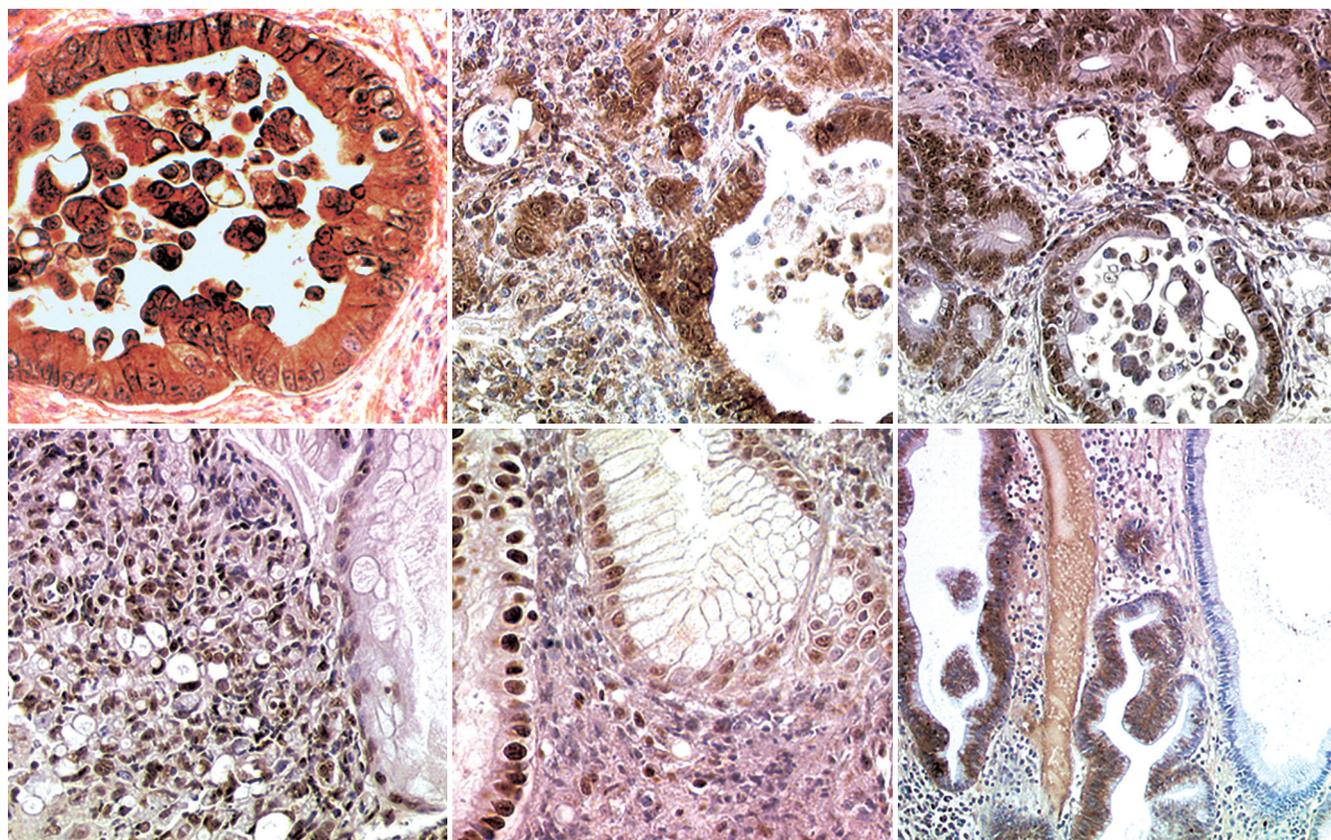


# 世界华人消化杂志

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006年2月28日 第14卷 第6期 (Volume 14 Number 6)



6 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授 西安

### 社长/总编辑

马连生教授 北京

### 副总编辑

陈士葆教授 上海  
房殿春教授 重庆  
姜洪池教授 哈尔滨  
王苑本教授 天津  
吴云林教授 上海  
徐克成教授 广州  
杨思凤教授 吉林  
姚希贤教授 石家庄  
岳茂兴教授 北京  
张万岱教授 广州  
周学文教授 沈阳

### 常务编委

程英升副教授 上海  
高毅主任医师 广州  
江学良副主任医师 上海  
李岩教授 沈阳  
刘连新教授 哈尔滨  
吕宾教授 杭州  
罗和生教授 武汉  
聂青和副教授 西安  
王小众教授 福州

### 编委

白爱平主治医师 广州  
白文元教授 石家庄  
白玉贤教授 哈尔滨

蔡淦教授 上海  
曹洁副教授 上海  
陈海龙教授 大连  
陈红松研究员 北京  
陈积圣教授 广州  
陈建荣副教授 南通  
陈立波副教授 武汉  
陈凜教授 北京  
陈其奎教授 广州  
陈强谱教授 滨州  
陈仕珠主任医师 西安  
陈卫昌教授 苏州  
陈耀凯副教授 重庆  
陈贻胜教授 福州  
陈知水教授 武汉  
陈治水主任医师 哈尔滨  
陈祖林副教授 重庆  
程爱国教授 唐山  
程红岩教授 上海  
迟宝荣教授 长春  
崔云甫教授 哈尔滨  
代文杰教授 哈尔滨  
戴冬秋教授 沈阳  
党双锁副教授 西安  
邓长生教授 武汉  
董蕾教授 西安  
杜群研究员 广州  
樊红副教授 南京  
范建高教授 上海  
范志宁主任医师 南京  
房静远教授 上海  
傅春彬主任医师 吉林  
高成新教授 上海  
高春芳研究员 上海  
高峰教授 西安  
高润平教授 长春  
戈之铮教授 上海  
龚国忠教授 长沙  
龚建平教授 重庆  
谷俊朝主任医师 北京  
关玉盘教授 北京  
管冬元副教授 上海  
郭克建教授 沈阳  
郭晓钟教授 沈阳  
郭新宁教授 银川

韩天权教授 上海  
郝俊鸣副主任医师 北京  
何超教授 杭州  
何裕隆教授 广州  
何振平教授 重庆  
洪天配教授 北京  
侯晓华教授 武汉  
黄恒青主任医师 福州  
黄金华副教授 广州  
黄晓东副主任医师 武汉  
黄颖秋教授 本溪  
黄裕新教授 西安  
黄志勇副教授 武汉  
季国忠副教授 南京  
季加孚教授 北京  
姜慧卿教授 石家庄  
蒋龙元副教授 广州  
金瑞教授 北京  
匡安仁教授 成都  
兰平教授 广州  
蓝宇教授 北京  
劳绍贤教授 广州  
李定国教授 上海  
李东辉教授 厦门  
李方儒教授 天津  
李国威教授 西安  
李继强教授 上海  
李靖副教授 重庆  
李奇林教授 广州  
李涛主治医师 北京  
李晓宇主任医师 北京  
李延青教授 济南  
李永哲研究员 北京  
李玉民教授 兰州  
李增山副教授 西安  
李兆申教授 上海  
李志霞教授 北京  
李宗芳教授 西安  
梁力建教授 广州  
林勇讲师 上海  
刘宝瑞教授 南京  
刘冰熔教授 哈尔滨  
刘成海研究员 上海  
刘平教授 上海  
刘杞教授 重庆

