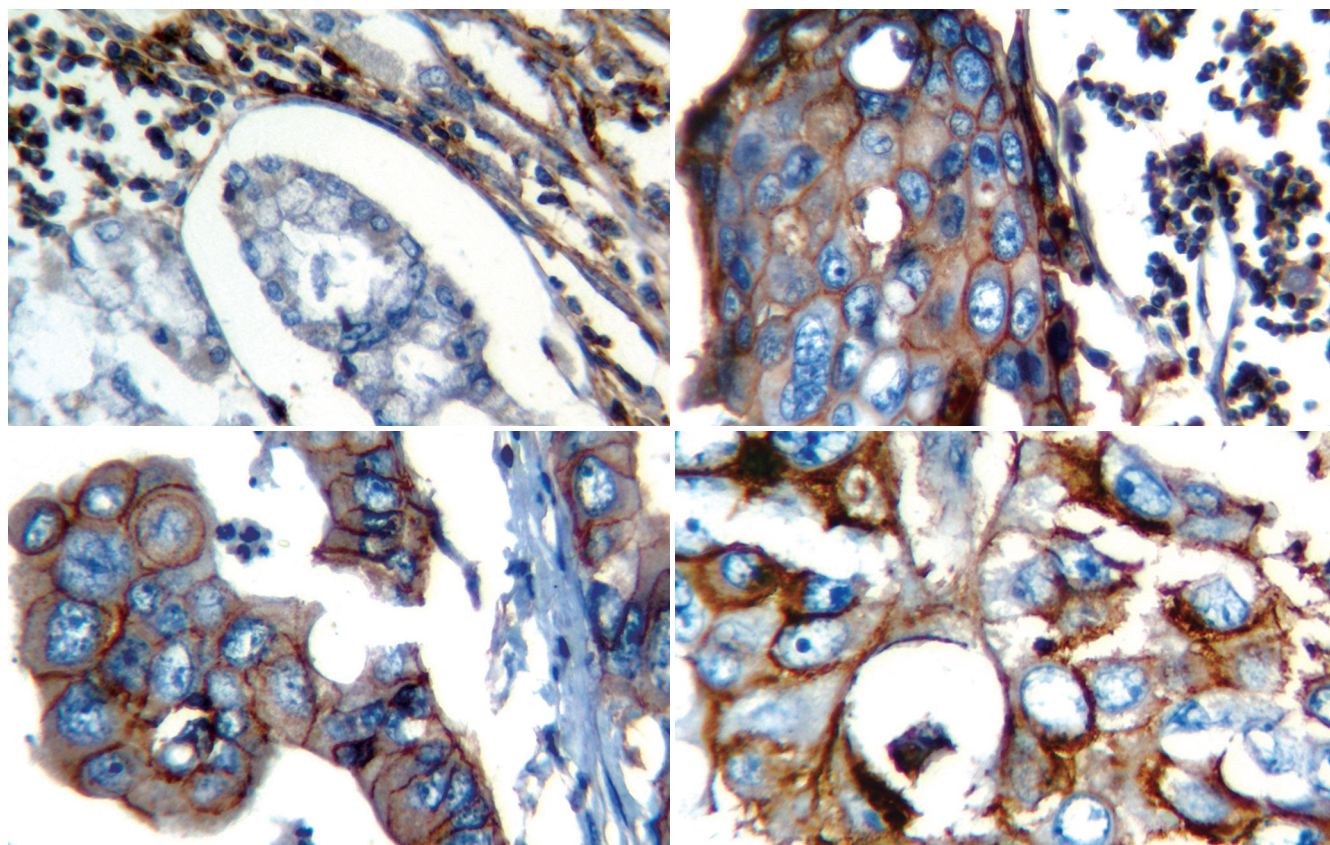


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 11 月 28 日 第 16 卷 第 33 期 (Volume 16 Number 33)



33 / 2008

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
白文元教授
苒新明教授
陈洪副教授
陈军贤主任医师
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈卫昌教授

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

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

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

消化外科学

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

龚建平教授
巩鹏教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
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
李涛副主任医师
李文岗副教授
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

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

消化感染病学

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

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

消化中医药学

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

消化肿瘤学

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

消化影像学

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

消化内镜学

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

消化介入治疗学

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

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授

刘鲁明教授
唐文富副主任医师
王学美研究员

消化基础研究

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

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2008 年 11 月 28 日 第 16 卷 第 33 期 (总第257期)

述 评

3705 结直肠癌分子靶向治疗药物研究现状

郁宝铭

基 础 研 究

3713 *restin*基因转染对裸鼠胃癌移植瘤生长的影响

张建永, 李锦毅, 李红玉, 戴聪, 马春雷, 王向党

3719 酪丝缢肽对人肝癌细胞SMMC-7721血管生成相关基因表达谱的影响

张宁, 王鲁, 赵一鸣, 梁英, 吴伟忠, 樊嘉, 汤钊猷

3724 HBV pre-X转染HepG2细胞后差异表达基因的筛选

柴艳云, 张锦前, 赵龙凤, 王琪, 成军

3729 谷氨酰胺对体外培养肠上皮细胞屏障通透性的影响

崔巍, 闻颖, 董亚路, 刘沛

3734 糖尿病大鼠回肠肌间神经丛mGluR1及mGluR5的表达

白艳华, 张军, 史红阳, 戴菲, 李芳伟

临 床 研 究

3740 幽门螺杆菌在胃癌及其癌前疾病中的原位检测及意义

于秀文, 董楠楠, 宫月华, 徐倩, 袁媛

3746 宜兴市胃癌手术患者临床特征分析1022例

周炎, 曾金艳, 白津, 龚伟达, 潘建强, 谈永飞, 李爱萍, 周建伟

3752 乙型肝炎肝硬化患者外周血和肝组织中HBV cccDNA的定量检测

李莹, 韩涛, 高英堂, 刘磊, 王毅军, 景丽, 张涛, 杜智

3759 阿德福韦酯体外对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的影响

陈月, 陈洪涛, 吴诗品, 岳化葵, 马云, 方爱萍

文 献 综 述

3765 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在肝星状细胞静止表型维持中的作用

侯懿耕, 张园园, 贾洁, 胡晔, 吴松, 方步武

3769 肝靶向胆酸-脂肪酸偶合物的研究进展

靳雪源, 王惠芬

3775 门静脉高压药物治疗的新进展

马骁, 刘冰熔

3782 胰腺星状细胞与胰腺癌的相互关系

倪建琦, 蒋小华, 汤文浩

3787 抑癌基因RUNX3与消化系肿瘤关系的研究进展

陶军, 邓涛

研 究 快 报

3792 JNK信号通路在 δ 氨基酮戊酸-光动力疗法诱导SW480细胞凋亡中的作用机制

郑江华, 陈开, 陈祖林

临 床 经 验

3796 食管-贲门黏膜撕裂综合征临床分析78例

袁二燕, 张洁, 吕宗舜

3801 Runx3与Ki67分子在慢性胃炎胃黏膜肠化生及胃癌组织中的表达及相互关系

彭真, 赵治国, 刘占举, 索明果, 唐芙爱

	<p>3805 氩离子凝固术在放大色素内镜下治疗胃黏膜癌前病变90例 袁海锋, 唐少波, 奚锦要</p> <p>3810 幽门螺杆菌感染在慢性胃炎患者中的危险因素 苏爱平, 许翠萍, 房晓芬, 王建春, 张太新</p> <p>3814 健康教育干预对肝硬化失代偿期患者生活质量的影响 张汉语, 瞿金城, 刘平</p>
致 谢	3818 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>3718 世界华人消化杂志名词术语标准</p> <p>3728 世界华人消化杂英文摘要要求</p> <p>3733 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>3745 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>3751 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>3758 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策</p> <p>3764 世界华人消化杂志计量单位标准</p> <p>3774 世界华人消化杂作者正文要求</p> <p>3781 世界华人消化杂志作者署名要求</p> <p>3786 世界华人消化杂网络版的发表前链接</p> <p>3791 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>3800 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>3804 世界华人消化杂志被收录情况</p> <p>3809 世界华人消化杂志数字用法标准</p> <p>3813 世界华人消化杂志中文摘要要求</p> <p>3817 世界华人消化杂志投稿方式</p>
封面故事	Ghaffarzadehgan K, Jafarzadeh M, Raziee HR, Sima HR, Esmaili-Shandiz E, Hosseinneshad H, Taghizadeh-Kermani A, Moaven O, Bahrani M. Expression of cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma and its prognostic importance. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 16(41): 6376-6381 http://www.wjgnet.com/1009-9327/16/6376.asp
本期责任人	编务 李慧; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-11-28 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>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p> <p>2008年版权归世界华人消化杂志所有</p>
--	---	--

中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号	82-262	国外代号	M 4481	国内定价	每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证	1401004000050
------------	--------------------------------	------	--------	------	--------	------	--------------------	---------	---------------

World Chinese Journal of Digestology

November 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 33

EDITORIAL	3705 Current status of molecular targeted therapeutic drugs for colorectal cancer <i>Yu BM</i>
BASIC RESEARCH	<p>3713 Effect of restin gene transfection on human gastric carcinoma xenograft growth in nude mice <i>Zhang JY, Li JY, Li HY, Dai C, Ma CL, Wang XD</i></p> <p>3719 Microarray analysis of tyroservatide-regulated angiogenesis gene expression profile in human hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721 <i>Zhang N, Wang L, Zhao YM, Liang Y, Wu WZ, Fan J, Tang ZY</i></p> <p>3724 Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with HBV pre-X <i>Chai YY, Zhang JQ, Zhao LF, Wang Q, Cheng J</i></p> <p>3729 Effect of glutamine on intestinal epithelial barrier permeability <i>in vitro</i> <i>Cui W, Wen Y, Dong YL, Liu P</i></p> <p>3734 Expression of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 in the myenteric plexus of the diabetic rat ileum <i>Bai YH, Zhang J, Shi HY, Dai F, Li FW</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3740 <i>In situ</i> detection of <i>Helicobacter pylori</i> in gastric cancer and precancerous diseases and its significance <i>Yu XW, Dong NN, Gong YH, Xu Q, Yuan Y</i></p> <p>3746 Clinical feature analysis of 1022 cases undergoing gastric cancer operation in Yixing city <i>Zhou Y, Zeng JY, Bai J, Gong WD, Pan JQ, Tan YF, Li AP, Zhou JW</i></p> <p>3752 Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in peripheral blood and hepatic tissues of cirrhotic patients with hepatitis B <i>Li Y, Han T, Gao YT, Liu L, Wang YJ, Jing L, Zhang T, Du Z</i></p> <p>3759 Effects of adefovir dipivoxil on the function of dendritic cells from chronic HBV-infected patients <i>in vitro</i> <i>Chen Y, Chen HT, Wu SP, Yue HK, Ma Y, Fang AP</i></p>
REVIEW	<p>3765 Effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ on the maintenance of quiescent phenotype of hepatic stellate cells <i>Hou YG, Zhang YY, Jia J, Hu Y, Wu S, Fang BW</i></p> <p>3769 Research progress in liver targeted fatty acid bile acid conjugates <i>Jin XY, Wang HF</i></p> <p>3775 Advances in drug treatment of portal hypertension <i>Ma X, Liu BR</i></p> <p>3782 Relationship between pancreatic stellate cells and pancreatic cancer <i>Ni JQ, Jiang XH, Tang WH</i></p> <p>3787 Research progress in the relationship between RUNX3 gene and digestive system neoplasm <i>Tao J, Deng T</i></p>
RAPID COMMUNICATION	3792 Role of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in SW480 cell apoptosis in response to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy <i>Zheng JH, Chen K, Chen ZL</i>

CLINICAL PRACTICE	<p>3796 Mallory-Weiss syndrome: a clinical analysis of 78 cases <i>Yuan EY, Zhang J, Lv ZS</i></p> <p>3801 Expression of Runx3 and Ki67 in chronic gastritis with intestinal metaplasia and gastric carcinoma and their correlations <i>Peng Z, Zhao ZG, Liu ZJ, Suo MG, Tang FA</i></p> <p>3805 Argon plasma coagulation under magnifying chromoendoscopy for gastric premalignant lesions: an analysis of 90 cases <i>Yuan HF, Tang SB, Xi JY</i></p> <p>3810 Risk factors for <i>helicobacter pylori</i> infection in patients with chronic gastritis <i>Su AP, Xu CP, Fang XF, Wang JC, Zhang TX</i></p> <p>3814 Effect of health educational intervention on life quality of patients with decompensated liver cirrhosis <i>Zhang HY, Qu JE, Liu P</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	3818 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Ghaffarzadehgan K, Jafarzadeh M, Raziee HR, Sima HR, Esmaili-Shandiz E, Hosseinneshad H, Taghizadeh-Kermani A, Moaven O, Bahrani M.</i> Expression of cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma and its prognostic importance. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 16(41): 6376-6381 http://www.wjgnet.com/1009-9327/16/6376.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Hui Li</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date November 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@wjgnet.com

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
Director: Hai-Ning Zhang

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

结直肠癌分子靶向治疗药物研究现状

郁宝铭

郁宝铭, 上海市第八人民医院结直肠外科 上海市 200025
郁宝铭, 教授, 博士生导师, 主任医师, 主要从事普外科兼肛肠外科临床教学和科研, 以诊治结直肠肿瘤为特色, 在结直肠癌的综合治疗、低位直肠癌的保肛手术以及肿瘤患者个体化治疗等方面均达到国际、国内领先水平。

通讯作者: 郁宝铭, 上海市漕宝路8号, 上海市第八人民医院结直肠外科. baomingiok@163.com

电话: 021-64514139 传真: 021-64514139

收稿日期: 2008-05-22 修回日期: 2008-11-10

接受日期: 2008-11-17 在线出版日期: 2008-11-28

Current status of molecular targeted therapeutic drugs for colorectal cancer

Bao-Ming Yu

Bao-Ming Yu, Department of Colorectal Surgery, the Eighth People's Hospital of Shanghai Municipality, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Bao-Ming Yu, Department of Colorectal Surgery, the Eighth People's Hospital of Shanghai Municipality, 8 Caobao Road, Shanghai 200025, China. baomingiok@163.com

Received: 2008-05-22 Revised: 2008-11-10

Accepted: 2008-11-17 Pubilshed online: 2008-11-28

Abstract

In addition to surgery, radiation and chemotherapy, molecular targeted therapy has become the fourth approach in the treatment of colorectal cancer. There were a numerous therapeutic drugs that have been investigated, including bevacizumab, cetuximab and panitumumab, which have been approved to treatment advanced and/or metastatic colorectal cancer (mCRC) by Food and Drug Administration (FDA). This paper presents a series of recent phase-II and -III trials on these three agents as the second and first line treatment for mCRC, and their efficacy and safety are, especially discussed.

Key Words: Colon cancer; Rectal cancer; Molecular targeted treatment; Bevacizumab; Cetuximab; Panitumumab; Vascular endothelial growth factor; Epidermal growth factor receptor

Yu BM. Current status of molecular targeted therapy for colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(33): 3705-3712

摘要

分子靶向治疗已成为结直肠癌除外科手术、放射和化疗的第四种治疗方法。有许多分子靶向药物在研究, 贝伐单抗、西妥昔单抗和潘尼单抗是得到批准应用于治疗进展性和/或转移性结直肠癌的三个药物。本文即介绍这三种药物在Ⅱ期和Ⅲ期二线和一线治疗转移性结直肠癌的疗效和安全性。

关键词: 结肠癌; 直肠癌; 分子靶向治疗; 贝伐单抗; 西妥昔单抗; 潘尼单抗; 血管生成因子; 表皮生长因子受体

郁宝铭. 结直肠癌分子靶向治疗药物研究现状. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3705-3712

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3705.asp>

0 引言

肿瘤的发生发展是一个多基因、多阶段的演变过程, 细胞的恶变首先是分子水平的改变。因此从分子水平来修正和处理, 从而阻断细胞恶变的基础和环境, 这是从根本上动摇和消灭肿瘤的方法和策略。但有许多基因, 从哪一个基因着手, 这是从根本上来进行探索和研究的课题。随着分子生物学的不断发展, 人们进一步认识到癌肿的发生发展是由一系列分子事件所构成, 包括信号传导的异常、生长因子受体失调、血管生长因子分泌的异常, 原癌基因和抑癌基因的平衡失调以及基质金属蛋白酶的异常分泌等。因而当前针对这些分子事件作为靶点, 不断开发研究靶向药物, 从而为肿瘤治疗带来了新的曙光。

1971年Suden Follman发现在鼠的角膜上种植1个肿瘤10 d后周围有血管长入, 继而肿瘤迅速长大。如将这些血管无论用机械或化学方法阻断, 使肿瘤得不到血液供应, 肿瘤生长停顿, 肿瘤即萎缩。这一现象给人们所提供了2个信息。一是肿瘤生长发展必须依赖有良好的血液供应; 二是肿瘤在原本没有血管的角膜上、周围出现大量新生血管, 表明肿瘤必然会产生一种促使

■背景资料

随着分子生物学的不断发展, 人们进一步认识到癌肿的发生发展是由一系列分子事件所构成, 包括信号传导的异常、生长因子受体失调、血管生长因子分泌的异常, 原癌基因和抑癌基因的平衡失调以及基质金属蛋白酶的异常分泌等。因而当前针对这些分子事件作为靶点, 不断开发研究靶向药物, 从而为肿瘤治疗带来了新的曙光。

■同行评议者

李华山, 副主任医师, 中国中医科学院广安门医院肛肠科

■研发前沿

对肿瘤分子靶向治疗的研究已成为当前的热点,并逐渐深化。

血管形成的物质,称为血管生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。因而提出了“饥饿疗法”,即让肿瘤得不到血供营养而死亡,并寻找能够抑制对抗阻碍血管生长的物质。至1994年得到第1个具抑制血管生成的物质称为“Angiostatin”。然而在10年后第1个可应用于临床,对结直肠癌具有明确疗效的贝伐单抗获得美国FDA批准,至今相继已有10余种分子靶向药物获准用于各种恶性肿瘤。同时至少还有20种药物被证实具有不同程度的抗血管生成作用。其中大约80%是针对VEGF,即以VEGF作为靶点。因为不但在实体肿瘤,甚至在白血病中也发现VEGF是极为重要的、有效的治疗靶点。因此在2004年美国FDA官员McClellan提出“抗血管生成治疗可作为癌肿治疗除手术、放射和化疗后第4种治疗方法”。当前针对分子靶向治疗的药物研究非常多,下面仅就目前在治疗结直肠癌中获得证实有效的研究作一简要介绍。

1 贝伐单抗

贝伐单抗(Bevacizumab, BV; 商品名: Avastin)是一种重组的人源化、人鼠嵌合抗VEGF的单克隆抗体。在结直肠癌中约有50%以上患者肿瘤的VEGF表达阳性而在正常结直肠黏膜上皮和良性肿瘤中到几乎无表达。贝伐单抗作为一种抑制血管生长的药物,直接作用于VEGF上,阻碍其与VEGFR的结合从而阻断VEGFR的活化,发挥其抗血管生成的作用。最新对抗血管生成的作用只了解它具有抑制新生血管形成和破坏已存在的新生血管网(床)结构的作用。最近更了解到并强调它具有使肿瘤血管正常化(normalization)的作用。表面上看这一作用似乎具有改善肿瘤血供的效果,似乎与抑制肿瘤发展的要求相背道而驰。然而当与化疗相结合应用时为保证化疗药物可有效地进入肿瘤从而发挥杀伤肿瘤细胞的作用至关重要。另一方面,通过改变肿瘤血管床,减少血管渗出,降低肿瘤间质中的已升高的压力,使化疗药可更容易地释放至肿瘤内发挥其细胞杀伤作用。同时改善肿瘤缺氧的环境可达到抑制和减少对VEGF分泌的刺激;此外还具有抑制内皮干细胞的补充,从而从源头上减少新生血管形成的物质基础^[1-2]。

贝伐单抗在临床前研究中显示了针对VEGF的鼠抗人的单克隆抗体对人肿瘤的异种移植的生长具有抑制作用,进而这种人源化的单克隆抗体贝伐单抗(Avastin)在治疗各种肿

瘤的临床研究中进行了评估。在Ⅱ期转移中位性结直肠癌的研究中证实与5-FU/LV联合应用比5-FU/LV单药能提高有效率(response rate, RR)、疾病进展时间(time to progression, TTP)和中位生存(duration of survival)^[3]。继之,美国的一个Ⅲ期临床研究,比较了贝伐单抗和伊立替康(innotecan, Iri)以及静脉注射氟嘧啶(FU)+亚叶酸钙(leucovorin)(IFL)与单纯推注IFL一线治疗转移性结直肠癌(mCRC)随即入组。联合治疗组402例,单纯化疗组411例。结果显示联合治疗组中位生存期20.3 mo,单纯化疗组15.6 mo, $P<0.001$ 。一年生存率74.3% vs 63.4%, $P<0.001$; 无进展生存期(progression free survival, PFS)分别为10.6 mo与6.2 mo($P<0.001$); 总有效率(overall response rate, ORR)分别为44.8%与34.8%, $P=0.004$; 中位有效时间分别为10.4 mo与7.1 mo($P<0.001$)。研究再次证明贝伐单抗联合化疗与单纯化疗相比,确能提高生存时间和总的有效率^[4]。最近一项Ⅱ期研究探讨了采用静脉滴注Iri+FU+LV(FOLFIRI方案)与BV结合在疗效和安全性方面的情况。通过41例502个周期的使用结果显示,中位无进展生存期(PFS)为12.6 mo; 有效率62%; 疾病稳定33%; 3和4级毒副反应包括发生2例3级粒细胞减少和3例腹泻,其结果比历史对照组好。结论认为这一方案作为转移性结直肠癌(mCRC)的一线治疗是一良好的优选^[5]。贝伐单抗在mCRC中与标准化疗一线或二线治疗结合的疗效和安全性的研究都已有报道。另一项至今最大的临床研究(AVIRI实验),在世界范畴内有31个中心,209例患者入组,采用BV和FOLFIRI作为mCRC的一线治疗。其有效率(RR)44%, 疾病控制率(DCR)90%, 6 mo的PFS为82%, 再次表明这个治疗方案的有效性和安全性^[6]。最近报道了一项大组的贝伐单抗在第1次进展后mCRC中的疗效(BRiTE实验), 总共入组治疗1953例患者, 中位随访17.5 mo, 有1369例为第1次疾病进展和839例死亡。结果表明应用贝伐单抗在第1次疾病进展后的mCRC患者中可获得较长生存期的疗效, 从而支持进行前瞻性随机临床研究来进行评估^[7]。

贝伐单抗在Ⅰ项Ⅲ期前瞻性研究中已显示与一线IFL化疗结合治疗转移性结直肠癌(mCRC)可使总生存率(OS)提高30%, 那么贝伐单抗与FOLFOX或XELOX相结合时疗效和安全性又如何呢? 在Ⅲ期随机一线治疗mCRC的No. 16966研究中, 共有1401例入组,

随机分为FOLFOX、XELOX、FOLFOX+BV和XELOX+BV四组。研究的主要目标为PFS, 结果显示加用BV后PFS明显延长($P = 0.0023$), FOLFOX和XELOX的PFS为8.0 mo, FOLFOX+BV和XELOX+BV的PFS为9.4 mo。结论是在奥沙利铂基础的化疗方案中加入BV可明显提高PFS^[8]。BEAT实验汇集了41个国家1927例mCRC患者入组。目前这一研究的最终结果尚未完全获得。从中期1914例可分析的病例中BV与一线化疗FOLFOX方案相结合者占28%, 一线化疗方案为FOLFIRI者26%, XELOX方案占18%, 一线为5-FU和卡培他滨(CAP)者16%。882例的中位PFS期10.4 mo, FOLFOX组中为10.5 mo, XELOX组10.3 mo, FOLFIRI组11.1 mo, 5-FU和CAP组为9.1 mo。805例的肿瘤进展时间(TTP)为10.8 mo。BV在一线治疗mCRC中与各种化疗相结合的初步结果与大组III期随机研究的结果是一致的^[9]。奥沙利铂基础的化疗方案与BV联合具有可进一步提高化疗疗效的作用这一点已可确定。但从E3200实验和No. 16966实验中所看到FOLFOX与BV联合应用所得到的PFS是有明显差异的。在进一步分析这二个研究时发现治疗时限与PFS的改善程度具有一定相关性。治疗时限不但影响PFS, 对不良反应的发生率也有影响。如何在这二者间取得平衡以达到最高效益, 这是未来临床研究中需要探索和解决的问题^[10]。鉴于卡培他滨具有在疗效相当、不良反应轻、使用方便等优点, 当前已取得取代5-FU的地位, 在联合方案中广泛使用Capox。那么当Capox与BV联合应用时, 如何优化卡培他滨(Cap)的剂量和应用方案是另一个值得探讨的问题。对此最近一个II期研究A-ICOX方案的初步报告已显示当Cap剂量增加至3000 mg/m², 分二剂连续服用7 d, 休7 d OX 85 mg/m²和BV 5 mg/kg, 每2周1次, 作为1个周期。在40例入组36例可评估的分析中, 中位应用周期为4周期10例(33%)达到PR, 8例(27%)可行肝转移灶切除, 3/4级血液毒副反应仅2例(7%), 其他3/4级毒副反应包括腹泻10%、手足综合征7%、周围神经病7%、恶心7%和呕吐7%。目前对A-ICOX方案的III期研究正在进行中^[11]。

当前BV联合5-FU/LV以及Iri或OX已成为转移性结直肠癌的标准治疗方案。而最近在III期研究中也已证明Cap可取代静脉注射的5-FU/LV和Iri或OX以及BV联合其疗效是可信的。那么安全性如何? 最近另一个随机对照II期研究证实

了Cap Iri+BV和CapOX+BV的疗效相仿, 毒副反应除神经病变外也无明显差异^[12]。在证实CapOX+BV在mCRC中的疗效与安全性的同时^[11-13], 人们自然关心为mCRC患者选用CapOX+BV方案作为新辅助治疗时, 对肝切除的影响, 在可行肝切除的患者中, 按6个周期治疗的计划, 当BV用至手术前5周时不再给予, 那么不但手术可以安全地进行, 手术和伤口愈合的并发症并不增加, 出血严重性亦不增加, 而且肝切除的再生动能也不变影响^[14]。此外最近还报道了一个BV与放疗和5-FU联合作为局部进展期直肠癌新辅助治疗的I/II期研究, 共有22例T₃/T₄期无转移的直肠癌患者进行了这个实验。通过手术标本的连续切片, PET-FDG扫描监测和血尿标本中肿瘤标志物如VEGF的分析测定, 初步结果表明在标准放化疗中加入BV对局部进展期直肠癌是安全的和有效的, 可产生良好的效果。通过PET检测, 了解FDG的摄取可判断对新辅助治疗的效应。而且血中肿瘤标志物的变化与最终病理变化是密切相关的^[15]。虽然这仅仅是一个I/II期的研究结果, 但从上述研究, 可反映和提示贝伐单抗在结直肠癌综合治疗中的作用和地位将日趋重要, 应用范围也在不断扩大。

2 西妥昔单抗

近年来有越来越多证据表明表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)与许多肿瘤的发生和发展有关。在各种实体肿瘤中EGFR表达率最高的是头颈部肿瘤, 达95%-100%。结直肠癌则为第2位, 表达率高达72%-89%。EGFR表达阳性的癌肿具有恶性度高、侵袭力强的特点, 而且EGFR表达水平的高低与预后相关。因而同样成为当前肿瘤分子靶向治疗的一个重要靶点。

EGFR是一种跨膜生长因子受体, 跨膜糖蛋白, 由原癌基因C-erb B1编码。EGFR是HER家族的成员之一。多种内源性配体包括EGF、TGF- α 、双向调节因子、肝素结合型EGF和B纤维素都可激活EGFR。当配体与受体在细胞外结构区结合时, 可引起细胞膜构象的改变, 促进受体二聚化, 活化蛋白激酶, 继而激活基因的表达, 从而产生一系列细胞反应。随着人们对EGFR作为肿瘤治疗靶点的潜力的认识不断增强, 迅速促进了抗EGFR药物的发展。当前在进行研究的EGFR抑制剂主要有二类, 一类是针对EGFR受体胞外区的单克隆抗体(MAbS), 另一类是抑制

■相关报道

当前对C-225的研究已不止局限在II、III期与各种化疗方案结合一、二、三线的治疗, 还进行了在局部进展期直肠癌中与化放疗联合的新辅助治疗, 而且初步结论表明都是安全有效, 值得进一步探索的

■应用要点

抗血管生成治疗
可作为癌肿治疗
除手术、放射和
化疗后第4种治疗
方法。

EGFR胞内区酪氨酸激酶的小分子化合物。

西妥昔单抗(Cetuximab, C-225; 商品名: Erbitux, 爱必妥)是一种以人EGFR作为靶点的IgG1型MAb, 能特异地与EGFR结合, 其亲和力高于内源性配体, 从而竞争性地与EGFR结合, 发挥抑制EGFR的作用。西妥昔单抗阻断EGFR的生物效应是通过减少酪氨酸激酶的激活, 继而影响与肿瘤生长和转移相关的所有细胞功能, 包括细胞增值、存活、DNA复制、肿瘤血管生长、以及细胞的迁移和侵袭等。同时西妥昔单抗可促使EGFR内化, 使细胞表面受体水平下调和受体信号减少。此外西妥昔单抗还可激活抗体依赖细胞介导的细胞毒副作用。在大量临床前研究中, 西妥昔单抗显示了多种细胞系和动物体内肿瘤模型中具有良好抗肿瘤作用, 并在化疗和/或放疗抑制肿瘤上具有协同作用^[16-17]。西妥昔单抗的临床研究始于1994年, 至2004年终获美国FDA批准单药与CPT-11联合用于进展期/转移性结直肠癌的二线治疗。

Saltz *et al*报道1组非随机II期研究, 入组对象为转移性结直肠癌对5-FU/LV+伊立替康已产生耐药的患者给予西妥昔单抗与伊立替康, 伊立替康的剂量与给药时间与原先治疗失败时相同, 总共入组患者138例。患者的中位KPS为90%(60%-100%), 总的有效率(ORR)为13%, 疾病控制(DCR)为53%, 中位疾病进展时间(mTTP)为2.6 mo, 中位生存期达7.7 mo^[18]。继之Saltz *et al*又对57例同类患者, 入组时中位ECOG状况评估为0(0-2)。入组患者从伊立替康失效至开始给予西妥昔单抗治疗中位间隔时间为2(0.5-10.6) mo。结果PR为5例(9%), SD21例(37%), DCR46%, mTTP和mOS分别为1.4 mo和6.4 mo^[19]。

欧洲BOND研究是一项随机II期临床研究共有329例, 以往曾接受过多疗程治疗, 且最近一次是以伊立替康(CPT-11)为基础的化疗后出现病情进展的转移性结直肠癌患者, 以2:1随机分为C-225单药治疗组($n = 111$)和C-225+CPT-11联合治疗组($n = 218$)。结果显示联合治疗组的RR 23%, 明显高于单药治疗组11%, $P = 0.007$; 疾病控制率分别为56%与32%, $P < 0.001$; mTTP分别为4.1 mo与1.5 mo, $P < 0.001$; 但中位生存期分别为8.6 mo与6.9 mo, 在统计学上无显著差异($P = 0.48$)。值得注意的是在单药治疗组中有56例疾病进展后又进行C-225+CPT-11联合治疗, 其中4%达到PR, DCR

达到36%。这些治疗结果纳入联合治疗组一并计算。鉴于这些病例单药治疗时的总生存期没有数据, 只能从联合用药算起, 可能是影响最终统计数的一个原因, 当然也不能排除二组确实没有差异^[20]。

然而一项针对两个开放性多中心II期临床研究中24例患者的回顾性分析指出, 先后接受C-225和CPT-11治疗的患者自一线治疗开始的中位总生存期为32 mo, 对18例接受C-225和CPT-11联合治疗的患者自一线治疗开始的中位生存期则为35 mo, 而从未接受过C-225治疗的6例患者生存期为23 mo, $P = 0.58$ ^[21]。

最近另一项II期临床研究报道了EGFR表达阳性经5-FU, 草酸铂(OXA)和CPT-11治疗失败后应用C-225的转移性结直肠癌患者共346例, 治疗总的有效率(RR)为12.4%, 疾病稳定率(SD)为32%, 疾病控制率(DCR)为46%, 无进展生存1.4 mo, 总生存期6.6 mo^[22]。

来自意大利的一组资料评估了CPT-11/cetuximab治疗对CPT-11和草酸铂(OXA)已出现耐药的60例转移性结直肠癌患者, 结果显示达到PR者12例(20%), DC达50%, PFS为3.1 mo, OS为6 mo。他们还发现CPT-11/cetuximab周方案可作为门诊治疗方案, 患者耐受性良好。

西妥昔单抗在晚期结直肠癌的二线治疗中显示出良好的疗效后, 目前已有多项II期临床研究显示C-225不论是单药或与CPT-11或OXA联合在晚期结直肠癌的治疗中亦具有较高有效率。Rougier *et al*报道C-225+FOLFIRI的有效率为43%^[23]; Holer *et al*报道FUFOX+C-225的有效率为55%; Rosenberg *et al*报道C-225+IFL的有效率为44%^[24]; Diaz Rubic *et al*报道C-225+FOLFOX4的有效率为81%^[25]; Folprecht *et al* C-225+FOLFIRI以AIO方案给予的有效率为67%。其中特别在C-225联合AIO方案、FOLFIRI方案和FOLFOX4方案中肝转移瘤的切除率分别为24%, 13%和21%。这使原来不能切除的肝转移瘤变为可切除的转移瘤, 从而为提高治愈率提供了一条新的途径和希望^[26]。关于一线治疗晚期结直肠癌的CALGB80203研究的结果于2006年ASCO会议上已有初步报道。不论FOLFOX或FOLFIRI, C-225联合化疗组的有效率均比单纯化疗组高, 分别为52% vs 38%($P = 0.029$)。但其PFS与OS结果尚未报道。

在最近报道的CRYSTALIII期研究结果中

显示, 1217例随机对比C-225+FOLFIRI与单纯FOLFIRI一线治疗转移性结直肠癌。中位PFS明显以加用C-225组优越, 8.9 mo vs 8 mo($P = 0.036$); RR分别为46.9% vs 38.7%, $P = 0.005$, 亦以加用C-225组为优。加用C-225后使疾病进展的风险降低约15%。不良反应是可以预期的, 腹泻为中度, 皮肤反应加用C-225比单用FOLFIRI组则明显增加^[27]。在II期以C-225+XELOX作为一线治疗mCRC的研究中则取得RR 40%, DC 80%, 中位有效时间8.8 mo, 无药物相关死亡。结论认为此方案可行、安全, 毒副作用可通过减少剂量和延长间隔用药来处理^[28]。另一个随机II期OPUS研究结果, 比较C-225+FOLFOX4与单用FOLFOX4一线治疗mCRC, 是欧洲70多个中心参加有337例入组。加用C-225组RR为49%, 单用FOLFOX4组36.8%; 3/4级毒副作用加C-225组皮肤红斑为9.4%, 其他反应并不增加; PFS和OS结果尚未出来, 但至少有效率是增加的^[29]。据报道, 在常用各化疗方案中加用C-225, 对mCRC不但可提高其有效率, 对原本不能切除的转移性病变还可增加其切除率^[30]。

皮肤反应是C-225所特有的不良反应, 而且反应的轻重与最终的疗效有密切相关。最近的EVEREST研究结果显示了C-225在标准剂量下无皮肤反应或仅轻微反应的患者在给予加大剂量至每周500 mg/m²后总的有效率有所改善。而药代动力学品行则与以往经验一致, 患者对治疗是能够耐受的。加用C-225可明显提高各种常用化疗方案的疗效, 这在上述II、III期研究中均已获证明, 那么对患者生活质量的影响又是如何呢? 一个有多国家参予的III期研究EPIC实验和在澳大利亚进行的NCIC CTG和AGITG CO17实验对应用C-225后患者疗效与生活质量两方面的情况进行了分析。结论是加用C-225组的PFS和RR有明显提高, 在改善生存的同时也提高了生活质量^[31-32]。

当前对C-225的研究已不止局限在II、III期与各种化疗方案结合一、二、三线的治疗, 还进行了在局部进展期直肠癌中与化放疗联合的新辅助治疗, 而且初步结论表明都是安全有效, 值得进一步探索的^[33-34]。另一个值得注意的研究是对一线治疗将贝伐单抗、西妥昔单抗与化疗结合在一起的联合方案的探索初步结果也是可以的^[35]。总之分子靶向药物已成为当前结直肠癌综合治疗中众所盼望能创造奇迹的一个重要手段。

3 帕尼单抗

帕尼单抗(Panitumumab)-人源EGFR单抗ABX-EGF是一种针对EGFR的高亲和性和完全人源化的单克隆抗体。其作用机制与C-225相似, 与C-225不同的是Panitumumab是全人源化的表皮生长因子受体IgG2单克隆抗体。在一项II期临床研究中, 入组对象为一线治疗失败而EGFR表达阳性的晚期结直肠癌患者共148例给予Panitumumab方案治疗, 结果显示PR15, SD54例。其中EGFR表达水平与疗效呈正相关^[37]。最近一项II期临床研究结果显示Panitumumab单药治疗以往治疗失败的转移性结直肠癌可以降低46%肿瘤进展风险, PR达到8%。90%患者会发生皮疹, 且皮疹的发生率与患者的中位生存期密切相关^[38]。Peeters *et al*在2006年ASCO会议上报道了一组III期临床研究的结果, 在469例对以往化疗包括5-FU, OXA和CPT-11治疗失败的晚期结直肠癌患者随即分为二组, 一组为支持治疗+Panitumumab, 另一组单纯支持治疗。结果显示二组中位无进展生存期(PFS)分别为90 d和60 d。联合治疗组明显优于单纯支持治疗 $P < 0.001$, 联合治疗组有8%的有效率。至治疗第32周时, 联合治疗组的存活患者数为支持治疗组2倍; Panitumumab的主要不良反应为皮疹、乏力、腹痛、恶心和腹泻^[39]。鉴于Panitumumab所取得的治疗效果, 因此美国FDA于2006-09批准了Panitumumab可用于治疗对5-FU, OXA和CPT-11已经失效的晚期结直肠癌患者, 作为单药三线治疗。最近Amado *et al*报道一组III期临床随机对照研究结果发现, 在比较Panitumumab联合最佳支持治疗(BSC)与单纯最佳支持治疗对化疗已失败的转移性结直肠癌427例时, 同时对采用PCR检测KRAS状态。结果野生型KRAS占57%, 突变型KRAS占43%。在联合治疗组中野生型和突变型KRAS的mPFS分别为12.4 wk和7.4 wk。BSC组的mPFS均为7.3 wk。二种治疗并无差异, 有效率(PR)分别为17%与0%。SD分别为34%与12%。联合分析时野生型KRAS的总生存期(OS)比突变型KRAS长。此外对363例联合治疗($n = 188$)和单纯治疗($n = 175$ 例)患者进行根据患者自诉临床转归(PRO)分析, 在野生型KRAS患者中联合治疗组的结直肠癌症状和健康相关生活质量(采用EQ-5D评分)均显著优于单纯BSC组。然而对突变型KRAS患者, 二组治疗患者的结直肠癌症状或健康相关生活质量均无显著差异。该研究结果提示在进

■同行评价

本文结构清楚, 可读性强, 具有较高的学术价值。

行靶向治疗前应先检测KRAS基因的分型,而仅对KRAS为野生型的患者才给予Panitumumab的治疗。而且这一检测甚至也适用妥昔单抗的患者^[40-41]。2007-12, Panitumumab获欧盟EMA批准可用于KRAS基因野生型结直肠癌患者。既然Panitumumab的靶点是EGFR,那么EGFR表达的情况是否影响Panitumumab的疗效呢,无疑这是众所关注的一个问题。最近Bertin *et al*和Hecht *et al*分别对EGFR表达不同程度而对以往各种化疗失效的转移性结直肠癌患者观察应用Panitumumab的疗效。Berlin *et al*报道一项II期多中心研究,计划入组300例中期结果分析,91例初步结论认为Panitumumab在标准化疗失败的肿瘤表达EGFR $\geq 10\%$ 的患者中具有抗肿瘤的作用。但研究还在进行最终结果尚有待以后报道^[42]。Hecht *et al*报道的是另一组II期多中心研究观察比较Panitumumab在对以往氟嘧啶、伊利替康、奥沙利铂等化疗失败疾病进展患者EGFR表达($<1\%$)或低表达 $1\%-9\%$ 的疗效。研究计划为150例,中期结果分析88例,其结论是不表达或低表达患者的疗效与高表达患者一样有效^[43]。而这一组资料的最新报道中期分析91例疗效和118例的安全性结论是结果再次证实了早期所见,在低表达和不表达EGFR的肿瘤患者中, Panitumumab照样具有抗肿瘤作用,在安全性方面痤疮性皮炎是最常见的不良反应,其发生率为72%, 3/4级占6%; 红斑的发生率为69%, 3/4级占6%; 皮肤瘙痒65%, 3/4级4%; 低血镁53%, 3/4级10%^[44]。关于安全性的最新报道,欧洲汇集了10个临床研究总共920例,比较了3种不同剂量与给药方法, 80%为6 mg/kg每2周1次, 17%为2.5 mg/kg每周1次, 和3% 9 mg/kg每3周1次, 中位随访时间21 wk总共滴注了7264次, 中位每例5次。94%患者有不良反应20%为3级。最常见为皮肤的不良反应和胃肠道不良反应。皮肤不良反应导致中断治疗的有2%患者,总的皮肤不良反应发生率为92%, 3级13%。该组资料的结论是皮肤不良反应最为常见,但罕有限制治疗的,而且绝大多数不良反应属轻、中度,很少导致停药。6 mg/kg每2周1次与2.5 mg/kg每周1次在10个临床研究中的耐受性都是很好的。9 mg/kg每3周1次的安全性与其他剂量是相同的^[45]。但应用例数太少,尚需进一步评估。目前此药在我国尚未上市供应。

4 结论

随着肿瘤分子生物学的发展以及对肿瘤分子相

互关系的了解,对肿瘤分子靶向治疗的研究已成为当前的热点,并逐渐深化。鉴于涉及参与肿瘤发生发展的基因众多,不同阶段起主导作用的基因亦不相同。分子靶向治疗同样存在多靶点联合治疗的问题。而现阶段可供临床选用的药物种类毕竟有限,因此,这是一个有待进一步开发,并有巨大发展潜力的领域。从结直肠癌现有的治疗方法而言,以往研究重点放在外科手术和放射治疗上,着重解决原发肿瘤的彻底清除和局部复发的问题。而现在已认识到光解决手术彻底性和降低术后局部复发,却无法避免远处转移的问题。近年来化疗的发展使综合治疗的效果得到了进一步改善,但远没有完全解决远处转移的问题。分子靶向治疗的问世,出现了如虎添翼的局面。人们希望其发展能使结直肠癌的治愈率、生存率以及生活质量都得到更大的提高,在结直肠癌的综合治疗中能发挥其更强有力的作用。

5 参考文献

- 1 Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001; 7: 987-989
- 2 Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004; 10: 145-147
- 3 Kabbinnar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S, Bergsland E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 60-65
- 4 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinnar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-2342
- 5 Kopetz S, Glover KY, Eng C, Wolff RA, Chang DZ, Adinin RB, Morris J, Abbruzzese JL, Hoff PM. Phase II study of infusional, 5-fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) plus bevacizumab as first line treatment for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4089
- 6 Sobrero AF, Young S, Belcewicz M, Young S, Balcewicz M, Chiara S, Perez Carrion R, Mainwaring P, Gapski J, Clarke S, Langer B, Ackland S. Phase IV study of first line bevacizumab plus irinotecan and infusional 5-FU/LV in patients with metastatic colorectal cancer: AVIRI. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4068
- 7 Grothey A, Sugrue M, Hedrick E, D. Purdie D, Yi J,

- Dong W, Kozloff M. Association between exposure to bevacizumab (BV) beyond first progression (BBP) and overall survival (OS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Results from a large observational study (BRITE). *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4036
- 8 Kretzschmer A, Van Cutsem E, Micheal M, Rivera F, Berry S, DiBartolomeo M, Mazier M, Lutiger B, Cunningham D. Preliminary efficacy of bevacizumab with first-line FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and monotherapy for mCRC: First BEATrial. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4072
- 9 Saltz L, Clarkes, Diaz-Rubio E, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang T, Cassidy J. Bevacizumab (Bev) in combination with XELOX or FOLFOX4: Updated efficacy results from XELOX-1/ NO16966, a randomized phase III trial in first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: Abst 4028
- 10 Giantonio BJ, Meropol NJ, Catalano PJ, Ng V, Oliver R, Sirzen F, Leonard S, Cassidy J, Benson AB. Magnitude of progression-free survival (PFS) improvement and treatment (Tx) duration in metastatic colorectal cancer (mCRC) for bevacizumab (BV) in combination with oxaliplatin-containing regimens: An analysis of two phase III studies. *J Clin Oncol* (Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4073
- 11 Rananathan RK, Rajasena K, Crandall T, Balaban EP, Pinkerton RA, Kane P, Potter DM, Dranko S, Schmotzer A, Lembersky BC. Phase II study of the A-ICOX regimen [bevacizumab (Bev), weekly intermittent capecitabine (Cap) and oxaliplatin (Ox)] for untreated advanced colorectal cancer (CRC). *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4092
- 12 Schmiegel WH, Reinacher-Schick A, Freier W, Dietrich G, Arnold D, Kanzler S, Geissler M, Graeven U, Hegewisch-Becker S, Schmoll H. Comparable safety and response rate with bevacizumab in combination with capecitabine/oxaliplatin (CapOx/Bev) versus capecitabine/irinotecan (CapIri/Bev) in advanced CRC (mCRC): A randomized phase II study of the AIO GI tumor study group. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4034
- 13 Gruenberger B, Scherthauer W, Tamandl D, Zielinski C, Schueller J, Gruenberger T. Effectiveness of neoadjuvant chemotherapy including bevacizumab in patients with resectable colorectal cancer liver metastases. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4060
- 14 Gruenberger T, Tamandl D, Puhallatt H, Scheithauer W, Zielinski C, Gruenberger B. Bevacizumab plus XELOX as neoadjuvant therapy for patients with potentially curable metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4064
- 15 Willet C, Duda D, Boucher Y, di Tomaso E, Clark J, Blaszkowsky L, Czito B, Bendell J, Jain R. Phase I/II study of neoadjuvant bevacizumab with radiation therapy and 5-fluorouracil in patients with rectal cancer: initial results. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4041
- 16 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970
- 17 Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001; 92: 1331-1346
- 18 Saltz L, Rubin M, Hochster H, Tchekmeydian NS, Waksal H, Needle M, LoBuglio A. Cetuximab (IMC-C225) Plus Irinotecan (CPT-11) is Active in CPT-11-Refractory Colorectal Cancer (CRC) that Expresses Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: Abst 7
- 19 Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201-1208
- 20 Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
- 21 Seitz JF, Dahan L, Richard K. Impact of cetuximab-irinotecan salvage combination on overall survival (OS) in refractory metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2005; 23: 16S Abst 3737
- 22 Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ, Rowinsky EK. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4914-4921
- 23 Rougier P, Raoul JL, Van Laethem JL, Peeters F, Hussein C, Brezault L, Cals JC, Vedovato M, Mueser. Cetuximab+FOLFIRI as first-line treatment for metastatic colorectal CA. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3513
- 24 Seufferlein T, Ditttrich C, Riemann J, Woell E, Herrmann T, Lordick F, Arnold D, Olchowka K, Hoehler T, Schmoll HJ. A phase I/II study of cetuximab in combination with 5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) plus weekly oxaliplatin (L-OHP) (FUFOX) in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) expressing epidermal growth factor receptor (EGFR). Preliminary results. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2005; 23: 16S
- 25 Díaz Rubio E, Tabernero J, van Cutsem E, Cervantes A, André T, Humblet Y, Soulié P, Corretgé S, Kisker O, de Gramont A. Cetuximab in combination with oxaliplatin/5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) (FOLFOX-4) in the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing metastatic colorectal cancer: An international phase II study. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2005; 23: 16S
- 26 Folprecht G, Lutz MP, Schöffski P, Seufferlein T, Nolting A, Pollert P, Köhne CH. Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 2006; 17: 450-456
- 27 Van Cutsem E, Nowacki M, Lang I, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Rougier P, Cunningham D, J. Nippgen J, Köhne C. Randomized phase III study of

- irinotecan and 5-FU/FA with or without cetuximab in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): The CRYSTAL trial. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4000
- 28 Cartwright TH, Kuefler P, Cohn A, Hyman W, Yoffe M, Boehm KA, D. Ilegbodu D, Asmar L. Results of a phase II trial of cetuximab + XELIRI as first-line therapy of patients with advanced and/or metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4094
- 29 Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, Zampino M, Donea S, Ludwig H, Zubel A, Koralewski P. Cetuximab plus 5-FU/FA/oxaliplatin (FOLFOX-4) versus FOLFOX-4 in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): OPUS, a randomized phase II study. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4035
- 30 Aloia T, Levi F, Wicherts DA, Haas de RJ, Paule B, Bralet M, Bouchahda M, Azoulay D, Castaing D, Adam R. Hepatic resection following rescue cetuximab treatment for colorectal metastases previously refractory to conventional systemic therapy. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4061
- 31 Teipar S, Pecters M, Humblet Y, Gelderblom H, Vermorken J, Viret F, Glimelius B, Ciardiello F, Kisker O, Van Cutsem E. Dose-escalation study using up to twice the standard dose of cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with no or slight skin reactions on cetuximab standard dose treatment (EVEREST study): Preliminary data. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4037
- 32 Eng C, Maurel J, Scheithauer W, Wong L, Lutz M, Middleton G, Stoller R, Zubel A, Lu H, Sobrero AF. Impact on quality of life of adding cetuximab to irinotecan in patients who have failed prior oxaliplatin-based therapy: The EPIC trial. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4003
- 33 Au H, Karapetis C, Jonker D, O'Callaghan C, Kennecke H, Shapiro J, Tu D, Wierzbiński R, Zalcberg J, Moore M. Quality of life in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab: Results of the NCIC CTG and AGITG CO.17 trial. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4002
- 34 Arnold D, Hipp M, Liersch T, Dellas K, Koelbl O, Hohenberger W, Lordick F, Sülberg H, Sauer R, Rödel C. Cetuximab, capecitabine, and oxaliplatin (Cet-CapOx) with concurrent radiotherapy (RT) in advanced rectal cancer (RC): Results of a phase I/II trial. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4042
- 35 Hong YS, Kim DY, Lee KS, Lim SB, Choi HS, Jeong SY, Kim JH, Im SA, Kim TW, Jung KH. Phase II study of preoperative chemoradiation (CRT) with cetuximab irinotecan and capecitabine in pts with locally advanced resectable rectal cancer. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4045
- 36 Ocean AJ, O'Brien K, Lee J, Matthews N, Holloway S, Christos P, Kung TS, Kaubisch A, Chen H, Wadler S. Phase II trial of FOLFOX6, bevacizumab and cetuximab in patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4075
- 37 Berlin J, Malik I, Picus J, Glisson S, Kozloff M, Spitzer G, Wiens B, MacDonald M, Jerian S, Hecht JR. Panitumumab therapy with irinotecan, 5-fluorouracil and leucovorin (IFL) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Ann Oncol* 2004; 15(suppl 3): iii70-iii71
- 38 Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A. Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6: 29-31
- 39 Pecters M, Van Cutsem E, Siena S, Humblet Y, Hendlitz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G. A phase 3, multicenter, randomized controlled trial (RCT) of panitumumab plus best supportive care (BSC) vs BSC alone in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). the 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2006 Apr 1-5; Washington DC, USA. Abst CP-1
- 40 De Rosack W, De Schutter J, De Hertogh G, Janssens M, Biesmans B, Personeni N, Geboes K, Verslype C, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4132
- 41 Finocchiaro G, Cappuzzo F, Jane PA, Jänne PA, Bencardino K, Carnaghi C, Franklin WA, Roncalli M, Crinò L, Santoro A, Varella-Garcia M. EGFR, HER2 and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4021
- 42 Berlin J, Neubauer M, Swanson P, Harker WG, Burris H, Hecht JR, Navale L. Panitumumab antitumor activity in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) expressing $\geq 10\%$ epidermal growth factor receptor (EGFr). *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S 3548
- 43 Hecht JR, Mitchell EP, Baranda J, Malik I, Richards D, Reiner M, Stout S, Amado RG. Panitumumab activity in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients (pts) with low or negative tumor epidermal growth factor receptor (EGFr) levels: An updated analysis. *Proc Am Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2006; 24: 17S Abst 350
- 44 Mitchell EP, Hecht JR, Baranda J, Malik I, Richards D, Reiner M, Stout S, Amado RG. Panitumumab activity in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients (pts) with low or negative tumor epidermal growth factor receptor (EGFr) levels: An updated analysis. *Proc Am Clin Oncol* (Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4082
- 45 Peeters M, Van Cutsem E, Berlin J, Hecht JR, Ruiz R, Navale L, Amado R, Meropol NJ. Safety of panitumumab, a fully human monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor (EGFr), in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) across clinical trials. *J Clin Oncol*(Meeting Abstracts) 2007; 25: 18S Abst 4132

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

restin基因转染对裸鼠胃癌移植瘤生长的影响

张建永, 李锦毅, 李红玉, 戴聪, 马春雷, 王向党

张建永, 李红玉, 戴聪, 马春雷, 辽宁医学院 辽宁省锦州市 121001

李锦毅, 王向党, 中国人民解放军武警总医院 北京市 100039
张建永, 2007年辽宁医学院药理学硕士, 主要从事胃肠道肿瘤转移机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30672771

作者贡献分布: 本课题由张建永, 戴聪, 李红玉及李锦毅设计; 研究过程由张建永, 戴聪及马春雷操作完成; 研究所用新试剂及工具由王向党, 李红玉及李锦毅提供; 数据分析由张建永, 戴聪, 王向党及李锦毅完成; 本论文写作由张建永, 李红玉及李锦毅完成。

通讯作者: 李锦毅, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 中国人民解放军武警总医院临床教研室, lijinyi.li@vip.sina.com
电话: 010-88276846

收稿日期: 2008-08-29 修回日期: 2008-10-12

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-28

Effect of restin gene transfection on human gastric carcinoma xenograft growth in nude mice

Jian-Yong Zhang, Jin-Yi Li, Hong-Yu Li, Cong Dai, Chun-Lei Ma, Xiang-Dang Wang

Jian-Yong Zhang, Cong Dai, Chun-Lei Ma, Hong-Yu Li, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Jin-Yi Li, Xiang-Dang Wang, the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672771

Correspondence to: Dr. Jin-Yi Li, Department of Clinic, the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, 69 Yongding Road, Haidian District, Beijing 100039, China. lijinyi.li@vip.sina.com

Received: 2008-08-29 Revised: 2008-10-12

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of restin transfection on the growth of human gastric cancer BGC-803 tumor xenograft in nude mouse model with the localized expression of restin and to explore its effect on angiogenesis.

METHODS: Gastric cancer BGC-803 cell line was transfected with recombinant pEGFP-restin through LipofectamineTM2000 mediation. The effect on BGC-803 growth was observed by enhanced green fluorescent proteins assay. The expression of restin gene was detected using restriction endonuclease analysis and RT-PCR; cell cycle was observed using flow cytometry (FCM).

Through *in vitro* study, growth inhibition of the restin on the cancer was observed in nude mice. Microvessel density (MVD) and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) were assessed by immunohistochemistry.

RESULTS: The results of identification by restriction endonuclease analysis and RT-PCR demonstrated that restin gene was stably expressed in BGC-803 cells transfected with pEGFP-restin and that significant expression of EGFP was observed in these cells with irregularity. Slower growth speed and smaller volume were found in pEGFP-restin transfecting cell group than in control group ($P < 0.01$). The inhibition rates of tumor in empty vector and pEGFP-restin transfecting cell group were 3.60% and 29.02%, respectively. The MVD was lower in pEGFP-restin transfecting cell group than in control group (4.25 ± 0.29 vs 9.79 ± 0.94 , 10.34 ± 1.22 , both $P < 0.05$); the expression of VEGF was down-regulated compared with control group (12.24 ± 3.45 vs 44.52 ± 9.70 , 39.76 ± 6.38 , both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Restin transfection could inhibit BGC-803 cell growth in nude mice, which may be related to inhibition of angiogenesis in gastric cancer.

Key Words: Restin gene; Transfection; Stomach neoplasm; Microvessel density; Vascular endothelial growth factor

Zhang JY, Li JY, Li HY, Dai C, Ma CL, Wang XD. Effect of restin gene transfection on human gastric carcinoma xenograft growth in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3713-3718

摘要

目的: 探讨restin基因转染对胃癌细胞BGC-803裸鼠移植瘤生长抑制作用及对肿瘤血管生成的影响。

方法: 将重组质粒pEGFP-restin转染BGC-803细胞, 以绿色荧光蛋白示踪其对胃癌细胞BGC-803生长的影响; RT-PCR鉴定目的基因的表达; 通过裸鼠移植瘤实验比较restin对裸

■背景资料

血管生成是目前肿瘤治疗研究的热点, 抑制肿瘤血管生成从理论上可抑制肿瘤的生长和转移, 但是临床实验表明, 肿瘤患者血管抑制剂应用与动物实验理想效果相差较远, 如果能够将基因靶向治疗技术应用用于临床, 就可在肿瘤部分保持药物的较高浓度, 增强治疗效果。

■同行评议者

汪思应, 教授, 安徽医科大学实验动物中心; 王晓艳, 副教授, 中南大学湘雅三医院消化内科

■研究前沿

restin基因与内皮抑素同源,有研究表明其可抑制肿瘤血管细胞生成,但其抗肿瘤的机制及作用方式不甚清楚,如能深入研究restin基因对胃癌的作用,将会为胃癌的基因治疗提供新的途径和方法。

鼠移植瘤的生长抑制作用,免疫组织化学染色方法观察微血管密度(MVD)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达。

结果:重组质粒经RT-PCR扩增后在600 bp处稳定表达;将pEGFP-restin重组质粒转染胃癌细胞BGC-803,荧光显微镜下见转染组细胞发出绿色荧光,肿瘤细胞形态不一;裸鼠移植瘤实验显示,与对照组(空载体组和未转染组)比较,转染组胃癌细胞生长速度缓慢,肿瘤体积小($P<0.01$);空载体组与转染组的抑瘤率分别为3.60%、29.02%;免疫组化显示,转染组肿瘤微血管密度减少(4.25 ± 0.29 vs 9.79 ± 0.94 , 10.34 ± 1.22 , 均 $P<0.05$),转染组VEGF表达降低(12.24 ± 3.45 vs 44.52 ± 9.70 , 39.76 ± 6.38 , 均 $P<0.05$)。

结论:restin基因转染可抑制裸鼠移植瘤生长,影响肿瘤新生血管形成可能是其抗肿瘤作用之一。

关键词: restin基因; 转染; 胃肿瘤; 微血管密度; 血管内皮生长因子

张建永, 李锦毅, 李红玉, 戴聪, 马春雷, 王向党. restin基因转染对裸鼠胃癌移植瘤生长的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3713-3718

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3713.asp>

0 引言

1972年, Folkman^[1]提出“抗肿瘤新生血管形成”的设想,通过抑制或破坏肿瘤新生血管形成及生长,切断肿瘤赖以生存的基础,达到控制肿瘤生长和转移的目的,这一设想已被越来越多的研究所证实。人胶原XV的C末端非胶原结构域(NC10 domain of $\alpha 1$ chain of collagen type XV),由180个氨基酸组成。1999年, Ramchandran *et al*^[2]首先克隆并表达了人胶原XV的C末端非胶原结构域,并将其命名为restin。序列分析表明,restin与内皮抑素(endostatin)同源,可靶向抑制血管内皮细胞的迁移和生长。此前,我们前期成功构建了pEGFP-restin重组质粒,并在细胞中稳定表达^[3],为下一步工作奠定了基础。本研究通过绿色荧光蛋白,并观察restin基因对胃癌裸鼠移植瘤生长的影响,观察其对胃肿瘤血管的抑制作用,初步探讨restin基因在肿瘤治疗中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c-nu裸鼠由中国科学院肿瘤医院基

础所提供。pEGFP-C1质粒由中国人民解放军军事医学科学院庞博士惠赠, pEGFP-restin质粒由中国人民解放军武警总医院中心实验室构建,人胃癌BGC-803细胞系由北京肿瘤医院基础所提供。限制性内切酶BamH I 和EcoR I、DNA-Marker购自天佑达生物工程科技有限公司,脂质体Lipofectamine购于美国Invitrogen公司, DNA凝胶纯化试剂盒、TRIzol-RNA提取试剂盒、Wizard Plus SV Minipreps试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司, Reverse Transcription System试剂盒购自Promega公司。兔抗人VEGF多克隆抗体、鼠抗人CD34 mAb及即用型免疫组化二步法试剂盒均购自北京百奥泰斯生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒扩增和细胞转染: 将pEGFP-restin质粒用热击法转化感受态细胞,在含有氨苄青霉素的LB培养基中培养,筛选阳性克隆扩大培养,提取并纯化质粒DNA,将获得的重组质粒DNA,紫外分光光度计测定其纯度,用BamH I 和EcoR I酶切鉴定, pEGFP-C1和pEGFP-restin经酶切电泳后分别出现4.7 kb、4.7 kb和600 bp的条带。选取对数生长期的BGC-803细胞培养,待细胞融合率达90%-95%时,按Lipofectamine^{TM2000}试剂盒说明书,将重组质粒DNA转染BGC-803细胞,以转染pEGFP-C1为空载体对照组,并设未转染对照组,转染48 h后,待其细胞融合率达80%时,加入1 g/L G418进行筛选,使转染后的BGC-803细胞选择性生长,2 wk后未转染组细胞相继死亡,转染组和空载体组均出现肉眼可见的细胞克隆,随机挑选抗性克隆,待扩增后备用。转染后24, 48, 72 h荧光显微镜观察细胞表达绿色荧光蛋白(EGFP)情况,判断细胞转染效率及转染后生长状态。

1.2.2 RT-PCR检测restin的表达: 分别收集未转染组、空载体组及转染restin组细胞进行RT-PCR检测,按照TRIzol试剂盒说明书提取总RNA,设计restin基因的上游引物: 5'-ggatccatttcaagtgccaatcatgagaagcct-3', 下游引物: 5'-gaattcttacttctctagcgtctgtcatgaaact-3', 反应体系50 μ L, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 循环30次; 72 $^{\circ}$ C延伸5 min, 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 裸鼠移植瘤实验: 24只SPF级裸鼠,随机分为未转染组、空载体(pEGFP-C1)组和转染(pEGFP-restin)组,每组8只,按 3×10^6 /只在裸鼠右侧腋窝皮下分别注射三组细胞,观察肿瘤出

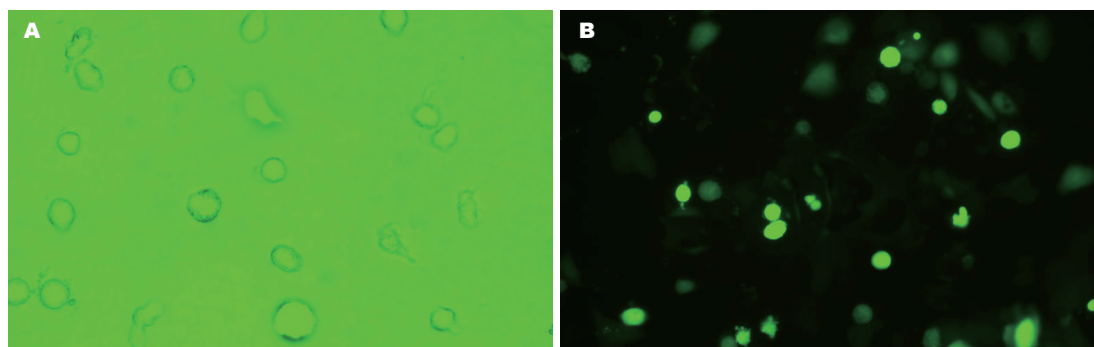


图1 pEGFP-restin质粒转染后的细胞形态变化. A: 转染前BGC-803细胞(倒置显微镜×400); B: 转染后的BGC-803细胞(荧光倒置显微镜×400).

现时间, 成瘤后每隔2 d测量肿瘤的长径(a)和短径(b), 取平均值绘制肿瘤生长曲线, 瘤体积 $V = (a \times b^2)/2(\text{mm}^3)$, 连续14 d观察, 26 d处死裸鼠, 剥离肿瘤称质量. 抑瘤率(%) = (未转染组平均瘤质量-各组平均瘤质量)/未转染组平均瘤质量×100%.

1.2.4 免疫组化检测肿瘤微血管密度(MVD)及VEGF的表达: 26 d处死裸鼠后, 将肿瘤组织以甲醛固定, 制成石蜡切片, 常规HE染色光镜下观察, 并进行免疫组化, 采用即用型二步法, 步骤按试剂盒说明进行. 主要步骤: 载玻片防脱片处理, 6 μm厚连续切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 微波修复20 min, 30 mL/L的 H_2O_2 室温孵育5-10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, PBS洗三次, 分别滴加50 μL的一抗(CD34, 1:200; VEGF, 1:500); 4℃过夜, PBS漂洗3次, 每张切片滴加50 μL过氧化氢酶-免疫球蛋白聚合物, 37℃孵育15 min, PBS洗3次, 每张切片滴100 μL DAB, 显微镜下控制染色15 min. 蒸馏水洗, 苏木精复染、脱水、透明、封片. 显微镜下读片、摄影, 每张切片用0.01 mol/L PBS代替一抗作空白对照, 用非免疫血清代替一抗作阴性对照. 参照Weidner^[4]和Maeda的方法, 即在低倍镜下(×40)选择微血管密集区(hot spots), 再在高倍镜(×200)下观察, 以3个热点区域CD34着色的平均血管数为MVD. VEGF免疫组化结果判定. 观察棕黄或棕褐色颗粒的分布情况, 有棕黄或棕褐色颗粒且强度高于背景的非特异性着色为阳性细胞; 细胞内无棕黄或棕褐色颗粒为阴性细胞.

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件, 实验数据用mean±SD表示, 计量资料采用单因素方差分析和t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 重组质粒扩增及转染 重组质粒扩增后, 酶切

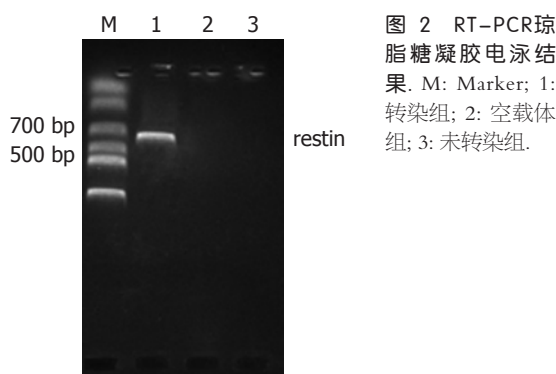


图2 RT-PCR琼脂糖凝胶电泳结果. M: Marker; 1: 转染组; 2: 空载体组; 3: 未转染组.

鉴定正确后转染BGC-803细胞. 荧光显微镜下显示, 转染重组质粒和空载体的细胞均有绿色荧光蛋白表达, 48 h呈现明亮的绿色荧光, 转染组约70%-80%的细胞发出绿色荧光. 肿瘤细胞形态大小不一, 部分肿瘤细胞缩小变圆, 并未影响生长速度. 表明带有restin的重组质粒在胃癌细胞中分子水平上表达(图1).

2.2 restin基因mRNA的表达 胃癌细胞BGC-803经质脂体法进行重组质粒转染后, 提取三组细胞总RNA, 逆转录合成cDNA, 经RT-PCR扩增后, 5%琼脂糖电泳显示, 转染组可见清晰的约600 bp的restin目的基因条带(图2), 空载体组和未转染组未见特异条带出现.

2.3 裸鼠体内成瘤实验 荷瘤后12 d至14 d裸鼠皮下全部成瘤, 接种26 d后, 未转染组、空载体组、转染组裸鼠移植瘤体积分别为 $2480.80 \pm 302.52 \text{ mm}^3$ 、 $2413.98 \pm 272.00 \text{ mm}^3$ 、 $1817.88 \pm 359.31 \text{ mm}^3$ (图3), 转染组肿瘤体积小于未转染组和空载体组(均 $P < 0.01$), 未转染组与空载体组间差异无统计学意义; 三组瘤质量分别为 $2.24 \pm 0.35 \text{ g}$ 、 $2.16 \pm 0.31 \text{ g}$ 、 $1.59 \pm 0.39 \text{ g}$, 转染restin组瘤重小于未转染组和空载体组(均 $P < 0.01$), 未转染组与空载体组间差异无统计学意义; 转染空载体组与转染restin组的抑瘤率分别为

■ 相关报道

自1972年Folkman提出“肿瘤血管生成疗法”以来, 这一理论得到了相关实验的证实而逐渐被认可, 为肿瘤的治疗提供了新的思路和途径.

