

循环肿瘤细胞研究进展

周晴接, 杨建民

周晴接, 杨建民, 浙江省人民医院消化内科 浙江省杭州市 310014

周晴接, 温州医学院研究生部 浙江省温州市 325000
杨建民, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事消化系统肿瘤相关基础与临床研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30570816

作者贡献分布: 周晴接与杨建民对此文所作贡献均等; 写作由周晴接完成, 杨建民选题、审校.

通讯作者: 杨建民, 教授, 主任医师, 博士生导师, 310014, 浙江省杭州市上塘路158号, 浙江省人民医院消化内科.

jianminyang@hotmail.com

电话: 0571-85893430

收稿日期: 2010-01-08 修回日期: 2010-03-26

接受日期: 2010-03-29 在线出版日期: 2010-04-18

Advances in research on circulating tumor cells

Qing-Jie Zhou, Jian-Min Yang

Qing-Jie Zhou, Jian-Min Yang, Department of Gastroenterology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570816

Correspondence to: Professor Jian-Min Yang, Department of Gastroenterology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China. jianminyang@hotmail.com

Received: 2010-01-08 Revised: 2010-03-26

Accepted: 2010-03-29 Published online: 2010-04-18

Abstract

Circulating tumor cells (CTCs) are defined as cells that have detached, spontaneously or as a result of clinical operations, from a primary tumor or its metastatic lesions and circulate in the peripheral blood. They are considered as the primary reason for postoperative recurrence and distant metastasis of malignant tumors. In recent years, non-invasive detection of circulating tumor cells has become a new type of diagnostic tool to evaluate postoperative recurrence, distant metastasis, and prognosis. This article reviews recent advances in research on circulating tumor cells.

Key Words: Circulating tumor cell; Malignant tumor; Metastasis

Zhou QJ, Yang JM. Advances in research on circulating tumor cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1081-1087

摘要

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是指自发或因诊疗操作由实体瘤或转移灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞, 是恶性肿瘤患者出现术后复发和远处转移的重要原因. 近年来, 随着检测技术的不断改进, CTCs检测作为一种新型的非侵入性诊断工具, 在早期发现患者术后复发与远处转移、评估疗效与预后等方面的应用价值已成为临床研究的热点. 本文简要综述近年CTCs检测的研究进展及其临床应用状况.

关键词: 循环肿瘤细胞; 恶性肿瘤; 转移

周晴接, 杨建民. 循环肿瘤细胞研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1081-1087

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1081.asp>

0 引言

分子生物学及临床研究显示, 肿瘤的侵袭和微转移很可能在肿瘤发生的早期就已出现^[1], 而目前临床肿瘤的诊断仍高度依赖于影像学及血清肿瘤标志物的检查, 难以早期发现肿瘤的转移或复发, 也难以及时反映疗效. 因此, 早期发现微转移不仅对肿瘤复发和预后的判断有重要意义, 而且对指导临床治疗也有很大价值. 大量研究显示, 循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)的检测有助于早期发现肿瘤的微转移、监测术后复发、评估疗效及预后, 以及选择合适的个体化治疗^[2].

1 CTCs概述

早在1869年, Ashworth发现血液中的一种血细胞同尸检发现的肿瘤细胞相似, 首次提出CTCs的概念^[3]. 目前CTCs定义为自发或因诊疗操作由实体瘤或转移灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞. 进入循环未被清除的肿瘤细胞通过迁移、黏附、相互聚集形成微小癌栓, 并在一定条件下发展为转移灶^[4]. 近年来, 随着人们对肿瘤转移机制研究的深入, 以及检测技术的不断改进, CTCs的检测已取得了一些突破性的进展, 部分检测方法

■背景资料

分子生物学及临床研究显示, 肿瘤的侵袭和微转移很可能在肿瘤发生的早期就已出现, 而循环肿瘤细胞(CTCs)是恶性肿瘤患者出现术后复发和远处转移的重要原因, 因此早期检测CTCs不仅对肿瘤复发和预后的判断有重要意义, 而且对指导临床治疗也有很大价值.

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

■研发前沿

随着检测技术的不断改进, CTCs检测作为一种新型的非侵入性诊断工具, 在早期发现肿瘤术后复发与远处转移、评估疗效与预后等方面的应用价值已成为临床研究的热点。

在稳定性、敏感性及特异性等方面均已较理想, CTCs的临床应用研究也已取得明显进展。

2 CTCs的富集

由于CTCs在外周血中的数量极少, 通常需在约1亿个白细胞和500亿个红细胞中寻找仅有的数个肿瘤细胞^[1], 因此为了提高CTCs的检出率, 通常需在检测前行CTCs富集。目前CTCs的富集方法按其原理主要分为免疫磁性分离法和基于形态学的富集法。

2.1 免疫磁性分离法(immunomagnetic separation, IMS) IMS的原理是基于肿瘤细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合, 继而在外加磁场中通过相应抗原抗体复合物与磁珠相连被吸附而滞留在磁场中, 无该种表面抗原的其他细胞由于不能与连接着磁珠的特异性单抗结合而没有磁性, 不在磁场中停留, 从而使肿瘤细胞得以分离。磁珠可分为阳性分选磁珠和阴性分选磁珠2种, 其中阳性分选磁珠的富集效率与一般的分离方法相比可提高 $(1-10) \times 10^3$ 倍^[4]。目前基于免疫磁性原理富集或同时检测CTCs的技术主要有CellSearch系统、CTCs-Chip、免疫磁性细胞分选仪(MACS)、RARE、AdnaTest癌细胞检测系统等^[5]。IMS可对外周血中的肿瘤细胞进行 $(1-20) \times 10^4$ 倍的富集, 与常规检测技术(如免疫细胞化学法, 流式细胞术, RT-PCR等)相结合, 可大大提高外周血样本中肿瘤细胞的浓度而提高检出率^[6]。Zigeuner等^[6]对于免疫磁性分离法中的阳性及阴性分离法以及单纯免疫细胞化学法进行了定量分析比较, 在每 2×10^7 单个核细胞加入一定量的肿瘤细胞时, 后者的检出率仅为23%, 而利用免疫磁珠技术的检出率可达93.3%, 同时分离纯化后的肿瘤细胞活性高达85%以上。因此认为, 免疫磁性分离富集可明显增加免疫细胞化学法检测外周血肿瘤细胞的检出率。但由于目前仍缺乏高特异的肿瘤相关抗原, IMS在分离过程中仍可能因为CTCs的丢失而出现假阴性或假阳性结果。

2.2 基于形态学的富集法 密度梯度离心法是目前实验室常用的一种基于形态学特点富集肿瘤细胞的方法, 可从外周血中分离单个核细胞(包括CTCs), 设备要求不高, 方法较为简单, 但该方法缺乏特异性, 易导致缺乏相应密度的肿瘤细胞丢失^[7]。目前在此基础上建立起来的OncoQuick分离法, 用一种专用的50 mL试管, 内置多孔屏障, 其下为密度梯度分离液, 使用

时将标本置于屏障之上, 从而避免在离心之前与分离液混合而污染。Rosenberg等^[7]通过比较OncoQuick分离法与传统的Ficoll分离法发现, OncoQuick分离法对肿瘤细胞的平均回收率更高(87% vs 84%), 富集效果更好。但在分离过程中仍可能丢失少量肿瘤细胞。

此外, 2000年由Vona等^[8]提出的基于肿瘤细胞大小的分离法(isolation by size of epithelial tumor cells, ISET), 主要根据肿瘤细胞与正常细胞的大小不同来分离肿瘤细胞。这种通过物理方法分离的细胞形态保存完整, 表面的各种抗原或分子标记均无破坏, 不影响细胞的特性, 为后续的检测提供了良好的条件, 且该方法设备技术要求不高, 过程易于掌握。有学者用多种不同孔径的膜进行对比研究, 结果认为用8 μm 大小孔径的膜分离外周血肿瘤细胞效果最佳^[9]。但这也意味着ISET只能分离直径大于8 μm 的肿瘤细胞, 而目前还没报道证实所有的肿瘤细胞都大于8 μm , 使其分离的灵敏性受到质疑^[6]。

3 CTCs的检测

目前CTCs的检测方法众多, 根据检测原理可分两大类: 细胞计数法(cytometric methods)和核酸检测法(nucleic-acid based methods)。前者主要包括各种免疫细胞化学技术、流式细胞术等; 后者主要包括聚合酶链反应、逆转录聚合酶链反应及其各种改进的技术等。

3.1 免疫细胞化学法(immunocytochemistry, ICC) ICC是指以显色剂标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应和细胞化学的呈色反应, 对相应抗原进行定位、定性和定量测定的技术。其检测的肿瘤标志物主要分3类: (1)上皮细胞角蛋白(CK), 如CK19、CK20; (2)上皮细胞膜特异性抗原, 如黏蛋白类, 包括EMA、HMFG、HEA-125等; (3)肿瘤相关糖蛋白(TAG)。ICC检测的主要优点是可进行细胞大小和形态学的分析, 缺点是敏感性低, 只能从 $(1-10) \times 10^5$ 个正常细胞中发现1个肿瘤细胞, 且应用免疫细胞化学法检测循环血中肿瘤细胞时, 每个载玻片上所能检测的细胞样本量仅为 5×10^5 个细胞^[10], 难以从外周血中大量的单核细胞中检测出极少量的肿瘤细胞, 因此单纯应用免疫细胞化学法敏感性低, 难以满足临床诊断需要。为了能大范围检测外周血中稀少的肿瘤细胞, 近年来又相继研发出光纤阵列扫描术(fiber array scanning technology, FAST)^[11], 激光扫描细胞计量仪(laser

scanning cytometry, LSC)^[12]等, 能够在传统的显微镜技术基础上高速扫描并快速、准确的定位免疫荧光标记的肿瘤细胞, 使检测的敏感性和实效性显著提高。

3.2 流式细胞术(flow cytometry, FCM) FCM是一项集激光、电子物理、光电测量、计算机、细胞荧光化学及单克隆抗体技术为一体的新型技术。其优点是可以定量计数肿瘤细胞数量, 检测数据较精确, 还可对细胞进行多参数分析。何成全等^[13]应用流式细胞术检测66例胃癌患者外周血中CK19、CK20的表达。结果66例胃癌患者CK19、CK20、CK19+CK20阳性表达率分别为53.1%(35/66)、56.1%(37/66)、46.9%(31/66), 检测的阳性率与患者的TNM分期及转移程度相关, 且检测胃癌远处转移的敏感度高达90.0%。认为应用FCM检测CK19、CK20的表达对胃癌微转移的诊断具有一定临床意义。但由于FCM检测靶细胞的敏感度仅为1/1-10万, 而外周血中肿瘤细胞的数量常少于1/100万, 因此应用FCM检测肿瘤细胞的价值在很大程度上依赖于可分析的细胞数量^[14]。此外标本固定贮存及研究人员间的差异等因素的干扰, 以及价格昂贵、耗时较长等都限制了该技术的广泛应用。

3.3 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) PCR检测肿瘤患者外周血中的CTCs主要是通过检测癌基因、抑癌基因的突变或染色体质量排产生的异常DNA。1977年, Leon等^[15]用放射免疫测定法首次在肿瘤患者外周血中检测到了游离DNA。随后研究显示, 神经母细胞瘤患者外周血中线粒体DNA^[16]及N-MYC(神经母细胞瘤MYC基因衍生的一个致癌基因)DNA^[17,18]的扩增均明显多于健康志愿者。然而, 除了少数实体肿瘤的染色体易位(如尤文氏肉瘤的t(11; 22)(q24; q12)易位)或基因突变(如胃肠道肿瘤的RAS基因), 绝大部分实体肿瘤的DNA变化没有明显的特异性, 且很少适合用CTCs检测^[2], 因此该方法虽然敏感性高[能从 $(1-10) \times 10^6$ 个正常细胞中检测出1个肿瘤细胞], 但易于出现假阳性, 且适用范围有限。此外, 由于外周血中的CTCs和核酸的半衰期不稳定, 检测到的游离DNA可能仅仅是核酸而非真正的肿瘤细胞, 因此应用PCR技术通过DNA标记指标检测CTCs的特异性不高, 在临床实践中尚不能达到理想的效果。

3.4 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) RT-PCR

检测CTCs是在PCR的基础上扩增由肿瘤特异性mRNA序列逆转录的DNA片段, 从而识别组织或肿瘤特异性mRNA的表达或某些基因改变后RNA水平的异常。由于这些特异性mRNA通常不表达于正常外周血细胞, 且半衰期较短, 在细胞死亡后会迅速被RNA酶降解, 因此在外周血中检测到的这些特异性mRNA可以间接提示CTCs的存在^[19]。RT-PCR的灵敏度很高, 目前已可在 10^7-10^8 个外周血单核细胞中检测出单个肿瘤细胞^[20]。然而, RT-PCR及其各种改进的技术都是以某个肿瘤标志物的mRNA为标志物, 因此易受到样本污染, 靶基因在正常细胞中的表达及伪基因的扩增等影响而出现假阳性。Kowalewska等^[21]采用RT-PCR方法以5种肿瘤抗原(SCCA, EGFR, hMAM, SBEM, CA9)mRNA标记检测正常志愿者外周血显示全阴性, 而在单纯炎症患者中却可出现4项(SCCA, EGFR, hMAM, SBEM)阳性, 表明炎症反应也可引起肿瘤抗原mRNA的升高。另有研究显示^[22], 慢性炎症性疾病患者的外周淋巴结和50%的骨髓样本中都可检测到CK19与CEA mRNA的表达, 因此癌症患者伴随的炎症反应可能会增加RT-PCR法检测CTCs时的假阳性率, 从而影响检测的特异性。此外, 游离的RNA和杂交DNA也可能导致假阳性结果的出现^[23]。为提高检测的特异性和敏感性, 近几年又开发出实时定量RT-PCR、荧光定量RT-PCR和巢氏RT-PCR等新方法^[24,25], 与常规的RT-PCR方法相比, 具有引物和探针的双重特异性, 扩增效率高、反应污染少、Ct值稳定等优势^[26]。RT-PCR及其各种改进的技术目前在CTCs的检测中应用最广泛, 且被认为是目前检测CTCs最有效的方法, 已被成功地用于检测多种实体肿瘤的CTCs, 如恶性黑色素瘤^[27]、软组织腺泡状肉瘤^[28]、前列腺癌^[29]、乳腺癌^[30]、胃癌^[31]及结直肠癌^[32]等。

4 富集与检测技术结合

为了提高检测的敏感性和特异性, 近年来的文献中多使用富集与检测技术相结合的自动化检测系统, 目前使用最多的就是CellSearch检测系统。CellSearch系统是目前唯一一项通过美国FDA批准用于临床的CTCs检测技术, 已被应用于预测转移性乳腺癌、结直肠癌或前列腺癌患者的无进展存活率和总存活率。其原理是采用一种可同铁微粒相结合的抗体, 称为

■相关报道

Uen等应用RT-PCR法检测438例结肠癌根治术后患者的外周血CTCs, 结果显示淋巴结转移、血管浸润和术后CTCs的持续阳性可作为患者术后复发的独立预后因子, 术后CTCs的持续阳性与患者术后较差的无复发生存率密切相关, 且检测CTCs水平有助于确定是否对其采用术后辅助治疗。

■创新盘点

CellSearch检测系统作为一项集富集与检测技术于一体的自动化检测系统,是目前唯一一项通过美国FDA批准用于临床的CTCs检测技术,已被应用于预测转移性乳腺癌、结直肠癌或前列腺癌患者的无进展存活率和总存活率。

铁磁流体,这种铁磁流体同CTCs(主要是表面的EpCAM)有极强的特异性结合能力,结合后再应用强力磁体将这些CTCs从血液样本中提取出并进行生物或化学染色,从而可以准确识别CTCs.应用CellSearch系统,只需应用7.5 mL的血液样本,即可从400多亿的血细胞中检测到单一的一个CTCs,结果相当准确. Balic等^[33]分别用CellSearch系统和Oncoquick法检测以CKs, EpCAM和DAPI标记的CTCs,两种方法在15例正常健康志愿者外周血样本中的特异性均达到100%,而在一组61例异构癌患者的外周血样本中, CellSearch系统检测出CTCs>1的样本明显多于Oncoquick(33 vs 14),中位CTCs数也较多. CellSearch系统是一项半自动化检测系统,能自动俘获从实体肿瘤上脱落后进入患者血液中的肿瘤细胞,对转移癌的诊断有很高的特异度,能鉴别所有类型的肿瘤细胞,在不同实验室间也有很好的可重复性^[34]. 但由于缺乏肿瘤特异性抗原,敏感度相对较低,会出现漏诊,且检验费用较高,使其在临床上的广泛应用受到一定限制. 此外,新近出现的CTCs-Chip也是一项集富集与检测为一体的先进技术,检测灵敏度非常高,即使只有极少量的肿瘤细胞,也只需一个步骤即可将其从全血中分离,检验可随时进行,结果不会受肿瘤细胞间断释放的影响,便于对患者进行实时监测,且不影响细胞活性,有利于进一步进行分子生物学和遗传学分析^[35].

5 CTCs的临床应用

研究发现,进入循环系统的CTCs绝大多数在机体免疫识别及杀伤等作用下发生凋亡,只有极少数能存活下来,并在一定条件下发展为转移灶. 因此,在外周血中检测到CTCs并不意味着一定存在转移灶. 尽管如此, CTCs在早期发现转移性结直肠癌,乳腺癌及前列腺癌等恶性肿瘤的微转移、监测术后复发与转移、评估疗效与预后、选择合适的个体化治疗等方面的作用已得到大量研究的证实. Sastre等^[36]使用CellSearch系统检测94例大肠癌患者的外周血CTCs,将CTCs \geq 2个/7.5 mL外周血定义为阳性,结果显示阳性率为36.2%(34/94),CTCs阳性率与原发肿瘤部位、CEA、LDH升高的水平及肿瘤分化程度无关,但与结肠癌的临床分期相关(II期20.7%, III期24.1%, IV期60.7%, $P=0.005$),且CTCs在结肠癌的早期阶段即可检

测到,表明CTCs检测有助于早期发现结肠癌及可能出现的微转移. Uen等^[32]应用RT-PCR方法以多肿瘤抗原(CK19、CK20、CEA)mRNA标记检测438例结肠癌根治术后患者的外周血CTCs,结果采用多变量比例风险回归分析,显示淋巴结转移、血管浸润和术后CTCs的持续阳性可作为患者术后复发的独立预后因子,术后CTCs的持续阳性与患者术后较差的无复发生存率密切相关,且检测CTCs水平有助于确定是否对其采用术后辅助治疗. Ignatiadis等^[37]采用RT-PCR法检测444例I-III期乳腺癌患者治疗前后的外周血CTCs,结果显示治疗前CK19 mRNA的阳性率为40.8%,平均随访56.4 mo并对其中437例接受辅助化疗的患者进行CK19 mRNA监测,发现治疗前CK19 mRNA阳性患者的DFS和OS较CK19 mRNA阴性的患者短($P<0.001$),且这种差异在雌激素受体阴性的患者中更为显著; CK19 mRNA阳性与患者更广泛的淋巴结浸润,更高的临床复发率和死亡率密切相关,治疗后CK19 mRNA仍阳性的患者DFS和OS明显较短^[38]; 此外,治疗前乳腺球蛋白A和HER-2 mRNA阳性的患者预后也较阴性的患者差^[39]. 这些结果均表明RT-PCR法检测CTCs在早期乳腺癌的预后判断与疗效评估中具有重要的潜在应用价值. Cristofanilli等^[40]进行的一项多中心、前瞻性研究使用CellSearch系统检测177例转移性乳腺癌患者治疗前后外周血CTCs,结果显示,在开始治疗前每7.5 mL外周血CTCs \geq 5个的转移性乳腺癌患者预后明显较CTCs<5个的患者差,其中位无进展生存期(PFS)(分别为2.7 mo和7 mo)和总生存期(OS)(分别为10.1 mo和>18 mo)均明显短于后者. 表明CTCs计数可作为转移性乳腺癌患者预后的独立预测指标,并对早期评估抗肿瘤治疗的疗效具有潜在价值^[41]. Ennis等^[42]、de Bono等^[43]在对前列腺癌患者的研究中也得到了相似的结论. 此外,虽然研究结果不尽相同,CTCs检测在胰腺癌^[44]、胃癌^[45,46]、膀胱癌^[47,48]及肺癌^[49,50]的临床应用中也取得了一定的进展. Bevilacqua等^[51]报道了1例患者肺组织活检显示为低分化神经内分泌瘤,但在外周血中却检测到EpCAM表达阳性的细胞,然而EpCAM通常不表达于低分化神经内分泌瘤,于是进行肝穿刺活检发现了肝内肺转移灶,最后确诊为小细胞型肺癌,这也进一步印证了外周血CTCs检测在早期诊断转移性肿瘤中的应用价值.

6 结论

外周血CTCs检测作为一种具有高度可行性和可重复性的非侵入性新型诊断工具, 在对实体肿瘤微转移的早期诊断、疗效及预后评估中的作用是显而易见的。可以预见, 随着检测技术的不断改进, 敏感性和特异性的不断提高, CTCs检测必将在临床肿瘤诊治中得到推广应用。

7 参考文献

- Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007; 253: 180-204
- Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 2006; 12: 130-139
- Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S. Review: polymerase chain reaction detection of micrometastases and circulating tumor cells: application to melanoma, prostate, and thyroid carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 1999; 8: 165-175
- Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U, Höffken K. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 617-627
- Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 463-474
- Zigeuner RE, Riesenberger R, Pohla H, Hofstetter A, Oberneder R. Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated cancer cells than immunocytochemistry in vitro. *J Urol* 2000; 164: 1834-1837
- Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, Thorban S, Nekarda H, Siewert JR. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* 2002; 49: 150-158
- Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchet C, Paterlini-Brechot P. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 57-63
- Zabaglo L, Ormerod MG, Parton M, Ring A, Smith IE, Dowsett M. Cell filtration-laser scanning cytometry for the characterisation of circulating breast cancer cells. *Cytometry A* 2003; 55: 102-108
- Molnar B, Sipos F, Galamb O, Tulassay Z. Molecular detection of circulating cancer cells. Role in diagnosis, prognosis and follow-up of colon cancer patients. *Dig Dis* 2003; 21: 320-325
- Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K, Curry DN, Humphrey M, Krivacic RT, Kroener J, Kroener L, Ladanyi A, Lazarus N, Kuhn P, Bruce RH, Nieva J. High speed detection of circulating tumor cells. *Biosens Bioelectron* 2006; 21: 1893-1899
- Tárnok A, Gerstner AO. Clinical applications of laser scanning cytometry. *Cytometry* 2002; 50: 133-143
- 何成全, 詹乾钢, 单水阳, 胡伯年, 叶平江, 冯刚, 许煥建, 付文安. 胃癌患者外周血中CK19, CK20表达的临床研究. *中国肿瘤临床* 2005; 32: 401-403
- Goodale D, Phay C, Postenka CO, Keeney M, Allan AL. Characterization of tumor cell dissemination patterns in preclinical models of cancer metastasis using flow cytometry and laser scanning cytometry. *Cytometry A* 2009; 75: 344-355
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-650
- Chiu RW, Chan LY, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, Rainer TH, Lo YM. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem* 2003; 49: 719-726
- Combaret V, Audouyoud C, Iacono I, Favrot MC, Schell M, Bergeron C, Puisieux A. Circulating MYCN DNA as a tumor-specific marker in neuroblastoma patients. *Cancer Res* 2002; 62: 3646-3648
- Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Ohira M, Nakagawara A, Kuroda H, Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5205-5210
- Ji XQ, Sato H, Tanaka H, Konishi Y, Fujimoto T, Takahashi O, Tanaka T. Real-time quantitative RT-PCR detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the LightCycler System. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 355-360
- Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* 1998; 82: 1419-1442
- Kowalewska M, Chechlińska M, Markowicz S, Kober P, Nowak R. The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2671-2674
- Jung R, Krüger W, Hosch S, Holweg M, Kröger N, Gutensohn K, Wagener C, Neumaier M, Zander AR. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* 1998; 78: 1194-1198
- Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, Arneson NC, Done SJ. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 107: 145-154
- Schüler F, Dölken G. Detection and monitoring of minimal residual disease by quantitative real-time PCR. *Clin Chim Acta* 2006; 363: 147-156
- Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 365-379
- Kahn HJ, Yang LY, Blondal J, Lickley L, Holloway C, Hanna W, Narod S, McCready DR, Seth A, Marks A. RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the blood of breast cancer patients: correlation with established prognostic parameters. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 60: 143-151
- Vendittelli F, Santonocito C, Paradisi A, Romitelli F, Concolino P, Silveri SL, Sisto T, Capizzi R, Catricalà C, Mulè A, Di Carlo A, Zuppi C, Capoluongo E. A new standardized absolute quantitative RT-PCR method for detection of tyrosinase mRNAs in melanoma patients: technical and operative

■应用要点

外周血CTCs检测作为一种具有高度可行性和可重复性的非侵入性新型诊断工具, 在对实体肿瘤微转移的早期诊断、疗效及预后评估中的作用是显而易见的。可以预见, 随着检测技术的不断改进, 敏感性和特异性的不断提高, CTCs检测必将在临床肿瘤诊治中得到推广应用。

转染*kiss-1*基因对人食管癌EC9706细胞裸鼠移植瘤的抑制作用

李晟磊, 赵志华, 张 岚, 陈奎生, 高冬玲, 张云汉, 张 蕾

■背景资料

*kiss-1*基因是近年来发现的一个新的肿瘤转移抑制基因, 他可以抑制细胞的趋化性, 增强成簇黏附激酶的表达和活性, 从而抑制肿瘤细胞的转移。本课题组在前期工作基础上将*kiss-1*基因转染了食管鳞癌EC9706细胞并筛选出稳定表达*kiss-1*基因的食管癌细胞株, 关于转染*kiss-1*基因后注射裸鼠成瘤的实验研究目前国内均尚未见报道。

李晟磊, 赵志华, 张岚, 陈奎生, 高冬玲, 张云汉, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市 450052

张蕾, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052
李晟磊, 博士, 主要从事肿瘤病理的研究。

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

作者贡献分布: 李晟磊与张蕾对此文所作贡献均等; 此课题由李晟磊与张蕾联合设计; 研究过程由李晟磊、张岚、陈奎生、高冬玲、张云汉及张蕾完成; 研究用新试剂及分析工具由张蕾提供; 数据分析由赵志华完成; 本论文写作由李晟磊与张蕾共同完成。

通讯作者: 张蕾, 副教授, 副主任医师, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院肿瘤科. zhanglei68616@yahoo.com.cn
电话: 0371-66658175

收稿日期: 2010-01-06 修回日期: 2010-03-19

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

***Kiss-1* transfection inhibits the growth of xenograft tumors derived from human esophageal carcinoma cell line EC9706 in nude mice**

Sheng-Lei Li, Zhi-Hua Zhao, Lan Zhang,
Kui-Sheng Chen, Dong-Ling Gao, Yun-Han Zhang,
Lei Zhang

Sheng-Lei Li, Zhi-Hua Zhao, Lan Zhang, Kui-Sheng Chen, Dong-Ling Gao, Yun-Han Zhang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

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

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

Correspondence to: Associate Professor Lei Zhang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhanglei68616@yahoo.com.cn

Received: 2010-01-06 Revised: 2010-03-19

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of *kiss-1* transfection on the growth of xenograft tumors derived from human esophageal carcinoma cell line EC9706 in nude mice, and to explore the feasibility of gene therapy for esophageal carcinoma.

■同行评议者

刘丽江, 教授, 江汉大学医学院病理学; 李璇, 教授, 广西肿瘤研究所

METHODS: A eukaryotic expression vector carrying the *kiss-1* gene (pcDNA3.1-Kiss-1) was transfected into EC9706 cells with Lipofectamine 2000. The cells stably expressing Kiss-1 were selected using G418. EC9706 cells untransfected or transfected with empty pcDNA3.1 plasmid were used as controls. A xenograft tumor model was then established. Tumor growth was observed. Tumor histopathological changes were determined by hematoxylin and eosin (HE) staining. The expression of *kiss-1* mRNA and protein in tumor tissue was measured by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) and Western blot, respectively.

RESULTS: *Kiss-1* transfection significantly suppressed tumor growth. Histopathological observations indicated that the volume of tumors derived from control cells were significantly bigger than that from EC9706 cells transfected with pcDNA3.1-Kiss-1 plasmid. RT-PCR and Western blot analyses indicated that the expression of *kiss-1* mRNA and protein was significantly enhanced in EC9706 cells transfected with the recombinant plasmid when compared with control cells ($F = 72.685$ and 24.807 , respectively; both $P < 0.05$).

CONCLUSION: *Kiss-1* transfection effectively inhibits the growth of subcutaneous xenograft tumors derived from EC9706 cell line in nude mice, suggesting that *Kiss-1* may be a potential molecular therapeutic target for esophageal carcinoma.

Key Words: *Kiss-1*; EC9706; Transfection; Nude mouse; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

Li SL, Zhao ZH, Zhang L, Chen KS, Gao DL, Zhang YH, Zhang L. *Kiss-1* transfection inhibits the growth of xenograft tumors derived from human esophageal carcinoma cell line EC9706 in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1088-1092

摘要

目的: 研究转染*kiss-1*基因对人食管癌EC9706细胞裸鼠皮下移植瘤的作用, 探讨其在食管癌

基因治疗中的可行性和特异性。

方法: 在食管癌细胞系EC9706中转染*kiss-1*基因, 经G418筛选, 建立稳定高表达Kiss-1蛋白的细胞系。稳定表达该基因的细胞为转染*kiss-1*基因组, 转染空质粒细胞及未处理细胞为对照组, 建立裸鼠荷瘤模型; 监测肿瘤生长变化, HE染色观察肿瘤病理学变化, RT-PCR、Western blot方法检测*kiss-1* mRNA和蛋白变化。

结果: 转染*kiss-1*基因组肿瘤生长受到显著抑制; HE染色显示转染*kiss-1*基因组及转染空质粒组肿瘤组织内坏死均较空白对照组多; RT-PCR、Western blot结果表明转染*kiss-1*基因组裸鼠肿瘤组织*kiss-1* mRNA和蛋白表达均显著升高, 三组间比较差异具有统计学意义($F=72.685, 24.807$, 均 $P<0.05$)。

结论: 转染*kiss-1*基因能抑制人食管癌EC9706细胞裸鼠皮下移植瘤的形成, 且能有效上调*kiss-1* mRNA和蛋白的表达, 可为食管癌的基因治疗提供新的靶点、开辟新的思路。

关键词: *kiss-1*; EC9706; 转染; 裸鼠; 逆转录聚合酶链反应; 蛋白免疫印迹

李晟磊, 赵志华, 张岚, 陈奎生, 高冬玲, 张云汉, 张蕾. 转染*kiss-1*基因对人食管癌EC9706细胞裸鼠移植瘤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1088-1092
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1088.asp>

0 引言

*kiss-1*基因是近年来发现的一个新的肿瘤转移抑制基因, 定位于人染色体1q32-q41, 由4个外显子组成。他可以抑制细胞的趋化性, 增强成簇黏附激酶的表达和活性, 从而抑制肿瘤细胞的转移^[1-4]。本研究首先在食管癌细胞系EC9706中转染*kiss-1*基因, 建立了稳定高表达Kiss-1蛋白的细胞系, 然后将不同组的细胞注射入裸鼠皮下成瘤, 之后采用RT-PCR及Western blot等实验方法, 分别检查了不同组裸鼠移植瘤组织中*kiss-1*基因蛋白及mRNA表达水平的变化。从不同角度对*kiss-1*基因抑制肿瘤转移的机制进行初步探索。旨在进一步探讨*kiss-1*基因在食管鳞癌发生过程中的作用, 为寻找检测食管鳞癌的新的分子标记奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA3.1真核表达质粒由郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室保存。

pcDNA3.1-Kiss-1真核表达质粒由本课题组构建, 经酶切及测序鉴定后保存在本实验室。食管癌细胞系EC9706由中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室惠赠。One step RNA PCR Kit(AMV)购自大连宝生物工程有限公司; 凯基全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; SP免疫组织化学检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Lipofectamine2000购自Invitrogen公司; Kiss-1兔抗人多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; 引物由北京奥克生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与基因转染: 细胞在含有100 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的完全培养基中37℃、50 mL/L CO₂条件下培养, 以 $1-2 \times 10^5$ /孔的密度接种于24孔板上, 待细胞长至90%-95%融合时, 按试剂盒要求将pcDNA3.1-Kiss-1质粒与脂质体混合后加入24孔板中, 轻微混匀后, 置37℃孵箱中培养, 转染4-6 h换液, 加入完全培养液终止转染, 并以pcDNA3.1空质粒转染做阴性对照。于转染后48 h加入终浓度为800 mg/L的G418, 连续应用2 wk, 挑取肉眼可辨的单克隆细胞, 以G418终浓度为300 mg/L继续扩大培养, 获得稳定转染细胞。

1.2.2 转染细胞的裸鼠荷瘤实验及分组: 4-6 wk鼠龄BalB/c雌性裸鼠, 平均质量18-22 g, 购自中国科学院上海斯莱克实验动物中心。在河南省肿瘤病理重点实验室动物实验中心层流净化室无菌饲养。取对数生长期细胞, 胰酶消化, PBS调整细胞悬液浓度至 5×10^{10} /L, 在裸鼠腋下接种0.2 mL。15只裸鼠随机分组, 每组5只。A组接种pSU2PER2EGFP2STA T3重组体转染细胞, B组接种空载体转染细胞, C组接种未转染细胞。注射7 d开始每3天游标卡尺测量瘤体大小, 每隔3 d测量肿瘤的长径(L)和短径(S), 至28 d统一处死裸鼠, 取下肿瘤组织, 根据公式 $V(\text{cm}^3) = (L \times S^2)/2$ 来计算肿瘤的体积。

1.2.3 Western blot检测蛋白表达: 按照总蛋白提取试剂盒说明书(凯基生物公司)提取总蛋白, Bradford法检测蛋白质的含量, 蛋白经SDS-PAGE电泳(5%浓缩胶, 15%分离胶)后转移至硝酸纤维素膜, 用含1%脱脂奶粉的TBST封闭30 min, 一抗于4℃孵育过夜, TBST洗涤3次×10 min; 辣根过氧化物酶标记的二抗于室温孵育2 h, TBST洗涤3次×10 min, 膜与化学发光底物孵育5 min, 经X线片曝光、显影、定影。显色结果用

■相关报道

国内外研究表明, 肝癌、乳腺癌及肺癌中*kiss-1*基因表达量与肿瘤的侵袭力呈负相关, 且*kiss-1*基因表达较高的患者预后往往也明显好于表达量低的患者。

■创新盘点

本文首次采用细胞转染、RT-PCR及Western blot等技术联合检测转染*kiss-1*基因后食管癌EC9706细胞裸鼠皮下移植瘤成瘤情况及中瘤组织Kiss-1蛋白及mRNA表达的情况。

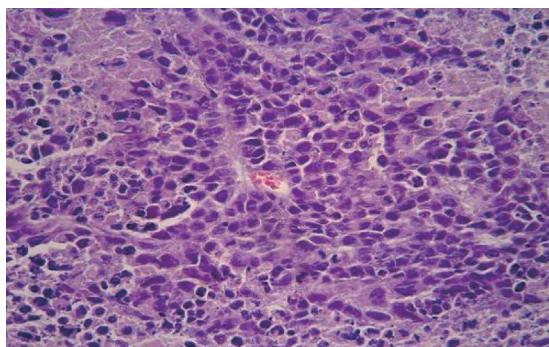


图1 EC9706/pcDNA3.1-Kiss-1组裸鼠移植瘤组织学形态(HE × 200)。

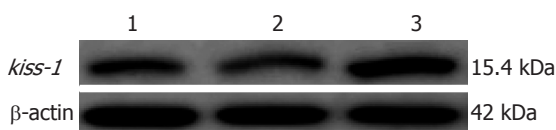


图2 Western blot法检测*kiss-1*基因转染裸鼠移植瘤组织蛋白表达。1: EC9706细胞组; 2: EC9706/pcDNA3.1细胞组; 3: EC9706/pcDNA3.1-Kiss-1细胞组。

软件Total Lab2.0进行灰度分析,并计算蛋白的相对表达水平。

1.2.4 RT-PCR(一步法)检测mRNA的表达: 采用大连宝生物公司提供的一步法试剂盒说明书进行, RNA提取过程按照TRIzol(Invitrogen公司)RNA提取试剂盒说明书进行, 引物序列分别为*kiss-1*上游5'-AGAGGAAGCCAGCTGCTACTG-3', 下游5'-GCCGAAGGAGTTCCAGTTGTA-3'; 内参β-actin: 上游5'-CATCCTGCGTCTGCACCT-3', 下游5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3', 预期扩增片段大小分别为191 bp和480 bp。RT-PCR反应条件: 50 °C × 30 min, 94 °C × 2 min, 94 °C × 40 s, Kiss-1为48 °C × 30 s, 72 °C × 1 min, 共30个循环; 72 °C延伸10 min。取5 μL用1.5%琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪上成像及灰度分析。

统计学处理 实验结果应用SPSS13.0统计软件进行分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 各组间相对表达水平的比较采用 F 分析。

2 结果

2.1 裸鼠移植瘤瘤体体积 至接种4 wk后, 裸鼠处死前测量各组移植瘤瘤体大小。连续4 wk检测3组裸鼠的成瘤体积, 肉眼观察时可见EC9706/pcDNA3.1-Kiss-1组瘤体最小, 裸鼠移植瘤体积明显小于EC9706细胞组、EC9706/pcDNA3.1细胞组。4 wk后裸鼠处死后迅速测量体积, 3组

表1 转染前后不同组别裸鼠移植瘤组织中Kiss-1蛋白的表达($n = 5$)

分组	Kiss-1/β-actin	F 值	P 值
EC9706细胞组	0.652 ± 0.039		
EC9706/pcDNA3.1细胞组	0.642 ± 0.042	24.807	0.000
EC9706/pcDNA3.1-Kiss-1细胞组	0.790 ± 0.029		

表2 Kiss-1转染各组裸鼠移植瘤*kiss-1* mRNA的表达($n = 5$)

分组	mRNA相对含量	F 值	P 值
EC9706细胞组	0.377 ± 0.030		
EC9706/pcDNA3.1细胞组	0.382 ± 0.024	72.685	0.000
EC9706/pcDNA3.1-Kiss-1细胞组	0.535 ± 0.014		

裸鼠肿瘤体积大小分别为 $1\ 541.60\ \text{mm}^3 \pm 59.36\ \text{mm}^3$ 、 $1\ 482.60\ \text{mm}^3 \pm 70.32\ \text{mm}^3$ 、 $508.40\ \text{mm}^3 \pm 464.90\ \text{mm}^3$, 差异具有统计学意义($F = 473.35$, $P = 0.000$)。

2.2 HE染色裸鼠肿瘤组织染色特点 各组抑制瘤组织HE染色后, 光镜下观察可见大小不等的瘤细胞团, 其中散在灶状、片状凝固性坏死, 瘤细胞团周围有少量纤维结缔组织包绕。瘤细胞多为圆形或多角形上皮样细胞, 细胞排列紧密, 呈明显异形性, 大小不一, 形态各异, 核大而深染, 部分肿瘤细胞核仁清晰可见, 病理性核分裂相可见。坏死灶依EC9706细胞组、EC9706/pcDNA3.1细胞组、EC9706/pcDNA3.1-Kiss-1细胞组的顺序逐渐增多, 图1为转染*kiss-1*基因组裸鼠肿瘤组织HE染色图片, 肿瘤细胞之间坏死组织广泛分布。

2.3 Western blot法检测*kiss-1*基因转染裸鼠移植瘤组织蛋白表达 免疫细胞化学法检测结果显示, Kiss-1蛋白和在三组细胞中的表达主要定位于胞质, 采用HPIAS-1000高清晰图像处理系统进行图像分析, Kiss-1蛋白在转染组中的平均吸光度(A 值), 明显高于转染空质粒组和空白对照组($P < 0.05$)。Western blot检测结果见图2和表1。

2.4 RT-PCR法检测*kiss-1*基因转染裸鼠移植瘤组织*kiss-1* mRNA表达 RT-PCR扩增结果经凝胶电泳显示, *kiss-1* mRNA RT-PCR扩增产物与预计一致, 其片段大小为191 bp, 内参β-actin片段大小为480 bp(图3)。扩增结果经凝胶灰度扫描而对*kiss-1* mRNA阳性表达进行定量, 在EC9706

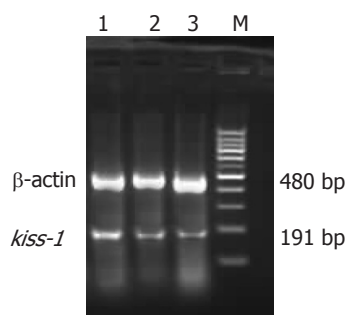


图3 RT-PCR法检测kiss-1基因转染裸鼠移植瘤组织kiss-1 mRNA表达. M: Marker; 1: EC9706/pcDNA3.1-Kiss-1细胞组; 2: EC9706/pcDNA3.1细胞组; 3: EC9706细胞组.

细胞组、EC9706/pcDNA3.1细胞组、EC9706/pcDNA3.1-Kiss-1细胞组中kiss-1 mRNA的含量依次增高, 组间比较差异具有统计学意义($F = 72.685, P < 0.05$, 图3, 表2).

3 讨论

肿瘤发生发展过程中的侵袭和转移是影响其预后的重要因素, 食管癌患者早期出现侵袭和转移的生物学特性严重影响了患者的生存率, 目前肿瘤转移抑制基因在肿瘤侵袭和转移中的作用受到了普遍关注^[5]. kiss-1基因是1996年Lee等在人黑色素瘤细胞株中最先发现的一个新的肿瘤转移抑制基因, 定位于染色体1q32-q41区. kiss-1基因编码的是一个有亲水性的145个氨基酸组成的蛋白质, 其羧基末端(61-121)的54个氨基酸是人孤儿G蛋白偶联受体(hOT7T175)的配体, 被命名为转移抑素(metastin), 其与受体结合在人类多种肿瘤中发挥了抑制肿瘤转移的作用^[6-8], 但其具体机制尚不十分明确.

研究表明, kiss-1基因的异常表达与肾癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、胰腺癌及卵巢癌等恶性肿瘤的浸润转移密切相关^[9-14]. 我们前期的实验研究显示: 食管鳞癌组织中的确存在kiss-1基因的表达显著下调, 并且这种表达量的下调与食管鳞癌的淋巴结转移有关^[15-17]. 因此本课题组在前期组织实验的基础上, 构建kiss-1基因真核表达载体, 并将其转染入食管癌EC9706细胞, 然后采用将不同组别的细胞注射入裸鼠体内, RT-PCR和Western blot技术首先验证kiss-1基因转染成功, 并检测转染前后裸鼠移植瘤组织中Kiss-1蛋白及mRNA的表达情况. 结果显示: 转染kiss-1基因后食管癌EC9706细胞裸鼠移植瘤组织中Kiss-1蛋白及mRNA的表达水平显著增加($P < 0.05$). 自2001年Yan等首次克隆出kiss-1基因并将其转入HT-1080细胞, 发现kiss-1基因降低了MMP的表达而起到了抑制肿瘤转移的作用以来, kiss-1基因与MMP的关系在胰腺癌、卵巢癌及子宫内膜癌中也相继被发现. 我们通过以上

实验证明了在食管癌细胞中kiss-1基因的过表达能抑制肿瘤的生长表达, 从而起到抑制肿瘤细胞转移的作用; 转染kiss-1基因的肿瘤细胞其蛋白及mRNA表达均显著上调, 转染kiss-1基因可能能够抑制肿瘤组织的生长.

kiss-1的确切功能目前尚不完全清楚, 有资料报道kiss-1还可能通过MAPK信号转导途径、Rac/Cdc42途径及PKC/PLC、 Ca^{2+} 途径调节肿瘤细胞的增殖、凋亡及抑制肿瘤细胞的转移^[18-20]. 因此对kiss-1基因进行深入、广泛的研究, 了解其抑制肿瘤浸润和转移的具体机制, 可为肿瘤的预后评估及临床治疗提供理论依据.

4 参考文献

- 1 Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1731-1737
- 2 Shengbing Z, Feng LJ, Bin W, Lingyun G, Aimin H. Expression of KiSS-1 gene and its role in invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)* 2009; 292: 1128-1134
- 3 Lee KH, Kim JR. Kiss-1 suppresses MMP-9 expression by activating p38 MAP kinase in human stomach cancer. *Oncol Res* 2009; 18: 107-116
- 4 Yoshioka K, Ohno Y, Horiguchi Y, Ozu C, Namiki K, Tachibana M. Effects of a KiSS-1 peptide, a metastasis suppressor gene, on the invasive ability of renal cell carcinoma cells through a modulation of a matrix metalloproteinase 2 expression. *Life Sci* 2008; 83: 332-338
- 5 Ek ET, Ojaimi J, Kitagawa Y, Choong PF. Does the degree of intratumoural microvessel density and VEGF expression have prognostic significance in osteosarcoma? *Oncol Rep* 2006; 16: 17-23
- 6 Zheng HC, Yu AM, Xin Y. Aberrant expression of Kiss-1 and matrix metalloproteinase-9 are closely linked to lymph node metastasis of gastric cancer. *Chin Med Sci J* 2008; 23: 63-64
- 7 Nicolle G, Comperat E, Nicolaiew N, Cancel-Tassin G, Cussenot O. Metastin (KiSS-1) and metastin-coupled receptor (GPR54) expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *Ann Oncol* 2007; 18: 605-607
- 8 Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N. Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1379-1383
- 9 Shoji S, Tang XY, Umemura S, Itoh J, Takekoshi S, Shima M, Usui Y, Nagata Y, Uchida T, Osamura RY, Terachi T. Metastin inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma with overexpression of metastin receptor. *Eur Urol* 2009; 55: 441-449
- 10 Wang ZH, Feng XS, Wang GP, Gao SG, Mi JQ, Sun JT, Qu ZF, Han J, Zhang L. [Expression and clinical significance of KiSS-1 and E-cadherin in gastric cardia carcinoma] *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2007; 10: 380-382
- 11 Hou YK, Wang Y, Cong WM, Wu MC. [Expression of tumor metastasis-suppressor gene KiSS-1 and matrix metalloproteinase-9 in portal vein tumor thrombus of hepatocellular carcinoma] *Aizheng*

■同行评价

本研究设计合理并具有科学性, 研究内容比较丰富, 数据及结果可论证其结论.

- 2007; 26: 591-595
- 12 Pentheroudakis G, Kostadima L, Dova L, Georgiou I, Tzavaras T, Vartholomatos G, Wirtz RM, Fountzilas G, Malamou-Mitsi V, Pavlidis N. A twisted kiss: in vitro and in vivo evidence of genetic variation and suppressed transcription of the metastasis-suppressor gene KiSS1 in early breast cancer. *Neoplasma* 2010; 57: 47-54
- 13 Liang S, Yang ZL. [Expression of KiSS-1 mRNA in pancreatic ductal adenocarcinoma and non-cancerous pancreatic tissues in SD rats] *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2007; 32: 109-113
- 14 Gao GL, Liu LD, Zou XS, Chen WX. [Expression of KiSS-1, matrix metalloproteinase-9, nuclear factor-kappaBp65 in ovarian tumour] *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2007; 42: 34-38
- 15 陈妍琼, 赵志华, 张蕾, 高冬玲, 张岚, 陈奎生. 食管鳞状细胞癌组织中KiSS-1蛋白和微血管密度的检测. *郑州大学学报(医学报)* 2009; 44: 1127-1130
- 16 陈妍琼, 赵志华, 张云汉, 张蕾. 食管鳞状细胞癌组织中KiSS-1和MMP-2的表达及其相关性研究. *肿瘤基础与临床* 2009; 22: 369-372
- 17 李小雨, 赵志华, 张蕾, 温洪涛, 李晟磊, 许柯. 食管鳞状细胞癌组织中KiSS-1 mRNA及蛋白的表达. *郑州大学学报(医学报)* 2008; 43: 634-636
- 18 Castaño JP, Martínez-Fuentes AJ, Gutiérrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagón MM. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* 2009; 30: 10-15
- 19 Yan C, Wang H, Boyd DD. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha -induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J Biol Chem* 2001; 276: 1164-1172
- 20 Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD, Shah KV, Hewitt KJ, Rosenthal DT, Indig FE, Jiang Y, Nickoloff BJ, Taub DD, Trent JM, Moon RT, Bittner M, Weeraratna AT. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 17259-17271

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

NP-cGMP-PKG信号通路在D型钠尿肽抑制延迟整流型钾电流中的作用

蔡正旭, 李胜, 蔡春玉, 曲成龙, 齐清会, 郭慧淑

蔡正旭, 李胜, 曲成龙, 齐清会, 郭慧淑, 大连医科大学附属第一医院中心实验室 辽宁省大连市 116011
蔡春玉, 延边大学附属医院内科 吉林省延吉市 133000
国家自然科学基金资助项目, No. 30800382
大连市科学发展计划基金资助项目, No. 2008E13SF213
作者贡献分布: 此文主要由郭慧淑与蔡正旭参与设计、实验、分析与撰写; 课题经费由郭慧淑与蔡正旭提供研究经费; 蔡正旭与李胜承担了大部分实验工作; 蔡春玉与曲成龙参与了部分实验及数据统计工作; 齐清会主要参与了实验协调工作; 论文写作由蔡正旭与郭慧淑完成。
通讯作者: 郭慧淑, 教授, 116011, 辽宁省大连市222号, 大连医科大学附属第一医院中心实验室, guohuishu1@yahoo.com.cn
电话: 0411-83635963-2237
收稿日期: 2010-01-10 修回日期: 2010-03-27
接受日期: 2010-03-29 在线出版日期: 2010-04-18

Role of the NP-cGMP-PKG pathway in dendroaspis natriuretic peptide-induced inhibition of delayed rectifier potassium current

Zheng-Xu Cai, Sheng Li, Chun-Yu Cai, Cheng-Long Qu, Qing-Hui Qi, Hui-Shu Guo

Zheng-Xu Cai, Sheng Li, Cheng-Long Qu, Qing-Hui Qi, Hui-Shu Guo, Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Chun-Yu Cai, Department of Internal Medicine, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30800382; and the Scientific Development Program of Dalian, No. 2008E13SF213
Correspondence to: Professor Hui-Shu Guo, Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 222 Zhongshan Road, Dalian 116011, Liaoning Province, China. guohuishu1@yahoo.com.cn
Received: 2010-01-10 Revised: 2010-03-27
Accepted: 2010-03-29 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To investigate the role of the natriuretic peptide (NP)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-protein kinase G (PKG) pathway in dendroaspis natriuretic peptide (DNP)-induced inhibition of delayed rectifier potassium currents ($I_{K(V)}$) in gastric antral circular smooth muscle of guinea pigs and to explore potential mechanisms involved.

METHODS: The whole cell patch-clamp technique was used to record delayed rectifier potassium current ($I_{K(V)}$) and to investigate the role of the NP-cGMP-PKG pathway in DNP-induced inhibition of $I_{K(V)}$ in gastric myocytes isolated by collagenase digestion.

RESULTS: DNP significantly inhibited $I_{K(V)}$ in a concentration-dependent manner. DNP at concentrations of 0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$ (at 60 mV) decreased $I_{K(V)}$ to $83.5\% \pm 2.1\%$, $71.8\% \pm 2.3\%$ and $63.8 \pm 2.2\%$ of control level, respectively. LY83583 (0.1 $\mu\text{mol/L}$), a guanylate cyclase inhibitor, significantly impaired DNP (1 $\mu\text{mol/L}$)-induced inhibition of $I_{K(V)}$ ($63.8\% \pm 2.2\%$ vs $76.8\% \pm 2.3\%$) at 60 mV. Moreover, DNP-induced inhibition of $I_{K(V)}$ was potentiated by zaparinast (1 $\mu\text{mol/L}$), a cGMP-sensitive phosphoesterase inhibitor ($63.8\% \pm 2.2\%$ vs $56.8\% \pm 2.1\%$). DNP-induced inhibition of $I_{K(V)}$ was completely blocked by KT5823, an inhibitor of cGMP-dependent PKG, but not affected by KT-5720, a protein kinase A (PKA)-specific inhibitor.

CONCLUSION: DNP inhibits $I_{K(V)}$ in a NP-cGMP-PKG pathway-dependent and cAMP/PKA pathway-independent manner. $I_{K(V)}$ may play a critical role in regulating resting membrane potential in the gastric antral circular myocytes of guinea pigs.