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

刘铁夫教授	哈尔滨	孙学英教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江
刘正稳教授	西安	邵升副教授	哈尔滨	严律南教授	成都
刘作金副教授	重庆	谭学瑞教授	汕头	杨冬华教授	广州
龙致贤教授	北京	唐采白副教授	徐州	杨广顺教授	上海
鲁华玉研究员	北京	唐芙爱教授	郑州	杨建勇教授	广州
陆才德教授	宁波	唐霓副研究员	重庆	杨林副研究员	广州
陆云飞教授	南宁	唐文富主治医师	成都	杨维良教授	哈尔滨
禄韶英主治医师	西安	唐文皓副主任医师	上海	杨希山教授	广州
吕明德教授	广州	唐旭东主任医师	北京	杨云生教授	北京
吕宁主任医师	北京	汤展宏副教授	南宁	姚登福教授	南通
吕云福教授	海口	唐志鹏副研究员	上海	姚树坤教授	石家庄
马大烈教授	上海	田素礼教授	哈尔滨	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
茅爱武主任医师	上海	屠红副研究员	上海	阴赅宏研究员	北京
梅林教授	北京	万德森教授	广州	于红刚副教授	武汉
孟庆华教授	北京	万军教授	北京	于健春教授	北京
宁琴教授	武汉	汪波副主任医师	北京	于颖彦教授	上海
牛建昭教授	北京	王承党副教授	福州	郁宝铭教授	上海
欧希龙副教授	南京	王春友教授	武汉	喻荣彬副教授	南京
潘林娜教授	哈尔滨	王广义教授	长春	张柏和教授	上海
潘兴华副主任医师	昆明	王吉耀教授	上海	张方信主任医师	兰州
潘秀珍教授	福州	王鲁副教授	上海	张吉翔教授	南昌
彭波副教授	西安	王效民教授	厦门	张锦生教授	上海
彭吉润主任医师	北京	王学美研究员	北京	张军教授	西安
彭曦副研究员	重庆	王正康教授	北京	张青云研究员	北京
彭心宇教授	石河子	王志刚副主任医师	上海	张群华教授	上海
彭志海教授	上海	王忠裕教授	大连	张水军教授	郑州
秦波教授	重庆	卫洪波教授	广州	张绪清副教授	重庆
秦成勇教授	济南	魏经国教授	西安	张学教授	北京
秦环龙教授	上海	魏来教授	北京	张宗明教授	北京
钱建民教授	上海	闻勤生教授	西安	赵桂珍教授	沈阳
秦仁义教授	武汉	吴德全教授	哈尔滨	赵景民教授	北京
卿三华教授	广州	吴建国教授	武汉	赵连三教授	成都
邱双健副教授	上海	吴君主任医师	贵阳	赵平副教授	上海
任超世研究员	天津	吴萍主任医师	徐州	郑民华教授	上海
任建安教授	南京	席启主任医师	大同	智发朝教授	广州
任建林教授	厦门	夏建川研究员	广州	周伯平教授	深圳
邵成浩讲师	上海	向德兵讲师	重庆	周丁华主任医师	北京
邵先玉教授	泰安	肖恩华教授	长沙	周国雄主任医师	南通
邵永孚教授	北京	谢晓华副教授	广州	周士胜教授	大连
沈洪教授	南京	徐爱民副教授	上海	周霞秋教授	上海
沈琳副教授	北京	许春舫主任医师	苏州	周晓东研究员	广州
沈薇教授	重庆	徐存拴教授	新乡	朱春兰主任医师	哈尔滨
施瑞华教授	南京	徐大华副主任医师	北京	朱立元教授	深圳
石统东副教授	重庆	徐德忠教授	西安	朱人敏教授	南京
宋振顺教授	西安	徐列明教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
孙诚谊教授	贵阳	徐小元教授	北京	左国营副主任药师	昆明
孙家邦教授	北京	许玲副教授	上海		
孙秀发教授	武汉	许文燮教授	上海		

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2006年2月28日

第14卷

第6期

(总第158期)

述 评	547 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 调节性T细胞与炎症性肠病研究进展 孙可歆, 李永哲
基础研究	550 利用组织芯片技术研究COX-2在胃癌中的表达及其与血管生成的关系 吕晓君, 毛晓韵, 李锦毅, 韩琤波, 吴东瑛, 张淑敏, 辛彦 557 间隙连接蛋白32, 43的表达对胃癌侵袭转移潜能的影响 吴瑾, 王翠华, 周红凤, 刘丹, 王雯, 张波, 隋广杰 563 利用大鼠Y染色体特异性PCR技术检测卵圆细胞源性肝癌细胞 陈铁军, 方驰华, 朱明德 568 克隆性分析技术在肝脏局灶性结节性增生诊断中的应用 巩丽, 张宏图, 张伟, 李爱宁, 刘杉, 孙耘田, 刘贵秋, 苏勤 576 HCV p7蛋白反式调节新基因3及其剪切体克隆化和生物信息学分析 陶明亮, 成军, 王春花, 郭江, 袁菊, 靳亚平, 毛羽 581 HCV p7蛋白反式调节基因p7TP2的克隆化及生物信息学分析 袁菊, 郭江, 成军, 陶明亮, 蓝贤勇, 洪源, 靳亚平, 毛羽 588 冷缺血时间及组织相容性对胰岛细胞活性的影响 高宏君, 徐达传, 赵明, 李氏, 范礼佩, 李留洋, 钱俊, 蔡德鸿
临床研究	594 溃疡性结肠炎结肠黏膜修复中HGF, c-Met, EGFR的作用 陈凡, 林琳, 张红杰, 叶晓霞, 赵伟志, 王涛, 杨希宁
文献综述	600 肝脏移植耐受及其抗原递呈细胞相关作用的研究进展 汪艳, 高毅 607 骨髓干细胞分化为肝细胞的多种移植途径 穆丽雅, 韩明子 611 重症急性胰腺炎心脏损伤临床表现与机制研究进展 张喜平, 戴金, 陈汉卿
研究快报	618 医用微型机器人对肠道损伤的探讨 刘金华, 王树卿, 刘丹阳 621 大鼠溃疡性结肠炎模型肠组织中MIF的表达和NF- $\kappa$ B的激活 黄超, 邓长生 626 小鼠甲胎蛋白基因的克隆表达鉴定及稳定表达甲胎蛋白的小鼠肿瘤细胞株的建立 田耕, 易继林, 刘积良, 翁准
临床经验	630 叶酸治疗萎缩性胃炎并改变P16蛋白表达 刘丽华, 吴汉平, 张方信, 刘斌, 董亮, 钱震
病例报告	634 胆囊黏膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤1例 赵闯, 戴朝六, 舒红
专家门诊	637 肠易激综合症的诊断和治疗 蔡淦

<b>附 录</b>	638 世界华人消化杂志投稿须知 643 世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息
<b>致 谢</b>	644 致谢世界华人消化杂志编委
<b>消 息</b>	556 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议 575 第二届全国小肠疾病学术会议 580 NERD及相关疾病国际研讨会 587 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会 593 第十届全国普通外科学术会议征文通知 599 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知 606 第十二届全国胆道外科学术会议征文通知 610 第十届全国临床营养支持学术会议通知 617 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议 620 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 625 中华消化学会第一届全国肝胆疾病学术研讨会 636 第十一届全国普通外科学术会议征文通知
<b>封面故事</b>	Brigitte Bancel, Jacques Estève, Jean-Christophe Souquet, Shinya Toyokuni, Hiroshi Ohshima, Brigitte Pignatelli. Differences in oxidative stress dependence between gastric adenocarcinoma subtypes. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(7): 1005-1012 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/1005.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/1005.asp</a>
<b>国际会议</b>	Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006  Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 <a href="http://www.asge.org/education">www.asge.org/education</a>  World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 <a href="mailto:c.chase@imedex.com">c.chase@imedex.com</a>  7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 <a href="mailto:convention@edinburgh.org">convention@edinburgh.org</a> <a href="http://www.edinburgh.org/conference">www.edinburgh.org/conference</a>  71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(旬刊)

创 刊 1993-01-15  
改 刊 1998-01-25  
出 版 2006-02-28  
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生  
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁  
中文编辑 潘伯荣 张海宁  
电子编辑 张敏 李琪 韩江燕  
本期审读 王瑾晖

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂  
发行 国内: 北京报刊发行局  
国外: 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局  
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市2345信箱)  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

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

## 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价 每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证  
1401004000050

# World Chinese Journal of Digestology

February 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 6

<b>EDITORIAL</b>	547 Relationship between CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatory T cells and inflammatory bowel disease <i>Sun KX, Li YZ</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	550 Study of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis by tissue microarray <i>Lv XJ, Mao XY, Li JY, Han CB, Wu DY, Zhang SM, Xin Y</i> 557 Relations of connexin 32 and 43 expression with metastatic potential of gastric cancer <i>Wu J, Wang CH, Zhou HF, Liu D, Wang W, Zhang B, Sui GJ</i> 563 Detection of liver cancer cells originated from hepatic oval cells using rats' Y chromosome specific polymerase chain reaction technique <i>Chen TJ, Fang CH, Zhu MD</i> 568 Application of clonality analysis in diagnosis of focal nodular hyperplasia <i>Gong L, Zhang HT, Zhang W, Li AN, Liu S, Sun YT, Liu GQ, Su Q</i> 576 Cloning and bioinformatic analysis of new gene p7TP3 and its spliced variant transregulated by hepatitis C virus p7 protein <i>Tao ML, Cheng J, Wang CH, Guo J, Yuan J, Jin YP, Mao Y</i> 581 Cloning and bioinformatics analysis of p7TP2 gene transregulated by hepatitis C virus p7 protein <i>Yuan J, Guo J, Cheng J, Tao ML, Lan XY, Hong Y, Jin YP, Mao Y</i> 588 Influence of cold ischemia preservation time and histocompatibility on activity of islet cells <i>Gao HJ, Xu DC, Zhao M, Li M, Fan LP, Li LY, Qian J, Cai DH</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	594 Roles of hepatocyte growth factor, c-Met and epidermal growth factor receptor in repair of colonic mucosa from patients with ulcerative colitis <i>Chen F, Lin L, Zhang HJ, Ye XX, Zhao WZ, Wang T, Yang XN</i>
<b>REVIEW</b>	600 Role of antigen-presenting cells in liver transplantation tolerance induction <i>Wang Y, Gao Y</i> 607 Multiple transplantation routes of bone marrow stem cells differentiating to hepatocytes <i>Mu LY, Han MZ</i> 611 Progress in clinical manifestations and mechanisms of heart injury induced by severe acute pancreatitis <i>Zhang XP, Dai J, Chen HQ</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	618 Investigation of miniature robot-induced injury in intestinal tract <i>Liu JH, Wang SQ, Liu DY</i> 621 Expression of macrophage migration inhibitory factor and activation of nuclear factor- $\kappa$ B in colon tissues of rats with ulcerative colitis <i>Huang C, Deng CS</i> 626 Gene cloning and expression identification of murine $\alpha$ -fetoprotein gene and establishment of a cell line stably expressing $\alpha$ -fetoprotein <i>Tian G, Yi JL, Liu JL, Weng Z</i>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	630 Effect of folic acid on atrophic gastritis and expression of P16 protein <i>Liu LH, Wu HP, Zhang FX, Liu B, Dong L, Qian Z</i>