■应用要点

目前应用肿瘤血管生成的基因治疗有很多优点,无毒副作用,无耐药性,浓度高等。因此对肿瘤血管抑制因子的研究将成为治疗的新热点,随着进一步的深入研究,有望成为肿瘤治疗有效的途径。

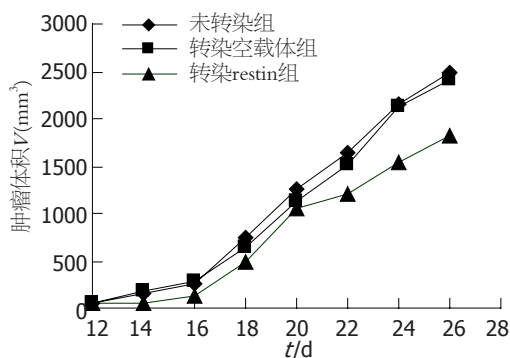


图3 转染后肿瘤生长曲线。

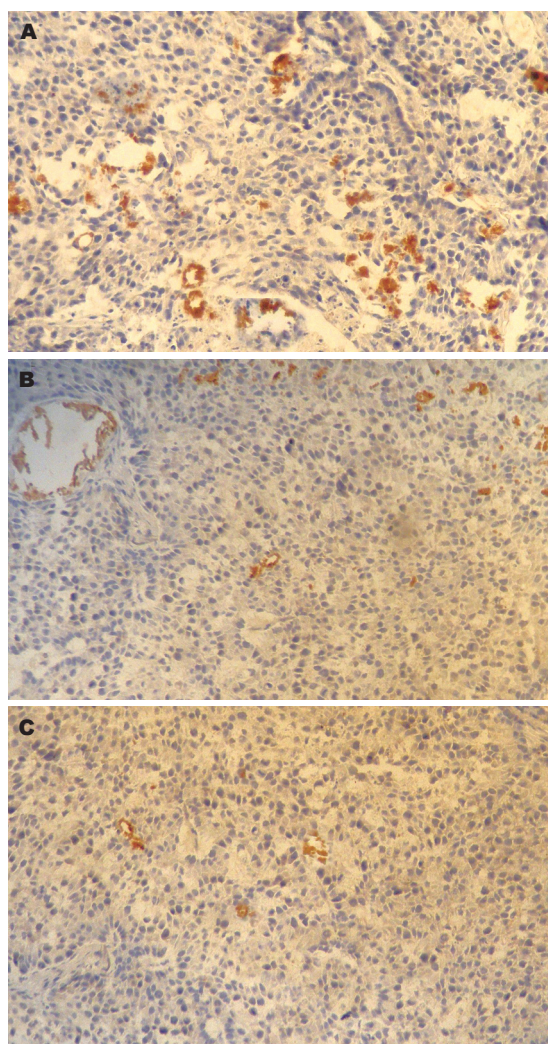


图4 免疫组化肿瘤周围微血管密度(CD34 × 200). A: 未转染组; B: 空载体组; C: 转染组。

3.60%、29.02%。

2.4 CD34和VEGF在裸鼠移植瘤组织中表达 光学显微镜下观察,可见CD34在血管内皮细胞膜和细胞质染色,为弥漫阳性,呈现杂乱无章的微血管网,并出现管腔结构(图4),转染组MVD值低于未转染组和空载体组(4.25 ± 0.29 vs $9.79 \pm$

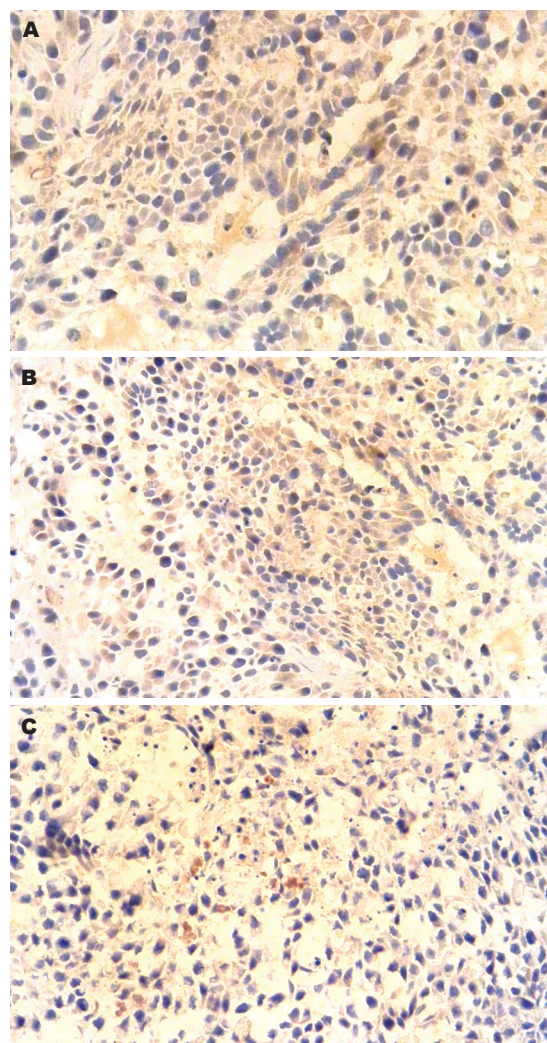


图5 免疫组化肿瘤组织中VEGF的表达(× 400). A: 未转染组; B: 空载体组; C: 转染组。

0.94 、 10.34 ± 1.22 , $P < 0.05$); 未转染组与空载体组间的差异无统计学意义($P > 0.05$). VEGF阳性染色为棕黄色,定位于肿瘤细胞质内(图5),转染restin后,裸鼠移植瘤组织中的VEGF表达较未转染组和空载体组均降低(12.24 ± 3.45 vs 44.52 ± 9.70 、 39.76 ± 6.38 , $P < 0.05$),未转染组和转染空载体组间的差异无统计学意义($P > 0.05$).

3 讨论

肿瘤生长和转移具有明确的血管依赖性^[5],如果没有新生血管的形成,肿瘤细胞只能靠周围组织的弥散获得氧气和养料,其生长将受到明显限制,一旦在瘤灶内及周围形成新生血管,肿瘤细胞就可经新生血管运输获得充足的营养物质而迅速生长;并通过血液循环把肿瘤细胞运输到他处,抗肿瘤血管生成能抑制结肠癌^[6]、肺癌^[7]、鼻咽癌^[8]等恶性肿瘤。有研究表明,肿瘤细

胞自身产生的VEGF是重要的促血管生长因子, 可通过与其受体VEGFR1、VEGFR2结合, 胞内信号传导, 诱导血管内皮细胞增殖和促进内皮细胞迁移, 增加微血管通透性, 加速血浆蛋白外渗, 最终导致新的基质及新生管腔形成. 因此应用转基因方法将血管生成抑制因子转入靶细胞, 可以在肿瘤组织周围创造抑制血管生成的微环境^[9], 使肿瘤病灶局部形成较高的药物浓度, 有效抑制肿瘤生长^[10-11].

1999年, Ramchandran *et al*首先发现了restin是一种血管发生抑制因子, restin位于胶原XV的羧端非胶原结构域, 分子质量为20 kDa, 广泛分布于各种组织基底膜, 在结构序列上与内皮抑素有61%的同源性, 研究发现, restin在体外可抑制血管内皮细胞的迁移, 特别是抑制因VEGF刺激引发的血管内皮细胞增长^[12], 对肿瘤的发生、发展及转移具有重要影响^[2,12]. 在小鼠移植瘤实验中, restin基因可使肝癌移植瘤体积缩小, 并抑制肝癌转移灶的生长^[13]; 人源restin片段能有效地抑制鸡胚新生血管的形成^[14].

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是一种能在细胞和分子生物学与临床检测中较理想的报告基因, 具有荧光标记的细胞在体内易于追踪, 可观察其在体内的生长情况, 与目的基因构建成重组体还能检测目的基因的高效转染和表达. GFP性能稳定, 具有能在活体内连续检测的特性^[15]. 我们通过绿色荧光蛋白, 示踪重组质粒pEGFP-restin在胃癌细胞中的分子表达情况, 发现转染后70%-80%的细胞发出绿色荧光, 提示restin在胃癌细胞中稳定表达. 并观察到转染restin基因的BGC-803细胞肿瘤细胞形态不一, 部分肿瘤细胞缩小变圆, 但并未影响其生长速度.

本实验将重组质粒pEGFP-restin(由武警总医院中心实验室构建)扩增纯化后, 转染BGC-803细胞, 经RT-PCR扩增, 得到600 bp片段, 与预期相符, 表明重组质粒能够在BGC-803细胞mRNA水平上表达相应的基因.

在实验中, 我们建立了裸鼠胃癌移植瘤动物模型, 观察转染重组质粒对裸鼠胃癌移植瘤生长抑制作用, 对其可能机制进行了初步探讨. 裸鼠体内成瘤实验结果表明, 空载体组与转染组的抑瘤率分别为3.60%、29.02%, 随着restin基因表达的充分, 转染组肿瘤生长较对照组减缓, 裸鼠移植瘤生长受到一定程度抑制, 这一结果与Ramchandran *et al*报道的结果相符. 有研究表明,

restin在体外可抑制血管内皮细胞的增殖^[2], 这种抑制作用是否与其抑制肿瘤新生血管生成有关. 我们又进一步进行了研究.

接下来我们采用免疫组化方法, 观察了restin基因对胃癌组织MVD和VEGF的影响, 目前研究发现CD34抗体是最敏感的内皮细胞标志物^[16]. 本实验采用CD34染色方法检测肿瘤组织的MVD, 光镜下可清晰显示肿瘤细胞间质中的微血管, 有的呈现管腔结构. 研究结果发现, 基因转染组肿瘤新生血管数少于未转染组和空载体组($P<0.05$), restin对肿瘤新生血管生成有一定抑制作用. VEGF检测结果显示, 在未转染组和空载体组VEGF表达较高. 转染组VEGF表达降低, 肿瘤组织中VEGF阳性细胞数均高于转染组. 表明restin转染抑制了肿瘤组织中VEGF的表达, 这种抑制肿瘤血管作用可能与降低肿瘤组织中VEGF表达相关.

我们的研究结果显示, restin基因与肿瘤血管生长抑制相关, 影响肿瘤新生血管形成可能是其抗肿瘤作用之一.

4 参考文献

- 1 Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175: 409-416
- 2 Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Segal M, Lu H, Knebelmann B, Sukhatme VP. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 735-739
- 3 张倩倩, 李春伶, 王运平, 李锦毅. 树突状细胞转染绿色荧光蛋白基因后生长特性和表型的变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2607-2612
- 4 Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 169-180
- 5 Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol* 2004; 85: 233-248
- 6 Dkhissi F, Lu H, Soria C, Opolon P, Griscelli F, Liu H, Khattar P, Mishal Z, Perricaudet M, Li H. Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 997-1008
- 7 Kurdow R, Boehle AS, Ruhnke M, Mendoza R, Boenicke L, Sipos B, Schniewind B, Dohrmann P, Kalthoff H. Retroviral endostatin gene transfer inhibits growth of human lung cancer in a murine orthotopic xenotransplant model. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 388: 401-405
- 8 Yue T, Zhang P, Liu P, Deng QL, Ji QM, Li XY, Zhu ZY. [Effect of transfection of hEndostatin gene on CNE2 cell xenograft growth in nude mice] *Ai Zheng* 2003; 22: 148-151
- 9 Sako A, Kitayama J, Koyama H, Ueno H, Uchida H, Hamada H, Nagawa H. Transduction of soluble Flt-1 gene to peritoneal mesothelial cells can

■同行评价

本研究设计基本合理, 方法成熟, 结果可靠, 具有一定的临床意义.

- effectively suppress peritoneal metastasis of gastric cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 3624-3628
- 10 Liu H, Peng CH, Liu YB, Wu YL, Zhao ZM, Wang Y, Han BS. Inhibitory effect of adeno-associated virus-mediated gene transfer of human endostatin on hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3331-3334
- 11 Li L, Wu PH, Huang JL, Liu RY, Zeng YX, Huang WL. [Inhibitive effects of recombinant adenovirus-mediated human endostatin on the growth of human hepatocellular carcinoma xenograft in nude mice] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2003; 11: 542-545
- 12 Sasaki T, Larsson H, Tisi D, Claesson-Welsh L, Hohenester E, Timpl R. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *J Mol Biol* 2000; 301: 1179-1190
- 13 Xu R, Xin L, Zhang JM, Li ZP, Gan RB. [Restin expressed in vivo suppresses the growth of tumors in nude mice] *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Shanghai)* 2002; 34: 571-575
- 14 张革, 柯细松, 冯涛, 周兰, 曾昭淳. 血管发生抑制因子 restin 的克隆表达及其抗血管活性的初步研究. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2002; 9: 194-197
- 15 Malecaze F, Couderc B, de Neuville S, Serres B, Mallet J, Douin-Echinard V, Manenti S, Revah F, Darbon JM. Adenovirus-mediated suicide gene transduction: feasibility in lens epithelium and in prevention of posterior capsule opacification in rabbits. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2365-2372
- 16 Martin L, Green B, Renshaw C, Lowe D, Rudland P, Leinster SJ, Winstanley J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1046-1054

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

酪丝缬肽对人肝癌细胞SMMC-7721血管生成相关基因表达谱的影响

张宁, 王鲁, 赵一鸣, 梁英, 吴伟忠, 樊嘉, 汤钊猷

张宁, 王鲁, 赵一鸣, 梁英, 吴伟忠, 樊嘉, 汤钊猷, 复旦大学肝癌研究所 上海市 200032

张宁, 复旦大学肝癌研究所在读硕士, 主要从事肝癌的抗血管生成治疗的基础研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30571800

高等学校全国优秀博士论文作者专项基金资助项目, No. 200263

作者贡献分布: 本课题设计由王鲁完成; 研究过程由张宁、赵一鸣及梁英完成; 数据分析由张宁完成; 本论文写作由张宁与王鲁完成; 汤钊猷、樊嘉及吴伟忠协助课题设计并修改论文。

通讯作者: 王鲁, 200032, 上海市医学院路136号, 复旦大学附属中山医院肝外科复旦大学肝癌研究所。

wang.lu@zs-hospital.sh.cn

电话: 021-64041990

收稿日期: 2008-09-15 修回日期: 2008-10-23

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-28

Microarray analysis of tyroservatide-regulated angiogenesis gene expression profile in human hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721

Ning Zhang, Lu Wang, Yi-Ming Zhao, Ying Liang, Wei-Zhong Wu, Jia Fan, Zhao-You Tang

Ning Zhang, Lu Wang, Yi-Ming Zhao, Ying Liang, Wei-Zhong Wu, Jia Fan, Zhao-You Tang, Liver Cancer Institute of Fudan University, Shanghai 200032, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30571800; and the Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China, No. 200263

Correspondence to: Lu Wang, Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital, Fudan University, 136 Yixueyuan Road, Shanghai 200032, China. wang.lu@zs-hospital.sh.cn

Received: 2008-09-15 Revised: 2008-10-23

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To observe inhibitory effects of tripeptide compound tyroservatide (YSV) on proliferation of human hepatocarcinoma cell SMMC-7721, and to apply cDNA microarray to analyze its influence on angiogenesis-related gene expression profile of SMMC-7721.

METHODS: a culture system of SMMC-7721 *in vitro* was established. The inhibitory effects of tyroservatide on growth of SMMC-7721 was detected using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Gene expression profile of SMMC-7721 was detected by Oligo angiogenesis microarray analysis. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to verify the results of the specific genes.

RESULTS: YSV significantly inhibited the growth of SMMC-7721; the proliferative inhibition rate was 42.34%, when YSV was used for 72 hours at concentration of 10 mg/L. The difference was significant compared with the control group ($P < 0.05$). After YSV treatment, 7 genes were down-regulated at least 0.667 fold among a total of 113 angiogenesis genes, compared with control group. YSV significantly inhibited the gene expression of angiogenesis factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) confirmed by RT-PCR.

CONCLUSION: YSV could significantly inhibit the growth of human hepatocarcinoma SMMC-7721 *in vitro*, and down-regulate expression of angiogenesis factors at genetic level.

Key Words: Tyroservatide; cDNA microarray; SMMC-7721; Vascular endothelial growth factor; Interleukin-8

Zhang N, Wang L, Zhao YM, Liang Y, Wu WZ, Fan J, Tang ZY. Microarray analysis of tyroservatide-regulated angiogenesis gene expression profile in human hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3719-3723

摘要

目的: 观察小分子三肽化合物酪丝缬肽(tyroservatide, YSV)对人肝癌细胞系SMMC-7721的抑制作用, 并分析YSV对肿瘤细胞血管生成相关基因表达的影响。

方法: 建立人肝癌细胞SMMC-7721的体外培养体系, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测YSV对体外培养的SMMC-7721的增殖抑制作用, 应用功能分类基因芯片分析人肝癌细胞

■背景资料

酪丝缬肽(YSV)可以通过诱导细胞凋亡、坏死, 破坏肿瘤细胞膜的完整性来有效的抑制肝癌细胞的增殖活性, 而目前尚无酪丝缬肽抗肿瘤细胞血管生成作用的相关报道。

■同行评议者

李涛, 副主任医师, 北京大学人民医院肝胆外科

■研发前沿

小分子肽是一类有广泛生物学活性的肽类化合物,有多肽疫苗、多肽抗生素、抗病毒多肽、心血管活性肽、细胞因子模拟肽和抗肿瘤多肽等。在抗肿瘤多肽研究方面,已经发现一个六肽在体内可以显著抑制腺瘤生长(包括肺、胃及大肠腺瘤)。

SMMC-7721经药物作用后血管生成相关基因表达的差异变化,同时应用RT-PCR方法验证相关基因的表达。

结果: YSV能显著抑制人肝癌SMMC-7721的生长, 10 mg/L YSV作用72 h对SMMC-7721的增殖抑制率为42.34%,与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$)。在113个血管生成相关基因中, YSV组相比对照组,基因下调0.667倍以上的有7个。RT-PCR在基因水平上证实YSV能显著抑制血管内皮生长因子(VEGF)和白介素8(IL-8)的表达。

结论: YSV在体外能够显著抑制人肝癌细胞SMMC-7721的生长,并能在基因水平上下调肿瘤细胞血管生成相关因子的表达。

关键词: 酪丝缬肽; cDNA微阵列; SMMC-7721; 血管内皮生长因子; 白介素8

张宁, 王鲁, 赵一鸣, 梁英, 吴伟忠, 樊嘉, 汤钊猷. 酪丝缬肽对人肝癌细胞SMMC-7721血管生成相关基因表达谱的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3719-3723

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3719.asp>

0 引言

原发性肝癌(主要为肝细胞癌,以下简称肝癌)是我国最常见的恶性肿瘤之一,每年新发病例约占全球新发肝癌总病例的55%,病死率在国内男性中排第二位,女性中排第三位^[1-2]。外科手术切除是主要的肝癌治疗方法,但由于术后的高复发率,使得手术的效果并不能令人满意^[3]。且很多患者明确诊断时已处于肝癌晚期,具有手术机会的患者只占30%左右,传统的细胞毒性化疗方法也并未表现出对肝癌的明显有效性^[4]。因此对于多数肝癌患者,寻找有效、低毒且针对肝癌特异性高的新型药物仍是临床亟待解决的问题。小分子肽是一类有广泛生物学活性的肽类化合物,有多肽疫苗、多肽抗生素、抗病毒多肽、心血管活性肽、细胞因子模拟肽和抗肿瘤多肽等。在抗肿瘤多肽研究方面,已经发现一个六肽在体内可以显著抑制腺瘤生长(包括肺、胃及大肠腺瘤)^[5]。我们研究的小分子三肽化合物酪丝缬肽(tyroservatide, YSV)由三个氨基酸组成,化学结构组成为L-酪氨酸-L-丝氨酸-L-缬氨酸,分子结构为 $C_{17}H_{25}N_3O_6$,相对分子质量为367.40 Da。我们观察YSV对体外培养的人肝癌细胞SMMC-7721生长抑制作用,并应用基因芯片技术分析YSV对人肝癌细胞血管生成相关基

因表达的影响,为酪丝缬肽抗肿瘤作用机制的研究提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 YSV由中国深圳康哲药业有限公司提供, RPMI Medium 1640培养液及小牛血清均购自Gibco公司, MTT购自SIGMA试剂公司。细胞株为复旦大学附属中山医院肝癌研究培养的人肝癌细胞SMMC-7721。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝癌细胞SMMC-7721采用含100 mL/L FBS的RPMI 1640培养基培养, 950 mL/L湿度, 50 mL/L CO₂, 37℃。所用细胞在体外培养均不超过5代,选生长状态好,处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT测定: SMMC-7721用含100 mL/L FBS的RPMI 1640培养基稀释成 1×10^7 /L,分别接种于96孔细胞培养板中,2000个/孔,每组四个复孔,细胞贴壁24 h后加入相应药物。实验分组: 药物干预组,药物均使用含100 mL/L FBS的RPMI 1640培养液稀释,加入细胞培养板,使YSV的终浓度分别为0.01、0.1、1.0、10、100 mg/L,每孔0.2 mL。阴性对照组,加入等体积50 mL/L FBS的RPMI 1640培养液。50 mL/L CO₂, 37℃条件下,药物作用24、48、72 h后进行MTT检测,操作按试剂盒说明书进行,用酶标仪测定不同作用时间下细胞的吸光度(A_{490}),计算酪丝缬肽对人肝癌SMMC-7721生长的影响和抑制情况。抑制率 = (对照组 A_{490} - 药物组 A_{490}) / 对照组 $A_{490} \times 100\%$ 。

1.2.3 基因芯片的制备: (1)样本RNA的抽提: 选取对照组及YSV(10, 100 mg/L作用72 h)的药物干预组细胞,每份样品约 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 细胞,加入1 mL的RNA抽提试剂TRIzol(Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA, USA)。 (2)样本RNA质量检测: 使用Nanodrop测定RNA在分光光度计260、280和230 nm的吸收值,以计算浓度并评估纯度。用甲醛电泳试剂进行变性琼脂糖凝胶电泳,检测RNA纯度及完整性。 (3)制备生物素标记的cRNA探针: 采用SuperArray公司的Truelabeling-AMPTM线性RNA扩增试剂盒合成生物素标记的cRNA探针,包括: 样本RNA进行逆转录反应合成cDNA; 在逆转录反应中加入RNA扩增缓冲液,生物素标记的UTP和扩增酶类混合液,合成生物素标记的cRNA探针; 使用Super Array Grade cRNA纯化试剂盒纯化cRNA探针。 (4)芯片杂交: 将纯化的cRNA探针在GEAhyb杂交液

■相关报道

国内学者Jia *et al* 研究发现YSV通过抑制人肝癌细胞BEL-7402增殖、降低细胞代谢和破坏肿瘤细胞细胞膜的完整性、诱导肿瘤细胞凋亡、坏死来发挥抗肿瘤作用。

表 1 RT-PCR引物及反应条件

基因	引物(5'-3')	退火温度(℃)	周期	大小(bp)
β-actin	Sense: ATGGAAGAAGAAATCGCCGC	55	30	287
	Antisense: ACACGCAGCTCGTTGTAGAA			
VEGF	Sense: GCAGAAGGAGGAGGGCAGAATC	60	40	149
	Antisense: GGCACACAGGATGGCTTGAAG			
IL-8	Sense: CAAACCTTTCCACCCCAAAT	56	30	197
	Antisense: CAAACCTTTCCACCCCAAAT			

表 2 各浓度YSV对体外培养人肝癌细胞SMMC-7721的抑制率 (%)

YSV (mg/L)	24 h	48 h	72 h
0.01	4.27 ± 0.51	4.63 ± 0.76	4.66 ± 1.00
0.1	13.43 ± 1.48	15.73 ± 1.08	19.53 ± 1.63
1.0	18.27 ± 1.31	20.03 ± 0.78	24.74 ± 1.31
10.0	27.62 ± 1.15 ^a	38.64 ± 0.85 ^a	42.34 ± 1.93
100.0	24.00 ± 0.99	31.59 ± 1.72	34.94 ± 1.58

^a*P* < 0.05 vs 72 h.

表 3 YSV(10 mg/L)72 h时对人肝癌细胞SMMC-7721血管生成相关基因表达的影响

Symbol	YSV	对照组	YSV/对照组
CCL11	0.0881	0.1387	0.6350
FGF6	0.0061	0.0093	0.6631
IL8	0.0056	0.0172	0.3263
IL10	0.0061	0.0100	0.6059
NUDT6	0.0437	0.1177	0.3717
VEGF	0.0188	0.1121	0.1684
VG5Q	0.0936	0.2055	0.4557

■创新盘点

对于多血管实体肿瘤, 抗血管生成治疗是当前研究的热点, 而肝癌细胞癌作为一种多血管肿瘤, 其中丰富的血管是使其具有生长快、转移早及浸润广泛的生物学特点的物质基础, 抑制肝癌组织中新生血管的生长对于肝癌的治疗具有特殊的意义, 本研究主要针对酪丝缬肽对人肝癌细胞SMMC-7721的抑制作用并探讨对其血管生成相关基因表达的影响。

条件下与所选择的Oligo GEMatrix系列芯片杂交。(5)化学发光检测: cRNA探针与芯片杂交后, 加入链亲和素耦联的碱性磷酸酶(AP)及化学发光底物反, X射线胶片曝光在胶片上显示检测结果。(6)图像采集与数据分析: X-射线胶片曝光后, 将胶片上的图像用扫描仪扫描并转换为灰度TIFF格式的图片文件保存, 使用配套软件GEMatrix Expression Analysis Suite对原始数据进行完整的芯片数据分析。

1.2.4 RT-PCR方法检测YSV对肿瘤细胞血管生成相关基因表达的影响: 所选取细胞为YSV 10 mg/L, 作用72 h的药物干预组及阴性对照组, RT-PCR方法检测YSV作用后对肿瘤细胞血管生成相关基因促血管生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及IL-8表达的影响。使用TRIzol(Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA, USA)提取肿瘤细胞中的总RNA, 用Reverse Transcription System(Promega, Inc. Madison, WI, USA)扩增相关基因的mRNA, RT-PCR反应条件及引物序列见表1。应用20 g/L琼脂糖凝胶电泳PCR产物, 100 mV恒压电泳40min, 在紫外灯下观察照相。以β-actin作为内参照, 以靶基因/β-actin灰度比值作为mRNA的相对表达丰度。

统计学处理 应用SPSS11.5统计软件进行分析, MTT实验数据以mean ± SD表示, 应用方差分析方法统计各组数据, *P* < 0.05为有统计学

使用配套软件GEMatrix Expression Analysis Suite分析, 以下调0.667倍以上为差异标准。

意义, 使用芯片配套软件GEMatrix Expression Analysis Suite对基因芯片数据进行分析。

2 结果

2.1 YSV对人肝癌细胞SMMC-7721生长的影响 不同浓度YSV在不同时段对人肝癌细胞SMMC-7721均有一定的抑制作用, 与对照组比较有显著地差异(*P* < 0.05); YSV作用72 h时各浓度对肿瘤细胞的抑制作用最为明显, 尤其在剂量10 mg/L时, 抑制率可以达到42.34%(表2)。

2.2 血管生成相关基因芯片检测结果 使用综合型GEMatrix表达分析配套软件(GEMatrix Expression Analysis Suite)将灰度TIFF格式图片的点阵转换为数字数据以分析芯片结果。三组细胞血管生成相关基因芯片检测结果比较: YSV(10 mg/L, 72 h)组与对照组相比较, 有7个基因下调0.667以上(表3); YSV(100 mg/L, 72 h)组与对照组比较, 有6个基因下调0.667倍以上(表4)。其中VEGF与IL-8下调最为明显, 并进一步通过RT-PCR得到了验证。

2.3 RT-PCR验证结果 为验证基因芯片的结果, 选取VEGF和IL-8这两个差异显著的促血管生成因子, 应用RT-PCR法进行验证。与基因芯片结果一致, YSV 10 mg/L, 作用72 h后可以明显地抑制

■应用要点

本文首次证实了酪丝缬肽能够体外抑制肝癌细胞促血管生成相关基因的表达,为酪丝缬肽治疗肝癌的临床应用中提供一些有意义的实验基础。

表 4 YSV(100 mg/L)72 h时对人肝癌细胞SMMC-7721血管生成相关基因表达的影响

Symbol	YSV	对照组	YSV/对照组
CCL11	0.0680	0.1387	0.4903
CXCL2	0.0901	0.1567	0.5750
IL8	0.0072	0.0172	0.4201
IL10	0.0065	0.0101	0.6442
NUDT6	0.0580	0.1177	0.4901
VEGF	0.0275	0.1121	0.2453

使用配套软件GEM Express Analysis Suite分析,以下调0.667倍以上为差异标准。

肿瘤细胞VEGF和IL-8 mRNA表达(图1)。

3 讨论

肝细胞癌是一种多血管实体肿瘤^[6],其中丰富的血管成为肝癌具有生长快、转移早及浸润广泛的生物学特点的物质基础。促血管生成因子对新生血管起着积极的正向调节的作用,VEGF被认为是肿瘤组织中最主要的促血管生长因子,在肝脏由肝硬化向肝癌的转化及刺激肝癌血管生成过程中发挥关键作用^[7]。Poon *et al*^[8]发现原发性肝癌患者术前血清中高浓度VEGF和临床病理特征中肿瘤包膜不完整、肝内转移、静脉侵袭、肿瘤分期呈明显正相关。VEGF通过与其在内皮细胞的受体VEGFR结合并相互作用激活多条信号转导通路,如Akt/PI3K/MAPK通路,进而诱导内皮细胞增殖、迁徙^[9]。Li *et al*^[10]发现肝癌患者血清中VEGF mRNA表达水平与肿瘤组织内微血管密度成明显正相关。此外由于在新生血管化中的重要作用,VEGF也在一定程度上促进了肿瘤转移及复发^[11]。

IL-8是CXC趋化因子家族中的一员,并被证实多种实体肿瘤中具有强烈的促血管生成的作用^[12]。当肝癌侵犯血管及胆管,IL-8的表达上调,由肝细胞分泌的IL-8在体外同样可以刺激人脐静脉内皮细胞的增殖^[13]。IL-8可以直接提高内皮细胞的生存能力,促进内皮细胞增生并上调基质金属蛋白酶的表达,进而调节血管生成^[14]。Ren *et al*^[15]研究发现肝癌患者血清中IL-8高水平可以反映出肿瘤组织中新血管活动旺盛及肿瘤生长迅速。Huang *et al*^[16]发现一种以IL-8为靶向目标的人源中和抗体对于黑色素瘤的生长、转移和血管生长具有潜在的治疗意义。

生物活性多肽近来逐渐受到关注,已有几十余种多肽类药物进入临床研究,多集中在多

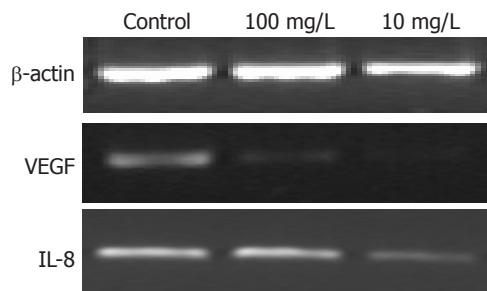


图 1 RT-PCR法验证YSV下调人肝癌细胞SMMC-7721 VEGF与IL-8表达。

肽疫苗、多肽抗生素、抗病毒多肽、心血管活性肽和抗肿瘤多肽^[17]。相关文献报道酪丝缬肽可抑制肝癌细胞BEL-7402裸鼠移植瘤的生长,通过抑制肿瘤增殖相关基因的表达,增强抑制肿瘤生长相关基因的表达发挥抗肿瘤活性^[18]。贾静 *et al*^[19]研究发现YSV通过抑制人肝癌细胞BEL-7402增殖、降低细胞代谢和破坏肿瘤细胞细胞膜的完整性、诱导肿瘤细胞凋亡、坏死来发挥抗肿瘤作用。另外YSV能够促进PTEN,并抑制AKT、P21、P27的表达来抑制人肝癌细胞BEL-7402裸鼠移植瘤的生长^[20]。本课题主要针对酪丝缬肽对人肝癌细胞SMMC-7721的抑制作用并探讨对其血管生成相关基因表达的影响。体外MTT实验结果显示酪丝缬肽能够显著抑制肿瘤细胞的生长,当用药剂量为10 mg/L,作用时间72 h时,抑制率可达42.34%,与对照组相比具有统计学意义。

在证实YSV对人肝癌细胞SMMC-7721药效的基础上,我们应用血管生成相关基因芯片筛选YSV对人肝癌细胞SMMC-7721血管生成相关基因表达的影响,该基因芯片是美国SuperArray公司生产的功能分类基因芯片,是将微阵列技术与特定生物学通路的最新知识有机结合,可以大大缩短发现诊治各种疾病的生物学标志物的时间,已成为生物学通路研究的重要工具。他与表达谱基因芯片的本质区别就在于剔除了基因芯片上对研究对象毫无意义的基因,我们可以把功能分类基因芯片的结果比作对基因图谱进行局部“放大”的分子图像。基因芯片结果显示,在113个血管生成相关基因中,YSV组(10 mg/L, 72 h)相对于对照组,下调0.667倍以上的有7个基因,分别是CCL11、FGF6、IL-8、IL-10、NUDT6、VEGF、VG5Q,均为促血管生成相关基因,其中差异最显著的为VEGF与IL-8。

YSV能够在基因水平上抑制肝癌细胞血管生成相关因子的表达,为进一步探讨YSV抗肿

瘤机制提供了新的思路. 如上所述YSV对其他肿瘤细胞的作用机制复杂, 其药效的发挥是多通路、多环节共同作用的结果, 且体外实验无法模拟体内复杂的生物学环境, YSV可能通过抑制血管生成相关基因的表达并结合其他作用机制来产生对SMMC-7721的抑制作用. 鉴于离体实验的局限性, 因此YSV具体的抗血管生成作用还有待于动物模型的证实.

4 参考文献

- 1 Tang ZY. Small hepatocellular carcinoma: current status and prospects. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 349-353
- 2 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma--cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 445-454
- 3 Poon RT, Fan ST, Lo CM, Ng IO, Liu CL, Lam CM, Wong J. Improving survival results after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study of 377 patients over 10 years. *Ann Surg* 2001; 234: 63-70
- 4 Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001; 35: 421-430
- 5 Fujisawa N, Sakao Y, Hayashi S, Hadden WA 3rd, Harmon CL, Miller EJ. alpha-Chemokine growth factors for adenocarcinomas; a synthetic peptide inhibitor for alpha-chemokines inhibits the growth of adenocarcinoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 19-26
- 6 Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Yang ZF, Fan ST, Wong J. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1775-1785
- 7 Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4241-4245
- 8 Poon RT, Ng IO, Lau C, Zhu LX, Yu WC, Lo CM, Fan ST, Wong J. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Surg* 2001; 233: 227-235
- 9 Vogel C, Bauer A, Wiesnet M, Preissner KT, Schaper W, Marti HH, Fischer S. Flt-1, but not Flk-1 mediates hyperpermeability through activation of the PI3-K/Akt pathway. *J Cell Physiol* 2007; 212: 236-243
- 10 Li XM, Tang ZY, Qin LX, Zhou J, Sun HC. Serum vascular endothelial growth factor is a predictor of invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 511-517
- 11 Niu Q, Tang ZY, Ma ZC, Qin LX, Zhang LH. Serum vascular endothelial growth factor is a potential biomarker of metastatic recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 565-568
- 12 Lin Y, Huang R, Chen L, Li S, Shi Q, Jordan C, Huang RP. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *Int J Cancer* 2004; 109: 507-515
- 13 Akiba J, Yano H, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M. Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2001; 18: 257-264
- 14 Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003; 170: 3369-3376
- 15 Ren Y, Poon RT, Tsui HT, Chen WH, Li Z, Lau C, Yu WC, Fan ST. Interleukin-8 serum levels in patients with hepatocellular carcinoma: correlations with clinicopathological features and prognosis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5996-6001
- 16 Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, Gudas JM, Bar-Eli M. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol* 2002; 161: 125-134
- 17 Janin YL. Peptides with anticancer use or potential. *Amino Acids* 2003; 25: 1-40
- 18 王松, 陆融, 朱智彤, 赵茜, 卢奕, 贾静, 傅正, 周春雷, 赵岚, 李会强, 李鸿利, 姚智. 三肽化合物酪丝缬肽对人肝癌裸鼠移植瘤基因表达谱的影响. *肿瘤* 2006; 26: 699-704
- 19 贾静, 朱智彤, 陆融, 赵茜, 李国力, 金孟珏, 李会强, 姚智. 三肽化合物酪丝缬肽对人肝癌细胞BEL-7402增殖抑制作用的实验研究. *中国药理学通报* 2005; 21: 1433-1437
- 20 Zhu Z, Jia J, Lu R, Lu Y, Fu Z, Zhao L, Wang L, Jin M, Zhao L, Gao W, Yao Z. Expression of PTEN, p27, p21 and AKT mRNA and protein in human BEL-7402 hepatocarcinoma cells in transplanted tumors of nude mice treated with the tripeptide tyroservatide (YSV). *Int J Cancer* 2006; 118: 1539-1544

■同行评价

本研究方法合理, 结果可信, 具有一定的创新性和实用性, 学术价值较好.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

HBV pre-X转染HepG2细胞后差异表达基因的筛选

柴艳云, 张锦前, 赵龙凤, 王琪, 成军

■背景资料

HBV慢性感染可引起胰岛素抵抗、糖耐量降低,甚至并发糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病,提示HBV和糖类、脂类物质代谢密切相关,但其分子生物学机制尚不明确。近年来,HBV新的ORF即pre-X的发现引人注目,但相关的深入研究甚少。

柴艳云, 赵龙凤, 山西医科大学第一附属医院感染病科 山西省太原市 030001

张锦前, 王琪, 成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100015
柴艳云, 2006年山西医科大学硕士, 主要从事病毒性肝炎的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30600524

作者贡献分布: 此课题由张锦前设计; 研究过程由柴艳云与张锦前操作完成; 数据分析由柴艳云与张锦前完成; 本论文写作由柴艳云、张锦前、赵龙凤、王琪及成军完成。

通讯作者: 成军, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院传染病研究所。cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-84322613

收稿日期: 2008-09-26 修回日期: 2008-10-17

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-28

Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with HBV pre-X

Yan-Yun Chai, Jin-Qian Zhang, Long-Feng Zhao, Qi Wang, Jun Cheng

Yan-Yun Chai, Long-Feng Zhao, Infectious Diseases Division, First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Jin-Qian Zhang, Qi Wang, Jun Cheng, the Institution of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

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

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, the Institution of Infectious Diseases, Ditan Hospital in Beijing, Beijing 100015, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2008-09-26 Revised: 2008-10-17

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To detect the expression of HBV pre-X and screen the different gene expression in HepG2 cells transfected with HBV pre-X using gene chip technology.

METHODS: The expressive vector of pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X was transfected into HepG2 cell line. The expression of HBV pre-X protein was observed by western-blotting method. cDNA microarray technique was applied to detect the differentially expressed genes in HepG2 transfected either with pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X or with pcDNA3.1-myc-his.

RESULTS: The expressive vector was confirmed

by restriction enzyme digestion. The expression of HBV pre-X protein was confirmed by western-blotting method. High quality mRNA and cDNA was prepared and successful microarray screening was conducted. Based on the scanning results, 200 genes were found to be up-regulated and 62 genes down-regulated in HepG2 cell line transfected with HBV pre-X.

CONCLUSION: cDNA microarray technology is successfully used to screen the genes differentially expressed in HepG2 cell line transfected with HBV pre-X, which may bring some new clues for studying the molecular biology mechanism of hepatitis B virus with metabolic diseases.

Key Words: HBV pre-X; HepG2 cell; Microarray; Differential expression gene

Chai YY, Zhang JQ, Zhao LF, Wang Q, Cheng J. Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with HBV pre-X. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3724-3728

摘要

目的: 检测HBV pre-X在真核表达载体pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X转染的HepG2细胞中的表达,并筛选其中的代谢相关差异表达基因。

方法: 将构建的真核表达载体pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X转染HepG2细胞后蛋白免疫印迹检测; 将pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X和pcDNA3.1-myc-his载体分别转染HepG2细胞后,提取mRNA后逆转录为cDNA,运用基因表达谱芯片技术分析差异表达基因。

结果: 构建的真核表达载体经Apa I、Bst XI双酶切鉴定,转染HepG2细胞后HBV pre-X表达经蛋白免疫印迹证实; 经基因表达谱芯片分析发现,其中基因表达水平显著上调和下调的分别是200个和62个。

结论: 筛选HBV pre-X转染HepG2细胞后的代谢相关差异表达基因,从而为乙型肝炎病毒合并糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病的分子生物

■同行评议者

刘杞, 教授, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所

学机制的研究提供了重要依据。

关键词: 乙型肝炎病毒前X基因, HepG2细胞, 基因芯片, 差异表达基因

柴艳云, 张锦前, 赵龙凤, 王琪, 成军. HBV pre-X转染HepG2细胞后差异表达基因的筛选. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3724-3728
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3724.asp>

0 引言

HBV基因组划分出4个开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区^[1-2]. 4个ORF中表达的氨基酸长度不同, 在X基因之前存在一个ORF, 长度168 bp, 编码56个氨基酸残基(aa), 命名其为前-X(pre-X)区^[3]. 前-X与X基因之间没有终止密码子, 前-X区编码氨基酸与X蛋白融合表达, 序列为MGLGYWPSPPAWNLCGSSADPYCGTPSSLFCSQPVWSETYRNRQLCCPLSQIHLLS^[4]. 将前-X+X基因称为全X, 全长约630 bp, 编码210个氨基酸. 前-X区是一种HBV血清型特异性编码区, 该编码序列仅在adr血清型中有编码表现^[4]. 前-X基因的编码具有一定的HBV C基因型倾向性, 但并不具有基因型特异性^[5]. 在HBV基因组中发现前-S和前-X基因序列的存在改写了HBV DNA编码基因序列研究的历史^[6]. 本研究应用基因芯片技术, 筛选HBV pre-X对HepG2细胞差异表达的代谢相关基因, 为进一步深入研究HBV合并糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病的生物机制提供重要依据。

1 材料和方法

1.1 材料 真核表达质粒pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X、HepG2细胞系本实验室保存; 细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂TRIzol均购自Gibco公司; 小鼠抗人抗His标签单抗, 购自Simga公司. 真核表达载体pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X系本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 HepG2细胞的转染和筛选: 细胞株用DMEM培养基(含有100 kU/L氨苄青霉素的100 mL/L小牛血清)常规培养, 待生长到50%-70%融合时, 采用Lipofectin脂质体法(转染程序参照Manitsans方法)将pcDNA3.1-myc-his及pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X质粒转染细胞, 含G418的培养基继续培养48 h, 裂解细胞后留取上清, 用于表达产物Western blot检测。

1.2.2 HBV pre-X蛋白Western blot检测: 将上清

于SDS-PAGE胶电泳, 于50 g/L的脱脂奶粉室温封闭2 h, 加入TBST稀释过的抗体(小鼠抗人抗His标签抗体, 1:500稀释), 4℃孵育1 h, 用TBST液漂洗4-6次, 每次5 min, 再用TBST稀释的酶标抗体(山羊抗鼠IgG-HRP, 1:5000稀释)于30℃温育60 min, TBST漂洗4-5次后滤纸吸干残余液体, 加入ECL化学发光底物, 在X光片曝光, 显影、定影后可见结果。

1.2.3 总RNA提取: 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时分别将pcDNA3.1-myc-his及pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X转染HepG2细胞48 h后收获细胞. 使用TRIzol试剂一步法提取细胞总RNA(对照组和实验组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 并行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 mRNA纯化, 探针标记和芯片制备: 以Qiagen公司Oligotex mRNA Midi Kit纯化得mRNA, 并行电泳检测常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μg), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解于杂交液中. 芯片包含的20 000个cDNA由生物芯片上海国家工程研究中心上海生物芯片有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行PCR扩增, 靶基因溶解于3×SSC溶液中, 用Cartesian公司的Cartesian 7500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h)、UV交联, 再分别用2 g/L SDS、水及2 g/L的硼氢化钠溶液处理10 min, 晾干备用。

1.2.5 杂交及洗涤: 将基因芯片和杂交探针在95℃水浴变性5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于60℃杂交15-17 h. 以SSC洗涤10 min, 室温晾干。

1.2.6 检测与分析: 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片. 用预先选定的内参照基因对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正. 用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>1.8, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.6, 为绿色荧光, 显示表达减弱。

2 结果

2.1 真核表达载体pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X真核表达质粒pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X, 转染前Apa I、Bst XI双酶切鉴定(图1).

■研发前沿

关于HBV pre-X基因生物学功能的相关机制研究热点逐渐深入并涉及到肿瘤发生、细胞凋亡、细胞信号转导、物质代谢等领域, 而后两方面的研究则更为引人注目, 但这些作用机制仍不明确。

■相关报道

有关HBV pre-X的研究发现, 在乙型肝炎后肝细胞癌患者中其表达量明显高于慢性乙型肝炎患者, 提示pre-X基因可能与肝细胞癌密切相关; 通过酵母双杂交技术可知乙型肝炎病毒全X基因编码的蛋白质与前-X基因编码的蛋白质存在相互作用。

■创新盘点

本研究应用基因芯片技术筛选HBV pre-X对HepG2细胞差异表达的基因,发现了与多种生物学功能有关的多种基因都存在明显的表达差异,其中部分在国内外相关的研究工作中未见报道,尤其与物质代谢和信号转导相关的基因更加具有研究意义。

表 1 表达显著增强的蛋白基因

序号	GenBank	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_000209.1	Homo sapiens insulin promoter factor 1(IPF1)	2.045
2	BQ549626	Human insulinoma Homo sapiens cDNA clone	2.019
3	NM_018690	Homo sapiens apolipoprotein B48 receptor(apoB48R)	2.693
4	NM_005108.2	Homo sapiens xylulokinase homolog(H.influenzae)(xylB)	2.043

表 2 表达显著减弱的蛋白基因

序号	GenBank	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_001506.1	Homo sapiens G protein-coupled receptor 32(GPR32)	0.318
2	NM_007193.3	Homo sapiens annexin A10(ANXA10)	0.408
3	NM_000860.3	Homo sapiens hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD) (HPGD)	0.489

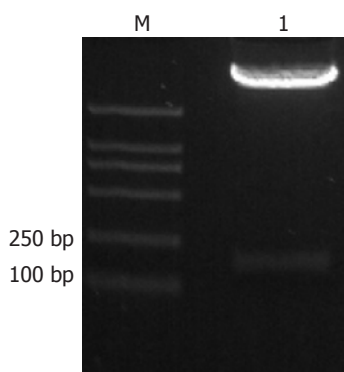


图 1 pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X经双酶切鉴定。M: Marker; 1: pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X经双酶切鉴定。

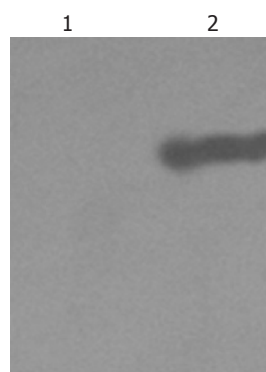


图 2 pcDNA3.1-myc-his质粒及pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X质粒转染HepG2细胞后蛋白免疫印迹检测确定。1: pcDNA3.1-myc-his; 2: pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X。

2.2 真核表达载体pcDNA3.1-myc-his和pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X分别转染HepG2细胞后,经蛋白免疫印迹检测结果 HepG2细胞株用DMEM培养基培养,待生长到50%-70%融合时, Lipofectin脂质体法将pcDNA3.1-myc-his及pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X质粒分别转染到HepG2细胞,培养48 h后裂解细胞后留取上清于SDS-PAGE胶电泳, Western blot检测(图2)。

2.3 总RNA提取: 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞,细胞生长至对数期时分别将pcDNA3.1-myc-his及pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X转染细胞48 h后收获细胞,使用TRIzol试剂一步法提取细胞总RNA,琼脂糖凝胶电泳可见28S、18S及8S条带(图3)。

2.4 差异表达基因分析 基因表达水平显著上调和下调的分别是200个和62个,摘取代谢相关重要基因见表1-2。

3 讨论

大量的统计学资料表明: HBV感染人体后可导

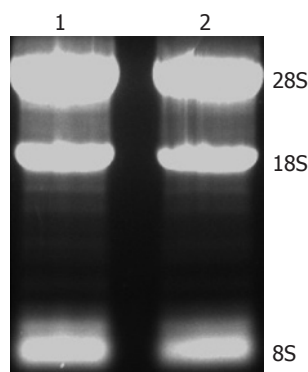


图 3 pcDNA3.1-myc-his质粒及pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X质粒分别转染HepG2细胞后提取总RNA结果。1: pcDNA3.1-myc-his; 2: pcDNA3.1-myc-his-HBV pre-X。

致患者出现胰岛素抵抗、糖耐量降低、糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病,这提示HBV与糖尿病、脂肪肝等代谢性疾病的发生、发展密切相关^[7-9]。Custro *et al*^[10]报道,成人慢性乙型肝炎2型糖尿病的发病率为25%,是普通人群发病率的4倍。大量临床观察的病例资料提示2型糖尿病患者HBV感染率超过普通人群,而慢性乙型肝炎患者2型糖尿病发病率也显著高于普通人群,表明HBV与糖尿病的发生有更强的相关性,但HBV导致糖尿病等代谢性疾病发生、发展的分

子生物学机制尚不明确. 研究表明: 乙肝病毒前-X基因的存在与HBV病毒株的突变有关, 这种突变在严重的肝脏疾病患者中可以检测到. 同时, 前-X基因也存在不能编码的情况, 在HBV C型基因型中不能编码前-X区的原因主要是A²⁶⁰⁸→C/T替换突变或C/A²⁷³³→T替换突变单一突变; 而B型、B/C型不能编码前-X区蛋白, 主要因为双突变的存在^[11-12]. 在已知基因型的HBV DNA阳性的HCC患者体内普遍表达前-X基因, 同时, 经过比较, 前-X基因在HCC患者中表达率明显高于慢性乙型肝炎患者, 具有显著性差异, 说明在疾病的不同阶段, 其前-X基因表达不相同, 提示前-X基因可能与HCC的发生密切相关^[13-15]. 进一步研究证实: 前-X基因的编码在HCC患者中具有普遍性, 其表达与患者的性别、年龄、乙肝病毒复制指标(HBV DNA、HBeAg阳性率)、ALT水平、AFP阳性率等临床相关指标无明显关系^[16]. 酵母双杂交系统研究表明: 乙肝病毒全X基因编码的蛋白质与前-X基因编码的蛋白质存在相互作用, 这为全X蛋白生物学功能的研究提供了新的思路^[17]. 因此, 进一步研究HBV pre-X转染HepG2细胞后的差异表达基因, 对深入研究相关的作用机制具有十分重要的意义. 本研究应用表达谱芯片技术筛选HBV pre-X转染HepG2细胞中的差异表达基因, 并从20 000个基因中筛选出262个差异表达的基因, 其中基因表达水平显著上调和下调的分别是200个和62个, 这些基因涉及细胞信号转导、物质代谢、肿瘤发生、细胞凋亡等多个领域, 这与HBV pre-X的生物学功能密切相关.

膜联蛋白是一类重要的钙结合蛋白, 参与各种重要的生物学过程. 膜联蛋白A10(ANX10)是此类蛋白中表达量很少的功能未知的新成员. 在成人肝脏和原发性肝癌组织中可以检测到ANX10的表达. ANX10的表达下调与原发性肝癌(HCC)的发生、发展及预后不良等关系密切, 这可能为原发性肝癌的基因治疗提供了一条潜在的思路^[18]. 我们研究发现: HBV pre-X在HepG2细胞中可以下调ANX10的表达, 从而促进HCC的发生、发展, 加重肝细胞损害. 有研究表明: apoB48R与动脉粥样硬化、高胆固醇血症等心血管疾病的发生密切相关, 其机制可能与apoB48R基因核苷酸序列改变有关^[19-21]. 我们研究发现HBV pre-X在HepG2细胞中上调ApoB48受体, 提示HBV pre-X可能参与载脂蛋白的表达调控, 这可能与脂类代谢和脂肪肝密切相关. 我

们研究也发现HBV pre-X在HepG2细胞中上调胰岛素促进因子1(IPF1)、木酮糖激酶(xylB)及胰岛素瘤基因的表达, 说明HBV pre-X可能参与了肝细胞对糖类代谢的调节. 同时, 本研究也发现HBV pre-X在HepG2细胞中可以下调G蛋白耦联受体32(GPR32)(与胰岛素等受体传导通路有关)及羟基前列腺素脱氢酶15(HPGD)的表达, 其表达下调可能与胰岛素抵抗、糖尿病等代谢性疾病的形成有关, 这也说明HBV pre-X可能参与了肝细胞对糖类代谢的调节. 以上结果为相关研究提示了大量的研究方向和思路, 我们拟进一步深入研究确定.

由此, 可以推论: HBV pre-X转染肝细胞后通过相应的信号转导通路可以导致某些重要功能基因表达水平的改变(上调或下调), 导致基因编码的蛋白功能的改变, 促进一系列代谢性疾病的发生, 如: 胰岛素瘤, 糖尿病, 脂肪肝等. 但HBV pre-X相关生物学过程及其信号转导机制目前仍尚未明确, 有待深入研究.

总之, 我们筛选了HBV pre-X转染HepG2细胞的差异表达基因后发现, 参与多种生物学过程的多种基因都存在明显的表达差异, 其主要与细胞信号转导、细胞增殖与分化、能量代谢、细胞凋亡和肿瘤发生等密切相关. 本实验结果为进一步研究HBV pre-X在肝细胞中相关生物学过程及其信号转导机制提供了坚实的基础, 尤其在HBV pre-X与糖、脂类代谢相关性方面则更具重要意义.

4 参考文献

- 1 Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. *Nature* 1979; 281: 646-650
- 2 Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 651-693
- 3 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. *解放军医学杂志* 2003; 28: 763-765
- 4 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1097-1101
- 5 董菁, 杨倩, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-X区的分子流行病学研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 794-800
- 6 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-编码基因的界定. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1091-1096
- 7 Demir M, Serin E, Göktürk S, Ozturk NA, Kulaksizoglu S, Yilmaz U. The prevalence of occult hepatitis B virus infection in type 2 diabetes mellitus patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 668-673
- 8 Shi JP, Fan JG, Wu R, Gao XQ, Zhang L, Wang H. [Prevalence and risk factors of hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis B] *Zhonghua*

■应用要点

本文的相关工作为HBV pre-X的生物学功能研究及其参与物质代谢、肿瘤发生等的相关机制研究提供了实验依据和方向, 极具研究价值和前景, 并为相关疾病的预防、治疗提供理论依据.

■同行评价

本研究选题明确, 设计思路清晰合理, 实验方法简单可靠, 可重复性强, 具有一定理论和科学价值。

- 9 Wang CC, Hsu CS, Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Association of chronic hepatitis B virus infection with insulin resistance and hepatic steatosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 779-782
- 10 Custro N, Carroccio A, Ganci A, Scafidi V, Campagna P, Di Prima L, Montalto G. Glycemic homeostasis in chronic viral hepatitis and liver cirrhosis. *Diabetes Metab* 2001; 27: 476-481
- 11 Faure E. Alternative peptide-fusion proteins generated by out-of-frame mutations, just upstream ORFs or elongations in mutants of human hepatitis B viruses. *Virus Res* 2006; 117: 185-201
- 12 张建傲, 罗端德. 乙型肝炎病毒的变异与临床. *临床内科杂志* 2000; 17: 255
- 13 董菁, 成军, 杨倩. 乙型肝炎病毒新开放读码框架的确定及其意义. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 757-762
- 14 Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998; 143: 2313-2326
- 15 Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci* 2006; 97: 977-983
- 16 薛红安, 王媛, 杨倩. 乙型肝炎病毒相关性原发性肝癌患者前-X基因分子流行病学意义. *第四军医大学学报* 2007; 28: 935-937
- 17 Yang Q, Cheng J, Dong J, Zhang J, Zhang SL. Molecular epidemiological study on pre-X region of hepatitis B virus and identification of hepatocyte proteins interacting with whole-X protein by yeast two-hybrid. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3473-3478
- 18 Liu SH, Lin CY, Peng SY, Jeng YM, Pan HW, Lai PL, Liu CL, Hsu HC. Down-regulation of annexin A10 in hepatocellular carcinoma is associated with vascular invasion, early recurrence, and poor prognosis in synergy with p53 mutation. *Am J Pathol* 2002; 160: 1831-1837
- 19 Fujita Y, Ezura Y, Bujo H, Nakajima T, Takahashi K, Kamimura K, Iino Y, Katayama Y, Saito Y, Emi M. Association of nucleotide variations in the apolipoprotein B48 receptor gene (APOB48R) with hypercholesterolemia. *J Hum Genet* 2005; 50: 203-209
- 20 Kawakami A, Tani M, Chiba T, Yui K, Shinozaki S, Nakajima K, Tanaka A, Shimokado K, Yoshida M. Pitavastatin inhibits remnant lipoprotein-induced macrophage foam cell formation through ApoB48 receptor-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 424-429
- 21 Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo WL, Li R, Song R, Bradley WA, Gianturco SH. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7488-7493

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1) 题目的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2) 作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3) 单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4) 基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5) 通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6) 收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

谷氨酰胺对体外培养肠上皮细胞屏障通透性的影响

崔巍, 闻颖, 董亚路, 刘沛

崔巍, 闻颖, 董亚路, 刘沛, 中国医科大学附属第一医院传染科 辽宁省沈阳市 110001

崔巍, 副教授, 主要从事肠黏膜屏障的临床和科研工作.

国家自然科学基金资助项目, No. 30670947

作者贡献分布: 此课题由刘沛设计; 研究过程主要由崔巍操作完成; 闻颖与董亚路对数据分析及论文写作提供帮助.

通讯作者: 刘沛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京街155号, 中国医科大学附属第一医院传染科. weicui@tom.com

电话: 024-83282199 传真: 024-31535053

收稿日期: 2008-08-20 修回日期: 2008-10-30

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-28

Effect of glutamine on intestinal epithelial barrier permeability *in vitro*

Wei Cui, Ying Wen, Ya-Luo Dong, Pei Liu

Wei Cui, Ying Wen, Ya-Luo Dong, Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670947

Correspondence to: Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Nanjing North Street 155, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. sylupei2003@yahoo.com.cn

Received: 2008-08-20 Revised: 2008-10-30

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To explore the mechanism of glutamine (GLN) underlying maintenance of intestinal barrier permeability.

METHODS: Caco-2 cells were placed on Transwell filters and grown in a culture medium composed of DMEM with indicated concentration of GLN (0, 0.1, 1, 4 mmol/L) for 21 days before treatment. Next, transepithelial electrical resistance (TEER) was measured. The localization and expression of tight junction (TJ) protein occludin were measured under immunofluorescence light microscopy. Cells were lysed into detergent-soluble and -insoluble protein fractions and the expression of active or non active occludin protein were measured using western blot.

RESULTS: Transepithelial electrical resistance

was significantly raised following GLN supplementation compared with 0 mmol/L GLN group (21.4 ± 0.1 , 124.5 ± 0.3 , 173.6 ± 0.2 vs 11.3 ± 0.3 , $P < 0.05$). Immunofluorescence test showed that occludin protein was localized in cytoplasm, with increasing GLN, positive occludin appeared as continuous belt-like structures encircling the cells at the apical cellular junctions in 0 mmol/L GLN group. GLN deprivation did not affect 65-kDa occludin expression, but 85-kDa occludin expression was down-regulated (1.04 ± 0.03 , 1.17 ± 0.04 , 1.29 ± 0.03 , 1.43 ± 0.06 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Deprivation of glutamine decreases active occludin protein expression and increases the intestinal barrier permeability, which is partially reversible with GLN supplementation.

Key Words: Glutamine; Intestinal barrier; Tight junction protein

Cui W, Wen Y, Dong YL, Liu P. Effect of glutamine on intestinal epithelial barrier permeability *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3729-3733

摘要

目的: 探讨谷氨酰胺保护肠黏膜屏障功能的作用机制.

方法: Caco-2细胞(20-30代)应用含有不同浓度谷氨酰胺(0、0.1、1、4 mmol/L)的DMEM培养液在Transwell上培养21 d, 检测跨上皮电阻的变化. 免疫荧光染色检测紧密连接蛋白occludin的定位、表达. 应用不同裂解液制备NP-40可溶性及不溶性蛋白框架, 分别进行蛋白印迹杂交检测活性和非活性occludin蛋白的相对含量.

结果: 与0 mmol/L GLN组比较, 补充GLN后, 跨上皮电阻明显升高(21.4 ± 0.1 , 124.5 ± 0.3 , 173.6 ± 0.2 vs 11.3 ± 0.3 , 均 $P < 0.05$). 免疫荧光染色可见0 mmol/L GLN组occludin呈团状分布于细胞胞质内, 随着GLN浓度的增加, occludin阳性荧光染色呈沿细胞膜分布的蜂巢状线性荧光. GLN缺乏不影响65 kDa occludin

■背景资料

谷氨酰胺是最重要的肠黏膜保护剂, 能够促进肠上皮细胞更新, 减少细菌穿透, 但是具体的作用机制还不十分清楚. 紧密连接是肠黏膜机械屏障的重要组成部分, 紧密连接的形成是否参与谷氨酰胺的肠黏膜保护功能还未见报道. 因此, 本文观察了谷氨酰胺对体外肠上皮细胞屏障通透性和紧密连接形成的影响.

■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

■研究前沿

谷氨酰胺的肠黏膜保护作用已经证实,但其发生机制是目前研究的热点,尤其是分子水平的研究是今后的趋势。

蛋白的表达,但能降低85 kDa occludin蛋白的表达(1.04 ± 0.03 , 1.17 ± 0.04 , 1.29 ± 0.03 , 1.43 ± 0.06 , $P < 0.05$)。

结论: 谷氨酰胺缺乏能够减少活性紧密连接蛋白occludin的表达,增加肠上皮细胞屏障通透性,补充GLN能够阻断这些改变。

关键词: 谷氨酰胺; 肠黏膜屏障; 紧密连接蛋白

崔巍, 闻颖, 董亚璐, 刘沛. 谷氨酰胺对体外培养肠上皮细胞屏障通透性的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3729-3733
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3729.asp>

0 引言

肠黏膜屏障是机体最重要的免疫防御屏障,将机体与肠道内的外源性物质隔离开来. 肠黏膜具有屏障功能最重要的解剖基础是肠上皮细胞间具有完整的紧密连接,封闭了细胞旁间隙,使得肠上皮细胞仅对离子、氨基酸等营养物质选择性通过. 但在病理情况下(如败血症、烧伤、急性重症胰腺炎等),紧密连接破坏,细菌、毒素等有害物质通过肠黏膜屏障进入血液系统,引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)甚至多器官功能衰竭^[1-5]. 谷氨酰胺在保护肠黏膜屏障功能方面发挥重要作用,能够促进肠上皮细胞更新,减少细菌穿透^[6-11],但是具体的作用机制还不十分清楚,紧密连接的形成是否参与谷氨酰胺的肠黏膜保护功能还未见报道. 因此,本文应用Caco-2细胞建立体外肠上皮细胞屏障模型,观察谷氨酰胺对肠上皮细胞屏障通透性和紧密连接蛋白occludin形成的影响,以探讨谷氨酰胺肠黏膜保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM高糖培养基, FBS购自美国Gibco-BRL公司, 非必需氨基酸购自美国Hyclone公司, L-GLN购自美国Sigma公司, 兔抗occludin多克隆抗体购自美国Zymed公司, FITC标记的羊抗兔IgG购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组: Caco-2细胞来源于人大肠癌细胞,可分化成有极性的肠上皮细胞. 将分化良好的Caco-2细胞接种于Transwell板上(孔径3 μm , 有效膜面积0.6 cm^2), 接种密度为 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$. 实验分为4组, 每组细胞均应用含有200 mL/L胎牛血清、10 g/L非必需氨基酸和青

霉素-链霉素双抗液的DMEM培养液,但是加入不同浓度的谷氨酰胺(0、0.1、1、4 mmol/L)在37°C、50 mL/L CO_2 条件下进行培养,隔天换液(Transwell上层加入100 μL 培养液,下层加入600 μL 培养液),倒置显微镜下观察细胞生长情况,同时测定跨上皮电阻(transsepithelial electrical resistance, TEER). 另将一部分细胞接种于六孔细胞培养板中,培养液同上,生长7 d左右细胞达到70%融合后进行免疫荧光和蛋白印迹杂交. 每种实验均选取至少三组非同代细胞进行。

1.2.2 跨上皮电阻的测定: 在细胞生长过程中,每日应用EVOM测定各组细胞的TEER值,具体测定方法参照文献[12]. 为保证数值的准确性,整个过程在恒定温度下(37°C)进行,每个Transwell均取不同方向的三个点,重复测定3次,取平均值乘以Transwell的膜面积,即为该样品的TEER值,以 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 表示;因为Transwell膜本身也具有一定的TEER,因此标准TEER($\Omega \cdot \text{cm}^2$) = 样本实测TEER-空白对照TEER。

1.2.3 免疫荧光: 取同代细胞接种于盖玻片上,加入含不同浓度谷氨酰胺的DMEM培养液,待细胞生长融合达70%左右,取出盖玻片, PBS漂洗3次(每次10 min), 37 g/L甲醛固定15 min, PBS漂洗,加入0.5% Triton X-100处理10 min, PBS漂洗,100 mL/L小牛血清白蛋白封闭1 h,加入浓度为1:50的多克隆兔抗occludin抗体,4°C过夜, PBS漂洗后加入用FITC标记的羊抗兔IgG抗体37°C 1 h,再用PBS漂洗,蒸馏水洗后用甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.2.4 NP-40可溶性及不溶性蛋白框架的制备: 参照文献[13]各组细胞用冰PBS洗3遍,然后用NP-40蛋白裂解液(25 mmol/L HEPES, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 4 mmol/L EDTA, 1% Nonidet P-40, 25 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L PMSF)冰上裂解细胞20 min, 4°C离心12000 g 30 min, 上清即为NP-40可溶性蛋白,转移至新的Microtube内. 剩余沉淀应用SDS蛋白裂解液(25 mmol/L HEPES, pH7.4, 4 mmol/L EDTA, 10 g/L SDS, 25 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L PMSF)冰上裂解细胞20 min, 超声波粉碎5 s \times 5次, 4°C离心12000 g 30 min, 所得上清即为NP-40不溶性蛋白,采用BCA法对蛋白样品进行定量,用蒸馏水将蛋白样品调成相同浓度,加入相同体积上样缓冲液,沸水煮5 min进行蛋白变性。

■相关报道

张媛莉 *et al*证实,在慢性酗酒大鼠中,补充谷氨酰胺能够提高occludin、ZO-1等紧密连接分子蛋白和mRNA的表达。

1.2.5 Western blot: 每个样本取等量蛋白(约50 μg)进行80 g/L SDS-PAGE凝胶电泳, 电压100 V, 90 min; 电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 电压50 V, 2 h; 脱脂奶粉封闭2 h, 加入多克隆兔抗occludin 抗体(1:1000)4℃过夜; 然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔-IgG抗体(1:2000)室温2 h, ECT显色。以 β -actin作为内参, 结果通过天能图像分析系统进行分析, occludin蛋白含量 = 样本occludin蛋白灰度值/同一样本 β -actin灰度值。

统计学处理 以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 应用SPSS10.0对各组间数据进行分析。采用单因素方差分析(AVONA)的LSD方法对各组间数据进行比较。

2 结果

2.1 谷氨酰胺对肠上皮细胞屏障TEER的影响 0 mmol/L GLN组Caco-2细胞随着培养时间的延长, 细胞间隙没有消失, TEER值无明显升高($11.3 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$); 0.1 mmol/L GLN组Caco-2细胞培养21 d后, 细胞间隙仍然存在, TEER值有所升高($21.4 \pm 0.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P < 0.05$), 1 mmol/L GLN组Caco-2细胞培养21 d后, 细胞间隙消失, TEER值达 $124.5 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 与0 mmol/L GLN组比较有统计学差异($P < 0.0005$); 4 mmol/L GLN组Caco-2细胞培养21 d后, 细胞形成紧密单层, TEER值进一步升高, 达到 $173.6 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 与0 mmol/L GLN组比较差异有统计学意义($P < 0.0005$, 图1)。

2.2 谷氨酰胺对紧密连接蛋白occludin定位的影响 0 mmol/L GLN组可见细胞胞质内成团状的阳性荧光染色, 细胞间连接处缺乏阳性荧光染色; 0.1 mmol/L GLN组于细胞间连接处可见不连续的线状荧光染色; 1 mmol/L GLN组细胞间连接处出现沿细胞膜分布的蜂巢状线性荧光, 轮廓较完整, 胞质内阳性荧光染色减弱; 4 mmol/L GLN组细胞间连接处阳性荧光信号明显增强, 轮廓完整, 胞质内可见少量极弱的荧光信号(图2)。

2.3 谷氨酰胺对occludin蛋白表达的影响 各组蛋白样品分为NP-40可溶性(S)与NP-40不溶性(I)两个框架分别进行蛋白杂交, 结果发现NP-40可溶性标本仅在65 kDa处见一特异性的蛋白条带, 对各条带进行灰度分析发现各组occludin蛋白的表达无明显差异(0.91 ± 0.05 , 0.85 ± 0.09 , 0.87 ± 0.06 , 0.88 ± 0.05 , $P > 0.05$)。NP-40不溶性标本可见两条蛋白条带, 分别在65 kDa和85 kDa, 对各条带进行灰度分析发现, 随着谷氨酰胺浓度的增加, occludin蛋白的相对含量明显增加

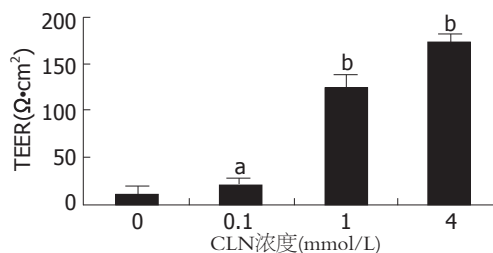


图1 GLN对TEER的影响。可见随着GLN浓度的增加, TEER值逐渐升高。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 0 mmol/L GLN组。

(1.04 ± 0.03 , 1.17 ± 0.04 , 1.29 ± 0.03 , 1.43 ± 0.06 , $P < 0.05$), 提示谷氨酰胺能够影响occludin蛋白的表达(图3)。

3 讨论

肠道积极参与应激反应, 如反应失调可直接或间接损伤肠黏膜屏障, 引起肠腔内细菌和内毒素逸出肠壁, 导致肠源性全身感染及SIRS甚至多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 造成大量重症患者死亡^[14-19]。目前已有研究表明在烧伤、重症胰腺炎、暴发性肝衰竭等疾病引起的肠黏膜屏障损伤中, 均存在肠上皮屏障的破坏^[20-25], 表现为紧密连接蛋白表达减少, 紧密连接完整性的破坏, 因此推断在上述疾病中, 肠上皮紧密连接屏障的损害是诱发全身炎症反应综合征的启动环节, 阻断此环节对疾病的转归具有重要意义。

GLN是目前应用非常广泛的肠黏膜保护剂, 是维持肠道黏膜代谢、结构和功能的必须营养成分, 对维护肠黏膜细胞的生长、分化和增殖具有重要的意义^[26-30]。体内实验表明GLN缺乏可使肠道黏膜萎缩, 绒毛变稀变矮, 屏障功能下降; 补充GLN后能明显增加大鼠肠黏膜质量、恢复绒毛高度、黏膜表面积和陷窝深度, 加快肠上皮细胞更新速度, 阻止肠黏膜萎缩及炎症所致的通透性增加, 从而恢复并维持肠黏膜屏障功能^[31-32]。Potsic *et al*^[33]利用胃造口术喂养大鼠发现, GLN的缺乏可以引起肠上皮细胞间连接的破坏, 并且与凋亡无关, 提示GLN可能对于肠上皮细胞紧密连接的形成功能维持有一定影响。为了验证这一推论, 我们应用研究紧密连接屏障的经典细胞Caco-2细胞建立体外肠上皮细胞屏障, 检测了不同浓度GLN对肠上皮屏障通透性和紧密连接蛋白occludin表达的影响。