Key Words: Dendroaspis natriuretic peptide; Delayed rectifier potassium currents; Cyclic guanosine monophosphate; Protein kinase G; Protein kinase A

Cai ZX, Li S, Cai CY, Qu CL, Qi QH, Guo HS. Role of the NP-cGMP-PKG pathway in dendroaspis natriuretic peptide-induced inhibition of delayed rectifier potassium current. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1093-1098

摘要

目的: 探讨NP-cGMP-PKG信号通路在D型钠尿肽(DNP)抑制豚鼠胃窦环形肌细胞上延迟整流型钾电流中的作用及其相关机制。

方法: 用全细胞模式的膜片钳技术记录豚鼠

■背景资料

D型钠尿肽(DNP)是最近发现的钠尿肽家族成员,是从一种美洲蛇的蛇毒中提炼出来的由38个氨基酸组成的聚肽类物质。到目前为止关于DNP的研究仅仅局限在心血管系统、泌尿系统和生殖系统。关于DNP对胃肠动力方面的研究却非常少。

■同行评议者

丁义涛, 教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科; 林志辉, 教授, 福建省立医院消化内科

■ 研发前沿

以往的研究也证实DNP通过增加 $I_{K(Ca)}$ 舒张胃窦环形肌。然而,到目前为止关于胃动力和 $I_{K(V)}$ 之间关系的报道却很少。

胃窦环形肌上延迟整流型钾电流($I_{K(V)}$)。并观察NP-cGMP-PKG信号通路在DNP抑制豚鼠胃窦环形肌细胞上延迟整流型钾电流中的作用。

结果: DNP抑制豚鼠胃窦环形肌上 $I_{K(V)}$ 并呈现剂量依赖关系。0.01, 0.1和1 $\mu\text{mol/L}$ 的DNP在去极化到60 mV时使 $I_{K(V)}$ 抑制到原来的83.5% \pm 2.1%, 71.8% \pm 2.3%和63.8% \pm 2.2%。鸟苷酸环化酶抑制剂LY83583减弱这种抑制作用, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的LY83583使1 $\mu\text{mol/L}$ 的DNP抑制 $I_{K(V)}$ 的程度由原来抑制到63.8% \pm 2.2%减弱为抑制到76.8% \pm 2.3%。而cGMP敏感的磷酸酯酶抑制剂zaparinast却能增强这种作用。1 $\mu\text{mol/L}$ 的zaparinast使1 $\mu\text{mol/L}$ 的DNP抑制 $I_{K(V)}$ 的程度由原来抑制到63.8% \pm 2.2%增强为抑制到56.8% \pm 2.1%。DNP对 $I_{K(V)}$ 的抑制作用可完全被cGMP依赖的蛋白激酶G(PKG)抑制剂KT5823所消除,但不受cGMP依赖的蛋白激酶A(PKA)抑制剂的影响。

结论: NP-cGMP-PKG途径参与DNP抑制豚鼠胃窦环形肌细胞上 $I_{K(V)}$ 过程, 而cAMP-PKA途径并不参与此过程。 $I_{K(V)}$ 在维持豚鼠胃窦环形肌细胞静息电位中起重要作用。

关键词: D型钠尿肽; 延迟整流型钾电流; 环一磷酸鸟苷; 蛋白激酶G; 蛋白激酶A

蔡正旭, 李胜, 蔡春玉, 曲成龙, 齐清会, 郭慧淑. NP-cGMP-PKG信号通路在D型钠尿肽抑制延迟整流型钾电流中作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1093-1098
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1093.asp>

0 引言

D型钠尿肽(dendroaspis natriuretic peptide, DNP)是最近发现的钠尿肽家族成员, 是从一种美洲蛇的蛇毒中提炼出来的由38个氨基酸组成的聚肽类物质^[1]。到目前为止关于DNP的研究仅仅局限在心血管系统^[2]、泌尿系统^[3]和生殖系统^[4]。关于DNP对胃肠动力方面的研究却非常少。Kim等^[5]首次在大鼠的结肠内发现DNP并发现他通过局部的调质调节结肠动力。我们以往的研究表明^[6,7]DNP通过cGMP的增加和动员细胞内IP3介导的钙库的钙释放, 增加钙敏感钾电流而抑制胃动力。在不同动物不同器官有不同类型的钾通道。Yuang等^[8]报道在肺动脉血管平滑肌上有钙敏感钾通道($I_{K(Ca)}$)和延迟整流型钾通道($I_{K(V)}$), 并证实 $I_{K(V)}$ 在维持细胞静息膜电位中起中药作用, 而 $I_{K(Ca)}$ 作为一种负反馈途径

调节膜点位和血管收缩。瞬间外向钾电流在维持大鼠胃窦平滑肌细胞静息膜电位中起中药作用^[9]。Koh等^[10]发现ATP($I_{K(ATP)}$)敏感钾电流的激活参与大鼠结肠平滑肌细胞膜点位并通过调节 $I_{K(ATP)}$ 的开放率双向调节膜的传导性产生去极化或超极化。Li等^[11]证明在豚鼠胃窦环形肌上有两种钾通道, 即 $I_{K(Ca)}$ 和 $I_{K(V)}$ 。Duridanova等^[12]报道乏氧引起的豚鼠胃窦环形肌的舒张是通过激活细胞内IP3介导的钙库的钙释放使 $I_{K(Ca)}$ 增加, 细胞超极化而实现的。我们以往的研究^[13]也证实DNP通过增加 $I_{K(Ca)}$ 舒张胃窦环形肌。然而, 到目前为止关于胃动力和 $I_{K(V)}$ 之间关系的报道却很少。考虑到 $I_{K(V)}$ 可能在维持平滑肌细胞膜静息电位中起重要作用, 本研究旨在用传统全细胞模式的膜片钳技术观察DNP对豚鼠胃窦环形肌细胞上 $I_{K(V)}$ 的作用, 并探讨NP-cGMP-PKG信号传导通路在其中的作用及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 EWG/B豚鼠, 雌雄不拘, 体质量300 g \pm 50 g, 由大连医科大学动物中心提供; 用乌拉坦(50 mg/kg)麻醉。

1.2 方法

1.2.1 细胞制备及其电生理记录: 用乌拉坦(50 mg/kg)麻醉动物后, 迅速剪取胃窦部放入氧饱和的无钙的PSS缓冲液中漂洗, 然后分离环形肌并将其分割成几个肌条(1 mm \times 4 mm)。将肌条放入4 $^{\circ}\text{C}$ 的K-B液中保存约15 min, 之后将其放入装有36 $^{\circ}\text{C}$ 消化液的试管中进行孵育。消化液是由0.1%的II型胶原酶、0.1%的二硫苏醇糖、0.15%的胰蛋白酶抑制剂和0.2%的牛血清白蛋白溶于4 mL无钙的PSS缓冲液组成的。孵育结束, 将消化好的肌条移入4 $^{\circ}\text{C}$ K-B液中保存, 在实验前用管口圆滑的滴管轻轻吹打肌条即可得到分离的单细胞。取1滴细胞悬浮液(0.1 mL)平铺于倒置显微镜(IX-70 Olympus, Japan)镜台上的灌流槽底部, 待10-15 min细胞沉降于槽底后, 用等渗溶液进行灌流(2-3 mL/min)。然后用电阻为2-5 M Ω 的玻璃电极进行5-10 G Ω 的千兆封接。钙敏感钾电流和延迟整流型钾电流通过Axopatch 1-D型膜片钳放大器记录。

1.2.2 药品及溶液配置: 台氏液成分(mmol/L): NaCl 147, KCl 4, MgCl₂·6H₂O 1.05, CaCl₂·2H₂O 0.42, Na₂PO₄·2H₂O 1.81, 5.5, 以NaOH调pH值至7.35; PSS成分(mmol/L): NaCl 134.8, KCl 4.5, MgCl₂·6H₂O 1.0, CaCl₂·2H₂O 2.0, glucose 5.0,

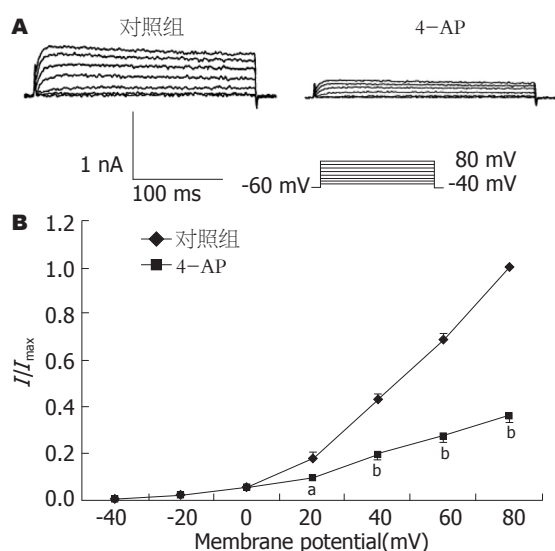


图1 $I_{K(V)}$ 的选择性抑制剂4-AP对豚鼠胃窦环形肌细胞上 $I_{K(V)}$ 的影响。A: 原始电流图; B: I-V曲线10 mmol/L 4-AP明显抑制 $I_{K(V)}$, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ vs 对照组。

HEPES 10.0, 以Tris调pH值至7.40; 无钙PSS的成分(mmol/L): NaCl 134.8, KCl 4.5, HEPES 10, $MgCl_2$ 1, Glucose 10, 以Tris调pH值至7.40; Kraft-Bruhe液(K-B液)的成分(mmol/L): EGTA 0.5, HEPES 10, $MgCl_2$ 3, KCl 50, Glucose 10, L-Glutamate 50, Taurine 20, KH_2PO_4 20, 以KOH调pH值至7.40; 记录 $I_{K(V)}$ 电极内液的成分(mmol/L): K-aspartic acid 110, Mg-ATP 5, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.0, KCl 20, EGTA 10, di-tris-creatine phosphate 2.5, disodium-creatine phosphate 2.5, HEPES 5, 以KOH调pH值至7.30; 配制完成后, 用1 mL的分装瓶分装存放于0 °C的冷冻箱中, 实验前解冻使用。DNP、LY83583、Zaparinast、KT5823和KT5720各配成响应母液待用。实验中用到的所有药品均为美国Sigma公司产品。

统计学处理 所有统计数据用mean±SD来表示。肌肉收缩幅度用SPSS统计, 电流幅值在Clamp Fit10中统计, 实验结果采用同体对照的t检验和组间比较的t检验, 具有显著性差异的标准为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 豚鼠胃窦环形肌上 $I_{K(V)}$ 的引导 用传统全细胞模式记录膜电流, 电极内液加10mmol/L的EGTA, 在电压钳制在-60 mV, 阶跃电压刺激从-40 mV开始, 以每20 mV的阶跃幅度去极化至+80 mV, 持续440 ms, 每次去极化刺激间隔为10 s即可引导出 $I_{K(V)}$ 。用10 mmol/L的选择性 $I_{K(V)}$ 抑制剂4-AP检测($n=6$, 图1)。

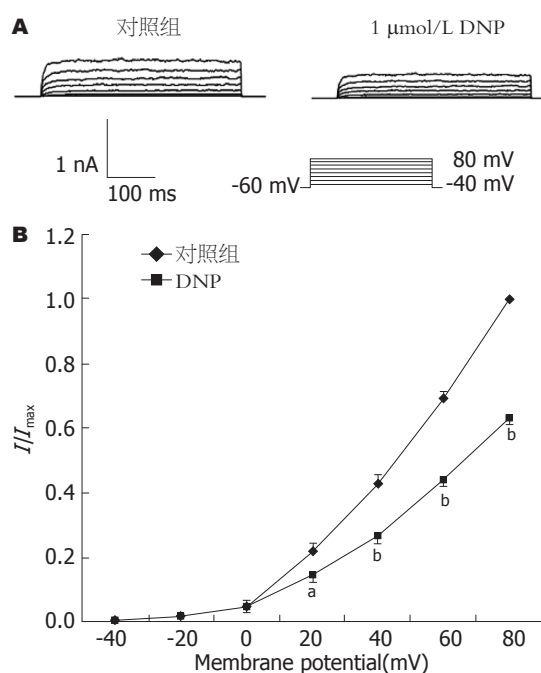


图2 DNP对豚鼠胃窦环形肌上 $I_{K(V)}$ 的影响。A: 标准记录图; B: I-V曲线图, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ vs 对照组; C: 不同浓度DNP对 $I_{K(V)}$ 影响的柱状图, $^bP<0.01$ vs 上一个浓度剂量组。

2.2 DNP对 $I_{K(V)}$ 的影响 1 μmol/L的DNP明显抑制 $I_{K(V)}$, 用同样的刺激模式, 观察不同浓度的DNP对 $I_{K(V)}$ 影响。结果显示不同浓度DNP对 $I_{K(V)}$ 抑制呈现剂量依赖关系, 0.01 μmol/L($n=8$), 0.1 μmol/L($n=8$)和1 μmol/L($n=8$)的DNP使 $I_{K(V)}$ 在去极化到60 mV时, 电流抑制到原来的83.5%±2.1%, 71.8%±2.3%和63.8%±2.2%(图2)。

2.3 cGMP与DNP抑制 $I_{K(V)}$ 间的关系 为了进一步探讨cGMP与DNP抑制豚鼠胃窦环形肌细胞上 $I_{K(V)}$ 间关系, 预先用0.1 μmol/L的鸟苷酸环化酶抑制剂LY83583处理后, 观察1 μmol/L DNP对豚鼠胃窦环形肌细胞上 $I_{K(V)}$ 的影响。结果显示LY83583明显抑制DNP对 $I_{K(V)}$ 的抑制作用。抑制程度由单纯给予DNP时抑制到63.8%±2.2%减弱为抑制到76.8%±2.3%($n=6$, 图3)。而1 μmol/L

■相关报道

Duridanova等报道乏氧引起的豚鼠胃窦环形肌的舒张是通过激活细胞内IP3介导的钙库的钙释放使 $I_{K(Ca)}$ 增加, 细胞超极化而实现的。

同行评价

该文章的目的明确,方法可靠,分析合理,是较有价值的基础研究。

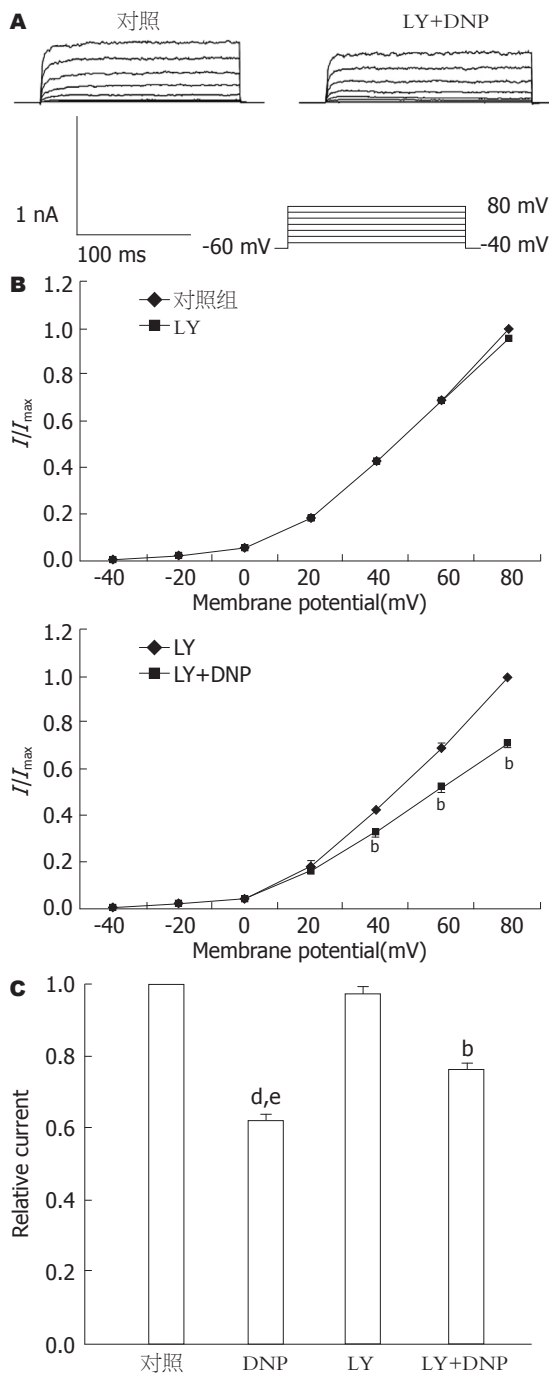


图3 鸟苷酸环化酶抑制剂LY83583对豚鼠胃窦环形肌上DNP引起 $I_{K(V)}$ 抑制效应的影响。A: 标准记录图; B: I-V曲线图; C: 柱状图。^b $P < 0.01$ vs LY组; ^d $P < 0.01$ vs 对照组; ^e $P < 0.05$ vs LY+DNP组。

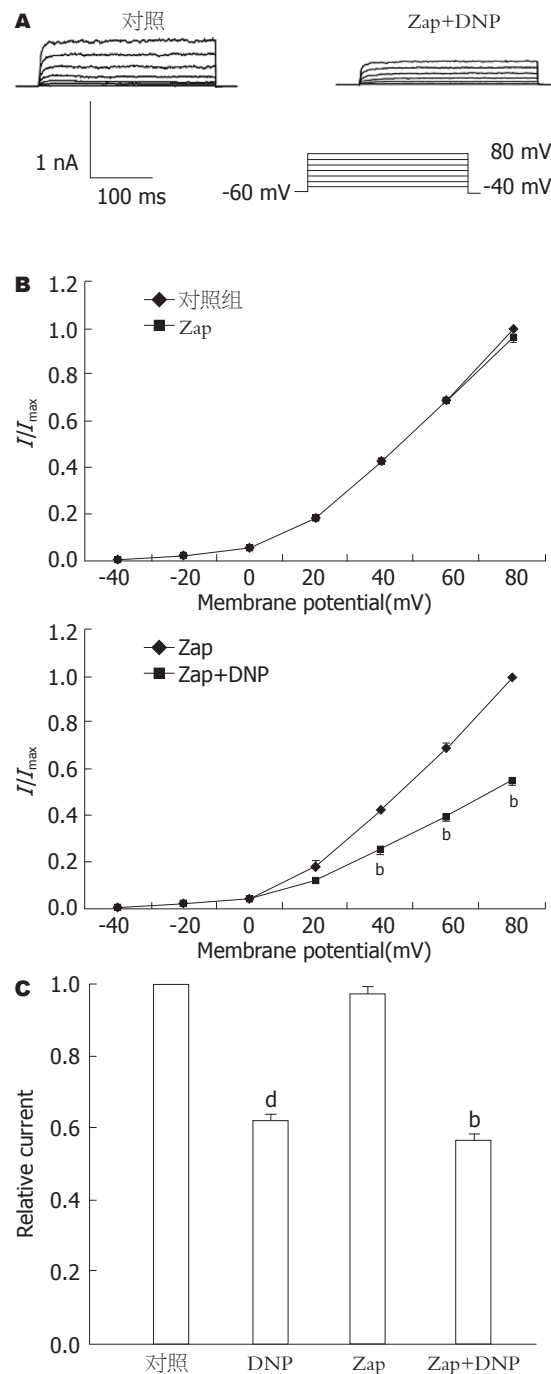


图4 cGMP敏感的磷酸酯酶抑制剂Zaporinast对豚鼠胃窦环形肌上DNP引起 $I_{K(V)}$ 抑制效应的影响。A: 标准记录图; B: I-V曲线图; C: 柱状图。^b $P < 0.01$ vs Zap组; ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

的cGMP依赖的磷酸酯酶抑制剂Zaporinast则增强其抑制作用,由单纯给予DNP时抑制 $63.8\% \pm 2.2\%$ 增强为抑制到 $56.8\% \pm 2.1\%$ ($n = 6$, 图4),以上电流均在去极化到60 mV时检测。

2.4 蛋白激酶G与DNP抑制 $I_{K(V)}$ 间的关系 为进一步探讨cGMP-PKG和cGMP-PKA途径是否参与DNP抑制 $I_{K(V)}$ 过程,观察了PKG抑制剂KT-5823和PKA抑制剂KT-5720对DNP抑制 $I_{K(V)}$ 的影响。

结果发现 $1 \mu\text{mol/L}$ KT-5823几乎完全消除DNP抑制 $I_{K(V)}$,而KT-5720却对DNP抑制 $I_{K(V)}$ 无影响 ($n = 8$, 图5)。

3 讨论

平滑肌细胞上主要有3种外向钾电流, $I_{K(Ca)}$, $I_{K(V)}$ 和 $I_{(to)}$,其中 $I_{K(Ca)}$ 对平滑肌收缩起重要作用。以往研究表明钠尿肽(NPs)通过增加 $I_{K(Ca)}$,舒张豚鼠

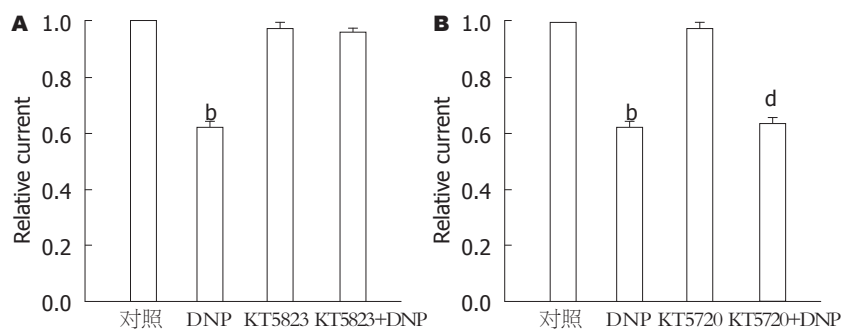


图 5 cGMP依赖的蛋白激酶对DNP抑制豚鼠胃窦环形肌细胞上 $I_{K(V)}$ 的影响. A: PKG抑制剂; B: PKA的抑制剂. ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs KT5720组.

胃窦环形肌. Mikawa等^[14]报道ANP通过激活 $I_{K(Ca)}$ 参与支气管平滑肌的舒张过程. 我室以往研究表明^[6,13]CNP和DNP通过增加 $I_{K(Ca)}$ 舒张豚鼠胃窦环形肌.

本研究中发现, DNP明显抑制豚鼠胃窦环形肌细胞上延迟整流型钾电流($I_{K(V)}$), 并呈现剂量依赖关系. 由于DNP对胃窦环形肌细胞总的效应是使其超级化, 这表明DNP增加胃窦平滑肌细胞上外向钾电流并舒张平滑肌. $I_{K(Ca)}$ 在舒张过程中起主要作用, 以往的许多研究也支持我们的这一观点. Yuan等^[8]报道 $I_{K(Ca)}$ 在肺动脉平滑肌细胞去极化和收缩过程中起中药作用而 $I_{K(V)}$ 只参与调节静息状态下细胞的紧张性. Otsuka等^[15]也报道 $I_{K(Ca)}$ 在CNP引起的血管平滑肌舒张过程中起决定性作用. 根据以往前人研究和本实验研究推测 $I_{K(V)}$ 在维持豚鼠胃窦环形肌细胞静息电位调节中起重要作用, 而 $I_{K(Ca)}$ 则通过改变细胞内外钙离子的浓度参与调节肌肉收缩和舒张.

NP和NO系统相似是体内cGMP和cAMP系统的启动系统参与调节机体的许多生理活动. Borán等^[16]报道ANP通过pGC-cGMP-PKG途径参与消除小胶质细胞的炎症反应. Wen等^[17]发现CNP通过pGC-cGMP-PDE3-cAMP途径参与调节甲壳类的心房颤动. Sabbatini等^[18]报道CNP通过减少cAMP产生使胰腺外分泌部淀粉酶释放增加. 在本研究中发现鸟苷酸环化酶抑制剂LY83583明显减弱DNP对 $I_{K(V)}$ 的抑制作用而cGMP敏感的磷酸酯酶抑制剂Zaparinast却增强DNP对 $I_{K(V)}$ 的抑制作用. 与此同时发现PKG的抑制剂KT5823完全阻断DNP对 $I_{K(V)}$ 的抑制作用而PKA的抑制剂KT-5720却对其无任何影响. 这表明pGC-cGMP-PKG途径参与DNP抑制 $I_{K(V)}$ 过程而cAMP不参与此过程.

总之, DNP通过pGC-cGMP-PKG途径抑制豚鼠胃窦环形肌细胞上 $I_{K(V)}$, 而cAMP不参与此过程. $I_{K(V)}$ 在维持豚鼠胃窦环形肌细胞静息膜电位中起重要作用.

4 参考文献

- Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 1992; 267: 13928-13932
- Singh G, Maguire JJ, Kuc RE, Skepper JN, Fidock M, Davenport AP. Characterization of the snake venom ligand [125I]-DNP binding to natriuretic peptide receptor-A in human artery and potent DNP mediated vasodilatation. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 838-844
- Lee S, Park SK, Kang KP, Kang SK, Kim SZ, Kim W. Relationship of plasma *Dendroaspis* natriuretic peptide-like immunoreactivity and echocardiographic parameters in chronic haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton)* 2004; 9: 171-175
- Piao FL, Park SH, Han JH, Cao C, Kim SZ, Kim SH. *Dendroaspis* natriuretic peptide and its functions in pig ovarian granulosa cells. *Regul Pept* 2004; 118: 193-198
- Kim JH, Yang SH, Yu MY, Lee HK, Kim SY, Kim SH. *Dendroaspis* natriuretic peptide system and its paracrine function in rat colon. *Regul Pept* 2004; 120: 93-98
- Guo HS, Cai ZX, Wu TH, Xu J, Qiu Y, Xu WX. Inhibitory effect of *dendroaspis* natriuretic peptide on spontaneous contraction in gastric antral circular smooth muscles of guinea pigs. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 1797-1802
- Guo HS, Yang YZ, Zou Y, Xu J, Cai ZX, Qi QH. Effects of *dendroaspis* natriuretic peptide on calcium-activated potassium current and its mechanism. *J Physiol Sci* 2008; 58: 1-6
- Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Golovina VA, Rubin LJ. Molecular basis and function of voltage-gated K⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998; 274: L621-L635
- Amberg GC, Baker SA, Koh SD, Hatton WJ, Murray KJ, Horowitz B, Sanders KM. Characterization of the A-type potassium current in murine gastric antrum. *J Physiol* 2002; 544: 417-428
- Koh SD, Ward SM, Dick GM, Epperson A, Bonner HP, Sanders KM, Horowitz B, Kenyon JL. Contribution of delayed rectifier potassium currents to the electrical activity of murine colonic smooth muscle. *J Physiol* 1999; 515 (Pt 2): 475-487
- Li Y, Xu WX, Li ZL. Effects of nitroprusside, 3-morpholino-sydnominine, and spermine on calcium-sensitive potassium currents in gastric antral circular myocytes of guinea pig. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21: 571-576
- Duridanova DB, Nedelcheva MD, Gagov HS. Oxytocin-induced changes in single cell K⁺ currents

- and smooth muscle contraction of guinea-pig gastric antrum. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 531-538
- 13 Guo HS, Cai ZX, Zheng HF, Li XL, Cui YF, Wang ZY, Xu WX, Lee SJ, Kim YC. Role of calcium-activated potassium currents in CNP-induced relaxation of gastric antral circular smooth muscle in guinea pigs. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2054-2059
- 14 Mikawa K, Kume H, Takagi K. Effects of BKCa channels on the reduction of cytosolic Ca²⁺ in cGMP-induced relaxation of guinea-pig trachea. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24: 175-181
- 15 Otsuka K, Tanaka H, Horinouchi T, Koike K, Shigenobu K, Tanaka Y. Functional contribution of voltage-dependent and Ca²⁺ activated K⁺ (BK(Ca)) channels to the relaxation of guinea-pig aorta in response to natriuretic peptides. *J Smooth Muscle Res* 2002; 38: 117-129
- 16 Borán MS, Baltrons MA, García A. The ANP-cGMP-protein kinase G pathway induces a phagocytic phenotype but decreases inflammatory gene expression in microglial cells. *Glia* 2008; 56: 394-411
- 17 Wen JF, Quan HX, Zhou GH, Cho KW. Altered role of C-type natriuretic peptide-activated pGC-cGMP-PDE3-cAMP signaling in hyperthyroid beating rabbit atria. *Regul Pept* 2007; 142: 123-130
- 18 Sabbatini ME, Rodríguez M, di Carlo MB, Davio CA, Vatta MS, Bianciotti LG. C-type natriuretic peptide enhances amylase release through NPR-C receptors in the exocrine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G987-G994

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

汤姆森 - 路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology*(WJG)的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1 112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, WJG的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-06-19)

zeb1基因与肿瘤细胞迁移能力的关系

宋永站, 张尤历, 乌慧玲, 孔梅, 陈鑫, 邵长江

宋永站, 张尤历, 孔梅, 陈鑫, 邵长江, 江苏大学附属医院消化科 江苏省镇江市 212001

乌慧玲, 江苏大学生命科学院 江苏省镇江市 212013

宋永站, 在读硕士, 主要从事消化系疾病的基础及临床研究。

作者贡献分布: 宋永站与张尤历对此文所作贡献均等; 此课题由宋永站与张尤历策划设计; 课题实验由宋永站、张尤历及乌慧玲操作完成; 研究所用试剂及分析工具由张尤历提供; 数据分析由宋永站、陈鑫及孔梅完成, 本论文写作由宋永站与张尤历完成。

通讯作者: 张尤历, 教授, 212001, 江苏省镇江市解放路438号, 江苏大学附属医院消化科, zjyouli@yahoo.com.cn

电话: 0511-85011787 传真: 0511-85011787

收稿日期: 2010-01-24 修回日期: 2010-03-19

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

zeb1 may promote the migration of tumor cells

Yong-Zhan Song, You-Li Zhang, Hui-Ling Wu, Mei Kong, Xin Chen, Chang-Jiang Shao

Yong-Zhan Song, You-Li Zhang, Mei Kong, Xin Chen, Chang-Jiang Shao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Hui-Ling Wu, College of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor You-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, 438 Jiefang Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zjyouli@yahoo.com.cn

Received: 2010-01-24 Revised: 2010-03-19

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To explore the relationship between the expression of *zeb1* gene and the migration ability of tumor cells.

METHODS: Real-time PCR was used to detect the expression of *zeb1* gene in gastric epithelial GES-1 cells and four types of tumor cells: BGC823, SGC7901, A549 and HeLa cells. Cell migration was measured by Transwell assay.

RESULTS: The expression level of *zeb1* gene was highest in HeLa cells, followed by SGC7901, BGC823, A549 and GES-1 cells. HeLa cells had highest migration ability, followed by SGC7901, BGC823, A549 and GES-1 cells. A significant correlation was noted between the expression of *zeb1* gene and cell migration ability ($r = 0.961$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: *zeb1* may promote the migration of tumor cells.

Key Words: Zinc-finger E-box binding homeobox 1; Migration; Invasion; Tumor

Song YZ, Zhang YL, Wu HL, Kong M, Chen X, Shao CJ. *zeb1* may promote the migration of tumor cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1099-1103

摘要

目的: 探讨肿瘤细胞中*zeb1*基因的表达量与肿瘤细胞的迁移能力之间的关系。

方法: 实时定量PCR方法检测正常胃黏膜上皮细胞GES及四种肿瘤细胞BGC823、SGC7901、A549和HeLa细胞中*zeb1*基因的表达量; Transwell小室检测五种细胞的迁移能力。

结果: 在五种细胞中, *zeb1*在HeLa细胞中表达量最高, BGC823及SGC7901次之, 在A549及GES中表达量最低; 发生迁移的细胞数目在HeLa细胞中最多, BGC823及SGC7901其次, 在A549及GES细胞中最少; 线性相关分析表明, *zeb1*基因的表达量与细胞迁移能力呈正相关($r = 0.961$, $P < 0.01$)。

结论: *zeb1*基因可能促进肿瘤细胞的迁移能力。

关键词: *zeb1*; 迁移; 侵袭; 肿瘤

宋永站, 张尤历, 乌慧玲, 孔梅, 陈鑫, 邵长江. *zeb1*基因与肿瘤细胞迁移能力的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1099-1103

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1099.asp>

0 引言

细胞的迁移运动不仅是细胞进行很多重要生理活动的基础, 同时也在炎症反应和肿瘤发生发展等病理过程中的发挥关键作用^[1-3]. *zeb1*(zinc-finger E-box binding homeobox 1), 又称为TCF8或 δ EF1, 位于人类10号染色体短臂上, 编码序列长3 327 bp, 编码1 108个氨基酸, 含有两个锌指结构簇及一个同源结构域, 其作为转录因子被

■背景资料

恶性肿瘤细胞的侵袭转移能力是肿瘤患者死亡的主要原因, 也是临床治疗面临的巨大困难之一. 早期发现肿瘤并抑制其侵袭转移成为治疗的关键. 寻找肿瘤迁移侵袭相关基因, 阐明其作用机制, 从而为临床治疗提供分子理论基础.

■同行评议者

丁士刚, 主任医师, 北京大学第三医院消化科

■ 研发前沿

*zeb1*基因已经被证明在肿瘤细胞的侵袭机制中发挥了重要作用,但其与迁移能力之间的关系尚不明确,对于*zeb1*基因与迁移能力之间的关系成为新的研究方向。

发现可以与鸡的 $\delta 1$ -晶体蛋白基因的增强子结合^[4]。研究发现*zeb1*在多种细胞系中可以抑制多种基因的表达,如在造血细胞中*zeb1*可以负性调控IL-2、免疫球蛋白 μ 重链、CD4和GATA-3等的表达^[5-8];在间充质细胞中,*zeb1*可以抑制*p73*基因的表达^[9];在格根包尔氏细胞中,*zeb1*可以抑制I型和II型胶原的表达^[10,11]。新近的研究发现*zeb1*在肿瘤的发生发展及肿瘤细胞的侵袭及转移过程中也起到十分重要的作用^[12-15]。但其在胃癌细胞中的表达情况及与肿瘤细胞的迁移能力是否有相关性研究较少。本研究观察了几种常见恶性肿瘤细胞中*zeb1*基因的表达量与肿瘤细胞的迁移能力,以探讨*zeb1*基因与肿瘤细胞的迁移能力之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 正常胃黏膜上皮GES细胞,胃癌BGC823、SGC7901细胞,宫颈癌HeLa细胞,肺癌A549细胞均由本实验室保存;高糖DMEM培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;TRIzol reagent购自Invitrogen公司;逆转录试剂盒购自TaKaRa公司;引物序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;荧光定量试剂盒购自Takara公司;Transwell小室购自Costar公司(USA);多聚甲醛、结晶紫均为国产分析级产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: GES、BGC823、SGC7901、A549及HeLa细胞均于含100 mL/L FBS的高糖DMEM培养液37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养。隔2 d换液,细胞融合达80%时按1:3比例传代培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 提取RNA及逆转录合成cDNA: RNA提取参照TRIzol提取试剂盒的操作说明书进行。提取的RNA纯度 A_{260}/A_{280} 均在1.80以上。照逆转录试剂盒说明书将细胞的总RNA逆转录成cDNA,合成的cDNA于-20℃保存。

1.2.3 PCR验证*zeb1*基因在各细胞系中的表达: 反应体系如下(20 μ L): ddH₂O 13.6 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, Mg²⁺ 2 μ L, dNTP 0.5 μ L, Taq 0.3 μ L, 引物P1、P2各0.3 μ L, 模板cDNA 1 μ L。反应条件: 94℃ 5 min, 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35个循环, 72℃ 10 min。*zeb1*引物序列P1: 5'-GCACAACCAAGTGCAGAAGA-3', P2: 5'-CATTGTCAGATTGAGGCTGA-3', (GenBank登录号: NM_001128128.1, 扩增片段大小为190 bp)。

1.2.4 荧光定量PCR检测*zeb1*在各细胞系中的表

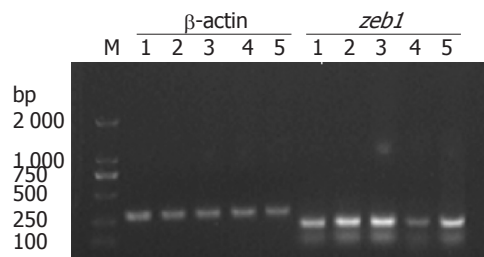


图1 *zeb1*在五种细胞中的表达。M: DL-2000 Marker; 1: A549; 2: BGC823; 3: GES; 4: HeLa; 5: SGC7901。

达量: 反应体系: SYBR 10 μ L, P1 0.4 μ L, P2 0.4 μ L, ROX II 0.4 μ L, 模板cDNA 1.6 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。反应条件: 95℃ 10 s, 95℃ 5 s, 56℃ 20 s, 40个循环。引物序列同上。以 β -actin为内参,校正每个样品的CT值,其引物序列为P1: 5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3', P2: 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3', 每种细胞重复3次。GenBank登录号: BC002409, 扩增片段大小为285 bp。采用相对定量法分析数据,将正常胃黏膜上皮细胞GES中的*zeb1*表达量设定为1,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算基因相对拷贝数,利用SPSS13.0软件对获得的数据进行分析。

1.2.5 Transwell小室迁移实验: 取对数生长期细胞,常规消化离心,用无血清的DMEM的培养液重悬细胞,调整细胞浓度至 $5 \times 10^7/L$,小室内加入200 μ L细胞悬液,小室下部24孔板内加入600 μ L含100 mL/L FBS的DMEM培养液,常规培养24 h后取出小室,棉签擦去小室内未迁移的细胞,4%多聚甲醛固定15 min,1%结晶紫染色15 min,单蒸水洗掉染色液后风干,放倒置显微镜下观察,100倍视野下取上中下左右5个视野计数穿过小室的细胞数目,以穿过膜的细胞数目的多少来评估其迁移能力,结果采用mean \pm SD来表示,每组细胞重复3次实验。

统计学处理 数据以mean \pm SD,采用SPSS13.0统计软件对所得数据进行单因素方差分析,两两比较采用LSD法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对定量结果和迁移结果之间进行相关性分析。

2 结果

2.1 *zeb1*基因在各细胞系中的表达 经PCR电泳跑胶表明在五种细胞中都有*zeb1*基因的表达,扩增片段大小与预期大小一致均为190 bp(图1)。

2.2 定量PCR检测结果 以各细胞的cDNA为模板进行Real time PCR检测*zeb1*基因的表达量,可见到4种肿瘤细胞中肺癌A549细胞中的*zeb1*

■ 相关报道

Drake等的研究表明在某些肿瘤细胞系中*zeb1*基因的表达与肿瘤细胞的迁移能力有相关性,但并不是在所有的肿瘤细胞系中都存在这种关系,其机制有待进一步的研究。

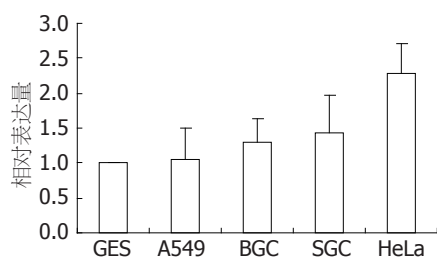
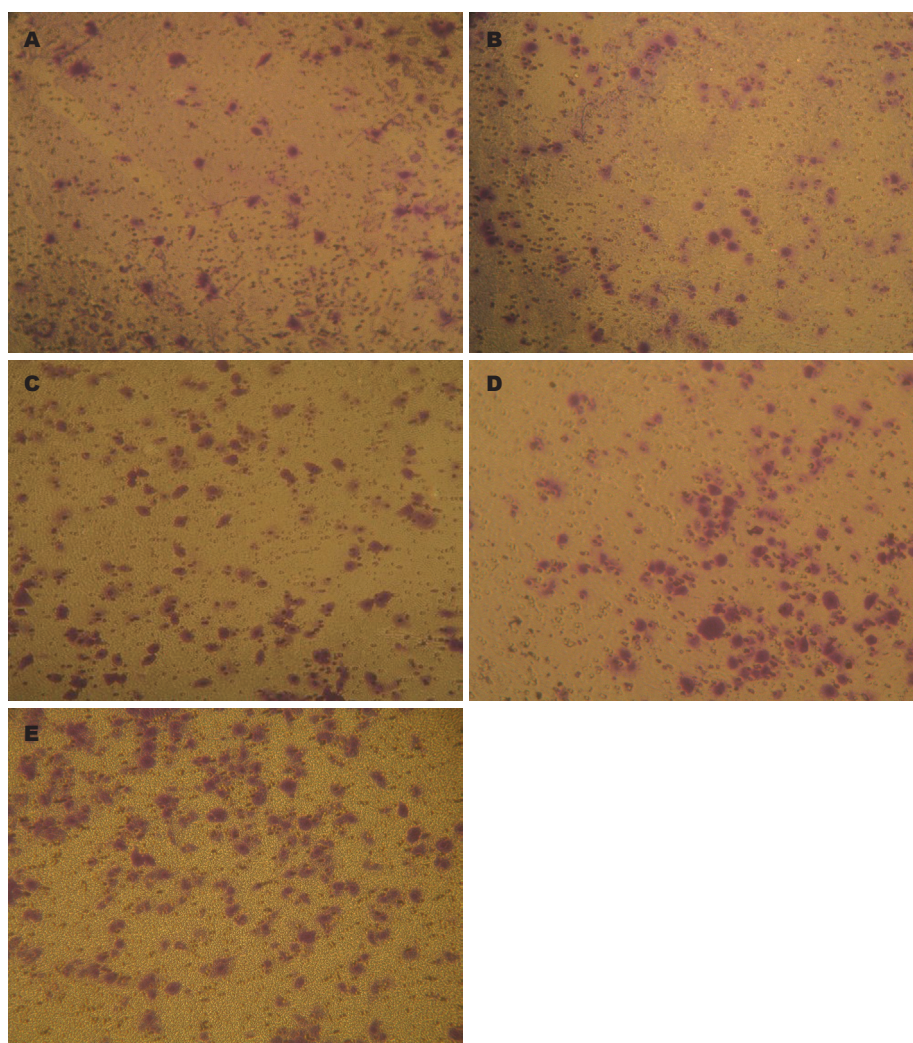
图 2 *zeb1*在各细胞系中的相对表达量.

表 1 各细胞系迁移数目

细胞	迁移细胞数目
GES	79.13 ± 17.12
A549	97.60 ± 25.21
BGC823	108.93 ± 39.16
SGC7901	132.73 ± 45.02
HeLa	169.07 ± 32.11

■创新盘点

本文首次在多种肿瘤细胞系中对 *zeb1* 基因的表达与肿瘤细胞的迁移能力进行分析, 数据更具说服力.

图 3 各细胞系迁移实验图($\times 100$).

A: GES; B: A549; C: BGC823; D: SGC7901; E: HeLa.

表达量最低, 胃癌细胞BGC823及SGC7901的 *zeb1* 表达量其次, 宫颈癌HeLa细胞中的 *zeb1* 表达量最高. 其中HeLa细胞与其他四组细胞间的 *zeb1* 基因的表达量有明显差异, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而其他各组细胞间 *zeb1* 基因的表达量无明显差异(图2).

2.3 Transwell迁移实验结果 正常胃黏膜上皮细胞GES的迁移细胞数目最少, 而HeLa细胞迁移细胞数目最多. 各细胞系的迁移数目除GES与A549、A549与BGC823、SGC7901与HeLa之间无明显差异外, 其余各组细胞间迁移细胞数目

有明显统计学意义($P < 0.05$, 表1, 图3).

2.4 *zeb1*表达水平与细胞迁移能力之间的相关性分析 *zeb1* 表达量与细胞迁移能力之间存在线性关系($r = 0.961$, $P < 0.01$), *zeb1* 的表达量越高, 细胞的迁移数目越多.

3 讨论

侵袭性与转移性是恶性肿瘤最重要的生物学特征, 也是肿瘤患者致死的主要原因^[16]. 肿瘤的侵袭和转移包括细胞黏附、蛋白酶水解组织基质以及细胞迁移等进程. 其中细胞迁移运动普遍

应用要点

本研究为抑制恶性肿瘤细胞的侵袭转移提供了新的研究方向, *zebl* 基因有可能成为新的基因治疗靶点。

存在于组织发育、伤口愈合、血管发生等生理过程中, 同时又存在于肿瘤发生发展这样的病理过程中^[1-3]。在迁移过程中, 细胞内细胞骨架蛋白的动态组装, 细胞和细胞外基质间黏着的动态变化、周围基质的重塑等以及这些反应在迁移过程中的协调涉及复杂的信号调节。

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)参与人体许多的生理病理过程, 包括胚胎发生, 器官分化, 组织炎症, 创伤愈合等, 越来越多的研究表明异常活化的EMT还可以促进肿瘤细胞的侵袭及转移^[17,18]。在EMT过程中, 上皮细胞获得成纤维样细胞的特征: 细胞间黏附减弱、运动性增强, 且细胞间紧密连接及细胞极性均被破坏。EMT的一个重要标志是E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达的下调, E-钙黏蛋白的表达水平与肿瘤发生的阶段相关^[19,20]。许多转录因子抑制E-钙黏蛋白的表达, 如: Snail/Slug家族蛋白、Twist、 δ EF1/*zebl*、SIP1和E12/E47。其中关于*zebl*促进肿瘤细胞的侵袭和转移的研究主要集中在他的对E-钙黏蛋白及T-钙黏蛋白的抑制作用^[12,21]。同时*zebl*还被发现有促进TGF- β 介导的抗增殖信号的作用^[22]。Drake等^[23]的研究发现某些前列腺癌细胞系的迁移能力与*zebl*基因的表达有关, 但不具有普遍性, 其机制还有待进一步的研究。

本实验采用实时定量PCR的方法检测了GES、BGC823、SGC7901、A549及HeLa细胞中*zebl*基因的相对表达量, 同时用Transwell小室法检测了这五种细胞的迁移能力, 对两者之间的关系进行线性相关分析, 结果表明在*zebl*表达量的多少与细胞的迁移能力之间呈正相关, 说明*zebl*可能促进肿瘤细胞的迁移能力, 对研究肿瘤细胞迁移的机制提供了新的方向与靶点。但其究竟是通过什么途径达到促进其迁移能力等有待进一步研究。近来的研究认为黏着斑(focal adhesion)^[24], 整合素(integrin)^[25], 黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)^[26], RHO家族蛋白^[27]等在细胞的迁移中发挥重要作用。进一步的关于*zebl*促迁移机制的研究我们可以从以上几个方面来进行, 后续相关试验正在进行中。

参考文献

- 1 Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14: 53-65
- 2 Han VK, D'Ercole AJ, Lund PK. Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor)

messenger RNA in the human fetus. *Science* 1987; 236: 193-197

- 3 Guvakova MA. Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 890-909
- 4 Funahashi J, Sekido R, Murai K, Kamachi Y, Kondoh H. Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Development* 1993; 119: 433-446
- 5 Williams TM, Moolten D, Burlein J, Romano J, Bhaerman R, Godillot A, Mellon M, Rauscher FJ 3rd, Kant JA. Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression. *Science* 1991; 254: 1791-1794
- 6 Genetta T, Ruezinsky D, Kadesch T. Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 6153-6163
- 7 Brabletz T, Jung A, Hlubek F, Löhberg C, Meiler J, Suchy U, Kirchner T. Negative regulation of CD4 expression in T cells by the transcriptional repressor ZEB. *Int Immunol* 1999; 11: 1701-1708
- 8 Grégoire JM, Roméo PH. T-cell expression of the human GATA-3 gene is regulated by a non-lineage-specific silencer. *J Biol Chem* 1999; 274: 6567-6578
- 9 Fontemaggi G, Gurtner A, Strano S, Higashi Y, Sacchi A, Piaggio G, Blandino G. The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 8461-8470
- 10 Murray D, Precht P, Balakir R, Horton WE Jr. The transcription factor deltaEF1 is inversely expressed with type II collagen mRNA and can repress Col2a1 promoter activity in transfected chondrocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 3610-3618
- 11 Terraz C, Toman D, Delauche M, Ronco P, Rossert J. delta Ef1 binds to a far upstream sequence of the mouse pro-alpha 1(I) collagen gene and represses its expression in osteoblasts. *J Biol Chem* 2001; 276: 37011-37019
- 12 Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 2375-2385
- 13 Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2006; 131: 830-840
- 14 Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 2007; 26: 6979-6988
- 15 Yang S, Du J, Wang Z, Yuan W, Qiao Y, Zhang M, Zhang J, Gao S, Yin J, Sun B, Zhu T. BMP-6 promotes E-cadherin expression through repressing deltaEF1 in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2007; 7: 211
- 16 Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E,

- Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56
- 17 Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 2005; 65: 5991-5995; discussion 5995
- 18 Berx G, Raspé E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24: 587-597
- 19 Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 499-508
- 20 Junghans D, Haas IG, Kemler R. Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 446-452
- 21 Adachi Y, Takeuchi T, Nagayama T, Ohtsuki Y, Furihata M. Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer. *FEBS Lett* 2009; 583: 430-436
- 22 Postigo AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *EMBO J* 2003; 22: 2443-2452
- 23 Drake JM, Strohbehn G, Bair TB, Moreland JG, Henry MD. ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 2207-2217
- 24 Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 2001; 114: 3583-3590
- 25 Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-687
- 26 Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 2000; 19: 5606-5613
- 27 Yan X, Shen Y, Zhu X. Live show of Rho GTPases in cell migration. *J Mol Cell Biol* 2010; 2: 68-69

■同行评价

本文内容新颖, 值得进一步研究证实。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

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

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

OPN和PAI-1在肝纤维化时的表达特征

张斌, 赵莹, 陈建杰, 王灵台

■背景资料

骨桥蛋白(OPN)作为ECM的非胶原蛋白组分,在肝纤维化过程的作用受到学者的重视。纤溶系统(PA和PAI)属于丝氨酸蛋白酶类,与ECM的降解密切相关,本文拟从此角度研究OPN及纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)表达特征及在肝纤维化时的作用。

张斌, 赵莹, 陈建杰, 王灵台, 上海中医药大学附属曙光医院肝病科上海市 201203

张斌, 主任医师, 主要从事肝病的基础和临床研究。

上海市中医肝病临床医学中心基金资助项目, No. ZX2006-01

通讯作者: 张斌, 主任医师, 200021, 上海市张衡路528号, 上海中医药大学附属曙光医院. zhangbsh@yahoo.cn

电话: 021-51328888-8209

收稿日期: 2009-12-06 修回日期: 2010-03-16

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

Expression characteristics of OPN and PAI-1 in rat liver fibrosis

Bin Zhang, Ying Zhao, Jian-Jie Chen, Ling-Tai Wang

Bin Zhang, Ying Zhao, Jian-Jie Chen, Ling-Tai Wang, Department of Hepatology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Supported by: the Fondation of Clinical Center of Chinese Medicine Liver Disease in Shanghai, No. ZX2006-01

Correspondence to: Bin Zhang, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 528 zhangheng Road, Shanghai 201203, China. zhangbsh@hotmail.com

Received: 2009-12-06 Revised: 2010-03-16

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of osteopontin (OPN) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in dimethylnitrosamine (DMN)-induced hepatic fibrosis in rats.

METHODS: Liver fibrosis was induced in rats by intraperitoneal injection of DMN. All rats were sacrificed to take liver tissue specimens. Formalin-fixed liver sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and Sirius Red to evaluate general histology and hepatic fibrosis, respectively. The expression of OPN and PAI-1 proteins was detected by immunohistochemistry and Western blot. The expression of OPN mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Computerized image analysis system was then used for quantification.

RESULTS: Immunohistochemical staining

showed that the expression of OPN and PAI-1 increased dramatically in fibrotic rat liver when compared with normal rat liver. OPN-positive signals were scattered or diffused around the central veins, and in fibrous septum and adjacent macrophages, Kupffer cells, some hepatic cells in the portal area, and liver sinusoidal endothelial cells. The expression of PAI-1 was distributed in the portal areas, degenerative and necrotic hepatic cells, the space of Disse and adjacent hepatic cells, fibrous septum and adjacent cells. Western blot analysis showed that the expression of OPN and PAI-1 increased obviously in fibrotic rat liver (1.0907 ± 0.2082 vs 0.0673 ± 0.0663 and 1.1407 ± 0.3094 vs 0.2464 ± 0.2234 , respectively; both $P < 0.01$). RT-PCR analysis showed that the expression of OPN mRNA was also significantly enhanced in fibrotic rat liver (0.2128 ± 0.0527 vs 0.1298 ± 0.0316 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of OPN is closely correlated with that of PAI-1 during hepatic fibrosis. The expression of OPN and PAI-1 is significantly up-regulated in rat hepatic fibrosis. OPN may promote the high expression of PAI-1, inhibit extracellular matrix degradation, and accelerate fibrosis progression.

Key Words: Osteopontin; Plasminogen activator inhibitor type-1; Hepatic fibrosis; Hepatic tissue

Zhang B, Zhao Y, Chen JJ, Wang LT. Expression characteristics of OPN and PAI-1 in rat liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1104-1108

摘要

目的: 研究骨桥蛋白(OPN)及纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)的表达特征及其在肝纤维化时的变化。

方法: 采用二甲基亚硝胺制作大鼠肝纤维化模型。大鼠肝脏常规HE和天狼猩红染色。采用SABC法作免疫组织化学染色及Western blot检测OPN和PAI-1蛋白表达; RT-PCR法检测OPN基因表达; 检测结果采用计算机图像定量分析系统, 扫描并计算染色阳性区域面积和阳性比率或条带的吸光度值。

■同行评议者

叶红军, 主任医师, 广东省北京大学深圳医院消化内科

结果: 正常大鼠肝组织OPN和PAI-1表达极弱, 肝纤维化大鼠肝脏中OPN表达增强, 阳性信号散在或弥漫性分布, 主要见于小叶内中央静脉周围、纤维间隔内以及周围巨噬细胞胞质, 库普弗细胞, 门管区的部分肝细胞, 肝窦壁内皮细胞. PAI-1在肝纤维化大鼠肝组织汇管区、肝细胞变性坏死处, 肝窦周Disse间隙及毗邻以上部位的肝细胞, 组织纤维间隔处及其外周细胞亦见阳性染色. Western blot检测正常大鼠肝脏OPN的蛋白表达极低, 肝纤维化组OPN的蛋白表达较正常组显著增强(1.0907 ± 0.2082 vs 0.0673 ± 0.0663 , $P < 0.01$). 与正常组比, 肝纤维化组PAI-1表达也显著增强(1.1407 ± 0.3094 vs 0.2464 ± 0.2234 , $P < 0.01$). RT-PCR检测结果显示, 正常大鼠肝脏OPN mRNA表达极低, 肝纤维化大鼠肝脏OPN mRNA的表达明显增强(0.2128 ± 0.0527 vs 0.1298 ± 0.0316 , $P < 0.05$).

结论: OPN及PAI-1的表达与肝纤维化密切相关, 肝纤维化时大鼠肝组织OPN及PAI-1的表达水平显著增高, OPN可能会促进PAI-1的高表达, 从而抑制细胞外基质(ECM)降解、加速肝纤维化进程.

关键词: 骨桥蛋白; 纤溶酶原激活物抑制物; 肝纤维化; 肝组织

张斌, 赵莹, 陈建杰, 王灵台. OPN和PAI-1在肝纤维化时的表达特征. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1104-1108
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1104.asp>

0 引言

肝纤维化是肝脏对慢性损伤的一种修复反应, 是慢性肝病的共有病理改变, 肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过多沉积为其特征性改变. 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)作为ECM的非胶原糖蛋白组分, 在肝纤维化过程的作用受到学者的重视. 纤溶系统(PA和PAI)属于丝氨酸蛋白酶类, 与ECM的降解密切相关, 本文拟从此角度研究OPN及纤溶酶原激活物抑制物(plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1)表达特征及在肝纤维化时的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar δ 大鼠35只, 清洁级, 体质量 $150 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$, 中科院上海实验动物中心提供. 二甲基亚硝胺(DMN, 东京化成工业株式会社产品). 小鼠抗大鼠OPN抗体、兔抗大鼠PAI-1抗体、兔抗大鼠GAPDH(SC-25778)抗体为美国Santa Cruz

公司产品, SABC免疫组织化学即用型染色试剂盒及DAB染色试剂盒, 购于武汉博士德公司, BCATM Protein-Assay-Kit美国PIERCE产品, ECL Plus Western Blotting Detection Reagent美国GE Healthcare offices产品. cDNA逆转录试剂盒及PCR×MIX试剂盒为Fermentas产品.

1.2 方法

1.2.1 分组及处理: 将大鼠随机分为正常对照组和肝纤维化模型组(DMN组), 模型组从造模第1周起, 每周1, 2, 3连续三天腹腔注射0.5% DMN $0.2 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 体质量, 每日1次, 共注射3 wk, 稳定1 wk.

1.2.2 OPN、PAI-1免疫组织化学检测: 大鼠肝脏石蜡包埋块 $4 \mu\text{m}$ 连续切片, 采用SABC法作免疫组织化学染色, 一抗分别为OPN抗体(工作浓度1:800)和PAI-1抗体(工作浓度1:200), 阴性对照以PBS替代一抗, 阳性细胞为胞质着色. 染色结果采用MIQAS医学图像定量分析系统, 测量并计算阳性区域面积和阳性比率以及吸光度值.

1.2.3 Western blot检测: 取 100 mg 湿肝冰浴中匀浆, 移入含 $10 \mu\text{L}$ PMSF的管中离心, 取上清液测总蛋白量, 保持样品蛋白质等量上样、电泳. 电泳后将凝胶取出, 电转移至硝酸纤维素膜, 经洗膜、封闭后, 加入一抗的工作液, 4°C 轻摇过夜, TBST洗膜后, 加二抗的工作液, 室温振荡60 min, TBST洗膜后, 按Amersham ECL Plus检测试剂盒操作, 转印膜用感光胶片显影, 显影后可见特异性靶条带, 用图像分析软件扫描并测定吸光度值.

1.2.4 RT-PCR检测: 采用TRIzol试剂方法抽提肝组织总RNA, 提取的总RNA用蛋白质核酸分析系统进行定量, 测定 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$. RT-PCR检测目的基因及内参照 β -actin引物由上海赛百盛生物技术有限责任公司设计并合成(表1). RNA逆转录合成cDNA根据cDNA Synthesis Kit方法进行. 总RNA经逆转录反应后, 采用2对引物在同一体系中进行PCR反应, 其中 β -actin的引物作为内参. PCR体系置DNA扩增仪上扩增后, 将PCR产物 $10 \mu\text{L}$, 加入上样缓冲液, 于2%琼脂糖凝胶电泳, 在天能凝胶图像处理仪观察并摄取电泳凝胶图像, 用KS400型图像分析系统进行吸光度扫描, 以目的基因吸光度值与对应内参基因吸光度的比值作为该样品中目的基因的相对转录量.

统计学处理 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析, 两两比较采用最

■研究前沿

纤溶系统的肝脏细胞来源一直为众多学者所争论, 如有的研究发现静止期的大鼠肝细胞体内及体外实验都不表达PAI-1, 而有的学者发现在原代培养的肝细胞产生tPA和PAI-1.

■相关报道

已有研究表明OPN和PAI与肝纤维化进程密切相关,炎症反应可增强刺激肝星状细胞(HSC),导致ECM的重建和纤维瘢痕的形成。

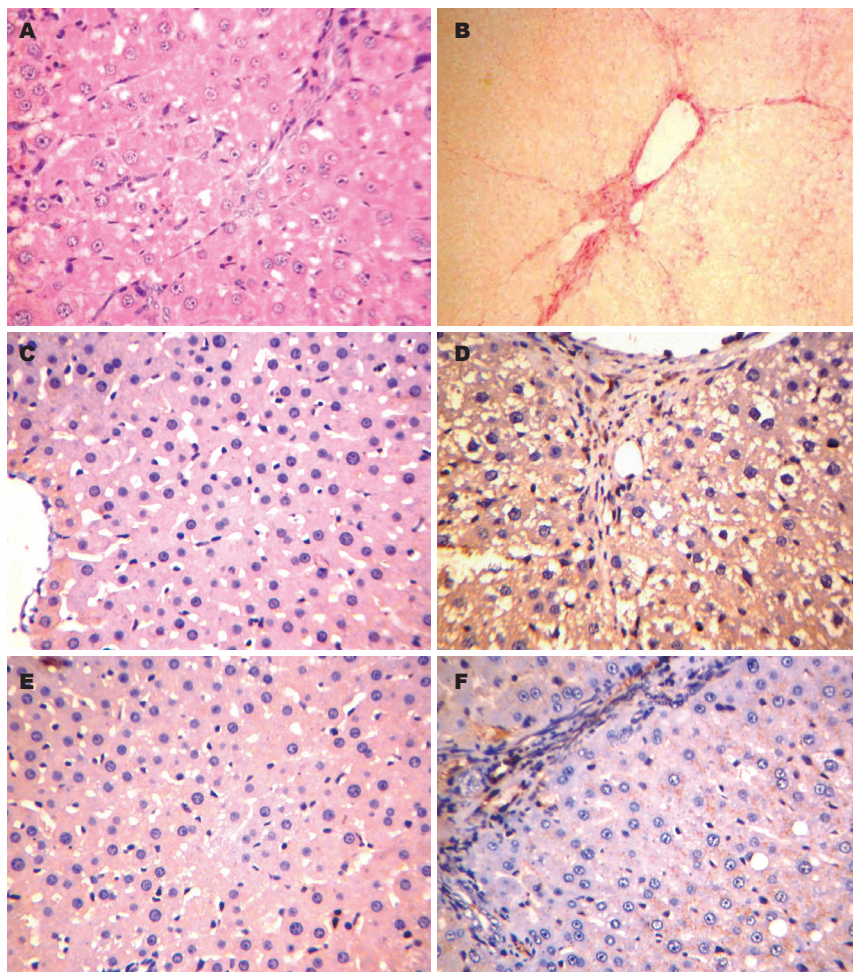


图1 肝脏病理染色. A: DMN组HE染色; B: DMN组天狼猩红染色; C: 正常组OPN染色; D: DMN组OPN染色; E: 正常组PAI-1染色; F: DMN组PAI-1染色.

表1 引物基因序列

基因	PCR引物	产物长度(bp)
OPN-F	CAGTCGATGTCCTGACGG	206
OPN-R	GTTGCTGTCCTGATCAGAGG	
β -actin-F	GTTCCGATGCCCGAGGCTCT	361
β -actin-R	GCATTTCGGTGCACGATGGA	

小显著(LSD)法检验,所有数据均利用SPSS11.0软件分析。

2 结果

2.1 病理HE染色观察 正常组大鼠肝细胞束排列整齐,无变性、坏死,肝实质内未见炎细胞浸润。DMN组大鼠肝组织中可见肝细胞空泡样变性,纤维组织增生,纤维间隔加宽,肝窦走向紊乱,有部分假小叶形成(图1A)。

2.2 天狼猩红染色结果 正常组大鼠肝小叶结构正常,无纤维增生;DMN组大鼠肝组织可见到肝内纤维间隔增多增宽,纵横交错互相连接,汇管区结构变形(图1B)。

2.3 免疫组织化学检测结果 正常组大鼠肝组织

OPN表达极弱,DMN组大鼠肝脏中OPN表达增强,阳性信号为棕黄色颗粒,散在或弥漫性分布,主要见于小叶内中央静脉周围、纤维间隔内以及周围巨噬细胞胞质,库普弗细胞,门管区的部分肝细胞胞质,肝窦壁内皮细胞,中亦有阳性染色,未见细胞核着色(图1C, D)。PAI-1在正常大鼠肝组织中央静脉、肝动脉、门静脉及肝血窦腔面可见阳性细胞胞质染色,在DMN组大鼠肝组织汇管区、肝细胞变性坏死处、肝窦周Disse间隙及毗邻的肝细胞质、组织纤维间隔处及其外周细胞亦见阳性染色(图1E, F)。

2.4 Western blot检测结果 正常组大鼠肝脏OPN的蛋白表达极低,DMN组OPN的蛋白表达较正常组显著增强($P<0.01$)。与正常组比,DMN组PAI-1表达也显著增强($P<0.01$,表2,图2, 3)。

2.5 RT-PCR检测结果 RT-PCR检测结果显示,正常组大鼠肝脏OPN mRNA表达极低,DMN组大鼠肝脏OPN mRNA的表达明显增强,较正常组有显著差异(0.2128 ± 0.0527 vs 0.1298 ± 0.0316 , $P<0.05$,图4)。

3 讨论

肝脏炎症反应和肝细胞的损伤常是肝纤维化的

表 2 肝纤维化大鼠肝组织OPN/GAPDH及PAI-1/GAPDH蛋白表达 ($n=5$, mean \pm SD, A 值)

分组	OPN/GAPDH	PAI-1/GAPDH
正常组	0.0673 \pm 0.0663	0.2464 \pm 0.2234
DMN组	1.0907 \pm 0.2082 ^b	1.1407 \pm 0.3094 ^b

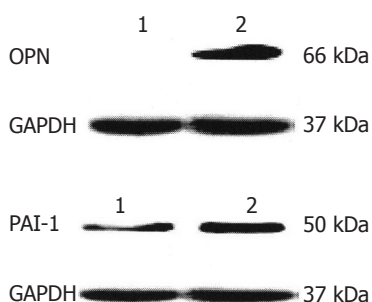
^b $P < 0.01$ vs 正常组.

图 2 大鼠肝脏 OPN 的蛋白表达检测结果. 1: 正常组; 2: DMN 组.

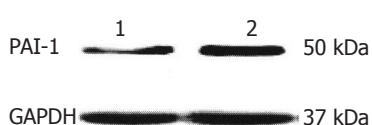


图 3 大鼠肝脏 PAI-1 的蛋白表达检测结果. 1: 正常组; 2: DMN 组.

启动因素, 肝细胞损伤后可通过一些细胞因子或介质的释放引起纤维化进程的加速, 已有研究表明OPN和PAI与肝纤维化进程密切相关, 炎症反应可增强刺激肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC), 导致ECM的重建和纤维瘢痕的形成^[1].