<b>CASE REPORT</b>	634 One-case analysis of mucosa-associated lymphoid tissue B cell lymphoma <i>Zhao C, Dai CL, Shu H</i>
<b>EXPERT OUTPATIENT SERVICE</b>	637 Diagnosis and treatment of irritable bowel syndrome <i>Cai G</i>
<b>APPENDIX</b>	638 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 643 Feedback information from authors, readers and editorial board of World Chinese Journal of Digestology
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	644 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<i>Brigitte Bancel, Jacques Estève, Jean-Christophe Souquet, Shinya Toyokuni, Hiroshi Ohshima, Brigitte Pignatelli.</i> Differences in oxidative stress dependence between gastric adenocarcinoma subtypes. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(7): 1005-1012 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/1005.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/1005.asp</a>
<b>INTERNATIONAL MEETINGS</b>	Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006  Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 <a href="http://www.asge.org/education">www.asge.org/education</a>  World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 <a href="mailto:c.chase@imedex.com">c.chase@imedex.com</a>  7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 <a href="mailto:convention@edinburgh.org">convention@edinburgh.org</a> <a href="http://www.edinburgh.org/conference">www.edinburgh.org/conference</a>  71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006

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

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

World Chinese Journal of Digestology

**Founded** on January 15, 1993

**Renamed** on January 25, 1998

**Publication date** February 28, 2006

**Honorary-Editor-in-Chief**

Bo-Rong Pan

**President and Editor-in-Chief**

Lian-Sheng Ma

**Edited by** Editorial Board of

*World Chinese Journal of Digestology*

PO Box 2345, Beijing 100023, China

**Published by** The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

**Overseas Distributor**

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

**Code No.**M4481

**Mail-Order** Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

**ISSN** 1009-3079 **CN** 14-1260/R

**Copyright** © 2006 by The WJG Press

# CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞与炎症性肠病研究进展

孙可歆, 李永哲

孙可歆, 李永哲, 中国医学科学院中国协和医科大学, 北京协和医院检验科, 北京市100730  
国家高技术研究发展计划(863计划)重大专项基金资助项目, No. 2002AARZ2011  
通讯作者: 李永哲, 100730, 中国医学科学院中国协和医科大学, 北京协和医院检验科. liyongzhepumch@yahoo.com.cn  
电话: 010-65295416 传真: 010-65295416  
收稿日期: 2006-01-11 接受日期: 2006-02-09

## 摘要

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞是维持机体自身免疫耐受的调节性T细胞亚群, 主要来源于胸腺, 与自身免疫性疾病的发生、发展密切相关。炎症性肠病(IBD)是一种病因未明侵犯胃肠道的自身免疫性疾病, 免疫耐受异常是导致其发病主要因素之一。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞的异常表达可能与IBD的发病有关。

**关键词:** 炎症性肠病; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞; 自身免疫

孙可歆, 李永哲. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞与炎症性肠病研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(6):547-549  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/547.asp>

## 0 引言

调节性T细胞(Treg)是不同于Th1和Th2的具有调节功能的T细胞群体, 在多种免疫性疾病中起重要调节作用。根据其表面标记、分泌的细胞因子及作用机制不同, Treg可分为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr细胞、Tr1和Tr3等多种亚型<sup>[1]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg是调节性T细胞亚群之一, 是一群表型和功能特异的T细胞, 他由胸腺产生后输出至外周, 并通过主动调节的方式抑制存在于正常机体内潜在的自身反应性T细胞的活化与增殖, 并识别自身抗原肽和分泌抑制性细胞因子<sup>[2]</sup>。大量的研究提示, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞的数量减少或功能异常均可能导致自身免疫性疾病的发生<sup>[3]</sup>。炎症性肠病(IBD)是一组病因未明侵犯胃肠道的自身免疫性疾病, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg异常表达可能与IBD的发病有关。本文主要就CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的来源、特性、免疫调节机制及其与疾病的关系作一综述。

## 1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的来源

根据CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的来源不同将其分为固有性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg和适应性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg<sup>[4]</sup>。固有CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg主要是指那些在胸腺发育成熟后进入外周淋巴组织的Treg, 在预防病理性自身免疫反应方面起作用, T细胞在胸腺分化过程中选择到的特殊细胞亚群逃避了克隆清除, 发生了胸腺逃逸。适应性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg是由成熟T细胞在外周淋巴组织中接触特异性抗原或免疫抑制因子的作用下活化而形成的。

## 2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的特性及免疫调节机制

2.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞的特性 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞具有两大特性: 即免疫无能性和免疫抑制性<sup>[5]</sup>。其免疫无能性对高浓度IL-2的单独刺激, 固相包被或可溶性抗CD3单抗, 以及抗CD3单抗、抗CD28单抗的联合作用呈无应答状态, 也不分泌IL-2。当经T细胞受体(TCR)介导信号刺激并有高浓度外源IL-2存在的情况下, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞可活化并增殖, 但其增殖程度较CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T淋巴细胞弱。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞的免疫抑制功能表现在经TCR的信号刺激活化以后能够抑制CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的活化和增殖, 并且这种抑制作用为非抗原特异性, 不具有组织相容性抗原(MHC)限制性。

2.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞免疫调节作用机制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞免疫调节作用机制目前可能为: (1)转录因子: Foxp3是新近发现的转录因子, 属于foxhead家族成员, 组成性表达于机体的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T调节细胞, 介导Treg细胞在胸腺的发育, 外周表达及功能维持<sup>[6]</sup>。Morgan *et al*<sup>[7]</sup>应用RT-PCR和蛋白电泳检测发现胸腺或外周组织的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg均高表达Foxp3mRNA, 而CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>、CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>及其他免疫细胞微量表达, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞Foxp3的表达量较CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞高100倍左右<sup>[2]</sup>。研究发现Foxp3敲除小鼠诱生的自身免疫病, 其病程较清除CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞诱生的自身免疫病严重, 可能的原因是Foxp3不仅表达在CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细

## ■背景资料

炎症性肠病(IBD)是一种自身免疫性疾病, 其机制未明。免疫耐受异常是其发病的主要因素。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞是维持机体自身免疫耐受的调节性T细胞亚群, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞的数量减少或功能异常均可能导致自身免疫性疾病的发生。本文主要就CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞的来源、特性、免疫调节机制及其与IBD的关系进行了探讨。

### ■ 研发前沿

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞作为调节机体免疫反应的T细胞亚群,近年来越来越成为研究热点,尤其与自身免疫性疾病关系的研究越来越被广泛认识。

细胞,还可能具有诱导小鼠体内静止CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞向Treg转化的功能;由于缺乏Foxp3的诱导作用,体内自身高亲和力T细胞克隆没有发育成为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞,而成为自身反应性T细胞。有学者认为,成熟树突状细胞(DC)能够诱导自体CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞向CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞转化,其作用依赖于Foxp3<sup>[8]</sup>。(2)细胞因子:TGF-β和IL-10参与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的免疫调节作用,二者是具有免疫作用的细胞因子,其抑制效应广泛<sup>[9-10]</sup>。特异性抗TGF-β抗体能阻断CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的抑制效应,因而若抑制TGF-β的活性则可阻断CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的诱导呈免疫无应答状态,表明TGF-β参与了CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的抑制作用。其可能的机制:抑制免疫效应细胞的增殖、分化和活性;抑制细胞因子的产生及其免疫调节作用。(3)辅助因子:细胞毒性T细胞受体4(CTLA-4)是一种抑制性调节分子,固有性和适应性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg与CTLA-4有关。人类及小鼠CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg均表达CTLA-4,阻断CTLA-4的同时也阻断了适应性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的调节作用<sup>[11]</sup>。Takahashi *et al*<sup>[12]</sup>报道CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞和CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T淋巴细胞的共同培养体系中加入抗CTLA-4单抗可以明显减轻前者对后者的抑制作用,而给予正常小鼠注射抗CTLA-4单抗或(和)抗CD25单抗则会出现一些免疫相关性疾病。这些均提示,经CTLA-4刺激对于诱导CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T淋巴细胞的抑制功能是必要的。