我们首先利用TEER检测了GLN对肠上皮屏障通透性的影响。TEER由离子经细胞旁间隙的流动形成, 是检测细胞旁通透性的常用指标^[12]。我

■ 创新盘点

目前国内关于谷氨酰胺影响肠上皮细胞间紧密连接形成的文章尚未见报道。谷氨酰胺肠黏膜屏障保护功能的研究主要集中在光镜下肠组织结构的变化以及肠上皮细胞的凋亡。

■ 应用要点

本研究证实谷氨酰胺缺乏能够影响紧密连接的形成, 为临床补充谷氨酰胺治疗肠黏膜屏障损害提供依据。

■名词解释

紧密连接: 存在于各类上皮细胞及血管内皮细胞间的顶端, 形成一个顶端闭锁结构且发挥“屏障”和“防御”功能, 以控制细胞间的通透性和保持细胞的极性。紧密连接由多种紧密连接蛋白组成, 包括Claudin, occludin以及ZO-1, ZO-2, Zo-3等, 在不同的组织结构, 各种紧密连接蛋白的表达亦存在差别。

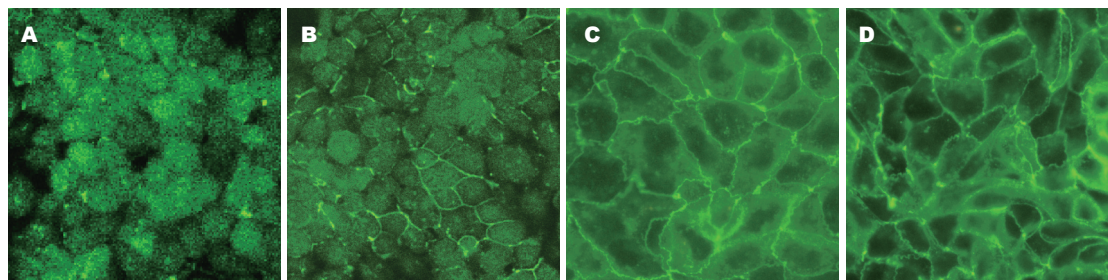


图2 谷氨酰胺对紧密连接蛋白occludin定位的影响(免疫荧光染色×400)。A: 0 mmol/L GLN组; B: 0.1 mmol/L GLN组; C: 1 mmol/L GLN组; D: 4 mmol/L GLN组。

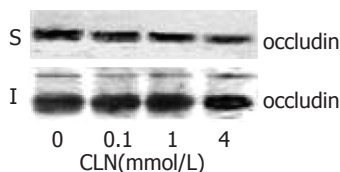


图3 谷氨酰胺对occludin蛋白表达的影响。S: NP-40可溶性蛋白标本; I: NP-40不溶性蛋白标本。

们的实验结果表明在GLN缺乏的情况下, Caco-2细胞不能形成紧密单层, TEER值始终处于较低水平; 而在补充1 mmol/L GLN后, Caco-2细胞的细胞间隙消失, TEER值明显升高, 4 mmol/L GLN的这种作用更加明显, 说明GLN的含量能够影响肠上皮细胞屏障的通透性。

TEER值主要反映肠上皮细胞的细胞旁通透性, 而肠上皮细胞的细胞旁转运主要受紧密连接的限制。有研究报道紧密连接蛋白occludin是TJ的主要功能调节蛋白^[34], 其表达量的多少直接决定TEER的高低, 并且occludin缺失可引起肠上皮屏障通透性的增高^[35], 因此我们进一步检测了GLN对紧密连接蛋白occludin表达的影响。

Occludin存在两种形式, 磷酸化和非磷酸化, 磷酸化是其活性形式。非磷酸化occludin主要存在于胞质内, 可溶解于去垢剂NP-40中, 而磷酸化occludin定位于细胞间的紧密连接处, 不溶于NP-40^[13], 因此我们制备了NP-40可溶性和不溶性蛋白成分, 分别进行蛋白印迹杂交。结果表明GLN缺乏能够明显减少NP-40不溶性occludin蛋白的表达, 补充GLN后, NP-40不溶性occludin蛋白的含量明显增加, 提示GLN缺乏能够引起活性状态occludin蛋白表达的减少。这一结论可由免疫荧光进一步证实: 在GLN缺乏的情况下, occludin蛋白呈团块状分布于Caco-2细胞胞质内, 不能定位在紧密连接处发挥功能; 补充GLN后, occludin蛋白逐渐向细胞膜上转移, 定位于膜尖端的紧密连接处, 形成完整的紧密连接。

总之, GLN缺乏能够通过减少活性紧密连接蛋白occludin的表达, 影响紧密连接的完整性, 进而增加肠上皮屏障通透性, 补充GLN是维护

紧密连接完整性, 降低肠上皮屏障通透性的有效手段。

4 参考文献

- 1 Rotstein OD. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome: gut origin, protection, and decontamination. *Surg Infect (Larchmt)* 2000; 1: 217-223; discussion 223-225
- 2 McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Jul 11. [Epub ahead of print]
- 3 Xu GF, Lu Z, Gao J, Li ZS, Gong YF. Effect of ecoinmunonutrition supports on maintenance of integrity of intestinal mucosal barrier in severe acute pancreatitis in dogs. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 656-661
- 4 Ding LA, Li JS, Li YS, Zhu NT, Liu FN, Tan L. Intestinal barrier damage caused by trauma and lipopolysaccharide. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2373-2378
- 5 白爱平. 炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3187-3191
- 6 Li JY, Lu Y, Hu S, Sun D, Yao YM. Preventive effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction induced by severe trauma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 168-171
- 7 黎君友, 盛志勇, 吕艺, 于勇, 胡森, 周宝桐. 严重创伤后肠屏障功能损伤及谷氨酰胺的保护. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 1093-1096
- 8 张小平, 程爱国, 陈玉红. 谷氨酰胺对饥饿大鼠内毒素移位和肠黏膜免疫功能的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1982-1986
- 9 Vicario M, Amat C, Rivero M, Moretó M, Pelegrí C. Dietary glutamine affects mucosal functions in rats with mild DSS-induced colitis. *J Nutr* 2007; 137: 1931-1937
- 10 Salman B, Oguz M, Akmansu M, Bebitoglu I, Akca G, Sultan N, Emre U, Kerem M, Yilmaz U. Effect of timing of glutamine-enriched enteral nutrition on intestinal damage caused by irradiation. *Adv Ther* 2007; 24: 648-661
- 11 Wojtuń S, Gil J, Błaszak A. [Dietary treatment in acute pancreatitis] *Pol Merkur Lekarski* 2007; 22: 469-473
- 12 Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor- α (TNF α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 1): 137-146
- 13 Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-

- Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 1997; 137: 1393-1401
- 14 Vega D, Badami CD, Caputo FJ, Watkins AC, Lu Q, Xu da Z, Berezina TL, Zaets SB, Feketeova E, Deitch EA. The influence of the type of resuscitation fluid on gut injury and distant organ injury in a rat model of trauma/hemorrhagic shock. *J Trauma* 2008; 65: 409-414; discussion 414-415
- 15 Zhang F, Tong L, Qiao H, Dong X, Qiao G, Jiang H, Sun X. Taurine attenuates multiple organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. *J Surg Res* 2008; 149: 101-109
- 16 Farmer DG, Venick RS. Morbidity and mortality associated with chronic intestinal failure. *Transplantation* 2008; 85: 1385-1386
- 17 Liu H, Li W, Wang X, Li J, Yu W. Early gut mucosal dysfunction in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2008; 36: 192-196
- 18 Flint R, Windsor J. The role of the intestine in the pathophysiology and management of severe acute pancreatitis. *HPB (Oxford)* 2003; 5: 69-85
- 19 Beale RJ, Sherry T, Lei K, Campbell-Stephen L, McCook J, Smith J, Venetz W, Altheheld B, Stehle P, Schneider H. Early enteral supplementation with key pharmaconutrients improves Sequential Organ Failure Assessment score in critically ill patients with sepsis: outcome of a randomized, controlled, double-blind trial. *Crit Care Med* 2008; 36: 131-144
- 20 崔巍, 马力, 闻颖, 刘沛. 暴发性肝衰竭时肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3008-3012
- 21 Ergün O, Ergün G, Oktem G, Selvi N, Doğan H, Tunçyürek M, Saydam G, Erdener A. Enteral resveratrol supplementation attenuates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase activity and mucosal damage in experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 1687-1694
- 22 Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, Fioramonti J, Eutamene H, Bueno L. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol* 2005; 167: 1071-1079
- 23 Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9: 143-151
- 24 Ammori BJ, Cairns A, Dixon MF, Larvin M, McMahon MJ. Altered intestinal morphology and immunity in patients with acute necrotizing pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 490-496
- 25 Rupani B, Caputo FJ, Watkins AC, Vega D, Magnotti LJ, Lu Q, Xu da Z, Deitch EA. Relationship between disruption of the unstirred mucus layer and intestinal restitution in loss of gut barrier function after trauma hemorrhagic shock. *Surgery* 2007; 141: 481-489
- 26 Shimizu M, Son DO. Food-derived peptides and intestinal functions. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 885-895
- 27 Wu XQ, Shu LH, Sun M, Wang H, Gao H. [Effect of glutamine on apoptosis of the small intestine in young rats with endotoxemia and its mechanism] *Zhongguo Dangdai Erke Zazhi* 2006; 8: 496-498
- 28 Margaritis VG, Filos KS, Michalaki MA, Scopa CD, Spiliopoulou I, Nikolopoulou VN, Vagianos CE. Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J Surg* 2005; 29: 1329-1334
- 29 De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005; 33: 1125-1135
- 30 Assimakopoulos SF, Nikolopoulou VN, Scopa CD, Vagianos CE. Beneficial effects of glutamine on intestinal barrier function in obstructive jaundice. *World J Surg* 2005; 29: 935-936
- 31 Boelens PG, Houdijk AP, Haarman HJ, Nijveldt RJ, van Leeuwen PA. Glutamine-enriched enteral nutrition decreases infectious complications in trauma patients. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 253-254; author reply 254-255
- 32 Karinch AM, Pan M, Lin CM, Strange R, Souba WW. Glutamine metabolism in sepsis and infection. *J Nutr* 2001; 131: 2535S-2538S; discussion 2550S-2551S
- 33 Potsic B, Holliday N, Lewis P, Samuelson D, DeMarco V, Neu J. Glutamine supplementation and deprivation: effect on artificially reared rat small intestinal morphology. *Pediatr Res* 2002; 52: 430-436
- 34 Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1241-H1248
- 35 Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Brain Res Rev* 2003; 42: 221-242

■同行评价

本研究新颖性较强, 数据可靠, 结论可信, 具有一定的学术价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

糖尿病大鼠回肠肌间神经丛mGluR1及mGluR5的表达

白艳华, 张军, 史红阳, 戴菲, 李芳伟

■背景资料

谷氨酸(Glu)是广泛存在于中枢神经系统的一种神经递质,与大脑的认知、疼痛、内脏感觉等有关。Glu激活两种类型的受体:离子型受体(iGluRs)和代谢型受体(mGluRs)。最新的分子生物学分析发现,Glu不仅作用于中枢的一些神经核团,调节胃肠功能,而且还作用于一些外周的神经元组织和非神经元组织直接调节胃肠功能,及参与胃肠内脏感觉的传入,从而间接调节胃肠功能。

白艳华,张军,史红阳,戴菲,李芳伟,西安交通大学医学院第二附属医院消化科 陕西省西安市 710004

白艳华,西安交通大学医学院第二附属医院在读博士,主要从事胃肠动力疾病的研究。

作者贡献分布:白艳华与张军对此文所作贡献均等;此课题由白艳华与张军设计;研究过程由白艳华、史红阳、戴菲及李芳伟操作完成;数据分析由白艳华、史红阳、戴菲及李芳伟完成;本论文写作由白艳华与张军完成。

通讯作者:张军,710004,陕西省西安市,西安交通大学医学院第二附属医院消化科。jun3z@163.com

电话:029-87679272

收稿日期:2008-09-17 修回日期:2008-10-12

接受日期:2008-10-30 在线出版日期:2008-11-28

Expression of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 in the myenteric plexus of the diabetic rat ileum

Yan-Hua Bai, Jun Zhang, Hong-Yang Shi, Fei Dai, Fang-Wei Li

Yan-Hua Bai, Jun Zhang, Hong-Yang Shi, Fei Dai, Fang-Wei Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jun Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. jun3z@163.com

Received: 2008-09-17 Revised: 2008-10-12

Accepted: 2008-10-30 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To find the morphologic abnormalities, if any, of myenteric plexus in diabetic rats, to explore the expressive alteration of the Group I mGluRs (mGluR1, mGluR5) and to explore the role of glutamic acid energetic nerve in enteric nervous system of diabetic gastroenteropathy.

METHODS: Forty rats were randomly divided into diabetic group and control group. Gastric emptying and small intestine transit rate were measured, and the number of mGluR1 and mGluR5 receptors in diabetic rats was studied using fluorescence immunohistochemistry and RT-PCR.

RESULTS: Eighteen weeks after the establishment of the diabetic rats model, gastric emptying

and gastrointestinal transit rate were delayed compared with control group. The number of ganglia and neurons was significantly decreased in diabetic rats compared with control group (mGluR1: 4.5 ± 3.1 vs 7.3 ± 2.4 , 142.25 ± 28.24 vs 175.34 ± 34.83 , both $P < 0.05$; mGluR5: 4.3 ± 2.1 vs 7.9 ± 2.8 , 133.37 ± 35.73 vs 168.34 ± 32.66 , both $P < 0.05$). The fluorescence intensity of the receptors of mGluR1 and mGluR5 in the diabetic rats was weakened compared with control group (mGluR1: 145.23 ± 28.78 vs 167.72 ± 30.56 , both $P < 0.05$; mGluR5: 141.54 ± 18.46 vs 172.53 ± 29.74 , both $P < 0.05$), and mGluR1 and mGluR5 mRNA expressions were decreased in the diabetic rats (1.05 ± 0.27 vs 1.43 ± 0.47 , 0.95 ± 0.30 vs 1.60 ± 0.39 , both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Decreased glutamatergic ganglia and neurons and reduced receptor expression of mGluR1 and mGluR5 in myenteric plexus might be one of the mechanisms of diabetic gastroenteropathy in rats.

Key Words: Enteric nervous system; Glutamate; mGluR1; mGluR5

Bai YH, Zhang J, Shi HY, Dai F, Li FW. Expression of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 in the myenteric plexus of the diabetic rat ileum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3734-3739

摘要

目的: 了解糖尿病大鼠胃肠动力障碍时,回肠肌间神经丛有无形态学异常,以及第I组代谢型谷氨酸受体mGluR1、mGluR5的表达变化,探讨谷氨酸能神经在糖尿病胃肠病变发生中的作用。

方法: 40只大鼠随机分为糖尿病组和对照组,给与高脂饮食结合腹腔注射STZ 30 mg/kg造糖尿病模型。运用肌间神经丛铺片观察谷氨酸能神经的分布及形态特征,并对其神经节和神经元进行定量研究,以及运用免疫荧光染色和RT-PCR方法观察大鼠回肠肌间神经丛的代谢型谷氨酸受体mGluR1、mGluR5的表达变化。

■同行评议者

姜春萌,教授,大连医科大学附属第二医院消化科

结果:糖尿病大鼠肠神经系统肌间神经丛的谷氨酸能神经节和神经元的数目较对照组明显减少(mGluR1: 4.5 ± 3.1 vs 7.3 ± 2.4 ; 142.25 ± 28.24 vs 175.34 ± 34.83 , 均 $P < 0.05$; mGluR5: 4.3 ± 2.1 vs 7.9 ± 2.8 , 133.37 ± 35.73 vs 168.34 ± 32.66 , 均 $P < 0.05$), 荧光强度较对照组减弱(mGluR1: 145.23 ± 28.78 vs 167.72 ± 30.56 , 均 $P < 0.05$; mGluR5: 141.54 ± 18.46 vs 172.53 ± 29.74 , 均 $P < 0.05$), mGluR1、mGluR5受体mRNA表达减少(1.05 ± 0.27 vs 1.43 ± 0.47 , 0.95 ± 0.30 vs 1.60 ± 0.39 , 均 $P < 0.01$).

结论:糖尿病大鼠回肠肠壁的肌间神经丛的神经节和神经元数目减少, 以及兴奋性递质受体mGluR1、mGluR5的表达减少是导致胃肠道肌层兴奋性降低, 肌层收缩减弱, 引起糖尿病胃肠病变的一个重要机制.

关键词: 肠神经系统; 谷氨酸; 代谢型谷氨酸受体mGluR1; 代谢型谷氨酸受体mGluR5

白艳华, 张军, 史红阳, 戴菲, 李芳伟. 糖尿病大鼠回肠肌间神经丛mGluR1及mGluR5的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3734-3739
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3734.asp>

0 引言

糖尿病胃肠病变(diabetic gastroenteropathy)是糖尿病的一种常见的并发症, 表现为消化不良、恶心、呕吐、腹痛、腹胀、腹泻、便秘等多种症状. 75%的门诊糖尿病患者不同程度具有这些症状, 严重地影响了患者的生活质量, 并削弱了血糖的调控, 且妨碍药物的吸收, 干扰治疗, 又可引起营养不良和水电解质紊乱, 可分为糖尿病性胃轻瘫和糖尿病肠病两种^[1-2]. 近年, 糖尿病胃肠动力障碍已引起国内外学者和临床医生的重视, 并成为研究热点.

目前认为引起糖尿病胃肠病变的发病机制包括神经病变(含自主神经病变和肠神经系统病变)、Cajal间质细胞异常、高血糖、胃肠激素分泌异常等等, 但确切的发病机制尚不完全清楚^[3]. 其中肠神经系统(enteric nervous system, ENS)病变是较受关注的一种发病机制, 本研究通过建立糖尿病大鼠模型, 研究代谢型谷氨酸受体mGluR1、mGluR5的表达变化, 从而了解谷氨酸能神经的变化在糖尿病胃肠神经病变发生中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠40只, 体质量100-160 g,

由西安交通大学医学院动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 糖尿病模型的建立: 健康♂SD大鼠随机分为实验组(30只)和对照组(10只). 对照组饲以标准饲料, 糖尿病组予以高脂饲料. 高脂饲料的成分为普通饲料占61.5%的基础上, 加熟猪油15%, 蔗糖20%, 胆固醇2.5%, 胆酸盐1%. 8 wk后糖尿病组, 一次性左下腹ip链尿佐菌素(streptozotocin, STZ)30 mg/kg^[4], 对照组腹腔内只注射等量柠檬酸盐缓冲液, 空腹血糖 >7.8 mmol/L或葡萄糖耐量实验血糖120 min >11.1 mmol/L并稳定者为糖尿病大鼠. 成模后每2周固定时间测量体质量, 每周测定2-3次血糖, 剔除死亡、未成模及血糖恢复的大鼠, 18 wk ip过量100 g/L水合氯醛处死大鼠.

1.2.2 胃肠道动力指标检测: 大鼠胃排空和肠道传输速度测定: 两组动物禁食24 h, 处死前, 经口胃管灌入20 g/L亚甲兰0.4 mL, 30 min后处死动物, 开腹取全部胃肠道, 自幽门括约肌处取胃, 沿大弯侧剪开, 将胃内色素残留物充分洗于4 mL去离子水中, 3500 r/min离心15 min, 取上清液, 以分光光度计测吸光度为胃内色素残留量, 求出与对照均值的百分比即为各样本的胃内色素相对残留率. 同时量取幽门括约肌至小肠色素最前端及至盲肠距离, 以二者百分比为小肠推进比.

1.2.3 小肠肌间神经丛铺片标本制备: 动物处死后, 剖腹, 取出取相同部位(距离回盲部10 cm处)的一段回肠(长10 cm), 尽量剪掉肠系膜和脂肪组织, 0.01 mol/L的PBS洗净内容物后, 用40 g/L多聚甲醛充盈回肠, 两端用线结扎, 放入40 g/L多聚甲醛中固定8 h, 再转入300 g/L蔗糖溶液脱水. 将固定脱水后的肠管剪成长约6 mm×6 mm大小的方块, 0.01 mol/L的PBS冲洗3次后用手术刀片在肠管浆膜面轻轻划一切痕, 用钟表镊沿切痕轻轻剥离, 得到一层透明的组织, 即纵行肌与环形肌层组织, 将组织内侧面向上之置于解剖显微镜下, 用钟表镊小心剥掉环肌层, 即得到位于位于纵、环肌层之间的肌间神经丛铺片标本, 放入0.01 mol/L的PBS溶液中保存(4℃).

1.2.4 肌间神经丛免疫荧光染色分别检测mGluR1、mGluR5的表达变化: 本实验采用漂染法, 铺片经0.01 mol/L的PBS漂洗10 min×3次后, (1)0.3% triton x-100 37℃下孵育30 min; (2)0.01 mol/L的PBS漂洗10 min×3次; (3)正常血清封闭, 37℃下孵育2 h后倾去, 不洗; (4)室温下滴加一抗, (mGluR1 chemicon公司, 1:200稀

■相关报道

在中枢神经系统中, 当Glu的释放异常时均可引起的神经损伤和神经元死亡这种作用被称为兴奋性毒性, 这在中枢神经系统中已得到公认, 兴奋性毒性引起的损伤包括坏死和凋亡, 通常被认为是由离子型受体和NMDA受体介导的. 近年来的研究认为代谢型谷氨酸受体(mGluRs)在兴奋性毒性的发生机制中起着重要的作用.

■创新盘点

谷氨酸作为一种新的外周神经递质,在消化系方面的研究较少.本文首次研究其在糖尿病胃肠病变中的作用,探讨其在胃肠动力疾病发生中的作用.

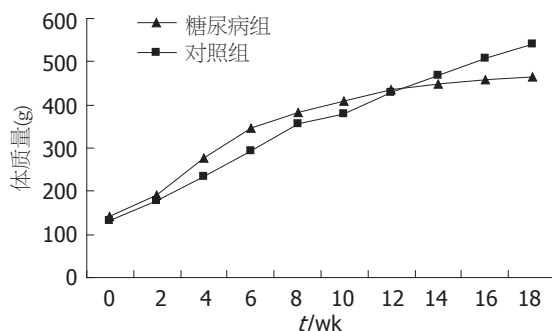


图1 两组大鼠体质量比较.

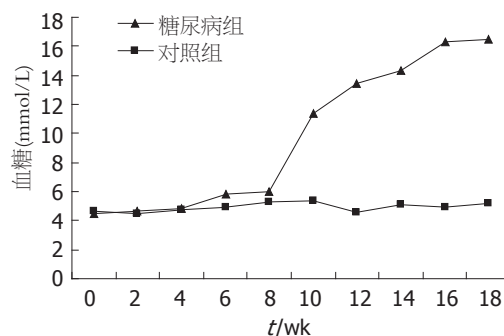


图2 两组大鼠血糖比较.

释, mGluR5 chemicon公司, 1:200稀释)4℃下过夜; (5)0.01 mol/L的PBS漂洗10 min×3次; (6)加荧光二抗(FITC 1:100稀释)4℃下过夜; (7)0.01 mol/L的PBS漂洗10 min×3次; (8)将铺片裱于多聚赖氨酸处理过的玻片上, 甘油/PBS封片; (9)荧光显微镜和共聚焦显微镜下观察, 照相, 定量观察mGluR1、mGluR5的荧光强度变化.

1.2.5 计数肌层神经元和神经节的数目: 在200倍荧光显微镜下对神经节及神经元计数, 每例随机选取5个高倍镜视野进行神经节及神经细胞计数, 取均值分别代表该标本神经节和神经元密度.

1.2.6 采用RT-PCR法检测胃肠道mGluR1、mGluR5 mRNA的表达变化: 取肠肌间神经丛共50 mg, 用TRIzol试剂提取总RNA. 测定总RNA含量. A_{260}/A_{280} 的比值在1.6-2.0时, 表明纯度较好, 可用于逆转录合成cDNA, 逆转录试剂盒购自Fermentas公司, 引物由北京三博远志公司设计合成. 引物序列如下, mGluR1上游引物: 5-AAA TCT ACA GCA ATG CTG GCGA-3, 下游引物5-CTT CGA TGA CTT CTC TGTC-3, 扩增产物长度207 bp; mGluR5上游引物: 5-GAGC AGATCAGCAGCGTAGTG-3, 下游引物: 5-TCA GGT AGG AGG AGC AGA TTGG-3, 扩增产物长度121 bp; β -actin上游引物: 5-CTA TCG GCA ATG AGC GGT TCC-3, 下游引物: 5-TGT GTT GGC ATA GAG GTC TTT ACG-3, 扩增产物长度146 bp. 25 μ L反应体系进行PCR反应, 反应条件: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 循环30次, 末次循环后72℃再延伸10 min, 4℃终止反应. 取PCR产物10 μ L, 在含0.5 mg/L溴化乙啶(EB)的20 g/L琼脂糖凝胶上电泳(80 V, 20 min), 凝胶图像成像处理系统扫描凝胶, 以目的条带与内参条带的光密度之比(A_{11}/A_{21})为标准评价结果.

统计学处理 各组数据用mean±SD表示, 两组间比较采用t检验, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异非常显著, 用SPSS13.0统计分析软件进行数据处理.

2 结果

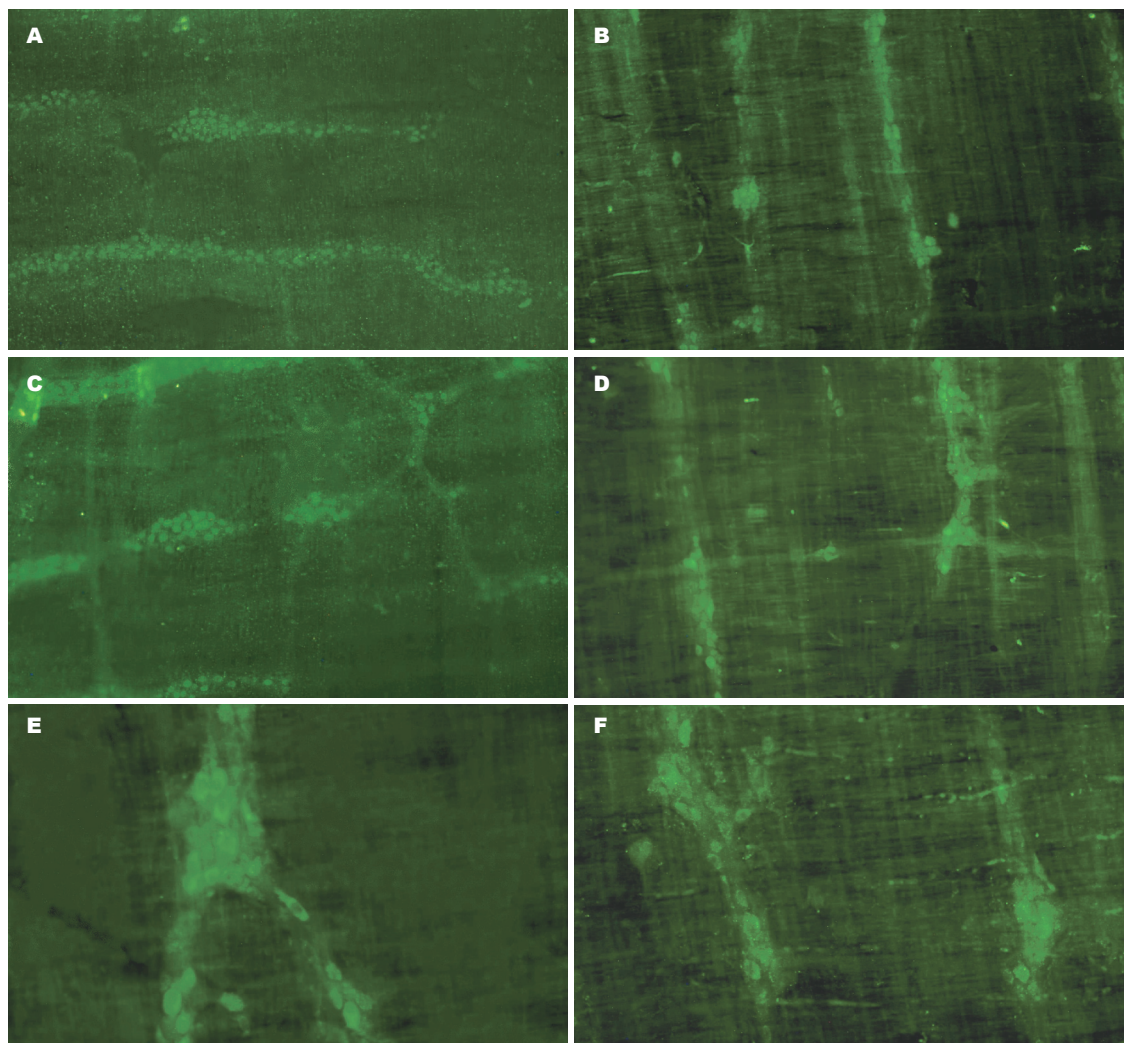
2.1 糖尿病模型大鼠的一般状况 对照组大鼠在实验全过程精神良好, 动作灵活, 进食正常, 体质量逐渐增加, 毛色光泽, 未见感染病灶. 实验组大鼠给予高脂饮食后, 体质量自第4周开始与对照组比较有明显升高, STZ注射后, 糖尿病大鼠体质量增长较注射前缓慢. 糖尿病组大鼠在注射后1 wk内出现多尿、多饮、多食症状, 10 wk后上述症状更加显著, 且较对照组大鼠明显懒动, 精神倦怠, 无进攻性, 毛色干枯无光泽, 易感染, 部分造模大鼠腹部出现溃疡.

2.2 体质量和血糖 实验组大鼠在第4周后体质量增长快于对照组(276.32 ± 23.47 g vs 234 ± 28.76 g, $P<0.05$), 自第9周开始体质量增长放缓, 第12-14周两组体质量无明显差异, 16 wk后糖尿病大鼠体质量增长较对照组减慢, 差异有显著性(458 ± 35.75 g vs 508 ± 28.46 g, $P<0.05$, 图1).

糖尿病组大鼠在第9周后空腹血糖高于对照组(8.34 ± 2.35 mmol/L vs 5.33 ± 1.03 mmol/L, $P<0.05$), 第10周后在血糖明显高于对照组(11.34 ± 3.36 mmol/L vs 5.34 ± 1.07 mmol/L, $P<0.01$), 以后每2周测一次空腹血糖. 大鼠18 wk处死前测量血糖和体重(图2).

2.3 糖尿病大鼠胃内色素残留率和小肠传输速率 糖尿病组的胃内色素残留率与对照组比较显著增加, 小肠传输速率减慢(表1).

2.4 神经节、神经元计数 荧光显微镜下, 大鼠回肠肌间神经丛主要由神经节, 节间束和一些含膨体的神经纤维纵横交织呈网格状分布, 神经元胞体形态多样, 有卵圆形, 三角形及不规则形. 正常大鼠回肠肌间神经丛中的神经纤维呈“树

**■应用要点**

本研究可以为胃肠动力疾病的研究提供新的方向, 帮助我们更深入地了解一些胃肠道动力疾病的发病机制, 提供诊断和治疗的新思路, 及提供新的药物作用靶点和选择用药的依据, 具有较强生理学意义和临床应用前景。

图3 各图均为大鼠荧光显微镜下FITC标记的mGluR1和mGluR5受体的回肠肌间神经丛。A: 正常大鼠的mGluR1受体的回肠肌间神经丛, 可见呈网状结构($\times 200$); B: 糖尿病组mGluR1受体的肌间神经丛结构($\times 200$), 可见网状结构受到破坏, 神经节和神经元数量与对照组比较明显减少; C: mGluR5受体的正常组肌间神经丛($\times 200$); D: 糖尿病组mGluR5受体染色, 神经节和神经元数量与对照组比较明显减少($\times 200$); E: 正常组mGluR5肌间神经丛($\times 400$); F: 糖尿病组mGluR5组间神经丛($\times 400$), 可见神经元数量减少。

表1 糖尿病组与对照组的胃内色素残留率、小肠传输速率比较(mean \pm SD, %)

分组	胃内色素残留率	小肠传输速率
糖尿病组	127.96 \pm 11.93 ^a	36.93 \pm 8.99 ^a
对照组	99.54 \pm 6.76	44.87 \pm 6.95

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组。

根状”分布, 神经节粗大, 其中可见大小不等的神经元及突起, 节间束可见散在神经元, 通常每个神经元胞体有1条或多条长突起伸入节间束, 但也可见到有的神经元胞体相互融合, 以及神经元的短突彼此连接, 构成神经元回路。此外, 还可见神经元的短突末端分叉, 投射到附近神经元的胞体上(图3)。

在200倍荧光显微镜下对阳性细胞计数, 每例随机选取5个高倍镜视野进行神经节及神经细胞计数发现实验组糖尿病大鼠回肠肌间神经丛中谷氨酸能神经和氮能神经的神经节体积较小, 散在分布的神经元少, 神经纤维较细。差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2, 图3)

2.5 激光共聚焦显微镜检测mGluR1、mGluR5荧光强度变化 糖尿病组较正常对照组回肠mGluR1、mGluR5阳性细胞数量减少, 表达减弱, 荧光强度降低, 差异显著($P < 0.05$, 表3)。

2.6 RT-PCR结果 产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 运用Bandscan软件计算各条带的积分光密度比值, 结果显示糖尿病组回肠组织mGluR1 mGluR5 mRNA的表达明显低于正常对照组($P < 0.01$, 表4, 图4)。

■名词解释

肠神经系统 (ENS): 1921年英国生理学家 Langley *et al* 在研究哺乳动物胃肠道的神经支配时, 发现胃肠道有一个独立于中枢神经系统的神经结构, 并将其称之为 ENS。他包括大量神经节和无数神经纤维, 主要由分布于黏膜下和肌间神经丛的传入神经元、中间神经元和传出神经元及神经纤维组成, ENS 中的肠神经节神经元是迷走神经和内脏神经传出神经通路的主要靶目标。这些神经节中的运动神经元和感觉神经元对胃肠平滑肌细胞、腺体细胞及血管等效应器官活动起作用。

表 2 糖尿病组和对照组神经节和神经元 (mean \pm SD)

分组	mGluR1		mGluR5	
	神经节	神经元	神经节	神经元
糖尿病组	4.5 \pm 3.1 ^a	142.25 \pm 28.24 ^a	4.3 \pm 2.1 ^a	133.37 \pm 35.73 ^a
对照组	7.3 \pm 2.4	175.34 \pm 34.83	7.9 \pm 2.8	168.34 \pm 32.66

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组。

表 3 糖尿病组和对照组回肠部荧光强度平均吸光度值 (I4) 比较

分组	糖尿病组	对照组
mGluR1	145.23 \pm 28.78 ^a	167.72 \pm 30.56 ^a
mGluR5	141.54 \pm 18.46	172.53 \pm 29.74

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组。

3 讨论

ENS 是由胃肠道壁内 (包括胰和胆囊内) 所含的神经节及其间的网络组成的系统, 从食管到肛门的管壁内, 有一系列的神经丛, 共同组成 ENS, 他是一个高度协调的神经集合, 具有明显的特征性, 类似于中枢神经系统 (CNS)。ENS 主要由有神经节的神经丛和无神经节的神经丛这两个互相联系的神经丛组成复杂的肠壁内神经网络, 主要有肠肌间神经丛和黏膜下神经丛。肠肌间神经丛位于纵肌和环肌之间, 围绕整个消化管的周围, 是由内部相互联系的小神经节组成的神经网络。ENS 是调节小肠收缩活动的重要组成部分, ENS 的神经元主要包括两部分: (1) 胆碱能神经元, 是兴奋性神经元, 主要的神经递质为乙酰胆碱。(2) 非肾上腺素非胆碱能神经元, 释放的递质主要有 NO, 血管活性肠肽, 生长抑素等^[5]。

谷氨酸 (Glu) 是广泛存在于 CNS 中的一种兴奋性神经递质, Glu 激活两种类型的受体, 离子型谷氨酸受体 (iGluRs) 和代谢型谷氨酸受体 (mGluRs)。其中, mGluRs 是一类和 G 蛋白偶联的调节离子通道和第二信使生成酶的特异型受体。根据序列同源性、信号转导通路以及药理学特性, mGluRs 可以分为 3 组, 第 I 组 (Group I mGluRs) 包括 mGluR1 和 mGluR5^[6]。研究表明, mGluRs 在中枢神经系统之外也有表达, 如在脊髓背根神经节, 味蕾, 胸腺, 视网膜、胰腺等都发现有其表达。目前研究证实 Glutamate 也是存

表 4 糖尿病组和对照组回肠部各基因 mRNA 的表达

分组	糖尿病组	对照组
mGluR1	1.05 \pm 0.27	1.43 \pm 0.47
mGluR5	0.95 \pm 0.30 ^b	1.60 \pm 0.39

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组。

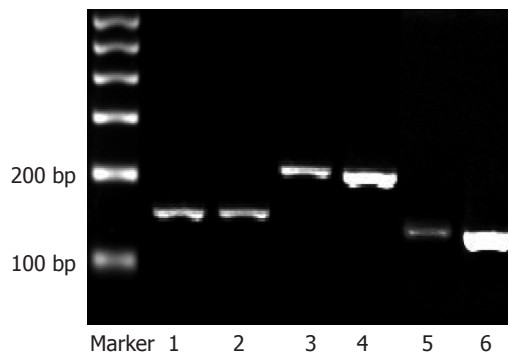


图 4 糖尿病组和正常对照组 mGluR1、mGluR5 mRNA 的表达。A: 1: β -actin 糖尿病组; 2: β -actin 对照组; 3: mGluR1 糖尿病组; 4: mGluR1 对照组; 5: mGluR5 糖尿病组; 6: mGluR5 对照组。

在于胃肠道中的一种重要的兴奋性神经递质, 谷氨酸受体在胃肠道 ENS 大量分布^[7-8], 功能包括调节胃肠运动、参与胃肠内脏感觉的传入, 以及影响胃肠道的分泌等^[9-10]。

本研究选用 δ 大鼠, 运用高脂饮食加前腹腔注射 STZ 法进行糖尿病造模, 从发病机制上更接近临床上的 2 型糖尿病, 且造模成功率较高^[4]。通过制作小肠肌间神经丛铺片, 进行 mGluR1、mGluR5 受体免疫荧光染色发现, 在糖尿病大鼠的肌间神经丛的神经节及神经元数目较对照组明显减少, mGluR1、mGluR5 受体表达降低, 荧光强度减弱。RT-PCR 方法观察发现肌间神经丛 mGluR1、mGluR5 mRNA 表达较对照组减少, 由于目前发现的 mGluR1、mGluR5 主要存在于神经元上, 固可认为肌间神经丛 mGluR1、mGluR5 mRNA 表达的减少, 系由于神经元上的该物质减少所致。以往研究发现, 肝硬化大鼠空肠和结肠肌间神经丛的氮能和胆碱能神经元减少, 一氧化氮合酶和乙酰胆碱酯酶的活性均下降, 其所对应的神经元的功能下降^[11], 另外, 雷亚宁 *et al*^[12] 用链脲佐菌素建立大鼠糖尿病模型, 发现糖尿病大鼠回肠肌间神经丛内胆碱能神经元的密度明显低于对照组, 而氮能神经节和氮能神经元的密度则明显高于对照组。龙庆林 *et al*^[13] 用 Karnovsky-Root 直接法证明了糖尿

病大鼠胃窦肌间神经丛胆碱能神经减少. 由于Glutamate也是存在于胃肠道中的一种重要的兴奋性神经递质, mGluR1、mGluR5与乙酰胆碱共同表达, 与乙酰胆碱具有协同作用^[14], 因此从另一方面也证明糖尿病胃肠病变大鼠在胆碱能神经元的密度减少的同时也存在着谷氨酸受体的减少. 实验表明, 谷氨酸是重要的兴奋性神经递质, 能使胃肠道平滑肌去极化, 激活mGluR1, mGluR5可引起胃肠道平滑肌收缩, 促进胃肠蠕动^[15], 因此肌间神经丛内谷氨酸能神经元减少势必引起肠蠕动减慢, 胃肠传输速率延迟. 通过本研究进一步证明糖尿病大鼠胃肠壁的肌间神经丛由于兴奋性递质受体mGluR1, mGluR5的减少, 导致胃肠道肌层兴奋性降低, 收缩减弱.

另外, 分子生物学研究表明mGluR1、mGluR5属于G蛋白偶联受体, 作用机制是通过活化磷脂酶C(PLC), 将膜内的磷酸肌醇(PI)水解为甘油二酯(DAG)和三磷酸肌醇(IP3), IP3作为第二信使可引起内源性Ca²⁺的释放. 神经元是一种可兴奋性细胞, 能迅速以一种可控制方式传递电化学信号, 神经元内对化学和电信号刺激做出反应的主要信使是Ca²⁺^[16]. 因此当mGluR1、mGluR5受体表达减少, 使其配体作用于神经元上谷氨酸受体的作用减弱, 使Ca²⁺释放减少, 因此神经元的兴奋性降低, 从分子水平上证实了第I组谷氨酸受体在ENS上的调节作用.

总之, 糖尿病胃肠病变大鼠胃肠动力明显减退, 其机制可能与肌间神经丛谷氨酸能神经损伤, mGluR1、mGluR5受体表达减少有一定关系.

4 参考文献

- 1 Ordog T. Interstitial cells of Cajal in diabetic gastroenteropathy. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 8-18
- 2 Talley NJ, Young L, Bytzer P, Hammer J, Leemon M, Jones M, Horowitz M. Impact of chronic gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus on health-related quality of life. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 71-76
- 3 Duby JJ, Campbell RK, Setter SM, White JR, Rasmussen KA. Diabetic neuropathy: an intensive review. *Am J Health Syst Pharm* 2004; 61: 160-173; quiz 175-176
- 4 Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 2000; 49: 1390-1394
- 5 Furness JB. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20 Suppl 1: 32-38
- 6 Fagni L, Bockaert J. Effects of nitric oxide on glutamate-gated channels and other ionic channels. *J Chem Neuroanat* 1996; 10: 231-240
- 7 Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 1995; 375: 599-603
- 8 Tong Q, Kirchgeessner AL. Localization and function of metabotropic glutamate receptor 8 in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G992-G1003
- 9 Ren J, Hu HZ, Liu S, Xia Y, Wood JD. Glutamate receptors in the enteric nervous system: ionotropic or metabotropic? *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 257-264
- 10 Young RL, Page AJ, O'Donnell TA, Cooper NJ, Blackshaw LA. Peripheral versus central modulation of gastric vagal pathways by metabotropic glutamate receptor 5. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G501-G511
- 11 张忠平, 张志坚, 张捷, 王雯, 林克荣, 朱金照. 肝硬化大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能神经的变化. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1459-1461
- 12 雷亚宁, 丁友梅, 钱旭, 郑裕勇. 糖尿病大鼠胃肠动力及肌间神经丛形态学改变. *中华消化杂志* 2006; 26: 666-668
- 13 龙庆林, 房殿春, 史洪涛, 罗元辉. 糖尿病大鼠胃窦肌间神经丛胆碱能神经的变化及其意义. *重庆医学* 2004; 33: 1868-1869
- 14 Kirchgeessner AL, Liu MT, Alcantara F. Excitotoxicity in the enteric nervous system. *J Neurosci* 1997; 17: 8804-8816
- 15 Kirchgeessner AL. Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 591-596
- 16 Suzuki H, Kito Y, Hashitani H, Nakamura E. Factors modifying the frequency of spontaneous activity in gastric muscle. *J Physiol* 2006; 576: 667-674

■同行评价

本研究内容较新, 设计合理, 统计方法恰当, 具有一定的参考价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

幽门螺杆菌在胃癌及其癌前疾病中的原位检测及意义

于秀文, 董楠楠, 宫月华, 徐倩, 袁媛

■背景资料

H. pylori 可以导致胃炎、胃溃疡以及增加胃癌的发生风险。目前, 诊断 *H. pylori* 感染的方法很多, 其中形态学检查, 特别是 HE, 在常规病理诊断的同时检测 *H. pylori* 感染, 既评价了组织学改变状况, 又观察了 *H. pylori* 感染情况, 故被学者广泛使用。

于秀文, 董楠楠, 宫月华, 徐倩, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院普通外科研究所暨肿瘤研究所第三研究室 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室 辽宁省沈阳市 110001
于秀文, 2004年哈尔滨医科大学硕士, 副教授, 主要从事消化系统疾病的病因病理研究。

辽宁省高校重点实验室资助项目, No. 20060913

作者贡献分布: 此课题由于秀文、董楠楠、宫月华、徐倩及袁媛设计; 研究过程由于秀文与董楠楠操作完成; 本论文写作由于秀文、宫月华及徐倩完成; 袁媛修改定稿。

通讯作者: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普通外科研究所暨肿瘤研究所第三研究室, 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室. yyuan@mail.cmu.edu.cn
电话: 024-23256666-6153 传真: 024-22703576

收稿日期: 2008-08-19 修回日期: 2008-10-24

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-28

In situ detection of *Helicobacter pylori* in gastric cancer and precancerous diseases and its significance

Xiu-Wen Yu, Nan-Nan Dong, Yue-Hua Gong, Qian Xu, Yuan Yuan

Xiu-Wen Yu, Nan-Nan Dong, Yue-Hua Gong, Qian Xu, Yuan Yuan, Cancer Control Laboratory of Cancer Institute and General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Projects Funded by Key Laboratories in Universities of Liaoning Province, No. 20060913

Correspondence to: Professor Yuan Yuan, Cancer Control Laboratory of Cancer Institute and General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan@mail.cmu.edu.cn

Received: 2008-08-19 Revised: 2008-10-24

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To investigate the distribution of *H. pylori* infection in gastric cancer and precancerous diseases and the role of *H. pylori* infection in the incidence and differentiation of gastric cancer, as well as the clinical value of *H. pylori* infection detection using immunohistochemical method.

METHODS: Biopsy specimens of gastric mucosa in various diseases were randomly selected from 327 cases in Zhuanghe region in Liaoning Province, including 63 cases of superficial gastritis, 62 cases of atrophic gastritis and 202 cases of gastric cancer. HE staining and immunohistochemical staining were used to measure the density of *H. pylori* infection in gastric mucosa and mucus.

tochemical staining were used to measure the density of *H. pylori* infection in gastric mucosa and mucus.

RESULTS: The *H. pylori* colonization status was higher in superficial gastritis group or in atrophic gastritis than gastric cancer group ($\chi^2 = 96.998, 87.542$, both $P < 0.01$), while the status was lower in gastric cancer group than pericancer mucosa ($\chi^2 = 5.378, P < 0.01$), higher in the intestinal gastric cancer group than in diffused gastric cancer ($\chi^2 = 19.253, P < 0.01$). When *H. pylori* density score was ≤ 2 , the *H. pylori* free status in superficial gastritis and atrophic gastritis were lower than that of gastric cancer ($\chi^2 = 6.526, 6.218$, both $P < 0.01$), and when *H. pylori* density score > 2 , it was higher in superficial gastritis group or atrophic gastritis group than in gastric cancer group ($\chi^2 = 20.252, 46.248$, both $P < 0.01$), it was higher in atrophic gastritis than in superficial gastritis ($\chi^2 = 4.746, P < 0.05$), and it was higher in the intestinal gastric cancer than in diffused gastric cancer ($\chi^2 = 6.784, P < 0.01$).

CONCLUSION: The *H. pylori* distribution is higher in superficial gastritis and atrophic gastritis than in gastric cancer, lower in gastric cancer than in pericancer mucosa, higher in the intestinal gastric cancer than in diffused one. There is no significant difference in the free *H. pylori* density score between gastric cancer tissue and pericancer mucosa. Immunohistochemical detection of *H. pylori* is better than HE staining.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Immunohistochemistry; Situ detection; Gastric diseases; Distribution status

Yu XW, Dong NN, Gong YH, Xu Q, Yuan Y. In situ detection of *Helicobacter pylori* in gastric cancer and precancerous diseases and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3740-3745

摘要

目的: 探讨 *H. pylori* 感染在胃癌及癌前疾病中的分布状态以及在胃癌的发生及分化中的作用以及免疫组化法检测 *H. pylori* 感染的价值。

■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

方法: 随机选取辽宁省庄河地区不同胃疾病胃黏膜活检标本327例, 包括慢性浅表性胃炎63例、萎缩性胃炎62例, 胃癌202例, 常规HE染色及免疫组织化学染色, 观察黏膜、黏液*H pylori*感染密度。

结果: 不同胃疾病*H pylori*在胃黏膜定植状态为浅表性胃炎、萎缩性胃炎高于胃癌($\chi^2 = 96.998, 87.542, \text{均} P < 0.01$), 胃癌组织低于癌周黏膜($\chi^2 = 5.378, P < 0.01$), 肠型胃癌高于弥漫型胃癌($\chi^2 = 19.253, P < 0.01$)。不同胃疾病*H pylori*在胃黏液游离状态为*H pylori*密度评分 ≤ 2 时, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎低于胃癌($\chi^2 = 6.526, 6.218, \text{均} P < 0.01$), *H pylori*密度评分 > 2 时, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎高于胃癌($\chi^2 = 20.252, 46.248, \text{均} P < 0.01$), 萎缩性胃炎高于浅表性胃炎($\chi^2 = 4.746, P < 0.05$), 胃癌与癌周黏膜无统计学差异, 肠型胃癌高于弥漫型胃癌($\chi^2 = 6.784, P < 0.01$)。

结论: 不同胃疾病*H pylori*分布, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎高于胃癌, 胃癌低于癌周黏膜, 肠型高于弥漫型。黏液内游离*H pylori*密度评分胃癌组织与癌周黏膜无差异。免疫组化染色检测*H pylori*优于HE。

关键词: 幽门螺杆菌; 免疫组织化学; 原位检测; 胃疾病; 分布状态

于秀文, 董楠楠, 宫月华, 徐倩, 袁媛. 胃癌及其癌前疾病幽门螺杆菌原位检测及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3740-3745

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3740.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是一种能运动的G⁻人类致病菌, 他可以导致胃炎、胃溃疡以及增加胃癌的发生风险^[1]。1994年世界卫生组织下属的国际癌症研究机构(IARC)已将其列为人类胃癌的I类致癌物^[2]。目前, 诊断*H pylori*感染的方法很多, 如细菌培养、形态学检查、快速尿素酶实验(RUT)及末梢血抗*H pylori*-IgG检测等^[3], 其中形态学检查, 特别是苏木素-伊红(HE)染色, 在常规病理诊断的同时检测*H pylori*感染, 既评价了组织学改变状况, 又观察了*H pylori*感染情况^[4], 故被学者广泛使用。但以往利用HE染色在胃癌组织中很少发现*H pylori*感染^[5]。那么究竟在胃癌发生过程中是否始终伴有*H pylori*感染? 在胃癌组织中*H pylori*的分布状况如何? 其与不同组织学分型胃癌关系如何? 目前尚不清

楚。本研究同步利用HE及免疫组织化学方法对不同胃疾病黏膜标本进行*H pylori*的原位检测, 旨在探讨*H pylori*感染在胃癌及癌前疾病、胃癌与癌周黏膜、胃癌不同组织学类型的分布状态, 同时探讨免疫组化方法检测*H pylori*感染的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选取辽宁省庄河地区1992-2007年经胃镜取材的胃黏膜标本共327例, 男201例, 女126例, 年龄32-77(平均年龄59.32)岁, 包括慢性浅表性胃炎63例、萎缩性胃炎62例, 胃癌202例。按胃癌的Lauren's分型^[6]: 肠型102例, 弥漫型100例。所有胃癌标本中有50例带有癌周黏膜(与癌不在同一块黏膜, 无癌组织浸润)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色及HE染色: 免疫组织化学染色采用SP法(链酶卵白素-过氧化酶法)。一抗为多克隆兔抗*H pylori*-IgG(DAKO, Denmark A/S)浓缩型抗体, 工作浓度为1:25, SP试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)操作步骤按说明书进行, 用0.01 mol/L柠檬酸缓冲液, pH6.0 \pm 0.1进行微波*H pylori*抗原修复。细菌培养的*H pylori*进行涂片, 阳性染色的涂片作为阳性对照, PBS代替一抗作阴性对照。HE染色即苏木素-伊红染色: 胃黏膜活检组织经950 mL/L乙醇固定, 石蜡包埋, 制成5 μm 切片, HE染色, 镜下观察。

1.2.2 结果判定: 免疫组织化学染色及HE染色评分标准相同。*H pylori*感染的程度依据显微镜下每个视野($\times 1000$)所见的细菌数目进行4级评分^[7]: 0分: 0个; 1分: 1-9个; 2分: 10-29个; 3分: 30-99个; 4分 ≥ 100 个。分别观察黏膜(胃黏膜小凹上皮表面、腺腔内)、黏液(黏膜表面黏液及远处黏液)*H pylori*, 每个部位观察2个视野, 取其均数作为该部位*H pylori*感染的密度值, 对积分进行4级综合判定: (-)为0分; (+)为0分 $<$ 积分 ≤ 1 分; (++)为1分 $<$ 积分 ≤ 2 分; (+++)为积分 > 2 分。

统计学处理 采用SPSS11.5软件进行 χ^2 和配对 χ^2 检验, 所有统计检验均为双侧概率检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化染色与HE染色判定*H pylori*感染密度的比较 免疫组化阳性的*H pylori*呈黄色或棕黄色, 而HE染色*H pylori*呈蓝色或紫蓝色, 单个细菌为短杆状或弯曲状, 可散在、成簇或成片排列。*H pylori*存在于胃黏膜小凹上皮表面、腺

■研究前沿

以往利用HE染色在胃癌组织中很少发现*H pylori*感染, 那么究竟在胃癌发生过程中是否始终伴有*H pylori*感染? 在胃癌组织中*H pylori*的分布状况如何? 其与不同组织学分型胃癌关系如何? 目前尚不清楚。

■相关报道

Sarosiek *et al* 研究发现萎缩性胃炎伴有胃酸的降低, 低胃酸影响了 *H pylori* 的定植, 但胃黏膜远端黏液内仍有 *H pylori* 的存在。

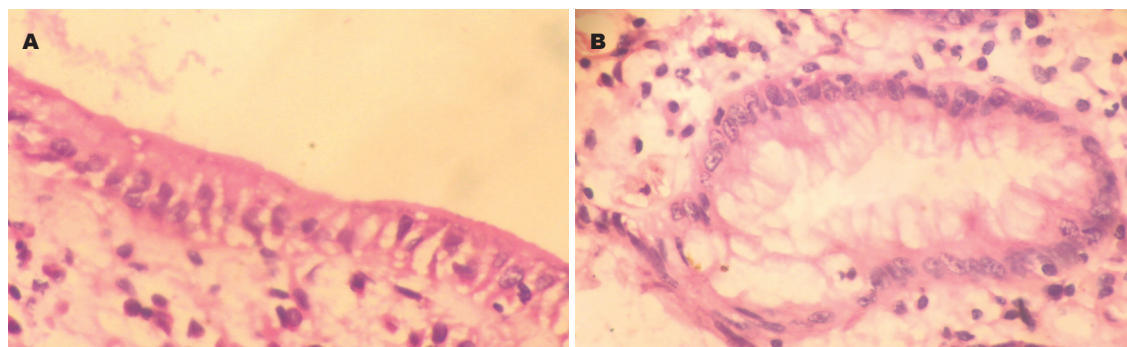


图1 胃病理组织HE染色观(SP×400). A: 浅表性胃炎表面上皮及附近黏液内见少量 *H pylori*; B: 萎缩性胃炎肠化黏膜腺体及黏膜表面未见 *H pylori*.

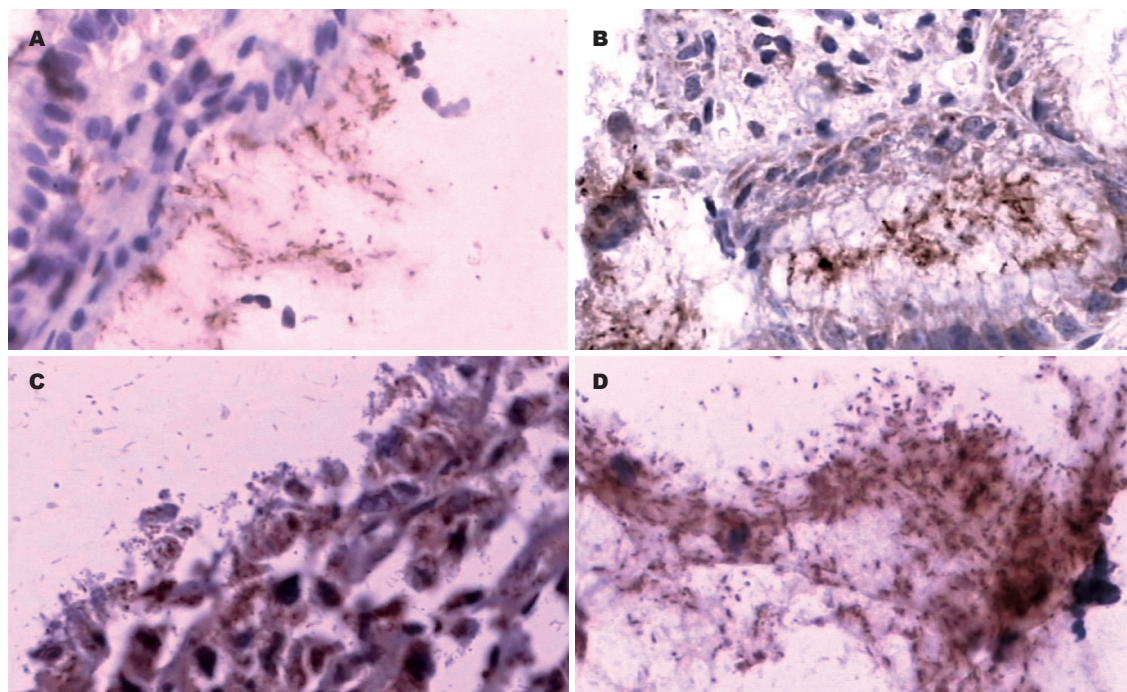


图2 胃病理组织免疫组化染色观(SP×400). A: 浅表性胃炎表面上皮及附近黏液内见 *H pylori*; B: 萎缩性胃炎肠化黏膜腺体及黏膜表面见 *H pylori*; C: 胃癌组织及表面见 *H pylori*; D: 胃癌组织黏膜远处黏液内见大量 *H pylori*.

表1 免疫组化染色与HE染色检测 *H pylori* 感染密度的比较

HE染色	免疫组化染色				总计
	-	+	++	+++	
-	33	38	37	44	152
+	0	37	41	29	107
++	0	4	17	21	42
+++	0	7	7	12	26
总计	33 ^b	86	102 ^b	106 ^b	327

^b $P < 0.01$ vs HE.

腔内、黏膜表面黏液及远处黏液中. 免疫组化染色与HE染色比较 *H pylori* 感染密度评分, 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 表1). 免疫组化染色在胃

黏液内发现大量成簇或成片状排列的 *H pylori*, 而HE染色呈阴性(图1-2).

2.2 慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎、胃癌组织中 *H pylori* 分布 不同胃疾病 *H pylori* 在胃黏膜分布为浅表性胃炎、萎缩性胃炎高于胃癌($\chi^2 = 96.998$, $\chi^2 = 87.542$, $P < 0.01$); 而不同胃疾病 *H pylori* 在胃黏液分布为 *H pylori* 密度评分 ≤ 2 分时, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎低于胃癌($\chi^2 = 6.526$, $\chi^2 = 6.218$, $P < 0.01$), *H pylori* 密度评分大于2时, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎高于胃癌($\chi^2 = 20.252$, $\chi^2 = 46.248$, $P < 0.01$), 萎缩性胃炎高于浅表性胃炎($\chi^2 = 4.746$, $P < 0.05$, 表2).

2.3 胃癌与癌周黏膜组织中 *H pylori* 分布 50例相对应的胃癌及癌周组织 *H pylori* 在胃黏膜分布为

表 2 *H pylori*在慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎、胃癌中的分布

<i>H pylori</i> 密度评分	黏膜			黏液		
	浅表性胃炎	萎缩性胃炎	胃癌	浅表性胃炎	萎缩性胃炎	胃癌
-	8(12.7) ^a	10(16.1) ^b	163(80.7)	2(3.2) ^b	2(3.2) ^b	31(15.3)
+	18(28.6) ^a	16(25.8) ^b	23(11.4)	4(6.3) ^b	2(3.2) ^b	45(22.3)
++	24(38.1) ^a	23(30.1) ^b	9(4.5)	16(25.4)	7(11.3) ^b	59(29.2)
+++	13(20.6) ^a	13(30.0) ^b	7(3.5)	41(65.1) ^{ab}	51(82.3) ^b	67(33.2)
总计	63(100)	62(100)	202(100)	63(100)	62(100)	202(100)

^a*P*<0.05 vs 萎缩性胃炎; ^b*P*<0.01 vs 胃癌。表 3 *H pylori*在胃癌与癌周黏膜分布

胃癌	癌周黏膜		癌周黏液	
	<i>H pylori</i> (-)	<i>H pylori</i> (+)	<i>H pylori</i> (-)	<i>H pylori</i> (+)
<i>H pylori</i> (-)	22	19	6	6
<i>H pylori</i> (+)	1	8	1	37
总计	23	27 ^a	7	43

^a*P* = 0.00 vs 胃癌。表 4 *H pylori*在不同组织学类型胃癌组织中分布

<i>H pylori</i> 密度评分	黏膜		黏液	
	肠型	弥漫型	肠型	弥漫型
-	70(68.6) ^b	93(93.0)	9(8.8) ^{bd}	22(22.0) ^d
+	19(18.6) ^b	4(4.0)	27(26.5)	18(18.0)
++	8(7.8) ^b	1(1.0)	30(29.4)	29(29.0)
+++	5(4.9)	2(2.0)	36(35.3)	31(31.0)
总计	102(100)	100(100)	102(100)	100(100)

^b*P*<0.01 vs 弥漫型胃癌; ^d*P*<0.01 vs 黏膜。

胃癌18.0%(9/50)低于癌周黏膜54.0%(27/50)($\chi^2 = 5.378$, *P*<0.05), 而在胃黏液分布胃癌与癌周黏液两者无统计学差异(*P*>0.05, 表3)。

2.4 不同组织学类型胃癌组织中*H pylori*分布 肠型、弥漫型胃癌组织*H pylori*在胃黏膜分布为肠型高于弥漫型($\chi^2 = 19.253$, *P*<0.01), 而在胃黏液中分布亦为肠型胃癌高于弥漫型($\chi^2 = 6.784$, *P*<0.01); 同一类型胃癌*H pylori*的分布为黏液高于黏膜(*P*<0.01, 表4)。

3 讨论

以往研究表明, *H pylori*感染与慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、胃及十二指肠溃疡、肠化生和胃癌相关^[8-10], 是胃癌发生的始动因素^[11]。然而, 利用常规检测方法, 在慢性萎缩性胃炎、胃癌组织中*H pylori*检出率较低^[12]。本研究同时利用HE及免疫组织化学方法对不同胃疾病黏膜组织进行*H pylori*的原位检测, 发现免疫组化方法对*H pylori*的检出率高于HE, 此方法不仅能检测到定植于胃黏膜的*H pylori*, 而且还能发现大量隐藏在胃黏液内游离的*H pylori*, 而HE染色则为阴性。文献报道, 免疫组织化学方法是一种特殊的检测*H pylori*感染的方法, 该方法观察结果较稳定^[13], 观察者间的一致率高达98%^[14]。本研究免疫组化方法检测结果显示, 不同胃疾病*H pylori*在胃黏膜分布为浅表性胃炎、萎缩性胃

■创新盘点

本研究发现, 黏膜内定植*H pylori*密度浅表性胃炎、萎缩性胃炎高于胃癌; 胃癌低于癌周黏膜; 肠型高于弥漫型。黏液内游离*H pylori*密度胃癌组织与癌周黏膜无差异。免疫组化染色检测*H pylori*优于HE染色。单纯检测定植于胃黏膜的*H pylori*数量不能全面反映患者*H pylori*感染状况, 有必要对黏膜和黏液中的*H pylori*密度进行综合检测。

炎高于胃癌(*P*<0.05), 在胃黏液分布为*H pylori*密度评分≤2分时, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎低于胃癌(*P*<0.01), *H pylori*密度评分大于2时, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎高于胃癌(*P*<0.01), 萎缩性胃炎高于浅表性胃炎(*P*<0.05)结果提示, 单纯检测定植于胃黏膜的*H pylori*数量不能全面反映患者*H pylori*感染的状况, 有必要对黏膜和黏液中的*H pylori*密度进行综合检测。本研究发现从慢性浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-胃癌发生过程中, 定植于黏膜的*H pylori*逐渐减少, 而黏液内*H pylori*密度仍处于较高水平, 尤其在萎缩性胃炎的黏液中可以检出大量*H pylori*。Sarosiek *et al*^[15]报道萎缩性胃炎伴有胃酸的降低, 低胃酸影响了*H pylori*的定植, 但黏液内仍有*H pylori*的存在, 游离的*H pylori*可以产生溶解黏液的酶, 使黏膜层变薄, 黏蛋白成分发生变化^[16-17], 有利于*H pylori*通过黏液屏障与胃黏膜上皮细胞发生黏附及定植。黏附的*H pylori*可以产生一些毒力因子, 如细胞毒素相关蛋白A(CagA)、空泡细胞毒素(VacA)等, 直接损害胃黏膜或引起炎症反应, 增加DNA损伤的机会, 导致胃黏膜上皮细胞更新加速, 从而引起胃癌的发生^[18-19]。提示, *H pylori*在癌前疾病及胃癌中是始终存在的, 并处于较高水平。那么在胃癌及癌周围组织

同行评价

本研究选题科学, 创新性较好, 实用性较强, 统计学处理正确, 具有很好的学术价值。

*H. pylori*分布如何呢? 本研究结果显示, 在胃癌及癌周围组织均可检出*H. pylori*, 胃癌及癌周围组织*H. pylori*在胃黏膜分布为胃癌低于癌周黏膜($P<0.05$), 而在胃黏液内分布胃癌与癌周黏膜两者无统计学差异($P>0.05$)。从癌周组织到癌组织定植*H. pylori*数量逐渐降低, 但其却以游离的方式存在于黏液内(76.0%), 与癌周正常组织(86.5%)经配对 χ^2 检验无统计学差异。说明同一患者体内癌组织及癌周围组织*H. pylori*感染状况是相同的, 通过检测癌周围组织*H. pylori*能够反映患者的感染状况。

目前研究表明, 肠型胃癌和弥漫性胃癌的发生过程不同。肠型胃癌经由*H. pylori*感染胃炎→腺体萎缩→肠上皮化生→异型增生→胃癌, 而弥漫性胃癌则很少或不经历此过程^[20]。肠型胃癌*H. pylori*检出率高于弥漫型胃癌(94.4% vs 42.1%)^[10]。本研究显示, 在肠型及弥漫型胃癌中均可检出*H. pylori*, 肠型、弥漫型胃癌组织*H. pylori*在胃黏膜分布为肠型高于弥漫型(31.4% vs 7%, $P<0.01$), 在胃黏液分布亦为肠型胃癌高于弥漫型(91.2% vs 78%, $P<0.01$)。即随着胃癌分化程度的降低, 定植于黏膜的*H. pylori*以及游离于黏液的*H. pylori*均减少。文献报道^[21]胃上皮细胞所分泌的黏液主要分布在肠型胃癌的腺腔表面而散在分布于弥散型胃癌的基质层, *H. pylori*则恰恰依赖于腺腔内的黏液而存活。存活的*H. pylori*可以不定期的与胃黏膜相互作用, 并分泌大量的cagA、vacA等毒素^[22], CagA通过IV分泌系统激活某些信号转导途径引起细胞的增殖和分化^[23-25], 形成不同类型的胃癌。

本研究采用免疫组化方法原位检测不同胃疾病、胃癌及癌周围黏膜、不同组织学类型胃癌*H. pylori*在黏膜的定植状态及在黏液的游离状态的分布, 为*H. pylori*与胃癌的发生研究提供了实验依据。

参考文献

- Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-1186
- Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1-241
- Taj Y, Essa F, Kazmi SU, Abdullah E. Sensitivity and specificity of various diagnostic tests in the detection of Helicobacter pylori. *J Coll Physicians Surg Pak* 2003; 13: 90-93
- Ota H, Hosoda K, Kobayashi M, Genta RM. [Histological diagnosis of Helicobacter pylori using biopsy specimens] *Nippon Rinsho* 2003; 61:

- 61-65
- Sipponen P, Kosunen TU, Valle J, Riihelä M, Seppälä K. Helicobacter pylori infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1992; 45: 319-323
- Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49
- Tokunaga Y, Shirahase H, Yamamoto E, Inao R, Hamaguchi S, Kanaji K, Kitaoka A, Yagi T, Tokuka A, Ohsumi K. Modified rapid urease test for Helicobacter pylori detection in relation to an immunohistochemical stain. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 617-621
- Matsuhisa T, Miki M, Yamada N, Sharma SK, Shrestha BM. Helicobacter pylori infection, glandular atrophy, intestinal metaplasia and topography of chronic active gastritis in the Nepalese and Japanese population: the age, gender and endoscopic diagnosis matched study. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2007; 5: 295-301
- 成虹, 胡伏莲, 袁申元, 潘国宗. 北京地区消化性溃疡流行病学分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3518-3523
- Trajkov D, Stadelova K, Dimitrova M, Mishevski J, Serafimovski V. Helicobacter pylori and gastric carcinoma. *Prilozi* 2007; 28: 39-46
- Wu MS, Hung HW, Wang JT, Tseng CC, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Lin JT. Helicobacter pylori-seronegative gastric carcinoma: a subset of gastric carcinoma with distinct clinicopathologic features. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 2432-2436
- Araújo-Filho I, Brandão-Neto J, Pinheiro LA, Azevedo IM, Freire FH, Medeiros AC. Prevalence of Helicobacter pylori infection in advanced gastric carcinoma. *Arq Gastroenterol* 2006; 43: 288-292
- Marzio L, Angelucci D, Grossi L, Diodoro MG, Di Campli E, Cellini L. Anti-Helicobacter pylori specific antibody immunohistochemistry improves the diagnostic accuracy of Helicobacter pylori in biopsy specimen from patients treated with triple therapy. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 223-226
- Rotimi O, Cairns A, Gray S, Moayyedi P, Dixon MF. Histological identification of Helicobacter pylori: comparison of staining methods. *J Clin Pathol* 2000; 53: 756-759
- Sarosiek J, Marshall BJ, Peura DA, Hoffman S, Feng T, McCallum RW. Gastroduodenal mucus gel thickness in patients with Helicobacter pylori: a method for assessment of biopsy specimens. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 729-734
- Kang HM, Kim N, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Lee DH, Lee HS, Jung HC, Song IS. Effects of Helicobacter pylori infection on gastric mucin expression. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 29-35
- 汪荣泉, 房殿春, 刘为纹, 罗元辉. 幽门螺杆菌感染与胃癌和癌旁组织中MUC1和MUC6基因表达的关系. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 584-585
- Suriani R, Colozza M, Cardesi E, Mazzucco D, Marino M, Grosso S, Sanseverinati S, Venturini I, Borghi A, Zeneroli ML. CagA and VacA Helicobacter pylori antibodies in gastric cancer. *Can J Gastroenterol* 2008; 22: 255-258
- Farinati F, Cardin R, Cassaro M, Bortolami M, Nitti D, Tieppo C, Zaninotto G, Rugge M. Helicobacter pylori, inflammation, oxidative damage and gastric

- cancer: a morphological, biological and molecular pathway. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17: 195-200
- 20 Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 651-674
- 21 Endo S, Ohkusa T, Saito Y, Fujiki K, Okayasu I, Sato C. Detection of *Helicobacter pylori* infection in early stage gastric cancer. A comparison between intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *Cancer* 1995; 75: 2203-2208
- 22 宫月华, 柳云恩, 孙丽萍, 董楠楠, 袁媛. 中国辽宁地区人群幽门螺杆菌感染菌株与相关性胃疾病的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3462-3467
- 23 Katoh M, Katoh M. FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review). *Int J Oncol* 2006; 29: 163-168
- 24 Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U, Fox JG, Rogers AB, Neish AS, Collier-Hyams L, Perez-Perez GI, Hatakeyama M, Whitehead R, Gaus K, O'Brien DP, Romero-Gallo J, Peek RM Jr. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10646-10651
- 25 Snider JL, Allison C, Bellaire BH, Ferrero RL, Cardelli JA. The beta1 integrin activates JNK independent of CagA, and JNK activation is required for *Helicobacter pylori* CagA+-induced motility of gastric cancer cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 13952-13963

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 •

世界华人消化杂志修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

宜兴市胃癌手术患者临床特征分析1022例

周炎, 曾金艳, 白津, 龚伟达, 潘建强, 谈永飞, 李爱萍, 周建伟

■背景资料

近年来, 一些研究显示胃癌的发生年龄、发生部位、临床特征、组织学类型等都发生改变, 提示一些影响胃癌发生发展的因素可能因生活、工作环境的改善、生活方式的改善以及医疗技术的进步而发生了变化, 这些变化可能对胃癌的临床预防和治疗有重要的意义。为了解宜兴市胃癌发生发展的变化趋势, 现将宜兴市人民医院1999-01/2006-12经病理证实的1022例胃癌手术病例的临床资料进行分析, 以探讨近八年来宜兴地区胃癌临床病例特点的变化趋势, 为胃癌的防治提供新的依据。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科; 吕宾, 教授, 浙江中医药大学附属医院消化科

周炎, 龚伟达, 潘建强, 谈永飞, 宜兴市人民医院肿瘤科 江苏省宜兴市 214200

曾金艳, 白津, 李爱萍, 周建伟, 南京医科大学肿瘤中心 南京医科大学公共卫生学院 江苏省南京市 210029

周炎, 主任医师, 南京医科大学兼职副教授。

国家自然科学基金资助项目, No. 30771829

江苏省教育厅重大基础研究资助项目, No. 06KJA33023

作者贡献分布: 周炎、曾金艳及白津对此文所作贡献均等; 此课题由周炎、龚伟达、潘建强、谈永飞、李爱萍及周建伟设计; 研究过程由周炎、曾金艳及白津操作完成; 论文写作由周炎、曾金艳及白津完成。

通讯作者: 周建伟, 210029, 江苏省南京市汉中140号, 南京医科大学肿瘤中心 南京医科大学公共卫生学院。

jwzhou@njmu.edu.cn

电话: 025-86862961 传真: 025-86862050

收稿日期: 2008-08-02 修回日期: 2008-09-18

接受日期: 2008-09-22 在线出版日期: 2008-11-28

Clinical feature analysis of 1022 cases undergoing gastric cancer operation in Yixing city

Yan Zhou, Jin-Yan Zeng, Jin Bai, Wei-Da Gong, Jian-Qiang Pan, Yong-Fei Tan, Ai-Ping Li, Jian-Wei Zhou

Yan Zhou, Wei-Da Gong, Jian-Qiang Pan, Yong-Fei Tan, Department of Oncology, Yixing People's Hospital, Yixing 214200, Jiangsu Province, China

Jin-Yan Zeng, Jin Bai, Ai-Ping Li, Jian-Wei Zhou, the Cancer Center, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30771829; and the Key Program for Basic Research of Jiangsu Bureau of Education, No. 06KJA33023

Correspondence to: Professor Jian-Wei Zhou, the Cancer Center, Nanjing Medical University, School of Public Health, Nanjing Medical University, 140 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. jwzhou@njmu.edu.cn

Received: 2008-08-02 Revised: 2008-09-18

Accepted: 2008-09-22 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To explore the clinicopathological variation trend of gastric cancer from 1999 to 2006 in Yixing city and to provide information for gastric cancer prevention.

