, 因“反复腹胀2 mo”于2005-05-30入院。既往1998年因“重症急性胰腺炎、胰腺脓肿”在我院手术治疗, 术后出现肠痿, 1999年又因“肠痿”在我院行肠切除吻合术。2004-03/2004-10“胃出血2次”, 入院查体: 生命体征平稳, 消瘦, 腹部膨隆, 移动性浊音阳性, 腹部有三条手术疤痕, 双下肢无水肿。院外两次彩超提示“门脉高压、脾脏长大、腹腔中-大量积液”, 院外胃镜示“食道下段静脉曲张”。入院检查生化、血常规、大小便常规基本正常。腹水检查: 外观为乳白色, 浑浊、不凝固, 苏丹III染色阳性, 细胞数 $470 \times 10^9/L$, 总蛋白13.9 g/L, 葡萄糖10.3 mmol/L, 镜下可见大量的脂肪滴, 病检可见较多淋巴细胞, 腹水涂片未见细菌与真菌。腹部彩超“脾脏长大、腹腔积液、门静脉主干增粗, 肠系膜近汇合口处显示不清(栓塞或狭窄), 肠系膜上静脉周围查见较多的静脉血管: 侧枝循环, 肠系膜上动脉阻力指数增高”。诊断: 胰源性门脉高压, 乳糜腹水。入院后主要给予桃仁、红花、赤芍、川芎、当归和丹参等活血化瘀, 同时给予氨体舒通和双氢克尿塞, 治疗14 d, 症状好转, 腹水吸收, 出院随访。

2 讨论

当胰腺疾病引起脾静脉阻塞时, 大量的脾血将

■同行评议者

曹杰, 主任医师, 广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科

取道胃网膜左静脉、胃短静脉经胃壁静脉从胃左静脉回流至门静脉, 造成脾胃血流区域高压而门静脉压正常, 临床上称为左侧门脉高压症, 又称胰源性门脉高压症^[2]。主要表现为胰腺疾病的症状、上消化道出血、脾功能亢进、肝功能正常。他的特点是胰腺疾病、胃底或/食管下段静脉曲张、脾肿大、肝功能正常, 但很少出现大量的腹水, 特别是乳糜腹水。本例诊断胰源性门脉高压明确, 但乳糜腹水的病因尚不完全清楚, 可能是多种因素共同作用的结果。按先天性和继发性病因将乳糜腹水进行分类。成人最常见的病因是腹腔恶性肿瘤。其中恶性淋巴瘤占乳糜腹水的85%, 而婴儿则以先天性病因为多见。在继发性病因中, 除了肿瘤以外还有炎症、手术后、创伤等。乳糜腹水发病机制^[3]主要是(1)损伤性因素: 由于各种手术或外伤引起乳糜池淋巴干的损伤或使乳糜囊肿破裂; (2)阻塞性因素: 某种原因使胸导管腹腔淋巴管及其分支受压阻塞而引发; (3)炎症性因素: 可因细菌致胸导管内炎性分泌物增加及纤维化或因淋巴结充血, 淋巴管壁水肿致淋巴管狭窄或阻塞乳糜渗漏入腹腔。本例考虑主要是手术及炎症导致淋巴管狭窄或阻塞造成。辅助检查^[3]现在最常用的是放射性核素淋巴管显像, 他主要利用^{99m}Tc-

DX显像不透过毛细血管壁而仅停留在淋巴系统的特点, 借助 γ 相机可获得清晰的淋巴管行经图像, 可以了解淋巴管通畅情况, 同时利用淋巴结内网状内皮细胞能吞噬放射性胶体颗粒的功能, 行淋巴结核素显像, 可清晰显示各组淋巴结。另外还有淋巴管造影术、口服¹³C-软脂酸、腹部CT扫描、腹部B超及全消化道造影。治疗上主要是原发病的治疗, 同时低脂、低钠、高蛋白饮食, 可用MCT法: 即饮食中脂肪为中链甘油三酯, TPN(全胃肠外营养)等、对腹水量大症状明显者可行腹腔穿刺, 但只能缓解症状。对有明确的淋巴管破裂或阻塞者及保守治疗无效者可行手术治疗。本例患者经检查排出肿瘤和结核后主要使用抽腹水、利尿减轻症状, 同时中药活血化瘀治疗, 改善微循环障碍、促进腹水吸收。因此中药也是治疗的重要手段之一。

3 参考文献

- 1 张延龄. 乳糜腹水. 国外医学. 外科学分册 2001; 24: 212-215
- 2 何天霖, 周颖奇, 曹贵松, 胡先贵. 左侧门脉高压症的诊断和外科治疗. 第二军医大学学报 2002; 23: 803-804
- 3 何峰, 李春跃, 孙热军. 乳糜性腹水的临床分析-附1例报告及20余年国内文献分析. 罕见疾病杂志 2002; 9: 20-22

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

■同行评价

本文科学性、创新性和可读性一般, 具有一定的临床价值。

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

• 消息 •

WCJD 和 WJG 开始实行网络版文章 与该文章发表前纪录的链接

本刊讯 WCJD和WJG从2008年第16卷第2期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。(总编辑: 马连生 2008-02-28)

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈克能 主任医师

北京大学临床肿瘤学院暨北京肿瘤医院胸一科

陈其奎 教授

中山大学附属第二医院消化内科

程英升 副教授

上海交通大学附属第六人民医院放射科、上海交通大学影像医学研究所

邓长生 教授

武汉大学中南医院消化内科

房静远 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

龚建平 教授

重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

韩天权 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

何超 教授

浙江大学医学院附属邵逸夫医院

李定国 教授

上海交通大学医学院(原上海第二医科大学)附属新华医院消化内科

李国威 教授

西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李旭 副教授

广东省广州市南方医院急诊科

刘彬彬 副研究员

复旦大学附属中山医院、复旦大学肝癌研究所

刘占举 教授

郑州大学第二附属医院消化内科

刘作金 副教授

重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

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

宁琴 教授

华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科

牛建昭 教授

北京中医药大学

欧希龙 副教授

东南大学中大医院消化科

潘兴华 副主任医师

成都军区昆明总医院病理实验科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化研究室

沈薇 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

施瑞华 教授

南京医科大学第一附属医院消化科

孙秀发 教授

华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

谭学瑞 教授

汕大医学院第一附属医院院长室

王晓艳 副教授

湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

吴建国 教授

武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室

向德兵 讲师

重庆第三军医大学大坪医院病理科, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心

许玲 副教授

第二军医大学长征医院中医科

赵平 副教授

第二军医大学微生物学教研室