### 3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg与炎症性肠病

免疫反应异常是IBD主要发病机制之一。在正常个体体内生理性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞约占CD4<sup>+</sup>T细胞的5%-10%,其数量及活性足以抑制自身免疫性疾病的发生。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞的免疫抑制作用主要是抑制自身反应性T细胞以维持自身免疫平衡。在炎症反应组织中,提呈自身抗原的抗原提呈细胞(APC)活化后,具有有效的自身反应性及抗原敏感性的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞迅速转移至炎症反应部位,与APC结合后活化,并抑制转移至该组织的自身反应性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的功能<sup>[13]</sup>。目前的研究认为, Foxp3是特异性表达在CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞,可有效地预防IBD的发生。Maul *et al*<sup>[14]</sup>采用流式细胞术和实时定量PCR分析CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg、Foxp3表达水平,结果表明IBD患者外周血中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg保持了他们的抑制活性,疾病活动期CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>和

Foxp3下降,但疾病缓解期和对照组比率上升,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg可能参与IBD的发病机制。体内动物实验表明CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞是通过分泌某些抑制性细胞因子而发挥其调节作用。在IBD的模型中对该病的发生起重要抑制作用的是CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg分泌的IL-10和TGF-β,而不是IL-4。这种高浓度的抗TGF-β抗体可以消除CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的抑制作用<sup>[15]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg调节细胞在感染后限制免疫应答引起的过度免疫病理应答,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg缺陷的IBD小鼠,一旦输入全T细胞后可避免发生自身免疫性疾病,缺少CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的小鼠对肠道共生菌群产生高反应性,引起严重的自身免疫性肠炎。在无菌环境下,给小鼠回输缺少CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞不会引起IBD的发生,由此可见CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞主要抑制过度抗病原体免疫,从而抑制对宿主过度的免疫病理损伤<sup>[16]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞通过调节作用,有效维持机体内环境稳定。研究发现在SCID或RAG-/-鼠模型中,同时输注致病性CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> T细胞,大约持续4 wk,再注入CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞,10 wk后,结肠黏膜恢复正常,相比较CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞,不具有此作用<sup>[17]</sup>。其机制可能为:CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞主要直接与靶细胞接触而发挥作用,下调细胞IL-2Ra链的表达,以致靶细胞增殖;可通过分泌抑制性细胞因子来减轻炎症反应;TCR介导自身反应性T细胞对自身肽段的识别,如内环境稳定与免疫调节具有相关性,表明Treg可能与致病T细胞共同竞争抗原提呈细胞而被活化。

### 4 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg与其他自身免疫性疾病

T细胞介导的自身免疫性反应也参与系统性红斑狼疮(SLE)发病过程。Muphy *et al*<sup>[18]</sup>研究表明其亚群CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞在控制自身免疫反应及维持免疫耐受方面起着关键作用,可以控制机体损伤后的免疫反应。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg可以通过抑制单核细胞和巨噬细胞产生细胞因子来减轻机体的炎症反应和组织损伤,在各系统炎症损伤的活动期SLE患者外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg显著低于稳定期的患者<sup>[19]</sup>。结果表明CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的变化可能是导致SLE发生和病情发展的主要因素之一。I型糖尿病是T细胞介导的,与自身抗原免疫耐受缺乏有关,在I型糖尿病患者体内Treg数量减少或者其抑制活性降低,其他介导胰岛β细胞破坏的

免疫活性因此而增强<sup>[20]</sup>. Van *et al*<sup>[21]</sup>应用流式细胞仪检测类风湿关节炎(RA)患者滑膜液(SF)和外周血(PB)CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的表达水平, 探讨其在RA中的作用, 结果表明: RA活动期SF中的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg数量显著高于PB, 因此, Treg在体外能抑制自身T细胞的增殖, 与慢性炎症的发生、发展、转归有关.

总之, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg是一种重要的免疫调节T细胞亚群之一. 探讨CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg在IBD发病机制中的可能作用, 寻找相对特异和敏感的指标, 可辅助临床对IBD的诊断, 为进一步提示IBD发生发展的机制提供有价值的线索. 迄今为止, 尚不清楚CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的T淋巴细胞受体所识别相应的生理配体的性质是什么, 这对阐明在体内的抑制作用及如何在体内或体外扩增这些细胞用于临床治疗免疫性疾病至关重要. 随着研究的不断深入, 将有可能在治疗此类疾病方面取得新的突破, 以为患者减轻痛苦.

## 5 参考文献

- Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 676-683
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061
- Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 58-67
- Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253-257
- Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005; 204: 195-207
- Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337
- Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerck B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Toes RE. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005; 66: 13-20
- Verhasselt V, Vosters O, Beuneu C, Nicaise C, Stordeur P, Goldman M. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4<sup>+</sup> T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 762-772
- Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003; 197: 111-119
- Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells educate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 2004; 172: 5213-5221
- Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4 and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; 168: 1080-1086
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192: 303-310
- Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210
- Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>(high)</sup> T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878
- Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 132-141
- Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 190-200
- Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 170: 3939-3943
- Khvilivitskaia MI, Taniukhina EI. On professional rehabilitation of persons who have sustained a myocardial infarct. *Kardiologiia* 1968; 8: 67-71
- Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Hum Immunol* 2005; 66: 222-230
- Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 92-99
- van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2775-2785

## ■同行评价

本文详细综述了CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的来源、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg的特性和免疫调节机制、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg与炎症性肠病的关系以及CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg与其他自身免疫性疾病的关系, 综述较为全面, 阐述较为详细, 引文较新, 有意义.

电编 李琪 编辑 张海宁

# 利用组织芯片技术研究COX-2在胃癌中的表达及其与血管生成的关系

吕晓君, 毛晓韵, 李锦毅, 韩琤波, 吴东瑛, 张淑敏, 辛彦

## ■背景资料

组织芯片(Tissue microarray)是将多个细小组织整齐排列于同一载体而成的缩微组织切片,具有体积小、信息含量高的特点,能提高实验效率,可灵活设计,所得结果可比性强。他作为一种高通量、大样本以及快速的分子水平分析的工具,其在肿瘤病理研究和临床病理诊断中有广泛而特殊的用途。本文用免疫组化法和组织芯片技术研究COX-2在胃癌转移中的作用及与胃癌病理生物学行为和预后的关系。

吕晓君, 毛晓韵, 韩琤波, 吴东瑛, 张淑敏, 辛彦, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室 辽宁省沈阳市110001

李锦毅, 武警总医院中心实验室 北京市海淀区 100039  
吕晓君, 女, 1965-12-03生, 辽宁省辽阳市人, 汉族, 2000年中国医科大学肿瘤学硕士, 副主任医师, 主要从事肿瘤临床及基础研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30371607

通讯作者: 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室。

电话: 024-23256666-6351 传真: 024-22703576

收稿日期: 2005-10-11 接受日期: 2005-11-04

## Study of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis by tissue microarray

Xiao-Jun Lv, Xiao-Yun Mao, Jin-Yi Li, Cheng-Bo Han, Dong-Ying Wu, Shu-Min Zhang, Yan Xin

Xiao-Jun Lv, Xiao-Yun Mao, Cheng-Bo Han, Dong-Ying Wu, Shu-Min Zhang, Yan Xin, the Fourth Laboratory of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Jin-Yi Li, the Central Laboratory, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30371607

Correspondence to: Professor Yan Xin, the Fourth Laboratory of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China.

Received: 2005-10-11 Accepted: 2005-11-04

## Abstract

**AIM:** To explore the expression and clinical-pathological significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) as well as its relations with the angiogenesis in the carcinogenesis and metastasis of gastric cancer.

**METHODS:** The expression of COX-2 was detected by EnVision immunohistochemical method in tissue microarray prepared from gastric cancer patients. The microvessel density (MVD) was calculated after CD34 staining for microvessel endothelium. Their correlations were analyzed.

**RESULTS:** The expression of COX-2 in gastric cancer was significantly higher than that in normal controls ( $P = 0.001$ ). The over-expression of COX-2 in gastric cancer was positively related to the metastasis and the depth of invasion ( $P = 0.031$ ), while it was not related with the histological types ( $P = 0.495$ ) and Borrmann types ( $P = 0.328$ ). The MVD in gastric cancer tissues ( $65.49 \pm 20.64$ ) was notably higher than that in normal controls ( $36.21 \pm 18.47$ ,  $P = 0.001$ ). MVD was correlated with the histological types ( $P = 0.003$ ) and metastasis ( $P = 0.043$ ), while it was not correlated with the depth of invasion ( $P = 0.627$ ) and Borrmann types ( $P = 0.634$ ). The MVD of COX-2 positive group was higher than that of COX-2 negative one ( $68.59 \pm 19.8$  vs  $25.82 \pm 7.76$ ,  $P < 0.05$ ), and the expression of COX-2 and MVD were positively correlated ( $P = 0.001$ ).