METHODS: A total of 1022 pathologically confirmed gastric cancer cases were subdivided into 2 groups. Group A comprised cases from 1999 to 2002, while group B consisted of cases from 2003 to 2006. Statistical analysis were conducted on

age, gender, tumor size, tumor location, pathologic-TNM stage and differentiation of tumor cells.

RESULTS: In both groups, gastric cancer occurred mainly at gastric body, cardia part and antrum. Interestingly, as compared with group A, there was a decreasing trend in the proportion of gastric carcinoma at gastric body ($\chi^2 = 21.59, P < 0.05$), and an increasing proportion at stomach angle ($\chi^2 = 33.16, P < 0.05$). The proportion of poorly-differentiated adenocarcinoma was significantly lower in group B ($\chi^2 = 46.11, P < 0.05$) than in group A. The proportion of tumor size and pathologic-TNM stage showed no significant difference between the two groups.

CONCLUSION: There is an increasing trend in the incidence of gastric cancer, but the malignance level of gastric cancer shows a decreasing trend in Yixing city.

Key Words: Gastric cancer; Clinical characteristics; Tumor location; Cell differentiation

Zhou Y, Zeng JY, Bai J, Gong WD, Pan JQ, Tan YF, Li AP, Zhou JW. Clinical feature analysis of 1022 cases undergoing gastric cancer operation in Yixing city. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3746-3751

摘要

目的: 探讨江苏省宜兴市地区胃癌病例临床特征的变化趋势, 为防治胃癌提供依据。

方法: 宜兴市人民医院1999-2006经病理证实的胃癌手术患者1022例, 分析逐年收治病例的临床病理特征及变化趋势, 按手术时间先后分成两组: 1999-2002组(A组)和2003-2006组(B组)。比较两组病例性别、年龄、肿瘤大小、发生部位、分化程度、临床分期和术后辅助化疗情况的差异

结果: 两组患者发病部位均以胃体、贲门和胃窦处为常见。与A组相比, B组胃癌发生于胃体处患者比例明显下降($\chi^2 = 21.59, P < 0.05$), 而发生于胃角的比例升高($\chi^2 = 33.16, P < 0.05$)。

两组胃癌患者肿瘤分化程度都以低分化及中分化为主, B组低分化比例较A组明显下降($\chi^2 = 46.11, P < 0.05$), 而中分化胃癌比例明显升高($\chi^2 = 37.68, P < 0.05$). 两组病例的肿瘤直径和pTNM分期构成比方面均无显著差异.

结论: 宜兴市胃癌发病人数呈逐年上升趋势, 而其肿瘤细胞的分化呈逐步升高的趋势.

关键词: 胃癌; 临床特征; 发病部位; 细胞分化

周炎, 曾金艳, 白津, 龚伟达, 潘建强, 谈永飞, 李爱萍, 周建伟. 宜兴市胃癌手术患者临床特征分析1022例. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3746-3751
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3746.asp>

0 引言

在我国胃癌已经是继肺癌和肝癌之后的第三大常见肿瘤, 胃癌仍然居消化系统肿瘤发病率的首位. 我国目前每年新发胃癌患者超过40万人, 因胃癌死亡患者30万人, 患病率和死亡率超过世界平均水平的2倍. 尽管近年来胃癌的诊治水平不断提高, 早期胃癌的治愈率可达90%以上, 但大多数患者就诊时已是晚期, 而晚期患者术后生存率仍较低. 近年来, 一些研究显示胃癌的发生年龄、发生部位、临床特征、组织学类型等都有所改变^[1-2], 提示一些影响胃癌发生发展的因素可能因生活、工作环境的改善、生活方式的改善以及医疗技术的进步而发生了变化, 这些变化可能对胃癌的临床预防和治疗有重要的意义. 宜兴市位于江苏省苏南太湖之滨, 是经济较发达的县级市, 人口约106万, 也是中国县级单位胃癌高发区(年发病率). 而该市的人民医院是该市最主要的医疗单位, 收治了本市绝大多数胃癌手术病例. 为了解宜兴市胃癌发生发展的变化趋势, 现将宜兴市人民医院1999-01/2006-12经病理证实的1022例胃癌手术病例的临床资料进行分析, 以探讨近八年来宜兴地区胃癌临床病理特点的变化趋势, 为胃癌的防治提供新的依据.

1 材料和方法

1.1 材料 宜兴市人民医院肿瘤外科手术后经病理切片明确诊断的胃癌患者1022例, 所有病例均为该市地区常住人口, 其中男781例(76.4%), 女241例(23.6%), 男女比例为3.2:1, 年龄31-83(平均63.09±9.97)岁.

1.2 方法 复阅1022例病例的临床与病理资料, 分

析1999-2006每年收治的胃癌病例的病理特征构成及变化趋势, 在此基础上进一步将所有病例按手术时间分为两组A组(1999-01/2002-12)365例; B组(2003-01/2006-12)657例, 比较两组病例性别、年龄、肿瘤大小、发生部位、分化程度、临床分期和术后辅助化疗情况的差异.

统计学处理 资料按确定的标准录入法由三人独立录入, 数据库资料按100%的数量由第三人抽检核对校正. 采用SPSS12.0软件进行统计分析, 率的显著性检验进行 χ^2 检验, 并以 $P \leq 0.05$ 为差异具有显著性意义.

2 结果

2.1 胃癌病例的构成特征

2.1.1 病例数和年度变化趋势: 1999-2006宜兴市人民医院收治入院的胃癌病例数分别为81、97、87、100、115、151、197、194例, 合计1022例. 可见从2003年开始, 该市的人民医院收治的胃癌患者数明显增加, 在2006年仍保持较高的水平(图1).

2.1.2 胃癌患者的年龄和性别构成: ≤ 40 岁者26人, 41-50岁者83人, 51-60岁288人, 61-70岁357人, 71-80岁253人, 80岁以上者15人; 60岁以上患者占多数(61.2%). 将年龄分成 ≤ 40 岁、41-60岁、60岁以上3组, 比较1999至2006年收治入院的1022例胃癌患者年龄分布. 经 χ^2 检验, 1999-2006每年收治的胃癌病例年龄分布无统计学差异($\chi^2 = 22.91, P = 0.06$, 图2). 1999-2006年收治入院的1022例胃癌患者76.4%为男性, 且各年收治的胃癌患者性别分布无统计学差异($\chi^2 = 2.86, P = 0.898$).

2.1.3 胃癌患者临床特征及术后辅助化疗变化趋势: (1)肿瘤发生部位. 观察1022例患者肿瘤发生部位的构成比, 从1999-2006每年胃癌发生部位均以胃底及贲门、胃体为主, 且肿瘤发生部位分布不全相同, ($\chi^2 = 94.18, P = 0.000$). 发生于胃角处的肿瘤逐年增加, 而胃体癌总体呈下降的趋势, 胃窦及贲门癌每年收治的病例数则呈波浪形起伏(图3A). (2)肿瘤大小. 将肿瘤直径按大小归为2类^[3], 一类为直径 < 5 cm, 另一类为直径 ≥ 5 cm, 从1999-2006, 每年发生的胃癌, 肿瘤均以直径 < 5 cm居多, 肿瘤大小的分布无统计学差异($\chi^2 = 7.67, P = 0.906$). (3)肿瘤分化. 1022例胃癌患者肿瘤分化程度以低分化和中分化为主. 从1999-2006低分化肿瘤患者比例逐年下降, 而中分化及中-低分化胃肿瘤患者成逐年递增的

■ 研发前沿

近年研究显示胃癌发病人数呈上升趋势, 胃癌发病年龄年轻化, 且胃癌发生部位向近端胃发展的趋势, 因此与影响胃癌患者术后生存的主要因素和与胃癌的早期诊断、治疗和预后相关的研究较为迫切.

■ 相关报道

青海省人民医院1994-2003年10年来胃癌临床病理资料显示, 胃癌检出人数有所增加, 男性显著高于女性, 胃癌的好发年龄在60岁以上, 平均56.62岁, 以中老年人多见, 40岁以下年青人比例也略有上升.

■创新盘点

本文总结了1999-2006年作者所在医院收治的胃癌病例的临床特征,可以反映当地胃癌的一些临床特点,而且还按时段(1999-2002和2003-2006)并分别按性别、年龄、病变部位、肿瘤直径、分化程度、临床分期探讨近八年来胃癌病理特征的发展趋势。

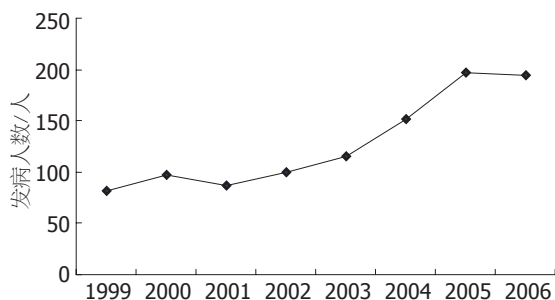


图1 1999-2006年收治入院的1022例患者的分布。

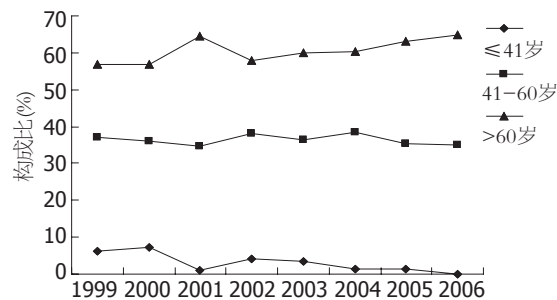


图2 1999-2006年入院的1022例胃癌患者的年龄分布变化趋势。

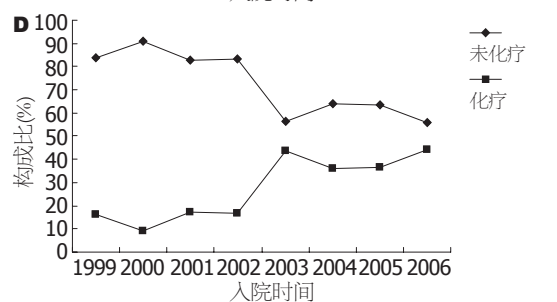
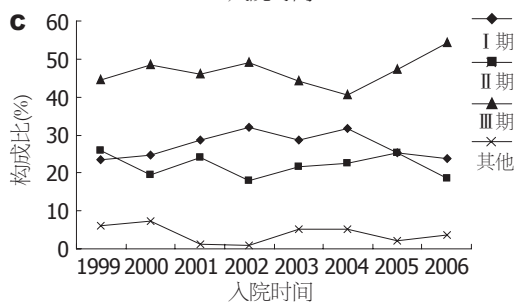
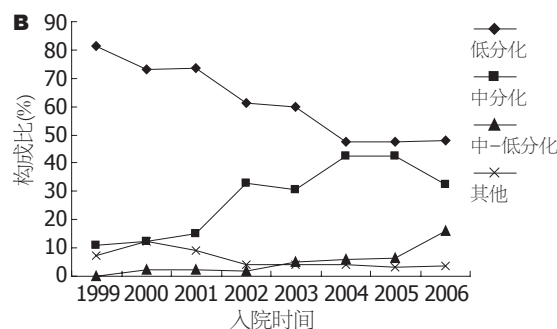
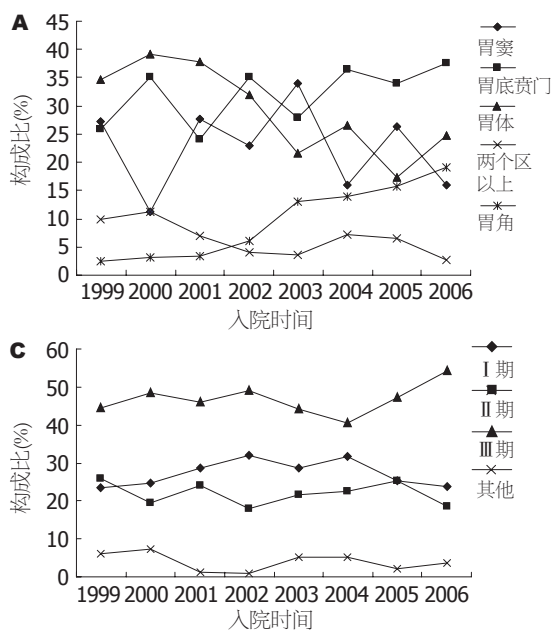


图3 胃癌患者的临床特征以及术后辅助化疗分布变化趋势。A: 肿瘤发生部位; B: 肿瘤分化程度; C: 肿瘤临床分期; D: 是否术后辅助化疗。

趋势, 总体分布有统计学差异($\chi^2 = 127.46$, $P = 0.000$, 图3B)。(4)临床分期. 1022例胃癌患者肿瘤临床分期以III期为主, 从1999-2006年每年收治的胃癌患者肿瘤的分期分布无统计学差异($\chi^2 = 22.63$, $P = 0.364$, 图3C)。(5)术后辅助化疗. 2003-2006年收治入院的胃癌患者术后辅助化疗人数明显高于1999-2002年($\chi^2 = 75.75$, $P = 0.000$, 图3D)。I期患者277人中238人(85.9%)未进行术后化疗, II期患者224人中138人(61.6%)未进行术后化疗, III期患者482人中299人(62%)未进行术后辅助化疗。

2.2 两组胃癌患者的临床特征比较 (1)性别构成. A组365例中男273例(74.8%), 女92例(25.2%), 男女之比为2.97:1。B组657例中男性508例(77.3%), 女性149例(22.7%), 男女之比为3.4:1。两组内男性构成比均明显高于女性($P < 0.05$), B组女性构成比较A组略有下降, 但两组间男女构成比无显著性差异($\chi^2 = 0.83$, $P > 0.05$)。(2)年龄构

成. 两组内年龄在60岁以上的胃癌患者构成比均比较高。B组40岁以下者比例较A组有显著下降($\chi^2 = 10.17$, $P = 0.001$), 而60岁以上者比例较A组略有上升, 但没有统计学意义。(3)发生部位. 观察胃窦、胃底及贲门、胃体、胃角、两个区域以上等部位的胃癌构成比, A组胃癌发生部位以贲门及胃体居多, B组胃癌发生部位以贲门为主, 其次为胃窦和胃体。B组胃癌发生于胃体处患者比例较A组明显下降($\chi^2 = 21.59$, $P < 0.05$), 而发生于胃角的比例明显升高($\chi^2 = 33.16$, $P < 0.05$)。两组胃癌发生部位构成比有显著性差异($\chi^2 = 49.52$, $df = 4$, $P < 0.05$, 表1)。(4)肿瘤大小. 将肿瘤直径按大小归为2类, 一类为直径 < 5 cm, 另一类为直径 ≥ 5 cm。两组肿瘤均以 < 5 cm为主, 显著性高于 ≥ 5 cm者($\chi^2 = 82.86$, $P < 0.05$)。两组肿瘤直径的构成无差异($\chi^2 = 0.01$, $df = 1$, $P > 0.05$, 表2)。(5)组织分化程度. 将所有病例归为4种分化类型, 可见两组低、中分化比例明显高于其他类型。A

表 1 两组胃癌发生部位的构成比 $n(\%)$

分组	n	胃窦	胃底及贲门	胃体	两个区以上	胃角
A组	365	80/365(21.9)	111/365(30.4)	131/365(35.9) ^a	29/365(7.9)	14/365(3.8) ^a
B组	657	146/657(22.2)	227/657(34.6)	147/657(22.4)	33/657(5.0)	104/657(15.8)

^a $P<0.05$ vs B组.表 2 两组胃癌肿瘤直径的构成 $n(\%)$

分组	n	<5 cm	≥ 5 cm
A组	365	224(61.4) ^a	141(38.6)
B组	657	401(61.0) ^a	256(39.0)

^a $P<0.05$ vs ≥ 5 cm.

组胃癌组织学类型低分化明显高于其他类型, 而B组低分化比例较A组比例明显下降($\chi^2 = 46.11$, $P<0.05$), 中分化、中-低分化胃癌比例明显升高($\chi^2 = 37.68$, $P<0.05$). 两组胃癌组织分化程度的构成有显著性差异($\chi^2 = 73.19$, $df = 4$, $P<0.05$, 表3). (6)病理分期. 根据国际抗癌联盟(UICC)制定的标准, 根据肿瘤浸润深度、淋巴结转移及有无远处转移对所研究的肿瘤进行pTNM分期, 两组胃癌均以Ⅲ期为主, 两组间胃癌分期构成无显著性差异($\chi^2 = 3.27$, $df = 4$, $P>0.05$, 表4).

3 讨论

回顾性分析宜兴市人民医院1999-1-1/2006-12-31间经病理证实的1022例胃癌手术患者的临床资料, 总结其临床和病理构成特征及变化趋势如下: (1)1999-2006收治的胃癌病例数呈逐年上升趋势, 尤其是2003年起, 该院收治的胃癌病例数明显地逐年增加, 与国内相关文献报道的近年来胃癌检出数有所增加相一致^[2,4]. 每年收治病例数增加可能与受检人数的增加、胃镜或病理诊断技术的提高有关. 然而近年来胃癌在大多数国家已出现发病水平普遍下降的趋势, 美国最早出现胃癌下降趋势^[5], 从1930-1960, 下降了2/3; 日本、智利等发病率高的国家, 至1950年代才开始下降, 且下降速度较慢^[6]. 由于本文仅对1996年以来市人民医院的收治病例进行分析, 尽管该院可能收治了本市绝大多数病例, 但无法反映该市胃癌的发病率. (2)各年收治的胃癌患者性别构成较为稳定, 均以男性为主, 与文献报道一致^[2,4,7-9]. 这可能与体内性激素差异以及部分男性偏好烟酒、高盐饮食等不良生活习

惯有关系. 自1983年首次在胃癌中发现雌激素、孕激素受体以来, 性激素受体在胃癌中的作用日益受到关注. 现多数学者认为性激素受体在胃癌中表达, 胃癌的发生发展可能与性激素受体表达有关. 多数实验认为雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progensterone, PR)阳性表达越高, 表明胃癌组织的分化越差, 浸润越深, 越易转移, 预后越差^[10-12]. 雄激素受体(androgen receptor, AR)与胃癌的关系众说纷纭. 有学者认为AR有中度抑癌作用, 也有学者认为AR是胃癌的促发因素^[13-14]. Kominea *et al*^[15]用免疫组化方法对86例胃癌标本进行了检测. 结果显示有淋巴结转移者AR表达明显增高, AR阴性患者平均存活9 mo, 较AR阳性者(平均存活24 mo)预后差, 经多元化分析显示AR阳性表达可能是不良预后的非依赖性因素. 但Kikuchi *et al*^[16]发现, AR的阳性表达与胃癌的组织学分级和淋巴结转移呈明显负相关, 随组织学分级增高, AR阳性率下降, 有淋巴结转移者AR阳性率低于无淋巴结转移者, 提示胃癌中AR阳性者预后较好. (3)每年收治的胃癌患者年龄构成无明显差异, 均以60岁以上的老年人为主, 与国内外其他报道一致^[4,8-9,17], 其原因可能为: 人口老龄化导致胃癌成高龄化趋势; 随着年龄的增长, 包括缺氧及饮食在内的各种致癌因素的接触及积累增加, 导致胃易发生生理和病理的改变等. 提示在胃镜检查中宜将老年人作为重点关注对象. (4)每年收治的胃癌患者肿瘤均以直径 <5 cm居多, 肿瘤大小的分布无统计学差异. 一般认为肿瘤较小, 无淋巴结转移者预后较好. Shiraish *et al*^[18]和Maeda *et al*^[19]研究报告肿瘤大小和淋巴结转移与否与胃癌复发时间关系密切, 对于评估因复发而死亡的时间是很重要的. (5)本研究中胃癌发生部位以胃底及贲门、胃体处为最常见, 与马利顺 *et al*报道的结果一致^[7], 但与国内外其他的报道不相符^[20-21]. 本研究胃癌发生部位以近端胃为主, 可能原因是: 与饮食习惯有关, 该市居民喜食腌制的食品, 有害物亚硝酸盐的摄入增加, 致癌

应用要点

进一步加强胃镜检查的筛、普查率放宽胃癌好发部位可疑病变的活检指标, 提高胃镜操作者的诊断及技术水平, 增强中老年人保健意识时于胃癌的早期发现及诊断有着现实而重要的意义; 另外, 针对该地区胃癌发生部位的上移趋势和分化程度提高, 应考虑手术和术后辅助化疗也应作相应调整.

■同行评价

本研究临床资料宝贵,病例数较多,有一定的临床参考价值,但可读性一般。

表 3 两组胃癌分化程度构成比 $n(\%)$

分组	n	低分化	中分化	中-低分化	高分化	其他
A组	365	262/365(71.8) ^a	69/365(18.9) ^a	6/365(1.6) ^a	5/365(1.4)	23/365(6.3)
B组	657	328/657(49.9)	246/657(37.4)	59/675(9.0)	3/657(0.5)	21/657(3.2)

^a $P<0.05$ vs B组。

表 4 两组胃癌临床分期构成比 $n(\%)$

分组	n	I期	II期	III期	IV期	其他
A组	365	100(27.4)	79(21.6)	172(47.1)	5(1.4)	9(2.5)
B组	657	176(26.8)	145(22.0)	310(47.2)	17(2.6)	9(1.4)

物质首先对贲门和胃体上部黏膜起破坏作用;近年来对 $H pylori$ 的根除治疗,减少了非贲门癌的发病率,使贲门癌的发病率相对增加以及胃镜诊断技术的提高等因素有关^[1,20]。从1999-2006,发生于胃角处的肿瘤逐年增加,而胃体癌总体呈下降的趋势,胃窦及贲门癌发病例数呈波浪形起伏。(6)本研究胃癌分化程度均以低分化腺癌及中分化腺癌比例显著高于其他类型,且以低分化为主,与文献一致^[22]。从1999-2006低分化肿瘤比例逐年下降,中分化及中-低分化胃肿瘤成逐年递增的趋势。通常认为肿瘤的分化程度与恶性程度呈反比,即分化程度越高,恶性程度越低,分化程度越低,恶性程度越高。该市人民医院从1999-2006收治的病例胃癌分化程度呈逐渐上升的发展趋势,可能与近年来该地区经济发展较快,居民生活方式趋于健康,营养状况的改善可能使机体抵抗力不断增强,生活和生产环境质量的改善降低了环境中的危险因素及其危害程度有关,但确切的原因还有待进一步深入研究。(7)pTNM分期涉及到肿瘤组织的浸润深度、淋巴结受累程度以及是否有远处转移,可综合反映肿瘤的生物行为学和进展情况。总体来看,1022例胃癌患者肿瘤临床分期以III期为主,1999-2006每年收治的胃癌患者肿瘤的临床分期分布无统计学差异。从该市胃癌病例pTNM分期结果看,该市还没有形成较好的早诊早治体系,就诊者大多已是晚期患者。

为进一步研究该市人民医院收治胃癌患者胃癌的演变趋势,将所有病例按手术时间先后分为两组1999-2002年(A组)和2003-2006年(B组)前后两组,两个时间段的患者术后辅助化疗所采用的方案有明显的差异,2003年以后

使用新的化疗药物较多,不同方案对胃癌患者术后生存的影响在另外的系列文章中阐述。探讨性别、年龄、肿瘤大小、发生部位、分化程度、临床分期、术后辅助化疗情况的差异。2003-2006收治胃癌病例数明显增加;胃癌的好发年龄在60岁以上;胃癌发生部位以胃体和贲门为主,2003-2006胃体癌有所下降,胃角癌比例上升;2003-2006低分化腺癌比例下降,而中分化腺癌比例显著上升,肿瘤的恶性程度降低;但胃癌的临床分期在两组间无显著差异。

总之,近年来该市人民医院收治的胃癌病例数呈上升趋势,胃癌的好发年龄在60岁以上,提示在胃镜检查中宜将老年人作为重点关注对象;胃癌发生部位以胃体和贲门为主,近几年胃体癌有所下降,胃角癌比例上升;本文胃癌以低分化和中分化腺癌为主,近年来低分化腺癌比例下降,而中分化腺癌比例显著上升,肿瘤的分化程度升高。因此,对重点人群开展有针对性的预防性胃镜筛查意义重大,必将提高胃癌的早期检出率;另外,针对该地区胃癌发生部位的上移趋势和分化程度提高,应考虑手术和术后辅助化疗也应作相应调整。

4 参考文献

- 1 丁士刚, 陈龙凤, 安宝国, 林三仁, 周丽雅. 25年来经胃镜检出胃癌的变化趋势-1178例临床流行病学分析. 中国肿瘤临床与康复 2001; 8: 23-25
- 2 袁建青, 李兰英, 赵明臻. 青海地区近十年胃癌构成分析. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1763-1765
- 3 黄海力, 吴本严, 尤伟锦, 申明识. 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1297-1301
- 4 刘婷, 王新允, 宋文静, 朱丛中, 李艳. 天津市20年胃恶性肿瘤发病分析. 世界华人消化杂志 2004; 12: 20-22
- 5 Terry MB, Gaudet MM, Gammon MD. The epidemiology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12: 111-127
- 6 Blaser MJ, Saito D. Trends in reported adenocarcinomas of the oesophagus and gastric cardia in Japan. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 107-113
- 7 马利顺, 王理伟, 周琴, 华召来, 李茂生. 扬中市胃癌流行及治疗情况调查分析. 中国肿瘤 2001; 10: 718-720
- 8 孟建英, 王新允. 宁城与天津地区胃癌发病现状的临床病理分析. 河北医学 2002; 8: 1063-1065
- 9 Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology

- and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 1-9
- 10 Ajani JA, Takimoto C, Becerra CR, Silva A, Baez L, Cohn A, Major P, Kamida M, Feit K, De Jager R. A phase II clinical and pharmacokinetic study of intravenous exatecan mesylate (DX-8951f) in patients with untreated metastatic gastric cancer. *Invest New Drugs* 2005; 23: 479-484
- 11 杨琳, 陈颖, 李锦毅, 吴东瑛, 王艳萍, 张素敏, 辛彦. 人胃肠道癌肝脏和卵巢及子宫颈转移的器官特异性分子病理学机制比较研究. *中国肿瘤临床* 2003; 30: 230-233
- 12 Hartmann J T, Oechsle K, Quietzsch D, Wein A, Hofheinz RD, Honecker F, Nehls O, Köhne CH, Käfer G, Kanz L, Bokemeyer C. Protracted infusional 5-fluorouracil plus high-dose folinic acid combined with bolus mitomycin C in patients with gastrointestinal cancer: a phase I/II dose escalation study. *Br J Cancer* 2003; 89: 2051-2056
- 13 Nakamura Y, Shimada N, Suzuki T, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Sasano H. In situ androgen production in human gastric carcinoma--androgen synthesizing and metabolizing enzymes. *Anticancer Res* 2006; 26: 1935-1939
- 14 刘戈, 钱结胜, 王升光. 胃癌组织中AR与Rb-Cyclin D1调控系统相关性研究. *安徽医科大学学报* 2003; 38: 275-277
- 15 Kominea A, Konstantinopoulos PA, Kapranos N, Vandroos G, Gkermepesi M, Andricopoulos P, Artelaris S, Savva S, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG. Androgen receptor (AR) expression is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 253-258
- 16 Kikuchi S, Kato M, Katsuyama T, Tominaga S, Asaka M. Design and planned analyses of an ongoing randomized trial assessing the preventive effect of *Helicobacter pylori* eradication on occurrence of new gastric carcinomas after endoscopic resection. *Helicobacter* 2006; 11: 147-151
- 17 许国强, 倪晓莹, 顾秀珍. 1554例胃癌的临床分析. *中国肿瘤临床* 2002; 29: 481-484
- 18 Shiraishi N, Inomata M, Osawa N, Yasuda K, Adachi Y, Kitano S. Early and late recurrence after gastrectomy for gastric carcinoma. Univariate and multivariate analyses. *Cancer* 2000; 89: 255-261
- 19 Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Kato Y, Sawada T, Chung KH. Vascular endothelial growth factor expression in preoperative biopsy specimens correlates with disease recurrence in patients with early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 566-571
- 20 唐世孝, 邓明明, 邹义君. 804例胃癌的临床分析. *重庆医学* 2002; 31: 821-823
- 21 Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1995; 333: 32-41
- 22 王福生. 3427例胃癌临床资料分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2006; 15: 40-41

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

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

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.(常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

乙型肝炎肝硬化患者外周血和肝组织中HBV cccDNA的定量检测

李莹, 韩涛, 高英堂, 刘磊, 王毅军, 景丽, 张涛, 杜智

■背景资料

抗病毒治疗已成为乙型肝炎肝硬化患者一种重要治疗手段, 对病毒复制良好抑制利于阻止病情进展, 不合理停药会导致病毒复燃、病情恶化, 对乙型肝炎肝硬化患者体内病毒复制状态详尽掌握对临床有很好指导意义, 目前研究多局限于慢性乙型肝炎, 对乙型肝炎肝硬化患者研究较少, 而乙型肝炎肝硬化患者体内病毒复制和慢性乙型肝炎并非完全一致, 因此有必要进行此项研究。

李莹, 韩涛, 高英堂, 刘磊, 王毅军, 景丽, 张涛, 杜智, 天津医科大学三中心临床学院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170

李莹, 医师, 医学硕士, 主要从事肝病基础与临床研究。
天津市科委应用基础研究计划面上项目, No. 06YFJMJC13100
天津市重点科技攻关专项资助项目, No. 05YFSJSF02500
国家重点基础研究发展规划(973计划)资助项目, No. 2007CB512801

作者贡献分布: 此课题由韩涛与高英堂设计; 研究过程由韩涛、高英堂、李莹、刘磊及张涛完成; 研究所使用的试剂及分析工具由高英堂、杜智、王毅军、李莹及景丽提供; 数据分析由韩涛与李莹完成; 本论文写作由李莹、韩涛及高英堂完成。

通讯作者: 韩涛, 300170, 天津市津塘路83号, 天津市第三中心医院肝内科, hantaomd@126.com

电话: 022-84112298

收稿日期: 2008-10-08 修回日期: 2008-10-30

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-28

Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in peripheral blood and hepatic tissues of cirrhotic patients with hepatitis B

Ying Li, Tao Han, Ying-Tang Gao, Lei Liu, Yi-Jun Wang, Li Jing, Tao Zhang, Zhi Du

Ying Li, Tao Han, Ying-Tang Gao, Lei Liu, Yi-Jun Wang, Li Jing, Tao Zhang, Zhi Du, Department of Hepatology, the Third Central Clinical College of Tianjin Medical University; Tianjin Key Laboratory of Artificial Cells, Tianjin 300170, China

Supported by: the General Foundation of Tianjin Science Committee for Applied Basic Research, No. 06YFJMJC13100; the Key Science and Technology Project of Tianjin Municipality, No. 05YFSZSF02500; and the National Basic Research Program of China (973 Program), No. 2007CB512800

Correspondence to: Tao Han, Department of Hepatology, the Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China. hantaomd@126.com

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

Accepted: 2008-10-30 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To investigate the distribution of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in peripheral blood and liver tissues of liver cirrhosis patient with hepatitis B virus infection.

METHODS: DNA was extracted from serum and

liver biopsy samples of 60 cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. The serum samples were treated with Plasmid-Safe ATP dependent Dnase (PSAD), while the liver biopsy samples were digested with restriction enzymes MluI and PSAD to reduce non-HBV cccDNA; then the total HBV DNA and cccDNA were measured by the real-time PCR assay.

RESULTS: HBV cccDNA was negative in all the serum samples, but positive in 40% (24/60) hepatic biopsy samples. In HBeAg-positive, HBeAg-negative plus HBeAb-negative, and HBeAb-positive hepatic tissues, HBV cccDNA positive rate was 66.7%, 52.9% and 26.5%, respectively. Meanwhile, the positive rate had significant difference between HBeAg-positive group and HBeAb-positive group ($P < 0.05$). Intrahepatic cccDNA accounted for 0%-7.77% of total HBV DNA, and there was a significant correlation between intrahepatic cccDNA and total HBV DNA ($r = 0.53$, $P < 0.01$). Intrahepatic cccDNA had no correlation with the total HBV DNA in the serum samples, as well as with ALT and TBIL levels ($r = 0.15$, $P = 0.25$; $r = 0.01$, $P = 0.94$).

CONCLUSION: HBV cccDNA can not be detected in peripheral blood of cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. Intrahepatic cccDNA accounts for a small proportion of the total HBV DNA. Replication of HBV is the most active in HBeAg-positive patients.

Key Words: Liver cirrhosis; Hepatitis B virus; Covalently closed circular DNA; Real-time polymerase chain reaction

Li Y, Han T, Gao YT, Liu L, Wang YJ, Jing L, Zhang T, Du Z. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in peripheral blood and hepatic tissues of cirrhotic patients with hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3752-3758

摘要

目的: 研究乙型肝炎肝硬化患者HBV共价闭合环状DNA(cccDNA)在肝组织和外周血中的

■同行评议者

成军, 教授, 北京地坛医院传染病研究所

分布及临床应用。

方法:选取60例乙型肝炎肝硬化患者肝组织和外周血样本,外周血样本以不降解质粒的ATP依赖的DNA酶(PSAD)进行酶切,肝组织样本以限制性内切酶*Mlu* I 联合PSAD酶切,而后进行荧光定量PCR检测。

结果:60例乙型肝炎肝硬化患者外周血HBV cccDNA均阴性,肝组织HBV cccDNA阳性24例(40.00%),在HBeAg(+)组、HBeAg(-)HBeAb(-)组、HBeAb(+)组分布分别为66.67%、52.94%和26.47%,定量结果在3组呈递减趋势,且HBeAg(+)组与HBeAb(+)组差异存在统计学意义($P < 0.05$)。肝组织HBV cccDNA占总HBV DNA 0%-7.77%,肝组织HBV cccDNA与肝组织总HBV DNA存在相关性($r = 0.53, P < 0.01$),与外周血总HBV DNA无相关性($r = 0.18, P = 0.18$),与ALT、TBIL均无相关性($r = 0.15, P = 0.25; r = 0.01, P = 0.94$)。

结论:乙型肝炎肝硬化患者外周血检测不到HBV cccDNA,肝组织HBV cccDNA占总HBV DNA比例较低,HBeAg(+)患者病毒复制最为活跃。

关键词:肝硬化;乙型肝炎病毒;共价闭环环状DNA;实时荧光定量PCR

李莹,韩涛,高英堂,刘磊,王毅军,景丽,张涛,杜智.乙型肝炎肝硬化患者外周血和肝组织中HBV cccDNA的定量检测.世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3752-3758

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3752.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染影响全球约35 000万人,每年约100万人死于终末期肝硬化或肝癌^[1-3]。共价闭环环状DNA(cccDNA)是HBV的重要复制中间体,肝细胞核内存在稳定的HBV cccDNA池^[4],对HBV的复制及感染状态的建立具有十分重要的意义^[5]。大量实验表明,抗病毒药物对其影响甚微,HBV cccDNA很难被彻底清除^[6],是停药后复发的主要原因^[7-8],所以HBV cccDNA是彻底清除HBV的关键,监测HBV cccDNA可以辅助评价抗病毒疗效和预后。而目前尚无较理想的HBV cccDNA定量检测方法,消除非特异性扩增仍为一难题,且HBV cccDNA在乙型肝炎肝硬化患者中研究较少,我们力求建立一种较为特异的HBV cccDNA定量检测方法,并在此基础上对我院60例HBV感染

肝硬化患者外周血及肝组织中HBV cccDNA的存在状况进行检测分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料及标本来源:60份肝组织标本及对应外周血标本,均取自天津市第三中心医院2003-12/2006-08住院患者,男51例,女9例;年龄最大75岁,最小22岁,平均 53.4 ± 11.5 岁。其中60例均为乙型肝炎肝硬化患者,按照病毒标志物分为3组,HBeAg(+)组9例,HBeAg(-)HBeAb(-)组17例,HBeAb(+)组34例。没有HBsAg与抗-HCV均(+)的患者。诊断符合2000年病毒性肝炎防治方案中的诊断标准^[9]。肝组织经肝穿刺活检取得后立即移入-80℃冰箱保存,外周血样本于肝穿刺当日采集,并保存于-80℃冰箱。病毒标志物和肝功能血清指标检测采用ELISA检测,试剂盒为华美生物工程公司产品。限制性内切酶*Mlu* I (北京天根生化科技有限公司),不降解质粒的ATP依赖的DNA酶(PSAD,美国EpiCentre公司),ABI7000荧光定量PCR扩增仪(美国ABI公司)Realtime PCR(Toyobo公司)。

1.1.2 引物及探针:依据GenBank选取HBV常见B、C基因型菌株50株的全基因组序列,结合HBV rcDNA、cccDNA结构特点选择相对保守序列设计引物/探针(表1)。引物/探针均由上海基康生物有限公司合成。

1.1.3 质粒标准品:选取乙型肝炎病毒C基因型样本应用276F进行PCR扩增,得到369 bp扩增产物,将此片段连接至PGMT载体(北京天根生化科技有限公司),连接产物导入DH5 α 感受态细胞(北京天根生化科技有限公司),碱裂解法提取重组质粒并纯化,琼脂糖凝胶电泳鉴定,紫外分光光度计测量A值,根据分子质量计算出重组质粒原始浓度。

1.2 方法

1.2.1 核酸抽提:(1)肝组织总DNA提取:采用常规蛋白酶K消化、酚-氯仿抽提,产物溶解于100 μ L TE缓冲液中。(2)外周血HBV DNA提取:取患者血清10 μ L,加HBV病毒裂解液10 μ L混匀,37℃ 1 h,加入中和液20 μ L混匀,取2 μ L上清液做PCR模板。

1.2.2 限制性内切酶*Mlu* I 酶切:5 μ L(0.5 μ g)肝组织DNA样本,加2 μ L 10 \times *Mlu* I 缓冲液,1 μ L *Mlu* I (15 U/ μ L),去离子水12 μ L,总体积20 μ L;设置空白对照(用水代替DNA样品)和重组质粒

■研发前沿

HBV cccDNA在肝组织及肝外组织如外周血、白细胞等定量检测始终是研究热点,同时研究HBV cccDNA与疾病其他临床指标关系,以指导临床。不同检测方法会得到不同结果,检测结果不可靠会误导临床治疗,目前缺乏一种快速简便特异的HBV cccDNA定量检测方法,仍需深入研究。

■相关报道

根据文献报道,HBV cccDNA定量检测目前常用方法有选择性PCR(普通PCR、套式PCR、荧光PCR)、侵入者探针法(Invader assay)、嵌合引物荧光PCR法。

■创新盘点

HBV cccDNA Real-time方法定量检测中,应用PSAD消化肝组织样本前,加用了限制性内切酶(HBV DNA无酶切位点),将人基因组大分子DNA切割为小片段,利于PSAD充分酶切样本,进一步提高HBV cccDNA检测特异性;HBV cccDNA在乙型肝炎肝硬化患者中研究较少,本研究对60例乙型肝炎肝硬化患者进行研究,所得结论对临床有较好指导价值。

表 1 引物及探针序列

引物及探针	序列(5'-3')	位置(nt)
总HBV DNA检测	13F AGAGGACTCTTGGACTCTCAGCAA	1659-1682
引物/探针(简称13F)	93R CCTCCCAGTCTTTAAACAAACAGTC	1715-1739
	38T FAM-TCAACGACCGACCTT-MGB	1685-1699
HBV cccDNA检测	71F ATCTGCCGGACCGTGTGC	1567-1584
引物/探针(简称71F)	381R TTGGAGGCTTGAACAGTAGGA	1857-1877
	96T FAM-GCACGTCGCATGGAGA-MGB	1601-1616
重组质粒制备	276F ACGGGGCGCACCTCTCTTTACG	1521-1542
引物(简称276F)	644R CAAGGCACAGCTTGGAGGCTTGAAC	1864-1888

表 2 外周血及肝组织DNA样本定量结果 ($n = 60$, mean \pm SD)

分组	乙型肝炎肝硬化患者	
	总HBV DNA	HBV cccDNA
肝组织(log拷贝/ μ g人基因组DNA)	6.46 \pm 1.67	1.53 \pm 1.13
外周血(log拷贝/mL)	4.23 \pm 1.38	0 ¹

¹ 为方便统计学分析,定量结果未检出取值为0,下表同。

阳性对照。混匀后置于37℃水浴酶切4 h, 100℃煮沸灭活内切酶。

1.2.3 不降解质粒的ATP依赖的DNA酶切: 2 μ L 10×PSAD缓冲液, 0.8 μ L 25 mmol/L ATP, 1 μ L PSAD(10 U/ μ L), 去离子水11.2 μ L, *Mlu* I 消化产物或外周血DNA样本5 μ L, 总体积20 μ L。与*Mlu* I 一致同时设置空白对照及重组质粒阳性对照。样本混匀后置于37℃水浴酶切12-16 h。于70℃水浴30 min灭活PSAD。

1.2.4 荧光定量PCR检测: 应用ABI7000荧光定量PCR扩增仪进行检测, 反应体系: 上游引物1 μ L, 下游引物1 μ L, 探针1 μ L, Realtime PCR Master Mix 20 μ L, 模板2 μ L, 总反应体积25 μ L。循环参数: 1. 预变性37℃ 5 min; 2. 变性94℃ 2 min, 退火94℃ 15 s, 延伸60℃ 40 s, 共45个循环。每次荧光定量检测均设空白对照(样本具体处理检测步骤如图1)。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学分析, 多组间比较采用ANOVA分析, 两组配对数据比较采用配对 t 检验, 数据相关性分析采用线性相关性分析。

2 结果

2.1 荧光定量PCR敏感性和特异性

2.1.1 敏感性: 取 10^5 - 10^{14} 拷贝/L的重组质粒梯度

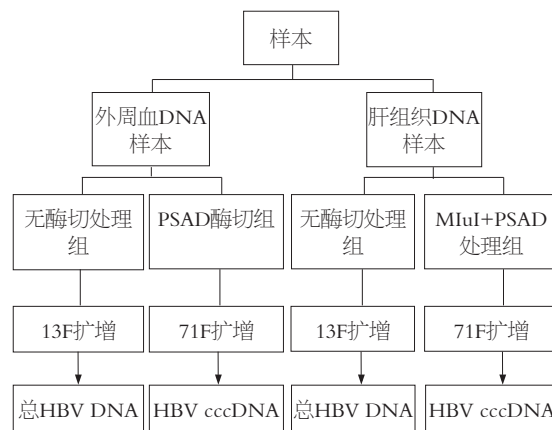


图 1 外周血、肝组织DNA样本具体处理检测方法。

稀释产物, 用13、71F重复进行荧光定量PCR扩增, 同时PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳。重复3次PCR扩增可以获得稳定一致结果, 且与琼脂糖凝胶电泳结果对应性良好, 13、71F检测限为 10^5 拷贝/L, 检测线性范围 2.4×10^5 - 2.4×10^{14} 拷贝/L。梯度稀释扩增曲线如图2。

2.1.2 特异性: 酶切反应及每次荧光PCR反应设置的空白对照定量检测结果均阴性, 排除酶切样本操作和荧光PCR反应中存在污染的可能性。酶切反应设置的重组质粒平行阳性对照与未经酶切处理的重组质粒定量检测结果无统计学差异($P = 1.0$), 排除酶切反应体系对荧光PCR反应抑制可能性。基于上述基础我们得到60例乙型肝炎肝硬化患者外周血、肝组织DNA样本定量结果如表2, HBV cccDNA定量结果较总HBV DNA降低4-5个log值, 根据13、71F两对引物梯度扩增曲线, 验证两对引物扩增效率一致, 说明HBV cccDNA定量数值低并非由于可能存在的扩增抑制或选择性引物扩增效率低等因素造成的, 而更可能是此操作流程显著提高了HBV cccDNA荧光定量PCR检测的特异性。

2.2 乙型肝炎肝硬化患者HBV cccDNA 外周血

表 3 HBeAg(+), HBeAg(-)HBeAb(-), HBeAb(+)各组总HBV DNA、HBV cccDNA定量比较

	HBeAg(+)			HBeAg(-)HBeAb(-)			HBeAb(+)		
	最大值	最小值	mean \pm SD	最大值	最小值	mean \pm SD	最大值	最小值	mean \pm SD
肝组织(log拷贝/ μ g人基因组DNA)									
HBV DNA	10.40	6.24	7.73 \pm 1.41	9.42	3.81	6.66 \pm 1.65	8.75	2.41	6.03 \pm 1.45
HBV cccDNA	5.96	0	2.96 \pm 2.38	6.87	0	2.33 \pm 1.41	5.47	0	1.06 \pm 0.79
外周血(log拷贝/mL)									
HBV DNA	7.80	4.57	5.54 \pm 1.08	7.17	2.40	4.73 \pm 1.14	7.33	2.07	4.51 \pm 1.35
HBV cccDNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0

■应用要点

本研究在建立起可靠的HBV cccDNA特异性定量检测方法基础上,深入研究了HBV cccDNA在乙型肝炎肝硬化患者外周血和肝组织中分布及临床意义,对于判断乙型肝炎肝硬化患者是否应用抗病毒治疗、评价抗病毒治疗效果以及预测停药后复发提供了强大的辅助手段。

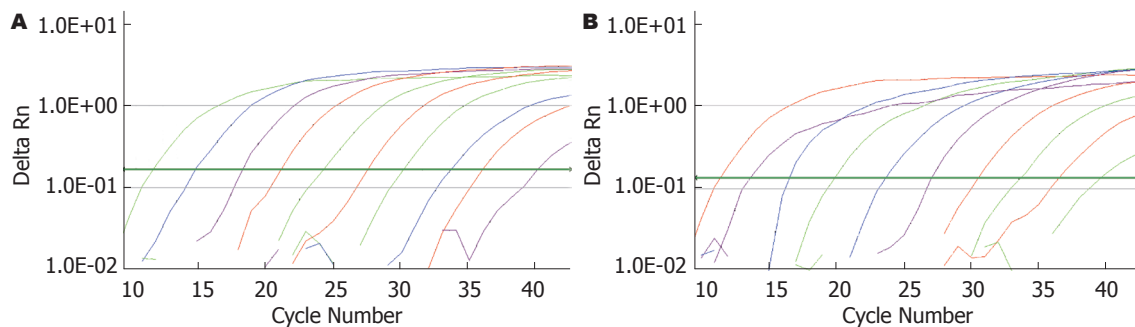


图 2 荧光定量PCR梯度稀释扩增曲线. A: 13F梯度稀释扩增曲线; B: 71F梯度稀释扩增曲线.

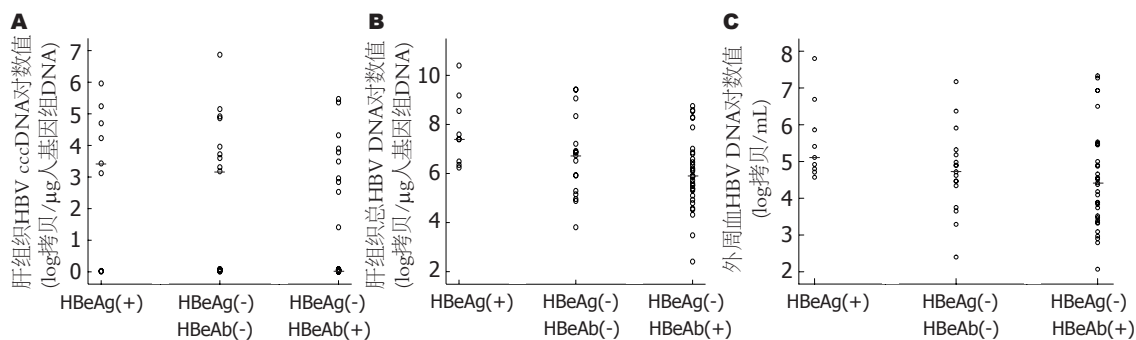


图 3 三组肝组织HBV cccDNA、肝组织和外周血总HBV DNA定量结果比较. A: 肝组织HBV cccDNA三组比较; B: 肝组织总HBV DNA三组比较; C: 外周血总HBV DNA三组比较. “—”代表每组数据中位数.

HBV cccDNA检出率为0%; 肝组织总检出率40.00%, 其中HBeAg(+)组、HBeAg(-)HBeAb(-)组、HBeAb(+)组检出率分别为66.67%、52.94%、26.47%, 各组HBV cccDNA定量值见表3, HBeAb(+)组低于HBeAg(+)组, 且存在统计学意义($P = 0.02$), HBeAg(-)HBeAb(-)组与HBeAg(+)组定量结果虽无统计学差异($P = 0.46$), 但前者亦低于后者. 同时我们对上述三组患者肝组织和外周血总HBV DNA亦分别进行比较, 结果与肝组织HBV cccDNA比较结果一致, [肝组织总HBV DNA: HBeAg(+)组 vs HBeAb(+)组: 7.73 ± 1.41 vs 6.03 ± 1.45 , $P < 0.01$; HBeAg(+)组 vs HBeAg(-)HBeAb(-)组: 6.66 ± 1.65 vs 7.73 ± 1.41 , $P = 0.09$; 外周血总HBV DNA: HBeAg(+)组 vs HBeAb(+)组: 5.54 ± 1.08 vs 4.51 ± 1.35 , $P =$

0.03 ; HBeAg(+)组 vs HBeAg(-)HBeAb(-)组: 4.73 ± 1.14 vs 5.54 ± 1.08 , $P = 0.12$, 图3].

2.3 肝组织中HBV cccDNA占总HBV DNA比例 同一患者肝组织中HBV cccDNA占总HBV DNA比例0%-7.77%. 其中HBeAg(+)组比例范围0%-7.77%, 均数0.88%; HBeAg(-)HBeAb(-)组比例范围0%-3.72%, 均数0.45%; HBeAb(+)组比例范围0%-4.66%, 均数0.38%, 三组比较无统计学差异($P = 0.59$).

2.4 HBV cccDNA与总HBV DNA相关性分析 肝组织HBV cccDNA与其对应肝组织总HBV DNA呈正相关($r = 0.53$, $P < 0.01$), 与外周血总HBV DNA无明显相关性($r = 0.18$, $P = 0.18$, 图4).

2.5 HBV cccDNA与ALT、TBIL的关系 肝组织HBV cccDNA与其对应ALT、TBIL均无明显

■名词解释

HBV cccDNA: HBV 共价闭合环状DNA. HBV 脱去外膜进入胞质, 又脱去核壳, 形成HBV 松弛环状DNA, HBV rcDNA 解脱负链5'端连接的末端蛋白、正链5'端的RNA 残段, 以DNA 聚合酶延长正链, 将各链缺口封闭, 最后转换为cccDNA 分子, cccDNA 是HBV 的原始复制模板.

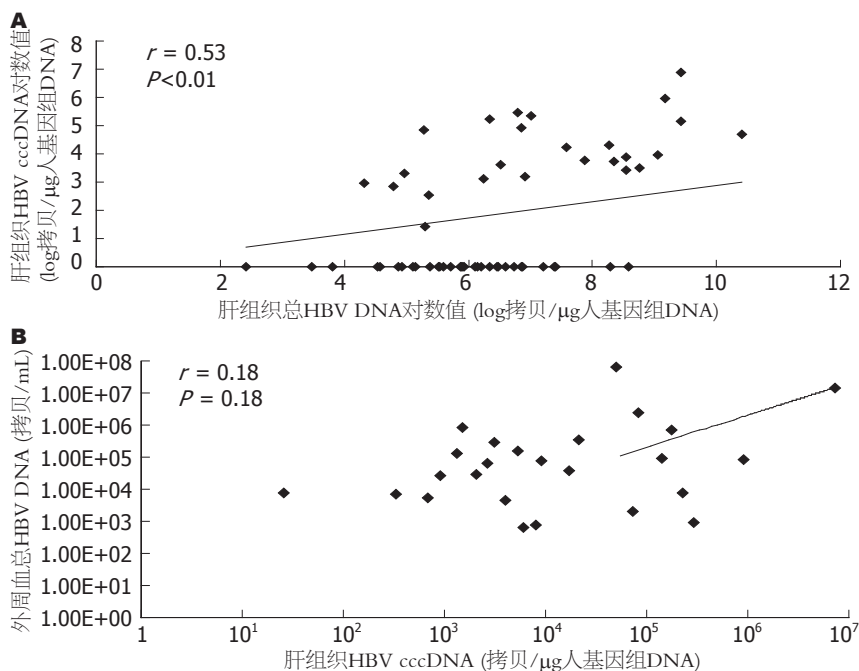


图4 肝组织HBV cccDNA与总HBV DNA相关性分析. A: 肝组织HBV cccDNA与肝组织总HBV DNA相关性分析; B: 肝组织HBV cccDNA与外周血总HBV DNA相关性分析.

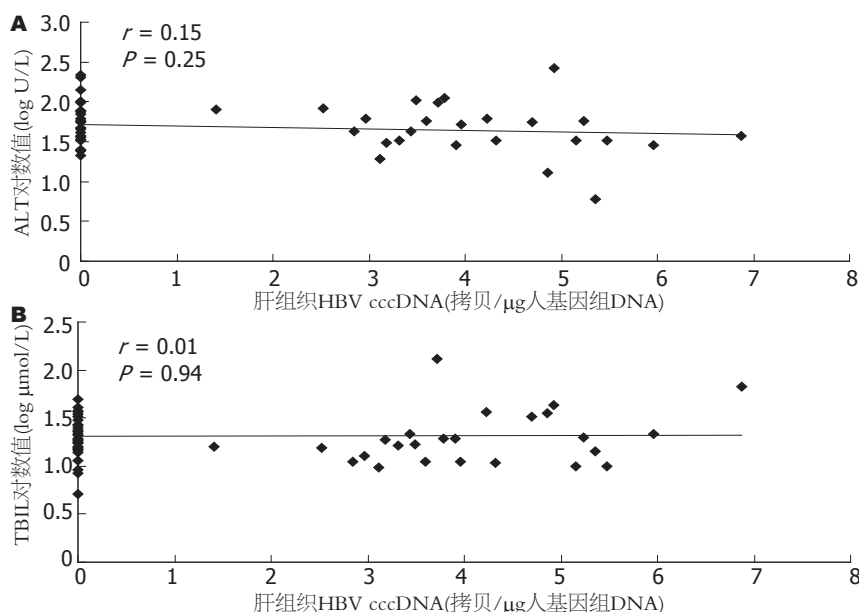


图5 肝组织HBV cccDNA与其对应肝功能血清学指标(ALT、TBIL)相关性分析. A: 肝组织HBV cccDNA与ALT相关性分析; B: 肝组织HBV cccDNA与TBIL相关性分析. 均无显著相关性.

相关性, 如图5. 肝组织和外周血总HBV DNA与ALT、TBIL亦无明显相关性(肝组织总HBV DNA与ALT: $r = 0.02$, $P = 0.89$; 肝组织总HBV DNA与TBIL: $r = 0.06$, $P = 0.67$; 外周血总HBV DNA与ALT: $r = 0.18$, $P = 0.17$; 外周血总HBV DNA与TBIL: $r = 0.21$, $P = 0.11$).

3 讨论

HBV cccDNA选择性引物能够优先扩增HBV cccDNA, 但对于rcDNA, 由于上下游引物均能延伸生成部分片段, 积累至一定浓度后, 这些只包含单侧引物的片段可自身退火并延伸, 形成含两

端引物的PCR模板, 从而产生非特异性扩增^[10], 因此, 选择性引物并无绝对的特异性. 我们在以往工作基础上将HBV cccDNA定量检测系统进行优化: (1)设计一对HBV cccDNA选择性扩增引物, 并验证选择性引物与总HBV DNA引物扩增效率一致. (2)扩增前外周血DNA先以PSAD酶切, 肝组织DNA应用限制性内切酶Mlu I 联合PSAD酶切, 选用Mlu I 作用在于, 肝组织DNA分子量大空间结构复杂直接以PSAD酶切效率较低, Mlu I 可将肝组织大分子DNA切割为小片段, 充分发挥PSAD酶切效力, 更好的去除肝组织内病毒整合DNA. 通过酶切处理样本尽可能

纯化cccDNA。(3)实验中设置一系列对照,防止酶切样本操作及荧光定量PCR反应中出现污染,保证酶切反应体系对荧光定量PCR反应无抑制作用,充分证明定量结果是由检测方法特异性而得到。结果显示HBV cccDNA定量值较总HBV DNA降低4-5个log值,体现建立的HBV cccDNA定量检测方法高特异性。

抗病毒治疗已成为乙型肝炎肝硬变患者一种重要治疗手段,乙型肝炎肝硬变患者已处于疾病较晚期,对病毒复制的良好抑制利于阻止病情的进展,不合理停药会导致病毒复燃、病情恶化,目前乙型肝炎肝硬变患者抗病毒治疗主张长期性,对乙型肝炎肝硬变患者体内病毒复制状态及其与其他临床指标关系详尽掌握对临床有很好指导意义,但目前对病毒复制研究多局限于慢性乙型肝炎,对乙型肝炎肝硬变患者研究较少,而乙型肝炎肝硬变患者体内病毒复制情况和慢性乙型肝炎并非完全一致,所以我们进行了此项研究。在60例乙型肝炎肝硬变患者HBV cccDNA在外周血及肝组织中分布情况研究中,发现60例患者外周血样本均未检出HBV cccDNA。外周血中是否存在HBV cccDNA始终存有争议,有学者否认外周血中存在HBV cccDNA^[11],也有学者在外周血中检测到HBV cccDNA^[12-13]。HBV cccDNA一般只存在于肝细胞核中^[14],感染肝细胞HBV cccDNA通常维持在30-50拷贝/细胞^[15],仅在肝细胞破坏时释放出来,能够到达外周血的HBV cccDNA含量微乎其微,且其在外周血中的稳定性也需考证^[16],所以在外周血中很难检测到HBV cccDNA。但不能除外外周血中存在HBV cccDNA,可能因含量甚微,低于检测下限不能检出。肝组织HBV cccDNA占肝组织总HBV DNA比例仅为0%-7.77%,低于有些学者研究结果^[17],提示乙型肝炎肝硬变患者病毒复制状态与慢性乙型肝炎不同,有待我们增加疾病种类及样本量进一步研究。

通过HBV cccDNA、总HBV DNA与肝功能血清指标相关性分析发现,肝组织HBV cccDNA以及外周血、肝组织总HBV DNA与ALT、TBIL均无相关性,即变化不具有同步性,并非病毒活跃复制同时ALT、TBIL值升高,肝功能损害加重。原因可能为,HBV本身并不会破坏肝细胞,肝细胞破坏发生在病毒激发了人体免疫系统,对病毒感染的肝细胞进行攻击,从而导致肝细胞的破坏^[17]。从病毒活跃复制到激发人体免疫系统对感染肝细胞进行攻击破坏,可能存在一定的时间延迟,最终导致HBV cccDNA与

ALT、TBIL变化的不同步性。有研究显示HBV cccDNA的升高先于ALT、TBIL的升高^[18],HBV cccDNA可能成为早期肝细胞破坏预警指标,我们的实验将对同一患者做动态检测进一步得出结论。

由于肝穿刺活检属于有创性检查,患者不易接受,取材困难,肝组织HBV cccDNA检测的临床应用受到了极大限制,许多学者在研究肝组织HBV cccDNA与外周血总HBV DNA、HBV cccDNA的关系^[12,19-20],探讨外周血总HBV DNA、HBV cccDNA是否可以间接反映肝组织中病毒的复制状态。我们的实验结果显示,外周血总HBV DNA与肝组织HBV cccDNA无相关性,单纯外周血总HBV DNA检测很难反映肝组织HBV cccDNA情况,Chan *et al*持相同意见^[21],肝组织HBV cccDNA检测尚不能被取代。研究中我们还发现肝组织HBV cccDNA与肝组织总HBV DNA虽存在相关性($P<0.01$),但相关系数仅为0.534,二者变化并不完全一致,提示肝脏内病毒复制状态可能还与其他因素相关。有研究应用HBV cccDNA和pgRNA共同反映病毒复制活性^[19]。将外周血DNA、肝组织cccDNA甚至pgRNA等指标结合起来,可能对患者抗病毒治疗有更好的指导性。

乙型肝炎肝硬变患者60例根据病毒标志物分为三组: HBeAg(+)组, HBeAg(-)HBeAb(-)组, HBeAb(+)组。我们建立的HBV cccDNA定量检测方法,通过引物设计较好地去除非病毒DNA混杂因素对结果的影响,通过限制性内切酶联合PSAD共同消化样本尽可能减少总HBV DNA中非cccDNA混杂因素对结果的影响,保证实验结果可靠。在此基础上我们得到肝组织HBV cccDNA占肝内总HBV DNA比例在上述三组间虽无统计学差异,但HBeAg(+)组高于其他两组, HBeAb(+)组最低。同时总HBV DNA、HBV cccDNA定量结果HBeAg(+)组明显高于其他两组($P<0.05$), HBeAb(+)组仍为最低,可以看出HBeAg(+)组病毒复制最为活跃, HBeAb(+)组即发生HBeAg血清学转换患者病毒复制受到很大抑制, HBeAg转阴组虽低于HBeAg(+)组,但病毒复制活性仍高于发生HBeAg血清学转换组。可能由于一部分HBeAg转阴患者是病毒基因序列变异而导致HBeAg检测不出,并非病毒复制活性降低。我们看到乙型肝炎肝硬变患者病毒复制在上述三组中并不相同,可进一步研究其机制以指导临床。

总之,我们在建立起可靠的HBV cccDNA特

■同行评价

本研究符合医学伦理学规范,采用Real-time方法检测HBV cccDNA国内外已有报道,因此本文虽具有一定科研与临床价值,但创新性略有不足。尤其是作者选择肝硬化患者作为研究对象,但意义并未充分体现。

异性定量检测方法的基础上,深入研究了HBV cccDNA在乙型肝炎肝硬化患者外周血和肝组织中分布及临床意义,对于判断乙型肝炎肝硬化患者是否应用抗病毒治疗、评价抗病毒治疗疗效以及预测停药后复发提供了强大的辅助手段。

4 参考文献

- 1 Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 351-366
- 2 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68
- 3 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 395-403
- 4 Wu TT, Coates L, Aldrich CE, Summers J, Mason WS. In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* 1990; 175: 255-261
- 5 Addison WR, Walters KA, Wong WW, Wilson JS, Madej D, Jewell LD, Tyrrell DL. Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication. *J Virol* 2002; 76: 6356-6363
- 6 Luscombe C, Pedersen J, Uren E, Locarnini S. Long-term ganciclovir chemotherapy for congenital duck hepatitis B virus infection in vivo: effect on intrahepatic-viral DNA, RNA, and protein expression. *Hepatology* 1996; 24: 766-773
- 7 Singh M, Dicaire A, Wakil AE, Luscombe C, Sacks SL. Quantitation of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in the liver of HBV-infected patients by LightCycler real-time PCR. *J Virol Methods* 2004; 118: 159-167
- 8 Yokosuka O, Omata M, Imazeki F, Okuda K, Summers J. Changes of hepatitis B virus DNA in liver and serum caused by recombinant leukocyte interferon treatment: analysis of intrahepatic replicative hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1985; 5: 728-734
- 9 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 6: 324-329
- 10 Köck J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology* 1996; 23: 405-413
- 11 郝勇, 苗千里, 缪晓辉, 赵克开, 李东良, 林江, 沈雪林. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞及肝组织中HBV cccDNA定量检测. *中华传染病杂志* 2007; 1: 38-42
- 12 Wong DK, Yuen MF, Yuan H, Sum SS, Hui CK, Hall J, Lai CL. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2004; 40: 727-737
- 13 Yuen MF, Wong DK, Sum SS, Yuan HJ, Yuen JC, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Effect of lamivudine therapy on the serum covalently closed-circular (ccc) DNA of chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1099-1103
- 14 Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 1986; 47: 451-460
- 15 Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wurstthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE 4th, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004; 126: 1750-1758
- 16 吕其军, 魏秀桂, 聂伟, 李毅, 田永刚, 黄黎. HBV感染者血清中HBVcccDNA、HBeAg及HBV DNA的关系. *临床肝胆病杂志* 2005; 21: 202-203
- 17 Mohamed R, Desmond P, Suh DJ, Amarapurkar D, Gane E, Guangbi Y, Hou JL, Jafri W, Lai CL, Lee CH, Lee SD, Lim SG, Guan R, Phiet PH, Piratvisuth T, Sollano J, Wu JC. Practical difficulties in the management of hepatitis B in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 958-969
- 18 Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 82-85
- 19 Laras A, Koskinas J, Dimou E, Kostamena A, Hadziyannis SJ. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology* 2006; 44: 694-702
- 20 Sung JJ, Wong ML, Bowden S, Liew CT, Hui AY, Wong VW, Leung NW, Locarnini S, Chan HL. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. *Gastroenterology* 2005; 128: 1890-1897
- 21 Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, Wong GL, Sung JJ. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1462-1468

编辑 史景红 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贡献及同行评议公开政策

本刊讯 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策,具体格式如:(1)作者贡献分布:陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等;此课题由陈湘川,庞丽娟,陈玲,杨兰,张金芳,齐妍及李洪安设计;研究过程由陈玲,杨兰,张金芳,蒋金芳,杨磊,李锋及曹秀峰操作完成;研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供;数据分析由陈湘川,杨兰及庞丽娟完成;本论文写作由陈湘川,庞丽娟及李洪安完成。(2)同行评议者:房静远教授,上海交通大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所;韩新巍教授,郑州大学第一附属医院放射科;匡安仁教授,四川大学华西医院核医学科。(常务副总编辑:张海宁 2008-11-28)

阿德福韦酯体外对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的影响

陈月, 陈洪涛, 吴诗品, 岳化葵, 马云, 方爱萍

陈月, 陈洪涛, 吴诗品, 岳化葵, 马云, 方爱萍, 深圳市人民医院(暨南大学医学院附属二院)检验医学部 广东省深圳市 518020

陈月, 南方医科大学博士, 副主任技师, 主要从事临床免疫检验研究。

广东省自然科学基金博士科研启动基金资助项目, No. 07300964

作者贡献分布: 此课题由陈月设计; 研究过程由陈月、陈洪涛、吴诗品、岳化葵、马云及方爱萍操作完成; 数据分析由陈月与陈洪涛完成; 本论文写作由陈月完成。

通讯作者: 陈月, 518020, 广东省深圳市东门北路1017号, 深圳市人民医院检验医学部, chen Yue_dr@163.com

电话: 0755-25533018

收稿日期: 2008-08-11 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-28

Effects of adefovir dipivoxil on the function of dendritic cells from chronic HBV-infected patients *in vitro*

Yue Chen, Hong-Tao Chen, Shi-Pin Wu, Hua-Kui Yue, Yun Ma, Ai-Ping Fang

Yue Chen, Hong-Tao Chen, Shi-Pin Wu, Hua-Kui Yue, Yun Ma, Ai-Ping Fang, Department of Medical Laboratory, Shenzhen People's Hospital (the 2nd Affiliated Hospital of Jinan University Medical College), Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, Doctorial Scientific Research Priming Foundation, No. 07300964

Correspondence to: Dr. Yue Chen, Department of Medical Laboratory, Shenzhen People's Hospital (the 2nd Affiliated Hospital of Jinan University Medical College), 1017 Dongmen North Road, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. chen Yue_dr@163.com

Received: 2008-08-11 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-11-03 Publihed online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To find out effects of adefovir dipivoxil (ADV) on the function of dendritic cells (DCs) from peripheral blood of chronic HBV-infected patients *in vitro*.