我们通过免疫组织化学对OPN的表达定位, 发现正常组大鼠的肝组织几乎不表达OPN, 与部分文献报道结果相同^[2], 而肝纤维化大鼠肝小叶中央静脉周围、纤维间隔内以及周围巨噬细胞胞质, 库普弗细胞, 肝窦内皮细胞, 汇管区的部分肝细胞胞质中都有OPN阳性表达. 通过RT-PCR和Western blot的方法检测肝纤维化组OPN mRNA表达和蛋白表达, 显示肝纤维化组OPN的蛋白表达和OPN mRNA的表达都较正常组明显增强, 因此推测OPN的蛋白表达和mRNA表达增加, 可能与肝脏损伤后表达OPN的细胞增多有关^[3].

HSC活化、增殖进而合成大量的胶原等ECM成分是各种肝脏损伤引起肝纤维化的中心环节. 尽管我们在使用免疫组织化学的方法对模型OPN的定位, 未能发现大量的肝星状细胞OPN强阳性染色, 但是我们通过对OPN蛋白表达的Western blot检测结合基因表达的RT-PCR检测, 与肝组织动态病理分级, 结合胶原天狼猩红染色的情况, 我们认为OPN的表达与肝星状细胞的活化是密切相关的. OPN可能通过对巨噬细胞的趋化作用, 引起巨噬细胞的聚集, 从而参与局部累积的库普弗细胞和巨噬细胞对于HSC的激活和肝纤维化级联反应.

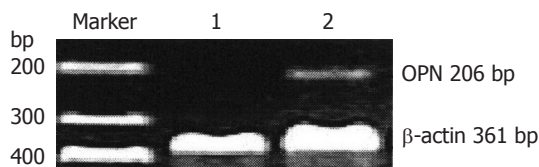


图 4 大鼠肝脏OPN mRNA的表达检测结果. 1: 正常组; 2: DMN组.

■同行评价

本研究内容有一定新颖性, 技术路线先进, 论点清晰, 学术价值较好.

新近的研究证实体外培养的肝细胞能合成和分泌OPN, 并且在TNF- α , TGF- β 和Leptin的刺激下其合成上调, 并且肝细胞OPN的表达增加先于肝脏炎症及纤维化的发展的, 同时伴有I型胶原mRNA的表达增加^[4]. Sung等发现重组OPN与HSC共培养, 可引起HSC明显的增殖与迁移, 诱导MMP-2的产生与活化, 引起I型胶原和II型、TGF- β 受体mRNA及蛋白的产生^[2]. 这提示OPN的表达上调可能是HSC活化的一个重要途径. 本实验结果表明, 在肝纤维化的形成过程中, 中央静脉周围、汇管区周围及其附近的肝窦内皮细胞, 部分肝细胞胞质都可以发现OPN阳性染色的细胞, 可以设想, 用干预OPN的表达或调节OPN的活性作为治疗靶标, 可以阻止肝纤维化的进程.

纤溶系统属于丝氨酸蛋白酶类, 与ECM的降解密切相关. 纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)作为纤溶系统其中的一个重要的组成部分, 大量的实验和临床研究证据表明他在肝纤维化形成中具有重要的作用. 对于PAI-1致纤维化的作用目前认为与两个相互联系的途径密不可分: 一是PAI-1抑制PA活性, 进而减少纤溶酶的生成和纤维蛋白的降解; 二是u-PA可促进MT1-MMP和MMP2活化. PAI-1作为uPA的抑制剂, 抑制uPA诱导的及由MT1-MMP介导的MMP-2的活化.

纤溶系统的肝脏细胞来源一直为众多学者所争论^[5], 如有的研究发现静止期的大鼠肝细胞体内及体外实验都不表达PAI-1, 而有的学者发现在原代培养的肝细胞产生tPA和PAI-1. 我们免疫组织化学定位的结果表明在正常大鼠的肝脏中央静脉、肝动脉、门静脉及肝血窦腔面可见阳性细胞胞质染色, 在血瘀型肝纤维化模型大鼠肝组织汇管区、肝细胞变性坏死处, 肝窦周Disse间隙及毗邻部位的肝细胞质, 组织纤维间隔处及其外周细胞亦见不同程度阳性表达. 而在纤维化模型大鼠的肝组织以上部位的阳性表达较血瘀型肝纤维化模型阳性表达弱. 这与国内李清华等报道相似: 随着肝纤维化程度的加

重, PAI-1的蛋白表达着色积分亦明显增加^[6]。

通过免疫组织化学半定量及蛋白表达 Western blot检测的发现, PAI-1和OPN在肝纤维化形成过程中蛋白表达明显增强, 就免疫组织化学定位来看, 两者在肝纤维化发生时的细胞学来源相似, 与关键ECM产生细胞如HSC相关, 或者与HSC活化相关的细胞如纤维细胞、巨噬细胞相互联系。但是两者在肝纤维化中发挥的作用存在差异, PAI-1主要是与基质的降解关系较大, 因此随着肝纤维化的进展其表达不断增加从而抑制ECM的降解。而OPN作为一种功能独特的ECM成分之一, 从肝纤维化的形成过程中的蛋白表达整体趋势而言以上升为主, 既可以通过对巨噬细胞的趋化作用, 引起巨噬细胞的聚集, 从而参与局部累积的库普弗细胞和巨噬细胞对于星状细胞的激活和肝纤维化级联反应, 也可能与I型胶原, 纤连蛋白等其他胞外基质成分相互作用而参与纤维化时ECM网架的形成等。

可以推测OPN的表达增高可能会促进PAI-1的表达增强, PAI-1表达增强会抑制纤溶系统对包括OPN在内的ECM成分的降解, 从而加速纤维化的形成。目前对于OPN与纤溶系统的关系的研究还不是很多, 国内报道^[7]在血管再狭窄发生过程中, OPN与纤溶酶原激活物抑制物共同参与血管的重构, 而对于OPN及PAI-1在肝纤维化

形成中作用的研究报道更少, 我们对于两者关系的研究初步揭示OPN和PAI-1在肝纤维化形成过程中的相关性。

4 参考文献

- 1 高峰, 程留芳. 中医药抗肝纤维化作用机制的研究进展. 现代中西医结合杂志 2005; 14: 39-41
- 2 Lee SH, Seo GS, Park YN, Yoo TM, Sohn DH. Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 2367-2378
- 3 Lorena D, Darby IA, Gadeau AP, Leen LL, Rittling S, Porto LC, Rosenbaum J, Desmoulière A. Osteopontin expression in normal and fibrotic liver. altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *J Hepatol* 2006; 44: 383-390
- 4 Kawashima R, Mochida S, Matsui A, YouLuTuZ Y, Ishikawa K, Toshima K, Yamanobe F, Inao M, Ikeda H, Ohno A, Nagoshi S, Uede T, Fujiwara K. Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 527-531
- 5 Zhang LP, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N, Watanabe A. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *J Hepatol* 1999; 31: 703-711
- 6 李清华, 秦成勇. 纤溶酶原激活物抑制物在纤维化肝组织中的表达及其血浆活性检测. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 209-211
- 7 周秀霞, 温进坤, 韩梅. 血管再狭窄发生过程中血浆组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂活性与胶原转换的变化. 中国动脉硬化杂志 2000; 8: 96-98

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

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

HBx基因缺失突变体HBx-d382对L02细胞增殖及非锚定依赖生长能力的影响

胡志亮, 谭德明, 侯周华, 谢萍, 刘国珍, 欧阳奕, 刘菲, 刘洪波

胡志亮, 谭德明, 侯周华, 谢萍, 刘国珍, 欧阳奕, 刘菲, 刘洪波, 中南大学附属湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410087
胡志亮, 中南大学附属湘雅医院博士, 从事乙型肝炎病毒与肝癌的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30872228

作者贡献分布: 此课题由胡志亮、谭德明及侯周华设计; 研究过程由胡志亮、侯周华、谢萍、欧阳奕、刘菲及刘洪波操作完成; 数据分析由胡志亮、谭德明及刘国珍完成; 本论文写作由胡志亮、谭德明及刘国珍完成。

通讯作者: 谭德明, 教授, 410087, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学附属湘雅医院传染科. dmt2008@yahoo.com.cn
电话: 0731-84327221

收稿日期: 2010-01-28 修回日期: 2010-03-22

接受日期: 2010-03-29 在线出版日期: 2010-04-18

HBx gene deletion mutant (HBx-d382) enhances the proliferation and anchorage-independent growth of L02 cells

Zhi-Liang Hu, De-Ming Tan, Zhou-Hua Hou, Ping Xie, Guo-Zhen Liu, Yi Ouyang, Fei Liu, Hong-Bo Liu

Zhi-Liang Hu, De-Ming Tan, Zhou-Hua Hou, Ping Xie, Guo-Zhen Liu, Yi Ouyang, Fei Liu, Hong-Bo Liu, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410087, Hunan Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872228

Correspondence to: Professor De-Ming Tan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410087, Hunan Province, China. dmt2008@yahoo.com.cn

Received: 2010-01-28 Revised: 2010-03-22

Accepted: 2010-03-29 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To establish a L02 cell line stably expressing HBx gene deletion mutant (HBx-d382) and to examine their proliferation changes.

METHODS: A recombinant plasmid encoding the HBx deletion mutant (pcDNA3.0/HBx-d382) was verified by PCR amplification, double restriction digestion and DNA sequencing, and then introduced into L02 cells by liposome-mediated transfection. Positive clones were selected in the presence of G418. The genome integration of the HBx gene deletion mutant was confirmed by PCR

amplification, and the expression of the deletion mutant was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. Cell proliferation changes were measured by methyl thiazol tetrazolium (MTT) assay and soft agar colony formation assay. The cell cycle distribution was tested by flow cytometry.

RESULTS: The recombinant plasmid pcDNA3.0/HBx-d382 was verified to contain HBx-d382 by PCR amplification, double digestion and DNA sequencing. Positive clones selected with G418 harbored chromosomally integrated HBx-d382 and could express HBx-d382. This cell line showed enhanced proliferation and anchorage-independent growth as revealed by MTT assay and soft agar colony formation assay. The percentage of cells in S and G₂ phases increased in transfected cell line.

CONCLUSION: L02 cell line stably expressing the HBx deletion mutant is established successfully. The proliferation ability of this cell line increases probably due to altered cell cycle.

Key Words: HBx; Mutation; Proliferation; Cell cycle

Hu ZL, Tan DM, Hou ZH, Xie P, Liu GZ, Ouyang Y, Liu F, Liu HB. HBx gene deletion mutant (HBx-d382) enhances the proliferation and anchorage-independent growth of L02 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1109-1114

摘要

目的: 建立稳定表达HBx基因缺失突变体(HBx-d382)的L02肝细胞株, 并探讨其对L02细胞增殖的影响。

方法: 含HBx-d382重组质粒(pcDNA3.0/HBx-d382)经过PCR扩增、双酶切及测序鉴定后, 通过脂质体转染和G418筛选获得稳定表达HBx-d382的L02肝细胞株。PCR鉴定基因组中HBx-d382基因整合。RT-PCR和Western blot鉴定其表达, 进一步通过MTT法, 软琼脂克隆形成实验检测HBx-d382对L02细胞增殖及非锚定依赖生长能力的影响。用流式细胞仪检测其对细胞周期的影响。

■背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染是肝癌发生的主要危险因素, 既往的研究表明, 几乎所有HBV相关的肝癌组织中都可以检测到基因组整合的HBV DNA, 在众多病毒基因组整合亚单位中HBx基因可以转录并翻译成相应HBx蛋白; HBx蛋白是一种多功能蛋白质, 参与调节基因转录、细胞信号传导、控制细胞增殖和凋亡, 其对肝细胞的分子生物学特性影响被广泛研究。

■同行评议者

管世鹤, 副教授, 安徽医科大学第一附属医院检验科

■研究前沿

在肝癌组织中或是肝癌患者血清中可以检测到自然发生的HBx变异,一些研究认为HBx突变特别是-COOH的缺失突变体和野生型HBx具有不同的生物学效应,可能参与肝细胞的恶性转化。

结果:经PCR扩增、双酶切及测序鉴定HBx-d382重组质粒构建正确。稳定转染该质粒的L02细胞基因组存在HBx-d382整合。RT-PCR及Western blot表明在RNA水平和蛋白水平存在HBx-d382表达,稳定表达HBx-d382的L02细胞其增殖能力和非锚定生长能力增强,S+G₂期细胞比例升高。

结论:成功构建了HBx缺失突变体的真核表达模型,证实HBx缺失突变体能影响细胞增殖,这种效应可能与其影响细胞周期调控相关。

关键词: HBx; 突变; 增殖; 细胞周期

胡志亮, 谭德明, 侯周华, 谢萍, 刘国珍, 欧阳奕, 刘菲, 刘洪波. HBx基因缺失突变体HBx-d382对L02细胞增殖及非锚定依赖生长能力的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1109-1114
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1109.asp>

0 引言

原发性肝细胞癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,HBV慢性感染是导致肝癌的最常见原因,HBV携带者肝癌的发病率是正常人群的25-37倍^[1,2],而对HBV肝癌发生发展的机制仍未完全阐明。在HBV所编码的蛋白中,约17 kDa大小的HBx被认为和肝癌密切相关^[3]。一些研究发现,HBV感染的肝癌患者中存在HBx基因的整合及突变,并认为HBx基因-COOH某些缺失突变体与肝细胞癌相关^[4-6]。我们前期的研究发现在肝癌组织中HBx基因nt 382-400缺失突变(HBx-d382)发生率较高,可能与慢性乙型肝炎感染后肝癌高发有关^[7]。为研究HBx-d382缺失突变体的意义,本实验将检测表达HBx缺失突变体(HBx-d382)或野生型HBx的L02细胞细胞增殖的改变,进一步研究其致肝细胞恶性转化的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 含有质粒pcDNA3.0、重组质粒pcDNA3.0/HBx-d382(HBx基因nt 382-400缺失)和pcDNA3.0/HBx(重组HBx基因片段来自于肝癌细胞株HepG2.215)的细菌DH5 α 由我室保存;人肝细胞株(L02)购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库;胎牛血清、RPMI Medium 1640培养基(Gibco);Lipofectamine 2000、TRIzol REAGENT(美国Invitrogen);无内毒素质粒大提试剂盒、基因组提取试剂盒(北京天根公司);逆转录试剂盒、核酸内切酶*Kpn* I和*Apa* I (Fermentas);细胞周期检测试剂盒(南京,凯基);ECL+显色试剂盒(GE);兔抗HBx多克隆抗体(英

国,Abcam)、鼠抗 β -actin单克隆抗体(美国, Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养,质粒提取与鉴定:取-70℃保存菌种,用细菌接种环沾取少量菌液,接种于含氨苄青霉素(100 mg/L)的LB平板培养基上,挑选单个菌落增菌培养,收集细菌沉淀,提取质粒,质粒的提取按照试剂盒说明书进行,提取的质粒用*Kpn* I和*Apa* I双酶切鉴定;并用HBx基因特异性引物HBx-F: 5'-AAGGTACCATGGCTGCTAGGCTGTGCT-3', HBx-R: 5'-CTGGGCCCTTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTG-3'进行PCR反应,扩增目的片段,并将质粒送上海申友公司进行DNA序列测定。

1.2.2 细胞转染和稳定细胞株的筛选:质粒鉴定成功后按照Lipofectamine 2000说明书进行转染操作,参照文献[8],以500 mg/L G418维持培养2 wk后挑选抗性克隆,扩大培养后以250 mg/L G418维持筛选,以获得稳定表达HBx基因的细胞株,分别命名为L02/HBx-d382(转染质粒pcDNA3.0/HBx-d382)和L02/HBx(转染质粒pcDNA3.0/HBx),稳定转染pcDNA3.0的细胞株命名为L02/pcDNA3.0。

1.2.3 转染后细胞株HBx基因整合及表达的鉴定:细胞基因组DNA的提取按照基因组提取试剂盒说明书进行;细胞总RNA的提取按照TRIzol说明书进行,用无RNA酶Dnase处理后,通过Oligo(dT)₁₈引物合成cDNA,操作按照说明书进行。以基因组DNA和合成的cDNA为模板,用HBx特异性引物HBx-F和HBx-R扩增目的基因,同时以 β -actin用来作为内参照。PCR反应产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后置于紫外灯下观察。RIPA裂解细胞,离心后收集上清,30 μ g的总蛋白用于15% SDS-PAGE电泳,半干转印于PVDF膜上,用50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h,分别加入HBx抗体(1:1 500), β -actin抗体(1:100 000),4℃孵育过夜,洗膜后根据一抗来源加入相应二抗室温孵育1 h,ECL显色试剂盒显影,将 β -actin作内参照^[9]。

1.2.4 细胞周期检测^[10]:实验分为L02细胞组,L02/pcDNA3.0细胞组,L02/HBx-d382细胞组和L02/HBx细胞组,细胞接种于6孔培养板,待细胞长至对数生长期,收集细胞,用PBS洗涤2次,700 mL/L乙醇4℃固定过夜,取出离心收集细胞,PBS洗涤2次,加入RNase A 37℃孵育30 min,再加入碘化丙锭染色,采用流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 MTT检测细胞增殖:操作参照文献[10,11],略加修改,各组细胞接种于96孔板,每孔接种2 $\times 10^3$ 个细胞,培养24 h后吸弃上清,加入200 μ L

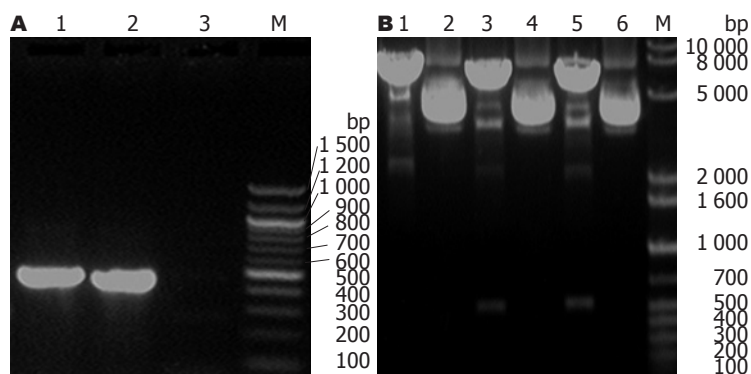


图1 重组质粒的鉴定. A: PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果; 1: pcDNA3.0/HBx; 2: pcDNA3.0/HBx-d382; 3: pcDNA3.0; B: 双酶切鉴定重组质粒结果; 1: pcDNA3.0酶切后; 2: pcDNA3.0酶切前; 3: 重组质粒pcDNA3.0/HBx-d382酶切后; 4: 重组质粒pcDNA3.0/HBx-d382酶切前; 5: 重组质粒pcDNA3.0/HBx酶切后; 6: 重组质粒pcDNA3.0/HBx酶切前; M: DNA分子量标准(bp).

■相关报道
肝癌组织中频发HBx基因突变, 一些来源于肝癌组织的HBx基因-COOH端缺失突变体被成功克隆, 比野生型HBx具有更强的促细胞增殖作用, 人工构建的HBx基因-COOH端缺失突变体亦证实具有不同的生物学效应.

含0.5 g/L MTT的Opti-MEM I Reduced Serum Medium, 4 h吸弃上清, 加入150 μ L DMSO, 摇匀10 min后酶联免疫检测仪测定572 nm处吸光值, 连续检测6 d, 以时间为横轴, 吸光值为纵轴绘制细胞生长曲线.

1.2.5 软琼脂克隆形成实验: 操作参照文献[12], 略加修改, 将 5×10^3 个细胞加入2 mL含3 g/L琼脂, 100 mL/L胎牛血清的RPMI Medium 1640培养基中, 充分混匀后, 将细胞悬液加入6孔板中已凝固的5 g/L琼脂培养基(含100 mL/L胎牛血清的RPMI Medium 1640培养基)上面, 培养2 wk后取出培养板, 每组细胞随机选取10个低倍视野, 镜下计数形成的细胞克隆数.

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, 组间比较采用LSD-*t*检验, 用SPSS16.0统计软件进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 以HBx基因重组质粒为模板, 用HBx基因特异性引物PCR扩增, 经15 g/L的琼脂糖凝胶电泳, 可以一约500 bp的条带, 而pcDNA3.0质粒未见特异条带(图1A). 经提取的质粒用用*Kpn* I 和*Apa* I 双酶切后, 超螺旋pcDNA3.0被切成约5.4 kb线性DNA, pcDNA3.0/HBx-d382和pcDNA3.0/HBx重组质粒用*Kpn* I 和*Apa* I 双酶切后, 经0.8%琼脂糖凝胶电泳, 可见约5.4 kb的片段和约500 bp的目的基因片段(图1B). DNA测序证实为质粒构建正确.

2.2 L02细胞转染后基因组DNA HBx基因及其表达的鉴定 转染pcDNA3.0/HBx-d382、pcDNA3.0/HBx与pcDNA3.0的L02细胞基因组DNA经PCR扩增和15 g/L琼脂糖凝胶电泳后, 在约500 bp处出现一特异性条带, 与预期大小片段一致. 而转染空质粒pcDNA3和未转染质粒的L02细胞基因组DNA经PCR扩增和15 g/L琼脂糖凝胶电泳后, 未见特异性片段(图2A). 提取上述L02细

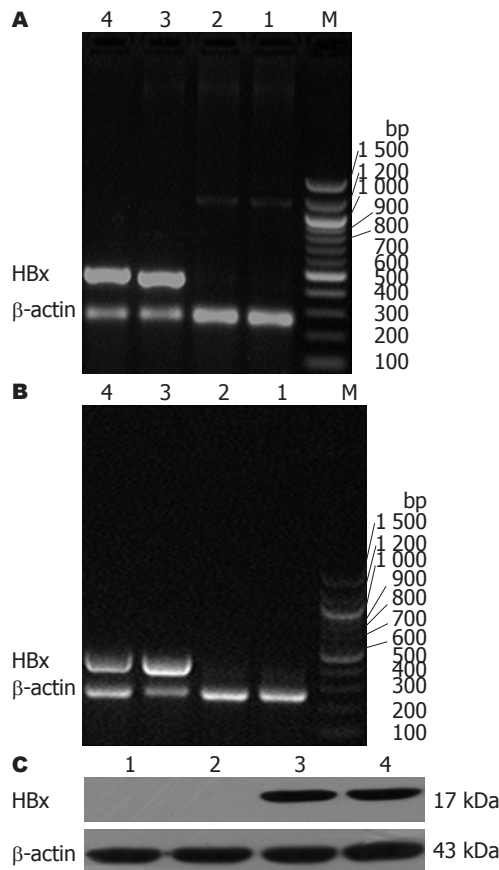


图2 L02细胞转染后基因组DNA HBx基因及其表达的鉴定. A: PCR扩增基因组DNA; B: RT-PCR鉴定目的基因的表达; C: Western blot鉴定目的基因表达; M: DNA分子量标准(bp); 1: L02细胞组; 2-4: 分别代表转染空质粒、转染重组质粒pcDNA3.0/HBx-d382以及转染重组质粒pcDNA3.0/HBx后L02细胞组.

胞mRNA经过RT-PCR扩增, 可见特异性目的片段(图2B), Western blot可见HBx蛋白表达(图2C).
2.3 MTT检测细胞增殖和软琼脂克隆形成实验 MTT结果显示L02细胞以及转染空载体pcDNA3.0质粒细胞L02/pcDNA3.0的增殖无明显差异性. 在细胞培养的前2 d, 各组细胞的增殖差异性并不明显, 从第3天开始转染HBx基因缺失突变体的细胞L02/HBx-d382($P = 0.03$)和转染野生型HBx基因的细胞L02/HBx($P = 0.02$)的增殖能力相对L02细胞

■创新盘点

前期研究发现中国南部地区肝癌组织中HBx基因存在着多种类型缺失型突变和点突变,其中HBx基因缺失突变体HBx-d382发生率较高,但其肝细胞生物学特性的影响尚不明确。本研究建立稳定表达HBx-d382或野生型HBx的L02细胞株,检测其对L02细胞增殖和非锚定依赖增殖能力的影响,为进一步探讨肝细胞癌发生的分子机制打下基础。

表 1 细胞周期检测结果

细胞系	G ₁	S	G ₂	S+G ₂
L02	76.02 ± 1.50	6.53 ± 1.27	17.45 ± 1.29	23.98 ± 1.49
L02/pcDNA3.0	76.81 ± 3.69	5.80 ± 0.94	17.38 ± 2.92	23.18 ± 3.69
L02/HBx-d382	52.99 ± 1.63	9.19 ± 0.71	37.82 ± 2.08	47.01 ± 1.63 ^{bd}
L02/HBx	65.12 ± 2.33	4.53 ± 0.71	30.35 ± 2.85	34.88 ± 2.33 ^b

^b $P < 0.01$ vs L02组; ^d $P < 0.01$ vs L02/HBx组。

和L02/pcDNA3.0细胞增强;且L02/HBx-d382的增殖能力强于L02/HBx($P = 0.004$, 图3)。

L02、L02/pcDNA3.0、L02/HBx-d382和L02/HBx组细胞在软琼脂中生长约1 wk可以看见克隆形成,培养2 wk后置于显微镜下观察,L02/HBx-d382组和L02/HBx组的克隆形成率明显高于L02组和L02/pcDNA3.0组($P < 0.01$),且L02/HBx-d382组高于L02/HBx($P < 0.01$),而L02组和L02/pcDNA3.0组克隆形成率无明显差别(图4)。

2.4 细胞周期检测 细胞周期结果显示,L02/HBx-d382($P < 0.01$)和L02/HBx($P < 0.01$)细胞S+G₂期的细胞比例显著高于L02细胞组,且L02/HBx-d382细胞要高于L02/HBx($P < 0.01$),L02细胞和L02/pcDNA3.0细胞S+G₂期无显著差异(表1, 图5)。

3 讨论

在许多HBV慢性感染的肝组织基因组DNA中存在HBV基因的整合,虽然整合对于病毒复制不是必需的,但HBV DNA的整合往往导致其基因组逃避免疫反应,成为HBV持续感染因素之一^[13,14],同时HBV DNA的整合也能导致基因组DNA的不稳定性从而导致肝细胞恶性转化^[15,16]。在众多整合的病毒亚单位中,HBx基因可以转录出17 kDa的HBx蛋白,其与肝癌的关系被广泛研究,一些研究认为HBx广泛影响着细胞的增殖、凋亡、有丝分裂纺锤体形成以及信号转导并可导致细胞恶性转化^[3,8,17-20],但其确切机制仍未完全阐明。

慢性HBV感染者众多,但其发展为肝癌的几率并不高,一些研究认为HBx单独可能并不导致肝细胞恶性转化,他需要某些癌基因如*H-ras*、*c-myc*、*p53*共同作用才能导致细胞恶性转化^[21-25],HBx与肝癌的关系仍然存在许多争议,其确切机制有待进一步阐明。

先前的研究发现,肝癌组织中HBx基因变异特别是一些HBx基因-COOH端的缺失突变体变异频发^[4,5,26,27],来源于肝癌组织的一些HBx基因-COOH端的缺失突变体以及人工构建的不同

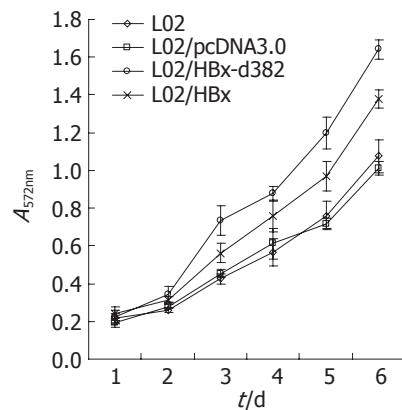
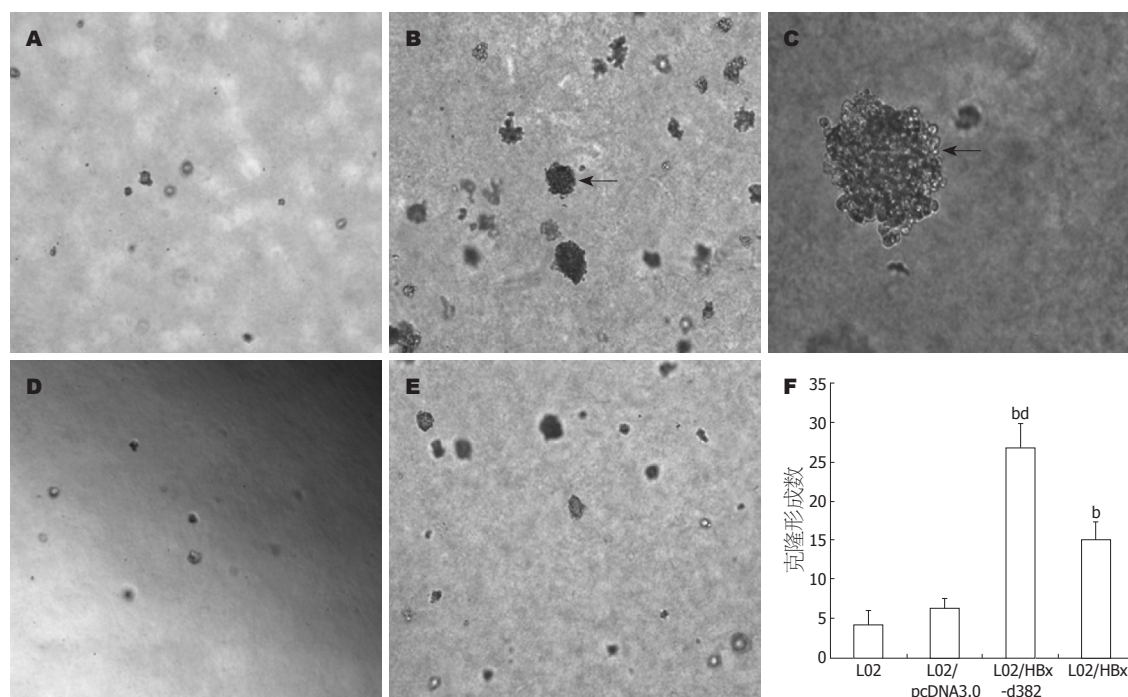


图 3 MTT检测细胞增殖。

HBx缺失突变体和野生型HBx具有不同的生物学效应^[5,27-29],因此我们推测某些HBx基因突变可能与肝癌的发生发展相关。我们前期研究也发现在肝癌组织的基因组中广泛存在HBx基因突变体的整合,并筛选出2个缺失突变体HBx-d382和HBx-d431,其中HBx-d382在肝癌组织中检出率较高,我们猜想HBx基因某些突变可能与肝细胞癌密切相关^[7]。随后我们成功构建了HBx-d382真核表达载体pcDNA3.0/HBx-d382^[30],为了进一步探讨HBx缺失突变体对细胞生物学活性的影响,本研究用脂质体转染目的基因,通过G418筛选,提取转染前后细胞的基因组DNA总RNA以及细胞总蛋白,分别通过PCR、RT-PCR以及蛋白免疫印迹技术验证基因组中存在目的基因(HBx-d382以及野生型HBx)的整合、RNA水平存在目的基因的表达同时能检测到相关蛋白。

进一步研究发现,稳定表达HBx的L02细胞相比转染空载体pcDNA3.0以及未转染质粒的L02细胞其增殖能力明显增强,克隆形成能力增强,且HBx缺失突变体的引起的改变要强于野生型HBx,而L02细胞和未转染质粒的L02细胞差异性不明显。我们推测HBx-d382可能更能影响细胞的增殖,导致细胞的恶性转化。各组细胞细胞周期的观察也发现稳定转染HBx的L02细胞



■应用要点

本研究表明HBx-d382比野生型HBx具有更强的促细胞增殖能力及非锚定依赖增殖能力, 进一步论证了HBx-d382与肝癌发生有着密切关系, 对HBx-d382更深一步的研究提供依据。

图4 软琼脂克隆形成实验。A: L02(×50); B: L02/HBx-d382(×50); C: L02/HBx-d382(×200); D: L02/pcDNA3.0(×50); E: L02/HBx(×50)。^b $P<0.01$ vs L02组; ^d $P<0.01$ vs L02/HBx组。

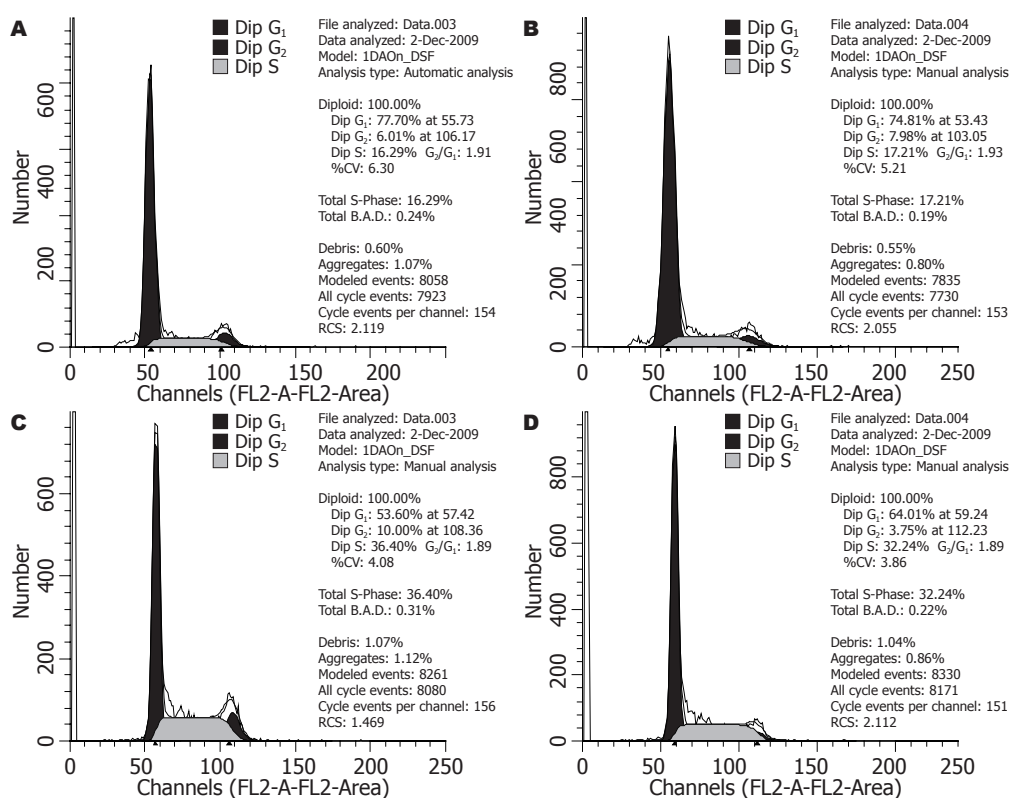


图5 细胞周期检测。A: L02/pcDNA3.0组; B: L02组; C: L02/HBx-d382组; D: L02/HBx组。

(S+G₂)期细胞比例明显高于未转染质粒和转染空质粒pcDNA3.0的L02细胞, 这种效应以HBx基因缺失突变体更加明显。结果提示HBx基因及其缺失突变体可能有助于推动细胞从G₀/G₁期进入S期从而导致细胞增殖增强。

虽然在实验中我们发现HBx缺失突变体相比野生型HBx更能影响细胞增殖, 但其确切机制尚不清楚, 是否HBx缺失突变体影响细胞周期调控的相关基因如E2F1、cyclin D等表达, 或许HBx基因缺失突变体改变了调控细胞增殖相关

■同行评价

本文做出一定的工作, 对今后研究有帮助。

miRNA的表达, 需要进一步的研究。

总之, 我们成功构建了HBx基因缺失突变体(HBx-d382)的真核表达模型, 证实HBx-d382相比野生型HBx更能影响L02细胞增殖, 这种效应可能与其影响细胞周期调控相关。该研究支持HBx基因突变可能导致肝细胞恶性转化的假说。

4 参考文献

- Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36: 1206-1213
- Geier A, Gartung C, Dietrich CG. Hepatitis B e Antigen and the Risk of Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347: 1721-1722; author reply 1721-1722
- Koike K. Hepatitis B virus X gene is implicated in liver carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009; 286: 60-68
- Liu XH, Lin J, Zhang SH, Zhang SM, Feitelson MA, Gao HJ, Zhu MH. COOH-terminal deletion of HBx gene is a frequent event in HBV-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1346-1352
- Ma NF, Lau SH, Hu L, Xie D, Wu J, Yang J, Wang Y, Wu MC, Fung J, Bai X, Tzang CH, Fu L, Yang M, Su YA, Guan XY. COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5061-5068
- Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Bréchet P, Bréchet C, Kremsdorf D. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001; 61: 7803-7810
- Zhu P, Tan D, Peng Z, Liu F, Song L. Polymorphism analyses of hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma patients from southern China. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; 39: 265-272
- 程斌, 林松挺, 杨玉珍, 黎培员. 转基因细胞模型L02/HBx的构建及HBx对细胞周期的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1488-1493
- 崔培林, 吕栋, 张峻, 姚士伟, 王燕斌, 杨昭徐. 急性坏死性胰腺炎肠黏膜氧化应激损伤和HIF-1 α 的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17: 24-30
- 张红燕, 李珊珊, 孙洋, 王新华, 阎爱华, 王小军. TGF- β 1反义寡核苷酸对食管鳞癌细胞EC9706增殖及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3480-3485
- 蔡婧, 刘安文, 赵向丽, 张树辉. 芹菜素对肝癌细胞生长及基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 542-549
- 张晓伟, 秦薇, 郭伟剑, 李建芳, 刘炳亚, 张凤春. Bmi-1基因对胃癌细胞增殖的影响及机制. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1390-1393
- Brechet C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* 1980; 286: 533-535
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2: 1129-1133
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma.

Nat Genet 2002; 31: 339-346

- Minami M, Daimon Y, Mori K, Takashima H, Nakajima T, Itoh Y, Okanoue T. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2005; 24: 4340-4348
- Zhang WY, Cai N, Ye LH, Zhang XD. Transformation of human liver L-02 cells mediated by stable HBx transfection. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30: 1153-1161
- Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 74-81
- Zhang JL, Zhao WG, Wu KL, Wang K, Zhang X, Gu CF, Li Y, Zhu Y, Wu JG. Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through interacting with a serine protease Hepsin. *Arch Virol* 2005; 150: 721-741
- Kim HJ, Kim SY, Kim J, Lee H, Choi M, Kim JK, Ahn JK. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis by enhancing translocation of Bax to mitochondria. *IUBMB Life* 2008; 60: 473-480
- Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 2007; 26: 2166-2176
- Terradillos O, Billet O, Renard CA, Levy R, Molina T, Briand P, Buendia MA. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 1997; 14: 395-404
- Kim YC, Song KS, Yoon G, Nam MJ, Ryu WS. Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 16-23
- Jiang W, Wang XW, Unger T, Forgues M, Kim JW, Hussain SP, Bowman E, Spillare EA, Lipsky MM, Meck JM, Cavalli LR, Haddad BR, Harris CC. Cooperation of tumor-derived HBx mutants and p53-249(ser) mutant in regulating cell proliferation, anchorage-independent growth and aneuploidy in a telomerase-immortalized normal human hepatocyte-derived cell line. *Int J Cancer* 2009 Dec 16. [Epub ahead of print]
- Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechet C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002; 181-182: 43-47
- Kwon HJ, Jang KL. Natural variants of hepatitis B virus X protein have differential effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 2202-2213
- Wang Y, Lau SH, Sham JS, Wu MC, Wang T, Guan XY. Characterization of HBV integrants in 14 hepatocellular carcinomas: association of truncated X gene and hepatocellular carcinogenesis. *Oncogene* 2004; 23: 142-148
- Liu X, Zhang S, Lin J, Zhang S, Feitelson MA, Gao H, Zhu M. Hepatitis B virus X protein mutants exhibit distinct biological activities in hepatoma Huh7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 643-647
- Zhang H, Shan CL, Li N, Zhang X, Zhang XZ, Xu FQ, Zhang S, Qiu LY, Ye LH, Zhang XD. Identification of a natural mutant of HBV X protein truncated 27 amino acids at the COOH terminal and its effect on liver cell proliferation. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29: 473-480
- 朱平安, 谭德明, 陈莉, 彭忠田, 宋琳. 肝细胞癌组织中HBx基因缺失型突变体真核表达载体的构建和鉴定. 热带医学杂志 2008; 8: 332-334, 361

编辑 李军亮 电编 何基才

粒细胞集落刺激因子促进小鼠肝再生的作用

何秀华, 李东良, 范敬静, 马明

何秀华, 李东良, 范敬静, 马明, 福建医科大学福总临床医学院肝胆内科 福建省福州市 350025

何秀华, 2007级福建医科大学硕士, 主要从事器官移植相关肝病的研究。

中国人民解放军南京军区医学科技创新基金资助项目, No. 2007534

作者贡献分布: 何秀华与李东良对此文所作贡献均等; 此课题由李东良与何秀华设计; 研究过程由何秀华、李东良、范敬静及马明操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李东良提供; 数据分析由何秀华完成; 本论文写作由何秀华与李东良完成。

通讯作者: 李东良, 教授, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 福建医科大学福总临床医学院肝胆内科。

dongliangli@gmail.com

电话: 0591-22859128

收稿日期: 2009-12-29 修回日期: 2010-03-15

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

Granulocyte colony-stimulating factor promotes liver regeneration in mice

Xiu-Hua He, Dong-Liang Li, Jing-Jing Fan, Ming Ma

Xiu-Hua He, Dong-Liang Li, Jing-Jing Fan, Ming Ma, Department of Hepatobiliary Medicine, Clinical Medical College of Fuzhou General Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

Supported by: the Medical Scientific and Technological Innovation Foundation of Nanjing Military Command, No. 2007534

Correspondence to: Professor Dong-Liang Li, Department of Hepatobiliary Medicine, Clinical Medical College of Fuzhou General Hospital, Fujian Medical University, 156 North Xierhuan Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. dongliangli@gmail.com

Received: 2009-12-29 Revised: 2010-03-15

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on liver regeneration after major hepatectomy in mice.

METHODS: Mice were subjected to 70% hepatectomy and randomly divided into three equal groups: control group (intraperitoneally injected with normal saline 24 h after hepatectomy, once a day for 5 d), G-CSF pretreatment group [intraperitoneally injected with recombinant human G-CSF (rhG-CSF) at 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight daily for 5 d and underwent hepatectomy 24 h later], and G-CSF treatment group (intraperitoneally injected with rhG-CSF 24 h after hepatec-

tomy, at 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight daily for 5 d). Serum and hepatic tissue samples were harvested seven days after hepatectomy. Liver function parameters were measured using an automated biochemical analyzer. Immunohistochemistry was used to detect the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and bromodeoxyuridine (BrdU)-positive cells.

RESULTS: The percentages of PCNA- and BrdU-positive cells in the G-CSF pretreatment and treatment groups were significantly higher than those in the control group (PCNA: $74.08\% \pm 8.86\%$ and $68.91\% \pm 9.64\%$ vs $57.36\% \pm 13.37\%$, respectively; both $P < 0.05$). Inflammatory response was noted in 27% (3/11) of mice in the G-CSF pretreatment group. Serum ALT and AST levels were significantly higher in the G-CSF pretreatment group than in the other two groups (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: G-CSF treatment promotes liver regeneration after major hepatectomy in mice, but induces inflammatory response.

Key Words: Hepatectomy; Granulocyte colony-stimulating factor; Liver regeneration; Inflammatory response

He XH, Li DL, Fan JJ, Ma M. Granulocyte colony-stimulating factor promotes liver regeneration in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1115-1120

摘要

目的: 探讨粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)促进肝大部切除小鼠肝再生的作用。

方法: 建立小鼠肝大部分切除(约70%)模型, 将肝切除小鼠随机分为3组。单纯肝切除组: 肝切除后24 h, 腹腔注射生理盐水5 d; G-CSF+肝切除组: rhG-CSF 150 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 腹腔注射5 d, 24 h后进行肝切除; 肝切除+G-CSF组: 肝切除术后24 h, rhG-CSF 150 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 腹腔注射5 d。于术后7 d取血清和肝组织, 用全自动生化分析仪检测血清肝功能指标, 并采用免疫组织化学方法观察肝内的增殖细胞核抗原

■背景资料

肝移植近年来发展迅速, 但供肝的严重短缺制约了临床肝移植的广泛开展。活体肝移植为解决供肝来源的短缺开拓了新的途径。活体肝移植的关键性技术之一是使移植到受体的肝组织块以及供体剩余的肝组织能尽快再生, 以满足机体代谢所需有效的肝体积。因此, 促进部分肝移植后肝再生的研究成为近年来器官移植领域一个新的研究热点。

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

■研究前沿

提高部分肝移植
物存活率的研究
主要集中于提高
手术技术和改善
缺血再灌注损伤
方面,如何促进移
植到受体的肝组
织块以及供体剩
余的肝组织的肝
再生方面的相关
报道较少.

(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达及BrdU阳性细胞.

结果: 肝切除+G-CSF组和G-CSF+肝切除组BrdU及PCNA表达胞明显升高,与对照组比较差异均具有统计学意义(PCNA: $74.08\% \pm 8.86\%$, $68.91\% \pm 9.64\%$ vs $57.36\% \pm 13.37\%$, 均 $P < 0.05$); 肝组织病理检查发现G-CSF+肝切除组27%(3/11)小鼠肝组织出现了不同程度的炎症反应, 肝功生化学也显示血清ALT及AST升高, 且其差异有统计学意义(均 $P < 0.05$).

结论: G-CSF具有明显促进肝大部切除小鼠肝再生的作用, 但也容易诱发肝脏炎症反应.

关键词: 肝切除; 粒细胞集落刺激因子; 肝再生; 炎症反应

何秀华, 李东良, 范敬静, 马明. 粒细胞集落刺激因子促进小鼠肝再生的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1115-1120
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1115.asp>

0 引言

肝移植近年来发展迅速, 但供肝的严重短缺制约了临床肝移植的广泛开展^[1-3], 活体肝移植为解决供肝来源的短缺开拓了新的途径^[4,5]. 活体肝移植的关键性技术之一是使移植到受体的肝组织块以及供体剩余的肝组织能尽快再生, 以满足机体代谢所需有效的肝体积. 因此, 促进部分肝移植后肝再生的研究成为近年来器官移植领域一个新的研究热点. 有报道粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)可能具有促进肝细胞再生的能力^[6], 但其确切疗效及其促进肝再生的安全性尚不明确. 因此, 本研究建立肝大部切除小鼠模型, 通过检测反应肝细胞再生的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和BrdU阳性细胞, 观察重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, hrG-CSF)对肝再生的促进作用, 为G-CSF临床促进肝再生治疗提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级BALB/C小鼠50只, ♂, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司(动物质量合格证scxh(沪)2007-0005), 饲养于中国人民解放军南京军区福州总医院比较医学中心IVC清洁级实验动物饲养系统. 饲养环境为恒温(25°C - 27°C)恒湿(45%-50%), 自由摄取食物和水, 普通饲料喂

养; 重组人粒细胞集落刺激因子由中国麒麟鲲鹏生物药业有限公司生产, 商品名为惠尔血, 批号20081151, 制剂标示量为每支150 μg ; PCNA单克隆抗体(北京中杉公司); BrdU(美国 Sigma公司); 鼠抗BrdU单克隆抗体(北京中杉公司); SP免疫组织化学染色试剂盒(北京中杉公司).

1.2 方法

1.2.1 造模: 实验小鼠, 周龄6-8 wk, 体质量18-22 g, 1%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 于剑突下0.5 cm腹中线剪开约3 cm长切口, 打开腹腔, 从肝蒂处结扎并切除肝左叶、中叶约70%肝体积. 观察创面无渗血后缝合关闭腹腔, 24 h未死亡, 活力及饮食基本恢复正常的34只肝大部切除小鼠用于实验研究.

1.2.2 分组: 肝切除组($n = 11$), 肝大部切除后24 h, 腹腔注射生理盐水5 d; G-CSF+肝切除组($n = 11$), rhG-CSF腹腔注射150 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, 共5 d, 24 h后进行肝大部切除; 肝切除+G-CSF组($n = 12$), 肝切除术后24 h, rhG-CSF腹腔注射150 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, 共5 d.

1.2.3 观察指标: 术后第7天, 眼眶静脉采血, Olympus AU2700全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和血清白蛋白(ALB), 脱臼法处死动物, 于相同部位取适量肝组织, 40 g/L的中性甲醛液固定, 常规HE染色观察肝组织病理变化, 免疫组织化学观察PCNA的表达和BrdU阳性细胞. 取肝组织前2 h腹腔内注射BrdU 50 mg/kg, 以使之掺入肝细胞DNA合成, 免疫组织化学操作按说明书进行, PCNA和BrdU的结果判定标准: 以细胞核呈界限清楚的棕色反应为阳性, 阳性结果分级按以下标准记录, 即每张切片随机观察5个高倍视野, 每个视野计100个细胞中的阳性细胞数, 取均值, 以百分数表示细胞增殖指数.

统计学处理 使用SPSS11.5统计软件处理实验数据, 多样本的均数的比较采用One-way ANOVA分析, 方差不齐采用H检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 肝细胞PCNA表达 肝切除+G-CSF组与对照组比较差异有统计学意义($74.08\% \pm 8.86\%$ vs $57.36\% \pm 13.37\%$, $P = 0.001$), G-CSF+肝切除组与对照组比较差异有统计学意义($68.91\% \pm 9.64\%$ vs $57.36\% \pm 13.37\%$, $P = 0.017$, 图1).

2.2 BrdU阳性细胞 肝切除+G-CSF及G-CSF+肝

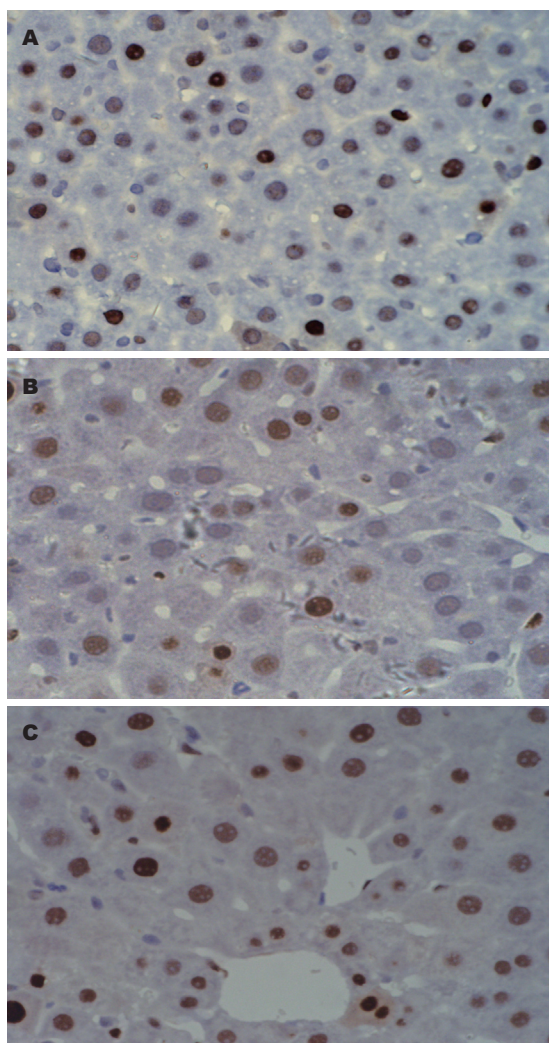


图 1 肝细胞PCNA表达($\times 400$). A: 肝切除组; B: G-CSF+肝切除组; C: 肝切除组+G-CSF.

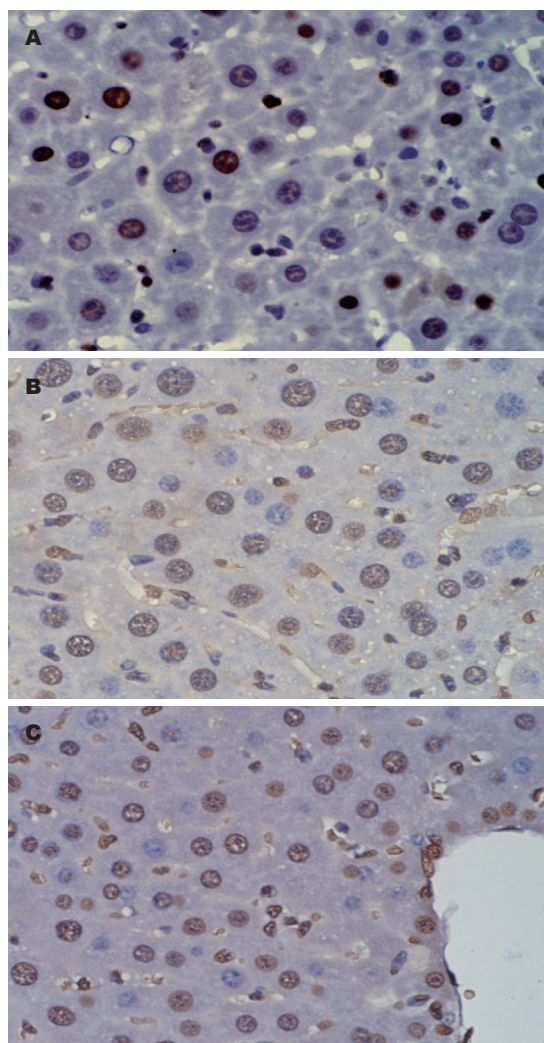


图 2 BrdU阳性细胞($\times 400$). A: 肝切除组; B: G-CSF+肝切除组; C: 肝切除组+G-CSF.

■创新盘点

本文利用小鼠肝大部分切除模型, 证实G-CSF可以促进肝大部切除小鼠肝再生的作用, 但也发现术前给予G-CSF容易诱发肝脏炎症反应.

表 1 术后7 d各组肝功能比较

分组	n	ALT(U/L)		AST(U/L) (mean \pm SD)	ALB(g/L) (mean \pm SD)
		M	QR		
肝切除	11	34.00	12.00	156.55 \pm 29.91	21.82 \pm 3.92
G-CSF+肝切除	11	111.00	341.00 ^{ab}	287.91 \pm 99.60 ^{cd}	22.64 \pm 2.54
肝切除+G-CSF	12	32.00	49.50	191.00 \pm 91.09	23.83 \pm 3.33

^a $P = 0.002$, ^b $P = 0.025$ vs 肝切除(H检验); ^c $P = 0.001$, ^d $P = 0.007$ vs 肝切除(F检验).

切除组BrdU阳性细胞阳性率明显高于单纯肝切除组(图2).

2.3 肝功生化改变 G-CSF+肝切除组的ALT、AST有明显升高, 与单纯肝切除组及肝切除+G-CSF组比较差异具有统计学意义. 而肝切除+G-CSF与对照组相比差异无统计学意义(表1).

2.4 肝脏病理组织变化 对肝组织病理学观察发现G-CSF+肝切除组3例小鼠出现肝脏局灶性坏

死及汇管区炎性细胞浸润等炎症反应的组织学改变, 而单纯肝切除组及肝切除+G-CSF组未见类似病理改变(图3).

3 讨论

G-CSF于1980年由Burgess等首次克隆成功^[7], 它是一种促粒细胞增殖的细胞因子, 主要应用于各种原因引起的粒细胞减少症^[8-10]. G-CSF还可

■应用要点

本研究为今后临床部分肝移植术后更好地促进供体肝及受体肝的再生提供了实验依据。但因G-CSF存在促进炎症反应的负面作用,应该继续深入研究,使得G-CSF应用于肝再生领域,发挥其优点而避其缺点。

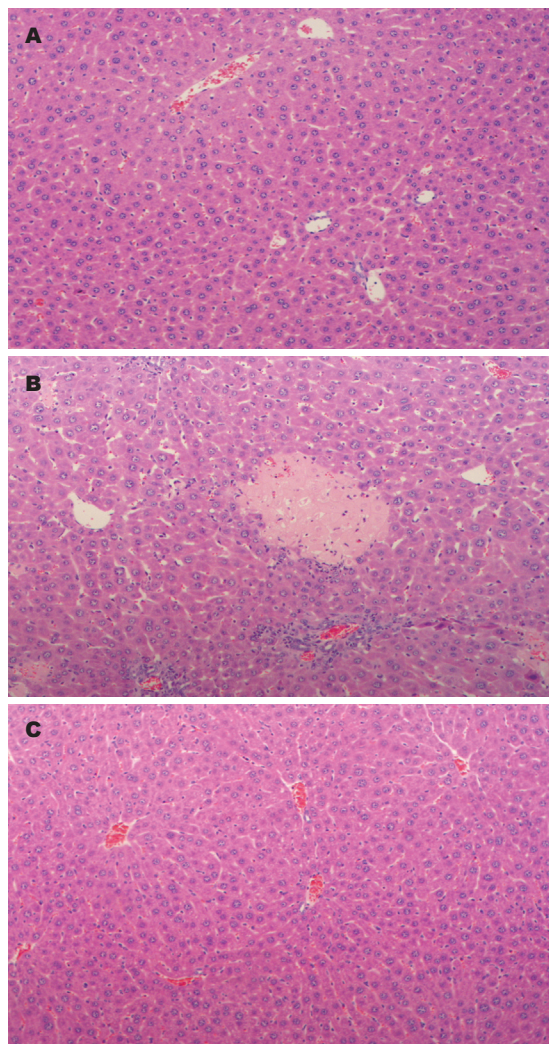


图3 肝组织病理(HE×100). A: 肝切除组; B: G-CSF+肝切除组; C: 肝切除组+G-CSF.

以诱导多潜能骨髓干细胞增殖,并动员进入外周血循环^[11,12],使得自体骨髓移植成为可能^[13].此外,G-CSF提高生存率及改善肝脏病理的作用已经在急性和慢性肝病的动物模型中得到了验证^[14,15].Theocharis等^[16]制备大鼠暴发性肝衰竭和肝性脑病模型,应用hrG-CSF组大鼠的生存率、肝组织病理变化、血清学指标及血氨水平均好于对照组,认为可能与hrG-CSF改善肝再生有关.近年来,G-CSF已经应用在了终末期肝病及急慢性肝衰竭患者中^[17-19].但也有研究者对G-CSF促进肝再生作用提出质疑^[20].基于上述研究,本课题组将G-CSF用于研究对肝大部切除后剩余肝脏的再生作用.

PCNA是一种与细胞周期相关的增殖细胞核抗原,存在并合成于核内,静止细胞中PCNA含量很少,增殖细胞和转化细胞中其含量发生明显变化,其含量和表达强弱的变化与DNA合

成及DNA复制的活跃程度一致.实验结果显示无论术前还是术后给予G-CSF均比对照组PCNA表达增高,说明肝再生更活跃,而且术后给予G-CSF促进肝切除后剩余肝再生作用最明显.5'-溴基-2'-脱氧尿苷(BrdU)是一种胸腺嘧啶脱氧核苷酸类似物,在细胞核内参与有丝分裂前DNA合成,BrdU可以用于检测S期细胞,通过评估分裂细胞摄取BrdU能反应细胞增殖情况.BrdU阳性细胞G-CSF组比对照组明显增多,但术前术后给予未见明显差别.上述的实验结果提示G-CSF促进部分肝切除后肝再生作用比较确定,但作用机制仍未明确,可能与hrG-CSF动员骨髓干细胞参与肝细胞再生有关,也可能与hrG-CSF启动肝脏再生的内源性程序有关.