**CONCLUSION:** Tissue microarray is a powerful tool for rapid identification of the molecular alterations in gastric cancer and other pathological types. The expression of COX-2 may play an important role in gastric carcinogenesis by promotion of angiogenesis. It may serve as a marker in the prognosis of gastric cancer.

**Key Words:** Gastric cancer; Cyclooxygenase-2; Tissue microarray; Microvessel density

Lv XJ, Mao XY, Li JY, Han CB, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. Study of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer and its relationship with angiogenesis by tissue microarray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):550-556

## 摘要

**目的:** 研究COX-2在胃癌中的表达及其与血管生成的关系,探讨其在胃癌转移中的作用及与胃癌病理生物学行为的关系。

**方法:** 采用EnVision方法检测胃癌组织芯片中COX-2的表达,用CD34进行微血管内皮细胞染色,计算微血管密度(MVD),分析其相关性。

**结果:** COX-2在胃癌中的表达明显高于正常

胃黏膜( $P = 0.001$ ). COX-2的高表达与胃癌的转移( $P = 0.019$ )和胃壁浸润深度( $0.031$ )呈正相关, 与胃癌的组织病理分型无关( $P = 0.495$ ), 与Borrmann分型无关( $P = 0.109$ )组织MVD ( $65.49 \pm 20.64$ )明显高于正常胃黏膜组织 ( $36.21 \pm 18.47$ ,  $P = 0.001$ ). MVD值与胃癌的组织病理分型( $P = 0.003$ )和转移有关( $P = 0.043$ ), 与胃癌胃壁浸润深度( $P = 0.627$ )和Borrmann分型( $P = 0.634$ )无明显相关性. COX-2表达阳性组的MVD指数明显高于COX-2表达阴性组 ( $68.59 \pm 19.8$  vs  $25.82 \pm 7.76$ ,  $P < 0.05$ ), COX-2表达与MVD呈正相关( $P = 0.001$ ).

**结论:** 组织芯片技术对于快速检测胃癌及其他肿瘤的组织病理学改变是一个强有力的工具. COX-2表达可能通过促进血管形成对胃癌的发生、发展起重要作用, 其可作为判断预后和指导治疗的有效指标.

**关键词:** 胃癌; 环氧合酶; 组织芯片; 微血管密度

吕晓君, 毛晓韵, 李锦毅, 韩珍波, 吴东瑛, 张淑敏, 辛彦. 利用组织芯片技术研究COX-2在胃癌中的表达及其与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(6):550-556  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/550.asp>

## 0 引言

胃癌是消化道发病率很高的恶性肿瘤之一, 且发病率和死亡率呈上升趋势, 肿瘤细胞生长的无限性和浸润转移是肿瘤的最重要的特征, 是胃癌治疗失败导致死亡的主要原因, 而肿瘤细胞生长及浸润转移受多种因子的调控<sup>[1-2]</sup>. 新近发现的组织微阵列/组织芯片技术是将多个细小组织片整齐排列于同一载体而成的缩微组织切片, 具有体积小、信息含量高的特点, 能大大提高实验效率, 且可以根据需要灵活设计, 所得结果均一可靠、可比性强<sup>[3-6]</sup>. 近年来多项研究表明组织微阵列/组织芯片技术在肿瘤病理研究和临床病理诊断中有广泛而特殊的用途. COX-2是前列腺素合成中一个重要的限速酶. 许多研究表明COX-2在结肠癌等肿瘤中高表达<sup>[7-11]</sup>, 能抑制COX-2的非甾体类抗炎药(NSAIDs), 可以作为结肠癌动物模型的有效化学预防剂<sup>[12-14]</sup>. 肿瘤的生长须经历一个血管形成过程, 我们用免疫组化方法和组织芯片技术的研究COX-2在胃癌中的表达及其与血管生成的关系, 探讨其在胃癌转移中的作用及与胃癌病理生物学行为和预后的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 中国医科大学和辽宁省肿瘤医院2003-12/2004-05手术切除胃癌标本104例, 另取其中79例距肿瘤边缘大于5 cm处的正常胃黏膜上皮作为对照, 标本经40 g/L福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 制作成4  $\mu\text{m}$ 厚的切片HE染色供定位用. 即用型兔抗人COX-2单克隆抗体(福州迈新公司), 即用型鼠抗人CD34单克隆抗体(福州迈新公司), PV-9000试剂(北京中山生物技术有限公司). 组织芯片仪及其1 mm组织穿刺针(Beecher Instruments), 免疫组化配套仪器.

### 1.2 方法

**1.2.1 组织芯片制作** 组织载玻片经过夜泡酸、充分清洗并烘干, 用多聚赖氨酸行防脱片处理. 对每一组织标本, 观察HE切片确定癌、肠上皮化生、不典型增生及远癌正常组织等, 选取目标组织并在HE切片及其相应石蜡组织块(供体蜡块)上标记. 莱卡石蜡(leica histowax, 上海华灵)与蜂蜡(东大蜂场)混合(比例为1:1), 制成2.2 cm  $\times$  3.5 cm  $\times$  1 cm大小的空白蜡块(受体蜡块). 在该蜡块上设计14  $\times$  9和16  $\times$  7共248点组织列阵, 用组织芯片仪打孔制成带孔空白蜡块. 将蜡块放在39-42  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中软化后, 用组织芯片仪从供体蜡块标记部位逐个取出直径1 mm, 高4 mm的组织柱, 推入空白蜡块预先设计的相应孔内. 这样将225个组织芯片整齐有序地安插在空白蜡块1和2中, 对蜡块进行连续切片, 裱于防脱片处理的载玻片上.

**1.2.2 组织芯片免疫组化染色** 采用EnVision方法对胃癌及其癌前病变组织芯片进行免疫组化染色, 并利用PBS(pH 7.4)代替一抗作为阴性对照, 已知阳性切片作为阳性对照. COX-2蛋白阳性反应颗粒定位于胞质和胞膜, 每例标本选择2个有代表性的高倍视野, 数200个肿瘤细胞, 取平均值. 阳性细胞数 $<5\%$ 为阴性(-),  $5\%-25\%$ 为弱阳性(+),  $25\%-50\%$ 为中度阳性(++),  $>50\%$ 为强阳性(+++). CD34表达于血管内皮细胞膜, 每一个染成棕黄色的、可与周围血管、肿瘤细胞和其他结缔组织区分开来的明显微小血管腔或含3个以上内皮细胞的内皮细胞簇, 不论管腔和红细胞出现与否, 均作为一个单一的、可计数的微血管. 管腔面积 $>8$ 个红细胞直径, 带有较厚的肌层的微血管均不计数<sup>[15-16]</sup>. 先于低倍光镜下确定3个血管着色最密集区域, 然后在高倍视野下计数微血管的数目, 取2个视野的均值作为微血管密度(MVD). 结果判定在双盲法下进行, 每张切片由

### ■创新盘点

本文利用组织芯片技术研究了COX-2在胃癌中的表达, 发现COX-2表达可能通过促进血管形成对胃癌的发生、发展起重要作用.

### 应用要点

组织芯片技术可用于快速检测胃癌及其他肿瘤分子病理学改变, COX-2可作为临床判断预后和指导治疗的有效指标。

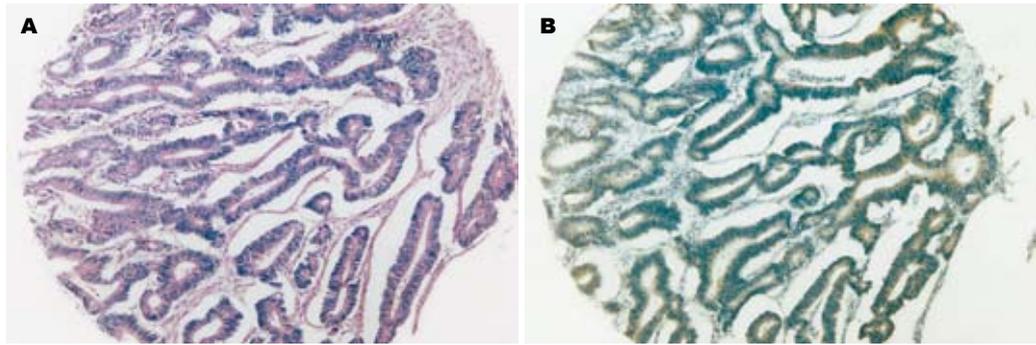


图1 组织芯片扫描图. A: HE染色; B: COX-2 EnVision法.