METHODS: Monocytes (Mo) were purified from peripheral blood of healthy volunteers and HBV-infected patients with incubation of granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4) and ADV

at different concentrations (20, 100, 500 $\mu\text{g/L}$) added on day 6. DC's morphology was observed under inverted microscopy and the expressions of CD1a, CD83, CD86 and MHC-DR on DCs were analyzed using FACS. The ability to stimulate the proliferation of allogenic T cells by DCs was detected using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). The levels of IL-12 p40+p70 in culture supernatant of DCs were determined using ELISA.

RESULTS: Compared with HBV-infected patient group, a better differentiation of DCs, enhanced proliferation of allogenic T cells and increased secretion of IL-12 p40+p70 were observed in ADV treatment group. The DCs with 100 $\mu\text{g/L}$ ADV had the highest expression of CD1a, CD83, CD86 and MHC-DR, significantly higher than those of DCs without ADV treatment (43.5 ± 5.7 vs 20.6 ± 2.8 , 34.6 ± 1.9 vs 16.7 ± 3.4 , 40.9 ± 2.8 vs 25.8 ± 6.6 , 66.9 ± 5.4 vs 40.7 ± 4.2 , all $P < 0.05$), but all lower than the healthy controls. Differences among the three groups were statistically significant ($P < 0.05$).

CONCLUSION: ADV enhances the immune ability of DCs from peripheral blood of HBV-infected patients, suggesting that ADV possibly participates in the immune response through modulation of function of DCs and plays an indirect antiviral role.

Key Words: Chronic hepatitis B; Dendritic cell; Adefovir dipivoxil; Cell phenotype; Antigen presentation

Chen Y, Chen HT, Wu SP, Yue HK, Ma Y, Fang AP. Effects of adefovir dipivoxil on the function of dendritic cells from chronic HBV-infected patients *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3759-3764

摘要

目的: 探讨体外阿德福韦酯(adefovur dipivoxil, ADV)对慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者外周血树突状细胞(dendritic cell, DC)功能的影响。

方法: 分离CHB患者及健康自愿者外周血单

■背景资料

CHB治疗的主要困难是患者存在不同程度的免疫耐受, 很难彻底清除HBV。如何调动机体免疫应答并配合抗病毒药物, 彻底清除或持续抑制HBV复制, 是亟待解决的问题。已证实, DC是唯一能活化初始型T细胞的专职APC, 在抗病毒的细胞免疫中举足轻重。ADV是新一代核苷类抗病毒药物, 通过抑制HBV DNA复制而发挥抗病毒作用, 具有广泛的临床应用前景。国外研究发现ADV在抗病毒同时对DC也有一定作用。国内尚未见相关报道。

■同行评议者

杨林, 副研究员, 中山大学附属第三医院感染病科; 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

■ 研究前沿

CHB可发展成肝硬化和肝细胞癌,迄今尚无切实有效的治疗方法。HBV的彻底清除,依赖于有效的抗病毒治疗和充分调动机体的细胞免疫应答。对CHB的治疗,抗病毒是关键,免疫调节是重点。CHB治疗的主要困难是CHB患者存在不同程度的免疫耐受,很难彻底清除HBV。造成CHB免疫耐受的重要原因之一是患者DC功能低下。DC是目前发现的功能最强的APC,是启动、调控并维持免疫应答的中心环节,具有激发CD4⁺T辅助细胞和CD8⁺CTL的能力,在抗病毒的细胞免疫治疗中起重要的作用。因此,如何加强DC的抗原提呈能力,发挥其免疫功能已成为治疗CHB急需解决的问题之一。

核细胞(Mo),在含rhGM-CSF+rhIL-4及不同浓度ADV(20、100、500 μg/L)培养条件下制备单核细胞源DC(MoDC)。在倒置显微镜下观察DC的形态;FACS分析DC的表型;MTT法测定DC刺激同种异体T细胞增殖的能力;ELISA检测DC培养上清中IL-12 p40+p70的含量。

结果:与CHB未处理组比较,CHB ADV处理组DC形态分化明显,激发初始T细胞增殖的能力加强,上清液中分泌的IL-12 p40+p70增多;在CHB ADV处理组(100 μg/L),CD1a⁺、CD83⁺、CD86⁺和MHC-DR+DC的数量均最多,显著高于CHB未处理组(43.5 ± 5.7 vs 20.6 ± 2.8 , 34.6 ± 1.9 vs 16.7 ± 3.4 , 40.9 ± 2.8 vs 25.8 ± 6.6 , 66.9 ± 5.4 vs 40.7 ± 4.2 , 均 $P < 0.05$),但低于健康对照组,三组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:ADV可以增强CHB患者外周血MoDC的免疫功能,提示其可能通过调节DC的功能而参与免疫应答,发挥间接抗病毒作用。

关键词:慢性乙型肝炎;树突状细胞;阿德福韦酯;细胞表型;抗原提呈

陈月, 陈洪涛, 吴诗品, 岳化葵, 马云, 方爱萍. 阿德福韦酯体外对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3759-3764

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3759.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)治疗的主要困难是CHB患者存在不同程度的免疫耐受,很难彻底清除HBV。造成CHB免疫耐受的重要原因之一是患者树突状细胞(dendritic cells, DC)功能低下^[1-3]。已证实,DC是唯一能活化初始型T细胞的专职抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),在抗病毒的细胞免疫中起重要作用^[4-5]。阿德福韦酯(adeфовир dipivoxil, ADV)是新一代核苷类抗病毒药物,通过抑制HBV DNA复制而发挥抗病毒作用,对野生HBV及拉米夫定、泛昔洛韦等耐药HBV变异株均有显著抑制作用,有望成为解决核苷类似物耐药问题的有效药物,具有广泛的临床应用前景^[6-9]。国外研究发现ADV在抗病毒同时对DC也有一定作用^[10]。国内尚未见相关报道,因此,本研究通过检测体外ADV对CHB患者外周血单核细胞(monocyte, Mo)源DC的作用,进一步探讨ADV治疗CHB的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 选择我院门诊及住院的CHB患者15例为实验组,临床诊断标准均符合2000-09西安中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》慢性乙型肝炎诊断标准,并符合以下条件:(1)年龄18-55岁;(2)HBsAg(+), HBeAg(+), HBeAb(+)及HBV-DNA(+);(3)ALT升高达正常值上限2-10倍;(4)全部研究对象均排除HAV、HCV、HEV、HIV感染,均无心脑肾及其他器官合并症。另以健康自愿者10例为对照组。FITC标记的鼠抗人CD1a、抗MHC-DR mAb, PE标记的鼠抗人CD83、抗CD86 mAb, 同型FITC-IgG1、PE-IgG1阴性参照抗体均为eBioscience公司产品。rhGM-CSF和rhIL-4, Pepro-Tech公司。RPMI 1640, Gibco公司。丝裂霉素C和MTT(四氮唑盐)分别为Sigma和MDBio, Inc.产品。阿德福韦酯,天津葛兰素史克公司。IL-12 p40+p70 ELISA试剂盒为U-CyTch biosciences产品。淋巴细胞分离液(Ficoll, 密度1.077),上海恒信化学试剂有限公司。新生牛血清(newborn calf serum, NCS),杭州四季青生物工程材料研究所。美国BD公司FACSCalibur流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 DC的分离与纯化:取研究对象(CHB患者或健康自愿者)的外周血,肝素抗凝后,与等量的RPMI 1640液混匀, Ficoll密度梯度离心法分离单个核细胞(PBMC);用含100 mL/L小牛血清(NCS)的RPMI 1640液悬浮PBMC,置于玻璃平皿内,在37℃、50 mL/L CO₂孵箱内静置3 h,单核细胞(Mo)即黏附于平皿表面;吸取悬浮的非黏附细胞,并以RPMI 1640液轻轻吹打,再次吸取悬浮细胞,然后用细胞刮轻轻刮离黏附的Mo,收集Mo。

1.2.2 DC的扩增:用含100 mL/L NCS的RPMI 1640调整Mo密度为 1×10^9 个/L,加入12孔板,0.002 L/孔,加入rhGM-CSF(100 μg/L)和rhIL-4(100 μg/L),于37℃、50 mL/L CO₂条件下培养,共培养9 d。在诱导DC的过程中,每3 d半量换液并同时补充相应的细胞因子,于培养第6 d进行分组培养。CHB未处理组;CHB ADV处理组:CHB患者DC+ADV(20、100、500 μg/L);健康对照组。倒置相差显微镜下动态观察DC形态变化,培养9 d后收集悬浮细胞和轻微贴壁细胞检测,并收集培养上清,于-70℃冻存待测细胞因子。

1.2.3 DC的表型分析:用预冷PBS洗涤细胞并调

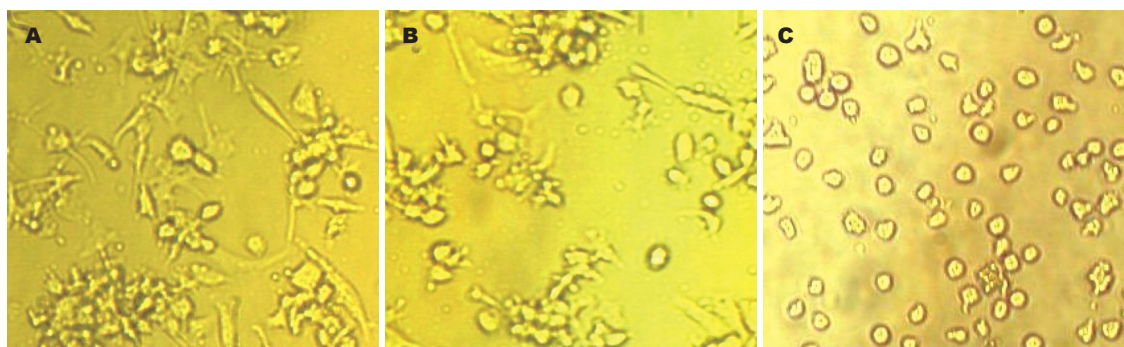


图1 倒置显微镜下培养9 d的DC形态($\times 400$). A: 健康对照组; B: CHB ADV处理组(100 $\mu\text{g/L}$); C: CHB未处理组.

整浓度为 1×10^9 个/L. 于100 μL 细胞悬液中, 分别加入两两组合的标记抗体, 即FITC-抗CD1a和PE-抗CD83、FITC-抗MHC-DR mAb和PE-抗CD86 mAb, 同时设PE和FITC标记的小鼠IgG1抗体作为对照, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光标记30 min后, 用预冷的PBS洗涤2次. 最后用400 μL 的PBS悬浮细胞, 流式细胞仪分析DC的表型.

1.2.4 同种异体混合淋巴细胞反应: 取健康人外周血, 用Ficoll密度梯度离心法分离PBMC, PBS洗去血小板, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 贴壁3 h. 收集非贴壁的细胞, 以含100 mL/L NCS的RPMI 1640悬浮, 注入尼龙毛柱中, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h后, 洗出非黏附的细胞即为T细胞. 用含100 mL/L NCS的RPMI 1640悬浮培养9 d的DC并调整其密度为 1×10^9 个/L, 加入丝裂霉素C 25 mg/L, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min, 以RPMI 1640洗3次, 再用完全培养液悬浮. 按1:10、1:20、1:50及1:100的DC与T细胞比例加入96孔圆底培养板中, 终体积200 μL , 每组3复孔. 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mL/L CO_2 条件下培养4 d, 1000 r/min离心5 min, 弃去100 μL 上清, 每孔加入MTT 10 μL (5 g/L), 继续培养4 h后, 1000 r/min离心5 min, 弃上清, 每孔加入DMSO 100 μL , 测 $A_{570\text{nm}}$ 值, 结果以3孔均值表示.

1.2.5 DC培养上清中细胞因子的检测: 按检测试剂盒中的说明书, 用ELISA法测定各实验组DC培养上清中IL-12 p40+p70的含量, 每组设3个复孔.

统计学处理 应用SPSS11.0软件包进行统计处理, 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用单因素方差分析方法, 组间进行 q 检验比较, $P < 0.05$ 时具有显著性差异.

2 结果

2.1 DC的诱导 倒置显微镜下观察, 培养3 d后, 细胞的形态出现不规则, 随着时间的延长, 悬浮细

胞逐渐增多, 异形突起明显. 培养诱导9 d, 健康对照组和CHB ADV处理组(100 $\mu\text{g/L}$)中绝大部分细胞呈半悬浮生长, 胞体较大, 可见胞膜向外延伸出异样突起. CHB ADV处理组(20 $\mu\text{g/L}$ 和500 $\mu\text{g/L}$)和CHB未处理组变形细胞较少(图1). 在DC诱导过程中, ADV 100 $\mu\text{g/L}$ 的效果优于500 $\mu\text{g/L}$, 可能是药物毒性作用所致, 镜下观察CHB ADV处理组(500 $\mu\text{g/L}$)可发现培养液中细胞数量减少, 有细胞碎片样物质.

2.2 ADV对DC表型的影响 流式细胞仪分析发现, 在CHB ADV处理组(100 $\mu\text{g/L}$), CD1a^+ 、 CD83^+ 、 CD86^+ 和 MHC-DR^+ DC的数量均最多, 显著高于CHB未处理组, 但低于健康对照组, 三组间差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而CHB ADV处理组(20 $\mu\text{g/L}$ 和500 $\mu\text{g/L}$)与CHB未处理组相比, 虽有差异但无统计学意义($P > 0.05$). 说明CHB的DC体外与适宜浓度ADV(100 $\mu\text{g/L}$)共孵育后, 其提呈抗原及刺激T细胞增殖能力相对增强(表1).

2.3 培养细胞同种异体混合淋巴细胞反应 以培养9 d的DC为刺激细胞, 按不同比例与同种异体淋巴细胞混合, CHB ADV处理组(100 $\mu\text{g/L}$)DC刺激同种异体淋巴细胞增殖的能力较高, 且随效应细胞比例的增加而增强, 优于CHB未处理组, 低于健康对照组($P < 0.05$), 而CHB ADV处理组(20、500 $\mu\text{g/L}$)与CHB未处理组相比较无显著性差异($P > 0.05$, 图2).

2.4 DC培养上清中IL-12 p40+p70的表达水平 ELISA分析结果表明, DC培养上清液IL-12 p40+p70水平在CHB ADV处理组(100 $\mu\text{g/L}$)较高, 与CHB未处理组和健康对照组相比均有差异($P < 0.05$), 明显高于CHB未处理组; 而CHB ADV处理组(20 $\mu\text{g/L}$ 、500 $\mu\text{g/L}$) IL-12 p40+p70含量较低, 与CHB未处理组相比较无显著性差异($P > 0.05$, 图3).

■ 相关报道

张冬云 *et al* 通过实验发现LAM具有促进CHB患者外周血DC分化成熟的功能; 卢高峰 *et al* 研究表明ETV亦能够增强CHB患者外周血DC的功能. 近年来国外有研究发现, ADV治疗后, CHB患者循环调节性T细胞减少, 病毒特异性 CD4^+ T细胞活性提高, 髓样DC的数量增多且功能增强. 这提示, ADV可能在对HBV免疫应答和免疫耐受的调节中起重要作用.

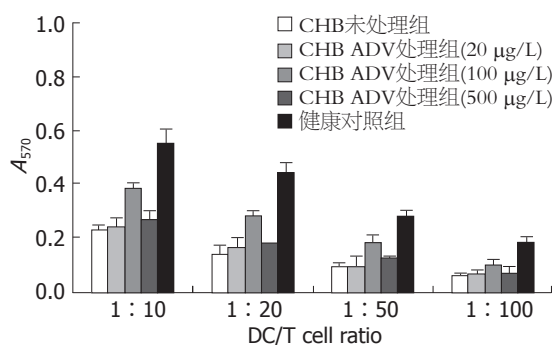
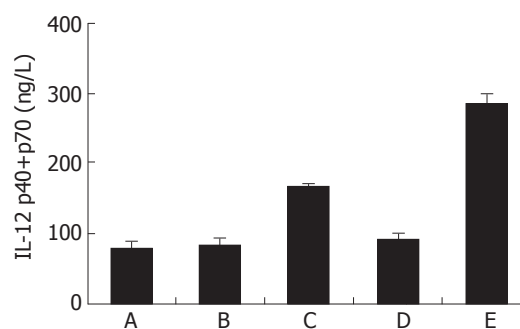
■创新盘点

本实验首次以不同浓度ADV与CHB的DC共同培养,通过一系列指标检测来观察ADV对CHB的DC功能的影响,为从免疫调节的角度合理应用ADV和提出新的免疫治疗策略提供科学依据。

表 1 培养9 d的DC表面标志表达水平 (mean \pm SD, %)

分组	CD1a	CD83	CD86	MHC-DR
CHB未处理组	20.6 \pm 2.8	16.7 \pm 3.4	25.8 \pm 6.6	40.7 \pm 4.2
CHB ADV处理组				
20 μ g/L	23.5 \pm 3.1	19.9 \pm 2.5	28.2 \pm 5.1	45.4 \pm 6.0
100 μ g/L	43.5 \pm 5.7 ^{ae}	34.6 \pm 1.9 ^{ae}	40.9 \pm 2.8 ^{ae}	66.9 \pm 5.4 ^{ae}
500 μ g/L	25.8 \pm 1.2	22.1 \pm 0.7	29.3 \pm 4.4	50.1 \pm 2.6
健康对照组	61.3 \pm 5.1 ^c	48.2 \pm 3.3 ^c	57.5 \pm 7.2 ^c	85.2 \pm 1.5 ^c

^a $P < 0.05$, ^e $P < 0.05$ vs CHB未处理组; ^c $P < 0.05$ vs 健康对照组。

图 2 DC刺激同种异体T细胞增殖能力 ($n = 3$).图 3 DC培养上清中IL-12 p40+p70的表达水平 ($n = 3$). A: CHB未处理组; B: CHB ADV处理组(20 μ g/L); C: CHB ADV处理组(100 μ g/L); D: CHB ADV处理组(500 μ g/L); E: 健康对照组。

3 讨论

乙型肝炎是一种世界范围的传染病,我国的流行情况尤甚,而CHB可发展成肝硬化和肝细胞癌,其后果特别严重^[11],但迄今尚无切实有效的治疗方法。HBV的彻底清除,依赖于有效的抗病毒治疗和充分调动机体的细胞免疫应答。对CHB的治疗,抗病毒治疗是关键,免疫调节是重点。因此,如何调动机体免疫应答并配合抗病毒药物,彻底清除或持续抑制HBV复制,是亟待解决的问题^[12]。

DC是目前发现的功能最强的APC,是启动、调控并维持免疫应答的中心环节,具有激发CD4⁺T辅助细胞和CD8⁺CTL的能力,在抗病毒的细胞免疫治疗中起重要的作用^[13-14]。因此,如何加强DC的抗原提呈能力,发挥其免疫功能已成为治疗CHB急需解决的问题之一。CHB的发病机制十分复杂,其发展和后果主要取决于宿主的免疫应答。ADV、拉米夫定(LAM)和恩替卡韦(ETV)都是核苷类药物,均可明显抑制HBV DNA的复制,降低血清中HBV DNA水平,增加HBeAg血清转换率和HBeAg清除率。张冬云 *et al*^[15]通过实验发现LAM具有促进CHB患者外周血DC分化成熟的功能;卢高峰 *et al*^[16]研究表明ETV亦能够增强CHB患者外周血DC的

功能。ADV是新一代核苷类抗病毒药物,对其耐药的患者少见,目前他对CHB患者机体免疫功能的影响尚不太清楚。近年来国外有研究发现,ADV治疗后,CHB患者循环调节性T细胞减少,病毒特异性CD4⁺T细胞活性提高,髓样DC的数量增多且功能增强^[10,17-18]。这提示,ADV可能在HBV免疫应答和免疫耐受的调节中起重要作用。我们依据ADV的临床用量,以不同浓度的ADV与培养第6天的外周血MoDC共孵育,第9天收获各组细胞进行检测,观察ADV对CHB患者DC功能的影响。

DC独特的免疫学功能取决于其免疫状态,尤其是表面CD1a、CD83、CD86、MHC-DR等免疫分子的表达水平,这些免疫分子表达低下或缺失将导致DC免疫功能低下或无免疫作用,因此是体外检测DC的重要标准^[19]。其中CD1a反映DC的数量,CD83为DC的成熟标志,CD86是DC表面重要的共刺激分子,MHC-DR主要参与抗原提呈,DC通过MHC-II类分子与抗原肽片段结合后必须在共刺激分子的协同作用下才能将抗原递呈给淋巴细胞,启动免疫应答^[20]。本研究表明,经ADV(100 μ g/L)孵育的CHB患者DC表面CD1a、CD83、CD86、HLA-DR表达

水平提高, 虽低于健康对照组, 但明显优于CHB患者未处理组($P<0.05$)。T细胞在机体免疫系统中占有极其重要的地位, 不仅有效应功能, 而且是免疫调节的主要介导者。在清除HBV中, Th和CTL都起着至关重要的作用。T细胞的活化需要两个信号: 第一信号来自T细胞受体(TCR)识别APC表面的MHC-肽复合物; 第二信号是由协同刺激分子相互作用提供的, 包括CD28/B7等, 这两组信号均需DC参与作用^[21-22]。本实验表明ADV(100 $\mu\text{g/L}$)孵育的DC淋巴细胞增殖能力增强。IL-12为成熟DC所分泌, 活化NK细胞, 促进Th1型细胞因子IL-2、IFN- γ 的分泌, 刺激T细胞活化增殖, 介导细胞免疫应答^[23-24]。本研究发现ADV可影响DC分泌IL-12水平, 在CHB ADV处理组(100 $\mu\text{g/L}$)细胞培养上清液中IL-12分泌水平较高。因此, 选择合适浓度ADV处理DC可促使T淋巴细胞增殖能力增强并向Th1分化, 增强其细胞免疫活性。表明ADV除了直接抑制HBV DNA合成外, 还可作为免疫调节剂, 一定程度上改善CHB的DC功能活性, 诱导DC分化成熟, 可能通过调节DC的功能而参与获得性免疫应答。这为从免疫调节的角度合理应用ADV和提出新的免疫治疗策略提供科学依据。

4 参考文献

- 1 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
- 2 Hilleman MR. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine* 2003; 21: 4626-4649
- 3 Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; 87: 1439-1449
- 4 Liu SR, Zhang Y, Xie Q, Li ZL, Yu ZY, Kong XP. [Effect of HBsAg pulsed dendritic cells on the functions of cytokine-induced killer cells] *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2005; 21: 634-636
- 5 Huang Y, Chen Z, Jia H, Wu W, Zhong S, Zhou C. Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg. *Clin Immunol* 2006; 119: 280-290
- 6 Peters MG, Hann HW, Martin P, Heathcote EJ, Buggisch P, Rubin R, Bourliere M, Kowdley K, Trepo C, Gray DF, Sullivan M, Kleber K, Ebrahimi R, Xiong S, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2004; 126: 91-101
- 7 van der Poorten D, Prakoso E, Khoo TL, Ngu MC, McCaughan GW, Strasser SI, Lee AU. Combination adefovir-lamivudine prevents emergence of adefovir resistance in lamivudine-resistant hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1500-1505
- 8 Akyildiz M, Gunsar F, Ersoz G, Karasu S, Ilter T, Batur Y, Akarca U. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine for three months in patients with lamivudine resistant compensated chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3444-3447
- 9 Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Watahiki S, Iwasaki S, Kobayashi M, Kumada H. Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy: two-year follow-up. *J Hepatol* 2008; 48: 923-931
- 10 van der Molen RG, Sprengers D, Biesta PJ, Kusters JG, Janssen HL. Favorable effect of adefovir on the number and functionality of myeloid dendritic cells of patients with chronic HBV. *Hepatology* 2006; 44: 907-914
- 11 Lok AS. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002; 346: 1682-1683
- 12 Long EO. Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. *Immunity* 2007; 26: 385-387
- 13 Untergasser A, Zedler U, Langenkamp A, Hösel M, Quasdorff M, Esser K, Dienes HP, Tappertzhofen B, Kolanus W, Protzer U. Dendritic cells take up viral antigens but do not support the early steps of hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 43: 539-547
- 14 Akbar SM, Horiike N, Onji M. Immune therapy including dendritic cell based therapy in chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2876-2883
- 15 张冬云, 郑鹏远, 张晓琴, 刘光辉, 姜惠萍, 唐芙爱, 白经修, 祁元明. 拉米夫定体外对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1693-1698
- 16 卢高峰, 唐芙爱, 郑鹏远, 马军, 白经修. 恩替卡韦对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的体外影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1292-1296
- 17 Stoop JN, van der Molen RG, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B. *Virology* 2007; 361: 141-148
- 18 Cooksley H, Chokshi S, Maayan Y, Wedemeyer H, Andreone P, Gilson R, Warnes T, Paganin S, Zoulum F, Frederick D, Neumann AU, Brosgart CL, Naoumov NV. Hepatitis B virus e antigen loss during adefovir dipivoxil therapy is associated with enhanced virus-specific CD4+ T-cell reactivity. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 312-320
- 19 Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 1996; 17: 273-278
- 20 Rouard H, Léon A, Klonjowski B, Marquet J, Tennezé L, Plonquet A, Agrawal SG, Abastado JP, Eloit M, Farcet JP, Delfau-Larue MH. Adenoviral transduction of human 'clinical grade' immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity. *J Immunol Methods* 2000; 241: 69-81
- 21 Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J. Method for large scale isolation, culture and

■应用要点

本实验表明ADV除了直接抑制HBV DNA合成外, 还可作为免疫调节剂, 一定程度上改善CHB的DC功能活性, 诱导DC分化成熟, 可能通过调节DC的功能而参与获得性免疫应答。这为从免疫调节的角度合理应用ADV提供依据, 并可据之提出新的CHB免疫治疗策略, 如DC疫苗治疗或ADV与DC疫苗联合治疗。

■同行评价

本研究设计基本合理,选题有一定新颖性,符合医学伦理学要求,表述正确、文笔尚流畅,具有较好的学术价值。

- cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods* 2004; 288: 123-134
- 22 Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 2005; 434: 83-88
- 23 Miro F, Nobile C, Blanchard N, Lind M, Filipe-Santos O, Fieschi C, Chapgier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Kumararatne DS, Le Deist F, Casanova JL, Amigorena S, Hivroz C. T cell-dependent activation of dendritic cells requires IL-12 and IFN-gamma signaling in T cells. *J Immunol* 2006; 177: 3625-3634
- 24 Zobywalski A, Javorovic M, Frankenberger B, Pohla H, Kremmer E, Bigalke I, Schendel DJ. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med* 2007; 5: 18

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 •

世界华人消化杂志计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm \times 6 cm \times 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在肝星状细胞静止表型维持中的作用

侯懿耕, 张园园, 贾洁, 胡晔, 吴松, 方步武

侯懿耕, 张园园, 贾洁, 胡晔, 吴松, 天津医科大学03级临床医学七年制 天津市 300070
方步武, 天津医科大学药理学教研室 天津市 300070
国家自然科学基金资助项目, No. 30772856
作者贡献分布: 本论文由方步武与侯懿耕立题; 收集和整理资料由侯懿耕, 张园园, 贾洁, 胡晔及吴松完成; 文章写作由侯懿耕完成; 方步武审核全文。
通讯作者: 方步武, 300070, 天津市气象台路22号, 天津医科大学药理学教研室, fangdch@yahoo.com.cn
电话: 022-23542523
收稿日期: 2008-10-06 修回日期: 2008-10-22
接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-28

Effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ on the maintenance of quiescent phenotype of hepatic stellate cells

Yi-Geng Hou, Yuan-Yuan Zhang, Jie Jia, Ye Hu, Song Wu, Bu-Wu Fang

Yi-Geng Hou, Yuan-Yuan Zhang, Jie Jia, Ye Hu, Song Wu, Grade 2003, Department of Seven-Year Medical Education, Basic Medical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Bu-Wu Fang, Department of Pharmaceutical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772856
Correspondence to: Dr. Bu-wu Fang, Department of Pharmaceutical Sciences, Tianjin Medical University, 22 Qixiangtai Road, Tianjin 300070, China. fangdch@yahoo.com.cn
Received: 2008-10-06 Revised: 2008-10-22
Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-11-28

Abstract

Activation of hepatic stellate cells (HSCs) is the key factor in the formation of hepatic fibrosis, so in present research, it becomes a hotspot that how to maintain the quiescent phenotype of HSCs. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a ligand-activated nuclear transcription factor, which can maintain the quiescent phenotype of HSCs by means of affecting the lipocytes, leptin, cytokines, transcription factors and cell cycle as well as by its synergistic action with Farnesoid X receptors. This paper discusses how PPAR γ maintains the quiescent phenotype of hepatic stellate cells.

Key Words: Hepatic stellate cell; Quiescent phenotype; Peroxisome proliferator-activated receptor γ

Hou YG, Zhang YY, Jia J, Hu Y, Wu S, Fang BW. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ on the maintenance of quiescent phenotype of hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3765-3768

摘要

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活是肝纤维化形成的关键, 因此如何维持HSC静止表型是当前的研究热点. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 是由配体激活的核转录因子, 通过影响脂肪细胞及瘦素、细胞因子、转录因子、细胞周期及与法呢醇X受体的协同作用维持HSC静止状态, 本文就此作一综述.

关键词: 肝星状细胞; 静止表型; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

侯懿耕, 张园园, 贾洁, 胡晔, 吴松, 方步武. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在肝星状细胞静止表型维持中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3765-3768
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3765.asp>

0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)曾名Ito细胞、维生素A储存细胞等, 当肝脏受到外界因素刺激时, 通常静止的储存维生素A的HSC经过表型转化成为肌成纤维样细胞(myofibroblast, MFB)即活化的HSC, 具有增生、收缩、趋化功能, 且维生素A消失, 细胞外基质生成增加, 导致纤维化形成. HSC的激活是肝纤维化的中心环节^[1-2], 因此维持HSC的静止表型对防治肝纤维化具有重要意义. 近年来研究发现, 过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)在维持HSC的静止表型中发挥重要作用, 其中PPAR γ 的作用尤著, 本文拟就PPAR γ 对维持HSC的静止表型的作用进行综述.

■背景资料

肝纤维化是肝硬化发生的前奏和必经环节, 其中肝星状细胞(HSC)的激活又是肝纤维化形成的关键. 当肝脏受到外界因素刺激时, 静止的HSC活化为肌成纤维样细胞而大量产生胶原等细胞外基质, 因此维持HSC的静止表型对防治肝纤维化具有重要意义. 研究表明, PPAR γ 通过多层次、多途径维持HSC静止表型, 不同途径之间存在着多种交互作用, 形成错综复杂的信号调节网络.

■同行评议者

高春芳, 研究员, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科; 高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

■研发前沿

PPAR γ 通过多信号、多途径维持HSC静止表型,开发其配体从而发挥抗肝纤维化的作用,有望为肝纤维化的临床治疗带来新的希望。但是PPAR γ 分布及作用广泛,缺乏细胞特异性,因此如何使该类药物主要作用于肝脏,维持HSC静止表型,防治肝纤维化将是今后研究的重点。

1 PPARs概述

1.1 PPARs类型与分布 PPARs是一类由配体激活的核转录因子,1990年首先由Issemann *et al*从小鼠肝脏克隆得到,因被过氧化物酶体增殖物活化后能诱导肝脏过氧化物酶体增殖而得名。PPARs作用广泛,参与体内多种生理和病理活动。迄今为止已发现3种PPAR亚型:PPAR α 、PPAR β (δ)、PPAR γ ,在不同组织中的表达存在差异。其中PPAR β 促进HSC的激活,而PPAR α 、PPAR γ 维持其静止^[3]。PPAR γ 表达的上调可引起HSC活化标志物 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达的抑制和I型胶原合成的下降^[1]。

1.2 PPAR γ 配体与激活物 目前已知PPAR γ 存在多种配体和激活物,可分为合成型配体和天然型配体两大类。在合成型配体中,噻唑烷二酮类化合物(thiazolidinediones, TZDs)是PPAR γ 选择性激活物,包括曲格列酮、罗格列酮、吡格列酮等,与PPAR γ 有高度亲和力,在毫微克分子浓度水平即可特异性激活PPAR γ 。天然配体来源于饮食及机体的代谢产物,包括花生四烯酸系列产物如15-脱氧 $12, 14$ -前列腺素 J_2 (15d-PG J_2)、前列腺素D 2 (PGD 2)、白三烯B 4 (LTB 4)、多不饱和脂肪酸如亚油酸、氧化型LDL^[4]。

2 PPAR γ 与HSC静止表型维持

大量研究表明,PPAR γ 通过多层次、多途径维持HSC静止表型,不同途径之间存在着多种交互作用,形成错综复杂的信号调节网络。

2.1 PPAR γ 对脂肪细胞及瘦素的作用

2.1.1 PPAR γ 对脂肪细胞分化的促进作用: 静止期HSC贮存大量脂质,包括脂溶性维生素A,其激活引起脂滴消失和转分化为MFBs。She *et al*发现把原代大鼠HSC培养于促进前脂肪细胞向脂肪细胞分化的培养液中,可维持HSC保持静止表型^[5]。PPAR γ 是促进前脂肪细胞向脂肪细胞分化的重要转录因子,但必须与视黄醇X受体(retinoic X receptor, RXR)结合成异二聚体,并与靶基因启动子中的PPAR反应元件(peroxisome proliferator responsive element, PPRE)结合才能发挥作用。他能抑制细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶(cyclin depended kinase, CDK)的活性,阻止细胞生长,使前脂肪细胞向脂肪细胞分化;又能与脂肪细胞特异基因ap2的增强子和磷酸烯醇式丙酮酸激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)启动子结合,调节这些基因的转录与表达。PPAR γ 激动剂存在时,转染性表达PPAR γ

的成纤维细胞NIH-3T3向脂肪细胞分化并伴有脂质贮积。CCAAT增强子结合蛋白(CCAAT-enhancer-binding protein, C/EBP)也参与脂肪细胞分化的调控^[6]。若将其与PPAR γ 共同转染3T3成纤维细胞,则无需PPAR γ 激活物的存在即可使3T3成纤维细胞向脂肪细胞转化。在脂肪细胞生成过程中,PPAR γ 的直接作用就是增加脂肪细胞特异性标志物如LPL、FAT、ap2和乙酰辅酶A合成酶基因的表达;使细胞摄入脂肪酸、甘油增多,表现出脂肪细胞的表型特征^[7-8]。

2.1.2 PPAR γ 对瘦素的抑制作用: 瘦素(leptin)是由肥胖基因编码、脂肪细胞分泌的一种蛋白质,是重要的代谢调节信号,具有诱导HSC活化和增殖作用,必须与HSC膜上特异性肥胖受体(obesity receptor, OB-R)结合后才能产生促肝纤维化作用。Lee *et al*研究发现PPAR γ 配体可下调OB-R基因表达,从而抑制了HSC的活化^[9]。JAK-STAT(janus kinase-the signal transducer and activator of transcription)途径是HSC内瘦素受体后信号转导的主要途径,始于JAK-2磷酸化,激活的JAK-2再激活JAK-1,在JAK-1的作用下,STAT1和STAT2分别被激活,前者形成同源二聚体后须与协同活化因子CREB结合蛋白(cAMP response element binding protein, CBP)或p300结合后才能转入细胞核内,识别并结合到瘦素启动子区的活化序列或相关序列,调控瘦素的基因转录^[10]。当PPAR γ 被配体激活后,PPAR γ -RXR异二聚体招募、结合数量有限的CBP及p300,竞争抑制STAT1的活化,减少瘦素mRNA生成,使HSC维持于静止表型。

2.2 PPAR γ 对细胞因子的影响

2.2.1 PPAR γ 对PDGF信号转导的阻断作用: 血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是最强大的促进HSC分裂和增生的细胞因子。PDGF受体结构域与接头蛋白Grb2(growth factor receptor bound protein 2)结合后激活Ras,促使细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)激活,ERK转位至细胞核,使c-fos等转录因子表达增加,启动HSC的增生。PDGF亦可通过蛋白激酶C等细胞内信号转导途径改变HSC内细胞骨架的分布,刺激HSC转化为MFBs。此外,PDGF诱导HSC合成TGF β 等细胞因子,促进HSC表达 α -SMA与分泌细胞外基质。以上途径中,PDGF均可以正反馈的方式作用于HSC,形成放大效应,进一步促进HSC的激活。PPAR γ 可干扰ERK的激活,抑制TGF β 和 α -SMA

的表达, 从而阻断PDGF引起的HSC活化^[11-13].

2.2.2 PPAR γ 对TGF β -1信号转导的阻断作用:

转化生长因子 β -1(transforming growth factor beta-1, TGF β -1)是最强的肝纤维化发生因子, 而且诱导HSC转化为MFBs的作用显著. 他通过改变HSC基因型及其表型, 使胞膜上细胞因子受体的表达增加, 提高了HSC对细胞因子的敏感性. TGF β -1主要通过细胞内(small mothers against decapentaplegic, Smad)通路介导其生物学活性, 与TGF β 的II型受体结合后, 激活TGF β I型受体的丝氨酸/苏氨酸激酶, 使Smad2、Smad3磷酸化. 活化的Smad2、Smad3再与Smad4形成活性复合物后入核, 激活血纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)和胶原蛋白 α I转录, 引起纤维连接素、I型胶原沉积增加和 α -SMA应力纤维加速组合, 直接介导HSC向MFBs的转化. PAI-1也是HSC活化的标志^[14]. PPAR γ 配体通过激活PPAR γ , 抑制Smad3磷酸化, 阻断TGF β -1介导的PAI-1的产生, 阻止HSC向MFBs转化^[15]; 还可抑制转录因子KLF6(kruppel-like factor 6)的表达, 从而在转录水平降低其下游因子TGF β -1的表达, 抑制HSC的激活^[16].

2.3 PPAR γ 对转录因子的影响

2.3.1 PPAR γ 对NF- κ B信号转导的阻断作用: 核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)是由Rel蛋白家族组成的同源或异源二聚体的转录因子, 最常见的是RelA(p65)/NF- κ B1(p50)异二聚体, 参与细胞增殖调控和凋亡等过程^[17]. HSC的活化与NF- κ B异常持续性激活有关. 在静息细胞中, NF- κ B以无活性的潜在状态存在于细胞质中, 与其抑制蛋白I κ B结合组成异源多聚体. 细胞表面复杂的信号级联反应可导致I κ B降解, 因而NF- κ B被活化并从细胞质易位至细胞核内, 发挥转录调控作用. 经PPAR γ 激活物15d-PGJ₂处理后HSC的NF- κ B表达下调^[18], 并且PPAR γ 可直接与p65/p50结合, 形成转录抑制复合物, 降低了NF- κ B与DNA的结合活性, 进而抑制NF- κ B的转录作用, 使HSC维持在静止表型.

2.3.2 PPAR γ 对AP-1信号转导的阻断作用: 激活蛋白1(activator protein 1, AP-1)是在激活的HSC中表达持续增加的一种核转录因子, 由Jun家族和Fos家族组成. Jun家族成员包括c-Jun、Jun-B和Jun-D; Fos家族成员含有c-Fos、Fos-B、Fra-1和Fra-2. Jun-D是激活的HSC中一种最重要的AP-1蛋白. 研究表明, 在激活的HSC中, AP-1活

性升高, 多种蛋白表达增加. 早期主要是c-Fos、Fra-1、c-Jun、Jun-B被诱导表达, 随后为Fra-2、FosB、Jun-D等被诱导表达, 提示AP-1参与HSC激活过程的基因表达. PPAR γ 通过和AP-1竞争与协同活化因子CBP、p300的结合, 抑制AP-1信号转导途径, 这一机制与PPAR γ 影响JAK-STAT途径类似^[19].

2.4 PPAR γ 对细胞周期的影响 静止期HSC多停留在G₀/G₁期, 活化时细胞主要集中在G₂期. HSC体外培养活化时, 从培养第2天至第7天, G₀/G₁期细胞逐渐减少, G₂期细胞显著增多. G₁/S调控点是影响细胞周期的关键. 细胞周期调控因子可分为三类: 细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶(CDK)和细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶抑制物(CDK inhibitor, CDI)如p21、p27、p18等. 单独的CDK亚基无激酶活性, 需与相应的Cyclin结合, 进而作用于视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, pRb), 使之磷酸化后释放转录因子E2F, 使细胞通过检测点, 启动DNA复制, 进入S期. PPAR γ 通过降低Cyclin D1、Cyclin D2及Cyclin E水平、提高与Cyclin结合的p21waf1/cip1和p27 kip1水平, 抑制CDK的活性, 从而阻断细胞通过检测点向S期转化, 维持HSC的静止表型^[20]. 经15d-PGJ₂处理的HSC中处于G₁期的细胞百分比高于非处理组, 差异有统计学意义, 说明PPAR γ 的配体15d-PGJ₂产生了G₁期阻滞作用.

2.5 PPAR γ 与FXR的协同作用 法呢醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)介导的信号途径可明显减少HSC活化及肝纤维化相关分子表达. FXR需要和RXR形成异源二聚体后才能直接与特定DNA反应元件结合而调节基因表达. 使用FXR的激动剂6-ECDCA(6-ethyl-chenodeoxycholic acid)可减轻动物模型的肝纤维化程度, 下调HSC的TGF- β 1、 α -SMA、TIMP-1表达, 可能是6-ECDCA作用于FXR后诱导转录抑制因子SHP(Src-homology 2 domain phosphatase)表达, 而SHP可抑AP-1与DNA的结合活性. 同时, 6-ECDCA作用于FXR后, PPAR γ 表达升高达40倍, 提示FXR通过其与PPAR γ 之间的协同作用而抑制HSC的激活^[21-22].

3 结论

PPAR γ 可通过维持HSC静止表型而发挥抗肝纤维化的作用, 因此开发PPAR γ 配体, 如已用于治疗II型糖尿病的噻唑烷二酮类药物, 有望为肝

■创新盘点

本文突出了PPAR γ 在肝星状细胞静止表型维持中的作用, 分析其影响脂肪细胞及瘦素、细胞因子、转录因子、细胞周期及与法呢醇X受体协同作用等多个环节, 阐述其作用机制.

■同行评价

本文总体内容比较新颖,参考文献引用恰当,具有一定的参考价值。

纤维化的临床治疗带来新的希望。但是目前在此方面的研究仅限于细胞培养和动物实验,尚未见临床试验的报道;并且PPAR γ 分布及作用广泛,缺乏细胞特异性,因此如何使该类药物主要作用于肝脏,维持HSC静止表型,防治肝纤维化将是我们今后研究的重点。

4 参考文献

- 1 Sun K, Wang Q, Huang XH. PPAR gamma inhibits growth of rat hepatic stellate cells and TGF beta-induced connective tissue growth factor expression. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 715-723
- 2 Greupink R, Bakker HI, Bouma W, Reker-Smit C, Meijer DK, Beljaars L, Poelstra K. The antiproliferative drug doxorubicin inhibits liver fibrosis in bile duct-ligated rats and can be selectively delivered to hepatic stellate cells in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317: 514-521
- 3 Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 999-1013
- 4 Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, Bertilsson G, Jendeberg L, Berkenstam A. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J Biol Chem* 1998; 273: 31108-31112
- 5 She H, Xiong S, Hazra S, Tsukamoto H. Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 4959-4967
- 6 Guimarães EL, Franceschi MF, Andrade CM, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, Bernard EA, Guma FC. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver Int* 2007; 27: 1255-1264
- 7 Tsukamoto H, She H, Hazra S, Cheng J, Miyahara T. Anti-adipogenic regulation underlies hepatic stellate cell transdifferentiation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S102-S105
- 8 Wang P, Renes J, Bouwman F, Bunschoten A, Mariman E, Keijer J. Absence of an adipogenic effect of rosiglitazone on mature 3T3-L1 adipocytes: increase of lipid catabolism and reduction of adipokine expression. *Diabetologia* 2007; 50: 654-665
- 9 Lee JI, Paik YH, Lee KS, Lee JW, Kim YS, Jeong S, Kwon KS, Lee DH, Kim HG, Shin YW, Kim MA. A peroxisome-proliferator activated receptor-gamma ligand could regulate the expression of leptin receptor on human hepatic stellate cells. *Histochem Cell Biol* 2007; 127: 495-502
- 10 Cao Q, Mak KM, Ren C, Lieber CS. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂-dependant MAPK pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 4292-4304
- 11 Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, Treptau J, Gressner AM, Weiskirchen R. Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits

hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest* 2004; 84: 766-777

- 12 Di Sario A, Bendia E, Svegliati-Baroni G, Marziani M, Ridolfi F, Trozzi L, Ugili L, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A. Rearrangement of the cytoskeletal network induced by platelet-derived growth factor in rat hepatic stellate cells: role of different intracellular signalling pathways. *J Hepatol* 2002; 36: 179-190
- 13 Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 413-423
- 14 Zhao CY, Zhou JY, Yang L, Wang YD. [Molecular mechanism of ciglitazone inhibiting the expression of extracellular matrix in human hepatic stellate cells] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 840-844
- 15 Zhao C, Chen W, Yang L, Chen L, Stimpson SA, Diehl AM. PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 385-391
- 16 Wang XM, Chen DF. [Effects of rosiglitazone on Kruppel-like factor 6(KLF6) signaling in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver fibrosis] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 649-653
- 17 成扬, 平键, 刘成, 徐列明. 姜黄素激活过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ 信号对大鼠肝星状细胞基质金属蛋白酶2、9活性和胞核核因子- κ Bp65表达的影响. *中国中西医结合杂志* 2007; 27: 439-442
- 18 Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 35715-35722
- 19 Hazra S, Xiong S, Wang J, Rippe RA, Krishna V, Chatterjee K, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 11392-11401
- 20 Toyota M, Miyazaki Y, Kitamura S, Nagasawa Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma reduces the growth rate of pancreatic cancer cells through the reduction of cyclin D1. *Life Sci* 2002; 70: 1565-1575
- 21 Fiorucci S, Rizzo G, Antonelli E, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Morelli A, Pruzanski M, Pellicciari R. Cross-talk between farnesoid-X-receptor (FXR) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to the antifibrotic activity of FXR ligands in rodent models of liver cirrhosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 58-68
- 22 Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R, Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 127: 1497-1512

编辑 史景红 电编 何基才

肝靶向胆酸-脂肪酸偶合物的研究进展

靳雪源, 王惠芬

靳雪源, 王惠芬, 中国人民解放军第302医院十二科 北京市 100039

自然科学基金资助项目, No. 30572220

国家高技术研究发展计划资助项目, No. 8632006AA02A4C6

作者贡献分布: 本文由靳雪源综述, 王惠芬校。

通讯作者: 靳雪源, 100039, 北京市丰台区西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院十二科. xueyuanjin@yahoo.com
电话: 010-66933432

收稿日期: 2008-09-18 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-28

Research progress in liver targeted fatty acid bile acid conjugates

Xue-Yuan Jin, Hui-Fen Wang

Xue-Yuan Jin, Hui-Fen Wang, the 12th Department of the 302th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30572220, and the National High Technology Research and Development (863) Project, No. 8632006AA02A4C6

Correspondence to: Xue-Yuan Jin, the 12th Department of the 302th Hospital of Chinese PLA, 100 Xisihuan Middle Road, Fengtai District, Beijing 100039, China. xueyuanjin@yahoo.com

Received: 2008-09-18 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-28

Abstract

Fatty acid bile acid conjugates (FABACs) are synthetic lipid molecules designed to solubilize biliary cholesterol. FABACs were shown to delay, reduce, or prevent cholesterol crystallization in vitro and ex vivo in model bile solutions and in human bile. FABACs have also been shown to prevent the formation of cholesterol gallstones and to dissolve preexisting gallstones in experimental animal models. In addition to the beneficial effect on gallstone disease, FABACs have been demonstrated to be able to prevent diet-induced fatty liver, reduce atherosclerosis in C57Bl6 mice and increase faecal bile salt and neutral sterol secretion.

Key Words: Fatty acid; Bile acid; Conjugate; Gallstone; Fatty liver; Atherosclerosis

Jin XY, Wang HF. Research progress in liver targeted fatty acid bile acid conjugates. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3769-3774

摘要

脂肪酸-胆酸结合物(FABACs)是由脂肪酸与胆酸通过酰胺键偶联形成的一类化合物。FABACs在体外能够增加胆汁中胆固醇的溶解度, 抑制人工胆汁和天然胆汁中胆固醇的结晶; 仓鼠和小鼠 po 给药后, FABACs能够预防由高脂饮食所致的胆结石, 并且对已形成的胆固醇结石有溶解作用; 在Wister大鼠、仓鼠和多种小鼠模型上, FABACs口服给药后能够预防由高脂饮食所致的脂肪肝; 进一步的研究表明FABACs还能够预防高脂饮食所致的动脉粥样硬化; 作用机制研究结果表明, FABACs对肝脏中的胆固醇合成有抑制作用, 对HMGCoA活性有一定的降低作用, 对CYP7A1活性有增强作用, 这些作用抑制了胆固醇的合成, 促进了胆固醇的代谢和排出。

关键词: 脂肪酸; 胆酸; 偶合物; 胆结石; 脂肪肝; 动脉硬化

靳雪源, 王惠芬. 肝靶向胆酸-脂肪酸偶合物的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3769-3774

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3769.asp>

0 引言

脂类物质在人体新陈代谢及细胞信号传递中具有多种重要作用。脂类代谢紊乱将导致胆固醇结石、脂肪肝、肥胖、高脂血症、糖尿病及动脉粥样硬化等病变。肝脏是脂类代谢的中心, 对调控脂质合成与脂蛋白分泌平衡起关键作用。

将饱和脂肪酸与胆酸交联形成的偶合物(fatty acid bile acid conjugates, FABACs)能够利用胆汁酸的转运能力将饱和脂肪酸转运进入胆汁, 参与肝肠循环, 产生一系列药理作用。体外实验结果表明, FABACs能够增加胆汁中胆固醇的溶解度, 防止人工胆汁及天然胆汁中胆固醇的结晶; 动物实验结果表明, po 给药后, FABACs从肠道吸收, 被肝特异性摄取, 分泌进入胆汁; 不但能够预防胆结石的形成, 而且对已形成的胆固醇结石有溶解作用; 进一步的研究表明FABACs能够防止动脉硬化, 预防由饮食引起的脂肪肝, 还具有降血脂作用; 作用机制研究结果

■背景资料

脂肪酸-胆酸偶合物是一类新的化合物, 能够通过调节脂代谢预防胆结石的形成, 溶解已形成的胆结石; 防止动脉硬化, 预防由饮食引起的脂肪肝, 还具有降血脂作用, 有可能成为胆结石、脂肪肝及动脉粥样硬化的新的治疗药物。

■同行评议者

陈耀凯, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

■研发前沿

研发高效安全的胆结石、脂肪肝、动脉硬化治疗药物是创新药物研究的重要方向。

表明, FABACs能够抑制胆固醇的合成, 促进了胆固醇的代谢和排出; 一般药理学研究没有发现FABACs的毒性。因此, FABACs有可能成为胆结石、脂肪肝及动脉粥样硬化的新的治疗药物^[1-3]。现将有关研究进展综述如下。

1 肝靶向性

通过肝靶向给药技术将化学治疗药物选择性的投放于肝脏, 能够减轻或避免其全身的毒副作用。如将药物与含有半乳糖残基的糖蛋白或寡肽偶联, 利用肝实质细胞上去唾液酸糖蛋白受体对半乳糖残基特异性的识别和结合作用, 可以将药物选择性投放于肝细胞。但是, 以乳糖化白蛋白或乳糖化多聚赖氨酸等大分子为载体的肝靶向偶合物易被网状内皮系统清除, 载药量小, 化学组成复杂, 需注射给药。

胆酸是内源性的肝细胞特异性的天然配基, 胆酸 po 后通过主动转运途径由肠道吸收进入肝脏, 具有高度的器官特异性和较高的转运能力; 因此, 以胆酸为靶向载体, 不但能够实现药物的肝靶向性, 减少毒副作用, 而且能够提高药物的 po 生物利用度; 作为内源性的天然配基, 胆酸具有较好的生物兼容性好^[4-5]。如顺铂与胆酸偶联形成的偶合物主要分布于肝脏, 在肾脏、心脏、骨髓等其他组织中的分布很少, 而原型药物在肾脏的浓度大大高于胆酸偶合物; 在等效治疗剂量下, 顺铂治疗可引起神经毒性、肾毒性和骨髓毒性, 而靶向偶合物不产生这些毒性^[6-7]。将熊去氧胆酸与一氧化氮供体偶联形成的偶合物NCX-1000, 能够有效抑制白介素、肿瘤坏死因子等多种炎症因子, 对各种原因引起的肝损伤及炎症、肝纤维化、肝硬化及门静脉高压均具有较好的治疗作用^[8-9]。将糖皮质激素受体拮抗剂与胆酸偶联形成的靶向偶合物能够选择性作用于肝脏, 产生特异性的降糖作用, 而没有其他副作用^[10-11]。

同样, FABACs在动物体内也具有较高的肝及胆汁靶向性。仓鼠灌胃口服30 mg C-16及C-20脂肪酸的FABACs后, 心脏血、门静脉血及胆汁中均可检测到FABACs, 而以胆汁中浓度最高; 胆汁中C-16脂肪酸偶合物的浓度在给药后2 h即可达峰值, C-20脂肪酸偶合物在4 h达到峰值; 给药后24-48 h, 胆汁中仍可检测到FABACs, 表明存在一定程度的肠肝循环^[12]。

2 对胆结石预防和治疗作用

胆结石症是最常见的代谢性疾病之一, 发病率高达15%; 从化学组成来看, 胆结石大多数为以

胆固醇为主要成分的胆固醇结石^[13-14]。在临床上, 胆结石的治疗方法主要分为手术疗法和非手术疗法。手术疗法即胆囊切除, 可以永久性去除结石; 但是手术疗法使胆囊的功能丧失, 会对患者机体造成损害, 且术后容易出现各种并发症^[13, 15]。非手术疗法包括 po 溶石药物、物理性排石、震波碎石以及各种途径的取石术, 其中较为理想也是最易被患者所接受的是 po 溶石药物。但是, 目前已知的胆结石溶解药物疗效欠佳。

研究表明, 胆汁中的磷脂物质是促进胆固醇溶解的主要成分^[16-17]。增加胆汁中的磷脂浓度可以延长胆固醇的成核时间, 增加胆汁中磷脂的比例或调节磷脂的组成可以防止胆固醇结晶^[17-18]; 组成磷脂分子的脂肪酸也具有抑制胆固醇结晶的活性^[17-19]。但是饱和脂肪酸直接给药很难到达胆囊。FABACs能够利用胆汁酸的转运能力将饱和脂肪酸转运进入胆汁, 促进溶石作用。

在体外, FABACs能够延长模型胆汁中胆固醇结晶时间, 减少胆固醇结晶量。不同碳链长度的脂肪酸组成的偶合物对胆固醇结晶的抑制作用不同, 14-碳饱和脂肪酸的胆酸偶合物没有显著抑制作用; 与对照组相比, C20-FABAC可以使结晶时间延长400%; 加入15 mmol/L FABAC孵育14 d后, C18-FABAC可使胆固醇结晶量降至对照组的14%。在人胆汁加入浓缩脂溶液形成的过饱和胆汁溶液中, 加入5 mmol/L FABAC孵育22 d, 从16碳到20碳的FABAC均能显著减少胆固醇结晶量, 而相同摩尔浓度的胆酸没有作用。在新鲜的人胆汁中, 加入5 mmol/L C20-或C22-FABAC, 孵育21 d, 可分别使胆固醇结晶的量减少至对照组的1.9%和5.7%^[12]。

FABAC还能够溶解已形成的胆固醇结晶。将饱和的人胆汁在37℃孵育21 d, 从第8天起即观察到结晶的形成, 并随时间延长逐渐增加, 达到平台。在第21天, 加入30 mmol/L的C20-FABAC, 观察结晶的变化; 加入FABAC后第10天, 已观察不到胆固醇结晶的存在, 表明FABAC对胆固醇结晶有溶解作用^[12]。

在动物体内, FABAC能够预防高脂饮食所致的胆结石。将18只仓鼠分组, 其中12只仓鼠以成石性饮食喂养, 6只以常规饮食喂养; 在第5.5周, 6只成石性饮食组动物和3只常规饮食组动物 po 给与15 mg/d的C20-FABAC。在第10周处死所有动物, 检测胆汁中的胆固醇结晶。常规饮食组动物胆汁中无一例发现胆固醇结晶, 给与FA-

BAC的所有成石性饮食组动物也均未见胆固醇结晶, 而未给与FABAC的所有成石性饮食组动物均可见胆固醇结晶^[12].

胆结石易感性的纯系C57J/L小鼠给与成石性饮食喂养2 mo, 然后部分给与正常饮食, 另一部分ig给与C20-FABAC, 剂量为每只0.5或3 mg/d. 成石性饮食喂养2 mo后, 所有动物产生胆固醇结石; 继续喂以常规饮食后2 mo, 3/4的动物仍然有胆结石, 而3 mg/d FABAC的动物无一有胆结石($P = 0.033$); 另一组实验中, 36只小鼠高脂饮食喂养; 2 mo后, 取13只动物处死, 检测所有动物均有结石; 剩余动物改以常规饮食喂养, 同时分别ig给与0.5 mg/d、3 mg/d的FABAC, 或给与蒸馏水作为对照组. 2 mo后, 处死所有动物, 检测胆结石. 结果表明, 对照组100%有胆结石, 而0.5 mg/d FABAC剂量组28%动物有结石($P = 0.007$), 3 mg/d组12%的动物产生结石($P = 0.001$). 在摩尔水平上, 0.5 mg剂量的FABAC相当于14 mg/(kg·d)的胆酸, 与临床溶石治疗中所用的胆酸量相当^[20-21].

以上结果表明, FABAC不仅能够预防高脂饮食所致的胆结石, 而且对已形成的胆结石有溶解作用.

3 预防饮食引起的脂肪肝

脂肪肝(fatty liver)是由多种原因引起的肝细胞内脂肪蓄积过多的肝脏疾病. 正常肝组织中脂类总量约占肝湿质量的4%-5%; 当肝组织中脂类含量超过肝湿质量的10%-15%时, 或在组织学标本上超过50%时, 即为脂肪肝^[22-23].

食物引起的非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)是发达国家或地区的常见肝脏疾病, 估计高达24%的人口患有NAFL^[23]. 随着人民生活水平的提高, 我国非酒精性脂肪肝的发病率也逐年增高, 严重影响我国人民健康.

尽管非酒精性脂肪肝大多数表现为无症状, 但是约20%的患者可能发展为肝硬化. 非酒精性脂肪肝通常与胰岛素抵抗、高血脂及其他代谢异常相关^[23-28].

长期和持续地减少能量的摄取, 可以减轻NAFL, 但是这一点很少有人能够做到.

在评价FABACs对小鼠体内胆结石形成作用的实验中, 发现FABACs能够减少高脂饮食组动物的肝脏脂肪沉积. 因此进一步考察了FABACs对不同种属动物的脂肪肝预防作用. 这些动物包括Wister大鼠、仓鼠和ICR系小鼠、

C57BL/6系小鼠、胆结石易感性的C57L/J6系小鼠及C57BL/6系小鼠等4种小鼠. 所有动物以高脂饮食喂养, 实验组动物ig给与150 mg/(kg·d)剂量的FABAC, 对照组动物给与生理盐水.

首先通过光显微镜观察, 测定实验动物肝脏组织切片的脂肪浸润程度. 根据脂肪浸润程度打分: 无脂肪浸润为0分, 脂肪浸润细胞数小于5%为1分, 脂肪浸润细胞数介于5%-25%为2分; 脂肪浸润细胞数介于25%-50%为3分; 脂肪浸润细胞数超过50%为4分. C20-FABAC给药4 wk后, C57L/J6小鼠的组织学脂肪肝分数为0.4分, 而对照组为1.5分; 类似地, 仓鼠给药10 wk后, 组织学脂肪肝分数为0.3分, 而对照组所有动物(7只)的脂肪肝分数均高达4分^[29].

FABAC能够显著降低肝组织中脂肪的重量比. 大鼠高脂饮食饲养14 d, 对照组脂肪/蛋白比值为 1.3 ± 0.44 ; FABAC治疗组为 0.66 ± 0.04 ($P = 0.001$); 对照组肝组织中脂肪的浓度 296 ± 41 mg/g肝组织, FABAC治疗组为 255 ± 30 mg/g肝组织; 仓鼠高脂饮食饲养21 d, 对照组脂肪/蛋白比值为 1.41 ± 0.27 ; FABAC治疗组为 1.11 ± 0.20 ; 对照组肝组织中脂肪的浓度 119 ± 30 mg/g肝组织, FABAC治疗组为 57 ± 12 mg/g肝组织($P = 0.009$). ICR小鼠高脂饮食饲养24 d, 对照组脂肪/蛋白比值为 0.34 ± 0.13 ; FABAC治疗组为 0.17 ± 0.07 ; 对照组肝组织中脂肪的浓度 73 ± 23 , FABAC治疗组为 37 ± 5 ($P = 0.034$); ♀ C57BL/6小鼠, 以Western饮食喂养16 wk, 对照组脂肪/蛋白比值为 0.24 ± 0.04 , FABAC治疗组为 0.16 ± 0.02 ($P = 0.001$); 对照组肝组织中脂肪的浓度 134 ± 19 mg/g肝组织, FABAC治疗组为 115 ± 17 mg/g肝组织($P = 0.003$); ♂ C57BL/6小鼠, 以高脂饮食喂养22 wk, 对照组脂肪/蛋白比值为 0.48 ± 0.1 , FABAC治疗组为 0.27 ± 0.02 ($P = 0.001$); 对照组肝组织中脂肪的浓度 67 ± 19 mg/g肝组织, FABAC治疗组为 51 ± 16 mg/g肝组织($P = 0.014$)^[29].

肝脏中脂含量的降低主要表现为甘油三酯水平的降低. 对于仓鼠, 对照组甘油三酯浓度为 47.3 ± 6.9 mg/g肝组织, FABAC治疗组为 11.8 ± 2.5 mg/g肝组织; 在C57BL/6小鼠, 对照组甘油三酯浓度为 24.2 ± 2.7 mg/g肝组织, FABAC治疗组为 8.4 ± 1.5 mg/g肝组织; FABAC治疗也能降低两种动物肝脏中的磷脂和胆固醇浓度, 而对脂肪酸、甘油二酯和胆固醇脂的影响不大^[29].

脂肪酸-胆酸偶合物中, 脂肪酸的碳链长度不同, 对肝脏中脂肪含量的影响不同; C57L/J高

■相关报道

Gilat *et al*研究组通过一系列研究, 发现脂肪酸-胆酸偶合物能够预防胆结石形成, 溶解已形成的胆结石; 防止动脉硬化, 预防由饮食引起的脂肪肝.