骨髓干细胞是重要的成体干细胞,骨髓内主要有两类干细胞群体:造血干细胞和间充质干细胞,他们都具有定向分化或是横向分化为一些成体细胞的潜能,包括神经细胞^[21]、心肌细胞^[22]、血管内皮细胞^[23]、软骨细胞^[24]以及肝实质细胞^[25]等.一般情况下,骨髓干细胞进入到外周血循环中并迁移到损伤部位的数量极少,G-CSF是骨髓干细胞强有力的动员剂,不仅可增加外周血干细胞数量,也可能使干细胞迁移到肝损伤部位^[26],另外在肝脏损伤时也可能动员肝系相关的干细胞归巢入肝脏,参与肝再生^[27].还有研究者表明G-CSF是本身直接促进肝再生,而不是动员造血干细胞后促进肝再生^[28].而也有学者表明是通过二者共同作用促进肝再生^[29].

肝功能结果显示ALT及AST术前给予G-CSF均比术后给予及对照组明显升高,差别有统计学意义,并且普通病理结果发现术前给予G-CSF出现炎性细胞浸润及局灶坏死,考虑腹腔注射G-CSF促进炎性细胞增殖和分化并诱导浸润肝脏,促进其炎症反应,所以术前给予G-CSF组炎症反应剧烈,出现炎性细胞浸润,局灶坏死,ALT及AST明显升高.术后给予G-CSF,在肝损伤前提下倾向于促进肝再生.因此,G-CSF促进肝再生的作用仍需继续深入研究,以探明其作用机制,并对G-CSF的作用全面综合分析,G-CSF的使用剂量及给药时间仍需多组比较研究,使得G-CSF用于肝再生领域,充分发挥其优点而避其缺点.

在今后供肝源有限的情况下,采用活体供肝,由于活体供肝不可能替代全肝的功能.那么,采用G-CSF可以促进供体肝及受体肝^[30]的再生,但因其存在促进炎症反应,我们应该继续深入

研究其作用机制, 慎重用于临床。

4 参考文献

- Bardou-Jacquet E, Lorho R. [Liver transplantation: who should have it and when?] *Presse Med* 2009; 38: 1258-1265
- Li KK, Neuberger J. The management of patients awaiting liver transplantation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 648-659
- Ng KK, Lo CM. Liver transplantation in Asia: past, present and future. *Ann Acad Med Singapore* 2009; 38: 322-332
- Müller SA, Mehrabi A, Schmied BM, Welsch T, Fonouni H, Engelmann G, Schemmer P, Weitz J, Schmidt J. Partial liver transplantation-living donor liver transplantation and split liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 Suppl 8: viii13-viii22
- Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 2007; 356: 1545-1559
- Theocharis SE, Margeli AP, Kittas CN. Effect of granulocyte colony-stimulating-factor administration on tissue regeneration due to thioacetamide-induced liver injury in rats. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1990-1996
- Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 1980; 56: 947-958
- Kelly S, Wheatley D. Prevention of febrile neutropenia: use of granulocyte colony-stimulating factors. *Br J Cancer* 2009; 101 Suppl 1: S6-S10
- Fioredda F, Calvillo M, Lanciotti M, Lanza T, Giunti L, Castagnola E, Lorenzi I, Tonelli R, Ghezzi P, Dufour C. Pegfilgrastim in children with severe congenital neutropenia. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54: 465-467
- Ruiz LP, Aguila JD, Cedeño AM. [Granulocyte colony stimulating factor in the ambulatory treatment of neutropenia following chemotherapy] *Rev Panam Salud Publica* 2009; 26: 281-282
- Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 183-189
- Fischer JC, Frick M, Wassmuth R, Platz A, Punzel M, Wernet P. Superior mobilisation of haematopoietic progenitor cells with glycosylated G-CSF in male but not female unrelated stem cell donors. *Br J Haematol* 2005; 130: 740-746
- Vose JM, Ho AD, Coiffier B, Corradini P, Khouri I, Sureda A, Van Besien K, Dipersio J. Advances in mobilization for the optimization of autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1412-1421
- 梁昌宇, 覃山羽, 姜海行, 王东旭, 苏思标, 梁梓宇. 骨髓间充质干细胞对大鼠急性肝损伤修复的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1178-1184
- Wang JP, Sun DX, Li BS, Kang FB, Guo ZR, Li MR, Kang JW, Li WY. [Preventive and treatment effects of granulocyte colony stimulating factor on CCl4 induced chronic liver injury in mice] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2008; 16: 395-396
- Theocharis SE, Papadimitriou LJ, Retsou ZP, Margeli AP, Ninos SS, Papadimitriou JD. Granulocyte-colony stimulating factor administration ameliorates liver regeneration in animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1797-1803
- Gaia S, Smedile A, Omedè P, Olivero A, Sanavio F, Balzola F, Ottobrelli A, Abate ML, Marzano A, Rizzetto M, Tarella C. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol* 2006; 45: 13-19
- Di Campli C, Zocco MA, Saulnier N, Grieco A, Rapaccini G, Addolorato G, Rumi C, Santoliquido A, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Safety and efficacy profile of G-CSF therapy in patients with acute on chronic liver failure. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 1071-1076
- Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Braga EL, Oliveira SA, Fortes MF, Silva AG, Brustolim D, Genser B, Dos Santos RR, Lyra LG. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 33-42
- Caraceni P, Giannone F, Catani L, Talarico S, Pertosa AM, Domenicali M, Fogli M, Principe A, Trevisani F, Baccarani M, Bernardi M, Lemoli RM. Effects of granulocyte colony stimulating-factor in a rat model of acute liver injury. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 943-951
- Alberti E, Los M, García R, Fraga JL, Serrano T, Hernández E, Klonisch T, Macías R, Martínez L, Castillo L, de la Cuétara K. Prolonged survival and expression of neural markers by bone marrow-derived stem cells transplanted into brain lesions. *Med Sci Monit* 2009; 15: BR47-BR54
- Yoon J, Choi SC, Park CY, Choi JH, Kim YI, Shim WJ, Lim DS. Bone marrow-derived side population cells are capable of functional cardiomyogenic differentiation. *Mol Cells* 2008; 25: 216-223
- Liu Z, Jiang Y, Hao H, Gupta K, Xu J, Chu L, McFalls E, Zweier J, Verfaillie C, Bache RJ. Endothelial nitric oxide synthase is dynamically expressed during bone marrow stem cell differentiation into endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H1760-H1765
- Hu J, Feng K, Liu X, Ma PX. Chondrogenic and osteogenic differentiations of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold with designed pore network. *Biomaterials* 2009; 30: 5061-5067
- Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005; 106: 756-763
- 张智峰, 赵钢, 赵天宇, 朱英. 重组人粒细胞集落刺激因子动员后自体外周血干细胞在大鼠纤维化肝脏内的发育. *中国组织工程研究与临床康复* 2008; 12: 569-572
- Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC, Petersen BE. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 2007; 132: 1077-1087
- Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassas A. G-CSF-primed

■名词解释

G-CSF: 粒细胞集落刺激因子, 作为一种促粒细胞增殖的细胞因子应用于临床, G-CSF还可以诱导多潜能骨髓干细胞增殖, 并动员进入外周血循环, 近年来研究发现G-CSF具有促进肝再生作用。

■同行评价

本文有一定创新性和科学价值.

- 29 hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33: 108-119
- Piscaglia AC, Shupe TD, Oh SH, Gasbarrini A, Petersen BE. Granulocyte-colony stimulating

- factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology* 2007; 133: 619-631
- 30 刘峰, 潘孝本, 陈国栋, 蒋栋, 丛旭, 费然, 魏来. 粒细胞集落刺激因子动员自体骨髓干细胞促进大鼠部分肝移植物的肝再生. *中华医学杂志* 2005; 47: 3342-3345

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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.

hMLH1和hMSH2基因在胃癌易感人群中的突变

李建华, 吕申, 石先哲, 刘敏, 王彦

李建华, 大连大学附属中山医院病理科 辽宁省大连市 116001

吕申, 刘敏, 王彦, 大连医科大学附属第二医院实验中心分子生物学实验室 辽宁省大连市 116027

石先哲, 中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心 辽宁省大连市 116011

作者贡献分布: 吕申、李建华及石先哲对此文所作贡献较大; 此课题由吕申与李建华设计; 研究过程由李建华、石先哲、刘敏及王彦操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由石先哲提供; 数据分析由李建华完成; 本论文写作由李建华与石先哲完成。

通讯作者: 李建华, 副教授, 116001, 辽宁省大连市, 大连大学附属中山医院病理科. lijianhua_ljh@126.com

电话: 0411-62893230

收稿日期: 2010-01-07 修回日期: 2010-03-10

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

hMLH1 and hMSH2 gene mutations in a population susceptible to gastric cancer

Jian-Hua Li, Shen Lv, Xian-Zhe Shi, Min Liu, Yan Wang

Jian-Hua Li, Department of Pathology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning Province, China

Shen Lv, Min Liu, Yan Wang, Laboratory of Molecular Biology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China

Xian-Zhe Shi, National Chromatographic Research and Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Associate Professor Jian-Hua Li, Department of Pathology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning Province, China. lijianhua_ljh@126.com

Received: 2010-01-07 Revised: 2010-03-10

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To analyze human mutL homolog 1 (hMLH1) and hMSH2 gene mutations in Chinese familial gastric cancer kindreds and sporadic gastric cancer patients.

METHODS: Blood samples from 16 gastric cancer patients and 114 healthy members with familial clustering of gastric cancer and 56 sporadic gastric cancer patients were collected. After DNA extraction, the fragments of exons 3, 8, 12, 13 and 16 of the hMLH1 gene and exons 5 and 7 of the hMSH2 gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR), followed by

single-stranded conformation polymorphism/capillary electrophoresis (SSCP-CE) genotyping assay. The fragments suspected to harbor mutations were sequenced.

RESULTS: Mutations were detected in exon 8, 12 and 16 of the hMLH1 gene, whereas no mutation was detected in exons 5 and 7 of the hMSH2 gene. In subjects with familial clustering of gastric cancer, the mutation frequency was 37% (6/16) in gastric cancer patients and 27% (31/114) in healthy members, both significantly higher than that in controls (5%; $P = 0.001$ and 0.000 , respectively). The mutation frequency was 11% in gastric patients without familial clustering, significantly lower than that in subjects with familial clustering. The mutation at codon 219 in exon 8 of the hMLH1 gene (A→G) results in a conversion of Ile→Val (ATC→GTC), whereas the mutation at codon 384 in exon 12 of the hMLH1 gene (T→A) results in a conversion of Asp→Val (GTT→GAT). The mutation at codon 553 in exon 16 of the hMLH1 gene (T→G) results in a conversion of Ser→Arg (AGT→AGG), which represents a novel mutation of the hMLH1 gene that has not been reported before.

CONCLUSION: Familial gastric cancer kindreds may have similar hMLH1 gene mutations to those observed in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Kindred; Mismatch repair; Gene mutation

Li JH, Lv S, Shi XZ, Liu M, Wang Y. hMLH1 and hMSH2 gene mutations in a population susceptible to gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1121-1126

摘要

目的: 分析中国北方地区胃癌家系人群及胃癌散发患者hMLH1和hMSH2基因的突变。

方法: 收集胃癌家族史的胃癌患者16例及5个家系健康人114例, 无胃癌家族史的胃癌患者56例, 正常人群对照100例。采取外周血, 用小

■背景资料

错配修复基因是DNA复制时保证细胞基因组稳定的卫士, 错配修复基因突变或功能丧失后, 其下游的癌基因和抑癌基因等多种基因的突变因得不到修复而逐渐积累, 使细胞发生恶变的危险性增高。欧美诸国多见的HNPCC发病的主要原因之一就是错配修复基因的突变。已经检测到的400多种错配修复基因的突变中, MLH1约占50%, MSH2约占40%。

■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

■ 研究前沿

错配修复基因突变是否也与中国北方发病率很高且有一定遗传倾向的胃癌发病相关,迄今为止尚未见报道。

样本血液DNA提取试剂盒提取DNA,分别扩增hMLH1的外显子3、8、12、13和外显子16以及hMSH2的外显子5和外显子7,热变性后,用毛细管电泳进行单链构象多态性的分析,对可疑样本进行测序。

结果:突变出现在hMLH1基因第8、第12和第16外显子,而外显子3和外显子13没有检测到突变,hMSH2基因的外显子5和外显子7也没有检测到突变。在有家族史的胃癌患者的16例外周血标本中,有6例出现突变,突变率37%;无胃癌家族史的56例患者,总计6例出现突变,突变率11%;胃癌家系健康人群的114例样本中,31例出现突变,突变率27%;在100例对照样本中,5例出现突变,突变率5%。第8外显子的突变点位于219位密码子的第一个碱基(ATC→GTC);第12外显子的突变点位于第384位密码子的第二个碱基(GTT→GAT);第16外显子的突变点位于第553位密码子的第二个碱基(AGT→AGG),这三个突变都是碱基置换。但有家族史的胃癌患者和胃癌家系健康成员的突变率明显高于对照组($P = 0.001, 0.000$),无家族史的胃癌患者突变率虽然略高于对照组,但差异不显著($P = 0.204$)。第16外显子的突变是目前尚未见报道的新的突变。

结论:胃癌家系人群体细胞存在与遗传性非息肉性结肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)相似的基因突变。

关键词: 胃癌; 家系; 错配修复; 基因突变

李建华, 吕中, 石先哲, 刘敏, 王彦. hMLH1和hMSH2基因在胃癌易感人群中的突变. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1121-1126

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1121.asp>

0 引言

胃癌在我国是发病率较高的恶性肿瘤,其发病与结肠癌相似,具有一定的家族积聚现象,这两种肿瘤的发生除了与环境因素有关,遗传因素也相当重要。已有大量的研究证实,结肠癌的发生与错配修复基因的突变有关^[1-3],错配修复基因是DNA复制时保证细胞基因组稳定的卫士,错配修复基因突变或功能丧失后,其下游的癌基因和抑癌基因等多种基因的突变因得不到修复而逐渐积累,使细胞发生恶变的危险性增高^[4-6]。除了遗传性非息肉性结肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC),在散发性结肠癌也检测到了错配修复基因的突变,尤

其是作为错配修复起始因子的hMLH1和hMSH2基因,突变更为常见^[7,8],然而在胃癌有关这两种基因突变的报道却很少。虽然有学者曾经按照HNPCC的标准定义过遗传性胃癌,但对胃癌基因背景的研究并不多。至于胃癌的发生为什么有家族积聚性,更很少有研究对这一现象进行解释。通过临床及流行病学调查,我们掌握了5个胃癌家系,这些家系的特点是:每个家系均有3例以上、连续2代发病,其中至少2例为直系亲属,这些特点与HNPCC相似,并且近些年来,这些家系的人群中结肠癌的发病率有增高的趋势。另外,在HNPCC也常有胃癌的发生^[9,10]。既然胃癌和结肠癌的组织结构和临床发病特点如此相似,我们推测他们基因遗传背景可能有相同之处。本研究中,我们在胃癌易感人群体细胞检测HNPCC常出现的突变位点,并与HNPCC相比较,以获取我国胃癌高发人群的基因背景资料。

1 材料和方法

1.1 材料 无胃癌家族史的胃癌患者的56份外周血采自我国东北地区的胃癌患者,具有胃癌家族史的胃癌患者的16份外周血和胃癌家系健康成员的114份外周血样采自中国辽宁省南部地区,这5个胃癌家系均满足以下条件:每个家系有3例以上、连续2代发病,其中2例为一级亲属。男64例,年龄8-75(中位年龄38)岁,女50例,年龄14-68(中位年龄40)岁。正常对照的100份血样采自大连地区的志愿者,其直系亲属无胃癌患者。无家族史胃癌患者是指一、二级亲属中未发现胃癌或结肠癌,有家族史胃癌患者是指一级亲属中有胃癌患者,胃癌家系健康者是指在进行调查和采血时未发现患有肿瘤。Perkin-Elmer Model 2700 PCR扩增仪(美国ABI公司);P/ACE MDQ型毛细管电泳(美国Beckman公司);ABI Prism 310基因分析仪(美国ABI公司)。血液DNA提取纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)、丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、 γ -甲基丙烯酰基-三(甲氧基)硅烷、TBE电泳缓冲液(Sigma公司,美国),PCR反应试剂、引物(宝生物工程公司,中国),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 血液DNA的提取:用试剂盒提取血液有核细胞DNA。

1.2.2 聚合酶链反应:PCR引物设计见表1。以提取的基因组DNA为模板,扩增hMLH1和hMSH2

表 1 PCR扩增的引物序列

基因	位点	引物序列	温度(°C)	长度(bp)
hMSH2	外显子5	5'-FAM-ACTGTCTGCGGTAATCAAGT	58	131
		5'-FAM-AAAGGTTAAGGGCTCTGACT		
	外显子7	5'-FAM-CAAGCAGCAAAGTTAGAAGA	56	176
		5'-FAM-ACCACCACCAACTTTATGAG		
hMLH1	外显子3	5'-FAM-AGAGATTTGGAATAGTAAC	50	208
		5'-FAM-ACAATGTCATCACAGGAGG		
	外显子8	5'-FAM-CTCAGCCATGAGACAATAAATCC	50	217
		5'-FAM-GGTTCCCAATAATGTGATGG		
	外显子12	5'-FAM-ACAGACTTTGCTACCAGGACTTG	55	216
		5'-FAM-TGTCTTATCCTCTGTGACAATGG		
	外显子13	5'-FAM-TGCAACCCACAAAATTGGC	55	292
		5'-FAM-CTTTCTCCATTTCAAAACC		
	外显子16	5'-FAM-CATTTGGATGCTCCGTTAAAGC	55	276
		5'-FAM-CACCCGGCTGGAAATTTATTG		
		5'-FAM-CTATTGTTGGATCATATTCGTCC		

■创新盘点

本研究通过对胃癌家系人群、胃癌患者及正常对照人群错配修复基因MLH1和MSH2的突变位点的分析,在胃癌家系人群检测到较高频率的突变,并发现了新的突变位点。

表 2 胃癌易感人群hMLH1基因突变的情况

分组	n	hMLH1突变(n)				突变率(%)
		外显子8	外显子12	外显子16	总计	
FGC	16	2	2	3	6	37 ^b
NFGC	56	2	2	2	6	11 ^b
FGC-H	114	12	7	13	31	27 ^b
对照组	100	2	2	1	5	5

FGC: 家系胃癌患者; NFGC: 非家系胃癌患者; FGC-H: 家系健康者。 ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

基因的外显子。PCR反应条件相同,PCR反应体积25 μ L,其中模板DNA 100 ng, 4 \times dNTPs终浓度各0.2 mmol/L, MgCl₂浓度1.5 mmol/L, Taq酶1.5 U,上下游引物各0.15 μ mol/L。循环条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性5 min后, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35个循环周期,最后72 $^{\circ}$ C 延长10 min。

1.2.3 SSCP-CE分析: 取2 μ L PCR产物用纯水稀释20倍, 95 $^{\circ}$ C变性5 min后迅速冰浴冷却,待测。电泳时由毛细管电泳仪压力系统自动填充聚合物溶液到毛细管(总长40 cm,有效长度30 cm,内径75 μ m)中,采用电动进样和反极性恒压电泳模式分离。激光诱导荧光检测器检测DNA片段,激发波长488 nm,发射波长520 nm。MDQ数据处理软件采集数据。与正常对照相比,出现异常峰为可疑突变。

1.2.4 DNA序列分析: SSCP-CE分析出现异常的PCR产物,按照ABI PRISM 310基因分析手册中的方法用乙酸钠和乙醇进行纯化。取纯化的双

链DNA2ng作为模板,相应的非荧光标记的PCR引物为测序引物(3 pmol),用ABI公司的Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit,在ABI PRISM 310型全自动DNA测序分析仪上进行PCR产物的直接测序。

2 结果

突变位点出现在hMLH1基因的第8、第12和第16外显子,外显子3和外显子13没有检测到突变,hMSH2基因的外显子5和外显子7也没有检测到突变。有胃癌家族史的16例患者,总计6例出现突变,突变率37%,hMLH1基因第8、第12和第16外显子突变分别有2例、2例和3例,其中1例出现了第8和第12外显子的同时突变。无胃癌家族史的56例患者,总计6例出现突变,突变率11%,hMLH1基因第8、第12和第16外显子突变分别有2例、2例和2例。家系114例健康者样本中,总计31例出现突变,突变率27%,hMLH1基因第8、第12和第16外显子突变分别有12例、7例和13例,其中1例出现第8和第16外显子的同时突变。在100例对照样本中,总计5例出现突变,突变率5%,第8、第12和第16外显子突变分别有2例、2例和1例。由于每个家系单个外显子的突变例数较少,因此,合计各外显子进行统计见表2。第8外显子的突变点位于219位密码子的第一个碱基(ATC \rightarrow GTC, Ile \rightarrow Val)(图1, 2);第12外显子的突变点位于第384位密码子的第二个碱基(GTT \rightarrow GAT, Val \rightarrow Asp)(图3, 4);第16外显子的突变点位于第553位密码子的第三个碱基(GTC

应用要点

对于胃癌家系人群中错配修复基因的携带者进行预警、干预,防治肿瘤的发生,或者早发现,早治疗,提高治愈率。

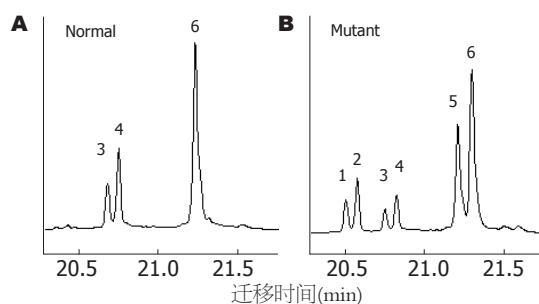


图1 hMLH1基因外显子8的SSCP-CE电泳谱图. A: 正常样品; B: 突变样品.

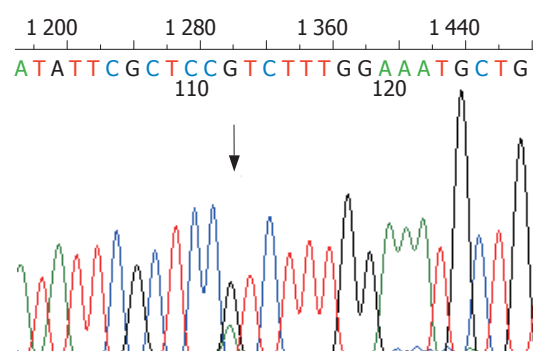


图2 hMLH1 外显子8的DNA测序部分谱图.

→GGC, Ser→Arg)(图5, 6).

3 讨论

错配修复基因的主要功能是修复DNA复制时出现的错配,维持基因组的稳定性^[11,12].当错配修复基因本身发生了改变或错配修复功能降低时,DNA复制时出现的错配得不到及时纠正,使基因组中的突变增多^[13,14].癌基因和抑癌基因突变时,细胞发生恶性转化的危险性随之增高^[15,16].欧美诸国多见的HNPCC发病的主要原因之一就是错配修复基因的突变^[17,18].到目前为止,已经检测到400多种错配修复基因的突变,MLH1约占50%,MSH2约占40%^[19,20].突变形式多为引起短缩蛋白的移码突变以及错义突变.据统计,有37.4%的HNPCC患者发病是由hMLH1基因突变引起的^[21,22].错配修复基因突变是否也与中国北方发病率很高且有一定遗传倾向的胃癌发病相关,迄今为止尚未见报道.

我们对胃癌患者和5个胃癌家系非肿瘤人群的体细胞hMLH1和hMSH2基因突变进行了检测,结果在hMLH1的第8和第12外显子发现了与HNPCC患者相同的外显子突变位点:第8外显子的突变点位于219位密码子的第1个碱基(ATC→GTC),第12外显子的突变点位于第384位密码子的第2个碱基(GTT→GAT),虽然这两种突

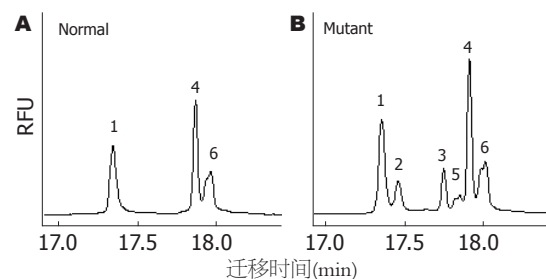


图3 hMLH1基因外显子12的SSCP-CE电泳谱图. A: 正常样品; B: 突变样品.

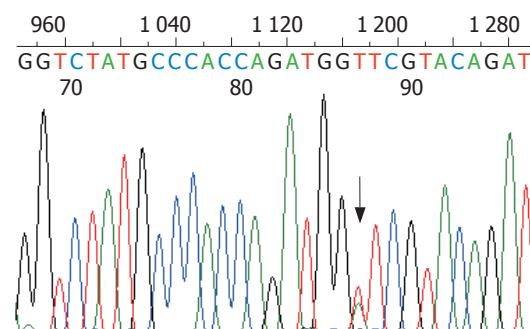


图4 hMLH1 外显子12的DNA测序部分谱图.

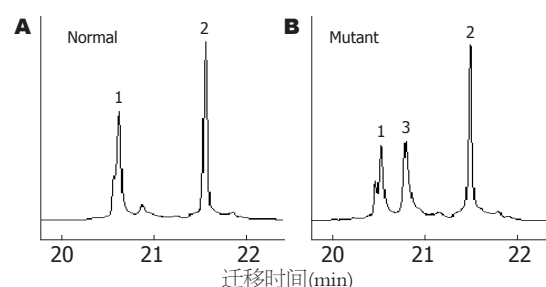


图5 hMLH1基因外显子16的SSCP-CE电泳谱图. A: 正常样品; B: 突变样品.

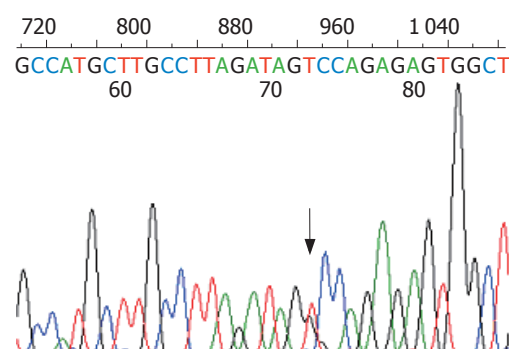


图6 hMLH1 外显子16的DNA测序部分谱图.

变在散发性大肠癌和胃癌中也见有报道,但却是偶发事件.第12外显子的突变(GTT→GAT, Val384Asp)曾被认为是非功能性突变^[23],因为Val384Asp不处于hMLH1基因的高度保守区内,其存在不会导致hMLH1基因功能的完全丧失.

然而第384位氨基酸残基是hMLH1基因相对可变区内的一个保守位点, 在电中性的缬氨酸被带负电荷的天冬氨酸替代时, 可能会使基因产物的结构发生某种变化。这种杂合性突变可能会提高宿主罹患消化系肿瘤的危险性, 在环境因素给予二次打击时, 易导致肿瘤发生。第16外显子的突变点位于第553位密码子的第3个碱基(AGT→AGG), 该突变到目前为止尚未见报道。该突变是否能引起蛋白质功能性变化, 还有待于探讨。胃癌患者和胃癌家系健康者的体细胞hMLH1基因出现的突变位点相同, 但有家族史的胃癌患者和胃癌家系健康成员的突变率明显高于对照组, 无家族史的胃癌患者突变率虽然略高于对照组, 但差异不显著。胃癌家系非肿瘤人群体细胞基因组也出现了HNPCC常有的外显子的突变, 且每个家系的基因突变率均明显高于对照人群。这一现象提示: 有胃癌家族史的人群可能有着与HNPCC相似的遗传背景, 即错配修复基因突变。我国北方地区人们的饮食习惯与欧美国家有很大的差异, 比如常食用酸菜, 饮食中粗纤维含量高和高温、高盐饮食等。在相同的基因遗传背景条件下, 肿瘤好发部位的不同是否是由于饮食习惯等流行病学原因所引起, 还有待于进一步的分子流行病学的研究。

无家族史的胃癌患者体内hMLH1基因的突变率与正常对照相似, 明显低于家系人群。尽管该56例胃癌组织中, 我们曾经在14例(25%)检测到MSI-H, 但体细胞检测到MMR突变的只有2例(14%)^[24], 基因突变可能不是这些胃癌错配修复功能的缺陷的主要原因, 家族性胃癌和散发性胃癌的发病机制和途径可能不同。

4 参考文献

- 1 Park JG, Vasen HF, Park KJ, Peltomäki P, Ponz de Leon M, Rodriguez-Bigas MA, Lubinski J, Beck NE, Bisgaard ML, Miyaki M, Wijnen JT, Baba S, Lynch HT. Suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC) criteria and results of genetic diagnosis. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 710-715; discussion 715-716
- 2 Lynch HT, Watson P, Shaw TG, Lynch JF, Harty AE, Franklin BA, Kapler CR, Tinley ST, Liu B, Lerman C. Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer. Part II: Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma as a model. *Cancer* 1999; 86: 2457-2463
- 3 Dieumegard B, Grandjouan S, Sabourin JC, Le Bihan ML, Lefrère I, Bellefqih, Pignon JP, Rougier P, Lasser P, Bénard J, Couturier D, Bressac-de Paillerets B. Extensive molecular screening for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 871-880
- 4 Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Saurin JC, Maugard C, Navarro C, Ruano E, Descos L, Trillet-Lenoir V, Bosset JF, Puisieux A. Prevalence of germline mutations of hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, and hMSH6 genes in 75 French kindreds with nonpolyposis colorectal cancer. *Hum Genet* 1999; 105: 79-85
- 5 Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; 113: 1146-1158
- 6 Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 735-740
- 7 Koopman M, Kortman GA, Mekenkamp L, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N, Antonini NF, Punt CJ, van Krieken JH. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 266-273
- 8 Poulgiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology* 2010; 56: 167-179
- 9 Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M, Nuorva K, Hautala E, Järvinen HJ, Mecklin JP, Aarnio M, Peltomäki P. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut* 2007; 56: 926-933
- 10 La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* 1992; 70: 50-55
- 11 Duval A, Hamelin R. Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Ann Genet* 2002; 45: 71-75
- 12 Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002; 84: 27-47
- 13 Ling XL, Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Fang L. Mitochondrial microsatellite instability in gastric cancer and its precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 800-803
- 14 Kobayashi K, Matsushima M, Koi S, Saito H, Sagae S, Kudo R, Nakamura Y. Mutational analysis of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2, in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 141-145
- 15 Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, Tayob N, Kastrinos F, Sparr J, Wang F, Bandipalliam P, Syngal S, Gruber SB. Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2009; 137: 1621-1627
- 16 Oliveira C, Velho S, Domingo E, Preto A, Hofstra RM, Hamelin R, Yamamoto H, Seruca R, Schwartz S Jr. Concomitant RASSF1A hypermethylation and KRAS/BRAF mutations occur preferentially in MSI sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 2005; 24: 7630-7634
- 17 Han HJ, Maruyama M, Baba S, Park JG, Nakamura Y. Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) *Hum Mol Genet* 1995; 4: 237-242
- 18 Mueller J, Gazzoli I, Bandipalliam P, Garber

■名词解释

hMSH2和hMLH1基因: 为保证DNA复制的真实性, 维持遗传的稳定, 无论原核生物还是真核生物, 都有一套完整的修复受损或突变DNA的修复系统, 其中修复碱基错配的系统称为错配修复系统, 其功能是修复复制过程中发生的碱基错配, 避免复制错误的积累。参与组成这一系统的主要基因称为错配修复基因, hMSH2和hMLH1基因是错配修复系统中最为重要的两个。

■同行评价

本文通过对中国北方地区胃癌家系人群及胃癌散发患者hMLH1和hMSH2基因突变的分析,来探索hMLH1和hMSH2基因突变与胃癌的关联,是一篇质量较高的研究型论文。

- JE, Syngal S, Kolodner RD. Comprehensive molecular analysis of mismatch repair gene defects in suspected Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) cases. *Cancer Res* 2009; 69: 7053-7061
- 19 Kim JC, Kim HC, Roh SA, Koo KH, Lee DH, Yu CS, Lee JH, Kim TW, Lee HL, Beck NE, Bodmer WF. hMLH1 and hMSH2 mutations in families with familial clustering of gastric cancer and hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 2001; 25: 503-510
- 20 Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol* 2009; 16: 405-417
- 21 Bonis PA, Trikalinos TA, Chung M, Chew P, Ip S, DeVine DA, Lau J. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: diagnostic strategies and their implications. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2007; 1:180
- 22 Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Peltomäki P, Kolodner RD, Nilbert M, Lindblom A. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 291-299
- 23 Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Nöthen MM, Kruse R, Propping P. A novel missense mutation in the DNA mismatch repair gene hMLH1 present among East Asians but not among Europeans. *Hum Hered* 1998; 48: 87-91
- 24 李建华, 石先哲, 吕申, 刘敏, 王朝晖, 刘丽娜, 姜静, 许国旺. 胃癌微卫星不稳定与错配修复蛋白表达的缺失. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1774-1777

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

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

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

小肠腺癌组织的细胞凋亡及相关蛋白Bid和Bcl-xL的表达及意义

郭文娟, 王爱英, 高春

郭文娟, 王爱英, 高春, 北京大学第三医院消化科 北京市 100191

郭文娟, 北京大学医学部2007级消化科硕士, 主要从事消化系统疾病方面的研究。

作者贡献分布: 郭文娟、王爱英及高春对此文所作贡献均等; 此课题由王爱英设计; 研究过程由郭文娟与高春操作完成; 数据分析由郭文娟与高春协作完成; 本论文写作主要由郭文娟完成; 由王爱英指导课题完成。

通讯作者: 王爱英, 主任医师, 100191, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院消化科. wangaiy@bjmu.edu.cn

电话: 010-82265533

收稿日期: 2010-01-08 修回日期: 2010-03-18

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

Apoptosis and expression of apoptosis-related proteins Bid and Bcl-xL in human small intestinal adenocarcinoma

Wen-Juan Guo, Ai-Ying Wang, Chun Gao

Wen-Juan Guo, Ai-Ying Wang, Chun Gao, Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Correspondence to: Ai-Ying Wang, Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China. wangaiy@bjmu.edu.cn

Received: 2010-01-08 Revised: 2010-03-18

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To examine whether apoptosis and expression of apoptosis-related proteins Bid and Bcl-xL are involved in the pathogenesis of small intestinal adenocarcinoma.

METHODS: Forty-two tissue samples, including 7 from human small intestinal adenocarcinoma (of the jejunum and ileum) and 35 from normal small intestine (the jejunum), were examined in our study. Apoptotic index (AI) was assessed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. The expression of Bid and Bcl-xL proteins was detected by immunohistochemistry (IHC).

RESULTS: A significantly higher level of enterocyte apoptosis was observed in normal small intestine tissue compared with small intestinal

adenocarcinoma (mean AI, 15.78% vs 0.29%, $t = 6.51$, $P < 0.01$). The positive rate of Bid expression in normal small intestine tissue (moderate/strong immunoreactivity in the cytoplasm of villus epithelial cells) was significantly higher (77.14% vs 28.57%, $P < 0.05$) than that in small intestinal adenocarcinoma, while the positive rate of Bcl-xL expression was significantly lower (34.29% vs 86.71%, $P < 0.05$) in normal small intestine tissue than in adenocarcinoma. The percentage of samples having a Bid/Bcl-xL ratio ≥ 1 was significantly lower in small intestinal adenocarcinoma compared to normal small intestine tissue (14.29% vs 80.00%, $P < 0.01$). A positive correlation was noted between AI and Bid expression level ($r = 0.368$, $P < 0.05$), but not between AI and Bcl-xL expression level ($r = 0.017$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: Decreased apoptosis, Bid expression and Bid/Bcl-xL ratio may play a role in the carcinogenesis of human small intestine adenocarcinoma.

Key Words: Small intestinal adenocarcinoma; Apoptosis; Bid; Bcl-xL

Guo WJ, Wang AY, Gao C. Apoptosis and expression of apoptosis-related proteins Bid and Bcl-xL in human small intestinal adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1127-1133

摘要

目的: 探讨细胞凋亡及相关蛋白的表达与小肠腺癌发生发展的关系。

方法: 研究包括35例正常小肠(空肠)组织和7例手术切除的小肠腺癌组织, 临床资料查阅病历; 用TUNEL法检测细胞凋亡; 用免疫组织化学检测相关蛋白Bid和Bcl-xL的表达。

结果: 小肠腺癌的凋亡指数(apoptotic index, AI)明显低于正常小肠组织(0.29% vs 15.78%, $t = 6.51$, $P < 0.01$); 蛋白Bid在小肠腺癌的表达低于正常小肠组织(28.57% vs 77.14%, $P < 0.05$);

■背景资料

目前对于消化系统肿瘤的研究主要集中在胃和结肠, 对于小肠肿瘤尤其是腺癌的研究甚少。细胞凋亡的减少对于肿瘤的发生发展有重要的意义。因此, 本文从凋亡的角度研究小肠腺癌的可能发病机制。

■同行评议者

施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科; 朱亮, 副教授, 大连医科大学生理教研室

■相关报道

在胃癌的研究中发现,通过RNA干扰技术将蛋白Bid的表达敲除,结果与内外凋亡通路有关的因子表达水平均降低,细胞在药物刺激下不再发生凋亡,因此蛋白Bid是细胞内外凋亡通路的整合因子。

蛋白Bcl-xL在小肠腺癌的表达高于正常组织(86.71% vs 34.29%, $P < 0.05$); Bid/Bcl-xL ≥ 1 的样本数在小肠腺癌低于正常小肠(14.29% vs 80.00%, $P < 0.01$)。相关性分析显示AI和蛋白Bid的免疫组织化学得分呈正相关($r = 0.368$, $P < 0.05$),但与蛋白Bcl-xL的免疫组织化学得分之间缺乏相关性($r = 0.017$, $P > 0.05$)。

结论: 细胞凋亡水平的降低; 蛋白Bid的低表达和Bid/Bcl-xL比值的降低可能在小肠肿瘤的发生和发展过程中发挥重要的作用。

关键词: 小肠腺癌; 凋亡; Bid; Bcl-xL

郭文娟, 王爱英, 高春. 小肠腺癌组织的细胞凋亡及相关蛋白Bid和Bcl-xL的表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1127-1133

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1127.asp>

0 引言

小肠肿瘤的年发病率不到十万分之一,仅占消化系恶性肿瘤的2%^[1,2],其中腺癌约占30%-40%,小肠腺癌的发病率仅为大肠腺癌的1/50^[3]。肿瘤的发生与细胞凋亡关系密切,凋亡是细胞主动的程序性死亡,对内环境稳态的维持和机体正常的生长发育有重要意义,如果凋亡过程受损使得衰老、损伤、畸变的细胞不能及时清除,大量基因突变的细胞在体内扩增会导致肿瘤的发生^[4-6]。Bcl-2家族特别是BH3-only亚家族对细胞凋亡的调节起了关键的作用^[7-9]。由于目前对于小肠腺癌的研究相对较少,本文从凋亡角度研究小肠腺癌的细胞凋亡及相关蛋白Bid和Bcl-xL在小肠腺癌的表达,初步探讨细胞凋亡与小肠腺癌发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集北京大学第三医院2003-2007年发生于消化系的腺癌和正常组织42例,所有入选标本符合如下条件:均来源于空肠或回肠,其中正常组织来源于内镜或小肠造影时黏膜活检取材,腺癌组织来源于外科手术标本;位于十二指肠和末端回肠的标本从入选中删除;所有的肿瘤患者均为原发性肿瘤并得到病理诊断,排除身体其他部位有肿瘤的标本。最终入选的42例标本中含有35例正常空肠组织和7例小肠腺癌组织(6例空肠和1例回肠)。所有标本取材后立即用40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μ m厚连续切片,每份标本均制作成免疫组织化学用的切片。细胞凋亡

试剂盒(In Situ Cell Death Detection Kit, POD)、DNase I (DNase I recombinant, grade I)、蛋白酶K(proteinase K, recombinant, PCR Grade)和NBT/BCIP显色液均购自德国罗氏公司(Roche, Germany); Bid兔抗人单克隆抗体由Abcam公司提供(1:250); Bcl-xL兔抗人单克隆抗体(1:200)由Cell signaling公司提供。DAB显色液购于DAKO公司。二抗、多聚赖氨酸、0.01 mol/L磷酸盐(PBS)缓冲液(pH7.2-7.4)、0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)及其他常规试剂均购自北京中衫公司。

1.2 方法

1.2.1 TUNEL检测组织凋亡: 石蜡切片脱蜡、水化后,蛋白酶K(1:10)37 $^{\circ}$ C孵育10 min, PBS冲洗后加入TUNEL反应液,避光湿盒孵育60 min, PBS冲洗后加入Converter-POD反应液,湿盒孵育30 min,最后NBT/BCIP显色,甲基绿复染。阴性对照使用Lable Solution取代TUNEL反应液。结果判定:每张切片选5-10个高倍镜视野,计数黏膜及腺管上皮细胞,核染色阳性者记为TUNEL阳性细胞,计数阳性细胞占视野总细胞数的百分比,其均值即为该标本的AI。

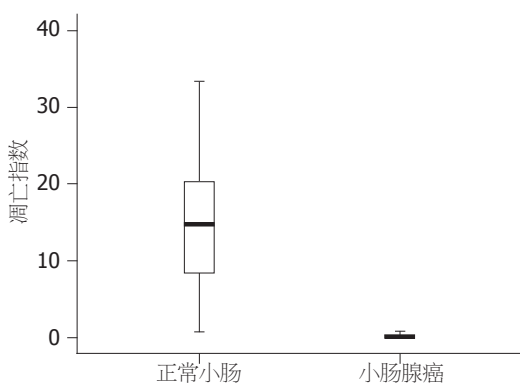
1.2.2 免疫组织化学检测蛋白表达: 按照PV两步法进行;40 g/L甲醛溶液固定,常规石蜡包埋切片(厚度4 μ m),贴于涂有多聚赖氨酸的玻片上,常规脱蜡至水,微波修复高火15 min,3%过氧化氢甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶,余步骤按照试剂盒说明操作。对照设立包括阳性对照、阴性空白对照和阴性替代对照;阳性对照由已知阳性切片做阳性对照,空白对照由既往实验证实,阴性替代对照用0.01 mol/L的PBS(pH7.4)代替一抗。

1.2.3 结果判定: 染色强度计分:无色0分;淡黄色1分;黄色2分;棕褐色3分。阳性细胞数计分:<25% 1分;26%-50% 2分;51%-75% 3分;>75% 4分。根据染色强度和阳性细胞数计分之之和进行判断:0分为阴性(-),1-2分为弱阳性(+),3-5分为阳性(++),6-7分为强阳性(+++)。所有结果均经3位作者在病理医生帮助下分别阅片,若有异议共同商议后确定。

统计学处理 用SPSS13.0软件处理,连续变量之间的比较采用Mann-Whitney非参数U检验;组间阳性率比较用根据样本量大小选用Pearson χ^2 、continuity χ^2 或Fisher's exact检验。应用Spearman等级相关分析处理AI和蛋白表达阳性率、各蛋白表达阳性率之间的相关性。 $P < 0.05$

表 1 临床资料

分组	正常小肠(<i>n</i> = 35)	小肠腺癌 (<i>n</i> = 7)	<i>P</i> 值
年龄(岁)			
≥55	15	4	>0.05
<55	20	3	
性别			
男	16	5	>0.05
女	19	2	
部位			
空肠	35	6	
回肠	—	1	
X线诊断			
正常	35	—	
肿瘤	—	7	
病理诊断			
正常或少量 炎细胞浸润	35	—	
腺癌	—	7	

图 1 正常小肠和小肠腺癌的凋亡指数. 两组之间有统计学差异($P < 0.01$).

表示有统计学意义.

2 结果

2.1 临床病例观察 在42例小肠组织中, 年龄、性别、取材部位、影像学诊断等见表1, 统计显示正常小肠组织和小肠腺癌在性别、年龄比较中均未见差异.

2.2 小肠正常组织和腺癌组织的凋亡水平 正常小肠组织的细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)均值为15.78%, 标准差为14.04%; 小肠腺癌组织的AI均值为0.29%, 标准差为0.30%. AI在正常组织最大为49.86%, 而在腺癌组织仅为0.85%. 因此细胞凋亡水平在小肠腺癌显著低于正常小肠组织($t = 6.51$, $P < 0.01$, 图1). 在AI≥5%的正常组织中, 可见大量凋亡细胞分布于整个高倍镜视野, 包括绒毛上皮的顶部和隐窝的底部; 在

表 2 蛋白Bid和Bcl-xL在肠道组织的表达

分组	正常小肠(<i>n</i> = 35)	小肠腺癌 (<i>n</i> = 7)	<i>P</i> 值
Bid			
阴性	8	5	0.021
弱阳性	2	0	—
中等阳性	18	0	—
强阳性	7	2	1.000
Bcl-xL			
阴性	23	1	0.031
弱阳性	1	0	—
中等阳性	8	4	0.088
强阳性	3	2	0.188
Bid/Bcl-xL ≥ 1	28	1	0.002

AI<5%的正常组织中, 可见凋亡细胞主要分布于绒毛的游离缘(图2A). 在小肠腺癌组织中仅见凋亡细胞稀疏的分布于不同的高倍镜视野(图2B).

2.3 蛋白Bid在正常小肠组织和小肠腺癌组织中的表达 在35例正常小肠组织中, 有27例蛋白Bid表达阳性, 阳性率为77.14%(27/35); 7例小肠腺癌组织中, 有2例蛋白Bid阳性, 阳性率为28.57%(2/7). 在阳性标本中, 正常小肠有7例为强阳性表达(7/35, 20.00%), 小肠腺癌有2例为强阳性表达(2/7, 28.57%); 对于中等强度的表达, 正常小肠有18例(18/35, 51.43%), 而小肠腺癌0例. 因此, 蛋白Bid在小肠腺癌组织的表达低于正常小肠组织且存在统计学差异($P = 0.021 < 0.05$). 但从表达强度上分析, 两组之间没有统计学差异(表2). 蛋白Bid的表达部位主要位于胞质. 在正常小肠组织中, 主要表达于绒毛上皮胞质, 尤其是游离缘表达明显, 细胞核基部表达强度明显低于游离缘, 腺管上皮表达罕见(图3A). 在小肠腺癌中, 蛋白Bid弥散地分布于癌细胞胞质中或为阴性表达(图3B).

2.4 蛋白Bcl-xL在正常小肠组织和小肠腺癌组织中的表达 蛋白Bcl-xL在正常小肠组织中有12例阳性(12/35, 34.29%), 在小肠腺癌中有6例阳性(6/7, 86.71%). 在阳性组织中, 正常小肠组织中强阳性表达的3例(3/35, 8.57%), 腺癌组织中强阳性表达的有2例(2/7, 28.57%); 中等强度的表达组织中, 正常小肠组织有8例(8/35, 22.86%)腺癌组织有4例(4/7, 57.14%). 统计学分析显示, 蛋白Bcl-xL在小肠腺癌中的阳性率显著高于正常小肠组织, 两者之间存在统计学差异($P = 0.031 < 0.05$). 从表达强度分析, 尽管数值上腺癌组织高于正常组织, 但统计学上缺乏差异性(表2). 蛋白Bcl-xL在正常组织中主要位于下段腺管上皮胞质和绒

■ 创新盘点

由于小肠腺癌的低发和标本来源的困难, 目前国内外对小肠腺癌发生机制的报道较少; 本文研究促凋亡蛋白Bid和抑制凋亡蛋白Bcl-xL在小肠中的表达水平, 并研究两者之间的比值Bid/Bcl-xL与腺癌组织凋亡的关系, 初步阐述小肠腺癌发生的可能机制.

■应用要点

由于蛋白Bid表达水平的降低与小肠腺癌凋亡指数的减少呈正相关,因此,通过生物学的方法上调蛋白Bid表达是促进肿瘤细胞凋亡的重要方法,不失为化疗的一个方向。

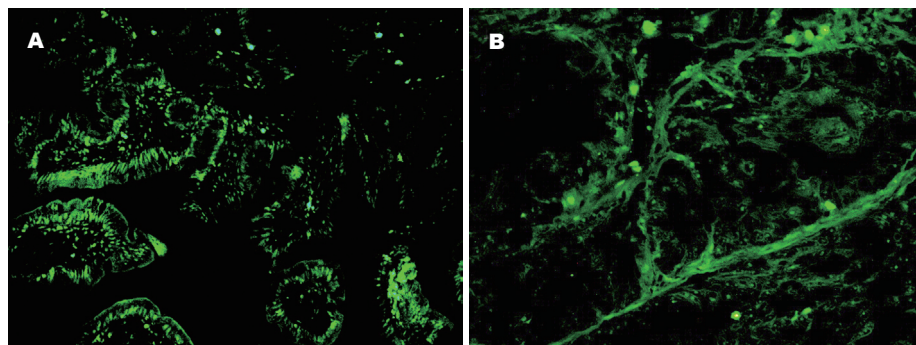


图2 细胞凋亡(TUNEL法×400)。A: 正常小肠中可见大量凋亡细胞,主要位于小肠绒毛游离缘;B: 腺癌组织中凋亡细胞稀疏的分布于癌组织。

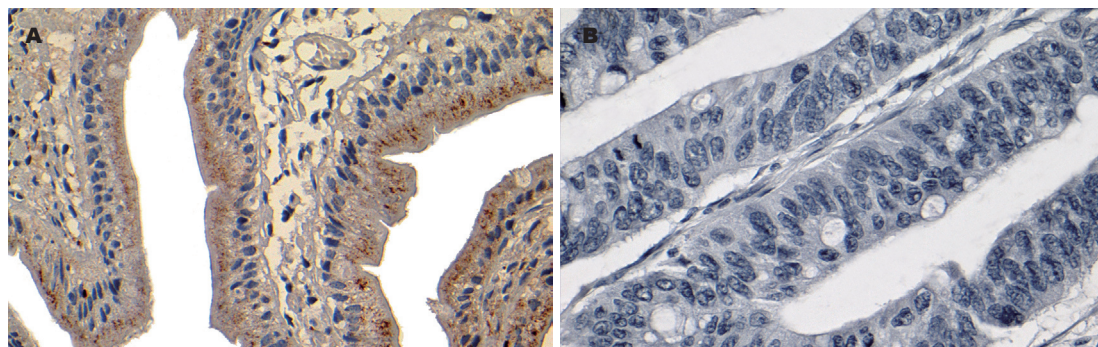


图3 蛋白Bid的表达(×400)。A: 正常组织中主要表达于绒毛上皮胞质,尤其是游离缘表达明显;B: 腺癌组织中蛋白Bid的表达为阴性。

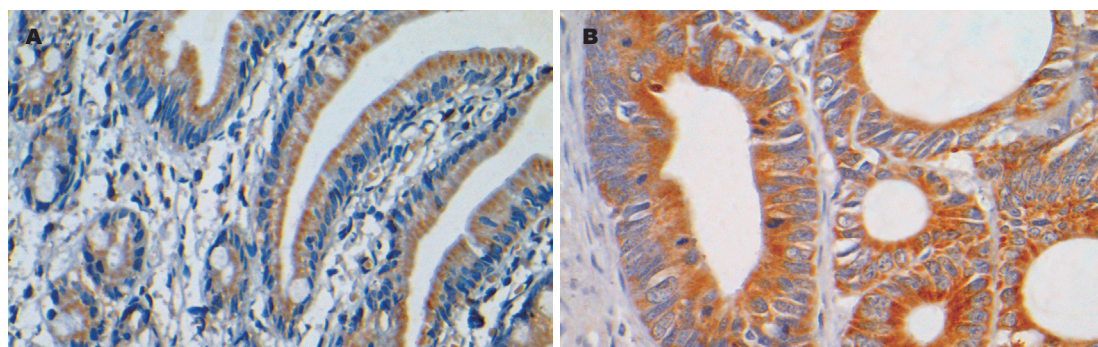


图4 蛋白Bcl-xL的表达(×400)。A: 正常组织中绒毛上皮和腺管上皮胞质均可见阳性表达;B: 腺癌组织中可见癌细胞胞质中呈颗粒样强阳性表达。

毛上皮游离缘胞质中,绒毛上皮基底侧的表达强度明显低于游离缘(图4A)。在腺癌组织中,可见蛋白Bcl-xL弥散的表达于整个胞质呈颗粒样,且表达强度高于正常小肠组织(图4B)。

2.5 Bid/Bcl-xL比值在正常小肠黏膜和腺癌黏膜组织中的比较 Bid和Bcl-xL是作用相反的两个基因,基于其不同作用首先比较二者在正常小肠和小肠腺癌中的表达是否存在统计学差异。前述分析显示 P 值均小于0.05,认为Bid在正常小肠组织表达阳性率高于腺癌组织,而Bcl-xL则在腺癌组织的表达阳性率高于正常组织。将正常小肠组织和小肠腺癌组织按 $\text{Bid/Bcl-xL} \geq 1$ 和 $\text{Bid/Bcl-xL} < 1$ 分为两组。 $\text{Bid/Bcl-xL} \geq 1$ 的样本数

在正常小肠和小肠腺癌分别为28/35(80.00%)和1/7(14.29%)。根据以上数据统计学分析显示 $P = 0.002 < 0.01$,两者之间有显著性统计学差异(表2)。因此,Bid/Bcl-xL比值在正常小肠组织和小肠腺癌组织之间有统计学差异。

2.6 AI与蛋白Bid或Bcl-xL免疫组织化学得分的相关性分析 在小肠肿瘤中,AI与蛋白Bid的表达呈正相关($r = 0.368$),与蛋白Bcl-xL的表达不存在相关性($r = -0.103$),且蛋白Bid和Bcl-xL之间也不存在相关性。

3 讨论

在正常肠道组织中,隐窝基底部含有肠道干细

胞, 其不断增殖和分化产生新生的细胞, 而绒毛顶端的细胞通过凋亡脱落入肠腔, 两者之间的相互平衡维持了肠道细胞数量的恒定^[10,11]. 如果细胞凋亡的速度慢于增殖速度, 则破坏肠道隐窝的正常结构并进一步引起肿瘤的发生^[4]. 结肠腺癌的发生是一个从息肉、腺瘤、腺癌渐进的过程, 在这一过程中伴随着凋亡细胞的逐渐减少^[12]. 同样在胃癌的研究中也发现, 在胃黏膜不典型增生、早期胃癌到进展期胃癌的发展过程中细胞凋亡逐渐受到抑制. 不同分化程度的胃癌的细胞AI的研究发现, 高分化胃癌的AI明显高于低分化者, 两者间比较有显著性差异 ($P<0.01$)^[13], 提示分化差的胃癌细胞对细胞凋亡存在逃避机制. 但目前对于小肠凋亡的研究相对较少^[14], 因此本文从凋亡角度探讨小肠腺癌发生的机制.

在我们的研究中发现, 正常小肠的AI明显高于小肠腺癌: 在正常小肠AI平均值为15.78%, 最大值为49.86%; 而小肠腺癌的AI均值为0.29%, 最大值为0.85%. TUNEL阳性的细胞位于正常小肠绒毛的游离缘和隐窝的基底部, 但游离缘凋亡强度显著高于基底部. 这可能是由于正常肠道隐窝的干细胞不断分裂产生新的子代细胞, 子代细胞从隐窝的基底部向游离缘移动并分化成熟, 而衰老的细胞则通过凋亡脱落入肠腔完成小肠细胞的更新过程, 因此正常组织的凋亡主要位于小肠绒毛的游离缘. 当各种原因导致凋亡过程受阻时, 大量分化不完全细胞的过量增殖引起肿瘤的发生. 因此, 细胞凋亡的减少促进小肠腺癌的发生.

在与凋亡有关的众多蛋白研究中, Bcl-2家族受到了越来越多的重视. 该家族通过线粒体途径调控细胞的凋亡, 可以分为3类: 第一类由抑制凋亡蛋白组成, 包括Bcl-2、Bcl-xL等, 他们可以与促凋亡蛋白结合并抑制其功能; 第二类包括Bak、Bax等, 他们含有多个BH结构域, 该类蛋白通过改变线粒体外膜的通透性直接引起内源性凋亡通路; 第三类是仅含有一个BH结构域的促凋亡蛋白组成, 因此也称为BH₃-only亚家族, 包括Bid、Bad等^[15,16]. 促进凋亡的蛋白质可以通过与抑制凋亡的蛋白质之间形成异源二聚体直接调控细胞凋亡, 或与线粒体膜上电压依赖性的离子通道和腺苷酸转运子结合形成通透性的运输通道, 使线粒体膜电位迅速降低引起凋亡. 已有大量的研究报道该家族与结肠癌、胃癌、乳腺癌等肿瘤的发生有关^[17], 但目

前对于Bcl-2家族在小肠腺癌发生中的作用鲜有研究. 我们课题组的前期研究结果表明蛋白Bax在小肠腺癌低表达促进了凋亡的减少及肿瘤的发生, 但蛋白Bcl-2表达水平的升高与小肠腺癌的发生缺乏联系^[18]. 近年的研究显示蛋白Bcl-xL和Bcl-2在肿瘤发生的不同阶段起作用, 且Bcl-xL的抗凋亡作用强于Bcl-2^[19]. BH₃-only亚家族是启动线粒体凋亡途径的必要条件, 其中蛋白Bid将内外源性的凋亡通路联系起来^[20], 对于细胞凋亡有重要意义. 因此我们的研究选取蛋白Bid和Bcl-xL为研究对象, 探讨他们小肠腺癌中的意义.

目前蛋白Bid在消化系肿瘤的研究主要集中在胃与结肠, 并且在胃癌中发现了该基因的失活性突变^[21]. 在一项对TNM II-III期结肠腺癌的研究中发现, 蛋白Bid的表达强度与组织的AI呈正相关; Bid表达强度越高, 患者对化疗药物敏感性越高; Bid的表达强度越高, 患者的无瘤生存期(DFS disease free survival)和总存活数(OS overall survival)越长^[23]. 国内的研究也显示蛋白Bid在结肠腺癌的表达率低于腺瘤^[24]. 在我们的研究中, 蛋白Bid在小肠腺癌的表达率显著低于正常小肠组织(28.57% vs 77.14%, $P = 0.021<0.05$), 在正常组织主要表达于绒毛游离缘, 腺管上皮和隐窝基底部的表达明显低于游离缘. 此结果不论是从表达阳性率还是表达部位上, 都与TUNEL检测的凋亡结果相一致, 同时Spearman相关分析也显示AI和蛋白Bid的免疫组织化学得分之间呈正相关 ($r = 0.368, P<0.05$). 蛋白Bid在小肠腺癌的低表达降低了腺癌细胞的凋亡, 打破了肠道细胞的正常凋亡和增殖之间的平衡, 致使肿瘤细胞逃避免疫监视, 在小肠腺癌的发生中具有一定作用.

蛋白Bcl-xL是Bcl-2家族中重要成员之一, 他与Bcl-2有着高度序列同源性且在多种肿瘤中共同表达, 通过调节线粒体膜的稳定性抑制凋亡的发生, 在结肠癌、食管癌、肝癌均有不同程度的表达升高. 在一项对56例结肠腺癌组织和正常对照的研究中显示, Bcl-xL在腺癌中的表达较对照显著升高, 且其表达强度与淋巴转移、Duke分期有关. 蛋白Bcl-xL主要在结肠腺癌表达, 而蛋白Bcl-2则主要是在结肠腺瘤阶段的表达, 提示蛋白Bcl-xL主要在肿瘤的晚期发挥作用^[25]. 在胃癌的研究中也显示蛋白Bcl-xL在癌组织的表达显著升高^[26]. 在本研究中, 蛋白Bcl-xL在小肠腺癌组织中的表达明显高于正常小肠组织(86.71% vs 34.29%, $P = 0.031<0.05$), 这与其

■名词解释

内源性凋亡途径: 是由Bcl-2家族蛋白介导的细胞内信号凋亡通路, 导致线粒体释放细胞色素c, 进一步引起caspase9和下游caspase3/7的活化, 从而引起凋亡的产生.