表1 COX-2蛋白在胃癌、正常胃黏膜上皮组织中的表达

组别	n	COX-2蛋白表达		阳性率 (%)	$\chi^2$	P
		-	+~+++			
组织性质					12.191	0.000
正常胃黏膜	37	15	22	59.46		
胃癌	87	11	76	87.36		
组织病理分型					5.391	0.495
乳头状腺癌	2	0	2	100.00		
高分化管状腺癌	8	2	6	75.00		
中分化管状腺癌	28	4	24	85.71		
低分化腺癌	29	2	27	91.10		
黏液腺癌	12	0	12	100.00		
印戒细胞癌	6	2	4	66.67		
未分化癌	2	1	1	50.00		
转移与否					5.502	0.019
无转移	21	6	15	71.43		
转移	66	5	61	92.42		
胃壁浸润深度					6.997 4	0.031
肌层	4	2	2	50.00		
浆膜下	57	8	49	85.96		
穿出浆膜	26	1	25	96.15		
Borrman分型					4.428 6	0.109
Borrman II	7	0	7	100.00		
Borrman III	75	9	66	88.00		
Borrman IV	5	2	3	60.00		

两位病理医师分别判定、计数。

**统计学处理** 利用 $\chi^2$ 检验比较率的差异,  $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义, 用SPSS 12.0统计分析软件处理。

## 2 结果

**2.1 组织芯片质量** 胃癌及其癌前病变组织芯片常规HE染色切片芯片组织形态好, 有代表性(图1)。胃癌组织芯片在免疫组织化学染色中有部分脱落, 其余组织阳性信号清晰, 背景清洁。

**2.2 COX-2在胃癌及正常黏膜中的表达** COX-2

免疫组化染色最终可用芯片组织为胃癌87例、远癌基本正常胃黏膜37例。COX-2的阳性染色主要为胞质和胞膜, 大多分布在癌组织中。COX-2在胃癌中的表达明显高于正常胃黏膜( $P < 0.05$ )。COX-2在转移组的阳性率高于无转移组阳性率( $P < 0.05$ )。COX-2表达与胃癌胃壁浸润深度呈正相关( $P < 0.05$ ), 与胃癌的组织病理分型无关( $P < 0.05$ ), 与Borrman分型无关( $P < 0.05$ , 表1, 图2)。

**2.3 胃癌及正常胃黏膜中的微血管密度值(MVD) CD34表达**免疫组化染色最终可用芯片组织为胃

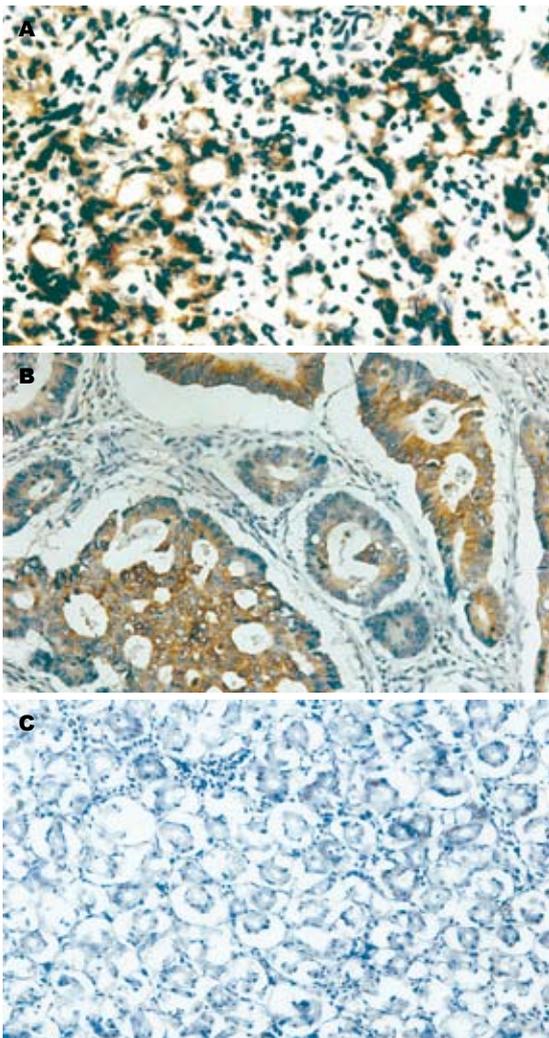


图 2 胃黏膜组织COX-2蛋白的表达 (EnVision法 × 200). A: 低分化腺癌阳性; B: 高分化腺癌阳性; C: 正常胃黏膜阴性.

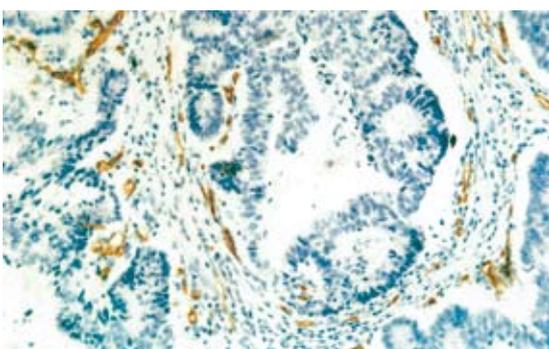


图 3 CD34抗原定位在血管内皮细胞的细胞质和细胞膜 (EnVision法 × 200).

癌92例、远癌基本正常胃黏膜38例。CD34主要表达于血管内皮细胞胞膜。微血管染色呈棕黄色, 在92例胃癌组织中MVD从16到100不等, 均数为65.5。在胃癌组织中的MVD明显高于在正常胃黏膜组织( $P < 0.05$ )。MVD值与胃癌的组织病

表 2 胃癌、正常胃黏膜上皮组织中MVD的差异

组别	<i>n</i>	MVD	<i>t</i>	<i>P</i>
组织性质			7.53	0.000
正常胃黏膜	38	36.21 ± 18.47		
胃癌	92	65.49 ± 20.64		
组织病理分型			3.68	0.003
乳头状腺癌	2	39.50 ± 7.78		
高分化管状腺癌	9	42.56 ± 20.35		
中分化管状腺癌	28	56.79 ± 20.97		
低分化腺癌	31	72.65 ± 20.49		
黏液腺癌	14	63.64 ± 23.02		
印戒细胞癌	5	74.40 ± 33.56		
未分化癌	3	44.67 ± 20.23		
分化程度			4.83	0.000
中高分化	39	54.68 ± 19.78		
分化差或未分化	53	73.88 ± 17.25		
转移与否			4.214	0.043
无转移	26	54.08 ± 24.42		
转移	66	65.08 ± 22.63		
转移部位			1.140	0.355
淋巴结转移	66	65.08 ± 22.63		
肝转移	4	82.00 ± 10.61		
卵巢转移	1	100.00		
腹膜转移	9	68.44 ± 26.16		
胃壁浸润深度			0.583	0.627
肌层	4	68.00 ± 19.13		
浆膜下	64	60.33 ± 24.28		
穿出浆膜	24	65.96 ± 22.68		
Borrmann分型			0.459	0.634
Borrmann II	7	55.71 ± 17.17		
Borrmann III	79	62.92 ± 23.89		
Borrmann IV	6	61.97 ± 23.55		

表 3 胃癌COX-2蛋白表达与MVD之间的关系

胃癌组织		MVD	<i>t</i>	<i>P</i> 值
COX-2表达	-	25.82 ± 7.76	13.12	0.000
	+~+++	68.59 ± 19.8		

理分型有关, 在分化差的胃癌其MVD明显高于分化好的胃癌( $P < 0.05$ )。另外MVD值与是否转移明显相关( $P < 0.05$ ); 与胃壁浸润深度和Borrmann分型无明显相关性( $P > 0.05$ , 表2, 图3)。

2.4 胃癌组织中COX-2表达与微血管计数的关系  
COX-2表达阳性的胃癌组与其相应的阴性组相比, 两组MVD有显著的差异( $P < 0.05$ , 表3)。