■应用要点

脂肪酸-胆酸偶合物能够通过调节脂代谢,为胆结石、脂肪肝及动脉粥样硬化的治疗提供新的手段。

脂饲养5 wk, 分别同时给与C16-FABAC、C20-FABAC、C22-FABAC或生理盐水。与对照组相比, 3种FABAC均能降低肝脏的脂肪含量, 肝组织中蛋白脂肪的含量比分别为 0.11 ± 0.06 ($P = 0.001$), 0.25 ± 0.10 ($P = 0.005$)和 0.34 ± 0.16 (无显著性), 对照组为 0.70 ± 0.25 [29]。

对常规饮食的动物, FABACs对肝脏所脂肪浓度及脂肪/蛋白比没有显著影响。FABAC在所有的动物模型中均可以预防或减少饮食引起的脂肪肝。FABACs可能会作为治疗饮食或其他原因引起的人体脂肪肝疾病的一种手段 [29]。

4 预防动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是威胁人类健康的重大疾病, 以血浆低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白水平升高为特征的高胆固醇血症是动脉粥样硬化的主要致病因子。

C57BL/6♀小鼠以致粥样化饮食喂养, 实验组动物同时 po C20-脂肪酸-胆酸偶合物, 每天 po 150 mg/kg, 15 wk后测定主动脉窦部分的动脉粥样硬化样脂肪斑块损伤面积。结果表明, FABACs能够显著降低动脉粥样硬化样脂肪斑块损伤面积 ($P = 0.019$)。对照组和FABACs给药组之间动物的体质量没有显著差异; 所有实验组动物的血总胆固醇水平显著升高, 实验开始前、实验8 wk及实验结束后, 对照组和FABACs给药组之间动物的血胆固醇及甘油三酯水平没有显著差异; FABACs给药组之间动物的血胆固醇水平有降低的趋势; 肝脏中的胆固醇及胆固醇酯的水平也没有差异。通过凝胶过滤色谱对血浆中脂蛋白进行了分析, VLDL胆固醇和LDL胆固醇没有差异, FABAC组HDL胆固醇有中等程度的降低。VLDL、LDL和HDL组分中均含有FABAC; HDL中FABAC的水平显著高于VLDL和LDL中的 [30]。

5 FABACs的安全性

仓鼠、大鼠和小鼠分别 ig 给与C20-FABAC, 测定给药后血液和胆汁的生化指标, 考察器官的组织学、动物行为及存活情况。150 mg/(kg·d) FABAC对所有实验动物没有任何不良反应; 肝、肾、心、大肠及小肠的组织学检查结果显示, 只有在成石性饮食组动物的肝中有脂肪沉积。FABAC对小鼠胆汁中胆固醇、磷脂和胆盐浓度没有影响; 对仓鼠胆汁的胆固醇浓度略有降低, 但是对磷脂和胆盐没有明显的影响。对部分种系的小鼠, 转氨酶略有升高; 对仓鼠和大鼠,

转氨酶没有影响, 甚至略有下降。血浆碱性磷酸酶、肌苷、白蛋白及葡萄糖水平没有改变。所有动物的器官均未见组织学改变 [12,31]。

6 作用机制

对FABACs的作用机制进行了研究。首先考察了C20-FABAC的脂类物质排泄的影响。实验动物为大鼠, 常规饲料喂养12 d后, 再 po 给与150 mg/(kg·d)剂量的FABAC, 12 d。C20-FABAC给药后, 4 d内粪便中天然甾醇的排出量, 由 7.58 ± 0.76 mg增加到 10.50 ± 2.33 mg ($P < 0.004$); 胆盐的排出量由 16.38 ± 9.11 mg增加到 35.23 ± 10.85 mg ($P < 0.002$); 总的粪便甾醇排出量由 23.96 ± 8.68 mg增加到 45.74 ± 12.96 mg ($P < 0.001$)。给与C20-FABAC前后, 胆汁流量没有改变, 胆汁中胆固醇、胆盐及磷脂的排出量也没有显著区别 [32]。

动脉粥样硬化的病因学的一个重要因素是反向胆固醇转运的过程, 即过量胆固醇从外周细胞向肝脏的转运, 然后向胆汁分泌。已知肝脏中ATP-结合转运子A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)的活性是控制此过程的重要因素, 肝脏的ABCA1将载脂蛋白A-I磷酸化或胆固醇酯化, 形成前- β -高密度脂蛋白, 前- β -高密度脂蛋白通过ABCA1能够从外周摄取胆固醇。

2 mg/L的C20-FABAC能够促进胆固醇从人成胶原细胞流出, 流出量与孵育时间成正比。胆酸、C16脂肪酸、C20脂肪酸及C22脂肪酸对胆固醇的流出没有影响。C16-FABAC、C20-FABAC以及C22-FABAC对胆固醇的流出均有促进作用, 但以C20-FABAC最有效。但是, 对ABCA1缺失的人成胶原细胞, FABAC不能引起胆固醇流出, 说明FABAC所致的胆固醇流出是ABCA1依赖性的 [33]。

在结石易感性的C57L/J小鼠, C20-FABAC能够显著降低高脂饲料所致的血浆胆固醇的升高, 降幅高达50% ($P < 0.001$)。FABAC降低肝脏中胆固醇的合成, 增加胆固醇7 α -羟基酶CYP7A1的活性和表达, 促进胆固醇代谢和排泄。粪便中胆汁酸/中性甾醇的比例增高, 总粪便胆固醇排出增加。这种降脂作用首先与肝脏胆固醇合成的降低有关, 其次与HMGCoA活性的降低, 促进胆固醇向胆酸的代谢有关; 也可能与CYP7A1活性的增加有关。这些作用增加了粪便中胆固醇的排出 [3,33]。

7 结论

随着生活水平的提高, 胆结石、脂肪肝及动脉

粥样硬化等发病率越来越高, 目前尚无有效治疗药物。脂肪酸-胆酸偶合物是一种具有全新结构的化合物。在体外能够增加胆固醇的溶解度, 抑制胆固醇结晶; 进入体内后能够选择性进入胆汁, 促进胆结石溶解。脂肪酸-胆酸偶合物还能够抑制胆固醇的合成, 促进胆固醇的代谢和排出, 通过调节脂类代谢产生预防脂肪肝、防止动脉硬化和降血脂的作用, 而且无明显的毒性, 显示了较好的应用前景。但是, 这些结果尚有待临床验证。通过对该类化合物进行进一步的作用机理研究, 设计合成活性更高的衍生物是今后的研究方向。

8 参考文献

- 1 Doggrell SA. New targets in and potential treatments for cholesterol gallstone disease. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 344-348
- 2 Konikoff FM, Gilat T. Effects of fatty acid bile acid conjugates (FABACs) on biliary lithogenesis: potential consequences for non-surgical treatment of gallstones. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5: 171-175
- 3 Leikin-Frenkel A, Parini P, Konikoff FM, Benthin L, Leikin-Gobbi D, Goldiner I, Einarsson C, Gilat T. Hypocholesterolemic effects of fatty acid bile acid conjugates (FABACs) in mice. *Arch Biochem Biophys* 2008; 471: 63-71
- 4 Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003; 83: 633-671
- 5 Enhnen A, Kramer W, Wess G. Bile acids in drug discovery. *Drug Discovery Today* 1998; 3: 409-418
- 6 Dominguez MF, Macias RI, Izco-Basurko I, de La Fuente A, Pascual MJ, Criado JM, Monte MJ, Yajeya J, Marin JJ. Low in vivo toxicity of a novel cisplatin-ursodeoxycholic derivative (Bamet-UD2) with enhanced cytostatic activity versus liver tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1106-1112
- 7 Paschke R, Kalbitz J, Paetz C, Luckner M, Mueller T, Schmoll HJ, Mueller H, Sorkau E, Sinn E. Cholic acid-carboplatin compounds (CarboChAPt) as models for specific drug delivery: synthesis of novel carboplatin analogous derivatives and comparison of the cytotoxic properties with corresponding cisplatin compounds. *J Inorg Biochem* 2003; 94: 335-342
- 8 Fiorucci S, Antonelli E, Tocchetti P, Morelli A. Treatment of portal hypertension with NCX-1000, a liver-specific NO donor. A review of its current status. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22: 135-146
- 9 Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D, del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8897-8902
- 10 Jacobson PB, von Geldern TW, Ohman L, Osterlund M, Wang J, Zinker B, Wilcox D, Nguyen PT, Mika A, Fung S, Fey T, Goos-Nilsson A, Grynfarb M, Barkhem T, Marsh K, Beno DW, Nga-Nguyen B, Kym PR, Link JT, Tu N, Edgerton DS, Cherrington A, Efendic S, Lane BC, Opgenorth TJ. Hepatic glucocorticoid receptor antagonism is sufficient to reduce elevated hepatic glucose output and improve glucose control in animal models of type 2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 191-200
- 11 von Geldern TW, Tu N, Kym PR, Link JT, Jae HS, Lai C, Apelqvist T, Rhonnstad P, Hagberg L, Koehler K, Grynfarb M, Goos-Nilsson A, Sandberg J, Osterlund M, Barkhem T, Hoglund M, Wang J, Fung S, Wilcox D, Nguyen P, Jakob C, Hutchins C, Farnegardh M, Kauppi B, Ohman L, Jacobson PB. Liver-selective glucocorticoid antagonists: a novel treatment for type 2 diabetes. *J Med Chem* 2004; 47: 4213-4230
- 12 Gilat T, Somjen GJ, Mazur Y, Leikin-Frenkel A, Rosenberg R, Halpern Z, Konikoff F. Fatty acid bile acid conjugates (FABACs)-new molecules for the prevention of cholesterol crystallisation in bile. *Gut* 2001; 48: 75-79
- 13 Lammert F, Miquel JF. Gallstone disease: from genes to evidence-based therapy. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl 1: S124-S135
- 14 杜鹏辉, 邓长生. 肝硬化并胆囊结石的临床特点与成因分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2456-2459
- 15 Venneman NG, van Erpecum KJ. Gallstone disease: Primary and secondary prevention. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 1063-1073
- 16 Jungst D, Lang T, Huber P, Lange V, Paumgartner G. Effect of phospholipids and bile acids on cholesterol nucleation time and vesicular/micellar cholesterol in gallbladder bile of patients with cholesterol stones. *J Lipid Res* 1993; 34: 1457-1464
- 17 Halpern Z, Moshkowitz M, Laufer H, Peled Y, Gilat T. Effect of phospholipids and their molecular species on cholesterol solubility and nucleation in human and model biles. *Gut* 1993; 34: 110-115
- 18 Ringel Y, Somjen GJ, Konikoff FM, Rosenberg R, Michowitz M, Gilat T. The effects of phospholipid molecular species on cholesterol crystallization in model biles: the influence of phospholipid head groups. *J Hepatol* 1998; 28: 1008-1014
- 19 Schone A, Jungst D, Meyer G, Hernandez-Richter T, Fischer S. Effects of phospholipase A2, free fatty acids and 2-lysocleithin on the crystallization of cholesterol in gallbladder bile. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 715-721
- 20 Gilat T, Leikin-Frenkel A, Goldiner L, Laufer H, Halpern Z, Konikoff FM. Arachidyl amido cholanoic acid (Aramchol) is a cholesterol solubilizer and prevents the formation of cholesterol gallstones in inbred mice. *Lipids* 2001; 36: 1135-1140
- 21 Gilat T, Leikin-Frenkel A, Goldiner I, Halpern Z, Konikoff FM. Dissolution of cholesterol gallstones in mice by the oral administration of a fatty acid bile acid conjugate. *Hepatology* 2002; 35: 597-600
- 22 Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 193-198
- 23 Greenfield V, Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 320-327
- 24 Adiels M, Taskinen MR, Boren J. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 2008; 8: 60-64
- 25 钱林, 胡小宣. 非酒精性脂肪肝分子发病机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2848-2852
- 26 窦爱霞, 陆伦根. 胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1197-1202
- 27 陈其奎, 陈海英, 王凌云, 陈为宪, 黄志清. 高脂血症

■同行评价

本文参考文献引用恰当, 文笔流畅, 内容具有前沿性, 学术价值较好。

- 表型与脂肪肝的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 914-916
- 28 鄧敏, 陈旻湖, 陈洁, 陈文激, 郎江明. 罗格列酮对高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗及脂联素的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2869-2874
- 29 Gilat T, Leikin-Frenkel A, Goldiner I, Juhel C, Lafont H, Gobbi D, Konikoff FM. Prevention of diet-induced fatty liver in experimental animals by the oral administration of a fatty acid bile acid conjugate (FABAC). *Hepatology* 2003; 38: 436-442
- 30 Gonen A, Shaish A, Leikin-Frenkel A, Gilat T, Harats D. Fatty acid bile acid conjugates inhibit atherosclerosis in the C57BL/6 mouse model. *Pathobiology* 2002; 70: 215-218
- 31 Konikoff FM, Leikin-Frenkel A, Goldiner I, Michowitz M, Brezowski E, Harats D, Gilat T. Biliary and systemic effects of fatty acid bile acid conjugates. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 649-655
- 32 Leikin-Frenkel A, Weinbroum AA, Leikin-Gobbi D, Krupitzky L, Goldiner I, Shafat L, Gilat T, Konikoff FM. Faecal sterol output is increased by arachidyl amido cholanoic acid (Aramchol) in rats. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 131-133
- 33 Goldiner I, van der Velde AE, Vandenberghe KE, van Wijland MA, Halpern Z, Gilat T, Konikoff FM, Veldman RJ, Groen AK. ABCA1-dependent but apoA-I-independent cholesterol efflux mediated by fatty acid-bile acid conjugates (FABACs). *Biochem J* 2006; 396: 529-536

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

门静脉高压药物治疗的新进展

马 骁, 刘冰熔

马骁, 刘冰熔, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 刘冰熔, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科. liubingrong@medmail.com.cn
电话: 0451-86296562

收稿日期: 2008-09-25 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-28

Advances in drug treatment of portal hypertension

Xiao Ma, Bing-Rong Liu

Xiao Ma, Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. liubingrong@medmail.com.cn

Received: 2008-09-25 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-11-28

Abstract

Intrahepatic vascular resistance augmentation and portal blood flow increase are main mechanisms of portal hypertension. The former as an initial factor is mainly due to liver structure changes and motivity changes (reversible). It has been demonstrated that this reversible resistance can be reduced by 20%-30% with drugs. Portosystemic shunt or transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) may induce many severe complications such as hepatic encephalopathy and stent re-obstruction. Therefore, researchers have performed plenty of experimental investigations about drug treatment of portal hypertension, and this article introduces their new advances in this field.

Key Words: Portal hypertension; Drug; Treatment

Ma X, Liu BR. Advances in drug treatment of portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3775-3781

摘要

肝硬化门脉高压形成的机制主要是肝内阻力增加和门脉血流量增多。肝内阻力增加是始动

因素,其原因主要分机械性和动力性因素;机械性因素是不可逆的,而动力性因素是可逆的。近年来发现许多血管活性物质可以解除或是减弱这种可逆性的梗阻。而且目前的外科分流术和经颈静脉肝内门体分流术可能引起许多并发症如肝性脑病、支架再梗阻等。于是,人们对门脉高压的药物治疗进行了大量的实验研究并有了许多新的认识。本文将主要阐述门脉高压的药物治疗的新进展。

关键词: 门静脉高压; 药物; 治疗

马骁, 刘冰熔. 门静脉高压药物治疗的新进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(33): 3775-3781

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3775.asp>

0 引言

肝硬化在世界范围的高发病率及高死亡率早已受到各国学者的重视,尤其是门静脉高压形成后出现的许多并发症,如食管-胃底静脉曲张出血、难治性腹水、肝肾综合征、肝性脑病等。其中,食管-胃底静脉曲张出血是最常见的并发症。出血后最初6 wk死亡率约为20%,而且出血后短期(<6 wk)再出血发生率为30%-40%,晚期再出血率为32%-84%,平均为59%。可是目前临床上推荐应用于降低门静脉高压的药物仅为β-肾上腺素受体阻滞剂,其可以降低一部分患者门脉压力,减小了肝硬化门脉高压患者1-2年内出血的发生率。但是β-肾上腺素受体阻滞剂存在较多的禁忌症,因此限制了其在肝硬化门脉高压患者中广泛的应用。为了减少门脉高压所致的并发症的发生,降低肝硬化患者的死亡率,国内外学者相继进行了众多的动物实验。本文主要阐述目前降低肝硬化门脉压力药物的研究进展。

1 肝硬化门脉高压形成机制

目前学者认为肝硬化门静脉高压形成的机制可以通过两个学说解释:“后向血流学说”和“前向血流学说”。“后向血流学说”认为肝硬化门脉高压始动因素是肝内阻力增加,导致经门脉回流入肝血液受阻,门静脉压力增高。而肝内高阻

■背景资料

肝硬化门脉高压形成的机制主要是肝内阻力增加和门脉血流量增多。肝内阻力增加原因主要分机械性和动力性因素;机械性因素是不可逆的,而动力性因素是可逆的。许多血管活性物质可以解除或是减弱这种可逆性的梗阻。

■同行评议者

冯志杰,主任医师,河北医科大学第二医院消化内科

■ 研发前沿

以HSC为治疗靶点的药物主要是抑制HSC的收缩特性、针对HSC收缩过程的信号传导途径或是增加扩血管物质的浓度等。不良反应是低血压、肾功能损害。因此,如何从根本上降低肝窦阻力且减少低血压等严重不良反应是今后研究的重点。

力的形成有机械性因素和动力性因素。机械性因素指肝硬化肝小叶结构的改变,假小叶的形成,肝窦毛细血管化等结构性因素导致肝血窦阻力增加,肝脏微循环障碍,这种变化是不可逆的;动力性因素是指肝血窦周围的星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)活化^[1],活化后的HSC有收缩血管平滑肌的作用^[2],同时对缩血管物质的敏感性增加,且内源性血管活性物质的失衡,都有助于门脉高压的形成和维持^[3]。这种变化被认为是可逆的。“前向血流学说”认为肝硬化门脉高压形成之后全身扩血管物质代偿性增加导致高动力循环,表现为心输出量增加、外周血管扩张,使回流入门脉的血流量增多,这被认为是维持和加重门脉高压的主要机制。目前学者们都是以上述两种学说为理论基础,以降低肝内阻力和减少门脉血流为目的进行降低门脉压力药物治疗的研究。

2 相关药物及其进展

2.1 降低肝内阻力的药物:主要通过抑制HSC收缩血管的活性或促进血管扩张来降低肝窦阻力,以达到降低门脉压力的作用。研究较多的药物有内皮素受体拮抗剂、硝酸酯、NO供体、血管紧张素受体拮抗剂等等。

2.1.1 内皮素系统:内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是最强的缩血管物质之一。在1988年首先由Yanagisawa *et al*^[4]发现,并发表在Nature杂志上。随后的研究表明肝硬化患者血浆中ET水平与肝脏疾病和门脉压力的水平呈正相关^[5-6],ET受体的表达在HSC中是最多的^[7],所以ET-1受体表达的增加和HSC的收缩作用关系密切。而且近期有研究表明,ET-1抑制肝窦内皮细胞窗Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性和Ca²⁺泵活性减弱了细胞内Ca²⁺向细胞间隙的移动,增加胞内游离Ca²⁺,最终使肝窦内皮细胞窗收缩,肝窦压力增高^[8]。ET-1与受体结合之后是通过磷脂酶C信号传导系统使细胞内Ca²⁺浓度增加,最终促使平滑肌细胞收缩。ET-1有2种受体,分别是ET_A和ET_B,而ET_B有2个亚型ET_{B1}和ET_{B2}^[9]。ET_A主要存在于血管平滑肌细胞中,与ET-1结合后介导血管收缩;而ET_B存在于血管内皮细胞中,与ET-1结合后介导血管舒张。但近期研究显示ET_B可以产生两种不同的作用,即ET_{B1}与ET-1结合使血管舒张,而ET_{B2}与ET-1结合使血管收缩。尽管ET-1各种受体发挥各种血管活性作用,但是他们在肝硬化门脉高压形成过程中所起到的作用仍存在争

议。因为学者们选择不同的受体拮抗剂进行实验研究,所得结论也并不一致。Cahill *et al*^[10]通过门脉结扎法制作大鼠肝硬化门脉高压模型后,给予大鼠BQ-123(ET_A拮抗剂)和IRL-1038(ET_B拮抗剂)静脉注射,分别观察其对门脉高压大鼠的作用,发现ET_A拮抗剂并不能降低门脉压力,而ET_B拮抗剂有降低门脉压力的作用。随后Kojima *et al*^[11]使用胆总管结扎法制作大鼠肝硬化模型发现了门脉高压形成后肝内ET_B mRNA表达明显增加,而ET_A mRNA表达并无变化,从而得出结论中ET_B受体可能参与了肝硬化门脉高压的形成。随后也有国内外学者的试验也支持Kojima的观点^[12-13]。但是,De Gottardi *et al*^[14]在门静脉结扎的大鼠肝硬化门脉高压模型中分别使用ABT-627(ET_A拮抗剂)、A-192621(ET_B拮抗剂)和A-182061(非选择性ET拮抗剂)长期口服治疗得出的结论可能与上述结论相反,他们的结论是ABT-627可以明显的降低门脉压力,而A-192621反而增加门脉压力, A-182061对门脉压力的降低作用不明显。张弛 *et al*^[15]的研究也表明ET_A在维持高动力循环作用起主要作用。Watanabe *et al*^[16]研究ET-1受体拮抗剂对肝窦内皮细胞窗和肝内微循环的作用时,认为ET-1主要是和ET_A结合后起到调节肝窦内皮细胞窗及影响肝内微循环作用的。有学者认为产生如此矛盾结果可能是因为门脉高压的模型不同。Cahill *et al*^[10]认为在肝硬化不同时期ET-1的作用是不同的,早期ET_A受体起主导作用,而后期ET_B受体起主要作用。虽然存在争议,但国内外许多学者通过复制不同的肝硬化门脉高压模型后,进行实验得出结论,认为非选择性的ET-1受体拮抗剂降低门脉压力的作用是可以确定的^[17-19]。但是,最近的一项随机双盲对照试验得出结论是ET-1对早期肝硬化患者的门静脉压力缺少急性作用,所以对治疗静脉曲张出血作用很有限^[20]。

2.1.2 NO与NOS系统:一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)是一种较强的扩血管物质,普遍存在于各系统中。他由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化L-精氨酸转化为瓜氨酸时产生的,通过旁分泌的方式直接刺激鸟苷酸环化酶,引起cGMP水平增加,致Ca²⁺内流,血管扩张。肝硬化肝窦内皮细胞损伤导致NO减少,血管收缩因子和舒张因子的失衡表现为肝窦血管收缩,肝内阻力增加。(1)硝酸酯类扩血管药:硝酸甘油、5-硝酸异山梨酯等药物是通过释放

NO, 发挥血管扩张作用. 但是因其导致循环血量不足, 严重低血压, 甚至肾功能不全等不良反应, 所以目前不推荐单独使用硝酸酯类预防首次出血. Borroni *et al*^[21]对纳多洛尔和硝酸异山梨酯进行比较, 认为硝酸异山梨酯虽然不良反应相对少, 但患者出血发生率较高. 有学者认为可以联合应用 β -肾上腺素受体阻滞剂和硝酸酯类药物治疗门脉高压, 但是目前的随机对照实验(randomized clinical trial, RCT)称其联合应用 β -受体阻滞剂在降低死亡率方面并不优于单用 β -受体阻滞剂, 并且联合治疗更易出现低血压不良反应^[22]. (2)NO供体制剂: 早在20世纪90年代初就有学者使用NO释放剂来降低门脉压力, 尽管NO可以舒张HSC, 但无论对动物还是门脉高压的患者, 都会导致全身血管舒张, 血压下降; 同时增加了内脏血流量, 所以非选择性的NO供体药物进行全身给药目前在临床上没有应用价值. 因此学者们把研究的重点转移到肝脏选择性的NO供体. Fiorucci *et al*^[23-24]使用NCX-1000(2-乙酰基苯酸3-甲基苯酯, 他通过附加在熊去氧胆酸上, 而熊去氧胆酸几乎全部在肝细胞中代谢, 所以这种复合物具有肝内选择性)在不同的门脉高压大鼠模型中进行实验, 证明其能够减低肝内阻力, 拮抗去甲肾上腺素的缩血管作用; 后又有实验证明上述观点^[25]. 但是, 此实验缺少与全身应用释放NO制剂的对照组比较. 其实在早期就有学者使用NO-NSAIDs制剂释放NO从而降低门脉压力. 近年Lalemana *et al*^[26]使用硝基氟吡洛芬(Nitroflurbiprofen)应用于肝硬化大鼠模型中, 亦得到良好降压效果. (3)一氧化氮合酶(NOS)及相关药物: NOS引起血管舒张主要通过两种机制: 一是可以直接增加NO的浓度, 而NO通过CGMP信号系统使细胞内 Ca^{2+} 浓度减少引起平滑肌细胞舒张; 二是引起肌球蛋白轻链磷酸酯酶(myosin light chain phosphatase, MLCP)含量增加、活性增强, 导致肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)去磷酸化, 横桥与肌动蛋白解离, 引起平滑肌细胞舒张. 目前有很多学者纷纷进行实验, 分别将三种亚型的一氧化氮合酶(NOS)(iNOS, nNOS, eNOS)通过病毒质粒转染到肝硬化门脉高压大鼠模型的肝脏中, 得出结论三种NOS均可以产生明显的降低门脉压力的作用^[27-30]. 但是, 由于并无研究证明转染媒介(腺病毒)应用的安全性, 所以这种治疗方法仍需要大量实验来证明其在人体内应用的可行性. RhoA/Rho激酶

信号传导通路与CGMP信号系统作用相反, 可以使肌球蛋白磷酸化引起平滑肌细胞收缩^[2]. 而且实验证明RhoA/Rho激酶与肝窦血管收缩有密切关系, 其上调可以使肝窦阻力增加, 下调可以使血管扩张、阻力下降^[30-32]. Trebicka *et al*^[33]制作胆源性肝硬化大鼠模型(结扎大鼠胆管)使用他汀类降脂药(阿托伐他汀, 15 mg/kg)治疗7 d, 与非治疗组肝硬化大鼠对比, 结果显示阿托伐他汀可以抑制RhoA/Rho激酶信号传导而活化NOS/CGMP信号系统, 抑制HSC的收缩, 降低肝内阻力及门脉压力, 而且不影响平均动脉压. 可是他汀类降脂药物肝损害的不良反应是否会加重肝硬化及门静脉高压, 现在仍不明确, 尚需实验证明. (4)其他: 另有许多研究一些作用于NO的药物试验, Fernando *et al*研究抗氧化剂(N-乙酰半胱氨酸和硫辛酸), 能够增加增加血浆中亚硝酸盐和硝酸盐的含量, 降低了门脉压力^[34-35]; 另有试验证明雌激素刺激窦内皮细胞产生NOS, 舒张平滑肌, 降低门脉压力^[36-37].

总之, NO是明确的扩血管物质, 增加NO释放的药物, 可以补充肝内NO的缺失, 明显地降低肝窦阻力, 针对发病机制进行治疗, 但是其外周血管扩张的作用对全身的影响是不可忽视的, 尤其造成低血压、循环血量不足等严重后果. 一项临床荟萃分析表明单独应用硝酸酯扩血管药与 β -肾上腺素受体阻滞剂对降低门静脉压力的作用无差别, 而且不能改善长期生存率.

2.2 肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAS系统) 自从19世纪80年代初就发现RAS系统可以调节肝内血管阻力, 他的激活与门脉高压有关系. 活化的HSC表达血管紧张素II受体, 血管紧张素II(Ang II)和其受体结合后导致肝窦收缩以及肝窦内皮细胞基质增殖, 加重门脉高压^[16]. 理论上认为血管紧张素II抑制剂(ACEI)和血管紧张素II受体拮抗剂(ARB)都可以降低肝内血管的阻力, 可是ACEI和血管紧张素II受体拮抗剂是否能降低门脉压力结论尚不统一^[38-42]. Helmy *et al*^[43]研究认为Ang II在肝硬化早期对血管紧张性没有明显作用, 所以认为肝硬化早期RAS系统尚未激活, 使用ARB对外周血流动力学影响较小; 而肝硬化晚期, 为了代偿外周血管的扩张和维持动脉血压稳定, RAS系统激活, 并发挥收缩血管的作用. Tripathi *et al*^[44]随后的实验也证明了缓慢给予氯沙坦对早期肝硬化患者没有作用. 最近又有研究表明血管紧张素阻滞剂还可以抑制

■ 相关报道

近年对NOS与HSC的关系, 且其在肝硬化形成中的作用的研究愈加深刻. Trebicka *et al*制作胆源性肝硬化大鼠模型(结扎大鼠胆管)使用他汀类降脂药(阿托伐他汀, 15 mg/kg)治疗7 d, 与非治疗组肝硬化大鼠对比, 结果显示阿托伐他汀可以抑制RhoA/Rho激酶信号传导而活化NOS/CGMP信号系统, 抑制HSC的收缩, 降低肝内阻力及门脉压力, 而且不影响平均动脉压.

■应用要点

目前确切降低门脉压力的药物寥寥无几,能够研发一种禁忌症和并发症都相对较少的药物将对降低肝硬化门脉高压患者的死亡率有很大帮助。而且,临床应用的曲张静脉结扎和外科断流、分流术也暂时缓解门脉高压所引起的并发症-侧枝循环静脉曲张出血,所以,能从根本上降低门脉压力将是未来治疗手段。

HSC活化和增殖,减少胶原的生成,可以抑制肝脏纤维化^[45-46]。

目前认为ACEI和ARB主要的不良反应可能会有肝、肾功能损害。Debernardi-Venon *et al*^[47]给予11名肝硬化门脉高压的患者厄贝沙坦(Irbesartan)(300 mg/d)治疗8 wk,发现HVP明显下降,而且他认为厄贝沙坦不像氯沙坦那样完全在肝中代谢,所以可以使用正常剂量而无需考虑肝损害。但是ACEI类药物对外周血流动力学影响较大,尤其是肾脏血流,研究表明卡托普利、依那普利长期使用损害肾功能较明显。另有报道,联合应用Irbesartan和 β -受体阻滞剂可以明显的降低患者的门脉压力,而且没有明显的肾功损害^[48]。

2.3 其他因子:与HSC的收缩作用有关系的血管活性物质还有:环氧合酶-2(COX-2)^[49-51]、5-羟色胺(5-HX)^[52-54]等。理论上他们的受体拮抗剂是能够通过抑制HSC的收缩作用从而降低门静脉压力,但现在相关的实验研究还很少。

3 减少门脉血流的药物

此类药物是通过减少心输出量或是直接收缩内脏血管,减少经门脉入肝血流量,从而达到延缓门脉高压的恶化甚至达到降低门脉压力的作用。目前研究较多有 β -肾上腺素受体阻滞剂、NOS抑制剂、垂体后叶素等。

3.1 β -肾上腺素受体阻滞剂 非选择性的 β -肾上腺素受体阻滞剂是目前应用于临床的降低门脉压力,预防静脉曲张出血的主要药物,如普萘洛尔和纳多洛尔主要应用于中度-重度静脉曲张患者的有效性已被众多实验证明^[22,55-56]。荟萃分析论证了普萘洛尔或是纳多洛尔在跟踪随访2年里能够使食管-胃底静脉曲张出血的发生率从25%降到15%。但是非选择性的 β -受体阻滞剂应用于轻度静脉曲张患者,是否可以防止静脉曲张进展、预防静脉曲张破裂出血,目前结论尚不统一。例如Merkal *et al*^[57]对161名轻度静脉曲张患者给予纳多洛尔(nadolol)和安慰剂治疗,在随后的5年里每年随访检查胃镜后,得出结论认为那多洛尔与安慰剂比较可以明显的抑制静脉曲张的进展,静脉曲张出血的发生率也明显下降($P=0.03$)。而随后Groszmann *et al*^[58]对213名肝硬化门脉高压(HVP>6 mmHg)患者进行双盲对照研究,使用噻吗洛尔(timolol)治疗108名患者(使用剂量从5 mg增加到患者能耐受最大剂量)或安慰剂治疗103名患者,结果表明噻吗洛尔治疗组并

没有明显减少出血发生率,同时不良事件的发生率较安慰剂组有所增加。Garcia-Tsao *et al*^[59]的研究也同样认为非选择性的 β -受体阻滞剂不能预防静脉曲张的发展而且同样会发生许多不良事件,所以目前不推荐大范围应用于临床。目前认为使用 β -受体阻滞剂的禁忌证主要是:窦性心动过缓、支气管哮喘、慢性阻塞性肺气肿、心力衰竭、低血压、II度以上房室传导阻滞和胰岛素依赖性糖尿病。Khuroo *et al*^[60]在一篇对比曲张静脉结扎和非选择性的 β -受体阻滞剂治疗效果的文章中指出:在6项研究共264例患者应用非选择性的 β -受体阻滞剂148例(56.1%)出现主要的不良反应:低血压39例,气促25例,精神症状13例,心动过缓16例,其他有支气管痉挛,阳痿,雷诺现象等。如果使用选择性的 β_2 -受体阻滞剂可以减少心血管系统的不良反应,但是达不到减少内脏血流的作用且对于支气管哮喘患者仍然是禁忌证。总之, β -受体阻滞剂的广泛使用仍然受到限制。其是否延长患者生存率,也需要进一步实验证实。

3.2 NOS抑制剂 NOS抑制剂可以抑制外周NO的产生,增加外周血管的紧张性,起到抑制高动力循环的作用。La Villa *et al*^[61]应用NOS抑制剂L-NMMA(NG-甲基-L-精氨酸)对7名肝硬化代偿期患者持续静点120 min,进行随机对照研究,结果表明,L-NMMA可以明显的减少心脏指数,增加外周血管阻力,减少经门脉入肝血流量,从而降低门脉压力。Spahr *et al*^[62]的研究也支持上述观点。但是受试者人数过少,而且是否会减少肝内NO含量,此实验都没有明确说明和解释。Kallambokis *et al*^[63]应用另一种NOS抑制剂亚甲蓝(methylene blue)对肝硬化合并腹水的患者进行治疗,并没有观察到其有明显降低门脉压力的作用。

3.3 其他药物 α -肾上腺素受体激动剂(去甲肾上腺素)和垂体后叶素以及生长抑素是治疗急性曲张静脉出血的一线药物。但是由于他们缩血管作用强大且持续时间较短,因此还没有临床实验证明其可以长期应用来降低门脉压力。可喜的是生长抑素问世明显降低门脉压力^[64-66],降低了门脉高压并发静脉曲张出血患者的死亡率。今年国内有报道使用长效生长抑素降低门脉压力也取得良好效果^[67]。

总之,无论是减少心输出量还是收缩内脏血管,最终目的都是减少经门静脉入肝血流量,从而达到降低门脉压力的作用。但是,这些药物

都并没有从根本上降低门脉压力, 肝内阻力仍然存在, 长期使用是否会加重肝细胞的缺血和乏氧, 目前还不确定。

4 结论

HSC在门脉高压形成中起到重要的作用。以HSC为治疗靶点的药物主要是抑制HSC的收缩特性、针对HSC收缩过程的信号传导途径或是增加扩血管物质的浓度等。但是此类药物长期全身应用最多见的不良反应是低血压、肾功能损害。而另一种降低门脉高压药物的机制是针对高动力循环, 即减少心输出量从而降低门脉入肝血流量, 最终达到降低门脉压力的目的。但是其没有从根本上降低肝窦阻力, 而且此类药物大多数是缩血管物质, 长期大量应用其是否会增加肝窦内缩血管物质的浓度, 加重肝窦压力仍不明确。所以, 如何从根本上降低肝窦阻力且减少低血压等严重不良反应可能是今后研究的重点。

5 参考文献

- 1 Reynaert H, Urbain D, Geerts A. Regulation of sinusoidal perfusion in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291: 693-698
- 2 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 3 姚冬梅, 姚希贤, 杨川杰, 冯志杰, 房红梅, 高军萍. 肝硬化不同病期ET-1, NO对离体肝脏血流动力学的调节作用. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 726-729
- 4 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415
- 5 Møller S, Gülberg V, Henriksen JH, Gerbes AL. Endothelin-1 and endothelin-3 in cirrhosis: relations to systemic and splanchnic haemodynamics. *J Hepatol* 1995; 23: 135-144
- 6 Moore K, Wendon J, Frazer M, Karani J, Williams R, Badr K. Plasma endothelin immunoreactivity in liver disease and the hepatorenal syndrome. *N Engl J Med* 1992; 327: 1774-1778
- 7 Shao R, Rockey DC. Effects of endothelins on hepatic stellate cell synthesis of endothelin-1 during hepatic wound healing. *J Cell Physiol* 2002; 191: 342-350
- 8 Yokomori H, Oda M, Ogi M, Yoshimura K, Nomura M, Fujimaki K, Kamegaya Y, Tsukada N, Ishii H. Endothelin-1 suppresses plasma membrane Ca⁺⁺-ATPase, concomitant with contraction of hepatic sinusoidal endothelial fenestrae. *Am J Pathol* 2003; 162: 557-566
- 9 La M, Reid JJ. Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22: 315-323
- 10 Cahill PA, Hou MC, Hendrickson R, Wang YN, Zhang S, Redmond EM, Sitzman JV. Increased expression of endothelin receptors in the vasculature of portal hypertensive rats: role in splanchnic hemodynamics. *Hepatology* 1998; 28: 396-403
- 11 Kojima H, Sakurai S, Kuriyama S, Yoshiji H, Imazu H, Uemura M, Nakatani Y, Yamao J, Fukui H. Endothelin-1 plays a major role in portal hypertension of biliary cirrhotic rats through endothelin receptor subtype B together with subtype A in vivo. *J Hepatol* 2001; 34: 805-811
- 12 Yokomori H, Oda M, Yasogawa Y, Nishi Y, Ogi M, Takahashi M, Ishii H. Enhanced expression of endothelin B receptor at protein and gene levels in human cirrhotic liver. *Am J Pathol* 2001; 159: 1353-1362
- 13 张军, 张忠涛, 王宇, 王萍, 李建设, 周延忠. 内皮素1及其受体拮抗剂对HSC-T6细胞内皮素受体mRNA表达的影响. *中华外科杂志* 2005; 43: 1395-1397
- 14 De Gottardi A, Shaw S, Sägerser H, Reichen J. Type A, but not type B, endothelin receptor antagonists significantly decrease portal pressure in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2000; 33: 733-737
- 15 张弛, 刘建军, 王吉耀. 选择性内皮素受体拮抗剂对肝硬变门脉高压症大鼠血流动力学的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1339-1344
- 16 Watanabe N, Takashimizu S, Nishizaki Y, Kojima S, Kagawa T, Matsuzaki S. An endothelin A receptor antagonist induces dilatation of sinusoidal endothelial fenestrae: implications for endothelin-1 in hepatic microcirculation. *J Gastroenterol* 2007; 42: 775-782
- 17 Chan CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Huang HC, Lee SD. Effects of endothelin-1 on portal-systemic collaterals of common bile duct-ligated cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 290-296
- 18 许冰, 谢继辉. 内皮素受体拮抗剂对肝硬变门静脉高压症大鼠门静脉压及ET-1 mRNA表达的影响. *郑州大学学报(医学版)* 2004; 39: 830-831
- 19 Thirunavukkarasu C, Yang Y, Subbotin VM, Harvey SA, Fung J, Gandhi CR. Endothelin receptor antagonist TAK-044 arrests and reverses the development of carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats. *Gut* 2004; 53: 1010-1019
- 20 Tripathi D, Therapondos G, Ferguson JW, Newby DE, Webb DJ, Hayes PC. Endothelin-1 contributes to maintenance of systemic but not portal haemodynamics in patients with early cirrhosis: a randomised controlled trial. *Gut* 2006; 55: 1290-1295
- 21 Borroni G, Salerno F, Cazzaniga M, Bisoli F, Lorenzano E, Maggi A, Visentin S, Panzeri A, de Franchis R. Nadolol is superior to isosorbide mononitrate for the prevention of the first variceal bleeding in cirrhotic patients with ascites. *J Hepatol* 2002; 37: 315-321
- 22 Kamath PS. Esophageal variceal bleeding: primary prophylaxis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 90-93
- 23 Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D, del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8897-8902
- 24 Fiorucci S, Antonelli E, Brancalone V, Sanpaolo L, Orlandi S, Distrutti E, Acuto G, Clerici C, Baldoni M, Del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic

■同行评价

本文客观的阐述了门脉高压药物治疗的进展, 可读性较好, 对临床有一定的参考价值。

- acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. *J Hepatol* 2003; 39: 932-939
- 25 Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Iwakiri Y, Groszmann RJ. A liver-specific nitric oxide donor improves the intra-hepatic vascular response to both portal blood flow increase and methoxamine in cirrhotic rats. *J Hepatol* 2003; 39: 940-946
- 26 Laleman W, Van Landeghem L, Van der Elst I, Zeegers M, Fevery J, Nevens F. Nitroflurbiprofen, a nitric oxide-releasing cyclooxygenase inhibitor, improves cirrhotic portal hypertension in rats. *Gastroenterology* 2007; 132: 709-719
- 27 邱江锋, 吴志勇, 张志奇, 罗海峰. iNOS基因治疗肝硬化门静脉高压症的实验研究. *中华外科杂志* 2004; 42: 428-431
- 28 Van de Castele M, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, Fevery J. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002; 51: 440-445
- 29 Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000; 105: 741-748
- 30 Zhang ZQ, Qiu JF, Luo M, Sun YW, Zhao G, Chen W, Liu H, Wu ZY. Liposome-mediated gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to cirrhotic rat liver decreases intrahepatic vascular resistance. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e487-e493
- 31 Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J, Jochem K, Zhou Q, Schmidt M, Jakobs KH, Sauerbruch T, Heller J. Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2006; 130: 838-854
- 32 Anegawa G, Kawanaka H, Yoshida D, Konishi K, Yamaguchi S, Kinjo N, Taketomi A, Hashizume M, Shimokawa H, Maehara Y. Defective endothelial nitric oxide synthase signaling is mediated by rho-kinase activation in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2008; 47: 966-977
- 33 Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 2007; 46: 242-253
- 34 Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Smith R, Hamilton G, Moore K. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology* 1998; 28: 689-694
- 35 Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, Davies S, Moore K. Lipoic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29: 1358-1363
- 36 Sakamoto M, Ueno T, Nakamura T, Hashimoto O, Sakata R, Kin M, Ogata R, Kawaguchi T, Torimura T, Sata M. Estrogen upregulates nitric oxide synthase expression in cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 2001; 34: 858-864
- 37 Sakamoto M, Ueno T, Nakamura T, Sakata R, Hashimoto O, Torimura T, Sata M. Improvement of portal hypertension and hepatic blood flow in cirrhotic rats by oestrogen. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 220-225
- 38 Baik SK, Park DH, Kim MY, Choi YJ, Kim HS, Lee DK, Kwon SO, Kim YJ, Park JW, Chang SJ. Captopril reduces portal pressure effectively in portal hypertensive patients with low portal venous velocity. *J Gastroenterol* 2003; 38: 1150-1154
- 39 Tsai YT, Lin HC, Lee FY, Hou MC, Wang SS, Lee SD. Effects of captopril on renal functions, renal and portal hemodynamics in patients with cirrhosis. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1996; 20: 44-50
- 40 师义才, 霍存孝, 白成宝. 培哚普利治疗肝硬化的临床观察. *延安大学学报(医学科学版)* 2005; 3: 30-34
- 41 Schneider AW, Kalk JF, Klein CP. Effect of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, on portal pressure in cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29: 334-339
- 42 崔丽娟, 黄会芳. 缬沙坦降低大鼠肝硬化门静脉高压的实验研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 258-259
- 43 Helmy A, Jalan R, Newby DE, Hayes PC, Webb DJ. Role of angiotensin II in regulation of basal and sympathetically stimulated vascular tone in early and advanced cirrhosis. *Gastroenterology* 2000; 118: 565-572
- 44 Tripathi D, Therapondos G, Lui HF, Johnston N, Webb DJ, Hayes PC. Chronic administration of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, is not effective in reducing portal pressure in patients with preascitic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 390-394
- 45 Park DH, Baik SK, Choi YH, Kim MY, Rhim DW, Kim JW, Kwon SO, Cho MY, Kim CH, Ahn SC. [Inhibitory effect of angiotensin blockade on hepatic fibrosis in common bile duct-ligated rats] *Korean J Hepatol* 2007; 13: 61-69
- 46 宋怀宇, 王万忠, 朱菊人. 缬沙坦综合治疗慢性乙型肝炎和肝硬化的临床研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1085-1088
- 47 Debernardi-Venon W, Barletti C, Alessandria C, Marzano A, Baronio M, Todros L, Saracco G, Repici A, Rizzetto M. Efficacy of irbesartan, a receptor selective antagonist of angiotensin II, in reducing portal hypertension. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 401-404
- 48 Schepke M, Wiest R, Flacke S, Heller J, Stoffel-Wagner B, Herold T, Ghauri M, Sauerbruch T. Irbesartan plus low-dose propranolol versus low-dose propranolol alone in cirrhosis: a placebo-controlled, double-blind study. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1152-1158
- 49 Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K, Sugita Y, Chang-De J, Kobayashi S, Damdinsuren B, Dono K, Umeshita K, Sekimoto M, Sakon M, Matsuura N, Monden M. JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis1. *Gastroenterology* 2003; 125: 556-571
- 50 Tu CT, Guo JS, Wang M, Wang JY. Antifibrotic activity of rofecoxib in vivo is associated with reduced portal hypertension in rats with carbon tetrachloride-induced liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 877-884
- 51 Horrillo R, Planagumà A, González-Pérez A, Ferré N, Titos E, Miquel R, López-Parra M, Masferrer JL, Arroyo V, Clària J. Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor and a nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 778-786
- 52 李涛, 冷希圣, 翁山耕, 彭吉润, 魏玉华, 牟东成, 王万

- 祥, 朱继业. 5-羟色胺受体在肝星状细胞上的表达及5-羟色胺对肝星状细胞生物学活性的影响. *中华外科杂志* 2003; 41: 175-179
- 53 Li T, Weng SG, Leng XS, Peng JR, Wei YH, Mou DC, Wang WX. Effects of 5-hydroxytyramine and its antagonists on hepatic stellate cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 96-100
- 54 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
- 55 Talwalkar JA, Kamath PS. An evidence-based medicine approach to beta-blocker therapy in patients with cirrhosis. *Am J Med* 2004; 116: 759-766
- 56 Bosch J, Abraldes JG, Groszmann R. Current management of portal hypertension. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S54-S68
- 57 Merkel C, Marin R, Angeli P, Zanella P, Felder M, Bernardinello E, Cavallarin G, Bolognesi M, Donada C, Bellini B, Torboli P, Gatta A. A placebo-controlled clinical trial of nadolol in the prophylaxis of growth of small esophageal varices in cirrhosis. *Gastroenterology* 2004; 127: 476-484
- 58 Groszmann RJ, Garcia-Tsao G, Bosch J, Grace ND, Burroughs AK, Planas R, Escorsell A, Garcia-Pagan JC, Patch D, Matloff DS, Gao H, Makuch R. Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2254-2261
- 59 Garcia-Tsao G. Preventing the development of varices in cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41 Suppl 3: S300-S304
- 60 Khuroo MS, Khuroo NS, Farahat KL, Khuroo YS, Sofi AA, Dahab ST. Meta-analysis: endoscopic variceal ligation for primary prophylaxis of oesophageal variceal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 347-361
- 61 La Villa G, Barletta G, Pantaleo P, Del Bene R, Vizzutti F, Vecchiarino S, Masini E, Perfetto F, Tarquini R, Gentilini P, Laffi G. Hemodynamic, renal, and endocrine effects of acute inhibition of nitric oxide synthase in compensated cirrhosis. *Hepatology* 2001; 34: 19-27
- 62 Spahr L, Martin PY, Giostra E, Niederberger M, Lang U, Capponi A, Hadengue A. Acute effects of nitric oxide synthase inhibition on systemic, hepatic, and renal hemodynamics in patients with cirrhosis and ascites. *J Investig Med* 2002; 50: 116-124
- 63 Kalambokis G, Economou M, Fotopoulos A, Bokharhii JA, Christos P, Paraskevi K, Konstantinos P, Katsaraki A, Tsianos EV. Effects of nitric oxide inhibition by methylene blue in cirrhotic patients with ascites. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1771-1777
- 64 Vanheule E, Geerts AM, Reynaert H, Van Vlierberghe H, Geerts A, De Vos M, Colle I. Influence of somatostatin and octreotide on liver microcirculation in an experimental mouse model of cirrhosis studied by intravital fluorescence microscopy. *Liver Int* 2008; 28: 107-116
- 65 Yang JF, Wu XJ, Li JS, Cao JM, Han JM. Effect of somatostatin versus octreotide on portal haemodynamics in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 53-57
- 66 朱长清, 董胜翔, 茅益民, 曾民德, 蒋义斌, 许建明, 田德安, 刘吉勇, 徐三平, 孙樱, 罗和生, 王炳元. 奥曲肽治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张急性出血的多中心对照研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2570-2573
- 67 杨文燕, 吴建新, 戴强, 江佛湖. 长效奥曲肽对大鼠肝纤维化门静脉高压形成的影响. *世界华人消化杂志*. 2008; 16: 2815-2819

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人员写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验; (2) 采集数据; (3) 分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章; (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析; (2) 获取研究经费; (3) 行政、技术或材料支持; (4) 指导; (5) 支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 《世界华人消化杂志》不设置共同第一作者和共同通信作者. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

胰腺星状细胞与胰腺癌的相互关系

倪建琦, 蒋小华, 汤文浩

■背景资料

胰腺癌是一种恶性程度极高的消化系统肿瘤, 预后极差。胰腺癌周围组织纤维化明显, 而活化的胰腺星状细胞在其中起着重要的作用。研究胰腺星状细胞在发展和转移中的作用可能会对胰腺癌的治疗提供新的治疗思路。

倪建琦, 蒋小华, 汤文浩, 东南大学附属中大医院普外科 江苏省南京市 210009

作者贡献分布: 本文的文献检索及撰写由倪建琦完成; 蒋小华、汤文浩审校。

通讯作者: 汤文浩, 210009, 江苏省南京市丁家桥87号, 东南大学附属中大医院普外科。tangwh126@jlonline.com

电话: 025-83272204 传真: 025-83272011

收稿日期: 2008-09-18 修回日期: 2008-10-21

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-28

Relationship between pancreatic stellate cells and pancreatic cancer

Jian-Qi Ni, Xiao-Hua Jiang, Wen-Hao Tang

Jian-Qi Ni, Xiao-Hua Jiang, Wen-Hao Tang, Department of General Surgery, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wen-Hao Tang, Department of General Surgery, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. tangwh126@jlonline.com

Received: 2008-09-18 Revised: 2008-10-21

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-28

Abstract

Pancreatic carcinoma is a highly malignant tumor in digestive tract, characterized by rapid progression, early metastasis, limited response to chemotherapy and radiotherapy, and an intense fibrotic reaction known as tumor desmoplasia. Carcinoma cells are surrounded by dense stroma consisting of myofibroblast-like cells, collagens, and fibronectin. Recent studies suggest that pancreatic stellate cells play an important role in this reaction and can stimulate pancreatic tumor cell proliferation, progression and metastasis. This review describes the discovery, activation pathway, interaction between pancreatic stellate cells and pancreatic tumor cells, and the role of pancreatic stellate cells in the process of pancreatic cancer initiation, progression, and metastasis.

Key Words: Pancreatic stellate cell; Pancreatic carcinoma; Stroma

Ni JQ, Jiang XH, Tang WH. Relationship between pancreatic stellate cells and pancreatic cancer. *Shijie*

Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(33): 3782-3786

摘要

胰腺癌是一种恶性程度极高的消化系统肿瘤, 其生长速度快、转移早, 对放射和化学治疗不敏感。胰腺癌重要的病理特征是癌组织周围有大量以成纤维细胞、胶原和纤维黏连蛋白等结缔组织聚集。目前已有文献报道, 活化的胰腺星状细胞在其中起着重要的作用; 更有研究认为, 胰腺星状细胞在胰腺癌的发生、发展和转移中亦可能起到一定的作用。本文就胰腺星状细胞和胰腺癌细胞之间的相互关系及其在胰腺癌发展和转移中的作用作一综述。

关键词: 胰腺星状细胞; 胰腺癌; 基质

倪建琦, 蒋小华, 汤文浩. 胰腺星状细胞与胰腺癌的相互关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3782-3786

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3782.asp>

0 引言

胰腺癌是一种严重危害人类健康的消化系统疾病, 在欧美国家, 其为恶性肿瘤死因的第4位, 其发病率和死亡率相近, 5年生存率不到5%^[1]。胰腺癌生长速度快, 在早期就有转移, 对放射和化学疗法不敏感, 胰腺癌的病理特征是癌组织周围有大量以成纤维细胞、胶原和纤维黏连蛋白等结缔组织聚集^[2-5]。而近年的研究认为, 胰腺星状细胞(pancreatic stellate cell, PSC)从静止状态转化为活化状态, 并且通过和胰腺癌细胞相互作用可能促进胰腺癌的发展^[6-10]。

1 胰腺星状细胞的发现

对胰腺星状细胞的早期认识, 是通过对肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的不断实验和研究中积累起来的, 肝星状细胞是由Karl von Kupffer首先发现, 起初, 他被认为是巨噬内皮细胞^[11]。除了肝和胰腺以外, 星状细胞也存在于肾和肺等器官中^[12-13]。1982年日本学者Watari *et al*^[14]在鼠和人的胰腺组织中发现了Vit A贮存细胞, 能自发蓝绿色荧光; 在酒精性胰腺炎模型中, 观察

■同行评议者

崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外科

到该细胞位于胰腺纤维化区, 细胞形态与HSC类似. 1990年Ikejiri^[15]通过电子显微镜在正常人和大鼠胰腺内识别出这种细胞. 1997年Saotome *et al*^[16]在人胰腺腺泡周围发现类成纤维细胞, 当时将该细胞命名为胰腺腺泡周围成纤维细胞样细胞(periacinar fibroblast-like cell, PFC). 直到1998年Bachem *et al*^[17]从人和大鼠胰腺基质中分离能产生I、III型胶原、纤维黏连蛋白(fibronectin, FN)和成黏连蛋白(laminin, LN)等细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)的细胞. 该细胞位于胰腺小叶间和腺泡周围区, 围绕邻近腺细胞基底部, 约占胰腺细胞数的3.99%, 与胰腺纤维化区肌成纤维细胞(myofibroblast)类似, 将该细胞命名为胰腺星状细胞(PSC). 现未见文献报道在胰岛中发现胰腺星状细胞.

2 胰腺星状细胞的生物学特性及其可能的活化机制

与HSC相似, PSC也存在静止和激活两种状态. 在正常的胰腺组织中, PSC呈静止状态, 胞内富含Vit A脂滴和油脂酸视黄醇, 具有摄取和酯化视黄醇的能力, 结蛋白(desmin)和神经胶质原酸性纤维蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)染色阳性. 当胰腺受损后, 发生细胞活化现象. PSC发生了形态学和功能学的双重变化, 表现为: 细胞体积变大, 增殖活跃; 脂质减少或丢失; α -平滑肌蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达阳性; 对细胞因子如血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)反应性增加; 分泌ECM, 尤其是I、III型胶原^[18-21]. 目前, PSC已知的生物学特性如下: 细胞增殖、迁移、合成和分泌ECM, 合成和分泌基质金属蛋白酶(matris metallo proteinases, MMP)和金属蛋白酶的抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP), 表达细胞间黏附因子-1(intercellular adhesion molecules-1, ICAM-1), 维持胰腺的正常结构^[22-23]. 活化的PSC表达多种其他细胞所特有的蛋白, 比如肌细胞中的结蛋白(desmin)、星形胶质细胞中的GFAP、白细胞中的波形蛋白(vimentin)、神经上皮干细胞中的巢蛋白(Nestin)等^[24-25].

3 胰腺星状细胞和胰腺癌的相互作用关系

Yen *et al*^[26]研究证明, 在胰腺癌中发现大量SMA阳性的胰腺星状细胞位于胰腺癌周围. Apet *et al*^[27]

研究发现胰腺癌中的胰腺星状细胞desmin、SMA、GFAP染色阳性. 提示胰腺癌中存在胰腺星状细胞, 在胰腺癌的病理发展过程中可能起一定的作用. 研究证明胰腺癌细胞可以刺激胰腺星状细胞增殖和TIMP-1的生成. 反过来, 在体内和体外实验也经证明, 胰腺星状细胞可以促进胰腺癌的生长和转移^[28]. 有学者提出, 胰腺癌结缔组织中的大量星状细胞, 可能是由胰腺癌细胞释放的某些化学因子招募而来, 也可能是由癌细胞直接刺激星状细胞增殖而来. 下面就以他们两者之间的相互作用关系做一小结.

3.1 胰腺癌细胞促进PSC迁移, 并招募PSC到癌组织周围 Bachem *et al*^[20]用“wound assay”法发现, 用SW850、Mia-PaCa2、Panc1 3个胰腺癌细胞株上清液和PSC共培养, PSC向创面迁移, 并且几乎完全覆盖了创面. 进一步研究其中可能的机制, 发现胰腺星状细胞PDGF受体、成簇黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)和细胞外信号调节激酶(ERK)发生了磷酸化. 用ERK的阻滞剂PD-98059可以使PSC的移动明显受阻. 因此, 他们认为癌细胞释放的PDGF及PDGF受体, 以及FAK、RK的磷酸化在促进PSC的迁移过程中起着重要作用. 同时运用癌细胞和PSC作共培养发现, PSC向癌细胞方向移动, 运用PDGF的中和抗体或者PDGF受体阻滞剂可以使PSC的迁移明显受阻. 从而他们认为, 癌细胞是通过释放PDGF来刺激PSC迁移, 并招募PSC到癌组织周围.

3.2 癌细胞可以促进PSC活化增殖 Armstrong *et al*^[22]将胰腺癌细胞MIAPaCa-2、PANC1和AsPC-1的培养上清液作用于原代培养的PSC, 通过 $[H^3]$ 胸苷结合力判断PSC增殖情况. 培养16 h后, $[H^3]$ 胸苷结合力较常规培养的PSC增加6倍, 并具有浓度依赖性. 另有研究发现SW850、Mia-PaCa2、Panc1 3个胰腺癌细胞株上清液和PSC共培养, 用BrdU法发现, 以上3种细胞株上清液可以促进PSC增殖. 加入PDGF中和抗体后, PSC增殖情况明显减少^[20]. 另外, 已有实验证实, 胰腺癌细胞还能分泌TGF- β 1、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、IL-1、IL-6、IL-8、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肿瘤坏死因子(TNF- α)等^[22-27]. 而TGF- β 1、PDGF、CTGF、IL-1、IL-6、IL-8、bFGF等均可刺激PSCs的增殖与活化^[29-30].

3.3 癌细胞可以促进PSC合成ECM 研究表明, 胰腺癌细胞可以在体内和体外生成I、II、IV型胶原纤维、层黏连蛋白以及表达基质金属蛋

■研发前沿

胰腺癌细胞促使胰腺星状细胞的活化并形成癌周纤维化组织, 研究胰腺星状细胞的活化机制及其对胰腺癌细胞的作用, 已成为研究胰腺癌及癌周基质之间关系的一个热点.

■相关报道

目前有关活化胰腺星状细胞在胰腺炎中的作用报道较多, 最近的研究发现, 胰腺癌组织中也存在胰腺星状细胞的活化, 但活化的胰腺星状细胞在胰腺癌中作用尚处于研究之中.

■创新盘点

本文就胰腺星状细胞的发现、活化途径、其与胰腺癌细胞之间的相互关系及其在胰腺癌发展和转移中的作用作一综述。

白酶诱导剂(emmprin)^[20,31]。但是现有研究认为胰腺癌中的大量纤维化组织是由活化的PSC产生, Bachem *et al*^[20]用MiaPaCa2、Panc1和SW850培养上清液与PSC作共培养,并用免疫荧光和RT-PCR测定PSC I、III型胶原的表达发现,以上3种培养上清液可以促进PSC生成I、III型胶原。并通过进一步研究发现,癌细胞可能通过释放FGF-2、TGF- β 1来刺激PSC合成ECM。Luttenberger *et al*^[21]也发现PDGF可以促进PSC合成ECM,而胰腺癌细胞本身即分泌PDGF。

3.4 活化的PSC促进胰腺癌细胞生长及转移 Bachem *et al*^[32]通过体外实验发现,与只注入胰腺癌细胞所形成的肿瘤比较,同时注入癌细胞和PSC所形成的肿瘤与人类体内胰腺癌组织结构更为相似,并且具有更快的生长速度和更大的体积。提出PSC可能通过3种机制刺激癌细胞增殖:(1)PSC释放某种生长因子刺激癌细胞,(2)PSC产生了癌细胞生长的微环境,(3)PSC可以抑制癌细胞凋亡;并通过实验数据推测第一种机制更有可能。Vonlaufen *et al*^[33]发现PSC通过分泌PDGF促进胰腺癌细胞增殖。腱糖蛋白-C(tenascin C, TNC)由PSC表达,是细胞外基质糖蛋白中一类具有重要生物活性的蛋白质分子;肿瘤细胞表面有膜联蛋白-2(annexin II),他是TNC的剪接受体的高亲和力受体。Esposito *et al*^[34]报道,胰腺癌组织中TNC和膜联蛋白-2 mRNA表达水平远高于正常胰腺组织。层粘连蛋白及纤维连接蛋白的作用均通过其整合素受体调节,而整合素受体又由肿瘤细胞表达^[28]。此外,胶原蛋白-1可促进胰腺导管腺癌的恶性程度增加^[22]。Bachem *et al*^[20]发现,胰腺癌细胞表达的EMMPRIN可以促进PSC合成MMP,他可降解ECM,破坏基底膜的完整性,有利于肿瘤的侵袭和转移。Yoshida *et al*^[35]发现PSC胞质表达COX-2,胰腺癌能刺激PSC中COX-2表达,而COX-2是胰腺癌独立的预后相关因子,阳性表达者预后差^[36-37]。COX-2可调节细胞的凋亡,使一些致癌物质被氧化后激活具有致癌性或激活癌基因,促进血管内皮细胞增生,也可由其参与合成的前列腺素(PGs)产物进入核内调节细胞内其他基因的转录,活化癌基因,抑制免疫监视,利于癌细胞的免疫逃逸,促进恶性细胞生长、癌栓形成和肿瘤转移^[38-39]。

新生血管是胰腺癌中的重要成分,新生血管可为肿瘤组织提供氧气和营养,并利于远处转移。血管形成受血管内皮生长因子(VEGF)、

bFGF、PDGF、TGF- β 、胰岛素样生长因子(IGF-1)等因子调控,而PSC可分泌TGF- β 。Masamune *et al*^[40]研究发现低氧可以刺激PSC诱导胰腺癌新生血管的生成。这些结果均提示在胰腺癌的进程中,PSC不仅仅包绕肿瘤,对于肿瘤的发生、发展亦起促进作用。

有研究发现,SW1990可表达半乳糖凝集-3(GAL-3),并且在与PSC培养上清液作共培养时,GAL-3表达增多。PSC并不表达GAL-3,但可以与GAL-3共同作用来促进胰腺癌细胞的增殖和侵袭^[41]。Hwang *et al*^[42]发现永生化的PSC的培养上清液可以促进PANC-1和BXP3增殖、迁移、侵袭,并且显示这些现象具有浓度依赖性。研究提示,PSC的培养上清液还可以抑制上述两种细胞株对化疗(2, 2-二氟脱氧胞嘧啶核苷)和放疗(100-Gy)射线的敏感性。Muerkoster *et al*^[43]通过研究显示,PSC通过释放NO上调T3M4、PT45-P1合成白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),最终诱导上述两种细胞株对依托泊沙的耐受。并且提示IL-8可以促进PSC释放NO,从而形成环路来放大该效应。

虽然大量研究表明活化PSC促进胰腺癌生长及转移,但也有研究表明PSC活化可能抑制胰腺癌的生长。PSC可分泌核心蛋白聚糖(decorin),并是胰腺癌组织Decorin的主要来源^[44]。但研究发现,Decorin在胰腺癌的生长过程中表现负性调控作用,通过控制基质聚集、胶原纤维形成,与生长因子结合而抑制肿瘤生长。Koninger *et al*^[45]在胰腺癌细胞培养瓶中加入100 mg/L Decorin,所有胰腺癌细胞株都发生生长抑制现象。

4 结论

活化的PSC与胰腺癌细胞相互作用,可能对胰腺癌的发展和转移有推动作用,然而对于PSC的研究,目前还有很多问题没有完全清楚。比如,对于胰腺癌中PSC的活化机制没有完全清楚。首先,慢性胰腺炎和胰腺癌中均有胰腺星状细胞的活化,但其分子机制有何不同目前并不清楚;其次,活化的胰腺星状细胞在胰腺癌的发生和转移中是否起促进作用及其分子机制,这些研究还处于起步阶段,并没有一致肯定的结论。致力于对PSC的研究,抑制PSC活化或促进其凋亡,或者阻止PSC和胰腺癌细胞间相互作用的关键分子通路,可能对阻断胰腺癌的发生起到一定作用。如,McCarroll *et al*^[46]报道,用Vit A及其代谢产物全反式维甲酸促进活化的PSC转

■应用要点

阐明胰腺癌中胰腺星状细胞的活化机制及其对胰腺癌发展和转移的作用,可能对胰腺癌的治疗带来新突破。

变为静止状态的PSC. 用CD95和TNF相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)诱导PSC凋亡^[47]. 刘文滨 *et al*^[48]的研究结果表明, 血管紧张素 II (Ang II) I型受体(AT1)拮抗剂洛沙坦(losartan)对人胰腺星状细胞在体外对PSC具有直接的促凋亡效应, Rickmann *et al*^[49]发现生育三烯酚类可以通过线粒体途径诱导PSC凋亡, 从而可以阻断PSC与胰腺癌细胞的相互作用. 目前, 已有针对基质细胞治疗肿瘤的报道, 在胰腺癌中, 如能致力于其基质细胞PSC在胰腺癌中作用的研究, 有望对胰腺癌的治疗提供新的思路.

5 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66
- Brand RE, Tempero MA. Pancreatic cancer. *Curr Opin Oncol* 1998; 10: 362-366
- Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 1992; 326: 455-465
- Hernandez-Munoz I, Skoudy A, Real FX, Navarro P. Pancreatic ductal adenocarcinoma: cellular origin, signaling pathways and stroma contribution. *Pancreatol* 2008; 8: 462-469
- Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, DePinho RA. Stromal biology of pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2007; 101: 887-907
- Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance. *Cancer Res* 2008; 68: 7707-7710
- Algul H, Treiber M, Lesina M, Schmid RM. Mechanisms of disease: chronic inflammation and cancer in the pancreas--a potential role for pancreatic stellate cells? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 454-462
- Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1186-1197
- Jaster R, Emmrich J. Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22: 17-29
- Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandolfi SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 2007; 117: 50-59
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 311-335
- Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006; 69: 213-217
- Keane MP, Strieter RM, Belperio JA. Mechanisms and mediators of pulmonary fibrosis. *Crit Rev Immunol* 2005; 25: 429-463
- Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1982; 58: 837-858
- Ikejiri N. The vitamin A-storing cells in the human and rat pancreas. *Kurume Med J* 1990; 37: 67-81
- Saotome T, Inoue H, Fujimiya M, Fujiyama Y, Bamba T. Morphological and immunocytochemical identification of periacinar fibroblast-like cells derived from human pancreatic acini. *Pancreas* 1997; 14: 373-382
- Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998; 115: 421-432
- 万远太, 王天才. 胰星状细胞与胰纤维化发生机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 376-380
- 余晓云, 陈婕, 侯晓华. 胰腺星状细胞活化相关因子研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2009-2013
- Bachem MG, Zhou S, Buck K, Schneiderhan W, Siech M. Pancreatic stellate cells-role in pancreas cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 891-900
- Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, Grunert A, Bachem MG. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest* 2000; 80: 47-55
- Armstrong T, Packham G, Murphy LB, Bateman AC, Conti JA, Fine DR, Johnson CD, Benyon RC, Iredale JP. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7427-7437
- Schneiderhan W, Diaz F, Fundel M, Zhou S, Siech M, Hasel C, Moller P, Gschwend JE, Seufferlein T, Gress T, Adler G, Bachem MG. Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. *J Cell Sci* 2007; 120: 512-519
- Lohr M, Trautmann B, Gottler M, Peters S, Zauner I, Mailliet B, Kloppel G. Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins. *Br J Cancer* 1994; 69: 144-151
- Lardon J, Rooman I, Bouwens L. Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 535-540
- Yen TW, Aardal NP, Bronner MP, Thorning DR, Savard CE, Lee SP, Bell RH Jr. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery* 2002; 131: 129-134
- Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 2004; 29: 179-187
- Edderkaoui M, Hong P, Vaquero EC, Lee JK, Fischer L, Friess H, Buchler MW, Lerch MM, Pandolfi SJ, Gukovskaya AS. Extracellular matrix stimulates reactive oxygen species production and increases pancreatic cancer cell survival through 5-lipoxygenase and NADPH oxidase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G1137-G1147
- Sawai H, Okada Y, Funahashi H, Matsuo Y, Takahashi H, Takeyama H, Manabe T. Interleukin-1 α enhances the aggressive behavior of pancreatic cancer cells by regulating the α 6 β 1-integrin and urokinase plasminogen activator

■名词解释

胰腺星状细胞: 胰腺基质中分离出的能产生 I、III 型胶原、纤维粘连蛋白和成粘连蛋白等细胞外基质的细胞; 在正常的胰腺组织中呈静止状态, 当胰腺受损后, 发生细胞活化现象并发挥作用.

■同行评价

本文选题新颖,思路清晰,参考文献引用恰当,是一篇较好的综述文章。

- receptor expression. *BMC Cell Biol* 2006; 7: 8
- 30 Karger A, Fitzner B, Brock P, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, Jaster R. Molecular insights into connective tissue growth factor action in rat pancreatic stellate cells. *Cell Signal* 2008; 20: 1865-1872
- 31 Zhang W, Erkan M, Abiatari I, Giese NA, Felix K, Kaye H, Buchler MW, Friess H, Kleeff J. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN/CD147) in pancreatic neoplasm and pancreatic stellate cells. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 218-227
- 32 Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 2005; 128: 907-921
- 33 Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, Toi CS, Pirola RC, Wilson JS, Goldstein D, Apte MV. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2085-2093
- 34 Esposito I, Penzel R, Chaib-Harrireche M, Barcena U, Bergmann F, Riedl S, Kaye H, Giese N, Kleeff J, Friess H, Schirmacher P. Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. *J Pathol* 2006; 208: 673-685
- 35 Yoshida S, Ujiki M, Ding XZ, Pelham C, Talamonti MS, Bell RH Jr, Denham W, Adrian TE. Pancreatic stellate cells (PSCs) express cyclooxygenase-2 (COX-2) and pancreatic cancer stimulates COX-2 in PSCs. *Mol Cancer* 2005; 4: 27
- 36 Matsubayashi H, Infante JR, Winter J, Klein AP, Schulick R, Hruban R, Visvanathan K, Goggins M. Tumor COX-2 expression and prognosis of patients with resectable pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 1569-1575
- 37 Juuti A, Louhimo J, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C. Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59: 382-386
- 38 Lev-Ari S, Zinger H, Kazanov D, Yona D, Ben-Yosef R, Starr A, Figer A, Arber N. Curcumin synergistically potentiates the growth inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 2: S276-S280
- 39 Hasan S, Satake M, Dawson DW, Funahashi H, Angst E, Go VL, Reber HA, Hines OJ, Eibl G. Expression analysis of the prostaglandin E2 production pathway in human pancreatic cancers. *Pancreas* 2008; 37: 121-127
- 40 Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Shimosegawa T. Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G709-G717
- 41 Jiang HB, Xu M, Wang XP. Pancreatic stellate cells promote proliferation and invasiveness of human pancreatic cancer cells via galectin-3. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2023-2028
- 42 Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 2008; 68: 918-926
- 43 Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebels T, Kloppel G, Kalthoff H, Folsch UR, Schafer H. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* 2004; 64: 1331-1337
- 44 Koninger J, Giese T, di Mola FF, Wente MN, Esposito I, Bachem MG, Giese NA, Buchler MW, Friess H. Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 943-949
- 45 Koninger J, Giese NA, di Mola FF, Berberat P, Giese T, Esposito I, Bachem MG, Buchler MW, Friess H. Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4776-4783
- 46 McCarroll JA, Phillips PA, Santucci N, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis. *Gut* 2006; 55: 79-89
- 47 Klonowski-Stumpe H, Fischer R, Reinehr R, Luthen R, Haussinger D. Apoptosis in activated rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G819-G826
- 48 刘文滨, 王兴鹏, 吴恺, 张汝玲. 血管紧张素 II 受体拮抗剂对人胰腺星状细胞增殖和迁移的影响. *胰腺病学* 2006; 6: 135-140
- 49 Rickmann M, Vaquero EC, Malagelada JR, Molero X. Tocotrienols induce apoptosis and autophagy in rat pancreatic stellate cells through the mitochondrial death pathway. *Gastroenterology* 2007; 132: 2518-2532

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

• 消息 •

世界华人消化杂志网络版的发表前链接

本刊讯 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文,使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。(常务副总编辑:张海宁 2008-11-28)

抑癌基因RUNX3与消化系统肿瘤关系的研究进展

陶军, 邓涛

陶军, 邓涛, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

通讯作者: 邓涛, 430060, 湖北省武汉市解放路238号, 武汉大学人民医院消化内科. tj2008_smile@sina.com
电话: 027-88041919

收稿日期: 2008-10-13 修回日期: 2008-11-01

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-28

Research progress in the relationship between RUNX3 gene and digestive system neoplasm

Jun Tao, Tao Deng

Jun Tao, Tao Deng, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Tao Deng, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuhan 430060, Hubei Province, China. tj2008_smile@sina.com

Received: 2008-10-13 Revised: 2008-11-01

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-11-28

Abstract

Since tumor suppressor gene RUNX3 was found in gastric cancer, researches have focused on the relationship between the gene and malignancies in digestive track, especially gastric carcinoma, colorectal carcinoma, esophageal carcinoma and liver carcinoma. The methylation of RUNX3 gene may correlate with the occurrence of tumors. Silence of RUNX3 gene can suppress tumor growth, and methylated RUNX3 gene product in serum may be a sensitive tumor marker, which is of great significance in early diagnosis of digestive system neoplasm.

Key Words: Tumor suppressor gene; RUNX3; Digestive system neoplasm

Tao J, Deng T. Research progress in the relationship between RUNX3 gene and digestive system neoplasm. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3787-3791

摘要

抑癌基因RUNX3在胃癌中被发现以来, 研究

便集中在该基因与消化系统肿瘤发生发展的关系, 尤其是在胃癌、结直肠癌、食管癌、肝癌中. RUNX3基因甲基化可能与肿瘤发生相关, 沉默的RUNX3基因重新表达能抑制肿瘤的生长, 血浆中甲基化的RUNX3可能成为较敏感的标志物, 对于提高消化系统肿瘤的早期诊断率将有一定的临床意义.

关键词: 抑癌基因; RUNX3; 消化系统肿瘤

陶军, 邓涛. 抑癌基因RUNX3与消化系统肿瘤关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(33): 3787-3791

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3787.asp>

0 引言

消化系统肿瘤是常见的恶性肿瘤, 且发病率逐年上升并逐渐年轻化, 对消化系统肿瘤的研究也日益广泛. 从RUNX3基因作为抑癌基因首次在胃癌中发现以来, 已经在多种肿瘤中发现, 尤其是在消化系统肿瘤中的研究更加深入. 下面将RUNX3基因与消化系统肿瘤关系的研究进展作一综述.

1 RUNX3基因概述

1.1 RUNX3的结构和功能 RUNX3(runt-related transcription factor 3)是RUNT家族成员之一, 人类RUNX家族是由RUNX1、RUNX2、RUNX3三个成员组成, 他们都是重要的转录因子. 人类RUNX3基因位于染色体1p36.1, 基因全长为67 kb, 含有P1、P2两个启动子、6个外显子和1290 bp的开放阅读框. RUNX3 mRNA主要来自P2启动子转录的产物^[1], 因P2启动子中鸟嘌呤(guanine, G)和胞嘧啶(cytosine, C)含量较高(64%), 故在理论上其要比P1启动子易发生甲基化^[1-2]. 鼠RUNX3基因位于4号染色体, 与人类RUNX3高度相似^[3]. 人类和鼠RUNX3基因都有两个大的保守CpG岛, 其中一个位于外显子2的附近, 另一个位于外显子6的起始部位^[1]. 人类RUNX3蛋白由415个氨基酸残基构成, 与RUNX1、RUNX2蛋白一样, 均是由α和β亚单位构成的异二聚体^[1,4]. α亚单位含有一个RD保

■背景资料

本文主要概述了RUNX3基因与消化系统肿瘤发生发展的关系, 众所周知RUNX3基因首次被认为是抑癌基因是在胃癌的研究中, 此后无论是肺癌、乳腺癌、子宫内膜癌还是本专业涉及的肿瘤都得到了广泛研究. 目前系统研究RUNX3基因与消化系统肿瘤间关系的文献相当少, 基于此本文详细阐述了RUNX3基因与胃癌、结直肠癌、食管癌以及肝癌的关系.