■同行评价

本研究较全面地分析和论证了Bid和Bcl-xL表达和小肠腺癌之间的关系,有一定的创新性,相关结果有助于提高对小肠腺癌发生的认知水平,并提示术后Bid和Bcl-xL免疫组织化学的病理检测,可能对判断患者预后和指导术后化疗方案有潜在的临床借鉴意义。

在胃与结肠的研究结果类似。但蛋白Bcl-xL的免疫组织化学得分与AI之间缺乏相关性($P>0.05$)。因此,在小肠腺癌的发生中抑制凋亡蛋白Bcl-xL表达的增加可能对于凋亡的减少并不起主要作用。但蛋白Bcl-xL的高表达促进了结肠腺癌的发生^[26],这可能是由于在不同的组织中蛋白Bcl-xL所起的作用不同。蛋白Bcl-xL可能主要是在结肠腺癌而不是小肠腺癌的发生中发挥作用。

在正常生理情况下,促凋亡蛋白Bax或Bak与抑制凋亡蛋白Bcl-2或Bcl-xL结合。在各种凋亡因素的作用下,BH3-only家族的成员与抑制凋亡蛋白Bcl-2或Bcl-xL结合,使得促凋亡蛋白Bax或Bak游离出来,形成同源二聚体引起凋亡的发生^[27,28]。又由于Bax/Bcl-2比值对多种细胞的凋亡起关键作用^[29]。在分子间相互作用的研究中发现Bcl-xL可以与蛋白Bid形成异源二聚体进而抑制蛋白Bid的促凋亡作用^[30]。因此我们研究Bid/Bcl-xL比值在正常小肠和小肠腺癌组织之间有无差异。结果显示,在正常小肠组织中Bid/Bcl-xL比值高于小肠腺癌组织(80.00% vs 14.29%, $P=0.002<0.01$)。因此,在小肠腺癌的发生中,Bid/Bcl-xL比值的降低可能促进了腺癌的发生。

在临床应用中,蛋白Bid的表达含量或许可以作为检测小肠癌手术后化疗敏感性及判断预后的指标之一。另外,如果能上调肿瘤细胞蛋白Bid的表达或Bid/Bcl-xL比值,不失为一种很好的生物治疗方法。

总之,本研究发现细胞凋亡水平的降低、蛋白Bid的低表达和Bid/Bcl-xL比值的降低可能在小肠肿瘤的发生和发展过程中发挥重要的作用;Bid/Bcl-xL比值可能会成为小肠肿瘤发生和发展新的预测指标。尽管蛋白Bcl-xL在腺癌的表达高于正常组织,但其表达水平与AI缺乏统计学相关性,蛋白Bcl-xL可能在小肠腺癌的发生中不起主要作用。

4 参考文献

- Brueckl WM, Heinze E, Milsmann C, Wein A, Koebnick C, Jung A, Croner RS, Brabletz T, Günther K, Kirchner T, Hahn EG, Hohenberger W, Becker H, Reingruber B. Prognostic significance of microsatellite instability in curatively resected adenocarcinoma of the small intestine. *Cancer Lett* 2004; 203: 181-190
- Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL, Vigneau FD. The epidemiology and pathogenesis of neoplasia in the small intestine. *Ann Epidemiol* 2009; 19: 58-69
- Singhal N, Singhal D. Adjuvant chemotherapy for small intestine adenocarcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD005202
- Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a

- research field. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 501-507
- Yang SY, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM, Winslet MC. Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends Mol Med* 2009; 15: 225-233
- Yu J, Zhang L. Apoptosis in human cancer cells. *Curr Opin Oncol* 2004; 16: 19-24
- Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 2008; 27 Suppl 1: S2-S19
- Giam M, Huang DC, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* 2008; 27 Suppl 1: S128-S136
- Fernandez-Luna JL. Regulation of pro-apoptotic BH3-only proteins and its contribution to cancer progression and chemoresistance. *Cell Signal* 2008; 20: 1921-1926
- Leedham SJ, Wright NA. Expansion of a mutated clone: from stem cell to tumour. *J Clin Pathol* 2008; 61: 164-171
- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 695-701
- Watson AJ, Pritchard DM. Lessons from genetically engineered animal models. VII. Apoptosis in intestinal epithelium: lessons from transgenic and knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G1-G5
- Aurello P, Bellagamba R, Rossi Del Monte S, D'Angelo F, Nigri G, Cicchini C, Ravaioli M, Ramacciato G. Apoptosis and microvessel density in gastric cancer: correlation with tumor stage and prognosis. *Am Surg* 2009; 75: 1183-1188
- Keefe DM, Brealey J, Goland GJ, Cummins AG. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut* 2000; 47: 632-637
- Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* 2009; 122: 437-441
- Chipuk JE, Fisher JC, Dillon CP, Kriwacki RW, Kuwana T, Green DR. Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 20327-20332
- Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008; 27: 6398-6406
- Gao C, Wang AY. Significance of increased apoptosis and Bax expression in human small intestinal adenocarcinoma. *J Histochem Cytochem* 2009; 57: 1139-1148
- Han HS, Park YM, Hwang TS. Differential expression of Bcl-2, Bcl-XL and p53 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1108-1114
- Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590-8607
- Lee JH, Soung YH, Lee JW, Park WS, Kim SY, Cho YG, Kim CJ, Seo SH, Kim HS, Nam SW, Yoo NJ, Lee SH, Lee JY. Inactivating mutation of the pro-apoptotic gene BID in gastric cancer. *J Pathol* 2004; 202: 439-445
- Zhao Y, Li R, Xia W, Neuzil J, Lu Y, Zhang H, Zhao X, Zhang X, Sun C, Wu K. Bid integrates intrinsic and extrinsic signaling in apoptosis induced by alpha-tocopheryl succinate in human gastric carcinoma cells. *Cancer Lett* 2010; 288: 42-49
- Sinicrope FA, Rego RL, Foster NR, Thibodeau SN, Alberts SR, Windschitl HE, Sargent DJ. Proapoptotic

- Bad and Bid protein expression predict survival in stages II and III colon cancers. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4128-4133
- 24 陈昊, 陈乃玲, 白玲, 张昶, 赵文海. 促凋亡蛋白FasL、Bid在结肠癌组织表达的临床意义. *中国实验诊断学* 2008; 12: 757-760
- 25 Zhang YL, Pang LQ, Wu Y, Wang XY, Wang CQ, Fan Y. Significance of Bcl-xL in human colon carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3069-3073
- 26 Smith L, Berrieman HK, O'Kane SL, Campbell A, Maraveyas A, Cawthell L. Immunohistochemical detection of apoptotic markers in gastric cancer. *Oncol Res* 2006; 15: 441-444
- 27 Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 2005; 19: 1294-1305
- 28 Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007; 315: 856-859
- 29 Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, Vallette FM. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 2007; 12: 887-896
- 30 García-Sáez AJ, Ries J, Orzáez M, Pérez-Payà E, Schwille P. Membrane promotes tBID interaction with BCL(XL). *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16: 1178-1185

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

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

过氧化作用与肝脏疾病

朱润芝, 李京敬, 谢超, 郜尽, 胡建军, 袁运生, 韩伟, 俞雁

■背景资料

肝脏疾病中, 过氧化通常被定义为强氧化复合物和抗氧化防御之间的不平衡, 过量的过氧化产物是肝脏疾病的重要指示物。活性氧是一种机体代谢反应的活性产物, 他可以造成很多细胞内分子如膜脂、蛋白和DNA损伤。氧化作用在肝脏疾病发病机制中有着重要意义。

朱润芝, 李京敬, 谢超, 袁运生, 俞雁, 上海交通大学农业与生物学院兽医生物技术上海市重点实验室 上海市 200240
谢超, 美国康奈尔大学农业与生命科学学院食品科学系 纽约市 14850
郜尽, 韩伟, 上海交通大学药学院再生医学实验室 上海市 200240
胡建军, 上海交通大学医学院附属上海市第六人民医院感染科 上海市 200233

作者贡献分布: 本综述由朱润芝、李京敬、谢超、郜尽、胡建军及袁运生完成, 韩伟与俞雁审校。

通讯作者: 俞雁, 教授, 博士生导师, 200240, 上海市闵行区东川路800号, 上海交通大学农业与生物学院3区409室。

yanyu@sjtu.edu.cn

电话: 021-34205769

收稿日期: 2009-12-19 修回日期: 2010-03-05

接受日期: 2010-03-15 在线出版日期: 2010-04-18

Oxidative stress and liver disease

Run-Zhi Zhu, Jing-Jing Li, Chao Xie, Jin Gao, Jian-Jun Hu, Yun-Sheng Yuan, Wei Han, Yan Yu

Run-Zhi Zhu, Jing-Jing Li, Chao Xie, Yun-Sheng Yuan, Yan Yu, Shanghai Municipality Key Laboratory for Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China
Chao Xie, Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, New York 14853-7201, United States

Jin Gao, Wei Han, Laboratory for Regenerative Medicine, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Jian-Jun Hu, Department of Infectious Diseases, Shanghai Sixth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Professor Yan Yu, Shanghai Municipality Key Laboratory for Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China. yanyu@sjtu.edu.cn

Received: 2009-12-19 Revised: 2010-03-05

Accepted: 2010-03-15 Published online: 2010-04-18

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are highly reactive molecules that are naturally generated in small amounts during the body's metabolic reactions and can react with and damage complex cellular molecules such as lipids, proteins, or DNA. Excessive oxidative stress contributes to the pathogenesis of liver disease and may serve as a prognostic indicator of poor clinical outcome. In this article, we will review the biological characteristics of free radicals and some antioxidants and discuss the association of oxidative

stress with many types of liver diseases.

Key Words: Reactive oxygen species; Reactive nitrogen species; Liver disease

Zhu RZ, Li JJ, Xie C, Gao J, Hu JJ, Yuan YS, Han W, Yu Y. Oxidative stress and liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1134-1140

摘要

肝脏疾病中, 过氧化通常被定义为强氧化复合物和抗氧化防御之间的不平衡, 过量的过氧化产物是肝脏疾病的重要标志物。活性氧是一种机体代谢反应的活性产物, 他可以造成很多细胞内分子如膜脂、蛋白和DNA损伤。氧化作用在肝脏疾病发病机制中有着重要意义。本文总结氧化作用自由基的特点以及部分抗氧化剂的特性, 并且讨论了氧化作用产物在肝脏疾病中的重要意义。

关键词: 活性氧; 活性氮; 肝脏疾病

朱润芝, 李京敬, 谢超, 郜尽, 胡建军, 袁运生, 韩伟, 俞雁. 过氧化作用与肝脏疾病. *世界华人消化杂志* 2010; 18(11): 1134-1140

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1134.asp>

0 引言

机体氧化反应产生的有害化合物具有强氧化性, 损害机体的组织和细胞, 进而引发慢性疾病及衰老。自由基也称为“游离基”, 是含有不成对电子的原子团。由于原子形成分子时, 化学键中电子必须成对出现, 因此自由基夺取其他物质的单个电子, 使自身形成稳定的物质, 这种现象被称为“氧化”。生物体内主要是氧自由基, 例如超氧阴离子自由基、羟自由基、脂氧自由基、二氧化氮和一氧化氮自由基, 加上H₂O₂、单线态氧和臭氧, 通称活性氧(reactive oxygen species, ROS)。自由基是必需的, 体内ROS自由基参与免疫和信号传导过程, 传递维持生命活力的能量, 杀灭细菌和寄生虫, 排除毒素。白细胞利用自由基来杀死外源性微生物, 体内一些

■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

代谢反应需要自由基来催化, 血管的舒张和部分神经、消化系统信号的传导要借助自由基, 此外, 自由基可以刺激某些基因导致突变从而适应环境变化. 但过多的ROS自由基会导致正常细胞和组织的损伤. 太阳辐射、空气污染、农药和不健康饮食习惯都会使机体产生更多ROS自由基, 致使核酸突变, 这是衰老和疾病的根源. 自由基对人体的损害主要表现在破坏细胞膜, 使血清抗蛋白酶失去活性, 损伤基因导致细胞变异的出现和蓄积. 大量研究表明, 炎症、肿瘤、衰老、血液病, 以及心、肝、肺、皮肤疾病的发生机制与体内自由基产生过多或机体清除自由基能力下降有着密切关系. 过氧化作用是肝脏疾病的主要特点. 近年, 越来越多的研究证明ROS和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)导致肝脏功能发生改变, 表现在生成有害物和减少胆汁产生. 机体生物毒素和药物毒素与肝脏的代谢、肝细胞生物化学的反应失衡、ROS自由基的过量产生有关. 随之而来的氧化还原反应失衡和氧化损伤导致亚临床无黄疸性肝炎、坏死炎症性肝炎、肝硬化和肝癌等一系列疾病实质损害^[1].

1 过氧化作用的产物

1.1 自由基 肝脏是自由基产生的重要场所. 自由基的合成与肝脏中的氧化酶有关, 包含二胺氧化酶, 醛脱氢酶, 色氨酸双氧化酶, 肝脏脱氢酶, 以及细胞色素P450酶系统诱导的氧化还原和解偶联. 很多自由基都是在肝脏新陈代谢的过程中由内源性产物转化形成或者体外摄入(对乙酰氨基酚等药物).

1.2 ROS ROS包括过氧化物、 H_2O_2 和羟基. 过氧化物是含氧自由基的统称, 大部分时间伴随线粒体的呼吸作用产生. 当游离氧在水中接触到电子传递链中释放出来的电子, 便产生了 O^{2-} , 其他常见的超氧化物包括缺血组织中的黄嘌呤氧化酶以及氧合血红蛋白的分解产物. 过氧化物能够通过歧化反应转化为稳定的 H_2O_2 , 后者在金属离子作用下能够转化为具有高度活性的羟基, 继而形成ROS^[2]. ROS主要形成于肝细胞的线粒体, 此外, 肝脏库普弗细胞和炎细胞经NADPH氧化酶和黄嘌呤氧化酶作用, 也可以产生少量的ROS. 在线粒体中, 伴随着电子传递链中氧的消耗, 氧分子能够持续稳定转化为ROS. 肝细胞中有较多的线粒体, 能够产生大量极不稳定的ROS, 破坏蛋白质、DNA、脂类等分子

的活性. 肝脏并不仅仅只能产生大量的ROS, 肝脏还能通过蛋白质合成发挥抗氧化作用. 氧化损伤定义为生命机体的氧化损伤和抗氧化损伤处于不平衡状态时, 氧化损伤占优势地位.

1.3 RNS 一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)在肝实质细胞和库普弗细胞中都存在. 肝脏发生炎症时, 含氮氧化物通过谷胱甘肽硫转移酶的作用可逆的结合在自由硫醇基团上, 含氮氧化物是一种高效的血管舒张剂, 可以减少细胞凋亡, 并以破坏DNA链的方式去除脂类自由基. 含氮氧化物形成活性中间体, 例如硝基酞氨酸, 会导致肝细胞坏死; 抑制线粒体功能; 消耗细胞的吡啶核苷酸, 导致DNA链断裂. 一氧化氮还能与过氧离子自由基结合形成过氧化氮化合物, 形成脂质体过氧化前体能导致细胞损伤, 抑制线粒体呼吸作用、 Na^+/K^+ 泵功能及磷酸化激酶活性.

2 氧化损伤

2.1 过氧化作用的一般结果

2.1.1 DNA损伤: 过氧化作用破坏DNA的双链结构, 导致DNA链断裂、解开, 甚至诱导机体基因突变, 引发肿瘤.

2.1.2 形成脂质过氧化体: 细胞膜上的多不饱和脂肪酸可以和氧分子作用产生过氧化氢自由基, 他是脂类过氧化物的中间体. 这个反应导致细胞膜结构变化从而改变细胞膜的流动性及其生物学功能, 例如离子转运、信号转导以及梯度渗透. 首先, 游离的羟基带走细胞膜脂质体上的氢原子, 从而转换成脂类自由基, 细胞膜上的这类自由基可以与其他含氧自由基共同生成新的自由基, 过氧自由基从邻近的脂质分子获取氢分子, 这个反应不断重复, 继而引起大规模的DNA损伤导致突变. 其次, 过氧化物还能够形成醛复合物, 引起器官的炎症以及纤维化, 例如酒精肝^[3]. 此外, 人类的非酒精性肝病以及丙型肝炎都不同程度表现为硫代巴比土酸和8-Isoprostane这类脂质过氧化物水平的升高, 这可以作为这一类肝脏疾病的重要标志物^[4].

2.1.3 蛋白损伤: 自由基导致的内源性蛋白损伤不但引起细胞功能改变, 还可能刺激机体的主动性免疫, 引发自身免疫性疾病. 多重的细胞内信号转导机制依赖于正常的蛋白结构和功能, 过氧化活性物能导致酶内氨基酸发生氧化, 改变蛋白的活性和抗原性.

2.2 氧化作用与肝炎 肝炎患者表现出氧化及抗

■ 研发前沿

肝脏毫无疑问是体内最重要的过氧化与抗氧化作用相交集的场所, 如何选择最佳的抗氧化治疗方案需要对肝脏这个生理病理复杂的器官进一步研究. 氧化作用的分子机制研究表面, 肝脏疾病通常会带来体内产生过量的ROS和RNS, 在合理的内源性抗氧化作用补偿性应答缺失时, 机体氧化作用失衡. 合理使用抗氧化剂对于阻止激活这些通路意义重大. 在了解肝脏疾病的分子机制后, 通过使用抗氧化剂来治疗相应疾病导致的抗氧化损伤, 将会成为药物开发的新途径.

■相关报道

机体过氧化作用与肝脏疾病的分子机制研究尤为重要, Evans等相关研究表明, 机体氧化作用失衡时, 信号通路NF- κ B, p38 MAPK, JNK/SAPK, PKC, AGE/RAGE等有关, 合理使用抗氧化剂对于阻止激活这些通路意义重大。

氧化失衡. 肝脏炎症细胞所产生的过量氧自由基能够攻击宿主细胞, 主导疾病的发生、发展及预后, 并且影响抗病毒治疗的敏感性. 过氧化作用导致DNA损伤和突变, 在肝癌的发病过程中发挥重要作用. 慢性肝病、肝硬化及肝炎患者血液中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性均明显低于正常对照, 且与ALT呈明显负相关. 肝脏疾病患者存在严重的脂质过氧化损伤, 监测GSH-Px、SOD活性及丙二醛MDA、Se的含量对肝病患者疗效和预后都具有重要意义^[5].

Halliwell等^[6]通过对不同类型肝病患者血清检测, 发现患者血清SOD均有明显下降. 研究人员^[7]检测30例慢性乙型肝炎患者血清, 显示丙二醛浓度及抗坏血酸浓度显著升高. 丙二醛浓度与谷丙转氨酶水平呈明显正相关, 丙二醛水平可以作为肝脏组织损伤的重要判断指标, Demirdag等也有类似报道^[8]. Bolukbas等^[9]和Eboumbou等^[10]发现肝硬化患者的血清抗氧化能力较非活动性HBsAg携带者及正常对照组明显降低. 病毒性肝炎患者血清及尿液中, 氧化损伤相关因子的表达是增加的, 并且与肝细胞损伤程度呈正相关. 肝炎患者的TNF- α 、TGF- β 的显著升高, 与氧化损伤、病理损伤以及肝纤维化密切相关^[11]. 肝星状细胞对凋亡小体的吞噬作用能够增加细胞内氧自由基的产生, 促进肝脏星状细胞的激活从而增加肝脏纤维化的机会^[12]. 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)为氧自由基诱导的DNA突变片段产物, 是评价DNA损伤的重要指标, Kitada等^[13]运用免疫组织化学的方法检测慢性乙型肝炎患者肝细胞和胆管细胞中8-OHdG的表达, 结果显示门静脉周围的肝脏坏死区及炎症浸润区较为明显, 肝细胞内8-OHdG数量和肝脏病理损伤正相关, 氧化损伤导致DNA突变, 诱发癌症. 还原型GSH可以阻断过氧化物的作用. 过氧化物能够显著降低HBV颗粒的释放, 并且能够抑制HBsAg和HBeAg的释放, 影响HBV DNA的复制^[14].

总之, 在肝脏疾病不同的阶段, 抗氧化复合物随着过氧化自由基的蓄积量变化不断变化. 通常, 过氧化作用是机体健康所必需的, 例如中性粒细胞产生过氧化物杀死细菌性病原体. 同时, 自由基会影响到细胞内的信号转导和基因表达调控, 进而导致机体炎症反应. 过氧化通常被定义为强氧化复合物和抗氧化防御之间的失

衡, 过量的过氧化产物无疑是疾病的重要指示物^[15]. 由于过氧化产物较为复杂, 很难在临床上定量测定, 导致针对氧化损伤的治疗非常困难.

3 抗氧化系统以及氧化损伤标志物

抗氧化剂包括谷胱甘肽(glutathione, GSH)、硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)、维生素C、维生素E、 β -胡萝卜素等. 活性氧清除酶系统包括: SOD、GSH-Px、过氧化氢酶等. GSH是一个在生物机体内含有极丰富巯基基团的复合物, 巯基能够提供电子给自由基. 细胞中GSH是以还原形式存在的, 他提供电子后能够转化成稳定的二聚体氧化型谷胱甘肽(oxidative glutathione, GSSG), GSSG能够阻止自由基持续的释放电子. GSH提供电子后, GSH-Px能够还原H₂O₂为O₂和H₂O, 并且可以还原脂质过氧化物. GSSG能在谷胱甘肽还原酶的作用下还原为GSH, 过氧化物酶体内的过氧化氢酶也能够将过氧化氢还原为氧气和水. TRX也是一个在氧化损伤作用下产生的蛋白质, 可以结合双硫键, 清除H₂O₂^[16]. 维生素A, 维生素C, 维生素E是细胞介导免疫反应和病毒性肝炎中最重要的抗氧化剂^[17].

细胞内过氧化物活性体的变化会引起细胞功能和基因表达的变化, 甚至可以导致细胞凋亡和坏死. 过氧化的标志物有脂类过氧化物4-hydroxynonenal(4-HNE)和DNA氧化产物8-hydroxyguanosine(8-OHG)的上升; GSH、维生素A、维生素E和维生素C的下降; 包括GSH和GSSG之间氧化还原型比值的变化. 过氧化作用与肝功能衰竭有着重要关联, 而且, 他还是酒精性肝炎和病毒性肝炎的重要特征性反应. 尽管肝脏损伤的诱因不同, 但是引起的结果包括炎症、纤维化、硬变都是相近的, 这些状况都与过氧化作用的结果有关.

维生素C和维生素E是血浆中最主要的抗氧化剂. 维生素C能够抑制水溶性基团、清除脂质过氧化产物以及还原生育酚残基为生育酚, 进而修复自由基对细胞的损伤^[18]. 维生素E作用于生物膜, 与微量元素硒协同作用, 能有效的阻断脂质过氧化和抑制氧自由基的产生. 类胡萝卜素能够协助清除ROS尤其是单态氧的形成, 同时, 胡萝卜素能够起到抑制脂质过氧化作用^[19]. 4-羟基-2-酚(4-Hydroxy-2-nonenal, HNE)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)是脂质氧化反应的产物, 8-羟基脱氧鸟苷是DNA碱基修正的产物, 这些产物都可以作为氧化损伤的指标.

3.1 内源性抗氧化剂 抗氧化作用也是一个复杂涉酶和不涉酶的过程, 酶类抗氧化剂: (1)SOD, SOD被氧化损伤所诱导产生并能够歧化两个 $O_2^{\cdot -}$, 产生 H_2O_2 和 O_2 的反应. SOD的抗氧化能力来自其所含镁、铜和锌, 机体内浓度可被诱导而提高; (2)过氧化氢酶, 催化 H_2O_2 转变为 H_2O 和 O_2 ; (3)GSH-Px, 同样催化 H_2O_2 转变为 H_2O 和 O_2 , 并且将部分过氧化物转变为乙醇; (4)谷胱甘肽转移酶、血浆铜蓝蛋白等也可以参与调控过氧化反应产物的代谢. 这类抗氧化剂有效降低了机体有害的过氧化物. 非酶类抗氧化剂: (1)脂溶性维生素E, 可以接受细胞膜上产生的过氧自由基的电子, 形成自由基, 阻止脂类过氧化物的形成; (2)水溶性维生素C, 具有很强的抗氧化能力; (3)GSH, 是细胞内最重要的抗氧化物, 其巯基可以接收自由基的不成对电子. GSH能够和自由基配对, 通过肾脏代谢产物, 对肝脏8-羟基脱氧鸟苷酶活性的影响尤为重要. 这一类自由基是一种可逆的结构体, 可以通过简单的化学反应来转换(GSSG/GSH), 或者借助于其他抗氧化剂(维生素C或维生素E)来完成转换; (4)功能性小分子, 例如尿酸、类黄酮以及类胡萝卜素. 涉酶和不涉酶的抗氧化反应通常是协同作用的. 例如, 过氧化物歧化酶作用下, 机体产生 H_2O_2 后, GSH-Px携带 H_2O_2 和水氧化谷胱甘肽前体(GSH)形成二硫化物谷胱甘肽(GSSG). 谷胱甘肽还原酶促成氧化性谷胱甘肽(GSSG)到GSH的转换. GSH-Px在清除细胞质和线粒体中过氧化氢起到相当重要的作用, 当然这也得依赖于机体内充足的内源性谷胱甘肽(GSH).

3.1.1 GSH及其系列酶的研究: GSH是一种三肽化合物(L- γ -谷氨酰-半胱氨酸-甘氨酸), 广泛分布于动植物中, 是一种哺乳动物内源性抗氧化剂. GSH的主要生理功能: 维持红细胞膜的完整性; 保护与恢复需要巯基酶活性的功能; 是多种酶的辅基与辅酶; 参与氨基酸的吸收及转运; 参与高铁血红蛋白的还原作用及促进铁的吸收; 清除体内有害毒物和代谢物. GSH主要以还原型(GSH)和氧化型(GSSG)两种形式广泛存在于机体内, 一般组织中主要以GSH形式存在. GSH不仅可作为GSH-Px、GSH-ST的底物去除 H_2O_2 、有机氢过氧化物(LOOH), 而且可以直接清除多种氧自由基, 同时也是构成膜及胞质保护因子的必需成分, 阻止氧自由基对机体的损伤. 还原型GSH和氧化型GSSG之间的比率变化直观反应机体过氧化状态. 慢性肝炎患者的血

液中GSH/GSSG比值上升, 但肝脏中GSH/GSSG比值下降^[20]. GSH抗氧化系统主要指谷胱甘肽(GSH+GSSG)、GSH-Px、谷胱甘肽-S转移酶(glutathione-S-transferases, GSH-ST)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase GR), 其相互之间有着密切的联系. GSH-Px和GSH-ST的主要作用是以GSH为底物, 清除体内的 H_2O_2 和LOOH. (1)GSH: GSH存在于所有动物细胞中, 正常环境下以其硫醇还原型(GSH)存在, 是细胞内主要的非蛋白质巯基化合物. GSH分子结构中的活性巯基具有很强的亲和力, 能够与多种化学物质及人体代谢产物结合, 清除体内的超氧离子和自由基, 保护细胞膜的完整性, 具有抗脂质氧化作用, 从而维持细胞的正常代谢. 氧化应激可使细胞内GSH含量下降, 或使其转变为双硫氧化型(GSSG), 后者又可通过以NADPH为辅酶的谷胱甘肽还原酶转变为GSH. 近年来发现, 谷胱甘肽除具有抗氧化和调节机体巯基平衡的作用外, 在中枢神经系统中也有神经递质或神经调质样作用. 研究表明, 慢性肝病患者中GSH较正常对照有明显降低^[21]. (2)GSH-Px: GSH-Px是广泛存在于机体的一种重要的催化 H_2O_2 分解的酶. 他特异催化还原型GSH对 H_2O_2 的还原反应, 起到保护细胞膜结构和功能的作用. GSH-Px的活性中心是硒半胱氨酸, 1单位酶分子含4单位硒原子. GSH-Px清除脂质氢过氧化物, 减轻有机氢过氧化物对机体的损伤^[22], 并且在过氧化氢酶含量很少或者 H_2O_2 产量很低的组织中代替过氧化氢酶清除 H_2O_2 ^[23,24], 参与调节前列腺素的生物合成. Czuczejko等^[25]发现慢性肝病患者血浆中硒的浓度以及红细胞中GSH-Px的活力比健康对照明显降低. (3)谷胱甘肽-S转移酶: 谷胱甘肽-S转移酶是一组与肝脏解毒功能相关的同工酶, 主要催化各种化学物质及其代谢产物与GSH的巯基共价结合, 1961年由Boyer发现^[26], 广泛分布于动植物界, 动物体肝脏中含量尤为丰富, 微量存在于近曲肾小管、小肠黏膜、肾上腺皮质、睾丸和卵巢等组织中. 人类肝脏中含有多种GSH-ST的同工酶, 最初研究人员在人类肝组织中鉴定了5种碱性GSH-ST同工酶^[27], 后来发现的GSH-ST同工酶达到了13种. 根据理化结构、酶学及免疫学特点, GSH-ST分为三类: GSH-ST α , GSH-ST μ 和GSH-ST π , 前两者主要存在于成人肝脏, 后者主要见于肾脏、胎盘和胎肝. GSH-ST按其等电点的不同, 可分为碱性、中性、酸性, 其中GSH-ST α 类为碱性, GSH-ST μ 类接近中性,

■同行评价

本文论述内容先进, 论述观点准确, 具有很好的参考意义.

GSH-ST π 类为酸性, 人类肝脏中GSH-ST的含量约占胞质蛋白质总含量的5%。GSH-ST的作用主要有: (1)催化GSH的巯基攻击亲电物质的亲电中心, 产生一种硫醚连接的GSH结合物; (2)以高亲和力直接结合胆红素、甾醇和其他亲脂性物质; (3)某些GSH-ST具有GSH-Px活性, 即具有抑制脂质过氧化作用。GSH-ST可作为肝细胞损伤的标志物, 比转氨酶更有意义。 (4)谷胱甘肽还原酶: 谷胱甘肽还原酶是一种黄素酶, 每分子酶蛋白含有一分子的FAD。由辅酶NADPH供氢, 催化GSSG还原成GSH。Pak等^[28]的研究发现, 在急性乙型肝炎患者的血清中, GR的含量明显降低。机体内的GSH主要通过合成和还原两条途径生成。肝脏是合成GSH的主要场所, 通过 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶催化合成, 合成过程中需消耗ATP。还原途径是GR在NADPH存在的条件下还原GSSG为GSH, 另外还可通过巯基转移酶作用生成GSH。肝脏不仅具有合成GSH的能力, 而且具有运输GSH的能力, 为周围组织提供大量的GSH。正常生理条件下, 肝脏中90%-95%的GSH被转运到周围组织, 其中的80%-85%通过肝窦膜进入血液, 另外的通过小管膜进入胆汁, 5%-10%的GSH参与各种反应氧化成GSSG, 或被酶破坏消耗。

3.2 外源性的抗氧化剂

3.2.1 螯合物: 肝脏是体内转运和存储铁最重要的器官, 肝脏内铜的积累是慢性肝炎的表现, 同时是铜代谢遗传缺陷性肝炎的重要诱因。可以结合金属的物质都可以认作是抗氧化剂, 肝脏富含半胱氨酸蛋白, 可以结合肝脏中多种金属, 例如铜和锌。肝脏中的铁可以结合于铁蛋白(铁传递蛋白和乳铁传递蛋白)和血铁黄素。结合铜的血浆铜蓝结合蛋白和白蛋白, 以及外源性铜结合载体青霉素。

3.2.2 食物性抗氧化剂: 食物性抗氧化剂是指从食物中获取的可以减少体内自由基积累并且减轻他们对机体的损伤的摄入物, 包括维生素C和维生素E。维生素E在抗氧自由基损伤方面的作用越来越受到重视。维生素包含 α -生育酚(Tocopherol)和三烯生育酚(Tocotrienols)。自然界共有8类, 即 α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚和 α 、 β 、 γ 、 δ -三烯生育酚。其中, α -生育酚具有3个甲基分别定位于色满醇环的5, 7, 8位上, 是生物活性最强的生育酚。维生素E尽管在膜上的含量较低, 但他是最重要的脂溶性抗氧化剂, 能对抗包括H₂O₂、脂质过氧化体等多种氧化剂。维生素E还可以减

少肿瘤坏死因子(TNF- α), 从而降低骨胶原产物生成。在缺氧性肝损伤时, 肝脏中维生素E水平降低。发生铜源性肝病时, 维生素E会降到很低的水平。维生素E可以与硒协同使用以控制四环素导致的肝病^[29]。此外, 维生素E对治疗慢性肝炎、肝硬变、铜相关性肝病有一定疗效。维生素C作为还原剂, 在细胞内外都具有重要的清除氧自由基和抗脂质过氧化的作用。这与仅限于细胞内的自由基清除剂SOD和GSH-Px的防御方式不同。维生素C可提高肝组织中GSH水平, 保存 α -生育酚, 还原 α -生育酚自由基, 使被还原的维生素E在细胞膜上继续发挥作用。还可以延迟 β -胡萝卜素的消耗, 增强GSH-Px和谷胱甘肽还原酶活力。维生素E和维生素C能够协同作用, 让一些脂质过氧化物链断裂。此外, 植物性类黄酮也可以起到强效的抗氧化剂的作用。此外还有一些类胡萝卜素(CAR)、甘露糖醇、植物酚类, 是H₂O₂、ROS、RNS等的清除剂。维生素A可以激活巨噬细胞, 通过激活肝脏库普弗细胞清除过氧化物以降低脂类过氧化物和减少肝脏损伤。

3.2.3 S-腺苷-L-蛋氨酸(S-Adenosylmethionine): S-腺苷-L-蛋氨酸是与机体新陈代谢相关的重要复合物, 表现为甲基的迁移和氨基反应。S-腺苷-L-蛋氨酸是公认的最常见的抗氧化剂, 同时也是GSH的前体。研究表明给予S-腺苷-L-蛋氨酸可以迅速补充酒精肝患者的GSH缺乏, 并且能够延长肝移植患者的存活时间, 提高存活率。此外, S-腺苷-L-蛋氨酸使对乙酰氨基酚注射后的猫红细胞免受氧化损伤^[30]。S-腺苷-L-蛋氨酸作为OTC药品, 对不同肝脏疾病给予剂量有所不同, 推荐剂量一般为空腹20 mg/kg, 研究表明能有效抑制对乙酰氨基酚引起的不良反应, 并且对慢性肝炎、脂肪肝、胆汁性肝炎有很好的疗效。

3.2.4 水飞蓟: 水飞蓟是菊科草本植物, 所含的活性成分主要存在于种子中, 有水飞蓟宾(silybin)、异水飞蓟宾(isosilybin)、水飞蓟宁(silidianin)和水飞蓟丁(silichristin), 统称为水飞蓟素(silymarin)。水飞蓟是肝细胞膜稳定剂, 可以增强肝细胞表面黏膜, 在欧洲作为人类保肝药物已经有一百多年的历史。保护肝细胞膜, 对三硝基甲苯、CCl₄、 α -鹅膏蕈、鬼笔碱的肝脏毒性有很好的缓解作用, 增加胆汁分泌。水飞蓟宾有清除自由基、抗脂质过氧化、抑制5-脂氧合酶、抗GSH排空、抗肿瘤、降血脂、保护肝细胞膜、促进肝细胞修复和抗肝纤维化等药理学效应^[31]。目前水飞蓟主要作为一种保肝植物, 其制

剂已广泛用于治疗急慢性肝炎及肝硬化, 由于具有较强的抗氧化作用, 在美国及欧洲已将其作为抗氧化食品添加剂. Bindoli等^[32]人研究发现水飞蓟素可以有效抑制在线粒体和微粒体中抗 Fe^{2+} -抗坏血酸诱发的脂质过氧化作用. Antonello等^[33]给小鼠服用高铁饮食后, 给予水飞蓟, 发现水飞蓟素能防止脂质过氧化, 增加肝组织中GSH含量. 肝硬化发生时, NO是引起高动力循环和低氧血症的主要介质, NO含量升高对组织细胞有毒性作用, 并能增强活化的单核巨噬细胞的毒性作用^[34], 此外, 在 H_2O_2 的参与下, NO的细胞毒性作用显著增强, 特别表现在与超氧阴离子结合后生成过亚硝酸盐. 水飞蓟素具有抑制活化的库普弗细胞产生NO, 进而使其与超氧阴离子相互作用减弱. 研究表明, 在给予犬 CCl_4 之前注射水飞蓟素可以显著降低血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶, 说明水飞蓟素能够去除机体的肝毒素.

3.2.5 胆烷酸: 胆烷酸与其他抗氧化剂不同, (1)他是一个处方药; (2)通常作为其他病症(如促胆汁分泌)的临床药物; 他也用作非酒精性脂肪肝的治疗, 研究表明非酒精性脂肪肝的致病机制可能与胰岛素合成缺乏和肝脏过氧化作用有关. 熊脱氧胆酸(UDCA)是治疗非酒精性脂肪肝的一个重要手段, 具有利胆、保肝护肝、抗氧化的作用. 实际上, UDCA治疗非酒精性脂肪肝是和维生素E和维生素C合并治疗一样有效的, 可以降低ALT, 甚至更好的降低GOT活性. UDCA减轻肝脏以及线粒体因为慢性胆汁郁积而引起的GSH消耗以及自由基的产生, 从而降低继发的胆汁性肝硬变的发生率. 当然, 还需要进一步研究他对胆管炎、慢性肝炎、铜富集引发的肝病作用机制.

4 结论

比起细菌学、病毒学等很多领域, 对自由基的研究相对滞后. 人类对自由基的研究开始于20世纪初, 最初研究自由基的化学反应过程, 随后自由基知识渗透到生物学领域. 虽然在20世纪60年代人们已经认识到自由基与疾病的紧密联系, 但由于技术手段限制, 研究进展缓慢. 近年来, 研究自由基的技术有了新的突破, 推动了生物学的迅速发展, 形成了一个以化学、物理学和生物医学相结合的蓬勃发展的新领域即自由基生物医学. 过氧化作用是多样的, 抗氧化剂在作用机制上也有所不同. 过氧化和抗氧化不是

简单的相反作用量的叠加, 而是一个复杂的过程. 设计一个有效的抗氧化方案首先必须了解哪种过氧化引起的损伤最为严重, 脂类过氧化体, DNA损伤以及炎症因子都是自由基作用引发的结果. 这类复杂的结果需要多重的抗氧化处理, 肝脏毫无疑问是体内最重要的过氧化与抗氧化作用相交集的场所, 如何选择最佳的抗氧化治疗方案需要我们对肝脏这个生理病理复杂的器官进一步研究. 氧化作用的分子机制研究表面, 肝脏疾病通常会带来体内产生过量的ROS和RNS, 在合理的内源性抗氧化作用补偿性应答缺失时, 机体氧化作用失衡. 信号通路NF- κ B, p38 MAPK, JNK/SAPK, PKC, AGE/RAGE等有关, 合理的使用抗氧化剂对于阻止激活这些通路意义重大^[35]. 进一步地说, 在了解肝脏疾病的分子机制后, 通过使用抗氧化剂来治疗相应疾病导致的抗氧化损伤, 将会成为药物开发的新途径. 当前, 基于抗氧化作用来治疗肝脏疾病还停留在使用常规的天然中草药活性提取物、维生素等复方成分, 解决一些表象问题, 对于肝脏疾病的分子机制了解还不是很透彻, 今后的研究应该将细胞生物学、分子生物学、病理学等紧密结合起来, 能够从药物靶向机制上找到切入点, 为治疗肝脏疾病提供新的思路.

5 参考文献

- 1 Wheeler MD, Kono H, Yin M, Rusyn I, Froh M, Connor HD, Mason RP, Samulski RJ, Thurman RG. Delivery of the Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Gastroenterology* 2001; 120: 1241-1250
- 2 Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1865-1879
- 3 Stehbens WE. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. *Exp Mol Pathol* 2004; 77: 121-132
- 4 Stehbens WE. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Exp Mol Pathol* 2003; 75: 265-276
- 5 彭庆远, 钟辉秀, 尹朝伦. 硒、GSH-Px、SOD、MDA测定在探测肝脏疾病过氧化脂质损伤中的临床应用. *国际检验医学杂志* 2001; 22: 324
- 6 Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 1997; 55: S44-S49; discussion S49-S52
- 7 王凯, 王兵, 范晓鹏. 慢性乙型肝炎患者氧化损伤的研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2004; 18: 172-174
- 8 Demirdag K, Yilmaz S, Ozdarendeli A, Ozden M, Kalkan A, Kilic SS. Levels of plasma malondialdehyde and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 766-770
- 9 Bolukbas C, Bolukbas FF, Horoz M, Aslan M, Celik H, Erel O. Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis*

- 2005; 5: 95
- 10 Eboumbou C, Steghens JP, Abdallahi OM, Mirghani A, Gallian P, van Kappel A, Qurashi A, Gharib B, De Reggi M. Circulating markers of oxidative stress and liver fibrosis in Sudanese subjects at risk of schistosomiasis and hepatitis. *Acta Trop* 2005; 94: 99-106
- 11 Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2000; 21: 49-98
- 12 Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, Torok NJ. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* 2006; 43: 435-443
- 13 Kitada T, Seki S, Iwai S, Yamada T, Sakaguchi H, Wakasa K. In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease. *J Hepatol* 2001; 35: 613-618
- 14 Zheng YW, Yen TS. Negative regulation of hepatitis B virus gene expression and replication by oxidative stress. *J Biol Chem* 1994; 269: 8857-8862
- 15 Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 161-168
- 16 Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 303-308
- 17 Madan K, Bhardwaj P, Thareja S, Gupta SD, Saraya A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 930-935
- 18 Center SA, Warner KL, Erb HN. Liver glutathione concentrations in dogs and cats with naturally occurring liver disease. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1187-1197
- 19 Spee B, Arends B, van den Ingh TS, Penning LC, Rothuizen J. Copper metabolism and oxidative stress in chronic inflammatory and cholestatic liver diseases in dogs. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 1085-1092
- 20 Webb CB, Twedt DC, Fettman MJ, Mason G. S-adenosylmethionine (SAME) in a feline acetaminophen model of oxidative injury. *J Feline Med Surg* 2003; 5: 69-75
- 21 Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 404-433
- 22 Fridovich I. Oxygen free radicals and tissue damage: chairman's introduction. *Ciba Found Symp* 1978; 1-4
- 23 Ladenstein R, Epp O, Bartels K, Jones A, Huber R, Wendel A. Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1979; 134: 199-218
- 24 Halliwell B, Gateridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press 1985; 96-98
- 25 Czuczejko J, Zachara BA, Staubach-Topczewska E, Halota W, Kedziora J. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1147-1154
- 26 Boyer TD. The glutathione S-transferases: an update. *Hepatology* 1989; 9: 486-496
- 27 Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Garcia KB, Royer RE. Isolation and characterization of the multiple glutathione S-transferases from human liver. Evidence for unique heme-binding sites. *J Biol Chem* 1985; 260: 11603-11610
- 28 Pak SG, Nikitin EV. [Status of the processes of free-radical oxidation and the antioxidation system in patients with a severe course of hepatitis B] *Klin Med (Mosk)* 1991; 69: 54-57
- 29 Hill AS, Rogers QR, O'Neill SL, Christopher MM. Effects of dietary antioxidant supplementation before and after oral acetaminophen challenge in cats. *Am J Vet Res* 2005; 66: 196-204
- 30 Center SA, Randolph JF, Warner KL, McCabe-McClelland J, Foureman P, Hoffmann WE, Erb HN. The effects of S-adenosylmethionine on clinical pathology and redox potential in the red blood cell, liver, and bile of clinically normal cats. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 303-314
- 31 阎玉峰, 于健东. 水飞蓟化学成分及药理研究进展. *中国药事* 2000; 14: 335-338
- 32 Bindoli A, Cavallini L, Siliprandi N. Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem Pharmacol* 1977; 26: 2405-2409
- 33 Pietrangelo A, Borella F, Casalgrandi G, Montosi G, Ceccarelli D, Gallesi D, Giovannini F, Gasparetto A, Masini A. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology* 1995; 109: 1941-1949
- 34 Filburn CR, Kettenacker R, Griffin DW. Bioavailability of a silybin-phosphatidylcholine complex in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2007; 30: 132-138
- 35 Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23: 599-622

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

胰腺癌中表观遗传修饰研究进展

王霞, 王晖, 张啸

王霞, 王晖, 张啸, 杭州市第一人民医院消化内科 浙江省杭州市 310006

杭州市科技发展计划项目基金资助项目, No. 20080333Q02

作者贡献分布: 本文综述由王霞与王晖完成; 张啸审校。

通讯作者: 王霞, 主治医师, 310006, 浙江省杭州市, 杭州市第一人民医院消化内科. wang78xia@hotmail.com

电话: 0571-87065701

收稿日期: 2010-01-02 修回日期: 2010-03-12

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

Epigenetics: a new frontier in pancreatic cancer research

Xia Wang, Hui Wang, Xiao Zhang

Xia Wang, Hui Wang, Xiao Zhang, Department of Gastroenterology, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Supported by: the Science and Technology Development Program of Hangzhou City, No. 20080333Q02

Correspondence to: Xia Wang, Department of Gastroenterology, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. wang78xia@hotmail.com

Received: 2010-01-02 Revised: 2010-03-12

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-18

Abstract

Pancreatic cancer is an epigenetic disease, as it is a genetic disease. Both genetic (at both the chromosomal and nucleotide levels) and epigenetic alterations (DNA methylation, histone acetylation and RNA interference) are involved in the pathogenesis of pancreatic cancer. The detection and quantification of DNA methylation alterations in pancreatic juice is likely a promising tool for the diagnosis of pancreatic cancer. Epigenetic alterations constitute attractive therapeutic targets for pancreatic cancer. In this review, we briefly summarize recent research findings on epigenetic alterations in pancreatic cancer and discuss their biological and clinical implications.

Key Words: Pancreatic cancer; Epigenetics; DNA methylation; Histone modification

Wang X, Wang H, Zhang X. Epigenetics: a new frontier in pancreatic cancer research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1141-1146

摘要

胰腺癌的形成受遗传学和表观遗传修饰的影响。基因突变或缺失(遗传学)参与肿瘤的形成, DNA甲基化、组蛋白修饰和RNA干扰等(表观遗传修饰)调节基因表达。随着基因组筛选技术的发展, 胰液中DNA甲基化定量检测是诊断胰腺癌的潜在工具, 以DNA甲基化和组蛋白乙酰化为基础的表观遗传学是胰腺癌治疗领域中的新靶点。本文对胰腺癌发生发展过程中出现的表遗传修饰异常, 以及其生物学和临床意义前景作一介绍。

关键词: 胰腺癌; 表观遗传修饰; DNA甲基化; 组蛋白修饰

王霞, 王晖, 张啸. 胰腺癌中表观遗传修饰研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1141-1146

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1141.asp>

0 引言

胰腺癌恶性程度较高、不易早期发现, 且预后较差, 其发病分子机制尚不是十分清楚。在過去几十年的研究中, 认为基因突变或缺失对肿瘤的形成非常重要, 发现了许多癌基因和抑制基因, 然而基因治疗并未取得满意效果, 攻克癌症还任重道远^[1]。自Waddington提出“表观遗传学(epigenetics)”, 人们逐渐认识到生长发育、肿瘤形成过程涉及各种基因如何适应内外环境的变化, 从而实现在时间和空间上表达的调控^[2]。随着DNA甲基化检测技术的发展, 以表观遗传修饰为靶点药物的研发为胰腺癌的诊断和治疗带来了新的思路。本文对胰腺癌表观遗传修饰的特点及其生物学和临床意义作一介绍。

1 表观遗传修饰特点

基因表达的调控通常有两种形式: 其一, 是传统意义上遗传信息, 即DNA序列所提供的遗传信息(如基因突变和缺失); 其二, 是表观遗传水平修饰(epigenetic modification), 影响基因转录活性而不涉及DNA序列的改变, 他提供何时、何地、以何种方式去应用遗传信息的指令。对肿

■背景资料

胰腺癌是临床上常见的消化系统肿瘤之一, 其发生发展是个多因素、多阶段和多基因改变的过程, 随着人类基因组计划的完成, 表观遗传修饰逐渐成为探索人类肿瘤发生发展的热点。DNA甲基化和组蛋白修饰异常与胰腺癌的临床病理特征和预后相关。

■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

■ 研发前沿

DNA甲基化异常,是当前胰腺癌表观遗传研究中的热点,而参与胰腺癌发生发展过程中癌基因或抑癌基因甲基化状态变化复杂多样,这就为随后的验证工作设置了较大障碍,如何在大量的候选标志物中找到真正有效的诊断标志物,还需研究者们进一步深入探究.

表 1 胰腺癌常见基因甲基化异常高表达及其染色体位点和功能

基因名称	基因位点	功能(明确或待定)	甲基化率(
			胰腺癌细胞系中	胰腺癌组织或种植后
TFPI-2	7q22	丝氨酸蛋白酶抑制因子	82	73
SPARC	5q31.3-q32	细胞基质相互作用, 细胞生长抑制因子	94	88
BNIP3	10q26.3	低氧诱导细胞死亡	90	80
TSLC1/IGSF4	11q23.2	细胞间/细胞基质间相互作用	24	27
CDKN1A/p16	9p21	细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子	33	14
CDKN1C/p57KIP2	11p15.5	细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子	78	未测
ppENK	8q23-q24	阿片样生长因子	100	91
SOCS-1	16p13.13	JAK/STAT通路抑制因子	32	22
WWOX	16q23.3-q24.1	甾体类固醇代谢物, 细胞凋亡因子	22	13
DUSP6	12q21-q22	MAPK负调控因子	13	42
Reprimo	2q23.3	p53诱导的G2/M 细胞周期抑制因子	91	80
HHIP	4q28-q32	Hedgehog通路负调控因子	50	47
MLH1	3p21.3	DNA错配修复因子	0	6
RARB	3p24	细胞生长调控因子	56	11
Cyclin D2	12p13	细胞周期调控因子	86	65
FOXE1	9q22	甲状腺激素转录因子	64	75
NPTX2	7q21.3-q22.1	神经因子转运蛋白	95	100

瘤形成过程中基因表达调控来说,有时后者更为重要.表观遗传修饰的分子机制主要有: DNA甲基化的修饰,组蛋白的修饰和染色质重塑,非编码RNA的调控(如RNA干扰和微小RNA)等^[3,4].

2 胰腺癌中DNA甲基化修饰异常及其机制

胰腺癌中基因组整体甲基化水平降低,导致遗传不稳定性增加;组织特异性基因的启动子区域出现从头甲基化,抑癌基因过度甲基化而失活,癌基因多为甲基化不足或去甲基化,导致重新开放或异常表达,细胞发生转化并向恶变发展.

2.1 DNA高甲基化与胰腺癌 高甲基化介导的基因失活是胰腺癌发生发展中的普遍现象,如APC, TSLC1/IGSF4, SOCS-1, cyclin D2, RASSF1A, WWOX, RUNX3, CDH13, DUSP6和HHIP(Hedgehog interacting protein)的异常与胰腺癌的关系已得到广泛认可^[5-7].胰腺癌中发生突变的p16^{INK4a}中未检出甲基化,而保持野生型序列的p16^{INK4a}其启动子CpG岛则被甲基化,基因突变和启动子甲基化均可使p16^{INK4a}失活,但两者不会同时存在^[8].pp ENK和p16^{INK4a}高甲基化的发生率在胰腺癌前病变-胰上皮内瘤和胰腺癌病变过程中逐渐增加,一般认为pp ENK和p16^{INK4a}甲基化是胰腺癌发生发展过程中的中晚期事件,抑癌基因高甲基化可促进胰腺癌发展^[9,10].采用高通流量寡核苷酸微阵列技术研究胰腺癌的甲基化位点,发现4种胰腺癌细胞系中有475个候选基因可由

DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)抑制剂5-aza-dC诱导再表达,有11个基因存在高甲基化,如UCHL1/PGP9.5、Reprimo在80%的胰腺癌中呈高甲基化^[6,11].甲基化差异分析研究胰腺癌发现27个CpG岛存在甲基化异常,其中13个基因高甲基化失活,SPARC和TFPI-2在正常的胰腺上皮细胞中表达,在多数胰腺癌细胞系中不表达. DNA高甲基化与胰腺癌的肿瘤生长、侵袭、转移和化疗药物耐药性有关,SPARC基因表达有助于增加胰腺癌对化疗和放疗的敏感性^[12],WWOX是一抑癌基因,转染WWOX可抑制胰腺癌细胞凋亡和集落形成^[13],TFPI-2是新近发现的组织因子通路抑制2,维持细胞外基质完整性,抑制胰腺癌细胞增殖、转移和侵袭力^[2,14].BNIP3是低氧诱导的凋亡前基因,BNIP3的丢失可增加细胞对低氧诱导凋亡和化疗药物吉西他滨的耐受性^[15,16].目前通过基因筛查胰腺癌DNA甲基化状态,其中常见基因甲基化异常高表达及其染色体位点和功能见表1.

2.2 DNA低甲基化与胰腺癌 DNA低甲基化包括全基因的低甲基化和局部位点低甲基化,这与叶酸代谢异常有关,参与甲基化形成的维生素B12和叶酸的缺乏可增加胰腺癌等肿瘤的发病风险^[17].研究表明亚甲基四氢叶酸还原酶的缺乏可导致DNA低甲基化和染色体的丢失,进一步证实了全基因的低甲基化可增加基因的不稳定性^[18].胰腺癌甲基化筛查表明有7个基因clau-

表 2 胰腺癌常见基因甲基化异常低表达及其染色体位点和功能

基因名称	基因位点	功能(明确或待定)	甲基化率	
			胰腺癌细胞系中	胰腺癌组织或种植后
14-3-3sigma/stratifin	1p36.11	p53诱导的G ₂ /M细胞周期抑制因子	85	97
Maspin/SERPINB5	18q21.3	调节细胞有丝分裂和细胞死亡	87	94
S100P	4p16	细胞周期和细胞分化	57	88
trefoil factor 2	21q22.3	分泌性多肽, 上皮细胞修复	65	84
Claudin 4	7q11.23	细胞黏附和侵袭	85	89
Mesothelin	16p13.3	细胞表面抗原和细胞黏附	40	92
PSCA	8q24.2	细胞表面抗原和细胞分化	30	54
S100A4	1q21	有丝分裂、侵袭和微管蛋白聚合作用	50	76
Lipocalin2	9q34	上皮细胞分化	80	92

din4, lipocalin2, 14-3-3sigma/stratifin, trefoil factor2, S100A4, mesothelin和前列腺干细胞抗原在胰腺癌上皮细胞内高表达, 而在正常胰腺细胞内不表达, 高通量DNA芯片分析S100P和maspin也呈低甲基化状态^[19,20], S100A4基因在胰腺癌中过度表达, 这与第1内含子特定CpG位点低甲基化有关^[16]. 常见基因甲基化异常低表达及其染色体位点和功能见表2.

2.3 DNA甲基化异常的分子机制 DNA甲基化是在Dnmt的作用下, 以S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体, 将甲基基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤(CpG)的二核苷酸的胞嘧啶中5位碳原子上. Dnmt1主要起维持甲基化作用, Dnmt3a和Dnmt3b则以从头甲基化为主. 生理情况下, CpG岛多为非甲基化, 大部分散在的CpG二核苷酸则为甲基化状态. DNA甲基化也可能是基因序列改变、转录因子的丢失或启动子转录活性改变之后的继发事件, 阻断肿瘤细胞系中DNA甲基化酶基因, 发现组蛋白修饰(组蛋白H3-9甲基化)可导致p16基因静默^[21]. 最近一项研究采用RNA干扰阻断雌激素受体表达, 可导致雌激素下游基因的失活, 主要机制是通过招募多梳抑制子和组蛋白去乙酰化酶结合在启动子上, 导致启动子CpG岛甲基化聚集, RNA干扰是小片段双链RNA(20-30 bp)分子阻断或降低同源基因表达的现象, 可诱导靶向基因DNA甲基化^[22]. 微小RNA在基因转录后调控中作用可能与DNA甲基化和组蛋白乙酰化密切相关^[3,23].

3 胰腺癌组蛋白修饰及染色质重塑

组蛋白修饰、多梳单位和异染色质蛋白1可引起核小体结构发生变化, 导致染色质重塑, 影响各类转录因子与DNA的结合, 从而影响基因的

转录.

3.1 组蛋白修饰 在真核细胞中, DNA以染色质的形式存在. 核小体是染色质的基本组成单位, 其核心主要由4种组蛋白(H2A, H2B, H3和H4)构成. 组蛋白尾部可受多种共价修饰, 包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化及ADP核糖基化. 其中组蛋白赖氨酸甲基化与基因转录调节、基因组整合密切相关. 组蛋白赖氨酸甲基化依据其甲基化位点的不同呈现不同的生物学效应^[35]. 一般认为, H3K9(组蛋白H3第9位赖氨酸残基)和H3K27甲基化与基因转录抑制相关. 组蛋白修饰(乙酰化、磷酸化等)是可逆的动态过程, 组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferases, HATs)将乙酰辅酶A的乙酰基部分转移到核心组蛋白氨基末端上特定Lys残基的ε-氨基基团. 组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs), 则移去组蛋白Lys残基上的乙酰基, 抑制转录. HATs(例如p300/CBP、pCAF、ACTR等)或HDACs可与一些癌基因和抑癌基因产物相互作用, 从而修饰或介导这些产物与细胞分化和细胞增殖有关的基因. 组蛋白磷酸化主要影响信号传导通路相关激酶的活性, c-fos基因的活化与H3的磷酸化有关^[24]. EGF受体抑制剂和MAPK抑制剂联合可有效抑制胰腺癌细胞生长, MEK抑制剂可增加胰腺癌细胞对化疗药物的敏感性^[25]. 胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤和正常胰腺导管上皮对比研究发现, CDKN1C/p57KIP2在肿瘤组织内低表达与CDKN1C启动子高甲基化和组蛋白乙酰化有关, LIT1基因低甲基化时CDKN1C等位基因的缺失也可导致CDKN1C低表达^[24].

3.2 多梳 多梳(Polycomb)是指兆道尔顿的大分子复合物, 维持胚胎干细胞生物学和个体器官生长发育, 一些基因在胚胎发育期静默可持续到

■相关报道

Mastubayashi等发现慢性胰腺炎患者胰液中基因甲基化发生率低于胰腺癌患者, 采用DNA甲基化异常标志物代替基因突变是今后筛查胰腺癌的研究方向, 具有重要的诊断价值.