### 3 讨论

组织芯片技术是将数十个甚至上千个不同个

体的临床组织标本按预先设计的顺序排列在一张玻片进行分析研究,是一种高通量、多样本的分析工具.其克服了传统病理技术只能逐个组织切片进行研究的落后方式,提高实验效率,同时能平行地研究组织细胞形态及一个特异性基因、蛋白在几百乃至上千种疾病样本中的表达及功能状态,平行性好、对比性和重复性强.组织芯片技术与DNA、RNA、蛋白质、抗体等技术相结合,在基因、基因转录和相关表达产物生物学功能多个层面上进行研究<sup>[17-21]</sup>. Moch *et al*<sup>[22]</sup>用cDNA从肾癌细胞株中筛选出89个潜在基因,其中一个过度表达的基因与Vimentin有关,其用组织芯片作免疫组化检测,证实了大多数肾癌Vimentin过度表达,其过度表达的病例预后差,基因芯片能筛选出有潜在性的生物标记,而组织芯片可迅速测试其临床价值.二者互补能迅速筛选基因和评估其生物学作用,助于建立诊断、治疗、预后相关的参数. Schraml *et al*<sup>[23]</sup>用源于17种不同肿瘤共397个肿瘤样本制成一个组织芯片,用FISH法检测了3CCND1、c-myc、erbB 3个癌基因的扩增情况,结果发现CCDD1在乳腺、肺、头颈部肿瘤和膀胱癌肿瘤、黑色素瘤等检测到;c-myc扩增在乳腺、大肠、胃、肺、卵巢、膀胱、头颈部和子宫颈癌等检测到;erbB扩增在膀胱癌、乳腺癌、大肠癌、胃癌、肺癌、睾丸癌中存在,这与文献报道的结论一致,而且其还首次提示了在睾丸癌中有erb-B2的扩增.在肿瘤研究领域,组织芯片对于肿瘤易感因素判断、病因学及发病机制、诊断和鉴别诊断、治疗及预后评估等方面均起到重要作用.目前有研究认为组织芯片由于所取组织量少,在信息量上有一定的局限性,但本人认为通过在组织芯片制作过程中,对目标组织有精确定位可将这个局限性减小.本研究构建了包含104例胃癌及正常黏膜的225个组织样本的组织芯片,检测COX-2和CD34的表达情况,所得实验结果与大多数研究较为一致.

COX是非甾体类消炎药的靶目标之一,是催化花生四烯酸产生前列腺素(prostaglandin, PG)的关键酶,在人体内主要存在两种亚型:结构型COX-1和诱导型COX-2. COX-2基因则位于染色体1q25.2-25.3上,由11个外显子和10个内含子组成,约8.3 kb.其mRNA转录产物为4.5 kb<sup>[12-14]</sup>. COX-1被认为是“看家基因”,在大多数正常组织中都呈稳定的表达,维持一些正常的生理功能;而COX-2被认为是“快速反应基

因”,仅在细胞受到刺激时迅速从头合成,参与多种病理生理过程,包括炎症过程及肿瘤的发生、发展,静息时并不表达<sup>[24]</sup>. COX-2表达的调控主要为在转录水平的调控,即细胞受到细胞内外的各种刺激后,经过一系列的信号转导促进COX-2转录,诱导COX-2的表达.近年来众多研究表明COX-2参与了癌症的发生、进展<sup>[25-26]</sup>. 一般认为COX-2高表达是癌症发生的早期事件<sup>[27]</sup>. 对于COX-2表达与胃癌的类型、分级、分化和淋巴结转移的关系许多学者进行了相关研究. Murata *et al*<sup>[28]</sup>发现COX-2表达促进胃癌淋巴管侵犯和淋巴结转移,而与胃癌原发灶大小、组织病理类型、静脉侵犯等因素无关. Fosslie *et al*<sup>[29]</sup>研究发现新生血管在COX-2表达的区域显著增生,而COX-2抑制剂可显著抑制血管生成,提示COX-2在血管生成中起重要作用. COX-2的过表达在肿瘤局部产生过多PGs,可促进新生血管的生成,可能是肿瘤组织生长、侵袭和转移的基础. Ohno *et al*<sup>[30]</sup>用RT-PCR法测定33例胃癌手术标本中COX-1和COX-2的表达量,对标本中COX-2抗体同时行免疫组化染色和常规组织学测定,发现胃癌中COX-2表达指数明显高于正常黏膜(3.4-0.7 vs 2.2-0.7,  $P < 0.05$ ), COX-2指数随着胃癌组织的浸润深度而升高. 免疫组化显示COX-2蛋白弥散于肿瘤细胞的胞质中,而不存在于细胞间质或非恶性黏膜中. Lim *et al*<sup>[31]</sup>用斑点杂交测定了104例胃癌手术标本中的COX-2蛋白表达情况,同样证实COX-2在胃癌组织中的表达上调. 本研究显示COX-2在胃癌中的表达明显高于正常胃黏膜,其在转移组的阳性率高于无转移组, COX-2表达与胃癌胃壁浸润深度呈正相关,提示COX-2的过表达与胃癌的侵袭和转移能力密切相关. COX-2表达与胃癌的组织病理分型无关,与Borrmann分型无关.

胃癌组织MVD(65.49±20.64)明显高于正常胃黏膜组织(36.21±18.47). MVD值与胃癌的组织病理分型(在低分化癌中高于高中分化癌)、转移有关,与远处转移部位、胃壁浸润深度及Borrmann分型无明显相关. 肿瘤细胞的侵袭不仅依赖于其增殖,且与肿瘤内新生血管的形成密切相关. 肿瘤内新生血管为肿瘤生长提供了必需的营养成分及其远处转移的通道,同时可通过内皮细胞分泌的生长因子来促进肿瘤细胞的增殖. 肿瘤新生血管不成熟,结构缺乏完整性、穿透性较高,肿瘤血管化使间质内压力增高,也加快了淋巴回流<sup>[32-34]</sup>. 血管丰富的肿瘤有

更高的转移率, 因此胃癌组织内MVD的检测, 在某种程度上可反映胃癌的生长和转移能力。

近年来的研究表明, COX-2在胃癌组织中有异常的高表达, 除可促进肿瘤细胞的增殖外, 还与肿瘤内新生血管的形成有关, 并认为COX-2的高表达可通过刺激肿瘤细胞释放血管源性的前列腺素, 而后者刺激内皮细胞迁移和管腔形成, 此乃血管生成的初始步骤, 对调节肿瘤新生血管的形成有重要的作用. 本研究也发现COX-2的表达在胃癌的发展过程中发挥重要作用, 可能与参与胃癌组织内新生血管形成有关. 目前研究认为, COX-2对肿瘤血管形成的调控机制可能有以下几种原因<sup>[35-36]</sup>: (1)上调VEGF的表达; (2)通过刺激bcl-2而抑制血管内皮细胞的凋亡; (3)花生四稀酸的代谢产物血栓素A<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>和PGI<sub>2</sub>可刺激内皮细胞迁移, 生长, 诱导血管生成. 其确切的机制还有待进一步研究. 流行病学研究表明, 使用COX-2抑制剂可使胃肠道肿瘤的发生率和死亡率下降40%. 本研究表明, COX-2的表达在胃癌的血管生成过程中可能起着重要的作用, 与胃癌细胞的增殖、浸润密切相关, 其表达可作为判断胃癌预后的一个指标。

#### 4 参考文献

- Han CB, Mao XY, Xin Y, Wang SC, Ma JM, Zhao YJ. Quantitative analysis of tumor mitochondrial RNA using microarray. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 36-40
- Han CB, Ma JM, Xin Y, Mao XY, Zhao YJ, Wu DY, Zhang SM, Zhang YK. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 31-35
- Xie D, Sham JS, Zeng WF, Che LH, Zhang M, Wu HX, Lin HL, Wen JM, Lau SH, Hu L, Guan XY. Oncogenic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3285-3289
- Liu K, Lei XZ, Zhao LS, Tang H, Liu L, Feng P, Lei BJ. Tissue microarray for high-throughput analysis of gene expression profiles in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1369-1372
- Zheng M, Simon R, Kononen J, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. Analysis of gene expression profiles among 3 epithelial ovarian tumor subtypes using cDNA and tissue microarrays. *Aizheng* 2004; 23: 771-776
- Andersen CL, Monni O, Wagner U, Kononen J, Barlund M, Bucher C, Haas P, Nocito A, Bissig H, Sauter G, Kallioniemi A. High-throughput copy number analysis of 17q23 in 3520 tissue specimens by fluorescence *in situ* hybridization to tissue microarrays. *Am J Pathol* 2002; 161: 73-79
- Gamradt SC, Feeley BT, Liu NQ, Roostaean J, Lin YQ, Zhu LX, Sharma S, Dubinett SM, Lieberman JR. The effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition on human prostate cancer induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone. *Anticancer Res* 2005; 25: 107-115
- Hasegawa K, Ohashi Y, Ishikawa K, Yasue A, Kato R, Achiwa Y, Nishio E, Udagawa Y. Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. *Int J Oncol* 2005; 26: 1419-1428
- Block KI. Inflammation, COX-2 inhibitors, and cancer. *Integr Cancer Ther* 2005; 4: 3-4
- Wendum D, Masliah J, Trugnan G, Flejou JF. Cyclooxygenase-2 and its role in colorectal cancer development. *Virchows Arch* 2004; 445: 327-333
- Koehne CH, Dubois RN. COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol* 2004; 31: 12-21
- Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2323-2326
- Hutchison R. COX-2-selective NSAIDs. *Am J Nurs* 2004; 104: 52-55
- Evans JF, Kargman SL. Cancer and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 627-634
- Boxer GM, Tsiompanou E, Levine T, Watson R, Begent RH. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer. *Tumour Biol* 2005; 26: 1-8
- Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dog. *J Comp Pathol* 2004; 130: 143-151
- Li H, Sun Y, Kong QY, Zhang KL, Wang XW, Chen XY, Wang Q, Liu J. Combination of nucleic acid and protein isolation with tissue array construction: using defined histologic regions in single frozen tissue blocks for multiple research purposes. *Int J Mol Med* 2003; 12: 299-304
- Cui DX, Zhang L, Yan XJ, Zhang LX, Xu JR, Guo YH, Jin GQ, Gomez G, Li D, Zhao JR, Han FC, Zhang J, Hu JL, Fan DM, Gao HJ. A microarray-based gastric carcinoma prewarning system. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1273-1282
- Dan HL, Zhang YL, Zhang Y, Wang YD, Lai ZS, Yang YJ, Cui HH, Jian YT, Geng J, Ding YQ, Guo CH, Zhou DY. A novel method for preparation of tissue microarray. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 579-582
- Lusis EA, Chicoine MR, Perry A. High throughput screening of meningioma biomarkers using a tissue microarray. *J Neurooncol* 2005; 73: 219-223
- Sun Y, Li JY, He JS, Zhou LX, Chen K. Tissue microarray analysis of multiple gene expression in intestinal metaplasia, dysplasia and carcinoma of the stomach. *Histopathology* 2005; 46: 505-514
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1999; 154: 981-986
- Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1966-1975
- Mohammed NA, Abd El-Aleem SA, El-Hafiz HA, McMahon RF. Distribution of constitutive (COX-1)