■同行评议者

熊斌, 教授, 武汉大学中南医院肿瘤科

■研究前沿

尽管RUNX3基因是一种新近发现的抑癌基因,但是其具体抑癌机制仍然有待于在以后的研究中解决.

守域, RD域位于RUNX蛋白的氨基末端, 由128个氨基酸残基组成, 包含一个S型免疫球蛋白折叠, 介导RUNX蛋白与DNA的结合以及与核心结合因子(CBF)- β 的相互作用; β 亚单位由134个氨基酸残基构成, 能增加 α 亚单位与DNA的结合力, 对于维持其正常功能是必要的, RUNX蛋白的羧基端在转录调控方面起重要作用^[4-6].

1.2 RUNX3的抑癌机制 目前多数研究认为RUNX3的抑癌机制与具有生长抑制和凋亡诱导因子功能的TGF- β 通路密切相关^[7-8]. TGF- β 是多种细胞的生长抑制因子, 激活后与具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的TGF- β 受体 I 和 II 相结合, 产生异四聚体复合物(T β RC), 触发细胞内信号通路, 其中Smads蛋白的作用很重要. 与TGF- β 信号通路相关的Smads蛋白中Smad2和Smad3属于受体调控型(receptor-regulated Smads, R-Smads), Smad4属于受体辅助型(common-partner Smads, Co-Smads), 他们均具有保守的N端和C端, 即MH1和MH2域, Smad锚定受体激活物(SARA)优先结合Smad2、Smad3的MH2域, 并通过自身的FYVE域将其固定在细胞膜上, Smad2/3复合物被活性T β RC磷酸化激活后, 与Co-Smad结合往返于细胞核和细胞质之间^[9]. 研究表明^[10], Smad复合物须在RUNX3等RUNX蛋白的协助下才能从细胞质进入细胞核特定的靶位点, 而RUNX3蛋白也需要在TGF- β 的协助下才能由细胞质进入细胞核. RUNX3蛋白在靶基因启动子区可与众多转录因子相互作用, 从而增强或主动抑制靶基因的转录激活; 对于转录沉默而言, RUNX3蛋白可募集转录辅助抑制因子如Sin3A或TLE蛋白家族成员, 后者与羧基末端VWRPY五肽基序相互作用. 目前已知的RUNX3靶基因有防御素NP-3和MDR1等, 但具体的调控机制尚不清楚^[11].

2 Runx3与消化系统肿瘤

2.1 RUNX3与胃癌 Homma *et al*^[12]应用甲基化特异性PCR(MSP)研究了10株胃癌细胞株和45例胃癌标本和相应癌旁正常组织RUNX3启动子CpG岛连续10个位点的甲基化状态, 结果显示启动子CpG岛5'端甲基化阳性率, 细胞株为90.0%, 胃癌标本和相应癌旁正常组织均为95.6%, 而在转录起始点部位细胞株为40.0%, 胃癌标本为53.3%, 相应癌旁正常组织为11.1%, 认为甲基化最初可能发生在RUNX3基因启动子CpG岛的5'端, 并逐渐向转录起始点方向演进, 最终引起

RUNX3 mRNA表达下调, 因此转录起始点附近位点的甲基化对于RUNX3沉默的意义更大. 而Feng *et al*^[13]用不同浓度的5-氮-2-脱氧胞苷处理胃癌细胞株SGC7901后, 认为尽管5-氮-2-脱氧胞苷不能使失活的RUNX3基因重新表达, 但也不能肯定RUNX3基因沉默不依赖DNA甲基化.

Ito *et al*^[14]应用抗RUNX3单克隆抗体免疫组化方法检测了97例胃癌标本和21株胃癌细胞株RUNX3蛋白的表达, 结果发现胃癌标本中56%表达RUNX3蛋白, 其中38%定位于细胞质, 而只有18%定位于细胞核. 研究表明TGF β 可协助RUNX3进入细胞核, 作为抑癌基因的Runx3如果在细胞质中失活, 胃癌中82%的RUNX3基因失活是由于基因沉默或者是定位于细胞质. 最新的研究主要围绕敲除RUNX3基因后, 由正常胃黏膜向胃癌发展过程的机制. Fukamachi *et al*^[15]在对RUNX3-/-胃癌上皮细胞的体外研究颇受关注, 最近有研究报道了血细胞可能影响胃癌形成, 他们研究的目的是要证实RUNX3-/-p53-/-的胃上皮细胞在体外化生成肠型细胞是否与血细胞有关. 实验分为3组, 分别是胶原胶组、胎鼠胃间质组和基质胶组, 只有基质胶组的胃上皮细胞不但形成了腺样结构而且一些细胞不同程度的化生成肠型细胞. 经RT-PCR证实这些细胞在培养期间, 时间越长胃特有基因的表达越少, 相反肠特有基因的表达却逐渐增加. 研究结果显示RUNX3-/-p53-/-的胃上皮细胞在体外化生成肠型细胞与血细胞无关. 这就向RUNX3基因沉默与胃癌形成机制的研究迈进了一步.

2.2 Runx3与大肠癌 Goel *et al*^[16]研究RUNX3在微卫星不稳定性散发性大肠癌中的表达时, 研究了17株结肠癌细胞株和91例散发性结肠癌. 结果表明21%(19/91)标本和65%(11/17)细胞系发生了甲基化, 经过去甲基化剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理的SW48和HCT15细胞株, RUNX3表达恢复. 同年, 另一篇关于Runx3基因对肠道肿瘤的研究扩大到了32株结直肠癌细胞株. Ku *et al*^[17]为了证实在大肠癌形成过程中RUNX3基因的基因改变和甲基化状态, 分析了突变、杂合性缺失、RUNX3启动子甲基化等. 用RT-PCR的方法发现有16株细胞株呈现低表达或是无表达, 用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)方法没有发现RUNX3基因突变. 在这16株细胞株中, 有12株细胞株的RUNX3启动子发生甲基化, 其余4株细胞株既无表达也无甲基化. 实验结果可能有助于认识RUNX3基因失活在结

直肠癌发病机制中的作用. 倪志 *et al*^[18]用5-Aza-CdR处理胃癌Lovo细胞株发现他能逆转RUNX3启动子区甲基化状态, RUNX3基因的重新表达能抑制Lovo细胞株的生长并能部分地诱导细胞株的凋亡.

RUNX3基因甲基化与临床病理也经常结合起来, Imamura *et al*^[19]对92例结直肠癌用MSP检测, 其中31/92(34%)肿瘤中检测到了RUNX3甲基化, 在有甲基化的肿瘤中, 低分化的肿瘤与其他分化情况的肿瘤在组织学上有明显的差异性($P=0.028$). 结果表明RUNX3甲基化在结直肠癌肿瘤发挥了重要作用, 尤其是在低分化的肿瘤中.

2.3 Runx3与食管癌 从RUNX3基因在胃癌中首先被证实为抑癌基因起, 各种围绕RUNX3的研究迅速开展起来, 尤其是人们设想RUNX家族基因中, 除了RUNX3以外是否也有其他基因参与了肿瘤的发生发展过程. Tonomoto *et al*^[20]在对61例食管鳞状细胞癌的研究中, 用实时RT-PCR检测RUNX1、RUNX2、RUNX3的表达, 用免疫组化检测Smad4的表达, 用MSP检测Runx3的甲基化状态. 结果显示: 在早期肿瘤(T₁和T₂)中, RUNX3阴性表达时肿瘤中淋巴道侵袭能力和淋巴结转移数目均明显增高; RUNX3阴性表达与肿瘤预后不良相关; 在Smad4阳性表达的肿瘤中, RUNX3可能是影响预后的重要因素; RUNX3甲基化状态与Runx3表达缺失密切相关, 即甲基化是RUNX3基因沉默的主要途径. Smith *et al*^[21]关于Barrett食管和食管腺癌的研究中, 9个基因中7个基因甲基化表达在各类型黏膜中的表达无差异, 而RUNX3和CDKN2A甲基化程度在食管腺癌中明显高于Barrett食管.

放疗针对某些食管癌是有效的治疗方法, 但是分子机制和放射敏感性依然未知. Sakakura *et al*^[22]在研究食管鳞状细胞癌时, 选择了62例标本经影像学诊断均为T₃或T₄期食管癌, 分为2组, 其中一组为放疗前活检组织, 另一组为放疗后手术切除标本. 结果显示, 处理前活检标本的Runx3表达率为67.7%, 放疗后手术标本的RUNX3表达率为96.7%, 在所有抗放射的肿瘤中均检测到RUNX3下调和甲基化. 他们将食管癌细胞在体外成功转染后, 虽然较弱的抑制细胞的增生, 但是增强了TGF- β 的抑制增生和促进凋亡的作用. 另外, 诱导RUNX3的重新表达能增加放射敏感性, 而处理前标本的RUNX3表达情况可以预测放射敏感性. 由此将为今后治疗肿瘤开辟新的思路, 使RUNX3重新表达、放疗和手术充分结合起来.

RUNX3基因甲基化是RUNX3沉默的主要机制, 但是Sugiura *et al*^[23]最近的研究发现RUNX3基因甲基化在食管癌中的检出率极低. 他们研究了包括15株食管癌细胞株和70例食管鳞状细胞癌标本以及对应的正常食管黏膜. Runx3在食管癌中的表达明显低于在正常黏膜中的表达, T₄期肿瘤的RUNX3 mRNA表达水平明显低于T₁₋₃期肿瘤. 但是RUNX3启动子区在食管癌细胞株的检出率为1/15, 在70例食管癌标本中仅有4例发生甲基化. 因此基于RUNX3表达降低的机制, 有待进一步研究.

2.4 Runx3与肝癌 研究已经证实了RUNX家族基因中, RUNX3在胃癌形成中是重要的抑癌基因, 在肝癌中也检测到定位于1p36的RUNX3基因, Miyagawa *et al*^[24]为了进一步研究RUNX家族基因包括RUNX1、RUNX2、RUNX3以及其辅助因子CBF β 在肝癌中的表达情况, 特选择了35例肝癌, 以及相邻的肝硬化标本和正常肝组织标本. 用RT-PCR检测, RUNX mRNA与 β -actin mRNA的比值如下: RUNX1(21.7 ± 9.1 , 11.8 ± 5.6 , 5.5 ± 2.5), RUNX2(0.7 ± 0.7 , 0.5 ± 0.4 , 0.4 ± 0.1), Runx3(23.7 ± 7.6 , 5.8 ± 2.3 , 1.9 ± 0.9), CBF β (17.9 ± 7.0 , 8.9 ± 3.1 , 5.5 ± 2.1), (正常肝组织 vs 肝硬化 vs 肿瘤). 其中, RUNX2表达微弱, 在肝癌组和其他组中表达量无明显差异; 而RUNX1和RUNX3在肝癌中表达明显下调分别是75%和92%, 在肝硬化中的表达分别是55%和71%; CBF β 表达也明显下调, 但是不及前两个基因明显. 结果表明RUNX3, 以及RUNX1和CBF β 在肝癌形成过程中发挥了重要作用, 同时在肝癌形成过程中对RUNX家族基因的认识也得到了进一步的深入. Park *et al*^[25]对RUNX3基因甲基化在肝癌中的表达情况, 研究了73例肝癌标本和11株肝癌细胞株, 其中30/73(41.1%)肝癌标本RUNX3发生甲基化, 对应正常肝组织中2/73(2.7%)发生甲基化, 肝癌细胞株中4/10(40%)发生甲基化, 但是启动子甲基化和临床病理参数间没有明显的差异性. RUNX3基因甲基化在肝癌发展中是一个早期事件, 甲基化是肝癌中RUNX3基因失活的主要机制.

2.5 Runx3与其他肿瘤 Wada *et al*^[26]对12株胰腺癌细胞株进行研究, 9株(75%)细胞株经过RNA印迹分析和RT-PCR证实了没有RUNX3表达, 但是都存在甲基化. 而甲基化抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后这9株细胞株的RUNX3基因重新表达. 以上说明RUNX3基因在胰腺癌形成中发挥了重要作用. TGF- β 信号通路的改变是胰腺

■ 相关报道

Tan *et al*在肿瘤患者血浆中检测包括RUNX3基因在内的肿瘤抑制基因的甲基化状态发现RUNX3基因的检出率是最高的, 乳腺癌9/19(47%)、非小细胞肺癌11/20(55%)、胃癌4/4(100%)、胰腺癌2/2(100%)、结直肠癌11/17(65%)和肝癌7/8(88%).

■同行评价

本文系统综述了RUNX3基因与消化系统肿瘤发生发展的关系以及研究进展,文章条理分明,有一定科学性,对消化系统肿瘤研究有一定的指导作用。

癌发生的重要原因之一,而RUNX3是该通路的重要组成部分。Nomoto *et al*^[27]对定位于1p36的RUNX3基因的研究,选择了32例胰腺癌标本,分别检测RUNX3启动子区甲基化状态和位于1p36的杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)。结合临床病理资料,甲基化的检出率为62.5%(20/32),经重硫酸盐处理的DNA测序证实,LOH检出率为34.3%(11/32),甲基化与胰腺癌预后不良相关($P = 0.0143$)。胰腺癌中RUNX3的失活机制可能是甲基化和LOH, RUNX3基因也成为与胰腺癌相关的重要的肿瘤抑制基因。Wada *et al*^[26]对10株胆管癌细胞株研究中,发现7株(70%)细胞株经过RNA印迹分析和RT-PCR证实了没有RUNX3表达,但是都存在甲基化。而甲基化抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷核酸处理后这7株细胞株的Runx3基因重新表达。以上说明RUNX3基因在胆管癌形成过程中发挥了重要作用。Takahashi *et al*^[28]对50例胆囊癌的多基因进行甲基化研究时,选择了确定以及还存在争议的肿瘤抑制基因24个。结果表明胆囊癌中这些基因的甲基化程度从0到80%不等,甲基化程度在20%以上的基因有10个,其中包括RUNX3为32%,研究认为甲基化是胆囊癌的早期事件。

3 讨论

Tan *et al*^[29]在肿瘤患者血浆中检测包括RUNX3基因在内的肿瘤抑制基因的甲基化状态发现RUNX3基因的检出率是最高的,乳腺癌9/19(47%)、非小细胞肺癌11/20(55%)、胃癌4/4(100%)、胰腺癌2/2(100%)、结直肠癌11/17(65%)和肝癌7/8(88%)。研究结果表明血浆中RUNX3甲基化可能成为较敏感的标志物,在恶性肿瘤的诊断中将比p16、RASSF1A和CDH1更加敏感。检测RUNX3基因甲基化程度对于提高早期诊断率,将有一定的临床意义。总之,RUNX3作为抑癌基因与具有生长抑制和凋亡诱导功能的TGF- β 密切相关, RUNX3失活与肿瘤的发展以及预后密切相关, RUNX3基因失活与肿瘤的机制有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y, Negreanu V, Goldenberg D, Lotem J, Ben-Asher E, Lancet D, Levanon D, Groner Y. The RUNX3 gene--sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001; 279: 221-232
- 2 Kato N, Tamura G, Fukase M, Shibuya H, Motoyama T. Hypermethylation of the RUNX3 gene promoter in testicular yolk sac tumor of

- infants. *Am J Pathol* 2003; 163: 387-391
- 3 Avraham KB, Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Groner Y, Copeland NG, Jenkins NA. Mapping of the mouse homolog of the human runt domain gene, AML2, to the distal region of mouse chromosome 4. *Genomics* 1995; 25: 603-605
- 4 Coffman JA. Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell Biol Int* 2003; 27: 315-324
- 5 Tang YY, Shi J, Zhang L, Davis A, Bravo J, Warren AJ, Speck NA, Bushweller JH. Energetic and functional contribution of residues in the core binding factor beta (CBFbeta) subunit to heterodimerization with CBFalpha. *J Biol Chem* 2000; 275: 39579-39588
- 6 Tahirov TH, Inoue-Bungo T, Morii H, Fujikawa A, Sasaki M, Kimura K, Shiina M, Sato K, Kumasaka T, Yamamoto M, Ishii S, Ogata K. Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta. *Cell* 2001; 104: 755-767
- 7 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itoharu S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 8 Bae SC, Choi JK. Tumor suppressor activity of RUNX3. *Oncogene* 2004; 23: 4336-4340
- 9 Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003; 94: 230-234
- 10 Zaidi SK, Sullivan AJ, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Integration of Runx and Smad regulatory signals at transcriptionally active subnuclear sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8048-8053
- 11 Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* 2003; 89: 9-18
- 12 Homma N, Tamura G, Honda T, Matsumoto Y, Nishizuka S, Kawata S, Motoyama T. Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 51-56
- 13 Feng XZ, He XS, Zhuang YZ, Luo Q, Jiang JH, Yang S, Tang XF, Liu JL, Chen T. Investigation of transcriptional gene silencing and mechanism induced by shRNAs targeted to RUNX3 in vitro. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3006-3014
- 14 Ito K, Liu Q, Salto-Tellez M, Yano T, Tada K, Ida H, Huang C, Shah N, Inoue M, Rajnakova A, Hiong KC, Peh BK, Han HC, Ito T, Teh M, Yeoh KG, Ito Y. RUNX3, a novel tumor suppressor, is frequently inactivated in gastric cancer by protein mislocalization. *Cancer Res* 2005; 65: 7743-7750
- 15 Fukamachi H, Mimata A, Tanaka I, Ito K, Ito Y, Yuasa Y. In vitro differentiation of Runx3-/- p53-/- gastric epithelial cells into intestinal type cells. *Cancer Sci* 2008; 99: 671-676
- 16 Goel A, Arnold CN, Tassone P, Chang DK, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Epigenetic inactivation of RUNX3 in microsatellite unstable sporadic colon cancers. *Int J Cancer* 2004; 112: 754-759
- 17 Ku JL, Kang SB, Shin YK, Kang HC, Hong SH,

- Kim IJ, Shin JH, Han IO, Park JG. Promoter hypermethylation downregulates RUNX3 gene expression in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23: 6736-6742
- 18 倪志, 鲍曼夕, 刘南植, 赵秋, 覃华, 杨彦, 邱艺坚, 王婷婷. 结肠癌Lovo细胞RUNX3基因的表达与其增殖及凋亡的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 711-715
 - 19 Imamura Y, Hibi K, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y, Ito K, Nakao A. RUNX3 promoter region is specifically methylated in poorly-differentiated colorectal cancer. *Anticancer Res* 2005; 25: 2627-2630
 - 20 Tonomoto Y, Tachibana M, Dhar DK, Onoda T, Hata K, Ohnuma H, Tanaka T, Nagasue N. Differential expression of RUNX genes in human esophageal squamous cell carcinoma: downregulation of RUNX3 worsens patient prognosis. *Oncology* 2007; 73: 346-356
 - 21 Smith E, De Young NJ, Pavey SJ, Hayward NK, Nancarrow DJ, Whiteman DC, Smithers BM, Ruskiewicz AR, Clouston AD, Gotley DC, Devitt PG, Jamieson GG, Drew PA. Similarity of aberrant DNA methylation in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2008; 7: 75
 - 22 Sakakura C, Miyagawa K, Fukuda KI, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Ida H, Yazumi S, Yamagishi H, Okanoue T, Chiba T, Ito K, Hagiwara A, Ito Y. Frequent silencing of RUNX3 in esophageal squamous cell carcinomas is associated with radioresistance and poor prognosis. *Oncogene* 2007; 26: 5927-5938
 - 23 Sugiura H, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Mori Y, Ogawa R, Katada T, Harata K, Fujii Y. Decreased expression of RUNX3 is correlated with tumor progression and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2008; 19: 713-719
 - 24 Miyagawa K, Sakakura C, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Ito K, Yamagishi H, Ida H, Yazumi S, Chiba T, Ito Y, Hagiwara A. Down-regulation of RUNX1, RUNX3 and CBFbeta in hepatocellular carcinomas in an early stage of hepatocarcinogenesis. *Anticancer Res* 2006; 26: 3633-3643
 - 25 Park WS, Cho YG, Kim CJ, Song JH, Lee YS, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. Hypermethylation of the RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med* 2005; 37: 276-281
 - 26 Wada M, Yazumi S, Takaishi S, Hasegawa K, Sawada M, Tanaka H, Ida H, Sakakura C, Ito K, Ito Y, Chiba T. Frequent loss of RUNX3 gene expression in human bile duct and pancreatic cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23: 2401-2407
 - 27 Nomoto S, Kinoshita T, Mori T, Kato K, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A. Adverse prognosis of epigenetic inactivation in RUNX3 gene at 1p36 in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008; 98: 1690-1695
 - 28 Takahashi T, Shivapurkar N, Riquelme E, Shigematsu H, Reddy J, Suzuki M, Miyajima K, Zhou X, Bekele BN, Gazdar AF, Wistuba II. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in gallbladder carcinoma and chronic cholecystitis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6126-6133
 - 29 Tan SH, Ida H, Lau QC, Goh BC, Chieng WS, Loh M, Ito Y. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep* 2007; 18: 1225-1230

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 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末。标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体。(常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

JNK信号通路在 δ 氨基酮戊酸-光动力疗法诱导SW480细胞凋亡中的作用机制

郑江华, 陈开, 陈祖林

■背景资料

PDT是指光敏剂选择性地聚集在肿瘤组织中, 接受光照后在细胞内产生活性氧物质, 而导致肿瘤细胞凋亡或坏死的一种治疗方法。迄今为止, 加拿大、美国、法国、荷兰、德国和日本等国家已先后批准PDT用于一些恶性肿瘤。

郑江华, 陈开, 川北医学院附属医院血管外科 四川省南充市 637000

陈祖林, 中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院普外科 重庆市 400037

作者贡献分布: 此课题由郑江华、陈开及陈祖林设计; 研究过程由郑江华操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈祖林提供; 数据分析由郑江华、陈开及陈祖林完成; 本论文写作由郑江华、陈开及陈祖林完成。

通讯作者: 郑江华, 637000, 四川省南充市, 川北医学院附属医院血管外科。zhengjianghua@126.com

电话: 0817-2262418

收稿日期: 2008-08-28 修回日期: 2008-10-08

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-11-28

Role of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in SW480 cell apoptosis in response to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy

Jiang-Hua Zheng, Kai Chen, Zu-Lin Chen

Jiang-Hua Zheng, Kai Chen, Department of Vascular Surgery, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 63700, Sichuan Province, China

Zu-lin Chen, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400037, China

Correspondence to: Dr. Jiang-hua Zheng, Department of Vascular Surgery, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 63700, Sichuan Province, China. zhengjianghua@126.com

Received: 2008-08-28 Revised: 2008-10-08

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To investigate the role of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway in SW480 cell apoptosis in response to 5-aminolevulinic acid (ALA)-based photodynamic therapy (PDT).

METHODS: SW480 cells were divided into control group, laser irradiation group, ALA group and ALA-PDT group. Western blot was used to detect expression of JNK in each group. SW480 cells in ALA-PDT group were preincubated with SP600125 (JNK inhibitor). Western blot was used

to detect expression of PARP in each group.

RESULTS: JNK phosphorylation almost had no expression in control group, light group or ALA group. JNK phosphorylation of SW480 cells at 30, 60 and 90 min after ALA- PDT was significantly increased than that of control group, light group or ALA group ($F = 12.314$, $P < 0.001$). Phosphorylated JNK expression was significantly higher at 60 min and 90 min after ALA-PDT than at 30 min after ALA- PDT ($F = 9.782$, $P < 0.001$). The expression of total JNK of all groups had no significant difference. The activation of JNK inhibited apoptosis of SW480 cells in response to ALA-PDT.

CONCLUSION: Activation of JNK signaling pathway inhibits SW480 cell apoptosis after ALA-PDT. JNK signaling pathway may become a new target, which will enhance anticancer treatment of ALA-PDT for colon carcinoma.

Key Words: Aminolevulinic acid; Photodynamic therapy; Colon carcinoma; Apoptosis; the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway

Zheng JH, Chen K, Chen ZL. Role of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in SW480 cell apoptosis in response to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3792-3795

摘要

目的: 探讨JNK信号通路在 δ 氨基酮戊酸(ALA)-光动力疗法(PDT)诱导SW480细胞凋亡中的作用。

方法: 将SW480细胞分为空白对照组、激光照射组、ALA组及ALA-PDT组, Western blot检测各组细胞c-Jun氨基末端激酶(JNK)的表达; 用SP600125(JNK抑制剂)预孵育ALA-PDT组细胞, Western blot检测各组细胞的多聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)的表达。

结果: 磷酸化JNK在空白对照组、激光照射组

■同行评议者

王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

及ALA组几乎无表达, ALA-PDT后30-90 min细胞表达显著高于空白对照组、激光照射组及ALA组($F = 12.314, P < 0.001$), 其中ALA-PDT后60及90 min的磷酸化JNK表达显著高于ALA-PDT后30 min($F = 9.782, P < 0.001$), 各组细胞总的JNK表达无显著差异. JNK的激活能抑制ALA-PDT诱导SW480细胞凋亡.

结论: JNK信号通路的激活抑制ALA-PDT诱导SW480细胞凋亡; JNK通路可能成为增强ALA-PDT治疗结肠癌的新靶点.

关键词: δ 氨基酮戊酸; 光动力疗法; 结肠癌细胞; 细胞凋亡; JNK信号通路

郑江华, 陈开, 陈祖林. JNK信号通路在 δ 氨基酮戊酸-光动力疗法诱导SW480细胞凋亡中的作用机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3792-3795

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3792.asp>

0 引言

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)作为一种新的肿瘤治疗方法近年来倍受重视, 迄今为止, 加拿大、美国、法国、荷兰、德国和日本等国家已先后批准PDT用于一些恶性肿瘤^[1], 但其作用的分子机制还不清楚. 研究表明PDT能激活有丝分裂原蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)^[2], 然而PDT诱导MAPKs的生物学作用存在争议, 这可能与光敏剂和/或细胞类型相关^[3]. MAPK家族主要包括3个成员: ERK、JNK和p38MAPK. ERK主要介导生长、分化及存活, JNK和p38MAPK主要介导细胞的应急反应, 他们的激活促进细胞凋亡. 但是JNK激活方式的不同也可产生不同的生物学效应, γ 射线照射Jurkat T细胞后, JNK被持续激活, 细胞发生凋亡; 而CD28单抗加PMA处理后, JNK被迅速而短暂的激活, 细胞并不出现凋亡, 而是被活化和增殖^[4], 提示JNK激活作用可能具有细胞和刺激物的特异性. 有报道显示卟啉或卟啉衍生物-PDT能诱导c-Jun表达^[5], 并激活JNK信号通路^[6], 但JNK信号通路的激活与PDT诱导细胞凋亡的关系还不清楚, 因此我们探讨ALA-PDT对JNK信号通路的影响及其与细胞凋亡的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 δ 氨基酮戊酸和Hepes为Sigma公司产品, 培养液RPMI 1640和D-Hanks为Hyclone公司产品, 胰蛋白酶(北京鼎国生物技术公司); 小牛血清(成都哈里公司); JNK mAb、磷酸化JNK

mAb及PARP mAb(Cell Signaling Technology); SP600125(Merck biosciences); β -actin抗体(北京博澳森生物技术公司); PVDF膜(Roche); 蛋白质分子Marker(MBI); RIPA(上海申能博彩生物科技有限公司); DTT(Gibco); 二甲基亚砜(DMSO, Sigma公司); 结肠癌细胞株SW480细胞(中国人民解放军第四军医大学动物实验中心提供).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 用含青霉素和链霉素分别为100 kU/L, 含100 mL/L小牛血清RPMI 1640培养液培养, 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度, 单层贴壁生长.

1.2.2 细胞的PDT处理: 将增殖期SW480细胞按照适当浓度接种于6孔培养板, 每组复4孔, 待其贴壁后, 吸出含血清的培养液, D-Hanks液轻轻漂洗后弃去, ALA组和ALA-PDT组在暗室按预定时间加入ALA(40 mg/L), 严格避光条件下继续孵育4 h, 弃去含有ALA的培养液; 在另外的ALA-PDT组细胞中加入终浓度20 μ mol/L的SP600125(JNK抑制剂)预孵育2 h, D-Hanks液轻轻漂洗后, 加入新鲜培养液, 空白对照组不加ALA且不受激光照射, ALA组加入ALA不受激光照射. 激光照射组、ALA-PDT组以及加有SP600125的ALA-PDT组使用半导体激光仪(西南师范大学激光所, 波长532 nm, 距光斑3 cm处输出功率12 mW, 能量密度9 J/cm²)垂直照射培养板30 min, 然后将细胞置于培养箱中继续培养到实验设计的时间, 再检测各组细胞的蛋白表达^[6].

1.2.3 Western蛋白印迹检测JNK和PARP蛋白表达: 细胞培养48 h后经PDT处理, 按照设计时间继续孵育或即刻抽提细胞总蛋白. 按照RIPA使用说明, 每孔细胞加入300 μ L RIPA提取细胞总蛋白, 考马斯亮蓝250染色法测总蛋白浓度后-20℃保存. 调整各组总蛋白浓度使每孔上样量一致, SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离后通过半干电转仪将蛋白转到PVDF膜. 用含0.1% Tween-20的50 g/L脱脂奶粉室温下封闭PVDF膜1 h后, 再用含0.1% Tween-20的Tris缓冲液(TBS/T)洗3次, 每次5 min; 一抗1:1000稀释, 4℃过夜, TBS/T洗3次, 每次5 min; 按照1:2000稀释浓度加入抗兔或小鼠的HRP-IgG 1 h, TBS/T洗3次, 每次5 min; 加入DAB显色, 凝胶成像系统上摄像并分析灰度值, 以积分吸光度 $A \times$ 面积表示($A \times \text{mm}^2$), 分别计算目的条带的积分吸光度值(I_A值).

统计学处理 数据mean \pm SD表示, 采用SPSS10.0统计软件处理数据, 行F检验. 检验水

■ 研发前沿

目前JNK信号通路的激活与PDT诱导细胞凋亡的关系还不甚清楚.

■应用要点

本文探索了ALA-PDT诱导结肠癌细胞SW480凋亡与JNK信号通路的关系,为结肠癌光动力治疗的增效作用提供新的靶点,也为结肠癌光动力治疗和作用机理提供理论依据。

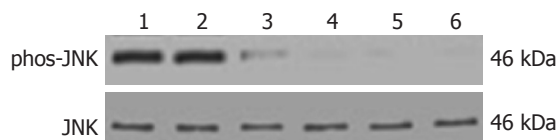


图1 ALA-PDT作用SW480细胞后JNK的表达。1: ALA-PDT后90 min; 2: ALA-PDT后60 min; 3: ALA-PDT后30 min; 4: 空白对照组; 5: 激光照射组; 6: ALA组。

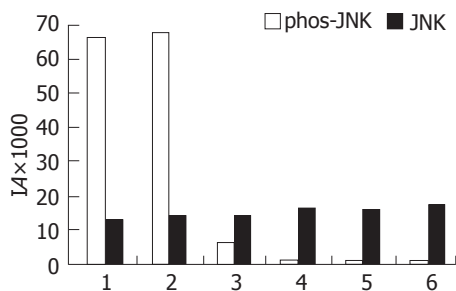


图2 ALA-PDT作用SW480细胞后JNK蛋白表达。1: ALA-PDT后90 min; 2: ALA-PDT后60 min; 3: ALA-PDT后30 min; 4: 空白对照组; 5: 激光照射组; 6: ALA组。

准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 ALA-PDT后SW480细胞的JNK蛋白表达变化 ALA-PDT造成SW480细胞JNK蛋白表达增加。磷酸化JNK在空白对照组、激光照射组及ALA组几乎无表达, PDT后30-90 min细胞表达显著高于空白对照组、激光照射组及ALA组($F = 12.314, P < 0.001$), 其中PDT后60及90 min的磷酸化JNK表达显著高于PDT后30 min($F = 9.782, P < 0.001$), 各组细胞总的JNK表达无显著差异(图1-2)。

2.2 SP600125对ALA-PDT作用SW480细胞后PARP表达的影响 为了进一步研究JNK在ALA-PDT后SW480细胞中的作用, 我们用JNK抑制剂SP600125在激光照射前处理ALA-PDT组细胞, 孵育2 h, 结果发现ALA-PDT后30-90 min PARP裂解成85 kDa大小的片段逐渐增加, 说明JNK的激活能抑制ALA-PDT诱导SW480细胞凋亡(图3-4)。

3 讨论

PDT是指光敏剂选择性地聚集在肿瘤组织中, 接受光照后在细胞内产生活性氧物质, 而导致肿瘤细胞凋亡或坏死的一种治疗方法^[7-8]。迄今为止, 加拿大、美国、法国、荷兰、德国和日本等国家已先后批准PDT用于一些恶性肿瘤^[1]。但常规光敏剂不良反应重和需要较长时间避光等缺点又限制了其进一步临床应用。δ氨基酮戊酸

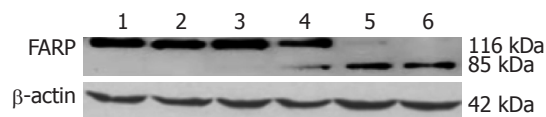


图3 SP600125对ALA-PDT作用SW480细胞后PARP表达的影响。1: 空白对照组; 2: 激光照射组; 3: ALA组; 4: ALA-PDT后30 min(加有SP600125); 5: ALA-PDT后60 min(加有SP600125); 6: ALA-PDT后90 min(加有SP600125)。

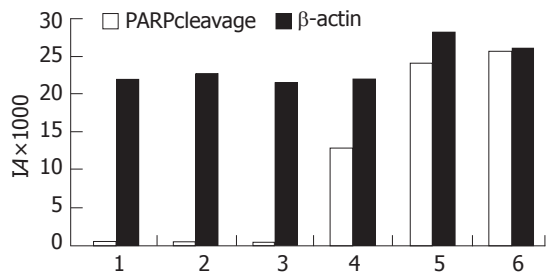


图4 SP600125对ALA-PDT作用SW480细胞后PARP表达。1: 空白对照组; 2: 激光照射组; 3: ALA组; 4: ALA-PDT后30 min(加有SP600125); 5: ALA-PDT后60 min(加有SP600125); 6: ALA-PDT后90 min(加有SP600125)。

(aminolaevulinic acid, ALA)是一种血红素生物合成的前体物质, 在大多数类型的癌细胞中, 由于胆色素原脱氢酶活性增加而亚铁螯合酶活性降低^[9], 导致原卟啉IX(protoporphyrin, PP IX)在癌细胞内积累, PP IX具有极好的光敏特性, 用与之吸收波段相应的光照射后将导致癌细胞的破坏^[10]。因ALA代谢快、毒副作用小等优点, 所以是一种很有前途的治疗癌症的方法^[11], 但ALA-PDT对结肠癌杀伤作用还不够强^[12], 探讨其作用的信号传导机制可能是提高ALA-PDT对结肠癌疗效的重要研究方向之一。

多项研究表明, JNK的激活与多种细胞的细胞凋亡调控有关。神经生长因子(NGF)可使PC12细胞发生分化, 当NGF从培养基中被去除后, JNK被激活, 出现细胞凋亡; 当PC12细胞被转染了JNK上游激酶MEKK1的显性失活突变体后, NGF撤除诱导的细胞凋亡可被阻断^[13]。Jurkat细胞经γ射线处理后JNK可被激活, 出现细胞凋亡, 而当细胞被转染了显性失活JNK突变体后, γ射线诱导的凋亡可以被阻断, 同样, 激活的JNK过度表达可诱导细胞凋亡^[14]。以上研究均表明, JNK的激活可诱导细胞发生凋亡。但是JNK激活方式的不同也可产生不同的生物学效应, γ射线照射Jurkat T细胞后, JNK被持续激活, 细胞发生凋亡; 而CD28单抗加PMA处理后, JNK被迅速而短暂的激活, 细胞并不出现凋亡, 而是被活化和增殖^[4], 提示JNK激活作用可能具有细胞和刺激物的特异性。有报道显示卟啉或卟啉衍生物-PDT能诱导c-Jun表达^[5], 并激活JNK信号通路的

激活^[6], 我们的实验结果显示ALA-PDT后SW480细胞的JNK信号通路也快速激活. 但JNK信号通路的激活与PDT诱导细胞凋亡的关系还不清楚, 因此我们进一步探讨ALA-PDT对SW480细胞JNK信号通路的激活与细胞凋亡的关系. 目前主要有两种细胞凋亡途径: 死亡受体介导的凋亡途径和线粒体介导的凋亡途径^[15]. 死亡受体介导的凋亡途径是指细胞表面的肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族受到刺激后, TNFR1和TNF结合导致TNFR1形成同三聚体, 随后他们的死亡结构域交联, 再与Fas相关的死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain, FADD)结合, 激活始动Caspase, 如Caspase-8, -9. 活化的始动Caspase进一步活化效应Caspase, 如: Caspase-3, -6, -7等. 从而诱导细胞凋亡^[16]. 线粒体介导的凋亡途径是指线粒体功能受到损害后, 细胞色素C释放进入胞质, 在ATP的参与下细胞色素C结合并活化凋亡活化因子-1(apoptosis activating factor, Apaf-1). 随后, 活化的Apaf-1使Caspase-9剪切和活化, 从而进一步活化效应Caspase, 最后细胞凋亡^[17]. Caspase-3最主要的底物是多聚(ADP-核糖)聚合酶(poly(ADP-ribose) polymerase, PARP), 该酶与DNA修复、基因完整性监护有关. 在细胞凋亡启动时, 116 kDa的PARP在Asp216-Gly217之间被caspase-3剪切成31 kDa和85 kDa两个片段, 使PARP中与DNA结合的两个锌指结构与羧基端的催化区域分离, 不能发挥正常功能. 结果使受PARP负调控影响的Ca²⁺/Mg²⁺依赖性核酸内切酶的活性增高, 裂解核小体间的DNA, 引起细胞凋亡. 因此我们用JNK抑制剂处理细胞, 观察ALA-PDT后各组细胞PARP蛋白的裂解情况, 从而探讨JNK信号通路的激活与PDT诱导细胞凋亡的关系. 实验结果表明: 抑制JNK或p38MAPK后, 116 kDa的PARP裂解成85 kDa片段逐渐增加, 说明JNK通路的激活保护ALA-PDT后SW480细胞免于凋亡.

总之, ALA-PDT能诱导SW480细胞JNK通路的快速激活, 阻断JNK通路可增强ALA-PDT诱导SW480细胞凋亡.

4 参考文献

- 1 Johansen LS. [Photodynamic therapy. A new method for the treatment of cancer] *Ugeskr Laeger* 1999; 161: 3992-3995
- 2 Assefa Z, Vantieghem A, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede JR, Merlevede W, de Witte P, Agostinis P. The activation of the c-Jun N-terminal

- kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *J Biol Chem* 1999; 274: 8788-8796
- 3 Xue L, He J, Oleinick NL. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by stress kinases. *Cell Death Differ* 1999; 6: 855-864
- 4 Chen YR, Meyer CF, Tan TH. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 631-634
- 5 Kick G, Messer G, Plewig G, Kind P, Goetz AE. Strong and prolonged induction of c-jun and c-fos proto-oncogenes by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1996; 74: 30-36
- 6 Klotz LO, Fritsch C, Briviba K, Tsacmacidis N, Schliess F, Sies H. Activation of JNK and p38 but not ERK MAP kinases in human skin cells by 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Res* 1998; 58: 4297-4300
- 7 Peng Q, Warloe T, Moan J, Godal A, Apricena F, Giercksky KE, Nesland JM. Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the use of a low dose of photofrin in human tumor xenografts. *Cancer Res* 2001; 61: 5824-5832
- 8 Niedre M, Patterson MS, Wilson BC. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Photochem Photobiol* 2002; 75: 382-391
- 9 Bartosova J, Hrkál Z. Accumulation of protoporphyrin-IX (PpIX) in leukemic cell lines following induction by 5-aminolevulinic acid (ALA). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2000; 126: 245-252
- 10 Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 889-905
- 11 Haddad R, Kaplan O, Greenberg R, Siegal A, Skornick Y, Kashtan H. Photodynamic therapy of murine colon cancer and melanoma using systemic aminolevulinic acid as a photosensitizer. *Int J Surg Invest* 2000; 2: 171-178
- 12 郑江华, 时德, 陈祖林. δ 氨基酮戊酸-光动力疗法对人结肠癌细胞SW480游离钙浓度的影响. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 250
- 13 Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270: 1326-1331
- 14 Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 1996; 271: 31929-31936
- 15 Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 2003; 25: 888-896
- 16 Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 331-367
- 17 Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 715-720

■同行评价

本研究对光动力疗法治疗肿瘤的机理的探讨具有一定理论价值, 可读性及创新性均能较好的反映我国和国际胃肠病学研究水平.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

食管-贲门黏膜撕裂综合征临床分析78例

袁二燕, 张洁, 吕宗舜

■背景资料

食管贲门黏膜撕裂综合征(MWS)是因剧烈干呕或呕吐等,腹内压力或胃内压力突然增大,导致食管与胃贲门连接处的黏膜和黏膜下层呈纵行撕裂,从而引起上消化道出血为特征的病变。其临床主要表现为频繁剧烈呕吐、呕血和(或)黑便,胃镜下可见黏膜纵行撕裂是其诊断要点。MWS是上消化道出血的原因之一,其发病率较低,多数出血量少,且为自限性,临床上容易被忽视,但是尚有一部分MWS可以引起消化系大出血,甚至导致出血性休克和死亡。

袁二燕, 张洁, 吕宗舜, 天津医科大学总医院消化内科 天津市 300052

作者贡献分布: 此课题由袁二燕, 张洁及吕宗舜共同设计, 采集数据和分析数据并共同完成论文写作。

通讯作者: 袁二燕, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化内科. yuaneryan@163.com

电话: 022-60362949

收稿日期: 2008-08-22 修回日期: 2008-10-07

接受日期: 2008-10-13 在线出版日期: 2008-11-28

Mallory-Weiss syndrome: a clinical analysis of 78 cases

Er-Yan Yuan, Jie Zhang, Zong-Shun Lv

Er-Yan Yuan, Jie Zhang, Zong-Shun Lv, Department of Gastroenterology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Er-Yan Yuan, Department of Gastroenterology, General Hospital of Tianjin Medical University, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. yuaneryan@163.com

Received: 2008-08-22 Revised: 2008-10-07

Accepted: 2008-10-13 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical characteristic, gastroscopic manifestation and treatment of Mallory-Weiss syndrome (MWS).

METHODS: We retrospectively analyzed the clinical data of 78 MWS patients admitted to hospital from March 2003 to April 2008.

RESULTS: MWS was estimated to account for 6.13% of patients with upper gastrointestinal bleeding. Vomiting after alcohol drinking was the main etiology. Under gastroscopy, all tears were longitudinal and common in cardia. The manifestation was correlated with the intervals from pathogenesis to gastroscopic examination ($P < 0.05$), but not associated with *H pylori* infection and patients' age. Eight of 78 cases were treated with endoscopic hemostasis and hemorrhage did not relapse; among the 70 cases with medical treatment, only 1 case was found with recurrence of bleeding, but after treatment with endoscopic hemostasis, the bleeding was stopped.

CONCLUSION: Both conservative and endo-

scopic treatment have favorable efficacy in stopping the bleeding of MWS, and the latter can be performed when the former was of no effect.

Key Words: Mallory-Weiss syndrome; Gastroscopy; Treatment

Yuan EY, Zhang J, Lv ZS. Mallory-Weiss syndrome: a clinical analysis of 78 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3796-3800

摘要

目的: 探讨食管-贲门黏膜撕裂综合征(Mallory-Weiss syndrome, MWS)的临床特点、内镜下表现和治疗。

方法: 对2003-03/2008-04收治的78例MWS患者的临床资料进行回顾性分析。

结果: MWS占上消化道出血的6.13%,饮酒后呕吐是其主要发病原因。内镜下均为线状纵行撕裂,以贲门撕裂多见,裂伤表面状态与发病至行胃镜检查的时间有关($P < 0.05$),与 *H pylori*感染和患者年龄无关。78例MWS患者8例给予内镜下止血治疗后均无再出血,70例给予保守治疗,仅1例复发出血,给予内镜下止血治疗后出血停止。

结论: MWS保守治疗和内镜下止血治疗均取得较好疗效,对保守治疗无效者可考虑内镜下止血治疗。

关键词: 食管-贲门黏膜撕裂综合征; 胃镜; 治疗

袁二燕, 张洁, 吕宗舜. 食管-贲门黏膜撕裂综合征临床分析78例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(33): 3796-3800
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3796.asp>

0 引言

食管-贲门黏膜撕裂综合征(mallory-weiss syndrome, MWS)是上消化道出血的原因之一。MWS由于发生率低,出血量少,很少引起消化系大出血,而且大部分为自限性等原因,常常被临床医生忽视,误诊率较高。近几年由于胃镜检查

■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

的普及以及急诊内镜的开展, 该病占上消化道出血的比例有逐年上升趋势, 且随着MWS在意外死亡中所占比例的升高^[1], 临床上应提高对该病的认识. 我院2003-03/2008-04共收治MWS患者78例, 现将临床资料报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003-03/2008-04收治的MWS患者78例, 占同期1273例上消化道出血原因的6.13%, 占同期6 644例胃镜检查者的0.12%, 年龄24-93(平均53.38±18.86)岁, 其中男57例, 女21例.

1.2 方法 观察78例MWS患者的临床表现; 在内镜下观察MWS表面的情况及分级. 裂伤表面状态按参考文献[2]的方法分四级: I级: 喷射性出血; II级: 渗出性出血; III级: 突出的可见血管; IV级: 血凝块附着与瘢痕. 对不同年龄、发病至行内镜检查的不同时间、*H pylori*感染情况与裂伤表面状态进行分析.

MWS有内科保守治疗和内镜治疗, 主要是前者, 其包括禁食、输液或输血、应用H₂受体阻滞剂或质子泵抑制剂(PPI)等, 8例内镜下表现为喷射性出血的患者给予内镜局部止血治疗, 内镜下止血治疗包括局部喷洒去甲肾上腺素、局部注射10 g/L肾上腺素或330 mg/L乙氧硬化醇. 经内镜下止血治疗的患者均无再出血, 保守治疗也取得较满意的疗效, 仅1例保守治疗无效, 后给予局部注射10 g/L肾上腺素和330 mg/L乙氧硬化醇硬化止血治疗后无再发出血.

统计学处理 两组有序变量资料采用Wilcoxon秩和检验, 多组有序变量资料用Wruskal-Wallis秩和检验, $P<0.05$ 为差别有统计学意义.

2 结果

2.1 患者发病年龄及性别 20-39岁22例占28.21%, 40-59岁25例占32.05%, 60-79岁24例占30.77%, 80-100岁7例占8.97%. 各个年龄段男性均多于女性(表1).

2.2 临床表现及其呕吐诱因 78例MWS患者中, 呕血33例, 黑便3例, 呕血+黑便24例, 呕吐未呕血者9例, 上腹不适3例, 暖气, 进食后堵闷感2例, 腹痛2例, 胸痛1例, 腹泻1例. 有66例患者出现呕吐, 呕吐诱因见表2. 呕血量为20-800 mL. 其中20例患者行*H pylori*检查, *H pylori*阳性13例, *H pylori*阴性7例.

2.3 内镜下表现

2.3.1 按撕裂部位分: MWS在食管、食管-贲门

表1 MWS患者发病年龄及性别 (n)

年龄	男	女	总例数	发病率(%)
20-	18	4	22	28.21
40-	19	6	25	32.05
60-	14	10	24	30.77
80-100	6	1	7	8.97

表2 66例MWS的呕吐诱因 (n)

诱因	n	发生率(%)
饮酒	27	40.90
急性胃肠炎	5	7.58
十二指肠溃疡	4	6.06
肝硬化(食管胃底静脉曲张)	3	4.55
食管裂孔疝	3	4.55
急性胰腺炎	2	3.03
食管溃疡	2	3.03
胃腺癌	2	3.03
幽门管溃疡	1	1.52
胃溃疡	1	1.52
胃息肉	1	1.52
胃镜检查	1	1.52
应用非甾体药物	1	1.52
服用激素	1	1.52
无明显诱因者	12	18.18

和贲门的发病情况见表3. 裂伤按照四壁定位法: 左侧壁31处为31/78(30.10%), 右侧壁24处为24/78(23.30%), 后壁38处为38/78(36.89%), 前壁10处为10/78(9.71%).

2.3.2 按撕裂的个数分: 内镜下观察MWS的撕裂数目见表3, 共103处裂伤. 撕裂长度在0.2-3 cm之间, 均为线状纵行裂伤.

内镜下观察到的MWS的裂伤表面状态受发病至行胃镜检查时间的影响($H = 6.06$, $P<0.05$), 行胃镜检查时间越早, MWS的检出率越高. MWS不受*H pylori*感染和患者发病年龄的影响. 裂伤表面状态与发病至行胃镜检查的时间、*H pylori*感染和年龄与之间的关系分别见表4. 内科保守治疗和内镜下止血这两种方法治疗MWS再出血情况见表5, 对出血复发的患者给予局部注射10 g/L肾上腺素和330 mg/L乙氧硬化醇后出血停止, 无再出血.

3 讨论

Mallroy-Weiss于1929年首先提出MWS, 是指因剧烈干呕或呕吐等, 腹内压力或胃内压力突然

■研究前沿

目前对MWS研究的热点在于其诊断和治疗. 胃镜为其确诊的可靠手段, 急诊胃镜的实施可以提高MWS的检出率; 对于MWS的内镜下治疗以及不同内镜下治疗方法的疗效比较是目前研究的重点. 内镜下治疗是否优于内科保守治疗、内镜下治疗哪种方法安全有效是有待进一步研究的内容.

■相关报道

Park *et al*认为内镜下套扎治疗与肾上腺素注射治疗在疗效和安全性方面无明显差别; Huang *et al*指出MWS活动性出血给予内镜下止血夹止血与注射肾上腺素两者疗效和安全性无差别。

表 3 内镜下MWS的发病部位和撕裂数目

项目		<i>n</i>	百分比(%)
部位	食管	5	6.41
	食管-贲门	16	20.51
	贲门	57	73.08
撕裂个数	1	59	75.64
	2	15	19.23
	3	2	2.56
	4	2	2.65

增大,导致食管与胃贲门连接处的黏膜和黏膜下层呈纵行撕裂,从而引起上消化道出血为特征的病变。频繁剧烈呕吐、呕血和(或)黑便并内镜下黏膜纵行撕裂是其诊断要点。MWS占上消化道出血原因的5%-15%^[3],本组占6.13%。由于胃镜检查的普及和人们生活方式的改变等原因,MWS发病率逐年增高。

该病男性较女性多见,好发年龄在40-60岁,本组该年龄段占32.05%,高于其他年龄段。引起腹内压或胃内压升高最常见的原因因为剧烈的呕吐,本组有66例(84.62%)以呕吐为首发症状。呕吐时胃内压剧烈升高,因贲门附近黏膜在组织结构上较薄弱,黏膜肌层伸展性较差,周围缺乏支持组织,这种骤然升高的压力差,极易造成黏膜撕裂。饮酒是MWS呕吐的主要原因,在我们的研究中饮酒占40.9%,其他原因包括胃肠炎、胃十二指肠溃疡、食管裂孔疝、胃腺癌、急性胰腺炎等,其中食管裂孔疝3例,占MWS的4.55%。Morales *et al*^[4]认为食管裂孔疝与MWS发生部位密切相关,因在我们的研究中MWS合并食管裂孔疝较少,因此食管裂孔疝与MWS发生部位之间的关系有待进一步研究。值得注意的是,本研究中有两例胃癌呕血导致的贲门撕裂,1例为73岁老年男性,胃绒毛状腺瘤,局部癌变;1例为84岁老年女性,胃腺癌。因此,对于贲门撕裂的老年患者,胃镜诊治的同时,对胃内可疑病变取活组织检查送病理是必要的。Sciumè *et al*^[5]认为由内镜导致的MWS发生率很低(0.0001%-0.04%),多为自限性,并且报道1例ERCP后出现MWS活动性出血,硬化治疗无效后给予止血夹治疗从而有效止血。我们所研究的78例患者中有1例为胃镜检查引起患者呕吐导致的MWS,给予保守治疗后止血,故医生在进行胃镜检查时尽量消除患者紧张情绪,使其配合检查,同时医师操作应轻柔熟练。此外,

MWS还发生于经食管的超声心动显像术中^[6]、患有硬皮病的孕妇^[7]和小麦引起的过敏反应导致呕吐的患者^[8]。

本研究中MWS多发生于贲门部(73.08%),1处裂伤常见(75.64%),多见于后壁,均为纵行撕裂。对内镜下裂伤表面状态与发病至行胃镜检查时间、*H pylori*感染情况和年龄之间的关系进行分析,结果发病至行胃镜检查的时间影响了我们所观察到的裂伤表面状态($P<0.05$),随着时间的延长,裂伤逐渐趋于愈合,因此胃镜宜在MWS发病48 h内进行,24 h内检出率更高。胃镜检查可直视病变部位和形态,而且对可疑病变还可以取活组织送病理,对出血可行内镜下止血治疗,因此胃镜对MWS诊治价值高,对怀疑MWS的上消化道出血患者应尽早行胃镜检查。本研究中有所有发病24 h内进行胃镜检查和内镜下止血治疗的患者,无1例出现大出血、窒息、休克甚至死亡,说明胃镜不仅是确诊MWS的重要手段,同时胃镜下止血还是治疗MWS安全、有效的治疗方法。MWS患者的裂伤表面状态在*H pylori*阳性和*H pylori*阴性的患者间无差别,说明*H pylori*感染与否并不影响MWS的裂伤程度。同时我们还认为不同年龄段患者的裂伤表面状态亦无差异,MWS的裂伤程度不因年龄的增加而加重。Kryshen *et al*^[9]研究认为胃黏膜微生物的多态现象加重MWS的病程,并导致MWS再出血,由于本研究中进行*H pylori*检测的病例数较少(20例),对于*H pylori*与裂伤表面状态和MWS再出血之间的关系有待进一步研究。

因MWS出血有一定的自限性,大多数内科保守治疗有效,对于保守治疗无效、凝血功能障碍或严重活动性出血者,可采用内镜下治疗:包括局部喷洒止血药物、注射肾上腺素和乙氧硬化醇、应用止血夹和内镜下套扎、微波和电凝等治疗。乙氧硬化醇作用机制为引起血管周围局部水肿,血管收缩、血栓形成和局部纤维化而起止血作用,另外还有局部冷却麻醉作用。内镜下钛夹止血是一种机械止血法,是利用钛夹闭合产生的机械力,将出血血管与周围组织一并压紧,从而阻断血流,达到止血目的,其止血机制同外科血管缝合或结扎。金属止血夹止血主要适用于血管直径2-3 mm的病灶出血,经内镜金属夹止血对非静脉性活动性出血可立即止血、对可见血管残端可预防

表 4 裂伤表面状态与发病至行胃镜检查的时间、*H pylori*感染及发病年龄的关系

分级	内镜检查时间(h)			<i>H pylori</i> 感染(n)		年龄(岁)			
	0-	24-	48-72	+	-	20-	40-	60-	80-100
I级	7	1	0	0	1	3	1	1	3
II级	10	5	2	3	0	6	8	3	0
III级	1	2	1	1	1	0	1	3	0
IV级	19	19	11	9	5	13	14	16	6

^a*P*<0.05

表 5 内科保守治疗和内镜下治疗再出血发生情况 (n)

治疗	再出血		合计
	无	有	
内科保守	69	1	70
内镜下	8	0	8
合计	77	1	78

再出血^[10], 研究显示应用钛夹治疗MWS止血率高、再出血率低且并发症少^[11], 对于喷血或渗血的患者给与止血夹夹闭治疗安全有效, 且止血夹不影响伤口愈合^[5]. 对于内镜下套扎治疗, Higuchi *et al*^[12]认为是安全、有效且简便易学的治疗MWS所致的上消化道出血技术, 而Park *et al*^[13]认为内镜下套扎治疗与10 g/L的肾上腺素注射治疗在疗效和安全性方面无明显差别, Cho *et al*^[14]认为内镜下套扎和止血夹止血在控制MWS活动性出血方面的疗效相同. 本研究中, 大部分MWS患者接受内科保守治疗, 止血效果较好, 70例中仅1例保守治疗无效, 后给予局部注射10 g/L肾上腺素和330 mg/L的乙氧硬化醇后出血停止; 8例喷射性出血患者行内镜下局部喷洒去甲肾上腺素、注射10 g/L肾上腺素或330 mg/L乙氧硬化醇治疗后均无再出血. 有研究显示内镜治疗较保守治疗24 h再出血发生率低、输血量少、住院时间缩短^[15]. 本研究中, 内镜下治疗MWS较少, 内镜治疗是否优于保守治疗仍需进一步研究. Pantsyrev *et al*^[16]认为内镜下治疗可以使MWS的手术率降低至0.4%. 内镜治疗后继续出血或再发大出血者, 可选择外科手术, 对不适合手术者可考虑行腹腔动脉灌注血管加压素或行胃左动脉栓塞术.

门脉高压和凝血障碍性疾病一直被认为是MWS再出血的主要危险因素, 但是Kim *et al*^[17]研究认为发病时出现休克、内镜下有活动性出

血的表现是预测MWS再出血的独立性因素. 对于影响MWS再出血的因素有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Türk EE, Anders S, Tsokos M. [Mallory-Weiss syndrome as the cause of sudden, unexpected death] *Arch Kriminol* 2002; 209: 36-44
- 2 Chung IK, Kim EJ, Hwang KY, Kim IH, Kim HS, Park SH, Lee MH, Kim SJ. Evaluation of endoscopic hemostasis in upper gastrointestinal bleeding related to Mallory-Weiss syndrome. *Endoscopy* 2002; 34: 474-479
- 3 Katz PO, Salas L. Less frequent causes of upper gastrointestinal bleeding. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 875-889
- 4 Morales P, Baum AE. Therapeutic Alternatives for the Mallory-Weiss Tear. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2003; 6: 75-83
- 5 Sciumè C, Geraci G, Pisello F, Li Volsi F, Facella T, Frazzetta M, Raimondo D, Passariello P, Modica G. [A rare complication of ERCP: Mallory-Weiss syndrome] *Ann Ital Chir* 2005; 76: 199-202
- 6 Fujii H, Suehiro S, Shibata T, Aoyama T, Ikuta T. Mallory - weiss tear complicating intraoperative transesophageal echocardiography. *Circ J* 2003; 67: 357-358
- 7 Cho KH, Heo SW, Chung SH, Kim CG, Kim HG, Choe JY. A case of Mallory-Weiss syndrome complicating pregnancy in a patient with scleroderma. *Korean J Intern Med* 2003; 18: 238-240
- 8 Takahama H, Tsutsumi Y, Fuke Y, Hayashida H, Watanabe M. Mallory-Weiss syndrome secondary to vomiting caused by wheat-induced anaphylaxis. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 682-683
- 9 Kryshen' VP, Trofimov MV, Novikova TV, Novikov OI. [Clinical, morphological, and microbiological characteristics of the Mallory-Weiss syndrome] *Klin Khir* 2007; 25-29
- 10 李辉, 钱俊波. 经胃镜止血钛夹治疗上消化道出血. *中国综合临床* 2007; 23: 510
- 11 柴玉萍. 胃镜下钛夹夹闭止血治疗贲门黏膜撕裂症28例疗效观察. *山东医药* 2007; 47: 102-103
- 12 Higuchi N, Akahoshi K, Sumida Y, Kubokawa M, Motomura Y, Kimura M, Matsumoto M, Nakamura K, Nawata H. Endoscopic band ligation therapy for upper gastrointestinal bleeding related to Mallory-Weiss syndrome. *Surg Endosc* 2006; 20: 1431-1434
- 13 Park CH, Min SW, Sohn YH, Lee WS, Joo YE, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Kim SJ. A prospective, randomized trial of endoscopic band ligation vs. epinephrine injection for actively bleeding Mallory-

■创新盘点

本文对MWS内镜下表面状态与发病至行胃镜检查的时间、*H pylori*感染情况和发病年龄之间的关系首次做总结, 并且得出内镜下表面状态与发病至行胃镜检查的时间有关, 不受*H pylori*感染和患者年龄的影响. 老年人MWS应警惕胃癌的可能性.

■同行评价

本文回顾性分析78例食管贲门黏膜撕裂综合征患者的临床资料,对临床工作有一定的参考价值,但内容缺乏新颖性,学术价值一般。

- 14 Weiss syndrome. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 22-27
Cho YS, Chae HS, Kim HK, Kim JS, Kim BW, Kim SS, Han SW, Choi KY. Endoscopic band ligation and endoscopic hemoclip placement for patients with Mallory-Weiss syndrome and active bleeding. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2080-2084
- 15 洪万东, 朱启槐, 陈向荣, 黄庆科, 陈民新. 食管贲门黏膜撕裂综合征的临床分析. *中国医师进修杂志* 2007; 30: 66-67
- 16 Pantsyrev IuM, Fedorov ED, Timofeev ME, Mikhalev AI. [Endoscopic treatment of bleeding due to Mallory-Weiss syndrome] *Khirurgiia (Mosk)* 2003: 35-40
- 17 Kim JW, Kim HS, Byun JW, Won CS, Jee MG, Park YS, Baik SK, Kwon SO, Lee DK. Predictive factors of recurrent bleeding in Mallory-Weiss syndrome. *Korean J Gastroenterol* 2005; 46: 447-454

编辑 史景红 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

Runx3与Ki67分子在慢性胃炎胃黏膜肠化生及胃癌组织中的表达及相互关系

彭真, 赵治国, 刘占举, 索明果, 唐芙爱

彭真, 赵治国, 刘占举, 索明果, 唐芙爱, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014

作者贡献分布: 赵治国与彭真对此文所作贡献两均等; 此课题由赵治国, 彭真及索明果设计; 研究过程由彭真与索明果操作完成; 研究所用分析工具由唐芙爱提供; 数据分析由彭真与刘占举完成; 本论文写作由彭真与刘占举完成。

通讯作者: 赵治国, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化科. zzghappy@eyou.com

电话: 0371-65261229

收稿日期: 2008-08-25 修回日期: 2008-10-28

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-11-28

Expression of Runx3 and Ki67 in chronic gastritis with intestinal metaplasia and gastric carcinoma and their correlations

Zhen Peng, Zhi-Guo Zhao, Zhan-Ju Liu, Ming-Guo Suo, Fu-Ai Tang

Zhen Peng, Zhi-Guo Zhao, Zhan-Ju Liu, Ming-Guo Suo, Fu-Ai Tang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Correspondence to: Zhi-Guo Zhao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. zzghappy@eyou.com

Received: 2008-08-25 Revised: 2008-10-28

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To examine the expression and roles of Runx3 and Ki67 in the process of the intestinal metaplasia as well as their roles in gastric carcinogenesis.

METHODS: Immunohistochemical staining was used to examine the expression and correlation of Runx3 and Ki67 in 92 cases of gastric specimens, including 15 cases of normal gastric mucosa, 30 cases of intestinal metaplasia and 47 cases of gastric cancer. The relationship between their expressions and histological types or biological behavior was analyzed.

RESULTS: Runx3 was expressed in all normal gastric mucosa. Compared with normal gas-

tric mucosa a significantly lower expression was found in chronic gastritis with intestinal metaplasia and in gastric cancer (26.7%, 10.6% vs 100%, both $P < 0.01$). The expression rate of Ki67 was higher in gastric cancer than in chronic gastritis with intestinal metaplasia (40%, 74.5% vs 2%, both $P < 0.01$). In gastric carcinoma, the expression of Runx3 was related to differential degree of tumor, serosal infiltration and metastasis to lymph nodes ($\chi^2 = 7.729, 7.661, 4.656, P = 0.021, 0.006, 0.031$). The expression of Ki67 was related to differential degree of tumor, serosal infiltration and histological types ($\chi^2 = 6.758, 4.019, 9.740, P = 0.034, 0.045, 0.002$). There was a negative correlation between the Runx3 expression and Ki67 expression in chronic gastritis with intestinal metaplasia or in gastric cancer ($r = -0.453, P < 0.01$).

CONCLUSION: Runx3 and Ki67 might be utilized jointly to screen for high-risk population and early diagnosis of gastric cancer.

Key Words: Runx3; Ki67; Intestinal metaplasia; Gastric cancer; Immunohistochemical staining

Peng Z, Zhao ZG, Liu ZJ, Suo MG, Tang FA. Expression of Runx3 and Ki67 in chronic gastritis with intestinal metaplasia and gastric carcinoma and their correlations. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3801-3804

摘要

目的: 探讨人类runt相关转录因子3(Runx3)和Ki67分子在慢性胃炎胃黏膜肠化生和胃癌发生、发展中的作用及二者的相互关系, 分析两者在胃黏膜肠化生和癌变过程中的作用。

方法: 采用免疫组化SP法对92例正常胃黏膜、胃黏膜肠化生及胃癌标本进行Runx3和Ki67染色。分析Runx3和Ki67在慢性胃炎胃黏膜肠化生和胃癌中的表达, 以及与胃癌组织学类型和生物学行为关系, 并分析Runx3和Ki67表达的相互关系。

结果: Runx3在胃黏膜肠化生和胃癌组织的

■背景资料

Runx3是迄今为止约10余种胃癌相关基因中与胃癌关系最密切的抑癌基因。可能是胃癌发生发展中的关键性基因。目前研究表明Runx3作用机制与TGF- β 信号转导通路和细胞凋亡密切相关; Ki67与细胞分裂有关, 是目前应用最广泛的增殖细胞标记之一, 检测两者在胃癌发生发展中的作用有助于癌及其癌前病变的早期发现, 对指导临床治疗有一定意义。

■同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科

■研发前沿

有关Runx3基因表达调节的作用机制是否与其他癌基因和(或)抑癌基因存在相关作用尚不十分清楚。Ki67被认为是能较可靠地全面地反映细胞群体增殖活性的客观指标,但国内外研究Ki67与胃癌发生、发展的报道少见。

表达明显低于正常胃黏膜(26.7%, 10.6% vs 100%, 均 $P<0.01$)。而Ki67分子在胃黏膜肠化生与胃癌中的表达率明显高于正常胃黏膜(40%, 74.5% vs 2%, 均 $P<0.01$)。Runx3的表达与胃癌的分化程度、浆膜浸润、淋巴结转移有关($\chi^2=7.729, 7.661, 4.656, P=0.021, 0.006, 0.031$), Ki67的表达与分化程度、浆膜浸润、胃癌组织学类型有关($\chi^2=6.758, 4.019, 9.740, P=0.034, 0.045, 0.002$)。Runx3和Ki67在胃黏膜肠化生和胃癌中表达呈显著负相关($r=-0.453, P<0.01$)。

结论: 检测Runx3和Ki67表达可能有助于胃癌高危人群,尤其是慢性胃炎患者伴有肠化生-胃癌演变过程的人群的筛查、早期诊断。

关键词: Runx3; Ki67; 胃黏膜肠化生; 胃癌; 免疫组织化学染色

彭真, 赵治国, 刘占举, 索明果, 唐关爱. Runx3与Ki67分子在慢性胃炎胃黏膜肠化生及胃癌组织中的表达及相互关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3801-3804
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3801.asp>

0 引言

研究发现, Runx3是与胃癌关系较为密切的抑癌基因,在调控细胞生长发育和凋亡过程中发挥重要的转录作用。而Ki67是公认的全面反映细胞群体增殖活性的可靠且客观的指标,其表达与细胞周期密切相连^[1],本课题采用免疫组织化学SP法联合检测Runx3及Ki67在正常胃黏膜、胃黏膜肠化生和胃癌组织中的表达及其相互关系,旨在探讨他们在肿瘤发生发展中的机制和协同作用以及与胃癌临床病理特征的内在联系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集郑州大学第二附属医院病理科2005-01/2007-08存档石蜡标本92例,包括胃镜下正常胃黏膜石蜡标本15例;病理证实肠化生性胃炎肠化胃黏膜石蜡标本30例;同期手术切除胃癌组织石蜡标本47例(按分化程度:高分化6例,中分化15例,低分化26例),要求有详细临床资料,患者术前均未行放疗及化疗,标本经病理证实,胃癌组织学分型采用Lauren分型,包括肠型胃癌21例和弥漫型胃癌26例。兔抗人Runx3单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,兔抗人Ki-67多克隆抗体,SP免疫组化试剂盒购自中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法 采用免疫组化SP法进行Runx3和Ki-67

表 1 Runx3和Ki67与组织学分级的关系 (n)

分组	n	Runx3		Ki67	
		+	-	+	-
正常	15	15	0	3	12
胃黏膜肠化生	30	8	22	12	18
高分化胃癌	6	2	4	2	4
中分化胃癌	15	3	12	11	4
低分化胃癌	26	0	26	22	4

染色。实验步骤严格按试剂盒说明书操作。石蜡切片脱蜡,以微波枸橼酸盐进行抗原修复, DAB显色,苏木精复染,脱水,透明封片,显微镜下观察,用已知标准的Runx3和Ki67表达阳性的胃癌组织切片作为阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替I抗,作为阴性对照。阳性结果判定: Runx3阳性结果为细胞膜和(或)细胞质为棕褐色, Ki-67阳性结果为细胞核为棕褐色,每张切片均由两位有经验的病理医师在400倍显微镜下观察5个视野,每个视野200个细胞,然后计算阳性细胞百分率。判定标准: 阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为阴性(-), 阳性细胞数 $>5\%$ 为阳性(+).