■创新盘点

本文对胰腺癌发生发展过程中出现的表遗传修饰异常作一综述,重点介绍DNA甲基化、组蛋白修饰和RNA干扰等调节基因表达,胰液中DNA甲基化定量检测是诊断胰腺癌的潜在工具,以DNA甲基化和组蛋白乙酰化为基础的表观遗传学是胰腺癌诊治领域中的新靶点。

整个生命过程,具有持久静默作用。这种现象称为转录后记忆,多梳导入早期胰腺癌细胞,可降低对化疗药物的耐药性,静默癌基因的表达^[26]。异染色质(heterochromatin)是指细胞在整个细胞周期内都处于凝聚状态的染色质,如着丝粒、端粒等,异染色质没有转录活性。异染色质蛋白1(HP1)是组成异染色质的重要的结构蛋白,最初从果蝇多线染色体异染色质中被分离出,包含chromo结构域与chromo阴影结构域两个高度保守的结构区域。HP1与花斑位置效应现象有关,可引起稳定的转录沉默,在基因调控、保护端粒、组装染色质上具有重要作用。HP1也需要与HDACs共同作用使组蛋白去乙酰化,HP1的染色区可特异性地与甲基化的H3K9相互作用,在基因调控中发挥重要作用^[27]。

4 表观遗传修饰异常标志物对胰腺癌的诊断价值

微阵列技术先后应用于乳腺癌、肺癌和胰腺癌等肿瘤CpG岛甲基化研究,获得的CpG岛甲基化谱不仅可作为早期诊断指标,还与肿瘤的病理分型、药物治疗敏感性和预后判断相关,也是胰腺癌家族史的高危人群的筛查标志物。微阵列检测胰液中NPTX2, SARP2和CLDN5基因甲基化异常发生频率,发现75%(18/24)的胰腺癌患者存在DNA甲基化异常,而良性对照组均无甲基化异常,62%(26/42)存在p16高甲基化,良性胆道疾病组为13%(3/24),胰腺炎组为8%(2/26)^[19]。定量PCR检测胰液中6个候选基因(cyclin D2、FOXE1、NPTX2、ppENK、p16和TFPI2)的甲基化,11例胰腺癌患者中有9例胰液中至少2个基因甲基化>1%,而64例非肿瘤患者的基因甲基化<1%(敏感性82%,特异性100%; $P<0.0001$),慢性胰腺炎患者胰液中基因甲基化发生率低于胰腺癌患者^[28]。正常十二指肠液中也存在部分基因高甲基化,采用基因甲基化检测来诊断胰腺癌,必须通过选择性胰管插管收集纯胰液^[29],目前仍需进一步的大样本研究以明确最佳甲基化标志物以指导临床对胰腺癌早期诊断、癌变风险评估、最佳检测方法(经济-效益比)及其敏感性和特异性。

甲基化CpG岛扩增技术联合差异性分析方法分离出一系列甲基化的异常CpG岛,其中>90%的胰腺癌患者存在pp ENK基因高甲基化^[30],胰腺癌存在特异性基因高甲基化表达,14%胰腺癌存在CpG岛甲基化表型(CIMP),老年胰腺癌患者甲基化CpG岛片段长且多^[29]。然而CIMP与胰腺

癌的病理类型、临床分期和生物学关系尚有待进一步研究。

有学者研究采用分析胰腺癌血浆中异常的分子标志物,如突变型K-RAS,然而此基因一般在胰腺癌中晚期才能检查出,血液循环中肿瘤源性DNA异常的浓度非常低($<0.2^{[31]}$),由于突变存在基因存在个体差异,因此,如采用DNA甲基化异常标志物代替基因突变是今后筛查胰腺癌的研究方向。

5 表观遗传修饰与胰腺癌治疗

主要从两个方面进行治疗:抑制DNA甲基化和抑制组蛋白的脱乙酰基。特异性地抑制Dnmt活性,如竞争性底物(发夹式半甲基化寡核苷酸)、核苷类似物(5-aza、5-aza-dC)、小分子抑制物(SAH)、反义寡核苷酸等。5-aza-dC可抑制胰腺癌细胞株生长,该效应与干扰素相关性基因的活化有关,并可增加TNF、顺铂和吉西他滨的化疗敏感性^[32],同时可诱导多种雄激素抗原,如G抗原(GAGE),这对免疫调节的药物的研发具有可利用价值。但有研究发现Dnmt抑制剂治疗可导致癌基因表达上调,增强肿瘤细胞的侵袭力,具有毒性作用和致突变性^[11]。最近,一种化学稳定性好、可口服的胞苷类似物Zebularine,可抑制DNA甲基化,具有细胞低毒性特点。Zebularine可全部消除Dnmt1的效应,部分消除Dnmt3a和Dnmt3b的作用,有效持久地抑制胰腺导管细胞癌Cf-Pac-1中p16的表达^[21,33]。

除此之外,一些HDAC抑制剂(TSA和FR901228)已被证实具有抑制肿瘤生长和诱导细胞凋亡的作用。丁酸盐、TSA、SAHA、MS-275、CI-994等多种HDAC抑制剂已进入I期和II期临床试验。MUC2基因5'端转录结合位点富含甲基化的H3K9、乙酰化的H3K9和H3K27, MUC4受DNMT、HDAC的调控,用HDACs抑制剂对胰腺癌等进行治疗,疗效良好,不良反应较少^[34]。HDACs抑制剂和其他抗肿瘤药物的联合使用具有广阔的前景,如联合应用Dnmt抑制剂和HDACs抑制剂可以重新激活抑癌基因,促进肿瘤细胞凋亡, TSA和5-aza-dC联用可减少5-aza-dC的不良反应,并达到协同增效作用^[21]。

6 结论

随着人类表观基因组计划(human epigenome project, HEP)的实施,2003年人类表观基因组协会(human epigenome consortium, HEC)宣布开始

投资和实施人类表观基因组计划(HEP), 其主要任务是大规模检测人类基因组中的甲基化位点, 绘制人类基因组中甲基化可变位点(methylation variable positions, MVP)图谱^[36], 从此胰腺癌表观遗传学的研究进入了新的里程, 胰腺癌DNA甲基化和乙酰化的研究为探索胰腺癌发生发展的分子机制, 早期诊断及治疗靶点提供了新思路。尽管取得了可喜的成绩, 有关DNA甲基化筛选的技术方法和临床实用性仍需大样本的研究, 以进一步明确与胰腺癌的病理类型、临床分期和生物学关系, 为DNA甲基化和HDAC抑制剂应用到临床治疗胰腺癌提供理论基础。

7 参考文献

- 1 Lomberg G, Mathison AJ, Grzenda A, Urrutia R. The sunset of somatic genetics and the dawn of epigenetics: a new frontier in pancreatic cancer research. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 597-602
- 2 Brune K, Hong SM, Li A, Yachida S, Abe T, Griffith M, Yang D, Omura N, Eshleman J, Canto M, Schulick R, Klein AP, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Goggins M. Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3536-3542
- 3 Lee KH, Lotterman C, Karikari C, Omura N, Feldmann G, Habbe N, Goggins MG, Mendell JT, Maitra A. Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatol* 2009; 9: 293-301
- 4 Omura N, Goggins M. Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 310-326
- 5 Chan AO, Rashid A. CpG island methylation in precursors of gastrointestinal malignancies. *Curr Mol Med* 2006; 6: 401-408
- 6 Sato N, Fukushima N, Hruban RH, Goggins M. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 2008; 21: 238-244
- 7 Martin ST, Sato N, Dhara S, Chang R, Hustinx SR, Abe T, Maitra A, Goggins M. Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 728-733
- 8 Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 1573-1581
- 9 Rosty C, Geradts J, Sato N, Wilentz RE, Roberts H, Sohn T, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. p16 Inactivation in pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) arising in patients with chronic pancreatitis. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1495-1501
- 10 Kumari A, Srinivasan R, Vasishta RK, Wig JD. Positive regulation of human telomerase reverse transcriptase gene expression and telomerase activity by DNA methylation in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1051-1059
- 11 Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, Iacobuzio-Donahue CA, Yeo CJ, Goggins M. Aberrant methylation of Reprimo correlates with genetic instability and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer* 2006; 107: 251-257
- 12 Manton TS, Schendel RR, Rödel F, Niedobitek G, Al-Assar O, Masamune A, Brunner TB. Stromal SPARC expression and patient survival after chemoradiation for non-resectable pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008 Nov 24 [Epub ahead of print]
- 13 Nakayama S, Semba S, Maeda N, Matsushita M, Kuroda Y, Yokozaki H. Hypermethylation-mediated reduction of WWOX expression in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Br J Cancer* 2009; 100: 1438-1443
- 14 Sato N, Parker AR, Fukushima N, Miyagi Y, Iacobuzio-Donahue CA, Eshleman JR, Goggins M. Epigenetic inactivation of TFPI-2 as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2005; 24: 850-858
- 15 Erkan M, Kleeff J, Esposito I, Giese T, Ketterer K, Büchler MW, Giese NA, Friess H. Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene* 2005; 24: 4421-4432
- 16 Mahon PC, Baril P, Bhakta V, Chelala C, Caulee K, Harada T, Lemoine NR. S100A4 contributes to the suppression of BNIP3 expression, chemoresistance, and inhibition of apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 6786-6795
- 17 Schernhammer E, Wolpin B, Rifai N, Cochrane B, Manson JA, Ma J, Giovannucci E, Thomson C, Stampfer MJ, Fuchs C. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, and homocysteine and pancreatic cancer risk in four large cohorts. *Cancer Res* 2007; 67: 5553-5560
- 18 Cavallari I, Silic-Benussi M, Rende F, Martinez A, Fogar P, Basso D, Vella MD, Pedrazzoli S, Herman JG, Chieco-Bianchi L, Esposito G, Ciminale V, D'Agostino DM. Decreased expression and promoter methylation of the menin tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 383-396
- 19 Streit S, Michalski CW, Erkan M, Friess H, Kleeff J. Confirmation of DNA microarray-derived differentially expressed genes in pancreatic cancer using quantitative RT-PCR. *Pancreatol* 2009; 9: 577-582
- 20 Kuroki T, Tajima Y, Kanematsu T. Role of hypermethylation on carcinogenesis in the pancreas. *Surg Today* 2004; 34: 981-986
- 21 Yoo CB, Valente R, Congiatu C, Gavazza F, Angel A, Siddiqui MA, Jones PA, McGuigan C, Marquez VE. Activation of p16 gene silenced by DNA methylation in cancer cells by phosphoramidate derivatives of 2'-deoxyzebrularine. *J Med Chem* 2008; 51: 7593-7601
- 22 Yasuda K, Yashiro M, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. ERas oncogene expression and epigenetic regulation by histone acetylation in human cancer cells. *Anticancer Res* 2007; 27: 4071-4075
- 23 Mees ST, Mardin WA, Sielker S, Willscher E, Senninger N, Schleicher C, Colombo-Benkmann M, Haier J. Involvement of CD40 targeting miR-224 and miR-486 on the progression of pancreatic

■应用要点

胰液及胰腺组织存在表观遗传修饰差异, 以DNA甲基化和组蛋白乙酰化为基础的表观遗传学为早期筛选和诊断胰腺癌提供了应用前景, 同时开辟了胰腺癌治疗的新途径与新思路。

■同行评价

本文对DNA甲基化异常与胰腺癌的关系及分子机制, 表观遗传修饰与胰腺癌的诊断及治疗价值作一介绍, 具有一定临床意义。

- 24 Espino PS, Pritchard S, Heng HH, Davie JR. Genomic instability and histone H3 phosphorylation induction by the Ras-mitogen activated protein kinase pathway in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 2009; 124: 562-567
- 25 Takayama Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y, Senga T, Hamaguchi M. MEK inhibitor enhances the inhibitory effect of imatinib on pancreatic cancer cell growth. *Cancer Lett* 2008; 264: 241-249
- 26 Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol* 2009; 568: 161-173
- 27 Wu LP, Wang X, Li L, Zhao Y, Lu S, Yu Y, Zhou W, Liu X, Yang J, Zheng Z, Zhang H, Feng J, Yang Y, Wang H, Zhu WG. Histone deacetylase inhibitor depsipeptide activates silenced genes through decreasing both CpG and H3K9 methylation on the promoter. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 3219-3235
- 28 Matsubayashi H, Canto M, Sato N, Klein A, Abe T, Yamashita K, Yeo CJ, Kalloo A, Hruban R, Goggins M. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer Res* 2006; 66: 1208-1217
- 29 Matsubayashi H, Sato N, Brune K, Blackford AL, Hruban RH, Canto M, Yeo CJ, Goggins M. Age- and disease-related methylation of multiple genes in nonneoplastic duodenum and in duodenal juice. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 573-583
- 30 Ueki T, Walter KM, Skinner H, Jaffee E, Hruban RH, Goggins M. Aberrant CpG island methylation in cancer cell lines arises in the primary cancers from which they were derived. *Oncogene* 2002; 21: 2114-2117
- 31 Sawabu N, Watanabe H, Yamaguchi Y, Ohtsubo K, Motoo Y. Serum tumor markers and molecular biological diagnosis in pancreatic cancer. *Pancreas* 2004; 28: 263-267
- 32 Missiaglia E, Donadelli M, Palmieri M, Crnogorac-Jurcevic T, Scarpa A, Lemoine NR. Growth delay of human pancreatic cancer cells by methylase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine treatment is associated with activation of the interferon signalling pathway. *Oncogene* 2005; 24: 199-211
- 33 Neureiter D, Zopf S, Leu T, Dietze O, Hauser-Kronberger C, Hahn EG, Herold C, Ocker M. Apoptosis, proliferation and differentiation patterns are influenced by Zebularine and SAHA in pancreatic cancer models. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 103-116
- 34 Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Hamada T, Goto M, Higashi M, Nomoto M, Yonezawa S. MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2708-2716
- 35 房静远. 表观遗传修饰与肿瘤. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 46-76
- 36 Wu Ct, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 2001; 293: 1103-1105

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive>(WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)

Pin1抑制剂Juglone对食管癌EC1细胞增殖的抑制作用

李玲, 陈平, 连鸿凯, 赵纪敏, 马俊芬, 董子明

李玲, 陈平, 赵纪敏, 马俊芬, 董子明, 郑州大学基础医学院
病理生理教研室 河南省郑州市 450001

连鸿凯, 郑州市骨科医院 河南省郑州市 450001

作者贡献分布: 李玲与陈平对此文所作贡献均等; 此课题由李玲、陈平及董子明设计; 研究过程由李玲、陈平、连鸿凯、赵纪敏及马俊芬操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由董子明提供; 数据分析由李玲与陈平完成; 本论文写作由李玲与陈平完成。

通讯作者: 董子明, 教授, 450001, 河南省郑州市, 郑州大学基础医学院病理生理教研室. dongzm@zzu.edu.cn

电话: 0371-67781956

收稿日期: 2010-02-04 修回日期: 2010-03-29

接受日期: 2010-04-06 在线出版日期: 2010-04-18

Juglone inhibits the proliferation of human esophageal carcinoma EC1 cells

Ling Li, Ping Chen, Hong-Kai Lian, Ji-Min Zhao,
Jun-Fen Ma, Zi-Ming Dong

Ling Li, Ping Chen, Ji-Min Zhao, Jun-Fen Ma, Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, Basic Medical College, University of Zhengzhou, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Hong-Kai Lian, Orthopedic Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, Basic Medical College, University of Zhengzhou, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. dongzm@zzu.edu.cn

Received: 2010-02-04 Revised: 2010-03-29

Accepted: 2010-04-06 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To investigate whether juglone, an inhibitor of Pin1, inhibits the proliferation of human esophageal carcinoma cells (EC1) *in vitro*.

METHODS: Cultured EC1 cells were incubated with different concentrations of juglone for different durations. The proliferation of EC1 cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The cell cycle distribution and cell apoptosis were measured by flow cytometry (FCM).

RESULTS: MTT results showed that juglone treatment decreased the proliferation of EC1 cells in a dose- and time-dependent manner. FCM assay indicated that, after treatment of EC1 cells with juglone at doses of 10, 20 and 30

$\mu\text{mol/L}$, the cell cycle was arrested at G_2 phase, and the apoptosis rates increased significantly compared to control cells (9.06%, 32.88% and 53.18% vs 8.77%, respectively; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Juglone significantly inhibits the proliferation and induces the apoptosis of EC1s *in vitro*.

Key Words: Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase; Juglone; Cell apoptosis; Cell cycle

Li L, Chen P, Lian HK, Zhao JM, Ma JF, Dong ZM. Juglone inhibits the proliferation of esophageal carcinoma EC1 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1147-1151

摘要

目的: 测定Pin1抑制剂(Juglone)对食管癌细胞EC1生长增殖的影响, 探讨Juglone的抗肿瘤作用。

方法: 体外培养人食管癌细胞系EC1, 用MTT试验观察细胞生长增殖状况, 流式细胞仪检测细胞周期以及细胞凋亡。

结果: MTT试验表明, Juglone对EC1细胞生长有明显的抑制作用, 且抑制作用随作用浓度和作用时间增加而增强。流式细胞仪检测表明, 加入Juglone培养48 h后, EC1细胞出现 G_2 期阻滞。Juglone药物(10、20、30 $\mu\text{mol/L}$)培养48 h后, EC1细胞的凋亡率明显增加, 与对照组相比有统计学意义(9.06%, 32.88%, 53.18% vs 8.77%, 均 $P < 0.05$)。

结论: Pin1抑制剂Juglone可以通过抑制Pin1表达从而抑制食管癌细胞的增殖, Pin1抑制剂有望成为新型的抗肿瘤治疗靶点。

关键词: 肽酰脯氨酰顺反异构酶; Juglone; 细胞凋亡; 细胞周期

李玲, 陈平, 连鸿凯, 赵纪敏, 马俊芬, 董子明. Pin1抑制剂Juglone对食管癌EC1细胞增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1147-1151
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1147.asp>

■背景资料

肽酰-脯氨酰顺反异构酶(Pin1)作为一种在磷酸化蛋白水平特异调节的变构酶, 在肿瘤发生中起重要作用。本文通过阻抑Pin1的功能观察其在食管癌发生中的作用。

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■相关报道

Atchison等 于2003年发表研究,指出Pin1敲除小鼠不仅可以正常发育,而且对转基因引起的致癌性有很高的抵制能力,提示Pin1抑制剂可能具有小的非特异性毒性.这为Pin1抑制在临床上的应用提供了理论基础.

0 引言

肽酰-脯氨酰顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis/trans isomerase, Pin1)作为一种在磷酸化蛋白水平特异调节的变构酶,在许多肿瘤组织中过表达^[1-3],通过多条途径促进细胞的异常增殖和肿瘤的发生^[4-6]. 阻抑Pin1的功能或减少其表达将能有效地抑制这些致癌途径^[7,8]. 天然产物胡桃醌(Juglone)是通过高通量筛选发现的第一个Pin1小分子抑制剂^[9]. 1968年Bhargava和Westfall发现胡桃作为药物在白化病小鼠模型上可以抑制乳腺癌的生长^[10]. 随后, Sugie等于1998年发现了Juglone可以在F344小鼠上减少肠道肿瘤的形成^[7]. 本研究通过体外实验,研究Juglone对食管癌EC1细胞生长的影响,证实Pin1在EC1细胞生长增殖中的作用并为Juglone的抗肿瘤机制提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌细胞系EC1保存于本研究室,1640培养液和新生牛血清为Gibco公司产品, Juglone购于Calbiochem公司, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)和碘化丙啶(PI)购自Sigma公司, Annexin V-FITC凋亡测定试剂盒购于郑州宝赛生物制品公司.

1.2 方法

1.2.1 药物配制: 将Juglone配制成终浓度为2 mmol/L的Juglone工作液, 常温避光下保存.

1.2.2 细胞培养及实验分组 人食管癌细胞株: EC1在含100 mL/L胎牛血清的1640培养液中, 于37 °C、50 mL/L CO₂饱和湿度培养. 实验分为3组: Juglone组、试剂对照组、空白对照组. 在Juglone组中, 设置不同的浓度组(10、20、30 μmol/L), 每个浓度设3个平行组.

1.2.3 MTT法检测细胞增殖: 取对数生长期食管癌细胞, 接种到96孔培养板上, 分组同上. 细胞贴壁后, 加药继续培养, 分别于12、24 h加入MTT(5 g/L)20 μL, 37 °C温育4 h后吸去培养液, 加DMSO 200 μL, 振荡10 min, 使结晶完全溶解, 在酶标仪上于570 nm波长测吸光度(A)值, 空白对照调零. 并按照下面公式计算不同浓度Juglone对EC1细胞增殖活力的抑制: 细胞抑制率(%) = (阴性对照组A值-实验组A值/阴性对照组A值) × 100%.

1.2.4 细胞形态学观察: EC1细胞在用30 μmol/L Juglone培养48 h后, 在相差显微镜下观察细胞形态学的变化.

1.2.5 流式细胞仪(FCM)测定细胞周期: 取对数生长期食管癌细胞, 接种到6孔培养板上, 待细胞贴壁后, 用血清饥饿法使细胞同步化, 再换成含100 mL/L灭活胎牛血清培养液, 并加入不同浓度的Juglone, 48 h后收集细胞. 用PBS清洗2次, 重悬浮于700 mL/L乙醇4 °C固定过夜, 加入RNA酶(终浓度为100 mg/L), 在37 °C反应0.5 h. 避光加入PI(浓度为100 mg/L)标记溶液染色20-30 min后, 采用FACSort流式细胞仪(美国BD公司产品)进行检测分析.

1.2.6 流式细胞仪(FCM)测定细胞凋亡: 取对数生长期食管癌细胞, 接种到6孔培养板上, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的Juglone, 48 h后收集细胞. 按照试剂盒说明书处理细胞. 具体操作如下: 用PBS清洗2次, 尽量去除PBS残留. 重悬细胞于200 μL Binding Buffer中, 加入10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI, 轻轻混匀, 4 °C反应30 min. 实验设置相应的对照组. 之后加入300 μL Binding Buffer, 采用FACSort流式细胞仪(美国BD公司产品)进行检测分析.

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件进行数据分析. 多组间的数据比较采用方差分析, 两两比较采用 q 检验.

2 结果

2.1 不同浓度的Juglone对食管癌EC1细胞增殖的影响 EC1细胞经不同浓度的Juglone处理24 h和48 h后, MTT法检测细胞增殖的变化, 结果见表1. 比较不同浓度的用药组, 结果发现Juglone组在加药培养后, 都能不同程度地抑制食管癌细胞的增殖, 对其生长产生明显的抑制作用. 特别是当Juglone浓度达到30 μmol/L时, 24 h和48 h对细胞的抑制率达到了47.4%和55.9%. 与空白对照组比较, 差异均具有统计学意义(均 $P < 0.01$).

2.2 Juglone作用后食管癌细胞的形态学变化 食管癌细胞在用Juglone(30 μmol/L)培养48 h后, 在相差显微镜下, 可观察到细胞大部分凋亡, 细胞体积缩小、细胞内出现颗粒沉着、细胞皱缩、细胞解离成彼此黏附成簇的圆形小体-凋亡小体, 部分细胞脱壁. 而空白对照组细胞未见明显细胞凋亡现象(图1).

2.3 流式细胞仪检测细胞周期的变化 食管癌细胞在用Juglone药物(10、20、30 μmol/L)培养48 h后, G₂/M期细胞比例数明显增加, 而G₀/G₁期细胞比例数却降低(图2). 由此可见, Juglone可造成食管癌细胞在G₂/M期的阻滞.

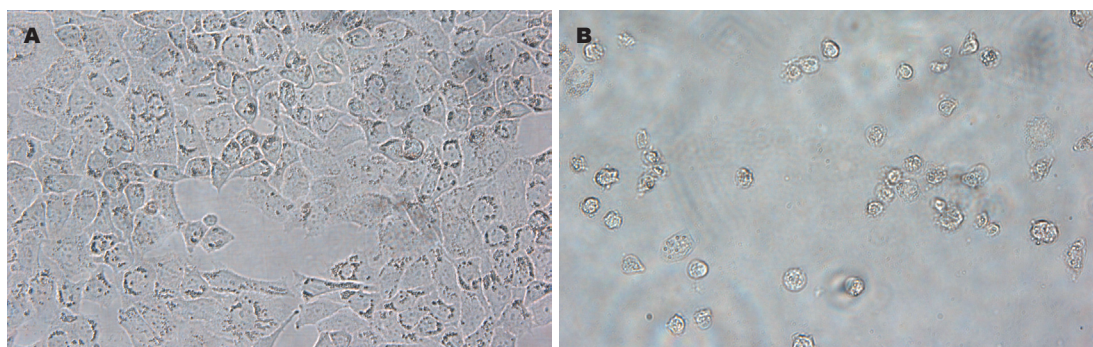


图 1 药物(30 $\mu\text{mol/L}$)培养48 h后食管癌细胞的相差显微镜观察. A: 空白对照组; B: Juglone组.

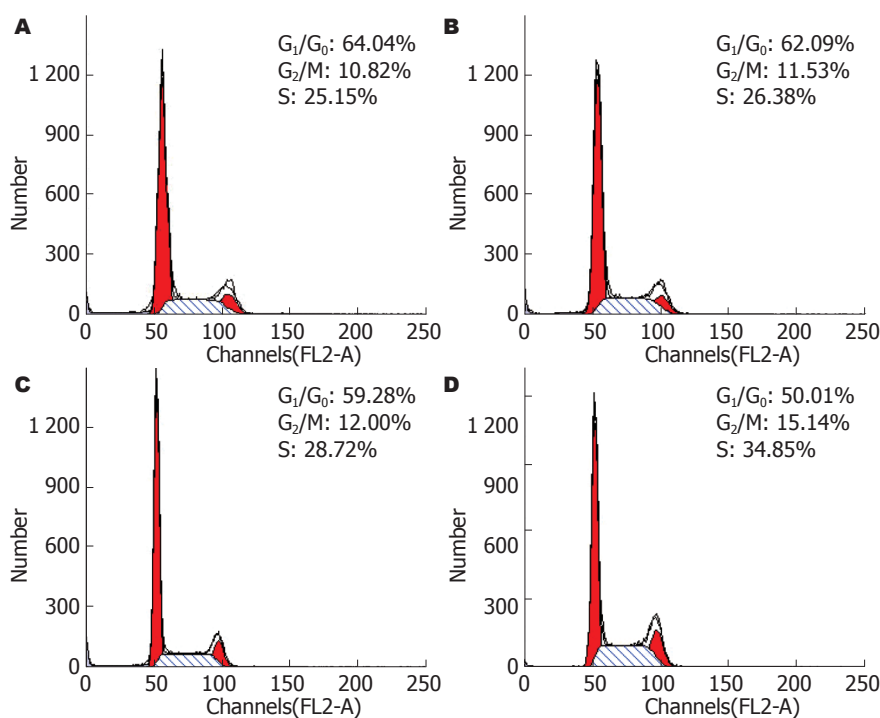


图 2 Juglone对EC1细胞周期的影响. A: 对照组; B: 10 $\mu\text{mol/L}$; C: 20 $\mu\text{mol/L}$; D: 30 $\mu\text{mol/L}$.

■创新盘点

文章中通过Juglone阻断Pin1功能的发挥,从而抑制人食管鳞状细胞的增殖并且增强细胞凋亡率,为探讨食管癌治疗中特异性信号通路阻断剂的治疗新策略提供了思路与理论依据.

表 1 不同浓度的Juglone处理EC1细胞24、48 h细胞增殖变化

分组	24 h		48 h	
	A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)
对照组	1.442 \pm 0.02	0.0	1.397 \pm 0.04	0.0
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.319 \pm 0.04	8.5	1.188 \pm 0.06	14.9
20 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.060 \pm 0.04 ^b	26.5	1.046 \pm 0.04 ^b	25.1
30 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.758 \pm 0.02 ^b	47.4	0.616 \pm 0.06 ^b	55.9

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡的变化 食管癌细胞在用Juglone药物(10、20、30 $\mu\text{mol/L}$)培养48 h后,随着药物浓度的增加,EC1细胞的凋亡率明显增加(9.06%, 32.88%, 53.18% vs 8.77%, 图3).由此可见,Juglone可增加食管癌细胞的凋亡率.

3 讨论

食管癌是最常见的恶性肿瘤之一^[11].近年来,随着外科技术水平的发展和放疗、化疗方案的日趋成熟,食管癌的综合治疗达到了一个新的水平,但令人遗憾的是其手术后5年生存率仅为25%-40%,没有显著的提高.如何寻求一种新型的抗癌靶标,提高食管癌的化疗效果,成为当前食管癌研究的一个紧迫问题.

目前的研究报道,Pin1在许多癌症中高表达,并且还可以作为一些癌症的预后指标,包括鳞状食管癌^[12],其介导的肽酰-脯氨酰异构化参与肿瘤发生的许多信号通路的调节,与食管癌关系密切的c-Jun、P53、NF- κ B、CyclinD1、 β -catenin等均为Pin1的作用底物^[5].Pin1也参与许多重要的细胞致癌事件中,比如细胞分化,血管生成以及肿瘤转移等,对Pin1的抑制可以诱导细胞凋亡.同时,一些选择性抑制Pin1的化合物

应用要点

食管癌治疗中产生的耐药问题成为提高食管癌治愈率的一个紧迫问题。本文通过研究Pin1的抑制剂Juglone对食管癌细胞增殖的影响,为寻求一种新型的抗癌靶标,提高食管癌的化疗效果,提供了理论依据。

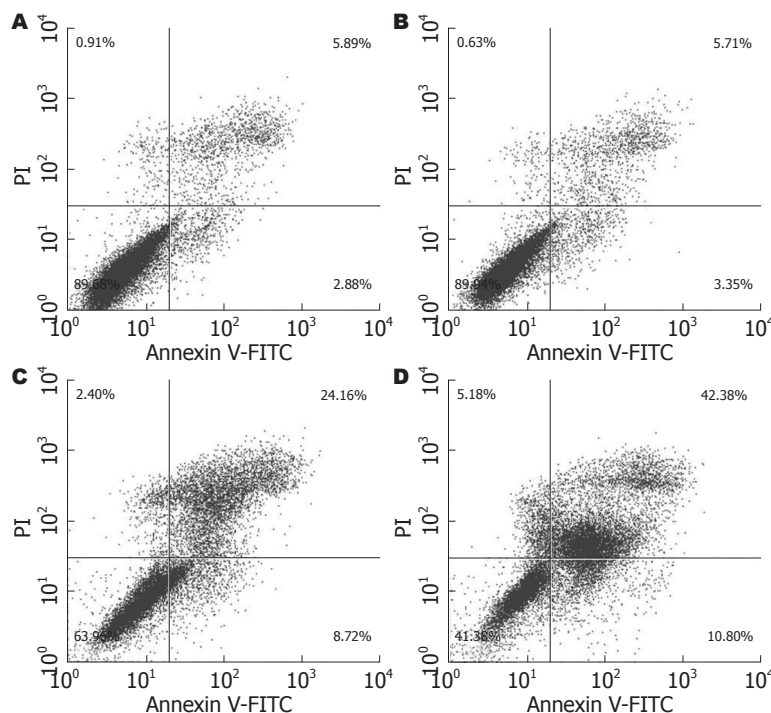


图3 Juglone对EC1细胞凋亡的影响。A: 对照组; B: 10 $\mu\text{mol/L}$; C: 20 $\mu\text{mol/L}$; D: 30 $\mu\text{mol/L}$ 。

也已经得到了鉴定^[13]。这些研究表明, Pin1介导的磷酸化后调节可以提供一种新的破坏原癌通路的机会,同时提供了一条新的抗癌治疗途径。研究报道, Pin1敲除小鼠不仅可以正常发育,而且对转基因引起的致癌性有很高的抵制能力^[14],提示Pin1抑制剂可能具有小的非特异性毒性。故本实验引入了Pin1抑制剂Juglone,在体外实验中用不同的方法研究Juglone对人食管癌细胞生长的影响,从另一角度进一步证实Pin1在细胞周期调控中的重要作用。

Juglone, 又名5-羟-1, 4-萘醌(5-Hydroxy-1, 4-naphthlenedione), 最先是从小胡桃的果皮和叶子中分离和提取出来^[9], 是肽酰-脯氨酰同分异构酶家族成员的不可逆抑制剂^[9,13]。作为Pin1的抑制剂, Juglone在实验研究中表现出对肿瘤细胞的抗癌活性^[15]。本研究显示, Pin1抑制剂Juglone组能明显抑制食管癌细胞的生长,诱导癌细胞凋亡的发生,并将食管癌细胞的细胞周期阻滞于G₂/M期。这些结果提示, Juglone具有抗肿瘤的作用,可望成为继传统化疗药物之后的又一新型化疗药物。这可能为抗肿瘤治疗提供了又一新的途径,同时也从肿瘤发病机制的角度上进一步证实了Pin1是一个与细胞周期调控高度相关的蛋白,参与食管癌的发生,在食管癌的发生发展过程中起着重要作用。

参考文献

1 Lu KP, Zhou XZ. The prolyl isomerase PIN1: a

pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 904-916

2 Yeh ES, Means AR. PIN1, the cell cycle and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 381-388

3 Takahashi K, Uchida C, Shin RW, Shimazaki K, Uchida T. Prolyl isomerase, Pin1: new findings of post-translational modifications and physiological substrates in cancer, asthma and Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 359-375

4 Wulf GM, Liou YC, Ryo A, Lee SW, Lu KP. Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J Biol Chem* 2002; 277: 47976-47979

5 Lu KP. Pinning down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 200-209

6 Matsuura I, Chiang KN, Lai CY, He D, Wang G, Ramkumar R, Uchida T, Ryo A, Lu K, Liu F. Pin1 promotes transforming growth factor-beta-induced migration and invasion. *J Biol Chem* 2010; 285: 1754-1764

7 Sugie S, Okamoto K, Rahman KM, Tanaka T, Kawai K, Yamahara J, Mori H. Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 1998; 127: 177-183

8 Paulsen MT, Ljungman M. The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induces rapid H2AX phosphorylation and cell death in human fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 209: 1-9

9 Hennig L, Christner C, Kipping M, Schelbert B, Rücknagel KP, Grabley S, Küllertz G, Fischer G. Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone. *Biochemistry* 1998; 37: 5953-5960

10 Bhargava UC, Westfall BA, Siehr DJ. Preliminary pharmacology of ellagic acid from *Juglans nigra* (black walnut). *J Pharm Sci* 1968; 57: 1728-1732

11 Metzger R, Schneider PM, Warnecke-Eberz U,

- Brabender J, Hölscher AH. Molecular biology of esophageal cancer. *Onkologie* 2004; 27: 200-206
- 12 Fukuchi M, Fukai Y, Kimura H, Sohda M, Miyazaki T, Nakajima M, Masuda N, Tsukada K, Kato H, Kuwano H. Prolyl isomerase Pin1 expression predicts prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlates with cyclinD1 expression. *Int J Oncol* 2006; 29: 329-334
- 13 张崇敬, 张志辉, 徐柏玲, 王玉玲. Pin1及其抑制剂的研
- 究进展. *药理学报* 2008; 43: 9-17
- 14 Atchison FW, Means AR. Spermatogonial depletion in adult Pin1-deficient mice. *Biol Reprod* 2003; 69: 1989-1997
- 15 Aithal BK, Kumar MR, Rao BN, Udupa N, Rao BS. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. *Cell Biol Int* 2009; 33: 1039-1049

■同行评价

本文选题合理, 具有一定先进性, 结果可靠, 讨论深入浅出, 有一定说服力。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版。具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复。

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议。编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿。

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改。作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复。为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果。

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量。对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知。稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出。

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行审核, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对。彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误。排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误。

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校。责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色。责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对。责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑。

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷。责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件。编务配合档案管理员邮寄杂志。

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原创文章、原始清样、制作文件等。

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一。为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

肝星状细胞合成气体信号分子H₂S的测定及其意义

武彦宁, 王利军, 翟云, 尚宏伟, 张立新, 丁惠国

■背景资料

H₂S、NO、CO三种气体信号分子均具有明显的舒张血管作用,三者之间相互作用,调节机体重要的生物学功能。H₂S、NO、CO气体信号分子可能通过影响肝内阻力及门脉压力,在肝硬化门脉高压症的病理生理机制具有重要作用。

武彦宁, 翟云, 丁惠国, 首都医科大学附属北京佑安医院 北京市 100069

王利军, 北京市平谷区人民医院 北京市 101200

尚宏伟, 张立新, 首都医科大学基础医学院 北京市 100069

国家自然科学基金资助项目, No. 30872225

北京市自然科学基金资助项目, No. 7062032

作者贡献分布: 武彦宁与王利军对此文所作贡献均等; 实验由王利军、尚宏伟、张立新及翟云完成; 数据分析由武彦宁与王利军完成; 论文写作由丁惠国与武彦宁完成; 课题设计及全文由丁惠国负责。

通讯作者: 丁惠国, 主任医师, 教授, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院. dinghuiguo@medmail.com.cn
电话: 010-83997155 传真: 010-63295525

收稿日期: 2010-01-08 修回日期: 2010-03-18

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

Endogenous production of gaseous signal molecule hydrogen sulphide by activated hepatic stellate cells

Yan-Ning Wu, Li-Jun Wang, Yun Zhai,
Hong-Wei Shang, Li-Xin Zhang, Hui-Guo Ding

Yan-Ning Wu, Yun Zhai, Hui-Guo Ding, Beijing YouAn Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Li-Jun Wang, Beijing Pinggu Hospital, Beijing 101200, China

Hong-Wei Shang, Li-Xin Zhang, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872225; and the Beijing Natural Science Foundation, No. 7062032

Correspondence to: Professor Hui-Guo Ding, Beijing YouAn Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China. dinghuiguo@medmail.com.cn

Received: 2010-01-08 Revised: 2010-03-19

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To assess whether hydrogen sulphide (H₂S) is produced by activated hepatic stellate cells (HSC) and to investigate the effects of exogenous H₂S on HSC proliferation.

METHODS: HSC-T6, an activated rat HSC line, was used in the study. HSC-T6 cells were divided into four groups: control group, DL-PPG [D-propargylglycine, an inhibitor of cystathionine γ -lyase (CSE)] group, L-NAME (nitro-L-arginine methyl ester) group, and hemin [a stimulator

of heme oxygenase-1 (HO-1)] group. HSC-T6 cell suspension (1×10^5 cells) was prepared with DMEM containing 10% fetal calf serum. The production of H₂S was detected by methylene blue spectrophotometry. The expression of CSE mRNA was tested by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Subsequently, the effects of different concentrations of sodium hydrosulfide (NaSH; 0, 50, 100, 500 and 1000 μ mol/L), an exogenous H₂S "donor", on HSC-T6 cell proliferation were observed by MTT assay.

RESULTS: The rate of production of endogenous H₂S by HSC-T6 cells was $6.79 \text{ nmol/min} \pm 1.27 \text{ nmol/min}$. DL-PPG significantly inhibited H₂S production ($4.55 \text{ nmol/min} \pm 1.06 \text{ nmol/min}$, $P < 0.05$). CSE mRNA was positively expressed in HSC-T6 cells as revealed by RT-PCR. CSE mRNA expression was down-regulated in HSC-T6 cells treated with DL-PPG or hemin (both $P < 0.05$). NaSH at a concentration of 50 μ mol/L significantly promoted cell proliferation. In contrast, NaSH at concentrations of 500-1000 μ mol/L had no significant impact on cell proliferation.

CONCLUSION: Activated HSC can produce H₂S. CSE may play an important role in the synthesis of H₂S by HSC. Endogenous H₂S produced by HSC may be related to the pathogenesis of cirrhotic portal hypertension.

Key Words: Hydrogen sulfide; Hepatic stellate cell; Cystathionine γ -lyase

Wu YN, Wang LJ, Zhai Y, Shang HW, Zhang LX, Ding HG. Endogenous production of gaseous signal molecule hydrogen sulphide by activated hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1152-1156

摘要

目的: 测定活化肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)H₂S的生成率及对细胞增殖的影响。

方法: 采用活化大鼠HSC-T6, 分4组: 对照组、炔丙基甘氨酸(D-Propargylglycine, DL-PPG)组、N-硝基-L-精氨酸甲酯(Nitro-L-

■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

arginine methyl ester, *L*-NAME)组、氯化高铁血红素(hemin)组, 每组重复6个皿. RT-PCR检测HSC-T6 胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE) mRNA水平, 亚甲基蓝分光光度法测定H₂S生成率, MTT法观察不同浓度外源性H₂S供体-NaSH(0, 50, 100, 500, 1000 μ mol/L)对HSC-T6增殖的影响.

结果: HSC-T6能分泌H₂S, DL-PPG可明显减少HSC-T6 H₂S生成率(4.55 nmol/min \pm 1.06 nmol/min vs 6.79 nmol/min \pm 1.27 nmol/min, $P < 0.05$). RT-PCR显示: HSC-T6 CSE mRNA阳性, DL-PPG、hemin均降低HSC-T6 CSE mRNA水平($P < 0.05$); *L*-NAME对HSC-T6 CSE mRNA无明显影响. 50 μ mol/L NaSH可明显促进HSC-T6增殖(细胞存活率为116%), 500-1000 μ mol/L NaSH对细胞增殖无明显影响.

结论: 活化HSC分泌H₂S, 并且影响其增殖. H₂S在肝纤维化及肝硬化门脉高压症的发生机制可能有重要作用.

关键词: 硫化氢; 肝星状细胞; 胱硫醚- γ -裂解酶

武彦宁, 王利军, 翟云, 尚宏伟, 张立新, 丁惠国. 肝星状细胞合成气体信号分子H₂S的测定及其意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1152-1156
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1152.asp>

0 引言

活化的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)在肝纤维化发生发展及调节肝内阻力、门静脉压力中具有重要作用^[1]. 已经确定与HSC收缩、舒张密切相关的血管活性物质有血管紧张素、内皮素(endothelin-1, ET-1)和一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化碳(carbon monoxide, CO)等^[2,3]. 硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是继NO和CO后新发现的气体信号分子, 内源性H₂S是体内含硫氨基酸在胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE)作用下产生的代谢产物, 具有多种生物学功能^[4,5]. 最近研究发现^[6], H₂S气体信号分子可能通过影响肝内微血管收缩与舒张, 调节肝内阻力及门脉压力, 在门脉高压的发生机制中也有重要的作用. 但是, 活化的HSC是否能合成H₂S及对HSC功能的影响仍不清楚.

1 材料和方法

1.1 材料 HSC-T6为大鼠活化HSC系, 为SV40转染SD大鼠HSC, 由首都医科大学附属北京友谊

医院肝病研究中心贾继东教授惠赠. 分光光度计(Tecan Systems, California, 美国), T28酶标仪(ASYS Hitech GmbH, 奥地利). DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)细胞培养液(Gibco BRC公司, 美国). TE-HER Water-Jacket CO₂孵育箱(Hirasawa公司, 日本). 胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE)抑制剂-炔丙基甘氨酸组(D-Propargylglycine, DL-PPG、一氧化氮合酶抑制剂-N^o-硝基-*L*-精氨酸甲酯组(nitro-*L*-arginine methyl ester, *L*-NAME)、血红素氧合酶(heme oxygenase-1, HO-1)刺激剂-氯化高铁血红素(hemin)及硫化钠(NaSH)购自美国Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏与分组: 细胞于37℃快速复苏, 用含5%小牛血清的DMEM细胞培养液制备为1 \times 10⁵个HSC悬液, 接种于75 mm细胞培养瓶中, 培养液总体积为4 mL. 在950 mL/L O₂+50 mL/L CO₂, 37℃条件下, CO₂培养箱内培养24 h, 细胞完全贴壁后分4组: 对照组; DL-PPG组(终浓度为2 mmol/L); *L*-NAME组(终浓度为300 μ mol/L); hemin组(终浓度为10 μ mol/L), 每组重复6个培养皿, 常规方法培养.

1.2.2 H₂S生成率测定: 参考石玲等报道的亚甲基蓝分光光度法测定H₂S生成率^[7]. 收集并计数上述培养细胞, 加入到1.5 mL EP管中, 50 μ mol/L的磷酸钾溶液至400 μ L, 以超声波打碎细胞. 置入37℃温箱15 min. 在细胞匀浆内加入如下反应液: 400 μ L的细胞裂解液, 5 mmol/L的左旋半胱氨酸, 2 mmol/L的5'-磷酸吡多醛3.6 mL. 将反应液移至反应瓶, 吸取0.5 mL的1%醋酸锌加入中央室另裁剪2 cm \times 2.5 cm滤纸以增加反应面积. 氮气吹20 s, 石蜡膜双层封口转移到37℃水浴锅中震荡反应90 min, 再加入50%的三氯醋酸0.5 mL中止反应, 石蜡膜封闭. 37℃水浴60 min使H₂S完全吸收, 将中央室中内容物转移到含有3.5 mL水的试管中, 另设一只含3.5 mL水的试管作为空白管, 立即加入20 mmol/L的对苯二胺盐酸盐0.5 mL和30 mmol/L的FeCl₃ 50 μ L, 室温静置20 min, 使之充分显色. 以空白管调零, 670 nm波长, 分光光度计测各测试管A值. 根据制备的NaHS标准曲线, 计算出每10⁶个细胞中H₂S的生成率, 以nmol/min为单位.

1.2.3 RT-PCR测定CSE mRNA: 应用TRIzol试剂, 按说明书提取细胞总RNA, 紫外分光光度计定量. 取2 μ g总RNA, 用M-MLV逆转录酶(Moloney

■ 研发前沿

H₂S在高血压及肺动脉高压的病理生理机制的作用是国内学者研究的热点.

■ 创新盘点

本研究首次证明了肝脏活化HSC分泌H₂S, 并且影响其增殖, 认为H₂S在肝损伤及肝硬化门脉高压症的发生机制中可能有重要作用.

■应用要点

阐明肝脏H₂S的来源及H₂S、NO及CO的相互关系及其机制,可能为肝脏损伤及肝硬化门脉高压症的预防及治疗带来新策略。

表 1 各组HSC H₂S生成率及CSE mRNA的表达 (mean ± SD)

指标	对照组	DL-PPG(2 mmol/L)	L-NAME(300 μmol/L)	Hemin(10 μmol/L)
H ₂ S生成率(nmol/min)	6.79 ± 1.27	4.55 ± 1.06 ^a	5.94 ± 2.10	6.77 ± 1.94
CSE mRNA表达(4值)	0.78 ± 0.13	0.45 ± 1.06	0.57 ± 0.06	0.51 ± 0.06

^a*P*<0.05 vs 对照组。

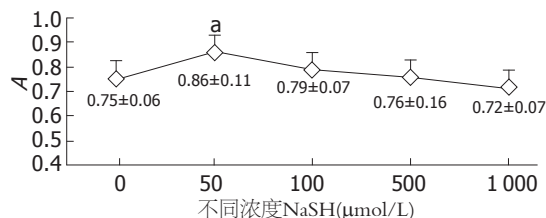


图 1 MTT试验观察H₂S供体-NaSH对HSC增殖的影响。

^a*P*<0.05 vs 对照组。

Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)和Oligo d(T)15引物逆转录成cDNA。以β-actin为内参, PCR反应体系25 μL, 包括: cDNA 1 μL, 含20 mmol/L氯化镁的10×PCR缓冲液2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 5 pmol/L CSE引物(S+A)1 μL, 25 pmol/L β-actin(S+A)1 μL, Taq DNA聚合酶0.5 μL。引物序列为: CSE(S): 5'-TCC GGA TGG AGA AAC ACT TC-3', CSE(A): 5'-GCT GCC TTT AAA GCT TGA CC-3', β-actin(S): 5'-ATC ATG TTT G AG ACC TTC AAC A-3', β-actin(A): 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3'。常规PCR扩增, PCR产物以2%琼脂糖凝胶电泳分离和溴化乙锭染色, 凝胶成像分析系统(AlphaImager AphaInnotechca, 美国)测定400 bp和318 bp两条带的吸光度。

1.2.4 MTT测定细胞增殖: 复苏后处于对数生长期的HSC-T6, 细胞密度为2×10⁴/孔接种于96孔培养板中, 培养基为含5%小牛血清的DMEM 200 μL, 常规培养24 h; 加入不同浓度NaSH(0, 50, 100, 500, 1 000 μmol/L), 每个浓度重复6孔。培养24 h后吸出培养液, 加入0.5 g/L的MTT 100 μL作用4 h。在570 nm波长T28酶标仪测定各孔A值, 计算细胞生存率。

统计学处理 数据用mean±SD表示。采用SPSS11.5统计软件进行ANOVA方差分析及*t*检验, *P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖活性 常规培养下细胞活性良好。50 μmol/L NaSH可明显促进 HSC-T6增殖(细胞

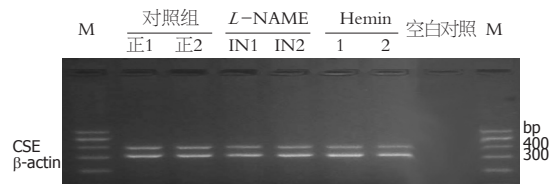


图 2 RT-PCR显示HSC CSE mRNA水平的表达。

存活率116%), 与对照组比较有明显统计学差异(*P*<0.05)。100 μmol/L NaSH HSC-T6细胞存活率为105%, 与对照组比较无明显统计学差异(*P*>0.05)。随着NaSH浓度的增加, HSC的存活率有降低趋势, 500-1 000 μmol/L NaSH对细胞增殖无明显统计学差异(图1)。

2.2 HSC H₂S生成率 活化HSC H₂S生成率为6.79 nmol/min±1.27 nmol/min, 加入CSE抑制剂-DL-PPG后, H₂S生成率明显降低(4.55 nmol/min±1.06 nmol/min, *P*<0.05)。提示CSE是HSC-T6合成H₂S的关键酶。同时初步发现, L-NAME、Hemin对活化HSC H₂S生成率无明显影响(表1)。

2.3 RT-PCR显示 HSC-T6细胞CSE mRNA阳性。初步发现, DL-PPG、Hemin均降低活化HSC CSE mRNA水平, L-NAME对活化HSC CSE mRNA水平无明显影响(图2, 表1)。

3 讨论

迄今, 肝硬化门脉高压症的发生机制及病理生理尚未完全阐明。在肝硬化门脉高压的形成机制中, 肝内阻力增加是门脉高压的始动因素, 全身高动力循环和内脏充血则是门脉高压持续进展的重要因素^[2]。近20年研究证明^[3]: 活化HSC在调节肝内阻力及肝窦血流量中具有重要作用。正常情况下, HSC位于Disse间隙, 是VitA在肝脏的贮存场所, 因此, 也称之为贮脂细胞(storing-fat cell)。当肝脏受到损伤时, HSC活化转化为成纤维母细胞, 合成与分泌大量胶原蛋白, 与肝脏纤维化有密切关系^[1,3]。近年来研究发现, 活化的HSC还表达平滑肌细胞特有的Desmin蛋白及具有细胞收缩装置的微丝、微管系统, 决定了HSC

具有平滑肌细胞相似的舒张与收缩功能^[8]. HSC收缩的结果是使肝窦阻力增加, 这种病理生理改变是肝硬化门脉高压症发生、发展的基础. 因此, 设计以HSC为靶点的药物, 是临床防治门脉高压症的新策略^[3].

H₂S是继NO和CO后新发现的第三个内源性气体信号分子. H₂S在体内有两种形式存在: 1/3的H₂S在体内以气体分子存在, 2/3以NaSH形式存在, 这样, 既保证了H₂S在体内的稳定, 又不改变内环境pH值. 内源性H₂S是由体内含硫氨基酸在胱硫醚-β-合酶(cystathionine-β-synthetase, CBS)、CSE作用下的代谢终末产物^[9], 具有重要、广泛的生物学功能^[4]. CBS主要存在于神经系统内, 也存在于肝脏、肾脏; CSE主要存在于主动脉、肺动脉、肠系膜动脉和肝脏^[9,10]. H₂S、NO、CO三种气体信号分子均具有明显的舒张血管作用, 三者之间相互作用, 在高血压及肺动脉高压的病理生理机制中具有重要作用^[5,11]. 其中, NO在调节血管局部张力中具有主要作用^[4]. 肝内阻力增加主要归因于肝内血管活性物质的生成及代谢失衡, 即肝窦NO缺乏和收缩血管活性的物质增加^[3]. 在肝硬化模型中也发现, 肝内NO含量减少主要归因于血管内皮一氧化氮合酶(eNOS)活性的减弱^[12]. 同时, 也发现肝脏HSC对血管舒张因子的反应性受损、敏感性减弱, 在门脉血流阻力增加中也起很重要的作用^[3,12]. H₂S如何影响NO产生? 研究发现^[13,14], 单独应用H₂S引起的血管舒张效应很微弱, 而在NO存在情况下, 血管舒张效应增加13倍. 其可能机制是, 一方面NO可以通过增加血管平滑肌CSE的活性; 另一方面NO还可以直接增加平滑肌CSE的转录, 从而上调CSE表达. 因此, 推测NO可能促进HSC合成、分泌H₂S. 但是, 本研究初步结果发现, 通过一氧化氮合酶抑制剂-L-NAME, 抑制HSC NO产生, 其结果对H₂S生成率无明显影响.

研究也发现, CO和H₂S通过调节血管平滑肌的舒缩、增殖和凋亡, 从而参与高血压的发病过程^[4,11]. 低氧性肺动脉高压大鼠中, H₂S可上调肺动脉平滑肌细胞NO合成与分泌, 而给予NO底物后显著抑制血管平滑肌细胞中H₂S生成, CSE mRNA的转录也明显下调, 提示NO对低氧性动脉高压大鼠血管平滑肌细胞H₂S/CSE体系发挥抑制作用^[13,14]. 在肝硬化门脉高压发生机制及高动力循环中, H₂S/CSE是否有相似的调节作用, 仍不清楚^[15]. 近年来, Fiorucci等^[6]报道, 在CCl₄大鼠肝硬化模型中发现, 肝脏组织H₂S生成明显减少,

肝内阻力增加. 然而, H₂S在肝脏的生成部位其机制仍不清楚. 研究发现^[16], 低浓度H₂S通过激活细胞K_{ATP}通道, 从而降低细胞内Ca²⁺浓度, 而高浓度H₂S刺激细胞内Ca²⁺浓度增加, 提示H₂S可能通过调节HSC Ca²⁺浓度, 从而影响HSC的生物学功能, 在调节肝脏微循环中也具有重要作用. 本研究发现, 活化HSC CSE mRNA阳性, 并且自分泌H₂S; DL-PPG, CSE酶抑制剂, 可明显抑制HSC H₂S的生成. 一定浓度(50 μmol/L)NaSH-H₂S供体, 对HSC具有促增殖作用. 我们推测, 一定浓度H₂S可能通过调节HSC收缩与增殖, 从而调节肝窦阻力的作用, 这可能是H₂S在肝硬化门脉高压发生机制中的作用之一. 最近研究发现^[17], H₂S作为新的炎症介质, 可能在肝脏损伤的机制中也具有重要作用. 因此, 在肝硬化门脉高压的发生机制中, 肝脏H₂S来源、CSE酶活性及其影响因素仍值得研究, 阐明H₂S、NO及CO的相互关系及其机制, 可能为门脉高压的预防及治疗带来新策略.

志谢: 感谢首都医科大学附属北京友谊医院肝病研究中心马红、贾继东教授在实验过程中的支持和帮助.

4 参考文献

- 1 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 2 Garcia-Tsao G, Bosch J, Groszmann RJ. Portal hypertension and variceal bleeding--unresolved issues. Summary of an American Association for the study of liver diseases and European Association for the study of the liver single-topic conference. *Hepatology* 2008; 47: 1764-1772
- 3 丁惠国. 长期控制肝硬化门脉高压症的策略. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 246-248
- 4 翟云, 蔡照华, 王利军, 丁惠国. 气体信号分子H₂S在肝硬化门脉高压形成机制中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2651-2653
- 5 Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 2008; 322: 587-590
- 6 Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, Rizzo G, Distrutti E, Shah V, Morelli A. The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 42: 539-548
- 7 石琳, 杜军保, 卜定方, 齐建光, 魏冰, 唐朝枢, 汤秀英. 高肺血流量对肺血管结构及胱硫醚-γ-裂解酶基因表达的影响. *北京大学学报* 2003; 35: 566-570
- 8 丁惠国, 尚宏伟, 王兴翠, 唐淑珍, 孙早临, 贾继东, 赵春惠, 王宝恩. 复方861对HSC超微结构及细胞骨架蛋白的影响. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 553-554
- 9 Wang R. Two's company, three's a crowd: can

■名词解释

H₂S: 内源性H₂S是由体内含硫氨基酸在胱硫醚-β-合酶、胱硫醚-γ-裂解酶作用下的代谢终末产物, 具有多种重要生物学功能的气体信号分子.

■同行评价

本研究选题有一定新意,设计合理.

- H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002; 16: 1792-1798
- 10 Li L, Bhatia M, Moore PK. Hydrogen sulphide-a novel mediator of inflammation? *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 125-129
- 11 Li W, Jin HF, Liu D, Sun JH, Jian PJ, Li XH, Tang CS, DU JB. Hydrogen sulfide induces apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 3032-3038
- 12 Bosch J, Abalde JG, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC. Portal hypertension and gastrointestinal bleeding. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 3-25
- 13 Yanfei W, Lin S, Junbao D, Chaoshu T. Impact of L-arginine on hydrogen sulfide/cystathionine-gamma-lyase pathway in rats with high blood flow-induced pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 851-857
- 14 张清友, 杜军保, 张春雨, 闫辉, 唐朝枢. 内源性一氧化氮对低氧大鼠肺动脉H₂S脱硫醚-γ-裂解酶体系的影响. *实用儿科临床杂志* 2003; 18: 865-867
- 15 Ebrahimkhani MR, Mani AR, Moore K. Hydrogen sulphide and the hyperdynamic circulation in cirrhosis: a hypothesis. *Gut* 2005; 54: 1668-1671
- 16 Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 2001; 20: 6008-6016
- 17 Zhang H, Bhatia M. Hydrogen sulfide: a novel mediator of leukocyte activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008; 30: 631-645

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-及-后列出, 在±前后都要列出. 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 pg/ml ± 0.27 pg/ml 应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/L$, WBC数用 $\times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

慢性肝炎肝纤维化的中医症状聚类及分期

王中甫, 宋素华, 王玉中, 宋彬彬, 门楠楠, 孟德阳

王中甫, 舞阳县疾病预防控制中心 河南省漯河市 462400
宋素华, 宋彬彬, 门楠楠, 漯河市第三人民医院 河南省漯河市 462000
王玉中, 漯河医学高等专科学校 河南省漯河市 462002
孟德阳, 漯河市中医院 河南省漯河市 462000
作者贡献分布: 王中甫、宋素华及王玉中对此文所作贡献均等; 此课题由王中甫、宋素华、王玉中、宋彬彬、门楠楠及孟德阳设计; 肝纤维化病理组织学检查由宋彬彬与门楠楠操作完成; 中医症状由王中甫、宋素华及王玉中采集完成, 研究用试剂及分析工具由宋彬彬与门楠楠提供; 数据分析由王玉中完成; 本文写作由王中甫、宋素华、王玉中及孟德阳完成。
通讯作者: 王玉中, 教授, 462002, 河南省漯河市大学路148号, 漯河医学高等专科学校. wangyuzhong65@126.com
收稿日期: 2009-11-12 修回日期: 2009-12-09
接受日期: 2009-12-14 在线出版日期: 2010-04-18

Cluster analysis of traditional Chinese medicine symptoms and pathological staging of liver fibrosis in chronic hepatitis

Zhong-Fu Wang, Su-Hua Song, Yu-Zhong Wang, Bin-Bin Song, Nan-Nan Men, De-Yang Meng

Zhong-Fu Wang, Wuyang Center for Disease Control and Prevention, Luohe 462400, Henan Province, China
Su-Hua Song, Bin-Bin Song, Nan-Nan Men, the Third People's Hospital of Luohe, Luohe 462000, Henan Province, China
Yu-Zhong Wang, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China
De-Yang Meng, Luohe Hospital of Chinese Medicine, Luohe 462000, Henan Province, China
Correspondence to: Professor Yu-Zhong Wang, Luohe Medical College, 148 Daxue Road, Luohe 462002, Henan Province, China. wangyuzhong65@126.com
Received: 2009-11-12 Revised: 2009-12-09
Accepted: 2009-12-14 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To perform a cluster analysis of traditional Chinese medicine (TCM) symptoms of liver fibrosis in chronic hepatitis and to explore the relevance between TCM syndromes and pathological stages of liver fibrosis.

METHODS: A total of 285 patients with chronic hepatitis and liver fibrosis in three centers were included in the study. Liver fibrosis was graded by histopathological examination. TCM symptoms were observed. Dimensionality reduction and clustering of TCM symptoms were per-

formed using a clustering method. By selecting appropriate locations as interception points, TCM syndromes were precipitated. A simple correspondence analysis was then performed to evaluate the relevance between TCM syndromes and pathological stages of liver fibrosis.

RESULTS: Forty-four TCM symptoms were clustered into five syndromes: liver Qi stagnation and spleen deficiency, internal accumulation of damp-heat, Qi stagnation and blood stasis, Qi-Yin deficiency, and liver and kidney Yin deficiency. TCM syndromes are closely related with the pathological stages of liver fibrosis ($\chi^2 = 33.998, P = 0.005$). The inertia values of dimensions 1, 2 and 3 were 0.084, 0.022 and 0.011, respectively, while the contribution rates were 70.6%, 18.7% and 9.2%, respectively. Liver Qi stagnation and spleen deficiency, internal accumulation of damp-heat, Qi stagnation and blood stasis, Qi-Yin deficiency, and liver and kidney Yin deficiency were frequently seen in stage S0, S1, S2, S3, and S4 liver fibrosis, respectively.

CONCLUSION: TCM syndrome is closely correlated with the degree of liver fibrosis. TCM syndrome is aggravated with the progression of liver fibrosis.

Key Words: Chronic hepatitis; Liver fibrosis; Histological examination; Traditional Chinese medicine syndrome; Cluster analysis; Correspondence analysis

Wang ZF, Song SH, Wang YZ, Song BB, Men NN, Meng DY. Cluster analysis of traditional Chinese medicine symptoms and pathological staging of liver fibrosis in chronic hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1157-1162

摘要

目的: 总结慢性肝炎肝纤维化的中医证型, 探讨中医证型与肝纤维化病理分期的关联性。

方法: 纳入4个中心285例慢性肝炎肝纤维化患者, 病理组织学检查肝纤维化分期, 观察中医症状表现, 采用指标聚类法对中医症状聚类降维, 在适当位置截取, 析出中医证型, 采用简

■背景资料

现代医学对肝炎肝纤维化有明确的病理分级标准, 中医学仍袭用经验对其证型进行归类, 聚类分析使本病的中医辨证分型由主观进入客观, 由定性进入定量, 评定方法更为科学, 结果更为可靠。开展病理分级与中医证型对应关系的研究, 有利于深化慢性肝炎肝纤维化中医辨证的客观化和探索中医证型间的演变规律, 也是提高临床疗效的重要环节。

■同行评议者

王富春, 教授, 长春中医药大学针灸推拿学院

■创新盘点

本研究首次将肝炎肝纤维化的中医症状用聚类分析方法归类分型,为中医辨证分型提供了科学依据,将中医证型与病理分期对应分析可以补充以四诊为主要依据中医宏观辨证体系的不足。

单对应分析中医证候分布与肝纤维化分级的关系。

结果: 44个中医症状聚为肝郁脾虚证、湿热内蕴证、气滞血瘀证、气阴两虚证和肝肾两亏证5大证型;中医证型与肝纤维化分期密切相关($\chi^2=33.998, P=0.005$);维度1、维度2和维度3的惯量值分别是0.084、0.022和0.011,贡献率分别是70.6%、18.7%和9.2%(累计98.5%);肝郁脾虚证偏重于肝纤维化S0,湿热内蕴证偏重于S1,气滞血瘀证偏重于S2,气阴两虚证偏重于S3,肝肾两亏证偏重于S4。

结论: 中医证型与肝纤维化程度有一定关联性,随肝纤维化分期由S0→S4的增加,中医证型也由肝郁脾虚证→湿热内蕴证→气滞血瘀证→气阴两虚证→肝肾两亏证逐渐加重。

关键词: 慢性肝炎;肝纤维化;组织学检查;中医证型;聚类分析;对应分析

王中甫, 宋素华, 王玉中, 宋彬彬, 门楠楠, 孟德阳. 慢性肝炎肝纤维化的中医症状聚类及分期. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1157-1162

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1158.asp>

0 引言

肝炎肝纤维化(liver fibrosis)是肝细胞发生坏死及炎症刺激时,肝脏内纤维结缔组织异常增生所致的病理过程,也是各种慢性肝病向肝硬化发展的必然经过。现代医学有明确的诊断标准和病理分级,中医缺如。本研究应用聚类分析和对应分析现代数理统计方法,以4个中心285例肝纤维化患者为研究对象,探讨慢性肝炎肝纤维化的中医证候类型及演化规律,为本病的辨证论治提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2006-05/2009-11在舞阳县疾病预防控制中心、漯河市第三人民医院、漯河医学高等专科学校第三附属医院、漯河市中医院4个中心经肝穿刺病理组织学检查确诊的慢性肝炎患者285例。病原学诊断为乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染254例,丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染2例,乙型合并丙型肝炎29例。男158例,女127例;年龄19-65(平均45.94±9.56)岁;病程0.6-35(平均13.38±6.58)年。纳入患者知情,同意接受调查。排除脂肪肝、肝癌、门静脉栓塞、高血压及心脏病患者。

1.2 方法

1.2.1 西医诊断标准和分期: 诊断采用2000年中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会联合修订的诊疗标准^[1]。肝穿刺活检标本用10%甲醛固定,常规制片染色,组织标本由2名病理医师读片确定。肝纤维化程度分为5期: S0期为无纤维化; S1期为汇管区纤维化扩大,局限于窦周及小叶内纤维化,小叶结构完整,没有纤维间隔形成; S2期为汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构大部分保留; S3期为纤维间隔伴小叶结构系统紊乱,但没有形成肝硬化,纤维条索还没有完全包绕; S4期为早期肝硬化或肝硬化,肝实质广泛破坏,弥漫纤维增生,被分隔的肝细胞呈不同程度结节再生。

1.2.2 确定中医症状体征变量: 计算机网络检索中国知网(<http://www.cnki.net>),万方数据库(<http://med.wanfangdata.com.cn>),手工检索《中国中西医结合杂志》、《中国中医基础医学杂志》、《中医杂志》、《北京中医药大学学报》等中文核心期刊,经课题组专家前期的预研究,确定与慢性肝炎肝纤维化中医证候密切相关的症状和体征共44个。

1.2.3 资料采集方法: 于患者入院24 h内完成中医四诊症状采集,并量化赋分,无=0,有=1,症状采集由2名中医专家分别观察1次,赋值相同者由第三者填入预先制定的临床流行病学调查表,赋值不同者共同商讨决定。

统计学处理 数据采用双边录入Excel电子表格,并逻辑检错建立数据库,导入SPSS16.0统计软件进行分析。采用系统聚类(hierarchical cluster)中的指标聚类方法对44个症状聚类分析,结合中医传统理论在适当位置截取,析出中医证型。用Correspondence analysis模块对患者中医证型与肝纤维化分期之间的关系进行对应分析。

2 结果

2.1 慢性肝炎肝纤维化中医症状聚类分析 采用指标聚类(R型聚类)法,以Pearson correlation为测量尺度,在适当位置截取,44个中医症状聚为5个大类,经专家认定为: (1)肝郁脾虚证: 右胁胀痛、脘痞腹胀、食少便溏、神疲乏力、面色少华、心情抑郁、暖气则舒、舌质淡、苔薄白、脉细弦; (2)湿热内蕴证: 身目鲜黄、口苦咽干、食欲不振、渴不欲饮、小便黄赤、大便灰白、舌质红、苔黄腻、脉滑数; (3)气滞血瘀证: 右胁剧痛、时作时止、胁下或可触及症积、手掌殷



2.3 对应分析 维度1惯量0.084, 解释总信息量的70.6%, 维度2惯量0.022, 解释总信息量的18.7%.

二维投影图涵盖了原始数据表中89.3%的信息,且2个维度对S1、S2和气滞血瘀的贡献仅51.8%、39.0%和52.9%,表明二维投影对这3个因素的解释并不充分,即投影尚不能充分概括S1、S2和气滞血瘀原始数据的信息。而前3个特征根对应的累计贡献率为98.5%,对行、列所有因素的贡献在92.6%-100%之间,表明用三维空间可以更好的展示行、列因素间的对应关系(表2, 3)。故同时绘制二维和三维投影图分析。图2为二维投影图,可以直观的显示出肝郁脾虚偏重于肝纤维化S0, 湿热内蕴偏重于S1, 肝肾两亏偏重于S4。而气滞血瘀、气阴两虚与S2、S3的投影在同一象限,且都很接近,难于明确对应关系。图3为三维投影图,可以清晰地看出,气滞血瘀与S2投影点最近,而气阴两虚与S3投影点最近。

■应用要点

中医临床可将肝炎肝纤维化分为肝郁脾虚证、湿热内蕴证、气滞血瘀证、气阴两虚证和肝肾两亏证5大证型辨证施治,中医证型与肝纤维化程度有明显的对应关系,当辨证分型困难时,可参考肝纤维化病理诊断结果,以提高辨证分型的准确性。

表 3 维度对行/列因素的贡献

因素	得分值			惯量	维度对点的贡献				
	1	2	3		1	2	3	1+2	1+2+3
S0	-1.022	0.174	-0.128	0.053	0.975	0.015	0.006	0.989	0.995
S1	-0.280	-0.126	0.436	0.009	0.469	0.049	0.409	0.518	0.926
S2	0.173	-0.254	-0.514	0.010	0.185	0.205	0.587	0.390	0.977
S3	0.414	-0.379	0.191	0.018	0.640	0.276	0.049	0.916	0.965
S4	0.510	0.700	0.022	0.029	0.507	0.493	0.000	1.000	1.000
肝郁脾虚	-0.964	0.381	-0.166	0.049	0.913	0.073	0.010	0.986	0.996
湿热内蕴	-0.382	-0.237	0.395	0.014	0.603	0.120	0.233	0.723	0.956
气滞血瘀	0.162	-0.374	-0.490	0.012	0.141	0.388	0.466	0.529	0.996
气阴两虚	0.352	-0.213	0.260	0.012	0.673	0.127	0.132	0.800	0.932
肝肾两亏	0.632	0.625	0.002	0.033	0.662	0.334	0.000	0.996	0.996

与样本间(行因素)的相互关系进行处理,而在实际应用时,往往需要了解指标与样品间的相关性,即:哪些个体是特定主成分的典型代表、哪些指标特异地表征着关系密切的样品。一般 χ^2 检验可提示各分组间的构成不同,相关程度则采用Pearson列联系数或Spearman等级相关系数来度量,但难以进一步揭示行、列变量的不同水平间的相互关系。对应分析正是解决这一问题的有力工具^[9],其基本思想是将一个列联表中行、列各元素的比例结构,以点的形式在较低维的空间中投影,将样品的种类及其属性在同一张因子载荷图(对应分析图)上展示出来,相邻的变量点关系密切,相邻的样品点具有相似的性质,而且可以用邻近的变量点来表征,直观、简单、方便^[10],对应分析已应用中医辨证论治^[11-13]。本研究将肝纤维化程度与中医证型分布情况进行对应分析,结果显示,随着肝纤维化分期的增加,中医证型也由肝郁脾虚、湿热内蕴、气滞血瘀、气阴两虚、肝肾两亏逐渐加重。肝炎的初级阶段,病程较短,肝组织无纤维化(S0),肝功能损害较轻,中医证型表现为肝郁脾虚;HBV复制在肝纤维化的形成和发展过程中起着重要的作用,研究发现,HBV DNA在湿热内蕴型中复制最为活跃^[14-16],可见湿热毒邪内蕴导致了肝脏从无纤维化向汇管区扩大,周围纤维增生(S1)的发展,本研究对应分析显示S1与湿热内蕴证型投影位于同一区域。随着病情的进展,汇管区明显扩大、周围纤维化,破坏界板,增生纤维组织伸入小叶(S2),中医证型以气滞血瘀为主。S3期大量纤维间隔形成,分隔并破坏肝小叶,致小叶结构紊乱,肝功能严重受损,患者多表现为中医气阴两虚的症状。肝纤维化发展

到最后阶段,肝实质广泛破坏,弥漫纤维增生,被分隔的肝细胞呈不同程度结节再生(S4),肝功能衰竭,临床表现腰膝酸软、头晕目涩、腹壁青筋显露、面色晦暗、鼻衄齿衄、舌质红绛少津、光剥苔、脉弦细数等肝肾两亏证型。王宝珍等^[17]按传统辨证方法将133例慢性乙型肝炎肝纤维化患者可分为:肝郁脾虚、湿热中阻、肝肾阴虚、脾肾阳虚及瘀血阻络5型;肝郁脾虚患者S1级较多(62.1%),湿热中阻患者S2级较多(57.7%),肝肾阴虚和脾肾阳虚患者S3级较多(分别为44.0%和38.9%),瘀血阻络患者以S3、S4为主(分别占37.1%和28.6%),各证型间有显著差异($P<0.01$),与本研究结果基本吻合。本研究样本均来自同一市区县的4个研究单位,保证了样本选择的同质性,减少了样本选择偏倚。但所析出的结论可能存在一定的局限性,是否适应于大范围推广,尚需要大样本、跨区域、多中心、前瞻性研究佐证,这是我们后续的工作。

总之,聚类分析和对应分析可以补充以四诊为主要依据中医宏观辨证体系的不足,肝炎肝纤维化中医可按肝郁脾虚证、湿热内蕴证、气滞血瘀证、气阴两虚证及肝肾两亏证5大证型辨证论治。随肝纤维化分期由S0→S4的增加,中医证型也由肝郁脾虚证→湿热内蕴证→气滞血瘀证→气阴两虚证→肝肾两亏证逐渐加重。

4 参考文献

- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 刘茵, 赵国荣. 肝纤维化肝硬化诊断指标及其与中医证型的相关性研究. 中医药导报 2005; 11: 74-75
- 刘绍能, 吕文良. 慢性乙型肝炎肝纤维化辨证分型的研究. 中医药信息 2002; 19: 15-16
- 王俊文, 王天芳, 刘建平. 肝纤维化中医辨证分型和

- 辨证依据的现代临床文献研究. 北京中医药大学学报 2008; 31: 210-214
- 5 石怀芝. 辨证施治治疗肝纤维化. 北京中医杂志 2002; 21: 191-192
- 6 薛博瑜, 顾学兰. 肝纤维化的病机认识和辨证论治. 南京中医药大学学报(自然科学版) 2001; 17: 76-78
- 7 卢良威, 娄国强. 肝纤维化的证治规律研究. 浙江中医学院学报 2004; 28: 1-2
- 8 李永健, 方肇勤, 邱若红. 聚类分析在中医药研究中的应用与思考. 中国中医药信息杂志 2001; 8: 8
- 9 王彤. 医学统计学与SPSS软件应用. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 292-293
- 10 杜强, 贾丽艳. SPSS统计分析. 北京: 人民邮电出版社, 2009: 419-420
- 11 卢林耿, 柯建利, 王中民. 中医辨证论治的对应分析方法. 数理医药杂志 2000; 13: 272-273
- 12 李淑芳, 熊旭东. COPD并发肺心病中医证型与病情程度相关性的对应分析研究. 中国中医急症 2007; 16: 949-950
- 13 尚景盛, 王玉光, 胡立胜. 应用对应分析研究COPD中医证候与病情分级的相关性. 上海中医药大学学报 2004; 18: 29-30
- 14 冀爱英, 赵英红, 潘来峰, 杜明瑞. 乙肝后肝硬化中医证型分布规律及其与HBV复制的相关性研究. 中国中医基础医学杂志 2006; 12: 542-543
- 15 张琴, 陈慧芬, 陈良, 方志红, 吴定中, 刘平, 魏建军, 曹素华. 肝炎后肝硬化中医证候与肝功能损伤关系的探讨. 上海中医药杂志 2004; 38: 8
- 16 黄毅, 伍严安, 马晓宁, 陈华. 乙型肝炎后肝硬化患者血清HBVDNA测定含量及其临床意义. 福建医药杂志 2004; 26: 97
- 17 王宝珍, 刘成, 薛惠明. 慢性乙型肝炎肝纤维化中医证型与肝组织病理分级、分期关系的探讨. 上海中医药杂志 2001; 35: 10-12

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *L*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*, *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *Vd*, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

双侧肝叶巨大海绵状血管瘤分期切除1例

徐新保, 冯志强, 张洪义, 张宏义, 张国荣, 张晋东, 刘承利, 肖梅, 张辉

徐新保, 冯志强, 张洪义, 张宏义, 刘承利, 肖梅, 张辉, 中国人民解放军空军总医院肝胆外科 北京市 100142
张国荣, 张晋东, 中国人民解放军空军总医院麻醉科 北京市 100142

作者贡献分布: 徐新保具体负责文章的设计、临床资料收集整理及文章的撰写, 为本文主要贡献者; 张洪义负责指导、审核; 冯志强、张宏义、张国荣、张晋东、刘承利、肖梅及张辉协助完成此文。

通讯作者: 张洪义, 主任医师, 100142, 北京市, 中国人民解放军空军总医院肝胆外科. zhhyiyi1487@163.com

收稿日期: 2010-02-02 修回日期: 2010-03-28

接受日期: 2010-03-29 在线出版日期: 2010-04-18

Two-stage excision of giant cavernous hemangioma involving the bilateral lobes of the liver: a report of one case

Xin-Bao Xu, Zhi-Qiang Feng, Hong-Yi Zhang, Hong-Yi Zhang, Guo-Rong Zhang, Jin-Dong Zhang, Cheng-Li Liu, Mei Xiao, Hui Zhang

Xin-Bao Xu, Zhi-Qiang Feng, Hong-Yi Zhang, Hong-Yi Zhang, Cheng-Li Liu, Mei Xiao, Hui Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Airforce General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Guo-Rong Zhang, Jin-Dong Zhang, Department of Anesthesia, the Airforce General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Correspondence to: Hong-Yi Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Airforce General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China. zhhyiyi1487@163.com

Received: 2010-02-02 Revised: 2010-03-28

Accepted: 2010-03-29 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To explore the surgical procedure for giant cavernous hemangioma involving the bilateral lobes of the liver and to summarize therapeutic experience.

METHODS: The clinical data for a female patient with giant cavernous hemangioma involving the bilateral lobes of the liver were retrospectively analyzed. Postoperative follow-up was carried out.

RESULTS: The patient could not bear one-stage resection of bilateral hemangiomas because small amount of liver parenchyma left would fail to support her life. A two-stage surgical procedure was then designed for her. In the first stage, the left hemangioma was excised smooth-

ly to eliminate compression of normal liver parenchyma. The rest normal liver tissue was then allowed to grow. Three and a half years later, the volume of the left liver lobe was enlarged markedly, and the hemangioma in the right liver lobe also grew larger. The second-stage excision of the right hemangioma was then performed. The surgery was successful. Postoperatively, the patient recovered gradually. Up to now, she is surviving healthily more than 4 years.

CONCLUSION: Excision of the left hemangioma in advance can eliminate compression of normal liver tissue and thus permit the left normal liver tissue to gain growth space. The enlarged normal liver tissue increases liver function reserve and obviously facilitates subsequent second-stage resection of the right hemangioma.

Key Words: Giant hepatic hemangioma; Bilateral hepatic lobes; Staging operation

Xu XB, Feng ZQ, Zhang HY, Zhang HY, Zhang GR, Zhang JD, Liu CL, Xiao M, Zhang H. Two-stage excision of giant cavernous hemangioma involving the bilateral lobes of the liver: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1163-1168

摘要

目的: 探讨双侧肝叶巨大血管瘤的外科手术方式并总结治疗经验。

方法: 对1例罕见的特大双侧肝叶血管瘤患者的临床资料进行完整详细的回顾性分析及术后随访。

结果: 1例罕见的特大双侧肝叶血管瘤患者因正常肝组织较少无法同时施行左、右侧肝叶血管瘤切除术。该患者接受了二期血管瘤切除术治疗: 一期手术切除左侧肝叶巨大血管瘤, 术后恢复顺利, 残余正常肝组织向左侧增生, 但同时右侧肝血管瘤也继续增大; 术后3.5年时接受了二期手术切除了右侧肝叶巨大血管瘤, 该患者术后逐渐康复。至今已经健康存活4年余。

结论: 双侧肝叶巨大血管瘤可先切除左侧肝

■背景资料

肝血管瘤是最常见的肝脏良性肿瘤。巨大的肝血管瘤较为少见, 尤其是双侧肝叶同时发生特大血管瘤非常罕见, 其手术治疗非常困难, 往往需要分期切除。

■同行评议者

彭吉润, 主任医师, 北京大学人民医院肝胆外科中心; 刘超, 副教授, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆胰外科; 陈积圣, 教授, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

■创新盘点

首先切除左肝巨大血管瘤,再视残余正常肝组织的增生体积和患者肝功能状况择期行二期右肝巨大血管瘤切除术,该方法避免了手术结扎或者介入封堵患侧肝动脉或门静脉分支而造成的肝功能损害或其他不良并发症(比如误栓胆道血管而造成胆道坏死等),这是较为稳妥可靠的治疗方法,本例患者即采用此种分期手术方法,获得了良好的效果。

叶巨大血管瘤,使正常肝组织解除压迫,获得生长空间,从而逐渐增生,随后择期二期切除右侧肝叶巨大血管瘤。

关键词: 肝巨大血管瘤, 双侧肝叶, 分期手术

徐新保, 冯志强, 张洪义, 张宏义, 张国荣, 张晋东, 刘承利, 肖梅, 张辉. 双侧肝叶巨大海绵状血管瘤分期切除1例. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1163-1168

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1163.asp>

0 引言

肝血管瘤是最常见的肝脏良性肿瘤。巨大的肝血管瘤较为少见,尤其是双侧肝叶同时发生特大血管瘤非常罕见,其手术治疗非常困难,往往需要分期切除,目前,国内外仅有1例公开报道^[1]。本院于2002-06-04接诊1例双侧肝叶特大海绵状血管瘤患者。该患者由于压迫症状明显,有贫血表现,血管瘤生长较快,有破裂可能,正常肝组织继续受损可能会失去手术切除机会,因此须尽快切除肝血管瘤。但患者肿瘤巨大,切除过程中难免会累及邻近正常肝组织,有可能损伤肝脏血管而影响正常肝组织血液供应,如同时切除双侧巨大血管瘤,不但手术切除难度极大,风险很高,并且术后患者可能会出现小肝综合征,导致肝功能衰竭^[1]。故我们拟分两期手术:先切除左叶病灶减轻压迫症状,释放正常肝组织再生空间,等到正常肝组织增生变大后再切除右肝巨大血管瘤。现将该患者手术过程、围术期处理及术后恢复,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 女,48岁,曾就诊于当地医院,腹部超声检查示:肝内多发巨大实性占位性,恶性肿瘤可能性大。当地医生认为恶性肿瘤晚期,无法治疗。2002-06-04就诊于中国人民解放军空军总医院肝胆外科。患者主诉“腹部胀满不适1 mo余”。

1.2 方法 患者既往史无异常。入院查体:皮肤、巩膜无黄染,腹部膨隆,腹软,肝于右肋下6 cm、剑突下8 cm可触及,质中,缘钝,无触痛,其余无异常。入院后化验:WBC $2.7 \times 10^9/L$, 血色素84 g/L, 红细胞比容0.264 L/L, 电解质、肝、肾功能正常,乙型肝炎五项阴性,AFP阴性,凝血酶原时间正常。胸片提示膈下占位性病变。心电图正常。入院后核磁共振检查提示:肝右叶可见一巨大团状肿块,大小约17 cm×16 cm,肝左叶内侧段也见一直径约2 cm异常信号区,左腹部另见一巨大肿块,其上缘与肝左叶持平,两者分界不清,

向下延伸至左肾上极,大小约22 cm×20 cm,考虑为肝脏多发巨大血管瘤可能性大。经股动脉穿刺肝动脉造影显示:肝门部下移,肝动脉受肿瘤挤压移位,肝左、右叶血管瘤巨大。

2002-06-27在全麻下行“左肝巨大血管瘤切除术”。经上腹部“人”形切口进腹后探查:肝脏弥漫性肿大膨出,占据中上腹部;左肝可见25.0 cm×25.5 cm大小肿物,压迫脾脏、胃、肠等周围脏器,与肝脏第4段有一定界限;右肝可触及20.0 cm×20.0 cm大小肿物,上端隆起顶起膈肌,向后压迫下腔静脉,向左侧侵及左内叶,胆囊附着其上;腹腔内少量腹水。探查后决定行左肝巨大血管瘤切除术。切断并结扎肝圆韧带,分离肝脏与膈肌的粘连,切开肝镰状韧带及肝左三角韧带。解剖第一肝门,并置肝门阻断带。沿左侧肿瘤与正常肝组织交界处,完整切除肿瘤。仔细寻找断面血管、胆管并结扎。缝合肝创面止血。温盐水冲洗创面,检查无活动性出血,于左膈下及肝脏断面处分别放置乳胶管1根并引出腹腔用缝线固定。

患者第1次住院出院后1年内一般情况良好,无不适感觉,能正常生活、工作。患者拒绝按计划(第1次出院时曾嘱患者休养半年后返院复查)返院复查以决定是否行第二期手术。2003年下半年开始经常感觉轻度乏力、腹胀。2004-06开始自觉右上腹包块逐渐增大,感觉右上腹胀满不适,并且症状逐渐加重。2005-11-30再次入住我院。入院查体:腹部极度膨隆,可见上腹“人”型切口疤痕,可触及巨大包块,包块向右下可达到盆腔,接近右腹股沟,向左侧越过中线10 cm,肝肺浊音界位于右锁骨中线第3肋间。化验显示白细胞稍低, $3.2 \times 10^9/L$,红细胞、血色素正常,肝、肾功能基本正常,活化部分凝血活酶时间36.2 s,凝血酶原时间14.8 s,凝血酶原活动度65.756%,纤维蛋白原0.924 g/L。乙型肝炎五项、丙型肝炎抗体、人类免疫缺陷病毒抗体、梅毒抗体全部为阴性。心电图:TV1、V2、V3倒置、TV4低平,提示窦性心律,大致正常心电图,T波改变。腹部超声:膈肌上移,肝右叶巨大血管瘤(病变血流丰富),大小约40 cm×20 cm×20 cm,下至盆腔,门静脉内径1.2 cm,血流通畅。腹部核磁共振(MRI)及核磁共振血管成像(MRA):肝右叶见大小约40 cm×20 cm×20 cm血管瘤,肝左叶见直径约2 cm的小血管瘤,肝固有动脉显影清晰,肝左右动脉显影欠佳,病变似为肝右动脉供血,门静脉受压移位,门脉主干、左支、肠

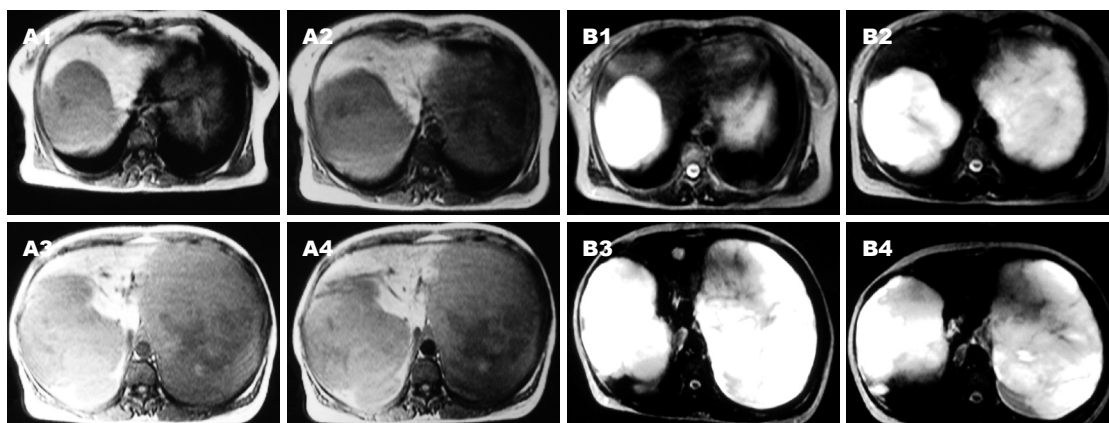


图 1 双侧肝叶巨大血管瘤. A: T1加权像; B: T2加权像.

■应用要点

双侧肝叶巨大血管瘤可先切除左侧肝叶巨大血管瘤,使正常肝组织解除压迫,获得生长空间,从而逐渐增生,随后择期二期切除右侧肝叶巨大血管瘤.

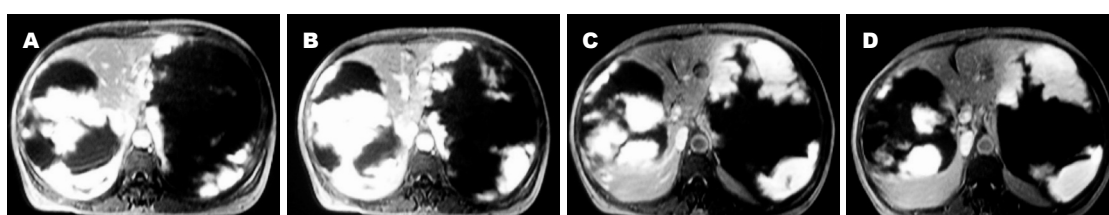


图 2 增强扫描显示血管瘤内不同程度强化.

系膜上静脉显影良好, 门静脉右支明显变细, 中远段显影欠佳, 下腔静脉受压变细, 肾静脉平面以下下腔静脉右壁与病变关系密切, 管壁毛糙, 第二肝门下腔静脉较细, 肝中、右静脉显影良好.

2005-12-05全院术前讨论认为: 患者第1次术后左侧肝组织明显增生, 目前肝功能正常, 凝血功能接近正常, 心肺肾功能良好, 手术适应证存在, 无手术禁忌证. 2005-12-07在全麻下行肝右叶巨大血管瘤切除术. 手术经过: 先行上腹部正中切口, 长约25.0 cm, 逐层切开进腹探查: 见右肝叶巨大肿瘤占据腹腔及盆腔, 并越过中线占据左侧腹腔, 肿瘤与腹壁粘连. 分离粘连, 游离左侧肝脏, 可见左侧为代偿增大的肝脏左内叶, 大小约20 cm×15 cm, 质地及色泽类似于充血的脂肪肝. 右侧可触及巨大肿物, 因此向右侧延长切口到腋后线, 探查见血管瘤巨大, 上界突出到胸腔, 下达盆腔, 左侧越过中线约10 cm, 肿瘤表面充满迂曲血管. 游离肿瘤下端, 见其与其他组织压迫为主, 粘连不重. 显露解剖第一肝门, 胆囊附着在肿瘤之上, 分离胆囊三角, 切断胆囊管. 切断右肝动脉、右肝管、右肝门静脉. 解剖肝周粘连带(第1次手术时已切断的镰状韧带和左侧冠状韧带、三角韧带在肝脏周围形成粘连), 暴露第二肝门, 从右侧逐渐压迫推移血管



图 3 一期手术42 mo后可见腹部明显膨隆.

瘤, 解剖、显露出肝右静脉. 离断来自膈肌和肾上腺的血管. 这样已经完全阻断进入肿瘤的血液供应. 分别阻断肝门15、16 min 2次, 完整切除肿瘤, 4-0血管线缝合右肝静脉残端. 肝断面彻底止血. 生理盐水冲洗腹腔. 摆正残肝位置, 可见其充血红润. 缝合后腹膜创面. 于膈肌下方放置腹腔引流2根. 逐层关腹.

2 结果

2.1 一期手术 手术时间4.5 h. 手术顺利, 术后安全返回肝胆外科普通病房. 术中出血约800 mL, 回输自体血1 500 mL(均为术中回吸收血液, 包括所切除的血管瘤内积存的部分血液). 术后患者恢复较顺利, 切口甲级愈合, 术后9 d拔除腹腔引流管, 术后18 d出院. 术后病理诊断: 肝脏海绵状血管瘤. 出院时嘱患者6 mo后返院复查并决

■同行评价

本文作者报道1例双侧肝脏巨大血管瘤,临床上罕见,作者采取先左后右的分期切除手术,避免了同时切除双侧巨大血管瘤可能出现的余肝体积太小所导致的肝功能衰竭;尽管本例患者手术风险很大,但通过此种稳妥的分期切除的方式,取得了令人满意的疗效。检索国内外文献,类似报道较少,对肝脏外科医生有较好的参考价值。

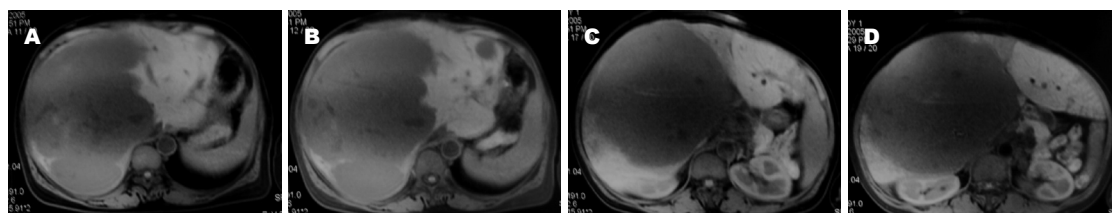


图4 一期手术42 mo后显示右肝巨大血管瘤及增生的肝左叶。

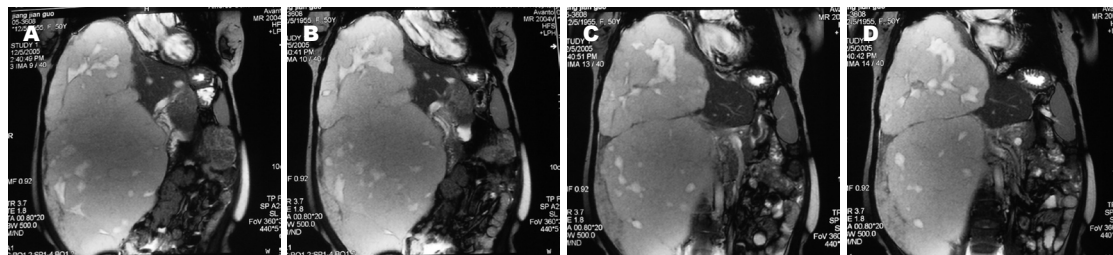


图5 冠状面显示右肝巨大血管瘤及增生的肝左叶。

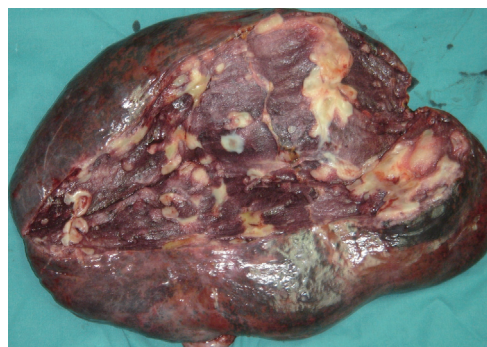


图6 所切除的右肝巨大血管瘤及部分剖面图。



图7 二期血管瘤切除术后腹部平坦。

定是否行二期手术(图1-2)。

2.2 二期手术 手术时间7.5 h,基本顺利,出血约1 200 mL,输血浆600 mL,悬浮红细胞600 mL。切除的右侧肝脏巨大血管瘤组织大小约45 cm×25 cm×25 cm(图3-6),胆囊附着其上。术后病理:肝脏海绵状血管瘤。

术后送入ICU加强监护1 d,次日转回肝胆外科普通病房。术后曾出现肝功能不全、凝血机制差、右侧胸腔积液、腹腔大量渗液(最多时每日1 500 mL血性腹水)等,经积极保肝、补充血浆和白蛋白、补充凝血酶原复合物和纤维蛋白原、营养支持、抗感染等治疗,病情逐渐稳定、好转。1 wk后能进食少量流质饮食。10 d后食欲逐渐好转,纳食逐渐增多。术后10 d拆线,切口甲级愈合(图7)。术后16 d肝功能明显好转。术后19 d拔除腹腔引流管。术后20 d痊愈出院。出院前化验电解质、血糖正常,白蛋白34 g/L,总蛋白60 g/L,谷丙转氨酶71 U/L,谷草转氨酶59 U/L,

胆红素正常, WBC $5.5 \times 10^9/L$, RBC $3.7 \times 10^{12}/L$, PLT $363 \times 10^9/L$ 。在家休养3 mo后即可正常工作,无任何不适。至今健康。最近复查超声显示:肝脏实质内小血管瘤大小约2.6 cm×2.9 cm。化验血常规、肝功能及肾功能均正常。

3 讨论

巨大肝血管瘤可广泛破坏肝组织,导致肝功能进行性减退,有些还会引起消耗性凝血障碍^[2],所以对已确诊的巨大肝血管瘤应主张尽早积极手术治疗^[3-11]。但也有报道认为大部分肝脏大血管瘤趋于稳定,对于无症状者可定期复查,不予手术切除^[12,13]。

综合文献报道,总结肝血管瘤的手术指征有以下几点^[3-11]: (1)肿瘤直径 ≥ 10 cm; (2)肿瘤直径5-10 cm,位于肝脏边缘,有自发破裂的可能; (3)肿瘤生长较快,腹痛、腹胀等症状明显,或者腹部明显膨隆; (4)瘤体内出血、坏死、感染; (5)合并明显的贫血及血小板减少; (6)与肝癌不易鉴别; (7)多发性血管瘤,其中一处与以上符合。双侧肝叶血管瘤的外科治疗也同样遵循以上原

则. 由于双侧巨大肝血管瘤同时挤压破坏正常肝组织, 后果非常严重, 因此, 应尽早切除. 但是, 一次完全切除双侧巨大肝血管瘤难度很高、风险很大.

双侧肝叶巨大海绵状血管瘤的治疗理论上可采用: (1)切除左侧巨大血管瘤, 同时结扎右侧血管瘤的门静脉分支以缩小右侧病灶并增加健侧门静脉血供, 从而促进剩余健康肝组织增生, 3-6 mo后再切除右肝巨大血管瘤; (2)切除左侧巨大血管瘤, 同时结扎肝右动脉(或通向右肝血管瘤的动脉)以减慢肿瘤生长速度, 二期手术时再切除右肝巨大血管瘤; (3)切除左侧巨大血管瘤, 待患者康复后视具体情况可采用介入方法堵塞患侧病灶的门静脉或/和肝动脉分支, 从而增加健侧门静脉血流, 再择期行右侧巨大肝血管瘤切除术; (4)切除左肝巨大血管瘤, 再视残余正常肝组织的增生体积和患者肝功能状况择期行二期右肝巨大血管瘤切除术, 该方法避免了手术结扎或者介入封堵患侧肝动脉或门静脉分支而造成的肝功能损害或其他不良并发症(比如误栓胆道血管而造成胆道坏死等), 这是较为稳妥可靠的治疗方法, 本例患者即采用此种分期手术方法, 获得了良好的效果; (5)原位肝移植, 这是在患者因肝脏多发巨大血管瘤致肝功能严重失代偿并且无法手术切除的情况下才予以考虑的最后治疗方案.

本例患者仅剩余左内叶为主的少量正常肝组织, 如果同时切除左、右肝巨大血管瘤, 不但术中会大量失血, 而且术后残余肝组织太少, 患者肯定会因为术后肝功能衰竭而危及生命. 因此, 我们采取分期手术, 首先切除左肝巨大血管瘤, 右肝巨大血管瘤留待以后二期切除.

制定此手术方案的原因主要有以下几点: (1)遵循安全原则, 先易后难, 因为左侧血管瘤切除相对于右侧难度较小; (2)也考虑到右侧肝脏巨大血管瘤紧紧靠近胸壁和腹壁, 生长空间相对左肝血管瘤较狭小, 可能生长速度较左肝血管瘤较缓慢; (3)首先切除左肝巨大血管瘤后残余正常肝组织向左侧及下方再生空间相对较大; (4)等到左侧肝组织明显增生、体积变大、肝功能正常后, 再择期切除右肝巨大血管瘤; (5)由于介入封堵或者结扎右侧肝动脉或者门静脉分支可导致肝功能进一步受损, 并有可能导致异位栓塞等不良并发症, 本例没有在首次手术同时结扎右侧肝动脉或门静脉分支, 也没有在首次术后介入封堵右侧肝动脉或门静脉分支. 本例

患者由于术中失血较多, 两次手术中均收集自体血回输^[14]. 一般认为两次手术间隔3-6 mo为宜^[1]. 由于患者首次手术后残余健康肝组织体积很小, 术后再生缓慢, 为求得二期手术安全, 第二次手术距离第一次手术时间长达42 mo, 在此期间, 尽管肝左内叶明显增生变大, 但右肝巨大血管瘤也增大了1倍以上, 大大增加了二期手术难度. 在施行手术时, 有两种方法^[4,15-17]: 血管瘤剥除术(摘除术)和连带附近肝叶切除术. 一般采用沿血管瘤包膜进行血管瘤摘除术, 这样出血较少, 能够保存较多正常肝组织^[4,15-17]. 本例主要采用血管瘤摘除术, 同时也切除了部分相邻肝组织, 手术治疗效果非常满意. 通过本例患者, 我们认为对于双侧肝叶巨大血管瘤患者, 如果一次同时切除难度较大, 可以分期切除, 仍可获得良好疗效.

4 参考文献

- Moldovan B, Copotioiu C, Bud V, Toma L, Ghițescu I, Grigorescu B, Serac G, Munteanu M. [Two steps liver resection with right portal vein ligation for two giant hemangiomas of the left and right lobes] *Chirurgia* (Bucur) 2006; 101: 529-532
- Concejero AM, Chen CL, Chen TY, Eng HL, Kuo FY. Giant cavernous hemangioma of the liver with coagulopathy: adult Kasabach-Merritt syndrome. *Surgery* 2009; 145: 245-247
- Seo HL, Jo HJ, Sim MS, Kim S. Right trisegmentectomy with thoracoabdominal approach after transarterial embolization for giant hepatic hemangioma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3437-3439
- Belli G, D'Agostino A, Fantini C, Cioffi L, Belli A, Limongelli P, Russo G. Surgical treatment of giant liver hemangiomas by enucleation using an ultrasonically activated device (USAD). *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 236-239
- Ikegami T, Soejima Y, Taketomi A, Kayashima H, Sanefuji K, Yoshizumi T, Harada N, Yamashita Y, Maehara Y. Extracorporeal hepatic resection for unresectable giant hepatic hemangiomas. *Liver Transpl* 2008; 14: 115-117
- Erdogan D, Busch OR, van Delden OM, Bennink RJ, ten Kate FJ, Gouma DJ, van Gulik TM. Management of liver hemangiomas according to size and symptoms. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1953-1958
- 黄志强. 肝脏外科学. 北京: 人民军医出版社, 1996: 154-159
- 姜洪池, 陈孝平. 实用肝胆外科学. 北京: 科学出版社, 2003: 253-256
- 蔡守旺, 刘永雄, 黄志强, 冯玉泉, 周宁新, 顾万清, 张文智, 黄晓强. 肝海绵状血管瘤的诊断和治疗(附84例报告). *中华肝胆外科杂志* 2000; 6: 198-200
- 吴伯文, 吴孟超, 潘泽亚, 姚晓平, 杨广顺, 杨甲梅. 肝海绵状血管瘤的外科综合治疗. *中国普通外科杂志* 2000; 9: 52-54
- 张宏义, 何晓军, 刘晓鹏, 张希东, 张洪义, 冯志强. 肝巨大血管瘤的外科治疗. *肝胆外科杂志* 2004; 12: 410-412
- Ng WW, Cheung YS, Lee KF, Wong J, Yu SC, Lee

- PS, Lai PB. Is regular follow-up scan for giant liver haemangioma necessary? *Hong Kong Med J* 2007; 13: 353-358
- 13 Herman P, Costa ML, Machado MA, Pugliese V, D'Albuquerque LA, Machado MC, Gama-Rodrigues JJ, Saad WA. Management of hepatic hemangiomas: a 14-year experience. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 853-859
- 14 Li MH, Yan LN, Wang SR. Autologous transfusion with modified total hepatic vascular exclusion for extracapsular resection of giant hepatic cavernous hemangioma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 43-48
- 15 Singh RK, Kapoor S, Sahni P, Chattopadhyay TK. Giant haemangioma of the liver: is enucleation better than resection? *Ann R Coll Surg Engl* 2007; 89: 490-493
- 16 Hamaloglu E, Altun H, Ozdemir A, Ozenc A. Giant liver hemangioma: therapy by enucleation or liver resection. *World J Surg* 2005; 29: 890-893
- 17 Hazinedaroglu SM, Kayaoglu HA, Ali Yerdel M. Enucleation of centrally located giant hepatic hemangioma: report of two cases. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1213-1217

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5±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±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±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±0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4±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→23.5→24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿拉伯数字不移行!

成人活体肝移植受体术后呼吸系统并发症分析108例

章志军, 李波, 刘非, 魏永刚

章志军, 李波, 刘非, 魏永刚, 四川大学华西医院肝移植中心
四川省成都市 610041

作者贡献分布: 此课题由章志军、刘非、李波及魏永刚设计; 该研究由章志军查阅病历并完成初稿写作; 由章志军与刘非共同设计该研究方案; 由魏永刚负责数据分析; 李波对该研究方案进行再次修改并修改初稿; 章志军最后完善该文章。

通讯作者: 李波, 教授, 硕士及博士生导师, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院肝胆血管外科. cdlibo@medmail.com.cn
电话: 028-85422476

收稿日期: 2010-01-11 修回日期: 2010-03-18

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

Respiratory complications in adult-to-adult living donor liver transplant recipients: an analysis of 108 cases

Zhi-Jun Zhang, Bo Li, Fei Liu, Yong-Gang Wei

Zhi-Jun Zhang, Bo Li, Fei Liu, Yong-Gang Wei, Center for Liver Transplantation, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Professor Bo Li, Department of Liver and Vascular Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. cdlibo@medmail.com.cn

Received: 2010-01-11 Revised: 2010-03-18

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To investigate the types, incidence and risk factors of respiratory complications in adult-to-adult living donor liver transplant (AALDLT) recipients in the early postoperative stage (≤ 30 d).

METHODS: The clinical records for 108 patients who underwent AALDLT from March 2005 to September 2008 and had no respiratory diseases preoperatively were analyzed retrospectively to identify the types and incidence of respiratory complications and the risk factors for these respiratory complications.

RESULTS: Seventy-six patients (70.4%) developed at least one respiratory complication during the early postoperative period. The most frequent complication was pleural effusion ($n = 60$, 55.6%), followed by pneumonia ($n = 24$, 22.2%), atelectasis ($n = 12$, 11.2%), acute respiratory failure ($n = 6$, 5.6%), pulmonary edema ($n = 3$, 2.8%), and pneumothorax ($n = 2$, 1.9%).

Compared to the patients who did not develop these problems, the affected cohort required more intraoperative transfusion ($P < 0.05$ or 0.01) and longer time to extubation ($P = 0.003$). The total mortality rate was 9.3%. The patients who developed pneumonia showed a significantly higher mortality (25% vs 4.8%, $P = 0.008$) than those who did not.

CONCLUSION: Pleural effusion, pneumonia and atelectasis are common respiratory complications in AALDLT recipients in the early postoperative stage, which are related to more intraoperative transfusion and longer time to extubation. Patients who develop pneumonia have a poor prognosis.

Key Words: Living donor liver transplantation; Recipient; Respiratory complication

Zhang ZJ, Li B, Liu F, Wei YG. Respiratory complications in adult-to-adult living donor liver transplant recipients: an analysis of 108 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1169-1173

摘要

目的: 探讨活体肝移植受体术后早期(≤ 30 d)呼吸系统并发症的类型、发病率以及原因。

方法: 回顾性分析2005-03/2008-09四川大学华西医院施行的术前无呼吸系统疾病的成人活体肝移植患者108例的临床资料, 分析术后呼吸系统并发症(胸腔积液, 肺部感染, 肺不张, 呼吸衰竭, 肺水肿, 气胸)发生可能的相关因素。

结果: 共76例发生了至少1种以上呼吸系统并发症, 发生率为70.4%, 胸腔积液($n = 60$, 55.6%), 肺部感染($n = 24$, 22.2%), 肺不张($n = 12$, 11.2%), 呼吸衰竭($n = 6$, 5.6%), 肺水肿($n = 3$, 2.8%), 气胸($n = 2$, 1.9%)。与未发生并发症组相比较, 发生组术中输血量明显增加($P < 0.05$ 或 0.01), 术后拔除气管插管的时间明显延长($P = 0.003$)。术后早期的总死亡率为9.3%, 发生肺部感染患者的早期死亡率明显高于未发生肺部感染患者(25% vs 4.8%, $P = 0.008$)。

结论: 胸腔积液、肺部感染、肺不张是活体肝移植术后常见的呼吸系统并发症, 并可能与

■背景资料

呼吸系统并发症作为肝移植术后的一个重要并发症, 发生率为64.0%-86.7%, 国外已经有较多的报道。但是, 之前的文献大多是基于尸体供肝肝移植的报道, 有关活体肝移植术后呼吸系统并发症报道很少。

■同行评议者

于聪慧, 教授, 中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科; 沈柏用, 副教授, 上海市交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

■研究前沿

有关活体肝移植术后呼吸系统并发症报道很少,国内缺乏大宗病例报道。本研究根据中国最大的活体肝移植中心的资料分析活体肝移植术后肺部并发症的发生情况。

术中大量输血输液、术后拔管时间有关,发生肺部感染患者的早期预后将较差。

关键词: 活体肝移植; 受体; 肺部并发症

章志军, 李波, 刘非, 魏永刚. 成人活体肝移植受体术后呼吸系统并发症分析108例. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1169-1173

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1170.asp>

0 引言

肝移植作为目前各种终末期肝病以及肝功能衰竭的唯一有效的治疗手段, 呼吸系统并发症作为肝移植术后的重要并发症, 发生率为64.0%-86.7%, 国外已经有较多的报道^[1-3]。但是, 之前的文献大多是基于尸体供肝肝移植的报道, 有关活体肝移植术后呼吸系统并发症报道很少^[4]。2002-01本院开始开展活体肝移植, 2005年开始在本院大规模的开展。本研究收集2005-03-01/2008-09-30在本中心连续施行的术前无呼吸系统疾病, 病例资料完整的108例成人活体肝移植患者, 回顾性分析术后早期(≤ 30 d)呼吸系统并发症的种类发生率以及可能的原因, 为临床上预防和治疗活体肝移植术后呼吸系统并发症提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-03-01/2008-09-30在四川大学华西医院肝移植中心接受成人活体肝移植术, 术前无呼吸系统疾病, 年龄 >18 岁, 病例资料完整的患者108例, 其中男86例, 女22例, 年龄19-63(中位年龄39)岁, 102例行活体右半肝移植(不含肝中静脉), 5例行活体双供肝, 1例行活体右半肝加尸体左半肝合成供肝肝移植。108例患者中肝硬化失代偿49例, 肝癌32例(14例同时有肝硬化), 重型肝炎19例, 其他8例。术前Child-Pugh分级C级65例、B级24例、A级19例。供受体均符合ABO血型配对原则。术后常规使用皮质激素+环孢素A(CsA)或他克莫司(FK506)+骁悉(良性疾病)或硫唑嘌呤(恶性疾病), 部分肿瘤患者使用雷帕霉素; CsA或FK506剂量根据血药浓度进行调整, 肾功能不全者不用CsA或FK506。发生急性排斥反应时加大原有免疫抑制剂剂量, 加用甲强龙500 mg iv冲击治疗, 如无效者用OKT3激素冲击。全部供体均自愿无偿捐肝, 所有供者的捐赠行为均经医院伦理学委员会批准。

1.2 方法 所有患者均于术后连续7 d做床边彩超

探查肝周血管与胸水, 术后3 d持续监测肺动脉楔压, 住院期间每日检查呼吸系统的症状、体征、呼吸系统分泌物的量和性状, 发现异常行胸部X摄片、胸部CT, 痰培养、血培养, 胸水与支气管肺泡灌洗液培养, 病毒全套检查。根据病历资料, 分析呼吸系统并发症的发生情况, 临床观察的指标包括: 人口学资料(姓名、性别、年龄), 体质量指数(BMI), 术前诊断, 术前Child-Push分级, 术前以及术后48 h的血红蛋白、白蛋白、总胆红素、ALT、PT、APTT、FIB、PLT、Cr、WBC, 手术持续时间, 术中输血输液的量, 术后拔除气管插管的时间, ICU接受治疗的时间, 术后早期(≤ 30 d)的死亡率。根据患者是否发生呼吸系统并发症将患者分为两组。

肺部并发症的诊断标准: (1)胸腔积液与肺不张: 根据患者有或则无呼吸系统症状、体征+术后的彩超、胸部X光片或者胸部CT诊断。(2)肺部感染^[5]: 按照美国胸科学会2005年颁布修订的《HAP诊治指南》的标准施行。(3)呼吸衰竭^[6]: 有以下情况之一者可认为有呼吸衰竭: 在呼吸空气时, 动脉血氧分压 $\text{PaO}_2 < 8$ kPa; 任何时候动脉血二氧化碳分压 $\text{CO}_2 > 6$ kPa; 吸入氧浓度(O_2) $> 40\%$, $\text{O}_2 < 10.7$ kPa; 术后72 h上仍需要机械通气者。(4)肺水肿: 肺摄氧功能减退, 可有或无两肺湿罗音、咳嗽咳白色泡沫或粉红色泡沫痰, 并且X线胸片有肺水肿征象。(5)气胸: 患者有或者无呼吸系统症状、体征+胸部X片表现符合气胸表现。

统计学处理 所有数据均应用SPSS13.0统计软件处理, 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 符合正态性与方差齐性的计量资料用成组设计的 t 检验, 否则则用Mann-Whitney U检验; 根据适用条件分类资料用 χ^2 检验和连续校正 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 肺部并发症的发生 108例活体肝移植受体中, 76例发生了呼吸系统并发症(部分患者同时并发几种呼吸系统并发症), 发生率为70.4%。胸腔积液60例(55.6%), 胸腔积液以为右侧居多40例, 双侧14例, 左侧较少6例, 其中行胸腔穿刺的18例, 2例因为合并气胸行胸腔闭式引流, 2例因为胸腔穿刺抽液困难行单腔静脉导管引流, 胸腔积液最早于术后24 h即开始出现, 大部分胸腔积液于术后72小时出现, 所有胸腔积液均治愈(表1)。肺部感染24例(22.2%), 24例肺部感染通过痰培养、血培养、胸水与支气管肺泡灌洗液

表 1 呼吸系统并发症的类型及发生率

呼吸系统并发症	发生率(%)
胸腔积液	60(55.6)
右侧	40(37.0)
左侧	6(5.6)
双侧	14(13.0)
肺部感染	24(22.2)
右侧	6(5.6)
左侧	2(1.9)
双侧	16(14.7)
肺不张	12(11.2)
右侧	7(6.5)
左侧	2(1.9)
双侧	3(2.8)
急性呼吸衰竭	6(5.6)
肺水肿	3(2.8)
气胸	2(1.9)

表 2 肺部感染的病原菌

病原	n
细菌	23
铜绿假单胞菌	6
α -溶血性链球菌	5
肺炎克雷伯杆菌	4
金葡球菌	3
大肠埃希氏菌	2
鲍曼溶血不动杆菌	2
流感嗜血杆菌	1
真菌	4
酵母菌	2
白色念珠球菌	1
曲霉菌	1
病毒	1
巨细胞病毒	1

注: 部分患者同时感染细菌和真菌。

■创新盘点

本研究在国内首次报道了大样本活体肝移植术后肺部并发症的发生情况, 以及发生肺部并发症的危险因素, 肺部感染的常见病原菌等。

培养, 病毒全套检查都找到病原学证据, 病原菌包括细菌、真菌、病毒(CMV), 其中有部分患者为混合感染, 发生肺部感染24例中, 其中6例术后早期(≤ 30 d)死亡, 3例因为继发呼吸衰竭经过持续机械通气、气管切开等治疗无效死亡, 2例因为继发肾功能不全透析治疗无效死于多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 1例死于感染性休克脓毒血症(表2)。肺不张12例(11.2%), 肺不张与胸腔积液一样多发生于右下肺, 多为压迫性肺膨胀不全。呼吸衰竭6例(5.6%), 4例继发于肺部感染, 其中3例死亡, 1例经过呼吸机持续机械通气、气管切开等治疗后治愈; 3例术后连续72 h不能脱离呼吸机, 3例都发生肺部感染, 经过气管切开等积极治疗后治愈; 1例继发于肺水肿, 最后治疗无效死亡。肺水肿3例(2.8%), 1例患者因为心功能不良发生, 最后该患者又继发了呼吸衰竭而死亡; 2例因为血容量过度, 合并急性肾功衰, 经透析后全部治愈。气胸2例(1.9%), 且2例都合并胸腔积液, 都有放置中心静脉导管史, 最后经过胸膜腔闭式引流后治愈。未发生呼吸系统并发症组4例死亡, 1例死于心功能不全肺水肿后呼吸衰竭, 1例死于急性排斥, 1例死于血管并发症, 1例死于上消化道大出血后肾衰竭继发MODS。

2.2 发生与未发生呼吸系统并发症组临床观察指标的比较 对发生呼吸系统并发症与未发生呼吸系统并发症组在年龄分布、性别、术前诊断、术前Child-Push分级、BMI、手术时间、术前和术后48 h内的各种化验指标以及术后免

疫方案等比较分析表明: 两组差异无统计学意义。进一步分析发现, 发生呼吸系统并发症组的术中输血, 包括输入新鲜冰冻血浆($1\,467.4\text{ mL} \pm 988.2\text{ mL}$ vs $1\,081.2\text{ mL} \pm 495.3\text{ mL}$, $P=0.026$)与红细胞悬液($2\,185.9\text{ mL} \pm 1\,840.9\text{ mL}$ vs $1\,186.6\text{ mL} \pm 726.6\text{ mL}$, $P=0.001$)均增加, 术中总共输血量明显增加($7\,957.6\text{ mL} \pm 3\,380.8\text{ mL}$ vs $6\,231.2\text{ mL} \pm 2\,049.8\text{ mL}$, $P=0.015$), 术后拔除气管插管的时间明显延长($39.1\text{ h} \pm 32.6\text{ h}$ vs $23.4\text{ h} \pm 7.0\text{ h}$, $P=0.003$), 且差别有统计学意义(表3)。发生肺部感染患者与未发生肺部感染患者相比较术后早期(≤ 30 d)死亡率(25% vs 4.8%, $P=0.008$)增高, 差异有统计学意义。