统计学处理 统计学应用SPSS11.0软件包进行统计学处理,根据实验资料要求,选用 χ^2 检验进行数据分析,以 $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 Runx3和Ki67在慢性胃炎胃黏膜肠化生和胃癌中表达 Runx3表达在正常胃黏膜(100%)、胃黏膜肠化生(26.7%)和胃癌(10.6%)中的表达差异有统计学意义($P<0.01$)。Ki67的表达在正常胃黏膜(2%)、胃黏膜肠化生(40%)、胃癌(74.5%)中呈递升趋势,并在低分化胃癌组织中呈表达高峰(表1)。

2.2 Runx3和Ki67与胃癌组织学类型和生物学行为关系 胃癌组织学类型采用Lauren分型。结果表明, Runx3与组织学分型无关, Ki67在弥漫型中的表达高于肠型($P<0.05$);肿瘤生物学行为按有无浆膜浸润和淋巴结转移各分两组, Runx3在有浆膜浸润组和淋巴结转移组的表达低于无浆膜浸润组和无淋巴结转移组($P<0.05$), Ki67在有浆膜浸润组的表达高于无浆膜浸润组($P<0.05$), Ki67表达与有无淋巴结转移无关(表2)。

2.3 Runx3和Ki67表达相互关系 77例慢性胃炎胃黏膜肠化生和胃癌组织, 13例Runx3表达阳性, 47例Ki67表达阳性; 64例Runx3表达阴性, 30例Ki67表达阴性; 统计学分析两者呈负相关($r=-0.453, P<0.01$)。

■相关报道

郭长青 *et al* 研究发现, Ki67核抗原的表达与胃癌的侵袭、低分化、淋巴结转移显著相关。田丽峰 *et al* 研究表明Ki67表达与胃不典型增生程度、分化程度、组织学类型有关,与EGFR有协同作用。徐佳 *et al* 研究发现Ki67指数和浸润深度、淋巴结转移有关。陈玉芳 *et al* 研究提示胃癌恶性度低, Ki67指数低,反之则高。

表 2 Runx3和Ki67与临床病理参数关系

	<i>n</i>	Runx3				Ki67			
		+	-	χ^2	<i>P</i>	+	-	χ^2	<i>P</i>
Lauren分型									
弥漫型	26	2	24	0.531	0.466	24	2	9.740	0.002
肠型	21	3	18			11	10		
浸润浆膜									
有	34	1	33	7.661	0.006	28	6	4.019	0.045
无	13	4	9			7	6		
淋巴结转移									
有	30	1	29	4.656	0.031	22	8	0.056	0.813
无	17	4	13			13	4		

■应用要点

检测Runx3和Ki67表达可能有助于胃癌高危人群,尤其是慢性胃炎患者伴有肠化生-胃癌演变过程的人群的筛查、早期诊断。

3 讨论

动物研究发现Runx3选择性地表达在凋亡明显的胃黏膜上皮细胞,而在增生活跃的干细胞带未发现Runx3表达,提示Runx3可能是与TGF- β 介导的细胞生长和凋亡调控有关的重要抑癌基因^[2-3]。TGF- β 是许多细胞的有效抑制因子(如上皮细胞、内皮细胞、淋巴细胞等),TGF- β 信号紊乱将导致多种肿瘤的发生^[4]。在TGF- β 信号传导过程中,被激活的Smad复合物需在Runx蛋白(包括Runx3)指导下才能从胞质内转入核内特定的靶位点,并加强Smad蛋白与靶位点的结合强度,Smad蛋白与Runx3转录因子相互作用共同调控靶基因的转录,因此Runx3蛋白在TGF- β /Runx3/Smad信号传导通路中起着非常重要的作用,Runx3功能的改变可以影响TGF- β 信号的活动,进而在胃癌的发生过程中起着重要的作用^[5]。宋军民 *et al*^[6]应用Western blot法检测了26例胃癌及相应的癌旁正常组织的Runx3蛋白表达,结果表明胃癌组Runx3蛋白表达明显低于癌旁组,而且Runx3蛋白的表达与肿瘤的分化程度有关。Runx3失活不表达蛋白时,TGF- β 凋亡传导通路受到影响,胃黏膜凋亡抑制,胃黏膜无限制的增生,发生胃癌。Runx3除对胃黏膜上皮的异常增生有影响外,还与其肠化生有关。曾有报道指出,在人体胃组织中,Runx3^{+/+}能诱导胃黏膜上皮肠化生^[7]。但近期又发现Runx3^{-/-}的胃黏膜上皮细胞可分化成肠型胃黏膜(肠化生)。Runx3^{-/-}还诱导能促进胃黏膜肠化生的Cdx2表达,但在正常胃黏膜中Cdx2的表达可被Runx3所抑制^[8]。本研究结果表明,Runx3在正常胃黏膜中表达为阳性;在胃黏膜肠化生、胃癌组织中表达明显低于正常胃黏膜($P<0.01$);Runx3与胃癌的分化程度、浆膜浸润、淋巴结

转移密切相关;Runx3基因缺失可能是胃癌发生发展的重要机制之一,Runx3有望成为一个胃癌发生的生物学标记和肿瘤基因治疗的靶点,为胃癌的诊断和治疗提供新的途径。

Ki67是一种核增殖抗原^[9],存在于细胞周期的G₁、S、G₂、M期,G₁后期开始出现,在S期和G₂期逐渐升高,M期达到高峰。有丝分裂结束后迅速降解或失去其抗原决定簇。Ki67表达的高低反映了细胞增殖状态,是目前应用最广泛的增殖细胞标记之一^[10]。研究发现,Ki67有可能作为确定癌前人群高危个体的生物标志物^[11]。Ki67与胃癌关系的研究报道较多,但结论并不完全一致^[12-13]。Czyzewska *et al*^[12]研究证实Ki67表达与肿瘤的分化程度、Lauren分型、淋巴结转移等明显相关,与年龄、肿瘤部位无关;Oshima *et al*^[13]的研究表明Ki67表达与年龄、性别、分期和预后等均无明显相关。本研究结果表明,Ki67表达与胃癌的分化程度、浆膜浸润和Lauren分型有关,检测Ki67的表达水平,有助于胃癌恶性程度的判断,对指导临床治疗有一定意义。

胃癌的发生是一个多因素、多步骤、多基因参与的过程^[14-16],胃癌中主要是腺癌,研究表明腺癌的发生是由正常黏膜-慢性炎症-萎缩-肠化生-异型增生-癌变多步骤、逐渐进展的过程,众多基因及分子改变的累积与这一演变过程密切相关^[17]。在胃癌发生的多因素形成方面,肠化生是一个非常重要的癌前病变,虽然肠化生并不是伴癌状态,但因能提高胃液pH,利于细菌生长而易致癌。因此,研究这一演变过程不同阶段中众多基因表达谱的差异,有助于揭示胃癌的发生机制。本研究认为胃癌中Runx3的低表达和Ki67的表达密切相关相一致,提示推测异常增

■同行评价

本研究设计合理,方法正确,结论可信,具有较好的可读性和科学性。

殖的细胞中可能有Runx3抑癌基因的功能缺失, Ki67基因的表达活跃, 两方面对细胞恶变均有促进作用. Runx3基因功能异常后, 其调节TGF- β 凋亡传导通路的作用受影响, 从而增强胃癌细胞的增殖活性, 进而使Ki67抗原表达明显增加. 因此, 免疫组化法检测胃组织中Runx3与Ki67蛋白的异常表达, 有助于癌及其癌前病变的早期发现, 并为开发新的抗癌药物和寻找新的基因治疗的靶基因提供线索和思路. 有关二者的分子和生物学机制, 还有待进一步研究和证实.

4 参考文献

- 1 Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, Singson R, Melmed S. Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nat Med* 1999; 5: 1317-1321
- 2 Fukamachi H, Ito K. Growth regulation of gastric epithelial cells by Runx3. *Oncogene* 2004; 23: 4330-4335
- 3 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 4 Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003; 94: 230-234
- 5 Otto F, Lübbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* 2003; 89: 9-18
- 6 宋军民, 刘晓梅, 李岩, 韩成波. 人胃癌Runx3基因CpG岛甲基化的关键位点和演进. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 212-216
- 7 Yamamoto M, Tsukamoto T, Sakai H, Shirai N, Ohgaki H, Furihata C, Donehower LA, Yoshida K, Tatematsu M. p53 knockout mice (-/-) are more susceptible than (+/-) or (+/+) mice to N-methyl-N-nitrosourea stomach carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1891-1897
- 8 Fukamachi H, Ito K, Ito Y. Runx3^{-/-} gastric epithelial cells differentiate into intestinal type cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 58-64
- 9 Yu R, Heaney AP, Lu W, Chen J, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 36502-36505
- 10 靳玉兰, 张伟, 刘伯齐, 王洪平, 韩志楷, 韩双延, 曲平, 李莱, 丁镇伟, 林培中. 食管癌前病变及原位癌组织中Ki67、p53、iNOS的异常表达. *中华肿瘤杂志* 2001; 23: 129-131
- 11 江学良, 傅丽娜. Ki67在大肠肿瘤研究中的应用. *复旦学报(医学科学版)* 2001; 28: 372-374
- 12 Czyzewska J, Guzińska-Ustymowicz K, Lebelt A, Zalewski B, Kemon A. Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers. *Rocz Akad Med Białymst* 2004; 49 Suppl 1: 64-66
- 13 Oshima CT, Iriya K, Forones NM. Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. *Neoplasia* 2005; 52: 420-424
- 14 Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000; 35 Suppl 12: 111-115
- 15 Hara T, Ooi A, Kobayashi M, Mai M, Yanagihara K, Nakanishi I. Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in gastric cancers: detection by fluorescence in situ hybridization. *Lab Invest* 1998; 78: 1143-1153
- 16 Yu J, Miehle S, Ebert MP, Hoffmann J, Breidert M, Alpen B, Starzynska T, Stolte Prof M, Malfertheiner P, Bayerdörffer E. Frequency of TPR-MET rearrangement in patients with gastric carcinoma and in first-degree relatives. *Cancer* 2000; 88: 1801-1806
- 17 Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004; 327-349

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

氩离子凝固术在放大色素内镜下治疗胃黏膜癌前病变90例

袁海锋, 唐少波, 奚锦要

袁海锋, 唐少波, 奚锦要, 广西中医学院附属瑞康医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530011

通讯作者: 袁海锋, 530011, 广西壮族自治区南宁市华东路10号, 广西中医学院附属瑞康医院消化内科. yhf2000055@sohu.com
电话: 0771-2188105

收稿日期: 2008-08-02 修回日期: 2008-09-22

接受日期: 2008-10-07 在线出版日期: 2008-11-28

Argon plasma coagulation under magnifying chromoendoscopy for gastric premalignant lesions: an analysis of 90 cases

Hai-Feng Yuan, Shao-Bo Tang, Jin-Yao Xi

Hai-Feng Yuan, Shao-Bo Tang, Jin-Yao Xi, Department of Gastroenterology, the Affiliated Ruikang Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical College, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Correspondence to: Hai-Feng Yuan, Department of Gastroenterology, the Affiliated Ruikang Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medical College, 10 Huadong Road, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yhf2000055@sohu.com

Received: 2008-08-02 Revised: 2008-09-22

Accepted: 2008-10-07 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To investigate the effects and clinical value of argon plasma coagulation (APC) on gastric premalignant lesions under magnifying chromoendoscopy (MCE).

METHODS: A total of 90 cases with gastric premalignant lesions underwent argon plasma coagulation under magnifying chromoendoscopy using Fujinon EG-590ZW magnifying endoscope in combination with methylene blue staining. The changes of microstructures after treatment were studied and compared with histopathology.

RESULTS: Six months after argon plasma coagulation treatment, microstructures of gastric mucosa in 90 cases with intestinal metaplasia and dysplasia were regenerated from type E, F to type C or D (86.7%, 6.7%), and the abnormal hyperplasia blood capillary disappeared. Histopathological tissues changed into active inflam-

mation (85.6%) or atrophic inflammation (8.9%). The ablation rates of microstructures (type E and F) and histopathology (intestinal metaplasia and dysplasia) were 93.0% and 94.4%, respectively.

CONCLUSION: Argon plasma coagulation is a safe and effective method in the treatment of gastric premalignant lesions.

Key Words: Magnifying chromoendoscopy; Argon plasma coagulation; Gastric premalignant lesions

Yuan HF, Tang SB, Xi JY. Argon plasma coagulation under magnifying chromoendoscopy for gastric premalignant lesions: an analysis of 90 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3805-3809

摘要

目的: 探讨放大色素内镜下氩离子凝固术对胃黏膜癌前病变的治疗效果及其临床应用价值。

方法: 应用Fujinon EG-590ZW型电子放大内镜, 结合美蓝染色, 对90例胃黏膜癌前病变患者进行氩离子凝固术治疗, 观察治疗前后病灶细微结构形态学改变, 并结合其病理组织学改变进行比较分析。

结果: 90例伴随肠上皮化生及异型增生的胃黏膜在进行氩离子凝固术治疗后6 mo, 胃小凹形态由治疗前的E、F型再生为C、D型(86.7%、6.7%), 异常增生微血管消失, 其相应病理组织学转变为慢性活动性炎症(85.6%)及萎缩性炎症(8.9%), E、F型胃黏膜及肠上皮化生、异型增生消融率分别为93.0%及94.4%。

结论: 氩离子凝固术是一种胃黏膜癌前病变安全、有效的治疗方法。

关键词: 放大色素内镜; 氩离子凝固术; 胃黏膜癌前病变

袁海锋, 唐少波, 奚锦要. 氩离子凝固术在放大色素内镜下治疗胃黏膜癌前病变90例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(33): 3805-3809

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3805.asp>

■背景资料

胃癌在我国发病率和病死率均居恶性肿瘤的首位, 手术切除是目前主要的治疗手段之一。报道显示, 我国胃癌的5年生存率为20%-30%左右, 决定胃癌患者预后的关键在于早期发现、早期诊断和早期治疗。临床上, 放大色素内镜(MCE)的应用可对消化系统黏膜表面及黏膜下血管等细微结构进行细致观察, 黏膜染色技术更能显示病变轮廓及范围, 也使得放大色素内镜下对胃黏膜癌前病变的诊断成为可能。

■同行评议者

程英升, 主任医师, 上海交通大学附属第六人民医院放射科、上海交通大学影像学研究所

■相关报道

Familiari *et al* 在研究中显示APC能对Barrett's食管进行消融并导致鳞状上皮的完全再生。Hage *et al* 在应用APC治疗Barrett's食管肠上皮化生和异型增生中进一步指出,尽管内镜下消融术可对76%患者进行有效治疗,但分子畸变的存在仍然是导致腺癌发生的危险因素。

0 引言

胃癌在我国发病率和病死率均居恶性肿瘤的首位,手术切除是目前主要的治疗手段之一。早期发现、早期诊断和早期治疗是决定胃癌患者预后的关键。萎缩性胃炎伴肠上皮化生及异型增生是重要的胃黏膜癌前病变,这种胃黏膜的病变在普通内镜下多表现为病灶黏膜不同程度的糜烂。临床上,放大色素内镜(magnifying chromoendoscopy, MCE)的应用可对消化系黏膜表面及黏膜下血管等细微结构进行细致观察,黏膜染色技术更能显示病变轮廓及范围,也使得放大色素内镜下对胃黏膜癌前病变的诊断成为可能。氩离子凝固术(argon plasma coagulation, APC)是一种新型的非接触性凝固方法,其与传统的热凝固技术相比,具有作用迅速、高效、安全性高等特点。本研究在放大色素内镜下应用氩离子凝固术对胃黏膜癌前病变进行凝固治疗,追踪观察病灶治疗后的细微形态改变,并与其病理组织学进行对照,探讨放大色素内镜下氩离子凝固术治疗胃黏膜癌前病变的疗效及其应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-01/2007-12因上腹部闷胀、疼痛、嗝气、反酸等上消化道症状在我科行放大色素内镜及病理组织学检查,明确存在萎缩性胃炎伴肠上皮化生及异型增生的患者共90例。其中肠上皮化生66例,轻度异型增生16例,重度异型增生8例;男51例,女39例;年龄35-67(平均年龄41.5)岁;病灶以胃窦部为主(72%),以胃角部(21%)及胃体部(7%)为次;所有病例共治疗观察病灶667处。放大内镜为Fujinon EG-590ZW型电子放大内镜,既可行普通内镜检查,也可通过光学及电子变焦将图像放大至100-200倍观察。氩气高频电刀,山东玉华电气有限公司生产,AG9800型。

1.2 方法

1.2.1 内镜观察:检查前5 min *po*局麻药物和祛泡剂,选定病变区域予蒸馏水及二甲基硅油稀释液充分冲洗祛除泡沫和黏液后,5 g/L美蓝喷洒染色,3 min后用蒸馏水冲洗表面浮色,启动放大功能对病灶胃小凹及黏膜微血管进行观察及形态学分类,并于病灶处行多点病理取材。本组病例于氩离子凝固术治疗前及治疗后1、3、6 mo分别接受内镜检查及复查。

1.2.2 病理组织学检查:治疗前及治疗后1、3、6 mo分别于病变区域取样行病理组织学检查。

将胃黏膜病理学改变定级为慢性活动性炎症、萎缩性炎症、肠上皮化生及轻、重度异型增生。如同一病灶病理组织学诊断出现重叠者,取较重一级。

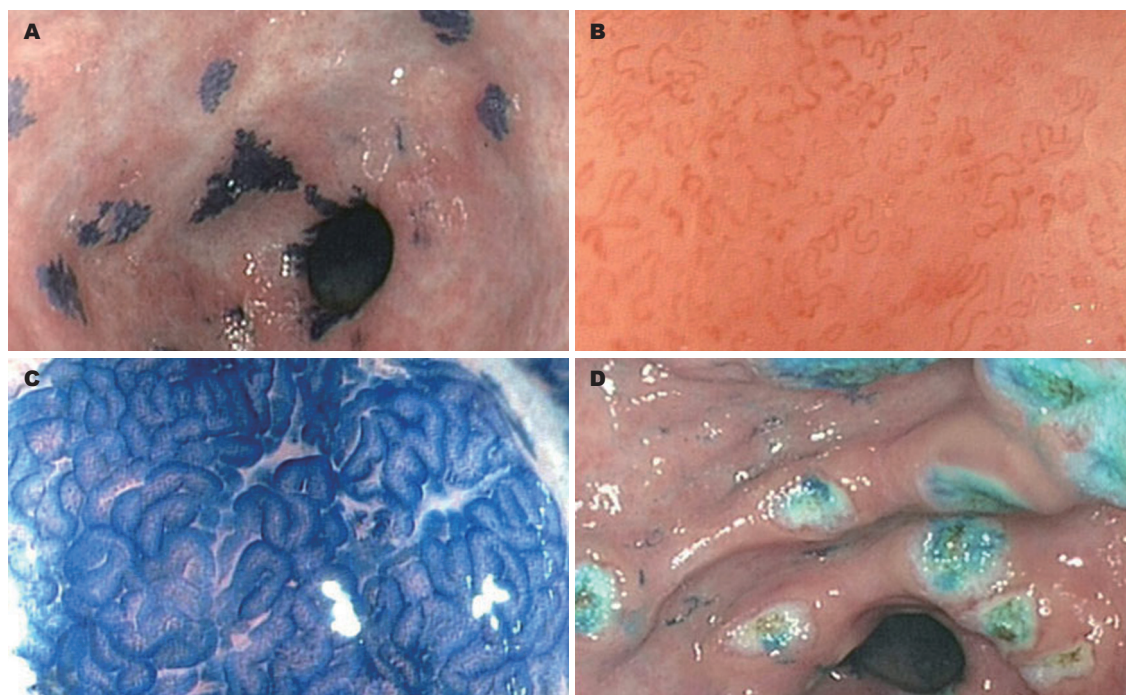
1.2.3 氩离子凝固术治疗:APC治疗前,如有幽门螺杆菌(*H pylori*)感染者均予1 wk质子泵抑制剂联合阿莫西林、克拉霉素抗*H pylori*,无*H pylori*感染者仅予质子泵抑制剂治疗;APC治疗后所有病例均继续使用质子泵抑制剂2 mo。APC治疗时,氩气流量2.0 L/min,功率60 W,在放大色素内镜下确定病灶区域后,经内镜活检孔道插入氩离子喷射导管至病灶上方0.3-0.5 cm,以每次1-2 s的时间施以氩离子凝固治疗。喷凝次数根据病灶大小及治疗效果来决定,治疗后以病灶黏膜平坦或稍凹陷,表面变白或深黄色为宜。治疗后1 mo复查,发现残留病灶者行二次APC治疗。

统计学处理 所获资料以SPSS10.0统计软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 形态学分类 将胃小凹及细微结构分为六大基本类型:A型:圆点状小凹;B型:短小棒状小凹,可出现迂曲、延长或分支;C型:较B型稀疏而粗大的线状小凹;D型:斑块状或网格样小凹;E型:绒毛状、指状小凹;F型:小凹结构模糊不清或缺损区内呈现出颗粒状隆起及不规则粗乱毛细血管。如同一病灶形态学出现重叠者,取较重一型。

2.2 治疗前后胃黏膜细微结构与病理组织学对照 本组90例胃黏膜癌前病变患者在接受APC治疗前黏膜胃小凹分型为D型4.4%(4/90)、E型68.9%(62/90)及F型26.7%(24/90),部分伴不规则粗乱微血管形成12.2%(11/90),其组织病理为肠上皮化生73.3%(66/90),轻度异型增生17.8%(16/90),重度异型增生8.9%(8/90)。在接受APC消融治疗后1 mo,胃小凹分型为C型81.1%(73/90)、D型13.3%(12/90)及E型5.6%(5/90),组织病理显示81.1%(73/90)为慢性活动性炎症、11.1%(10/90)为萎缩性炎症、7.8%(7/90)为肠上皮化生;治疗后3 mo胃小凹分型为C型87.8%(79/90)、D型7.8%(8/90)及E型3.3%(3/90),均未见不规则粗乱微血管出现,组织病理85.6%(77/90)为慢性活动性炎症、11.1%(10/90)为萎缩性炎症及3.3%(3/90)肠上皮化生;治疗后6 mo胃小凹分型为C型



■应用要点
氩离子凝固术是一种胃黏膜癌前病变安全、有效的治疗方法。

图1 放大色素内镜下胃黏膜癌前病变色素观察及APC治疗. A: 胃窦美蓝染色后病灶清晰显示; B: F型($\times 120$), 伴粗乱微血管形成; C: E型($\times 100$); D: 病灶美蓝染色后行APC治疗.

表1 APC治疗前后胃黏膜细微结构对照 ($n = 90$)

小凹形态	治疗前	治疗后		
		1 mo	3 mo	6 mo
C型		73	79	86
D型	4	12	8	2
E型	62	5	3	2
F型	24			

表2 APC治疗前后病理组织学对照 ($n = 90$)

病理组织学改变	治疗前	治疗后		
		1 mo	3 mo	6 mo
慢性活动性炎症		73	77	83
萎缩性炎症		10	10	4
肠上皮化生	66	7	3	3
轻度异型增生	16			
重度异型增生	8			

95.6%(86/90)、D型2.2%(2/90)及E型2.2%(2/90), 组织病理92.2%(83/90)为慢性活动性炎症、4.4%(4/90)为萎缩性炎症及3.3%(3/90)肠上皮化生。

治疗前、后胃小凹形态及病理组织学改变差异具有显著性($P < 0.05$), 而治疗后1、3、6 mo间比较差异无显著性(表1-2, 图1)。

3 讨论

胃癌在我国发病率和病死率均居恶性肿瘤的首位, 手术切除是目前主要的治疗手段之一。报道显示, 我国胃癌的5年生存率为20%-30%左右, 决定胃癌患者预后的关键在于早期发现、早期诊断和早期治疗。正常胃黏膜表面由纵横交错的浅沟分成许多胃小区, 小区内遍布点状或线状的细小凹陷, 称胃小凹(gastric pit)。普通内镜下难以观察到胃小凹的形态特征, 放大内镜可

将黏膜表面放大至接近实体显微镜的水平, 可清晰观察到胃小凹甚至黏膜下血管形态。镜下染色是放大内镜检查的重要辅助手段, 根据不同目的采用特殊染料对黏膜组织进行染色, 美蓝染色属于细胞核染色, 由于病灶细胞内DNA含量明显高于正常细胞核的含量, 所以经美蓝染色后的病灶上皮与邻近上皮的分界十分清楚, 可以更清晰地显示出病灶范围及表面情况。当胃黏膜发生病变时, 首先表现为胃小凹形态的改变。在前期研究中应用放大色素内镜观察胃黏膜小凹及细微结构, 并将其分为六大基本类型, 即A、B、C、D、E及F型, 结果显示胃小凹的形态学改变与病理学改变呈正相关, 由A-F型的转变可较为准确地反映胃黏膜从正常黏膜-浅表性炎症-萎缩性炎症-伴肠上皮化生-异型增生的慢性炎症发展过程以及病变的严重

■同行评价

本研究设计合理, 统计学处理恰当, 结果可靠, 实用性较强, 具有很好的可读性和科学性。

程度^[1-4]。Watari *et al*^[5]研究认为, 胃小凹的形态及病理组织学类型可随着胃黏膜炎症和活跃度而变化, 但当胃黏膜肠上皮化生形成后, 即使在 *H pylori* 感染被消除、炎症消退、萎缩程度改善后仍然无法逆转其组织病理。萎缩性胃炎伴肠上皮化生及异型增生是重要的胃黏膜癌前病变, 这种胃黏膜的病变常首先引起胃小凹形态学上的改变, 应用放大色素内镜观察胃黏膜细微结构, 并与其组织病理进行对照, 结果显示E、F型黏膜的出现及异常微血管的形成, 提示着胃黏膜肠上皮化生及异型增生癌前病变甚至早期胃癌的发生^[3,6-7]。放大色素内镜下胃黏膜细微形态学特征与其病理组织学类型的高度相关性, 使得内镜下对胃黏膜癌前病变及早期胃癌的诊断及治疗成为可能。APC是一种新型的非接触性凝固方法, 其能量经电离的氩气传导至靶组织, 使该组织产生凝固效应, 从而起到破坏病变组织和止血的作用, 他的热效应深度仅限于使组织失活、凝固和干燥的一个很小的范围内, 正常操作下组织表面热凝固深度一般不超过0.3 cm, 其治疗具有操作简便、高效、创伤小、并发症少的优点^[8-9]。APC自1991年被应用于内镜下治疗术后, 已越来越广泛地应用于治疗消化道出血、Dieulafoy病、胃窦毛细血管扩张症、Barrett's食管、消化道肿瘤、息肉或息肉电切术后残留及疣状胃炎等, 并且显示出其满意的疗效^[10-19]。值得关注的是, Familiari *et al*^[14]在研究中显示APC能对Barrett's食管进行消融并导致鳞状上皮的完全再生。Hage *et al*^[15]在应用APC治疗Barrett's食管肠上皮化生和异型增生中进一步指出, 尽管内镜下消融术可对76%患者进行有效治疗, 但分子畸变的存在仍然是导致腺癌发生的危险因素。

本研究中, 在放大色素内镜下应用氩离子凝固术对胃黏膜癌前病变进行凝固治疗, 追踪观察病灶黏膜治疗后的细微形态及其病理组织学改变。结果显示, 在治疗前, 90例胃黏膜癌前病变在放大色素内镜下呈现出特殊的E、F型黏膜95.6%(86/90), 其中12.2%伴不规则异常微血管形成。病灶在进行APC治疗后的1 mo复查显示, E、F型黏膜5.6%(5/90), 其病理组织学检查肠上皮化生及异型增生为7.8%(7/90)。治疗后3 mo复查, E、F型黏膜3.3%(3/90), 其病理组织学检查肠上皮化生及异型增生为3.3%(3/90)。治疗后6 mo复查, E、F型黏膜2.2%(2/90), 其病理组织学检查肠上皮化生及异型增生为3.3%(3/90)。

本组90例胃黏膜癌前病变在接受APC治疗前、后胃小凹形态及病理组织学改变差异具有显著性($P<0.05$)。治疗后6 mo, E、F型胃黏膜消融率为97.6%, 肠上皮化生、异型增生消融率为96.7%, 且治疗后1、3、6 mo间比较, 胃黏膜细微结构及病理组织学改变差异无显著性。既往在对胃黏膜隆起糜烂APC治疗的观察中显示, 原病灶在消融治疗后往往有不同程度残留并伴随不同程度的疤痕组织形成, 这种疤痕组织的存在可引起再生黏膜微循环的障碍, 进一步导致新病灶的出现, 这与在同一部位的反复接触性治疗, 消融范围未能覆盖整个病灶有关。在放大色素内镜下进行非接触性的消融治疗, 可避免这一缺陷的出现, 不仅使整个病灶得以均匀喷凝, 同时保证形成的再生黏膜更为稳定。APC治疗中常见的不良反应主要为腹胀、腹痛, 而出血、穿孔等严重并发症在本组病例未见, 前者可于治疗过程中注意抽吸胃腔中过多气体而避免。在前期对胃黏膜隆起糜烂及癌前病变的色素放大观察中, 伴随肠上皮化生及异型增生癌前病变的胃黏膜经美蓝染色后常为深蓝或浅蓝色, 放大后局部黏膜细微结构呈E、F型, 且镜下界限清晰, 易于辨认^[2-3]。在病灶接受APC治疗后1、3、6 mo进行色素放大内镜的复查中, 发现遗留病灶分别为7例、3例及3例, 均为原病灶周边组织, 可能与治疗范围未能完全覆盖病灶有关, 而经充分喷凝治疗后的病灶中央区域, 均未见遗漏病变。本组病例中, 镜下观察、病理取材、APC消融治疗及病灶治疗后的随访均在色素放大内镜下进行, 效果满意。

总之, 我们认为氩离子凝固术对胃黏膜癌前病变具有满意疗效, 能明显消除E、F型胃黏膜及肠上皮化生、异型增生, 治疗后病灶黏膜细微结构及病理类型均有明显改善。放大色素内镜在治疗过程中的应用, 不仅能清晰显示病变范围, 指导治疗, 而且在治疗后的追踪观察中亦具有重要应用价值。

4 参考文献

- 1 Yang JM, Chen L, Fan YL, Li XH, Yu X, Fang DC. Endoscopic patterns of gastric mucosa and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2552-2556
- 2 袁海锋, 唐少波, 林寿宁, 黄适, 奚锦要. 胃黏膜隆起糜烂胃小凹分类及其临床病理价值. *中国内镜杂志* 2008; 14: 78-81
- 3 袁海锋, 唐少波, 黄适, 奚锦要. 放大色素内镜在胃黏膜癌前病变诊断中的价值. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2052-2055
- 4 黄永辉, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 刘建军, 丁士刚, 夏志

- 伟, 段丽萍, 常红. 放大内镜下胃小凹形态学分类及其临床病理意义. *中国内镜杂志* 2004; 10: 14-17
- 5 Watari J, Das KK, Amenta PS, Tanabe H, Tanaka A, Geng X, Lin JJ, Kohgo Y, Das KM. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on the histology and cellular phenotype of gastric intestinal metaplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 409-417
 - 6 Tajiri H, Doi T, Endo H, Nishina T, Terao T, Hyodo I, Matsuda K, Yagi K. Routine endoscopy using a magnifying endoscope for gastric cancer diagnosis. *Endoscopy* 2002; 34: 772-777
 - 7 Otsuka Y, Niwa Y, Ohmiya N, Ando N, Ohashi A, Hirooka Y, Goto H. Usefulness of magnifying endoscopy in the diagnosis of early gastric cancer. *Endoscopy* 2004; 36: 165-169
 - 8 Wahab PJ, Mulder CJ, den Hartog G, Thies JE. Argon plasma coagulation in flexible gastrointestinal endoscopy: pilot experiences. *Endoscopy* 1997; 29: 176-181
 - 9 Malick KJ. Clinical applications of argon plasma coagulation in endoscopy. *Gastroenterol Nurs* 2006;v 29: 386-391; quiz 392-393
 - 10 Neneman B, Gasiorowska A, Małacka-Panas E. The efficacy and safety of argon plasma coagulation (APC) in the management of polyp remnants in stomach and colon. *Adv Med Sci* 2006; 51: 88-93
 - 11 Havanond C, Havanond P. Argon plasma coagulation therapy for acute non-variceal upper gastrointestinal bleeding. *Cochrane Database Syst Rev* 2005: CD003791
 - 12 Iacopini F, Petruzzello L, Marchese M, Larghi A, Spada C, Familiari P, Tringali A, Riccioni ME, Gabbriellini A, Costamagna G. Hemostasis of Dieulafoy's lesions by argon plasma coagulation (with video). *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 20-26
 - 13 尚瑞莲, 贾爱芹, 孙自勤, 陈桂荣. 氩离子凝固术治疗非静脉曲张性消化道出血94例分析. *中国内镜杂志* 2007; 11: 83-85
 - 14 Familiari L, Scaffidi M, Bonica M, Consolo P, Giacobbe G, Fichera D, Familiari P. Endoscopic treatment of Barrett's epithelium with Argon Plasma Coagulation. Long-term follow-up. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2003; 49: 63-70
 - 15 Hage M, Siersema PD, Vissers KJ, Steyerberg EW, Haringsma J, Kuipers EJ, van Dekken H. Molecular evaluation of ablative therapy of Barrett's oesophagus. *J Pathol* 2005; 205: 57-64
 - 16 薛寒冰, 戈之铮, 陈晓宇, 胡运彪, 萧树东, 莫剑忠, 高云杰, 宋燕, 刘燕. 内镜下氩离子凝固术治疗Barrett食管. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 3-6
 - 17 Chaves DM, Sakai P, Oliveira CV, Cheng S, Ishioka S. Watermelon stomach: clinical aspects and treatment with argon plasma coagulation. *Arq Gastroenterol* 2006; 43: 191-195
 - 18 樊锦河, 李玉明, 王亚民. 氩离子凝固术治疗消化道息肉的临床价值. *中国内镜杂志* 2005; 11: 394-396
 - 19 应力, 姜春萌, 王朝晖. 内镜下氩离子凝固术治疗成熟型疣状胃炎35例临床分析. *中国内镜杂志* 2006; 12: 125-127

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

幽门螺杆菌感染在慢性胃炎患者中的危险因素

苏爱平, 许翠萍, 房晓芬, 王建春, 张太新

■背景资料

慢性胃炎是一种常见病和多发病, 反复发作, 迁延不愈, 严重影响人们的生活质量。1983年幽门螺杆菌(*H pylori*)的发现, 人们认识到慢性胃炎与*H pylori*感染密切相关。大量研究证实, 80%-95%的慢性活动性胃炎患者胃黏膜中有*H pylori*感染。因此明确引起*H pylori*感染的危险因素, 对慢性胃炎的防治有重要作用。

苏爱平, 山西医科大学 山西省太原市 030001

许翠萍, 房晓芬, 王建春, 张太新, 山西医科大学第一医院消化内科 山西省太原市 030001

作者贡献分布: 此课题由许翠萍与苏爱平设计; 在许翠萍指导下, 实验操作与论文写作由苏爱平完成; 研究所用试剂及分析工具由房晓芬, 王建春及张太新提供。

通讯作者: 许翠萍, 030001, 山西省太原市解放南路85号, 山西医科大学第一医院消化内科, cuipingxu@hotmail.com

收稿日期: 2008-07-30 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-28

Risk factors for *helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastritis

Ai-Ping Su, Cui-Ping Xu, Xiao-Fen Fang,
Jian-Chun Wang, Tai-Xin Zhang

Ai-Ping Su, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Cui-Ping Xu, Xiao-Fen Fang, Jian-Chun Wang, Tai-Xin Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Dr. Cui-Ping Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, 85 South Jiefang Road, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. cuipingxu@hotmail.com

Received: 2008-07-30 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To investigate the risk factors for *H pylori* infection in patients with chronic gastritis.

METHODS: A total of 345 cases with chronic gastritis confirmed by gastroscopy completed a unified questionnaire survey. *H pylori* infection was assessed using the ¹⁴C-urea breath test. The 191 *H pylori*-positive cases were taken as case group while the 154 *H pylori*-negative cases were taken as control group. The univariable and multivariable analyses were carried out using the Chi-Square Tests and Logistic regression method.

RESULTS: Single factor analysis showed that the *H pylori* infection was related to educational background, living areas, eating outside, eating speed, engorgement, vinegar use, preference of spicy food, food fried in oil, family history and

mental stress (all $P < 0.05$). The multivariable unconditional Logistic regression analysis showed that the *H pylori* infection was related significantly to the educational background, eating outside, engorgement, vinegar and preference of spicy food. *H pylori* infection was negatively associated with the educational background and vinegar use ($\beta = -0.247, -0.510$, both $P < 0.05$), but positively associated with eating outside, engorgement and preference of spicy food ($\beta = 0.617, 0.577, 0.190$, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Eating outside frequently, engorgement and preference of spicy food increase the risk for *H pylori* infection, while increased education and proper vinegar use decrease the risk for *H pylori* infection.

Key Words: Chronic gastritis; *Helicobacter pylori*; Risk factor

Su AP, Xu CP, Fang XF, Wang JC, Zhang TX. Risk factors for *helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3810-3813

摘要

目的: 探讨慢性胃炎患者幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的危险因素。

方法: 对345例经胃镜确诊的慢性胃炎患者采用统一调查表进行问卷调查, ¹⁴C-尿素呼气试验检查*H pylori*, *H pylori*阳性191例列为病例组, *H pylori*阴性154例列为对照组。

结果: 单因素分析显示文化程度、居住地、在外就餐、进餐速度、暴饮暴食、食醋、食用辛辣食物、食用油炸食品、胃病家族史、精神紧张与*H pylori*感染的关系有统计学意义($P < 0.05$)。多因素分析表明文化程度、在外就餐、暴饮暴食、食醋及食用辛辣食物5个因素有显著性差异。其中, 文化程度、食醋与*H pylori*感染呈负相关($\beta = -0.247, -0.510$, 均 $P < 0.05$), 外出就餐、暴饮暴食、食用辛辣食物与*H pylori*感染呈正相关($\beta = 0.617, 0.577, 0.190$, 均 $P < 0.05$)。

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科; 潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室

结论:经常在外进餐、暴饮暴食及食用辛辣食物可显著增加*H pylori*感染的危险性, 提高文化程度, 适量食醋可以减少*H pylori*感染的风险。

关键词:慢性胃炎; 幽门螺杆菌; 危险因素

苏爱平, 许翠萍, 房晓芬, 王建春, 张太新. 幽门螺杆菌感染在慢性胃炎患者中的危险因素. 世界华人消化杂志 2008; 16(33): 3810-3813

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3810.asp>

0 引言

慢性胃炎是一种多发病、常见病, 反复发作, 迁延不愈, 严重影响了人们的生活质量. 1983年澳大利亚学者Barry Marshall和Robin Warren首次从人胃黏膜活检组织中分离出幽门螺杆菌(*H pylori*)后, 经过多年研究表明, *H pylori*感染为慢性活动性胃炎的主要致病菌, 消化性溃疡的重要致病因素, 也是胃癌重要的危险因素^[1]. 大量研究证实, 80%-95%的慢性活动性胃炎患者胃黏膜中有*H pylori*感染. 因此明确引起*H pylori*感染的危险因素, 对慢性胃炎的防治有重要作用. 本研究旨在寻找慢性胃炎患者与*H pylori*感染相关的危险因素, 为预防慢性胃炎的发生提供健康教育和干预靶点, 为减少慢性胃炎的复发与提高慢性胃炎的疗效提供临床依据.

1 材料和方法

1.1 材料 山西医科大学第一医院消化科2007-11/2008-02因上消化道症状就诊并经胃镜和(或)病理检查确诊为慢性胃炎的门诊患者345例, 其中*H pylori*阳性191例, *H pylori*阴性154例.

1.2 方法

1.2.1 调查方法:采用统一调查表, 对每个被调查对象进行问卷调查. 调查内容主要包括一般情况5个(性别、年龄、职业、文化程度、长期居住地); 生活饮食习惯25个(饮水来源、吸烟、饮酒、喜喝红茶还是绿茶、是否常喝浓茶、是否常喝咖啡、是否经常外出就餐、进餐习惯是共餐还是分餐、是否饮食规律、是否经常暴饮暴食、进餐速度、是否常吃甜食、是否喜食醋、是否常喝鲜牛奶、是否常吃新鲜蔬菜、是否常吃新鲜水果、是否常吃豆制品、是否常吃肉制品、是否常吃油炸食物、是否常吃熏烤食物、是否常吃腌制食物、是否常吃霉变食物、是否常吃生冷食物、是否常吃热烫食物、是否常吃辛辣食物); 胃病家族史1个; 精神心理因素3个

表 1 病例组与对照组的均衡性比较 $n(\%)$

变量		病例组	对照组
性别	男	110(57.6)	80(51.9)
	女	81(42.4)	74(48.1)
年龄(岁)	20-	27(14.1)	14(9.1)
	30-	42(22.0)	37(24.0)
	40-	41(21.5)	42(27.3)
	50-	54(28.3)	39(25.3)
	60-	27(14.1)	22(14.3)
	60+	27(14.1)	22(14.3)
文化程度	文盲	46(24.1)	34(22.1)
	小学	44(23.0)	15(9.7)
	初中	37(19.4)	36(23.4)
	高中(中专)	34(17.8)	45(29.2)
	大学及以上	30(15.7)	24(15.6)

(是否经常感觉精神紧张、是否工作生活的压力大、是否工作生活满意)共34个变量.

1.2.2 *H pylori*感染的检测方法:用¹⁴C-尿素呼气试验检查*H pylori*感染情况. 呼气试验药盒及HTY1001 *H pylori*测试仪为深圳中核海得威生物科技有限公司生产. 严格按照操作规程要求操作. 阳性值判断: ¹⁴C-UBT ≥ 100 dp m/mmol CO₂时, 可判定患者为*H pylori*阳性. 按照病例-对照研究的分组原则, 以*H pylori*检测结果分组, 将阳性受检者列入病例组, 阴性受检者列入对照组.

统计学处理 对34个变量用SPSS13.0软件包进行单因素 χ^2 检验和多因素Logistic回归分析, 计算比值比(OR)及其95%可信区间.

2 结果

2.1 一般情况 病例组与对照组的性别和年龄差异无统计学意义($P>0.05$), 但在文化程度上, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表1).

2.2 单因素 χ^2 检验 本研究对34个变量逐项进行单因素 χ^2 检验, 发现文化程度、居住地、在外就餐、进餐速度、暴饮暴食、食醋、食用辛辣食物、食用油炸食品、胃病家族史、精神紧张与*H pylori*感染的关系有统计学意义($P<0.05$, 表2). 其他因素均无统计学意义.

2.3 非条件多因素Logistic回归分析 本研究引入年龄、性别及上述10个因素, 进行非条件多因素Logistic回归分析(进入水准 $\alpha = 0.05$, 剔出水准 $\alpha = 0.10$). 结果发现, 影响慢性胃炎患者*H pylori*感染的主要因素有5个, 分别为文化程度、外出就餐、暴饮暴食、食醋、食用辛辣食物, 其中, 文化程度、食醋与*H pylori*感染呈负相关, 外出就餐、暴饮暴食、食用辛辣食物与

■研究前沿

*H pylori*是慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴瘤的重要致病因素, 治疗和预防*H pylori*感染的复发受到广泛重视. 研究*H pylori*感染的危险因素并进行干预, 对防治慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌等消化系统疾病有重要意义.

■相关报道

张群勇 *et al* 研究发现饮食因素与*H pylori*感染有很大的关系, 按时进餐、多吃豆制品可以降低慢性胃炎患者*H pylori*感染风险.

■创新盘点

目前有关食醋与 *H pylori* 感染关系的文献报道较少, 本研究显示适量食醋可以减少 *H pylori* 感染的风险。

表 2 慢性胃炎患者 *H pylori* 感染危险因素的单因素 χ^2 检验

变量	χ^2	<i>P</i>
文化程度	14.464	0.006
居住地	9.830	0.002
经常外出就餐	10.931	0.001
进食速度	7.687	0.021
经常暴饮暴食	6.425	0.011
食醋	5.445	0.020
食辛辣物	20.382	0.000
食油炸物	11.629	0.020
胃病家族史	4.504	0.034
精神紧张	5.671	0.017

H pylori 感染呈正相关(表3)。

3 讨论

研究报道 *H pylori* 感染是慢性胃炎的主要病因, 根除 *H pylori* 可使胃黏膜活动性炎症消失, 慢性炎症程度减轻^[2-3], 可以明显减缓癌前病变的进展, 并有可能减少胃癌发生的危险^[4-6]。探讨 *H pylori* 感染的相关危险因素并进行干预, 将有助于预防 *H pylori* 感染, 降低 *H pylori* 感染率, 对防治慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌等消化系统疾病有重要意义。

现有研究表明 *H pylori* 感染与性别、年龄及社会经济条件有关^[7-8], 本研究显示345例慢性胃炎患者 *H pylori* 总的感染率是55.4%, 其中男性 *H pylori* 感染率高于女性, 但两者无统计学差异, 这与国内外研究揭示男性是 *H pylori* 感染的危险因素^[9]不同。许多研究证实年龄是 *H pylori* 感染的危险因素, 本调查结果没有显示年龄与 *H pylori* 感染有密切关系, 这可能是由于病例组 and 对照组在年龄分布上比较接近。

文化程度、居住地及经济收入等多因素与 *H pylori* 感染有关。本研究发现文化程度与 *H pylori* 感染有统计学上的关联, 并且呈负相关关系, 文化程度低者 *H pylori* 感染率高, 文化程度高者 *H pylori* 感染率低。这与徐顺福 *et al*^[10] 研究结果一样, 提示可能是受教育程度较高者, 职业相对较好, 收入也相对较高, 饮食卫生观念较强和居住生活环境也较好, 由环境、水源污染造成的感染机会相应就较少。农村地区 *H pylori* 感染率高于城市地区人群^[11]。本研究也显示农村居民和城市居民 *H pylori* 感染率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 9.830$, $P = 0.002$), 提示和农村居民卫生习惯及饲养家禽动物有一定的关系, 但

表 3 慢性胃炎患者 *H pylori* 感染危险因素的多因素 Logistic 分析

变量	β	SE	<i>P</i> 值	OR值	OR 95%CI
文化程度	-0.247	0.092	0.007	0.781	0.652-0.935
喜食醋	-0.510	0.230	0.026	0.600	0.383-0.942
外出就餐	0.617	0.230	0.007	1.853	1.181-2.908
暴饮暴食	0.577	0.236	0.014	1.781	1.121-2.830
食辛辣物	0.190	0.079	0.016	1.210	1.036-1.413

H pylori 的传播途径尚不明确, 可能与密切接触有关。

个人的饮食生活习惯与 *H pylori* 感染有很大的关系。本文经单因素分析表明, 外出就餐、进餐速度、暴饮暴食、食用辛辣食物、食用油炸食品、食醋与 *H pylori* 感染密切相关, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。多因素分析发现经常外出就餐、暴饮暴食、食用辛辣食物、食醋与 *H pylori* 感染有较强的关联。陈胜良 *et al*^[12] 报道外出就餐是血清学 *H pylori* IgG 抗体阳性危险程度最高的因素。本调查显示经常外出就餐与 *H pylori* 感染呈明显正相关关系($OR = 1.853$, $P = 0.007$)。这与李富欢 *et al*^[13] 报道一致, 提示可能由于当前一些小餐馆的食品卫生、进餐环境不佳, *H pylori* 通过不洁的餐具、食物或共同进餐的方式经由唾液传播, 这也许是我国人群 *H pylori* 感染率普遍较高的原因之一, 也更加支持了 *H pylori* 可通过唾液传播^[14] 的理论。长期暴饮暴食使胃肠道负担过重, 食物在胃中停留时间过长, 刺激和损伤胃黏膜, 胃液中的盐酸被稀释, 无力抵抗病菌的侵袭, 容易发生 *H pylori* 感染。本研究发现, 经常食辣可以增加慢性胃炎患者 *H pylori* 感染的风险。这与郭智成 *et al*^[15] 研究发现喜欢食辣是 *H pylori* 感染的危险因素结果一致。原因与经常食辣刺激和损伤胃黏膜, 而损害的胃黏膜更容易遭受 *H pylori* 的侵袭有关。

多因素分析还发现, 喜食醋是 *H pylori* 感染的保护因素。文献报道维生素C减少引起抗氧化能力下降是 *H pylori* 感染的原因之一^[16]。本次调查对象大部分来自山西省, 山西不仅盛产醋, 山西人还喜食醋, 醋具有促进维生素C的吸收及保护原料中维生素C不被破坏的作用, 而且能抑制氧化物质的形成, 由此降低 *H pylori* 感染的风险。但大量食醋将改变胃液的pH值使胃环境中酸性加强, 对胃黏膜造成损伤。故食醋的食用应适量。有关食醋与 *H pylori* 感染关系的文献报道较少, 还需进一步研究。本次调查的部分结果与

■应用要点

本研究显示经常在外就餐、暴饮暴食及食用辛辣食物可增加 *H pylori* 感染的危险性, 提高文化程度、适量食醋可以减少 *H pylori* 感染的风险。提示慢性胃炎患者养成良好的饮食生活习惯, 有助于预防 *H pylori* 感染, 降低 *H pylori* 感染率, 为减少慢性胃炎的复发与提高慢性胃炎疗效提供依据。

以往文献报道不尽一致,可能是由于不同地区的人群其生活方式、经济状况、地理环境等因素的差异而造成其主要致病因素的不同。总之,*H pylori*感染不仅与社会综合经济状况有关,还与个人饮食生活习惯有关。本研究提示改善饮食卫生状况和居住环境,培养良好的生活习惯,尽量避免在外就餐,忌暴饮暴食,少吃辛辣食物,适量食醋可以减少*H pylori*感染的风险。

4 参考文献

- 1 Murakami K, Kodama M, Fujioka T. Latest insights into the effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2713-2720
- 2 Sheu BS, Yang HB, Wang YL, Chuang CH, Huang AH, Wu JJ. Pretreatment gastric histology is helpful to predict the symptomatic response after *H. pylori* eradication in patients with nonulcer dyspepsia. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2700-2707
- 3 Zhou L, Sung JJ, Lin S, Jin Z, Ding S, Huang X, Xia Z, Guo H, Liu J, Chao W. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after *H. pylori* eradication. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 11-14
- 4 You WC, Brown LM, Zhang L, Li JY, Jin ML, Chang YS, Ma JL, Pan KF, Liu WD, Hu Y, Crystal-Mansour S, Pee D, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Xu GW, Gail MH. Randomized double-blind factorial trial of three treatments to reduce the prevalence of precancerous gastric lesions. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 974-983
- 5 Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 187-194
- 6 周丽雅, 林三仁, 丁士刚, 黄雪彪, 郭长吉, 张莉, 崔荣丽, 金珠, 孟灵梅, 张静. 根除幽门螺杆菌对胃癌患病率及胃黏膜组织学变化的八年随访研究. *中华消化杂志* 2005; 25: 324-327
- 7 Malcolm CA, MacKay WG, Shepherd A, Weaver LT. *Helicobacter pylori* in children is strongly associated with poverty. *Scott Med J* 2004; 49: 136-138
- 8 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春. 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1779-1780
- 9 Replogle ML, Glaser SL, Hiatt RA, Parsonnet J. Biologic sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in healthy young adults. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 856-863
- 10 徐顺福, 施瑞华, 张国新, 丁岩冰, 孙桂前, 张红杰, 陈晓星, 黄霞玥, 李学良, 严志刚, 苗毅. 江苏地区幽门螺杆菌感染及其危险因素调查. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3363-3370
- 11 王凯娟, 王润田. 中国幽门螺杆菌感染流行病学Meta分析. *中华流行病学杂志* 2003; 24: 443-446
- 12 陈胜良, 萧树东, 刘文忠, 徐蔚文, 潘熾. 1990-2001年上海市区幽门螺杆菌血清流行病学比较. *胃肠病学* 2002; 7: 146-148
- 13 李富欢, 陈韦冰, 陈钟鸣, 赵越, 高晓燕, 刘红生, 朱淑萍, 吴珍珠, 刘小萍. 吉安地区425例胃病患者幽门螺杆菌感染易感因素的研究. *中国慢性病预防与控制* 2005; 13: 284-286
- 14 韩咏梅, 季峰, 厉有名. 部分人群幽门螺杆菌感染流行病学调查. *浙江中西医结合杂志* 2003; 13: 458-459
- 15 郭智成, 厉有名, 许卓睿, 季峰, 王丽君, 陈坤. 胃病患者幽门螺杆菌感染危险因素的病例对照研究. *中华预防医学杂志* 2002; 36: 187-190
- 16 Zhang HM, Wakisaka N, Maeda O, Yamamoto T. Vitamin C inhibits the growth of a bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter pylori*. *Cancer* 1997; 80: 1897-1903

■同行评价

本研究统计方法正确,结果可靠,讨论条理,文章简洁,对临床预防和治疗幽门螺杆菌感染有一定意义。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度,研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征,如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准,如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值)。(常务副总编辑:张海宁 2008-11-28)

健康教育干预对肝硬化失代偿期患者生活质量的影响

张汉语, 瞿金娥, 刘平

■背景资料

肝硬化失代偿期患者存在着各种心理问题, 尤为突出是焦虑、恐惧、抑郁、敌对、躯体化、人际关系敏感等。其中躯体化症状的改善与治疗效果直接相关。本文探讨健康教育干预对肝硬化失代偿期患者生活质量的影响。

张汉语, 瞿金娥, 刘平, 鄢阳医学院附属太和医院营养科 湖北省十堰市 442000

通讯作者: 瞿金娥, 442000, 湖北十堰市人民南路23-1, 鄢阳医学院附属太和医院营养科. hbsyqje@tom.com
电话: 0719-8801114

收稿日期: 2008-05-29 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-11-28

Effect of health educational intervention on life quality of patients with decompensated liver cirrhosis

Han-Yu Zhang, Jin-E Qu, Ping Liu

Han-Yu Zhang, Jin-E Qu, Ping Liu, Department of Nutrition, Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Jin-E Qu, Department of Nutrition, Taihe Hospital, 23-1 RenMing Road, Shiyan 442000, Hubei Province, China. hbsyqje@tom.com

Received: 2008-05-29 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-11-28

Abstract

AIM: To investigate effect of health educational intervention on life quality of patients with decompensated liver cirrhosis.

METHODS: A total of 58 patients with decompensated liver cirrhosis were randomly divided into the intervention group ($n = 30$) and the control group ($n = 28$). The patients in control group only received medication treatment, while the patients in intervention group were given health educational intervention in addition to medication. Life quality of the patients was assessed before and after treatment according to SCL-90 scale, health belief scale and quality of life scale.

RESULTS: There was statistically significant difference between the intervention group and control group with the scores in mental disorder (Anxiety, fear, depression, hostility and somatization), health belief (Compliance behavior, healthy lifestyle, treatment satisfaction) and quality of life scale (physical, psychological, social and material functions and scores) ($t = 4.23, 5.31, 4.82, 5.01, 6.44; \chi^2 = 33.6, 13.72, 20.15, 24.92$;

$t = 10.58, 6.61, 5.47, 4.85, 6.72$, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Health educational intervention can improve the life quality of patients with decompensated liver cirrhosis.

Key Words: Health education; Decompensated liver cirrhosis; Quality of life

Zhang HY, Qu JE, Liu P. Effect of health educational intervention on life quality of patients with decompensated liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(33): 3814-3817

摘要

目的: 探讨健康教育干预对肝硬化失代偿期患者生活质量的影响。

方法: 选择我院2005-08/2007-07住院的肝硬化失代偿期患者58例, 随机分为两组, 干预组($n = 30$)除常规临床治疗外, 给予健康教育干预; 对照组($n = 28$)常规临床治疗。治疗前后两组均用SCL-90量表、健康信念调查表和肝硬化失代偿期患者生活质量表进行评估。

结果: 健康教育干预后两组心理障碍(焦虑、恐惧、抑郁、敌对、躯体化), 健康信念(遵医行为、健康生活方式、治疗满意度、疾病重视程度)和生活质量(躯体、心理、社会及物质状态功能和总分)比较, 差异均具有统计学意义($t = 4.23, 5.31, 4.82, 5.01, 6.44; \chi^2 = 33.6, 13.72, 20.15, 24.92; t = 10.58, 6.61, 5.47, 4.85, 6.72$, 均 $P < 0.05$)。

结论: 对肝硬化失代偿期患者实施健康教育干预可以提高其生活质量。

关键词: 健康教育; 肝硬化失代偿期; 生活质量

张汉语, 瞿金娥, 刘平. 健康教育干预对肝硬化失代偿期患者生活质量的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(33): 3814-3817
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3814.asp>

0 引言

肝硬化病程长、迁延不愈, 而且缺乏特效的治

■同行评议者

黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科; 陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

疗方法, 治疗费用昂贵, 因此, 肝硬化患者易产生很多心理问题, 导致躯体症状加重影响疗效和生活质量^[1-3]. 本文探讨健康教育干预对肝硬化失代偿期患者生活质量的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2005-08/2007-07我院肝硬化失代偿期患者58例(肝性脑病患者及肝功能处于Child评分C级患者不纳入对象), 年龄26-70(平均年龄47)岁, 其中男39例, 女19例. 文化程度: 初中及以下32例(55%)、中专10例(17.2%)、高中及以上16例(27.8%). 住院经济顾虑: 有顾虑50例(86.2%)、无顾虑8例(13.8%). 病因类型: 病毒性肝炎45例、酒精中毒5例、其他8例. 入院时将患者随机分为干预组(30例)和对照组(28例), 两组原发病因、病程、性别、年龄、文化程度比较, 差异无显著性意义(均 $P>0.05$).

1.2 方法

1.2.1 健康教育方法: 两组患者均进行常规药物治疗, 对照组行常规护理; 观察组在此基础上实施健康教育干预. 针对患者存在的知识缺乏、营养失调、潜在并发症等护理问题进行评估、指导. (1)提供规范的治疗护理方案: 因人而异掌握健康教育时机, 首先观察病情, 处理患者急需解决的护理问题, 为患者创造安静舒适的环境, 稳定患者情绪, 使其对自己有一定信任后, 再开始健康教育效果会更好^[4]. (2)接触感召: 我国古代称“医本仁术”, 护理也是“仁术”. 护理学是关怀、同情、照料患者的技术. 每当我们接触或护理患者时可以看到患者或亲属总是用渴望的眼神盯着我们, 因此, 我们应表情、语言、技能、仪表和对护理工作的严格要求等影响患者心态, 使患者信赖、积极配合各项治疗和护理工作. 神圣的护理职业要求我们用良好情绪感染他们, 因此我们把接触感召放在首位, 禁忌消极暗示, 加强护患沟通与患者建立良好的信任关系. (3)饮食指导: 既要遵守饮食限制又要保证饮食营养是改善肝功能、延缓病情进展的基本措施^[5]. 以高热量、高蛋白、高维生素易消化食物为主. 忌坚硬刺激性食物、细嚼慢咽, 避免过饱有食管胃底静脉曲张的患者以软食为主. 有腹水者可进高蛋白低盐饮食, 有肝性脑病先兆者, 应限制蛋白质摄入. 每周邀请营养师护理查房1次, 指导患者或家属做好饮食记录, 定期测量身高、体质量、腹围评估患者营养状况. (4)心理指导: 肝硬化失代偿期是肝病进展的

最后阶段, 病情相对较重, 病情迁延不愈, 而且无特效治疗方法. 患者会产生焦虑、恐惧、敌对、人际关系敏感、轻生厌世、躯体化等心理问题^[6], 严重影响患者治疗效果, 并可导致肝硬化患者生活质量下降. 因此, 护理人员用积极的暗示, 激发患者潜能, 消除患者轻生厌世的心理. 在与患者交流中, 通过列举病情恢复良好的例子来激励患者的信心, 护士应理解并同情患者, 耐心向患者讲解各种费用, 积极争取社会家庭支持, 加强护理沟通, 保持乐观情绪, 鼓励患者适当的参加一些娱乐活动如下棋、绘画、打扑克、听音乐等, 增加探视和陪伴的次数, 让患者不感到被遗弃. (5)活动指导: 肝硬化失代偿期患者以卧床休息为主, 平卧可减少患者的体能消耗, 减轻肝脏的负担, 注意生活有规律, 避免用力排便和搬重物. 但过多的躺卧易引起消化不良、情绪不佳, 故应视病情适量活动, 活动量以不加重疲劳和其他症状为度. (6)用药指导: 教育患者根据医嘱用药, 避免滥用药物、禁用损害肝脏的药物, 应用利尿剂时不可过量, 以免引起严重并发症. 详细向患者介绍药物的名称、剂量、给药时间和方法, 教会其观察药物疗效和不良反应. (7)健康教育方式: 85.3%的患者对健康教育知识的需求形式是与医务人员交谈通过医护人员的讲解示范, 直接获得更多的健康教育知识^[7]. 护士可根据患者年龄、性格、特征、理解能力等不同情况选用聊天式、教导式、探讨式教育形式进行针对性健康教育, 还可通过发放健康教育手册、病房内宣传板报等人性化的健康宣传, 利用每月3-4次的医患沟通会, 组织患者交流经验, 畅谈感受、相互鼓励、增强信心. (8)出院指导: 指导病情稳定患者每月定期复查肝肾功能, 每周称体重、注意保持皮肤清洁, 保持大便通畅, 及时发现并发症的出现, 医院每周电话或书信、家庭访视1次, 建立护患联系, 进行个别指导.

1.2.2 效果评价: 两组患者均在健康教育干预前及干预后1 mo填写以下各评定量表: (1)症状自评量表(SCL-90)^[8], 主要包括焦虑、恐惧、敌对、抑郁、躯体化等5个因子, 采用5级评分(0-4), ≥ 3 分视为存在心理障碍. (2)健康信念调查表(自行设计), 通过患者的遵医行为, 疾病的重视程度、健康的生活方式、治疗满意度来反映. (3)健康教育干预后两组患者生活质量评分结果比较, 应用生活质量综合评定量表(GQOLI-74)调查^[9], GQOLI-74主要用于特定人

■研发前沿

肝硬化病程长, 迁延不愈, 而且缺乏特效的治疗方法, 治疗费用昂贵, 患者缺乏治疗信心, 担心给家庭带来经济负担常常自责、痛苦绝望, 而这一负性情绪非常影响治疗.

■相关报道

肝硬化是常见的慢性进行性肝病, 调查表明70%以上的患者对肝硬化的病因, 临床表现缺少了解, 95%以上的人对治疗护理知识缺少了解, 近98%的患者生活方式方面存在不同程度的问题.

■应用要点

有针对性地肝硬化失代偿期患者进行心理护理,消除不良情绪刺激,增强战胜疾病的信心,以最佳的心理状态积极配合治疗和护理,能有效地降低医疗费用,提高治疗效果和生活质量。

表 1 教育干预后两组SCL-90因子分比较

分组	<i>n</i>	焦虑	恐惧	抑郁	敌对	躯体化
对照组	28	1912 ± 3.60	15.40 ± 2.50	13.18 ± 1.92	13.12 ± 2.15	24.57 ± 2.51
干预组	30	10.38 ± 1.23 ^a	9.38 ± 1.27 ^c	8.29 ± 1.26 ^e	7.20 ± 1.12 ^g	10.13 ± 1.12 ⁱ

$t_a = 4.23$, $t_c = 5.31$, $t_e = 4.82$, $t_g = 5.01$, $t_i = 6.44$, 均 $P < 0.05$ vs 对照组。

表 2 教育干预后两组患者健康信念调查结果比较 *n*(%)

分组	<i>n</i>	遵医行为		健康生活方式		治疗满意度		疾病重视程度	
		能	不能	了解	不了解	满意	不满意	重视	不重视
对照组	28	5(17.85)	23(82.14)	10(35.71)	18(64.28)	8(28.57)	20(71.42)	6(21.42)	22(78.57)
干预组	30	28(93.33) ^a	2(6.66) ^a	25(83.33) ^c	5(16.66) ^c	26(86.66) ^e	4(13.33) ^e	26(86.66) ^g	4(13.33) ^g

$\chi^2_a = 33.6$, $\chi^2_c = 13.72$, $\chi^2_e = 20.15$, $\chi^2_g = 24.92$, 均 $P < 0.05$ vs 对照组。

表 3 健康教育干预后两组患者生活质量评分结果比较

分组	<i>n</i>	躯体功能	心理功能	社会功能	物质状态功能	生活质量总分
对照组	28	18.21 ± 1.57	39.1 ± 3.21	47.2 ± 2.45	46.75 ± 2.37	45.33 ± 2.40
干预组	30	77.41 ± 2.52 ^a	75.4 ± 2.58 ^c	68.7 ± 1.58 ^e	62.56 ± 1.58 ^g	71.03 ± 2.62 ⁱ

$t_a = 10.58$, $t_c = 6.61$, $t_e = 5.47$, $t_g = 4.85$, $t_i = 6.72$, 均 $P < 0.05$ vs 对照组。

群(如老年人、慢性患者)生活质量综合评定。包括躯体功能、心理功能、社会功能、物质生活状态4个维度,20个因子共计74个条目,得分越高,提示生活质量越好,被调查者自行填写或指导填写。发放问卷58份,回收58份,合格率100%。

统计学处理 健康信念比较采用 χ^2 检验,SCL-90评分和生活质量评分比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 两组SCL-90评分比较 健康教育前,两组患者均不同程度存在焦虑、恐惧、敌对、抑郁等心理障碍,两组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。健康教育干预后两组SCL-90比较,差异具有统计学意义(表1)。

2.2 两组健康信念比较 通过发放健康信息调查表,在实施健康教育前两组健康信念差异无显著性意义($P > 0.05$)。实施健康教育干预后,两组患者健康信念调查结果比较差异具有统计学意义(表2)。

2.3 两组生活质量比较 两组患者在实施健康教育干预前均有不同程度的乏力、腹胀、厌食、

恶心、头晕、失眠、腹泻等症状,两组患者在心理功能、躯体功能、社会功能、物质状态功能4个方面比较,差异均无显著性意义($P > 0.05$)。实施健康教育干预后,两组生活质量比较差异具有统计学意义(表3)。

3 讨论

肝硬化失代偿期患者存在着各种心理问题,尤为突出是焦虑、恐惧、抑郁、敌对、躯体化、人际关系敏感等。其中躯体化症状的改善与治疗效果直接相关。肝硬化病程长,迁延不愈,而且缺乏特效的治疗方法,治疗费用昂贵,患者缺乏治疗信心,担心给家庭带来经济负担常常自责、痛苦绝望,而这一负性情绪非常影响治疗。本研究发现实施健康教育可以更多地了解患者的心理感受,鼓励患者交流,医护人员认真倾听患者主诉,帮助患者适应新的角色,满足患者入院后被尊重的心理需求,并列举康复良好的病例以缓解患者心理压力。研究表明,干预组通过健康教育后SCL-90各因子显著低于对照组($P < 0.01$),提示有针对性地对肝硬化失代偿期患者进行心理护理,消除不良情绪刺激,增强战胜

疾病的信心, 以最佳的心理状态积极配合治疗和护理, 能有效地降低医疗费用, 提高治疗效果和生活质量。

肝硬化是常见的慢性进行性肝病, 调查表明70%以上的患者对肝硬化的病因, 临床表现缺少了解, 95%以上的人对治疗护理知识缺少了解, 近98%的患者生活方式方面存在不同程度的问题^[10]。健康教育是肝硬化患者主要的护理干预手段, 护理人员应有计划开展系统性和有针对性的健康教育, 讲解肝硬化的病因、治疗、转归以及生活饮食调理等, 使患者掌握相关知识和履行遵医行为, 提高患者及家属对肝硬化的认识, 消除紧张焦虑情绪, 提高患者心理应激能力, 使患者主动积极配合治疗, 本研究结果显示健康教育干预后患者能够重视疾病, 能够采取健康的生活方式, 治疗满意度也大大提高, 患者能积极配合治疗, 主动参与治疗。健康教育提高了患者的健康信念。

由于肝硬化患者病程长症状不易改善, 预后差, 所以医护人员通过实施健康教育与患者建立良好的关系给患者提供心理支持。主动多接触患者, 鼓励患者倾诉, 尽量满足患者合理的生理和心理需求。在健康教育干预过程中, 由于患者提高了对自己疾病的认识, 同时患者还有机会相互交流对疾病的体验、消除了不必要的担心和恐惧, 从而为改善患者的社会功能奠定了基础。实践证明, 良好的医患关系是提高患者生活质量的关键, 调动支持系统给予医疗保障, 以减轻患者心理压力和经济负担, 使患者能享受到家庭的温暖, 树立治疗信心, 使肝硬化患者能改变不良生活方式, 自觉采纳有益于健康的

行为和生活方式, 从而促进健康和提高生活质量^[11-13]。

肝硬化是一种慢性常见、病死率高的疾病, 病程长、并发症多, 在应用生物医学手段对症治疗后, 如何进行控制症状, 预防并发症, 改善患者的社会功能, 提高其生活质量已成为我们今后工作努力的方向。而健康教育干预正是根据上述目标设计而成。本次研究结果显示, 对肝硬化患者实施健康教育可节省人力、时间、增强健康教育的效率, 提高患者生活质量和满意度。

4 参考文献

- 1 王莉. 肝炎后肝硬化病人的心理表现与护理. 现代医药卫生 2005; 21: 2836
- 2 谷金环, 张淑华, 刘宝泉, 张宝山. 心理护理对焦虑症病人康复的对照研究. 临床护理杂志 2005; 4: 59-61
- 3 林佩纯, 杨玉云, 秦宏. 健康教育对肝硬化患者生存质量的影响. 临床和实验医学杂志 2007; 6: 20-21
- 4 胡容. 护士长对健康教育存在问题的认识情况调查与分析. 护理学杂志 2001; 16: 686-688
- 5 尤黎明, 吴英. 内科护理学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 231
- 6 杜召云, 成义仁, 刘继兰. 护理心理学. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 138
- 7 余权珍. 肝硬化患者对健康教育的需求调查. 时珍国医国药 2006; 17: 215-881
- 8 张明园. 精神科评定量表手册. 第2版. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998: 81
- 9 李凌江, 郝伟, 杨德森, 张亚林, 吴舸, 罗友根, 黄俊, 张斌, 刘解宁, 廖巨福. 社区人群生活质量研究-Ⅲ生活质量问卷(QOLI)的编制. 中国心理卫生杂志 1995; 9: 227-231
- 10 雷国英. 护理程序在肝硬化病人健康教育中的应用. 南华大学学报(医学版) 2002; 30: 312-313
- 11 谢立春. 住院病人实施健康教育路径探讨. 护理学杂志 2004; 19: 63-64
- 12 冷玉霞. 浅谈对住院患者的健康教育. 齐齐哈尔医学院学报 2007; 28: 1535
- 13 王丽芬, 马湘云. 住院患者健康教育的实施及质量管理. 护理实践与研究 2007; 4: 31-32

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本研究设计合理, 内容新颖, 对临床晚期肝病患者的辅助治疗及护理有一定的指导价值。

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

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com>/在线提交未成功, 请通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d。来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑: 张海宁 2008-11-28)

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!

曹秀峰 主任医师
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈耀凯 副教授
中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

成军 教授
北京地坛医院传染病研究所

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

范学工 教授
中南大学湘雅医院感染病科

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

高春芳 研究员
中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

巩鹏 教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

管冬元 副教授
上海中医药大学基础医学院实验医学教研室

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

李华山 副主任医师
中国中医科学院广安门医院肛肠科

李涛 副主任医师
北京大学人民医院肝胆外科

刘杞 教授
重庆医科大学病毒性肝炎研究所

吕宾 教授
浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

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

汪思应 教授
安徽医科大学实验动物中心

王炳元 教授
中国医科大学附属第一医院消化内科

王晓艳 副教授
湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

熊斌 教授
武汉大学中南医院肿瘤科

杨林 副研究员
中山大学附属第三医院感染病科

张声生 教授
首都医科大学附属北京中医医院消化中心

张学 教授
中国协和医科大学基础医学院医学遗传学系

张宗明 教授
清华大学第一附属医院消化医学中心

邹小明 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科