3 讨论

本研究资料提示, 活体肝移植术后早期的呼吸系统并发症的发生率为70.4%, 胸腔积液是活体肝移植术后最常见的呼吸系统并发症, 早期发生率为55.6%; 肺部感染是活体肝移植术后严重的肺部并发症, 早期发生率为22.2%, 发生后的早期死亡率25%。本组资料提示术中大量的输血输液、术后拔管时间与活体肝移植术后肺部并发症有关。大量输血输液, 肺部的容量负荷加大, 很容易发生肺水肿、肺动脉高压^[8], 加之大量出血后输血引起的缺血再灌注损伤, 这些都容易导致肺损伤而易于发生肺部并发症。术后延迟拔除气管插管与重要脏器功能不全、全身衰竭和感染等有关。因此, 在条件允许的情况下, 应该尽可能地减少术中输血输液的量, 尽早拔除气

■应用要点

本研究结果提示胸腔积液、肺部感染、肺不张是活体肝移植术后常见的呼吸系统并发症,并可能与术中大量输血输液、术后拔管时间有关,发生肺部感染患者的早期预后将较差。该结果为临床上防治活体肝移植术后肺部并发症提供了一定的理论依据及实践指导。

表 3 呼吸系统并发症的危险因素

危险因素	并发症组 (n = 76)	无并发症组 (n = 32)	P值
年龄(岁)	44.2 ± 9.3	41.3 ± 8.1	0.156 ^M
性别(男/女)	60/16	26/6	0.786 ^N
Child-Pugh分级			
A	14(18.4%)	5(15.6%)	0.727 ^N
B	16(21.1%)	8(25.0%)	0.652 ^N
C	46(60.5%)	19(59.4%)	0.911 ^N
移植前疾病			
肝硬化	32(42.1%)	17(53.1%)	0.294 ^N
肝癌	23(30.3%)	9(28.1%)	0.824 ^N
重型肝炎	15(19.7%)	4(12.5%)	0.367 ^N
其他	6(7.9%)	2(6.3%)	1.000 ^N
体质量指数	21.1 ± 2.2	21.8 ± 1.9	0.470 ^M
手术时间(h)	11.5 ± 2.1	11.9 ± 2.7	0.471 ^M
术中输血输液量			
全血/红悬 (mL)	2 185.9 ± 840.9	1 186.6 ± 726.6	0.001 ^M
新鲜冰冻血浆 (mL)	1 467.4 ± 988.2	1 081.2 ± 495.3	0.026 ^M
液体总量(mL)	7 957.6 ± 3 380.8	6 231.2 ± 2 049.8	0.006 ^M
机械通气时间(h)	39.1 ± 32.6	23.4 ± 7.0	0.003 ^M
ICU住院时间(d)	17.2 ± 7.4	15.7 ± 6.1	0.353 ^M

^Mt检验或秩和检验; ^N卡方检验或连续校正的卡方检验。

管插管,鼓励患者咳痰,尽早建立患者的自主呼吸,这对降低患者术后肺部并发症是重要的。

之前多数报道^[9,10]认为胸腔积液是尸体肝移植术后最常见的肺部并发症。跟之前文献的报道吻合,本研究证实胸腔积液仍是活体肝移植术后最常见的呼吸系统并发症,其特点为:发生率较高,108例患者中60例早期产生胸腔积液,早期发生率高达55.6%发生部位以右侧多见,资料显示60例患者术后早期发生胸腔积液,其中40例为右侧。产生的时间较早,本资料显示最早于术后24 h即开始产生胸腔积液,多数于术后72 h产生。产生原因可能与手术中对右侧膈肌的刺激、术后低蛋白血症、腹水反流等有关。幸运的是这些并发症通常是自限性的,大多不需处理,但Mack等的报道^[7]认为持续胸腔积液不处理会导致严重的后果。关于胸腔积液的治疗,我们的经验是中等量以上胸腔积液产生呼吸压迫症状和(或)有体温升高才考虑行穿刺治疗(同时胸水送检),以缓解压迫、明确可能存在的病原菌;而有些患者甚至需要行多次穿刺治疗或置管引流。本组中,行胸腔穿刺18例,2例因为合并气胸

行胸腔闭式引流,2例因为胸腔穿刺抽液困难放置单腔静脉导管引流。胸水的产生原因主要是手术中对膈肌的刺激、腹水反流、低蛋白血症,因此术中减少对膈肌的刺激,积极的补充白蛋白,膈下的充分引流对减少胸腔积液的发生有积极的意义。

感染并发症被称之为实体器官移植术后威胁生命的并发症,肺部作为占主导的感染部位,有较高的发生率^[11]。国外报道肝移植术后并发肺部感染死亡率为36%-60%^[1,2],发生肺部感染后患者的预后将变差。本组资料中早期肺部感染的发生率为22.2%,早期死亡率为25%,同时这部分患者的术后拔除气管插管的时间明显延长,术中输血输液量明显增加。致病菌以绿脓假单胞菌、鲍曼溶血不动杆菌、肺炎克雷伯杆菌等革兰氏阴性菌为主,且多为耐超广谱β-内酰胺酶的细菌,同时有真菌混合感染,混合真菌感染患者的预后将很差,本组中4例患者并发细菌与真菌混合感染,其中3例死亡。病毒感染表现不典型,诊断困难,在抗细菌真菌治疗无效时应该想到病毒感染的可能。本组中1例患者术后表现为发热、全身不适等症状,胸片表现为双肺弥漫性浸润,经过抗细菌真菌治疗疗效不佳,后来加用抗病毒药患者病情得到控制并治愈,最后证实为巨细胞病毒感染。所以活体肝移植受术中应在可能的情况下尽量减少输血输液,术后应在条件许可的情况下尽可早拔除气管插管,吸痰以及护理时加强无菌操作,尽早恢复患者的自主呼吸;术后早期选用广谱抗生素预防感染,一旦发生肺部感染应经验应用抗菌药物,同时要考虑到合并真菌混合感染与病毒感染的可能,同时还应尽早取得标本送培养加药敏试验,取得病原学证据,有针对性的抗感染治疗。

肝移植术后肺不张常由于长时间手术、麻醉剂残留、术后手术伤口疼痛影响咳嗽、咳痰致痰阻或胸腔积液压迫引起;亦有报道^[6]肝移植术后在拔除气管插管后由于干燥的痰痂脱落导致气管阻塞而引起肺不张,这种情况常于拔除气管插管后数小时即发生,需要紧急处理。本组资料显示,多数肺不张是由于胸水的压迫导致的压迫性肺不张;另外本组资料经过统计分析提示术中大量的输血输液、术后拔管时间的延长与肺部并发症有关,这些因素导致肺部感染增加(具体机制上面已提),肺部感染时局部分泌物、痰液等增加使局部阻塞而导致肺不张发生。发生肺不张后,积极的治疗胸水,积极的行痰液引流,包

括各种化痰排痰措施。总之,肺不张重在预防,措施包括:胸部理疗、雾化吸入稀释痰液、适当止痛、加强营养、鼓励咳嗽、咳痰,积极治疗肺部感染,必要时可予纤维支气管镜吸痰。

Golfieri等^[2]与Snowden等^[8]报道了尸体肝移植术后肺水肿发生率14%-47%,而Hong等^[4]基于包含120例次活体共计131例次(11例次为尸体肝移植)肝移植的研究报道的肺水肿发生率为4%。Snowden等认为肺水肿与术中失血量、术中的液体输注量有关,也有报道^[12]认为术后门脉高压的解除,使肺循环阻力增高和肺动脉高压,使术后早期极易发生肺水肿。本组中肺水肿的发生率为2.8%,与之前Snowden等报道的一样,其发生与术中的大量输血输液有关,其机制可能为:(1)大量的输注导致肺循环的负荷加重,加之门静脉等血流开放后使之前淤积在腹腔的血液亦大量的循环回心肺导致肺动脉压增加而导致肺水肿。(2)术中大量输血,特别是输异体血,大量的细胞碎片在肺毛细血管形成微小血栓,从而导致肺毛细血管楔压(pulmonary capillary wedge pressure, PCWP)升高,肺间质水肿发生。本组肺水肿3例中,1例患者因为心功能不良发生,最后该患者又继发了呼吸衰竭而死亡;2例因为合并急性肾功衰血容量过度,经透析后全部治愈。预防肺水肿发生,一方面尽量减少术中的输血,控制好输注液体的平衡,另一方面可以根据情况适当应用一些利尿、强心、扩血管药物防治。

郑树森等^[6]报道了尸体肝移植后呼吸衰竭的原因包括:术中膈肌的损伤、术后切口疼痛、术后胸腔积液、肺部感染、肺水肿等。本组活体肝移植的资料显示,术中的大量输血输液、术后拔管时间的延迟为术后肺部并发症的原因,且有统计学意义,其导致呼吸衰竭的可能机制如下:(1)大量的术中输血输液导致肺动脉压增高而导致肺水肿,使肺的摄氧功能减退而容易继发呼吸衰竭。(2)延迟拔管使得肺部感染发生率增高,肺部感染时气道分泌物的增加、咳嗽无力等将使患者容易发生呼吸衰竭。本组中有8例发生呼吸衰竭,4例继发于肺部感染,1例继发于肺水肿,3例术后72 h不能脱离呼吸机(可能跟患者术前的一般情况较差,肝肾功能不全有关),虽然经过透析、持续机械通气、气管切开、强力抗感染等治疗,乃有3例患者死亡,故应加强术后呼吸的预防。

本组2例气胸患者合并有胸腔积液,都有胸

穿与锁骨下静脉穿刺史,考虑可能与穿刺有关。

总之,本组资料提示活体肝移植术后早期呼吸系统并发症发生率较高(70.4%),并与术中大量输血输液、术后拔管时间有关。肺部感染作为术后早期严重的呼吸系统并发症,有较高的死亡率,采取有效措施尽可能减少危险因素,早期诊断早期治疗术后肺部感染性并发症对提高活体肝移植患者的早期预后是很重要的。

4 参考文献

- 1 Durán FG, Piqueras B, Romero M, Carneros JA, de Diego A, Salcedo M, Santos L, Ferreira J, Cos E, Clemente G. Pulmonary complications following orthotopic liver transplant. *Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1: S255-S259
- 2 Golfieri R, Giampalma E, Morselli Labate AM, d'Arienzo P, Jovine E, Grazi GL, Mazziotti A, Maffei M, Muzzi C, Tancioni S, Sama C, Cavallari A, Gavelli G. Pulmonary complications of liver transplantation: radiological appearance and statistical evaluation of risk factors in 300 cases. *Eur Radiol* 2000; 10: 1169-1183
- 3 Jensen WA, Rose RM, Hammer SM, Jenkins RL, Bothe A Jr, Benotti PN, Dzik WH, Costello P, Khettry U, Trey C. Pulmonary complications of orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1986; 42: 484-490
- 4 Hong SK, Hwang S, Lee SG, Lee LS, Ahn CS, Kim KH, Moon DB, Ha TY. Pulmonary complications following adult liver transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38: 2979-2981
- 5 American Thoracic Society Documents. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 388-416
- 6 郑树森, 卢安卫, 梁廷波, 王伟林, 沈岩, 张珉. 肝移植术后呼吸系统并发症的原因及对策. *浙江大学学报(医学版)* 2004; 33: 170-173
- 7 Mack CL, Millis JM, Whittington PF, Alonso EM. Pulmonary complications following liver transplantation in pediatric patients. *Pediatr Transplant* 2000; 4: 39-44
- 8 Snowden CP, Hughes T, Rose J, Roberts DR. Pulmonary edema in patients after liver transplantation. *Liver Transpl* 2000; 6: 466-470
- 9 Singh N, Gayowski T, Wagener MM, Marino IR. Pulmonary infiltrates in liver transplant recipients in the intensive care unit. *Transplantation* 1999; 67: 1138-1144
- 10 O'Brien JD, Ettinger NA. Pulmonary complications of liver transplantation. *Clin Chest Med* 1996; 17: 99-114
- 11 Kotloff RM, Ahya VN, Crawford SW. Pulmonary complications of solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 22-48
- 12 Zheng SS, Lu AW, Huang DS, Chen QL, Xu LZ. Functional changes of the heart and lung in perioperative period of orthotopic liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 335-339

■同行评价

本研究选题实用,对临床医师有较好的参考价值。

难治性溃疡性结肠炎与巨细胞病毒的关系

李甜甜, 吕宗舜, 王邦茂, 张洁

■背景资料

近年来, 国内外炎症性肠病的发病率逐渐增高, 随着发病率的增高, 对于常规治疗反应差或者无反应的患者随之增加。对标准剂量的激素反应差, 或减药过程中出现症状反跳, 或长期依赖激素且出现不良反应的患者称为难治性炎症性肠病。巨细胞病毒(CMV)属于疱疹病毒家族中的一员, 能够引起全胃肠道严重的临床疾病, 临床上严重的胃肠道CMV疾病通常发生在免疫受损的患者中, 在免疫正常人群中感染几乎很少报道, 目前许多学者认为巨细胞病毒感染是难治性炎症性肠病的原因之一。

李甜甜, 吕宗舜, 王邦茂, 张洁, 天津医科大学总医院消化科天津市 300052

作者贡献分布: 本论文写作由李甜甜完成, 吕宗舜设计及审校, 病历由王邦茂与张洁提供, 李甜甜完成数据分析。

通讯作者: 吕宗舜, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院消化科。lzsh_mail@tom.com

电话: 022-60362977

收稿日期: 2009-12-20 修回日期: 2010-03-15

接受日期: 2010-03-23 在线出版日期: 2010-04-18

Relationship between refractory ulcerative colitis and cytomegalovirus infection

Tian-Tian Li, Zong-Shun Lv, Bang-Mao Wang, Jie Zhang

Tian-Tian Li, Zong-Shun Lv, Bang-Mao Wang, Jie Zhang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Zong-Shun Lv, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China. lzsh_mail@tom.com

Received: 2009-12-20 Revised: 2010-03-15

Accepted: 2010-03-23 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To explore the relationship between refractory ulcerative colitis (UC) and cytomegalovirus (CMV) infection.

METHODS: Seventy-six patients with inflammatory bowel disease (IBD) diagnosed at Tianjin General Hospital from July 2000 to February 2009 were included in the study. According to the use of corticosteroid or not and therapeutic effect, these patients were divided into two groups: effective group and refractory group. Cytomegalovirus (CMV) infection of the colon was evaluated by immunohistochemistry.

RESULTS: Eleven patients, including three males and eight females, were positive for CMV, while sixty-five patients, including forty males and twenty-five females, were negative for CMV. Of CMV-positive patients, nine belonged to the refractory group, and two belonged to the effective group. The percentage of CMV-positive patients was significantly higher in the refractory group than in the effective group ($P < 0.05$).

CMV-positive patients often suffered from high fever, cervical lymphadenopathy, and splenomegaly. No significant difference was noted in endoscopic and pathological manifestations in patients between the effective group and refractory group. Despite diverse clinical manifestations, abdominal pain and diarrhea were main ones observed in this study. Two CMV-positive patients underwent colectomy due to the occurrence of complication.

CONCLUSION: Refractory inflammatory bowel disease is related to CMV infection. The course of IBD may become more complicated in the presence of CMV infection. It remains to be investigated whether antiviral therapy can improve the sensitivity to corticosteroid therapy in IBD patients with CMV infection.

Key Words: Refractory inflammatory bowel disease; Ulcerative colitis; Cytomegalovirus; Antiviral therapy

Li TT, Lv ZS, Wang BM, Zhang J. Relationship between refractory ulcerative colitis and cytomegalovirus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1174-1177

摘要

目的: 探讨难治性溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染的关系, 提高对该病的认识和治疗水平。

方法: 收集2000-07/2009-02在天津医科大学总医院诊治的76例溃疡性结肠炎患者。根据是否使用激素及其治疗效果, 将患者分为有效组和难治组, 对两组患者进行相关临床资料的比较, 同时对其内镜活检组织进行免疫组织化学染色。

结果: CMV-negative患者共65例, 其中男40例, 女25例; CMV-positive患者共11例, 其中男3例, 女8例。CMV-positive患者中, 难治组为9例, 有效组为2例, 两组之间的差异有统计学意义, 且出现高热, 颈淋巴结肿大, 脾肿大等症状和体征的IBD患者与CMV-positive组有关。内镜及病理表现, 难治组与有效组相似。在此研究病

■同行评议者

崔立红, 主任医师, 中国人民解放军海军总医院消化内科

例中, 临床表现比较多样, 仍以腹泻腹痛为主, 其中2例因出现并发症而行结肠切除术, 均在CMV-positive组。

结论: 难治性溃疡性结肠炎与CMV感染有一定关系, CMV可以使难治性溃疡性结肠炎的病程变复杂, 出现激素抵抗, 但进行抗病毒治疗能否改善激素的敏感性, 有待进一步考证。

关键词: 难治性炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 巨细胞病毒; 抗病毒治疗

李甜甜, 吕宗舜, 王邦茂, 张洁. 难治性溃疡性结肠炎与巨细胞病毒的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1174-1177
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1174.asp>

0 引言

近年来, 国内外炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发病率逐渐增高, 随着发病率的增高, 对于常规治疗反应差或者无反应的患者随之增加。对标准剂量的激素反应差, 或减药过程中出现症状反跳, 或长期依赖激素且出现不良反应的患者称为难治性IBD^[1]。据文献^[2]报道, 有30%-60% IBD患者为难治性或者激素依赖性, 其中部分患者甚至对补救措施所使用的免疫抑制剂, 如硫唑嘌呤(azathioprine, AZA)、6-巯基嘌呤(mercaptopurine, MP)、环孢素A(cyclosporin A, CsA)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)单克隆抗体亦无反应。目前如何处理难治性IBD成为临床医师面临的一大难题。巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)属于疱疹病毒家族中的一员, 发生在40%-100%的成人中, 大部分感染并没有临床症状出现, 通常有终身的潜伏期, 但CMV能够引起全胃肠道严重的临床疾病, 临床上严重的胃肠道CMV疾病通常发生在免疫受损的患者中^[3], 然而在免疫正常人群中感染几乎很少报道, 目前许多学者认为巨细胞病毒感染是难治性IBD的原因之一。

1 材料和方法

1.1 材料 2000-07/2009-02在我院诊疗的IBD患者76例, 全部为溃疡性结肠炎, 其中男38例, 年龄26-58(平均年龄为38.5±11)岁, 女为38例, 年龄18-47(平均年龄为40±10.5)岁, 所有患者均在临床症状、影像学、结肠镜和病理结果的基础上进行诊断, 符合中华医学会消化分会的IBD诊断标准^[4], 并且通过Truelove-Witts^[5]指标, 均为中-重度病情的患者。76例患者均没有使用过激素、免

疫抑制剂等治疗, 经免疫全项检查均为免疫正常患者, 所有患者均行全面的病史采集以及身体检查, 特别注意CMV疾病的症状和体征, 包括高热, 淋巴结疾病, 脾肿大。根据激素使用情况及治疗结果, 将患者分为有效组和难治组。使用激素后临床症状消失或部分缓解者(每天大便≤4次, 少量脓、血和黏液; 腹痛每天发作少于4次; 无发热、体质量减轻和肠外症状)^[2]归为有效组, 符合下列情况之一的患者归为难治组: (1)静脉注射激素无效者(氢化可的松100 mg, 每天3次, 5-7 d); (2)改为口服激素后症状加重者; (3)口服泼尼松30-40 mg/d不能减量者。难治组及有效组均使用5-氨基水杨酸治疗, 剂量为1 g, tid。

1.2 方法

1.2.1 电子结肠镜: 所有患者均行电子结肠镜检查, 所用的电子结肠镜为Olympus CF-Q260AL, 结肠镜检查中发现病变部位取活检, 做病理检查。

1.2.2 免疫组织化学染色: 将所取活组织行免疫组织化学染色, 抗人巨细胞病毒UL49蛋白抗体及SP试剂盒均购于北京博奥森生物技术有限公司, 方法按说明书进行。标本中出现“鹰眼”包涵体为巨细胞病毒感染阳性。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件, 计量资料以mean±SD表示, 组间比较采用t检验; 计数资料以例数和百分率表示, 组间比较采用卡方检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床表现 难治组中25(83.33%)例有腹泻症状, 多为黏液脓血便, 每天4-8次不等, 偶达10余次, 最多达数十次。20例(66.67%)腹痛, 痛则泻, 泻后痛减, 疼痛多以胀痛为主, 多为固定, 多局限在左下腹或左腰腹部, 持续隐痛者也不少见。4例(13.3%)以便血为主诉。全身症状中, 19例(63.33%)有发热症状; 7例(23.33%)出现肌痛, 5例(16.67%)频发口腔溃疡。有效组多数患者表现为腹痛、腹泻、便血或者黏液脓血便, 少数表现为便秘。全身症状表现为发热、关节脊柱酸痛、口腔溃疡。

2.2 染色结果及临床资料 免疫组织化学染色后CMV阳性患者11例, 其中女8例, 男3例; CMV阴性患者65例, 其中男40例, 女25例, 两组之间性别、发热、颈淋巴结肿大、脾肿大、全结肠炎分布差异有统计学意义(表1)。难治组中CMV阳性患者11例, 有效组中CMV阳性患者2例, 两组之间差异有统计学意义(表2)。

■研发前沿

近年来, 国内外IBD的发病率逐渐增高, 随着发病率的增高, 对于常规治疗反应差或者无反应的患者随之增加。目前如何处理难治性IBD成为临床医师面临的一大难题。

■相关报道

Maha等认为CMV免疫组织化学是明显敏感的检查方法, 在进行其他药物治疗或者外科治疗前应该作为常规评价难治性IBD患者的一部分, 一旦CMV被治疗, 也许这些治疗将不被需要。

■创新盘点

本文对溃疡性结肠炎CMV阳性组、阴性组以及难治组、有效组的临床资料分别进行总结对比,得出难治性溃疡性结肠炎与CMV感染有关,但进行抗病毒治疗能否改善激素的敏感性,有待进一步考证。

表 1 CMV阳性组与阴性组临床资料对比

参数	CMV阳性(<i>n</i> = 11)	CMV阴性(<i>n</i> = 65)	<i>P</i> 值
年龄	41.5 ± 13	45 ± 11	0.3500
性别(女)	8(72.73%)	25(38.46%)	0.0340 ^a
疾病持续时间	33.5 ± 12.3	41 ± 16.2	0.1478
肌痛	7/11	36/65	0.3500
发热(℃)	38 ± 3.1	36.5 ± 0.9	0.0017 ^a
颈淋巴结肿大	5/11	0/65	6.83E-07 ^a
脾肿大	2/11	0/65	0.014 ^a
全结肠炎	8/11	2/65	3.40E-09 ^a
激素抵抗	9/11	21/65	
需行手术治疗	2/11	0/65	

^a*P* < 0.05.

表 2 难治组与有效组临床资料对比

参数	难治组(<i>n</i> = 30)	有效组(<i>n</i> = 46)
CMV-positive	9/30	2/46 ^a
年龄	38.5 ± 16	41 ± 7
女性/男性	19/11	19/27
疾病持续时间	33.5 ± 16.5	40 ± 11.3
激素使用时间	17 ± 2.5	11 ± 6
病变范围		
全结肠炎	8	2
左半结肠炎	13	18
直乙状结肠炎	9	26

$\chi^2 = 9.6524$, *P* < 0.05.

2.3 内镜表现 难治组病变呈连续性改变,结肠黏膜充血、水肿,血管纹理模糊,接触性出血,弥漫分布表浅不规则溃疡。有效组内镜表现与难治组相似。两组直乙状结肠型、左半结肠型、全结肠型病变分布差异有统计学意义(表3, 4)。

2.4 病理结果 所有患者出现下列表现中的一项或者几项: (1)固有膜内有弥漫性、慢性炎症细胞及中性粒细胞、嗜酸性粒细胞浸润; (2)隐窝有急性炎症细胞浸润,尤其是上皮细胞间有中性粒细胞浸润及隐窝炎,甚至形成隐窝脓肿,可有脓肿溃入固有膜; (3)隐窝上皮增生,杯状细胞减少; (4)可见黏膜表层糜烂、溃疡形成和肉芽组织增生。

3 讨论

IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn disease, CD)。UC是其中一种重要类型,它是一种慢性复发性的大肠炎症,常

表 3 两组患者病变部位比较 *n*(%)

分组	<i>n</i>	直乙状结肠型	左半结肠型	全结肠型
难治组	30	8(26.67)	13(43.33)	9(30.00)
有效组	46	2(4.35)	18(39.13)	26(56.52)

表 4 卡方分割检验

病变部位	难治性	有效组	统计学处理	
			组比	χ^2 值
直乙状结肠型(1)	8	2	1: 2	4.3847
左半结肠型(2)	13	18	1: 3	9.7509
全结肠型(3)	9	26	2: 3	1.9470
χ^2 值	9.7204			

P < 0.05.

常发生在直肠、结肠下段,也会影响到整个结肠。其病因和发病机制尚不清楚,近几年发病率较前明显升高,且各个年龄组发病率具有同步增加趋势,尤以青少年和老年人为主。目前主要以药物治疗为主,手术主要是处理并发症。资料显示,34%-45%的UC患者需使用糖皮质激素治疗,但长期疗效并不令人满意。难治性IBD目前国际上尚无统一定义。检索PubMed多数文献以steroid-resistant(激素抵抗)/stero-dependent(激素依赖)/steroid-refractory(激素难治性)为关键词讨论临床治疗比较困难的IBD。2006年欧洲克罗恩病和结肠炎组织(ECCO)的CD诊治共识^[6]将皮质类固醇激素依赖的(corticosteroid-dependent)及皮质类固醇激素难治的(corticosteroid-refractory)的CD单独进行了论述。因此,本文中难治性IBD患者是指激素依赖性患者或者激素治疗无效患者。CMV感染对获得性免疫功能丧失综合征、接受器官移植、恶性肿瘤的患者,或者经过化学疗法或者激素治疗的患者来说是一种常见的引起结肠炎的病因^[7]。几乎1/3的骨髓移植或者器官移植的患者会感染CMV疾病^[8]。相反,此类疾病在免疫力正常宿主中很少报道。许多学者认为CMV感染是难治性肠病的原因之一,据文献[3]报道,在IBD患者中出现下列情况考虑CMV感染: (1)出现系统症状和体征比如高热,呼吸困难,淋巴结疾病或者脾肿大; (2)对于激素治疗无反应的肠病; (3)使用免疫抑制剂后出现短暂的症状改善,之后临床症状进一步恶化。在胃肠道,CMV可以发生在任何部位,从口腔到直肠,通常形成黏膜溃疡伴随出血。在结肠,CMV可以

■应用要点

本文进一步证实了难治性溃疡性结肠炎与CMV的关系,对于临床表现及内镜、病理检查做了对比分析,对于难治性溃疡性结肠炎的诊治有较大的帮助。

引起腹泻, 便血, 里急后重, 腹痛, 并且常伴有发热, 不适, 食欲减退和体质量下降。IBD患者成为获得CMV感染的高危人群有很多原因, 首先, 这些IBD患者经常使用免疫抑制剂治疗比如皮质类固醇, 硫唑嘌呤, 6-巯基嘌呤, 环孢素A或者甲氨蝶呤; 并且, 炎症本身也可能是一种诱病因素, 已有报道证实CMV对于肉芽组织的增生细胞有趋向性。期间虽然对感染CMV的IBD患者的流行病学数据进行了大量观察研究, 仍尚不能确定CMV对这些患者确切的致病作用, 有一些学者描述CMV为无致病作用的“旁观者”作用于肠, 另外一些学者称CMV在诱发炎症反应的过程中起到重要作用, 并且会引起一些并发症。近几年, IBD与CMV感染之间的关系偶有报道, 在这些患者中特别是难治性肠病的患者, 在结肠镜活检标本或者手术切除的结肠病理检查中已经发现CMV^[9], UC患者伴有中毒性巨结肠或者因紧急处理而行结肠切除术所得到的一些结肠组织活检标本中的CMV高流行性也提示CMV可能会导致IBD的恶化^[7]。CMV感染可能会加重难治性IBD的病程, 使这些患者对激素治疗没有反应或者出现病情恶化。在难治性IBD的患者中, CMV感染必须在大量使用免疫抑制剂来治疗激素抵抗或者行结肠切除术前被排除, 特别是要考虑使用长效的免疫抑制剂包括单克隆抗体中的抗-TNF抗体(英夫利昔单抗), 因为这类药物的作用不是简单的终止治疗就能够很快地逆转。一些文献的综述中并没有断言当活检标本或者外周血中发现CMV时, 抗病毒治疗是必须的, 然而, 一些学者更赞成抗病毒治疗的使用^[10,11]。

在这组研究病例中, 我们选择了76例中-重度溃疡性结肠炎患者, 男女比例相等, 进行免疫组织化学染色后, CMV-negative患者共65例, 其中男40例, 女25例; CMV-positive患者共11例, 其中男3例, 女8例。CMV-positive患者中, 难治组有9例, 有效组为2例, 两组之间的差异有统计学意义, 可以认为CMV阳性相比较下容易出现在难治组中, 认为难治性肠病与CMV有一定关系, 且出现高热, 颈淋巴结肿大, 脾肿大等症状和体征的IBD患者与CMV-positive组有关。内镜及病理

表现, 难治组与有效组无明显差异。在此研究病例中, 临床表现比较多样, 仍以腹泻腹痛为主, 多为黏液脓血便, 每天4-8次不等, 偶达10余次, 最多达数十次, 其中2例因出现并发症而行结肠切除术, 均在CMV-positive组。

总之, 考虑难治性UC与CMV感染有关, 但进行抗病毒治疗能否改善激素的敏感性, 有待进一步考证, 应展开更多的研究调查, 以进一步完善对此病的诊断和治疗。

4 参考文献

- 1 陈隆典. 难治性炎症性肠病的治疗对策. 胃肠病学 2005; 10: 53-56
- 2 Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 1994; 35: 360-362
- 3 Papadakis KA, Tung JK, Binder SW, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, Vasilias EA. Outcome of cytomegalovirus infections in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2137-2142
- 4 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. 胃肠病学 2001; 6: 56-59
- 5 Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2: 1041-1048
- 6 Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Schölmerich J, Reinisch W. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006; 55 Suppl 1: i1-i15
- 7 Goodgame RW. Gastrointestinal cytomegalovirus disease. *Ann Intern Med* 1993; 119: 924-935
- 8 de la Hoz RE, Stephens G, Sherlock C. Diagnosis and treatment approaches of CMV infections in adult patients. *J Clin Virol* 2002; 25 Suppl 2: S1-S12
- 9 Vega R, Bertrán X, Menacho M, Domènech E, Moreno de Vega V, Hombrados M, Cabré E, Ojanguren I, Gassull MA. Cytomegalovirus infection in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1053-1056
- 10 Rahbar A, Boström L, Lagerstedt U, Magnusson I, Söderberg-Naucler C, Sundqvist VA. Evidence of active cytomegalovirus infection and increased production of IL-6 in tissue specimens obtained from patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 154-161
- 11 Mendez JC, Espy MJ, Smith TF, Wilson JA, Paya CV. Evaluation of PCR primers for early diagnosis of cytomegalovirus infection following liver transplantation. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 526-530

■同行评价

本研究选题结合临床问题, 有一定参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

特发性结肠坏死穿孔32例

李杨

■背景资料

特发性结肠坏死穿孔临床罕见, 患者平均发病年龄为70岁, 男女发病率相仿, 约60%的患者有便秘史, 其确切病因尚不清楚。

李杨, 贵州省人民医院胃肠外科 贵州省贵阳市 550002
通讯作者: 李杨, 主治医师, 550002, 贵州省贵阳市, 贵州省人民医院胃肠外科. liyang168586@yahoo.com.cn
电话: 0851-5937710
收稿日期: 2010-01-08 修回日期: 2010-03-20
接受日期: 2010-03-29 在线出版日期: 2010-04-18

Idiopathic perforation and necrosis of the colon: an analysis of 32 cases

Yang Li

Yang Li, Department of Gastrointestinal Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Correspondence to: Yang Li, Department of Gastrointestinal Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China. liyang168586@yahoo.com.cn

Received: 2010-01-08 Revised: 2010-03-20

Accepted: 2010-03-29 Published online: 2010-04-18

Abstract

AIM: To investigate the clinical features of idiopathic perforation and necrosis of the colon.

METHODS: The predisposing factors, clinical features and therapeutic outcomes in 32 cases of idiopathic perforation and necrosis of the colon were retrospectively analyzed.

RESULTS: Of 32 patients with idiopathic perforation and necrosis of the colon, 26 presented with sudden abdominal pain, and 6 suffered from abdominal pain or discomfort initially, which gradually developed into severe abdominal pain and abdominal distention. The average disease duration was 7.2 h. The disease clinically manifested as diffuse peritonitis in 26 cases (81.25%) and localized peritonitis in 6 cases. Twenty-three patients had a past history of habitual constipation. Only three patients were accurately diagnosed preoperatively, and 29 patients (81.25%) were misdiagnosed, of which 12 were misdiagnosed as acute appendicitis, 11 as upper digestive tract perforation, and 9 as strangulating intestinal obstruction. All patients underwent surgical treatment. The necrosis of

the ascending colon was confirmed in 2 patients, the necrosis of the transverse colon in 4 patients, and the necrosis of the descending colon and sigmoid colon in 26 patients. Twenty-six patients recovered and were discharged from the hospital, and six (18.75%) patients died, of which 4 died of infection and toxic shock, 1 of acute pulmonary embolism, and 1 of pulmonary infection and respiratory failure.

CONCLUSION: A careful review of past medical history, detailed physical examination, diagnostic paracentesis and CT examination are extremely important for accurate diagnosis of idiopathic perforation and necrosis of the colon. Early surgery is essential for good results.

Key Words: Intestine; Necrosis; Perforation; Colonic disease

Li Y. Idiopathic perforation and necrosis of the colon: an analysis of 32 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1178-1181

摘要

目的: 探讨特发性结肠坏死穿孔的临床特点。

方法: 回顾性分析32例特发性结肠坏死穿孔患者的发病诱因、临床特点和疗效。

结果: 32例患者中, 以突发腹痛就诊26例, 另6例先有腹部隐痛不适, 渐发展为全腹痛, 伴有腹胀。平均病程7.2 h。临床表现为弥漫性腹膜炎26例(81.25%), 局限性腹膜炎6例。23例既往有习惯性便秘史。术前仅确诊3例, 误诊29例(81.25%), 其中误诊为急性阑尾炎穿孔12例, 上消化道穿孔11例, 绞窄性肠梗阻9例。所有病例均行手术治疗, 术中证实升结肠坏死2例, 横结肠坏死4例, 降结肠及乙状结肠坏死26例。26例痊愈出院; 死亡6例(18.75%), 4例死于感染中毒性休克, 1例死于急性肺栓塞, 1例死于并发肺部感染、呼吸衰竭。

结论: 仔细采集病史、详细体格检查、诊断性腹穿及CT检查对本病诊断极为重要; 及早手术是治疗的根本措施, 应正确处理坏死穿孔

■同行评议者

秦环龙, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院外科

部位、彻底清洗腹腔,术后充分引流。

关键词: 肠; 坏死; 穿孔; 结肠疾病

李杨. 特发性结肠坏死穿孔32例. 世界华人消化杂志 2010; 18(11): 1178-1181

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1178.asp>

0 引言

特发性结肠坏死穿孔系指正常肠管在无任何病变(肿瘤、憩室、粘连)或外伤的情况下,发生坏死穿孔而导致继发性腹膜炎。本病临床少见,多发于老年人,是老年人急腹症的原因之一。因其缺乏特异性临床表现,极易误诊,延误治疗,死亡率较高。为探讨特发性结肠坏死穿孔的临床特点,本研究对我院1990-01/2009-12收治的特发性结肠坏死穿孔32例进行回顾性分析,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 32例患者中,男19例,女13例,男女比为1.4:1,年龄62-90(平均69.2)岁,其中61-70岁16例,71-80岁14例,81-90岁2例。所有患者均无克罗恩病、慢性溃疡性结肠炎等炎症性肠病,无长期服用激素史。23例既往有习惯性便秘史,24例体型肥胖,17例有高血脂,16例有高血压史。

1.2 方法 分析所有患者的发病症状、阳性体征、诱因、辅助检查、治疗方法及效果。

1.2.1 临床特点: 以突发腹痛就诊26例(81.2%),18例(56.3%)有腹内压增高诱因,如在用力咳嗽、屏气排便等后发生,3例(9.4%)服用泻剂,余5例(15.6%)无明显诱因。表现为突发左下腹痛,进行性加重并迅速蔓延至全腹15例(46.8%),突发性脐周痛并向全腹蔓延8例(25%),较局限的左下腹痛3例(9.4%)。另6例(18.7%)先有上腹部隐痛不适,渐发展为全腹痛,伴有腹胀及排气、排便停止而就诊。病程1-22 h,平均7.2 h。所有患者入院时均有腹膜刺激征,左下腹或全腹压痛、反跳痛及肌紧张,肠鸣音减弱或消失,表现为弥漫性腹膜炎26例(81.25%),局限性腹膜炎6例(18.75%)。12例(37.5%)肛诊直肠内扪及大量质硬粪块。其中4例(12.5%)就诊时出现高热、呼吸急促、血压低于90/60 mmHg、脉搏在130次/min以上等感染性休克表现。23例(71.8%)既往有习惯性便秘史,24例(75%)体型肥胖,17例(53.1%)有高血脂,16例(50%)有高血压史。

1.2.2 辅助检查: 26例(81.2%)腹穿抽出黄色混浊

伴恶臭液体,无食物残渣,常规涂片见大量脓细胞。28例(87.5%)CT发现腹腔积液,20例(62.5%)发现腹腔游离气体,22例(68.7%)结肠扩张明显并有大量粪便贮积,9例(28.1%)见膈下游离气体,8例(25%)有麻痹性肠梗阻征象。25例(78.1%)血常规中白细胞和中性粒细胞百分比均升高。

1.2.3 诊治情况: 术前仅确诊3例(9.4%),误诊29例(90.6%),其中误诊为急性阑尾炎穿孔12例(37.5%),上消化道穿孔11例(34.4%),绞窄性肠梗阻9例(28.1%)。所有病例均急诊在全麻下行剖腹探查,术中证实坏死、穿孔部位位于升结肠2例(6.3%),横结肠4例(12.6%),降结肠2例(6.3%),乙状结肠中段5例(15.6%),乙状结肠与直肠交界处(Sudeck临界点)18例(56.2%),直肠上段1例(3.0%)。坏死处结肠系膜均较短且肥厚,坏死均发生于对系膜缘,肠壁菲薄,表面覆有脓苔,面积约5 cm×4 cm至7 cm×12 cm,发生穿孔的直径0.3-2.0 cm,有1例乙状结肠病例出现2处坏死灶,2例右半结肠病例坏死范围较广。大部分病例近端肠管扩张明显,充满干硬粪块,腹腔积臭味脓液或大量粪渣,无肠粘连和内疝,未发现结肠肿瘤。腹腔清除腹腔脓液及粪渣,大量温生理盐水及甲硝唑(至少5 000 mL)冲洗腹腔,24例(75%)行乙状结肠下段及直肠上段切除、结肠造瘘术(Hartman);6例(18.7%)行穿孔处组织活检、穿孔修补、结肠襻式造瘘术;2例(6.3%)升结肠坏死范围广行右半结肠切除术。

1.2.4 组织病理学检查: 所有患者术后病理均提示:结肠局灶性坏死、穿孔处肌层断裂较整齐,黏膜在穿孔外边缘清楚,不延伸向浆膜侧;周围组织呈急性炎症改变^[1]。

2 结果

所有病例中,27例(84.3%)痊愈出院,其中12例(37.5%)返院行结肠还纳术;死亡6例(18.7%),其中3例(9.3%)死于不可逆性中毒性休克,1例(3.1%)死于术后肾衰竭;1例(3.1%)因吻合口瘘并发腹腔脓肿而死于严重感染和多器官功能衰竭,1例(3.1%)死于并发肺部感染、呼吸衰竭;术后有8例(25%)出现切口感染,均经充分引流后治愈。

3 讨论

特发性结肠坏死穿孔,又称自发性大肠破裂。患者平均发病年龄为70岁,男女发病率相仿,约60%的患者有便秘史^[2]。其确切病因尚不清楚。

■研究前沿

特发性结肠坏死穿孔缺乏特异性临床表现,极易误诊误治,死亡率较高。如何提高早期诊断率、降低死亡率是学者感兴趣的话题之一。

■相关报道

Yamazaki等根据结肠自发坏死穿孔的好发部位首先提出sudeck临界点的概念,认为乙状结肠直肠动脉和直肠上动脉之间并无吻合,故乙状结肠和直肠交界处存在着生理性的缺血因素。

■应用要点

特发性结肠坏死穿孔治疗术中应根据患者情况选择术式,原则上应消除腹腔感染源,建议切除坏死肠段或将其外置,不提倡穿孔单纯修补或穿孔修补加近端结肠造口。

Serpell等^[3]称该病为粪性穿孔,与交感神经与副交感神经平衡失调,及慢性便秘有关。Yamazaki等^[4]根据结肠自发坏死穿孔的好发部位首先提出sudeck临界点的概念,认为乙状结肠直肠动脉和直肠上动脉之间并无吻合,故乙状结肠和直肠交界处存在着生理性的缺血因素。Pomerants等^[5]指出结肠破裂的主要外因是慢性便秘和直肠脱垂,腹内压和肠压突然增高。亦有学者认为缺血性病变以及应用抗酸剂、非甾体抗炎药等应用是导致该病的危险因素^[6]。笔者认为,老年人结肠易发生坏死穿孔有其解剖及病理生理特点:(1)结肠血供特点是形成Drummond边缘动脉弓后发出垂直血管进入肠壁,而老年患者,尤其是合并肥胖、高血脂、高血压和心血管疾病的,周围血管硬化及血管舒缩性减弱甚至出现肠系膜小血管栓塞,使Drummond弓较细或缺乏,因此该处肠管血供差,特别是肠管对系膜缘尤甚。(2)术中发现多数患者坏死穿孔处结肠系膜均较短且肥厚,腹内压或肠管内压的增高会造成肠管的受力分布不均,致使成角处压力过高而使对系膜缘肠壁过度伸展变薄而穿孔^[7]。结合本组病例分析,特发性结肠坏死穿孔的发生往往是在特殊的解剖因素、老年性退变及神经、血管病变的基础上,长期慢性肠内压增高(如便秘),使局部肠壁扩张、变薄^[8],又由于特殊的成角水平位^[9],腹内压、肠内压增高,受力不均,缓冲对抗能力减弱,或在应用一些药物的诱因下,终使肠壁在Sudeck点等薄弱处坏死穿孔。

由于本病缺乏特异的临床表现,加之好发者多为老年患者,感觉迟钝或不能准确描述病史,临床表现不典型,发病早期多未能及时就诊,因此误诊率较高^[6]。本组32例中术前仅确诊3例(9.4%),误诊29例(90.6%);另外,结肠肠壁血运差,肠腔内细菌含量多,一旦坏死穿孔难以自然愈合,会导致弥漫性腹膜炎、感染性休克、多器官衰竭等,死亡率高^[10]。因此对本病的早期诊断、及时手术、正确的围术期处理甚为重要。

在术前诊治过程中,应重视以下问题:(1)注意病史采集和体格检查,尤其是结肠慢性疾病的表现和肛门检查,有以下表现者,应警惕结肠坏死穿孔:老年便秘患者突然出现腹痛^[11],发病前有排使用力、搬运重物或导泻等诱因,有高血压、高血脂、动脉硬化等病史;有腹膜刺激征,肠鸣音减弱或消失,肛指检查于直肠内扪及质硬干结粪块;腹穿抽出混浊伴粪臭液体,涂片脓细胞阳性;腹部CT示结肠内粪便贮积、腹腔

游离气体、腹腔积液。(2)重视腹胀。结肠穿孔患者多表现腹胀,X片多有阳性表现,有腹部手术史者易误诊为粘连性肠梗阻。(3)对于老年患者,出现腹膜炎体征,应及时行诊断性腹腔穿刺^[12]、腹部CT检查(患者一般情况允许),若穿刺液涂片有脓细胞,或CT提示腹腔游离气体、积液等明确手术指征,不应再做过多检查甄别病因,要尽早剖腹探查。

术中应根据患者情况选择术式,原则上应消除腹腔感染源,建议切除坏死肠段或将其外置,不提倡穿孔单纯修补或穿孔修补加近端结肠造口:(1)坏死结肠切除术:适用于全身情况较好、无中毒性休克患者,对于右半结肠坏死,如果腹腔污染轻可一期切除吻合。(2)坏死结肠外置造瘘^[13],择期二次手术:适用于一般情况差或有中毒性休克患者,采取用时最短、最简单的术式,以抢救生命为关键。(3)术中注意将结肠内贮积大便经造瘘口排出或挤入预切除结肠,可降低肠内压;彻底清洗腹腔,减少毒素吸收、减轻全身感染中毒症状;依据腹腔污染程度于双侧结肠旁沟及盆腔放置引流^[14]。

围术期处理应注意:合理应用抗生素,全身情况稳定后给予TPN营养支持,积极治疗并存疾病,防治肺部感染等术后并发症,这些是保证患者顺利康复的关键^[15]。

该病的预后主要取决于病史长短、腹腔污染程度、是否及时手术、术中清洗是否彻底、术后抗感染营养支持治疗的力度及有无其他伴随疾病等。只要处理及时,其预后良好。

4 参考文献

- 1 娄运池,张学成,曾奕山,徐用喜.特发性乙状结肠破裂12例临床探讨.实用医学杂志 2001; 17: 319-320
- 2 Tokunaga Y, Hata K, Nishitai R, Kaganai J, Nanbu H, Ohsumi K. Spontaneous perforation of the rectum with possible stercoral etiology: report of a case and review of the literature. *Surg Today* 1998; 28: 937-939
- 3 Serpell JW, Nicholls RJ. Stercoral perforation of the colon. *Br J Surg* 1990; 77: 1325-1329
- 4 Yamazaki T, Shirai Y, Tada T, Sasaki M, Sakai Y, Hatakeyama K. Ischemic colitis arising in watershed areas of the colonic blood supply: a report of two cases. *Surg Today* 1997; 27: 460-462
- 5 Pomerants RA, Mitchel KJB, Hines JR. Spontaneous perforation of the colon and rectum: two cases reports and review of the literature emphasizing management principles. *Contemp Surg* 1990; 37: 28-32
- 6 Hollingworth J, Alexander-Williams J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and stercoral perforation of the colon. *Ann R Coll Surg Engl* 1991; 73: 337-339; discussion 339-340
- 7 金洪永,姜洪伟,齐德祥,郭慧玲,于磊,姜天明.特发

- 性乙状结肠破裂原因及诊治体会. 中国老年学杂志 2008; 28: 1645-1646
- 8 郭春玲, 李凤苍. 特发性乙状结肠破裂12例临床分析. 结直肠肛门外科 2007; 13: 392-393
- 9 李爱国, 陈浩, 何俊, 杜涛, 李小军. 特发性大肠破裂6例分析. 中国误诊学杂志 2006; 6: 970-971
- 10 杨永平, 刘铜军, 谭毓铨, 杨子军. 自发性大肠破裂2例. 中国实用外科杂志 2008; 28: 1003-1004
- 11 沈苑. 自发性结肠破裂5例外科诊治体会. 山东医药 2007; 47: 71
- 12 严秋亮, 朱锦辉. 特发性乙状结肠破裂误诊分析. 浙江临床医学 2006; 8: 1313
- 13 曹清, 姜建帅, 宋甫春. 自发性结肠破裂的诊治体会(附8例报告). 中国医师进修杂志 2008; 31: 62-63
- 14 黄洋, 冯彦, 孙春亮. 自发性结肠破裂诊治体会(附5例报告). 大肠肛门病外科杂志 2004; 10: 297-298
- 15 吕永峰, 冯光华, 叶永茂, 刘炎. 自发性乙状结肠破裂的临床诊治. 浙江医学 2007; 29: 741-742

■同行评价

本文具有一定的临床价值和借鉴意义.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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.

会阴脓肿引发慢加急性肝衰竭1例

陈峭, 李岩, 王垂杰

■背景资料

引发肝功能衰竭的原因很多, 在我国引起肝衰竭的主要病因是肝炎病毒(主要是HBV), 其次是药物及肝毒性物质(如酒精、化学制剂等)。而急性肝功能衰竭(ALF)是发生于正常个体的罕见病状, 表现为肝功能结果的迅速恶化, 并导致精神异常及凝血障碍。

陈峭, 辽宁中医药大学 辽宁省沈阳市 110032

李岩, 王垂杰, 辽宁中医药大学附属医院消化科 辽宁省沈阳市 110032

作者贡献分布: 陈峭与李岩对此文所作贡献均等; 本文由王垂杰教授指导。

通讯作者: 王垂杰, 教授, 110032, 辽宁沈阳皇姑区北陵大街33号, 辽宁中医药大学附属医院消化科. pkq215765@qq.com

收稿日期: 2009-10-22 修回日期: 2009-11-26

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2010-04-18

Perineal abscess-induced acute-on-chronic liver failure: a report of one case

Qiao Chen, Yan Li, Chui-Jie Wang

Qiao Chen, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China
Yan Li, Chui-Jie Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Chui-Jie Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 33 Beiling Street, Huanggu District, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. pkq215765@qq.com

Received: 2009-10-22 Revised: 2009-11-26

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2010-04-18

Abstract

A 42-year-old male patient presented with nausea and vomiting after drinking. During hospitalization, he developed hemorrhoids and anal fistula infection, which led to left scrotal cellulitis, perineal abscess and eventually liver failure. After undergoing an operation, his condition improved.

Key Words: Infection; Abscess; Acute-on-chronic liver failure

Chen Q, Li Y, Wang CJ. Perineal abscess-induced acute-on-chronic liver failure: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(11): 1182-1183

摘要

患者, 男, 42岁, 因5 d前饮酒后出现恶心呕吐症, 于2005-07-06收入院, 住院期间患者因痔疮、肛瘘感染导致左侧阴囊蜂窝组织炎、会

阴脓肿, 高热不退, 进而引发肝功能衰竭, 经手术后病情得到好转。

关键词: 感染; 脓肿; 慢加急性肝衰竭

陈峭, 李岩, 王垂杰. 会阴脓肿引发慢加急性肝衰竭1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(11): 1182-1183

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1182.asp>

0 引言

肝衰竭是多种因素引起的严重肝脏损害, 导致其合成、解毒、排泄和生物转化等功能发生严重障碍或失代偿, 以出现凝血机制障碍和黄疸、肝性脑病、腹水等为主要表现的一组临床症候群。肝衰竭的处理是不仅是对内科医生临床医疗技术的挑战, 更是临床医疗管理上的挑战。改进和提高诊疗措施, 尽快明确肝衰竭的病因和诊断, 对于其预后具有重要意义。

1 病例报告

男, 42岁, 5 d前因饮酒后出现恶心呕吐症, 呕吐为胃内容物, 门诊以“胃肠功能紊乱”为诊断于2005-07-06收入院, 既往酒精性脂肪肝病1年, 痛风性肾病1年。近十年来每日酒精摄入量约400 g, 查体: T 36.5 °C, P 95次/分, R 16次/分, BP 125/95 mmHg, 神清, 巩膜无黄染, 心肺(-), 腹平坦, 肝脾肋下未及。腹软, 无压痛及反跳痛。移动性浊音(-), 肠鸣音亢进。彩超示: 脂肪肝。初步诊断: (1)胃肠功能紊乱; (2)酒精性肝病, 酒精性脂肪性肝炎。入院后查胃镜, 补充诊断为: 浅表性胃炎(重度), 十二指肠球炎(中度)。查肝功示: ALT: 52 U/L, AST: 181 U/L; 血常规: WBC: $4.9 \times 10^9/L$, RBC: $4.67 \times 10^{12}/L$, HGB: 164 g/L, PLT: $62 \times 10^9/L$, 甲乙丙戊肝炎病毒标志物: HBSAB(+), 余指标均阴性。予患者保肝降酶补充水、电解质, 维生素, 同时抑酸保护胃黏膜治疗, 予5%葡萄糖250 mL, 门冬氨酸钾镁2.0 g日一次静点, 0.9%氯化钠100 mL, 奥美拉唑40 mg日一次静点, 临时予5%葡萄糖250 mL, 生脉注射液60 mL一次静点, 病情尚平稳。07-11复查

■同行评议者

田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科;
徐可树, 教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科

肝功示: TP: 63.4 g/L, ALB: 31.6 g/L, GLB: 31.8 g/L, A/G: 1.0, TBIL: 22.6 $\mu\text{mol/L}$, DBIL: 12.4 $\mu\text{mol/L}$, ALP: 192 U/L, GGT: 254 U/L, ALT: 69 U/L, AST: 180 U/L, 07-22患者突然发热, 查体: T 39.5 $^{\circ}\text{C}$, 神清, 巩膜无黄染, 双肺呼吸音清, 未闻及干湿性罗音. 腹平坦, 无压痛及反跳痛. 双下肢无水肿. 急查血常规: WBC: $9.9 \times 10^9/\text{L}$, RBC: $4.07 \times 10^{12}/\text{L}$, HGB: 141 g/L, NE: 89.6%, PLT: $63 \times 10^9/\text{L}$, 补充诊断: 发热原因待查(感染可能性大), 予物理降温, 头孢曲松钠静点抗炎, 效不佳. 患者发热持续不退, 07-24查体患者巩膜、皮肤黄染, 腹部膨隆, 腹壁静脉显露, 复查肝功: TP: 59.1 g/L, ALB: 27.7 g/L, GLB: 31.4 g/L, A/G: 0.9, TBIL: 134.5 $\mu\text{mol/L}$, DBIL: 85.7 $\mu\text{mol/L}$, ALP: 186 U/L, GGT: 651 U/L, ALT: 74 U/L, AST: 97 U/L, PT: 13.8 S, APTT: 45.1 S, PT%: 62.2%. 详询病情, 患者诉07-21曾于病房内摔伤后左髋部不适, 查局部皮肤红肿, 阴囊明显肿大, 超声示: (1)肝大; (2)脂肪肝; (3)双附睾体、尾增大, 回声欠均; (4)阴囊皮下与睾丸鞘膜之间积液(考虑积血). 请泌尿外科会诊意见: 考虑阴囊肿大不排除低蛋白血症所致局部水肿, 暂不予特殊处理. 然患者黄疸迅速加深, 胆红素持续升高(每日升高 $>17.1 \text{ mmol/L}$), 肝功继续恶化, 腹水迅速增加, 伴有恶心、呕吐等消化系症状, 07-27复查肝功: TP: 48.0 g/L, ALB: 22.8 g/L, GLB: 25.2 g/L, A/G: 0.9, TBIL: 205.1 $\mu\text{mol/L}$, DBIL: 136.3 $\mu\text{mol/L}$, ALP: 114 U/L, GGT: 296 U/L, ALT: 43 U/L, AST: 106 U/L. 出凝血时值: PT: 17 S, APTT: 41 S, PT%: 35.6%. 血氨: 80 $\mu\text{mol/L}$. 07-27下午出现肝性脑病, 临床诊断为慢加急性肝功能衰竭, 予密切监测患者肝功及出凝血时, 并向家属告知预后不佳. 患者阴囊水肿继续增大, 表面破溃, 有液渗出, 追询病史, 家属诉既往曾于沈阳肛肠医院诊断有痔疮, 肛瘘. 再请泌尿外会诊予局部消毒抽出脓性液10 mL, 送检常规及细菌培养示: 李凡他反应(+), 白细胞计数: $289 \times 10^9/\text{L}$, 中性粒细胞: 87%, 蛋白定量: 2.4 g/L, 于07-28转入泌尿外科继续治疗. 泌尿专科检查: 左侧阴囊肿大, 表皮破溃, 色红. 耻骨上腹股沟区红肿压痛, 阴囊根部与直肠之间可见脓肿, 范围约6 cm \times 3 cm, 其中央皮肤苍白坏死有破溃, 脓汁恶臭, 诊断: (1)左侧阴囊蜂窝组织炎; (2)会阴脓肿. 请肛肠科会诊补充诊断: 肛周脓肿, 肛瘘. 诊予阴囊脓肿切开引流, 无菌换药, 抗炎, 保肝降酶利

尿, 补充白蛋白及对症治疗. 术后患者阴囊部脓肿逐渐愈合, 会阴部创面缩小, 未再发热, 肝功能逐渐恢复, 黄疸、腹水逐渐消退, 09-12复查肝功示: TP: 76.1 g/L, ALB: 37.1 g/L, GLB: 39.2 g/L, A/G: 0.9, TBIL: 33.5 $\mu\text{mol/L}$, DBIL: 12.6 $\mu\text{mol/L}$, ALP: 110 U/L, GGT: 128 U/L, ALB 37.1 g/L, ALT: 38 U/L, AST 54 U/L, PT: 13.6 S, APTT: 36.5 s, PT%: 64.2%. 血常规: 大致正常. 患者病情好转, 于09-14转肛肠科继续治疗, 予其肛瘘瘘管切开术后, 病情好转出院.

2 讨论

引发肝功能衰竭的原因很多, 在我国引起肝衰竭的主要病因是肝炎病毒(主要是HBV), 其次是药物及肝毒性物质(如酒精、化学制剂等). 较常见的病因还包括细菌及寄生虫等病原体感染, 严重或持续感染(如败血症、血吸虫病等), 妊娠急性脂肪肝, 自身免疫性肝病等. 少见或罕见病因包括代谢异常、缺血缺氧、肝移植、肝脏肿瘤、创伤、辐射等^[1]. 治疗时必须查明病因, 针对病因治疗方可取得满意疗效. 本例患者是在慢性酒精性肝病基础上, 短期内出现胆红素升高(总胆红素 $>171 \mu\text{mol/L}$), 凝血酶原时间 $<40\%$, 并在2 wk内出现肝性脑病, 符合慢加急性肝衰竭诊断. 患者出现腹水、阴囊水肿等表现考虑与其肝功能升高、低蛋白血症有关, 予保肝降酶等治疗后效并不佳. 在详细询问病史和查体后, 发现患者因痔疮、肛瘘感染导致左侧阴囊蜂窝组织炎、会阴脓肿, 高热不退, 进而引起肝功能严重损害, 手术后病情得到迅速改善, 对于这种因严重细菌感染引发的肝功能衰竭临床上我们应给与重视. 同时, 本病例亦告诫我们在临床工作中必须一丝不苟, 对于出现中到重度的急性肝炎症状的患者, 应立即进行详尽的病史采集、细致的体格检查、全面的实验室检测, 以便早期对患者作出初始评估. 一旦作出急性肝衰竭的诊断, 尽早转入重症监护室(ICU)是首选处理措施^[2]. 任何一个细节都可能对诊治疾病有帮助. 只有这样, 才能做到不误诊、漏诊, 不延误患者的治疗.

3 参考文献

- 1 李兰娟. 肝衰竭诊疗指南. 中华内科杂志 2006; 45: 1053-1056
- 2 王宇明, 晏泽辉. 对美国肝病联合会《急性肝衰竭的处理》推荐意见的评述. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 72-75

■同行评价

本文报告的病例是肝病基础上由感染诱发的肝衰竭, 有典型意义, 对医务人员的工作具有告诫作用.