- and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 350-354
- 25 Singh B, Berry JA, Shoher A, Ramakrishnan V, Lucci A. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. *Int J Oncol* 2005; 26: 1393-1399
- 26 Eibl G, Takata Y, Boros LG, Liu J, Okada Y, Reber HA, Hines OJ. Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor. *Cancer Res* 2005; 65: 982-990
- 27 Yazawa K, Tsuno NH, Kitayama J, Kawai K, Okaji Y, Asakage M, Sunami E, Kaisaki S, Hori N, Watanabe T, Takahashi K, Nagawa H. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 inhibits colon cancer cell adhesion to extracellular matrix by decreased expression of beta1 integrin. *Cancer Sci* 2005; 96: 93-99
- 28 Murata H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sawaoka H, Kimura Y, Shiozaki H, Hori M. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 451-455
- 29 Fosslien E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31: 325-348
- 30 Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, Iseki H, Tsunozaki H, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1876-1881
- 31 Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, Kim HS, Nam DK, Lee KB, Kim HC. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 519-525
- 32 Arbiser JL. Implications of Epstein-Barr Virus (EBV)-induced carcinogenesis on cutaneous inflammation and carcinogenesis: evidence of recurring patterns of angiogenesis and signal transduction. *J Invest Dermatol* 2005; 124: xi-xii
- 33 Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y. Combination of interferon and angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, suppresses liver carcinogenesis and angiogenesis in mice. *Oncol Rep* 2005; 13: 491-495
- 34 Onizuka S, Kawakami S, Taniguchi K, Fujioka H, Miyashita K. Pancreatic carcinogenesis: apoptosis and angiogenesis. *Pancreas* 2004; 28: 317-319
- 35 Chu AJ, Chou TH, Chen BD. Prevention of colorectal cancer using COX-2 inhibitors: basic science and clinical applications. *Front Biosci* 2004; 9: 2697-2713
- 36 Tatsuguchi A, Matsui K, Shinji Y, Gudis K, Tsukui T, Kishida T, Fukuda Y, Sugisaki Y, Tokunaga A, Tajiri T, Sakamoto C. Cyclooxygenase-2 expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue. *Hum Pathol* 2004; 35: 488-495

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

## 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议

本刊讯 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议将于2006-08在哈尔滨举行, 现将征文通知公布如下:

### 1 稿件要求及截稿日期

全文3 000字及摘要800字各1份, 电脑打印(附软盘), 2006-06-15截稿。

### 2 联系方式

哈尔滨市哈尔滨医科大学二院消化内科刘冰榕教授, 电话: 13313695959, E-mail: liubingrong@medmail.com.cn

## 间隙连接蛋白32, 43的表达对胃癌侵袭转移潜能的影响

吴瑾, 王翠华, 周红凤, 刘丹, 王雯, 张波, 隋广杰

吴瑾, 王翠华, 周红凤, 刘丹, 王雯, 张波, 隋广杰, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院 黑龙江省哈尔滨市 150040  
吴瑾, 女, 1963-12-13生, 黑龙江省哈尔滨人, 汉族, 哈尔滨医科大学肿瘤学在读博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事恶性肿瘤的发生、发展及转移方面的研究。

通讯作者: 吴瑾, 150040, 哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内科. xianliu@public.hr.hl

电话: 0451-86298730

收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-09-30

### Relations of connexin 32 and 43 expression with metastatic potential of gastric cancer

Jin Wu, Cui-Hua Wang, Hong-Feng Zhou, Dan Liu, Wen Wang, Bo Zhang, Guang-Jie Sui

Jin Wu, Cui-Hua Wang, Hong-Feng Zhou, Dan Liu, Wen Wang, Bo Zhang, Guang-Jie Sui, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Wu Jin, Department of Internal Medicine, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. xianliu@public.hr.hl

Received: 2005-09-28 Accepted: 2005-09-30

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the expression of connexin (Cx) 32 and 43 and metastatic potential of gastric cancer.

**METHODS:** Indirect immunofluorescent method and SP immunohistochemistry were used to examine the expression of Cx32 and Cx43 in gastric tissues from normal controls and patients with carcinoma of variously differentiated grades as well as in the gastric cancer cells of variously differentiated degree, and the relations of Cx expression with metastatic potential of gastric cancer were analyzed.

**RESULTS:** Immunohistochemistry showed that the positive staining of Cx32 and Cx43 was located at cell membrane and cytoplasm, and the positive rate of Cx expression was significantly higher in normal gastric tissues than that in cancer tissues (Cx32:  $\chi^2 = 23.1, P < 0.05$ ; Cx43:  $\chi^2 = 11.6, P < 0.05$ ). The positive rate of Cx expression was markedly higher in well-differentiated gas-

tric cancer tissues than that in poorly-differentiated cancer ones (Cx32:  $\chi^2 = 32.1, P < 0.05$ , Cx43:  $\chi^2 = 22.6, P < 0.05$ ). Indirect immunofluorescence showed that the expression of Cx32 and Cx43 were both positive in human gastric mucosal epithelial cell line (GES-1) and human well-differentiated gastric cancer cell line (N87), but the distributions and positive rates were significantly different between the two kinds of cell lines. Cx32 and Cx43 distributed granularly or linearly along the cell membrane with positive rates of both 100% in GES-1 cells. However, Cx32 located granularly or linearly along the membrane with a positive rate of 49%, and Cx43 was found in the cytoplasm with a positive rate of 55% in N87 cells. Cx32 and Cx43 were negatively expressed in the lowly-differentiated gastric cell line (BGC-823).

**CONCLUSION:** Cx32 and Cx43 are important factors in influencing the occurrence, development and metastatic potential of gastric cancer.

**Key Words:** Connexin; Gap junction intercellular communication; Gastric cancer; Metastatic potential

Wu J, Wang CH, Zhou HF, Liu D, Wang W, Zhang B, Sui GJ. Relations of connexin 32 and 43 expression with metastatic potential of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):557-562

### 摘要

**目的:** 研究间隙连接蛋白Cx32, Cx43表达水平对胃癌侵袭转移潜能的影响。

**方法:** 采用免疫组化SP法和间接免疫荧光方法分别检测Cx32, Cx43在正常胃组织及不同病理分型的胃癌组织和不同分化程度胃癌细胞株中的表达, 并分析该蛋白表达对胃癌侵袭转移潜能的影响。

**结果:** 免疫组化SP法结果显示: Cx32, Cx43阳性棕黄色颗粒位于细胞膜和细胞质内, 在正常胃组织中的阳性表达率显著高于胃癌组织(Cx32:  $\chi^2 = 23.1, P < 0.05$ , Cx43:  $\chi^2 = 11.6, P < 0.05$ ), Cx32, Cx43在高中分化胃癌的阳

### ■背景资料

细胞间隙连接由膜上的连接子结构单位构成, 其蛋白成分称为连接蛋白(connexin, Cx), 在细胞间信息调控信号传导方面起重要作用, 构成细胞间通讯(CJIC)功能。不同的连接蛋白由位于不同染色体上的连接蛋白基因编码, 连接蛋白基因的异常可导致间隙连接功能的异常, 从而引起肿瘤细胞之间失去正常的调控信息, 肿瘤细胞就会异常生长, 引起局部张力增加, 导致肿瘤细胞的脱落并向张力低的基质间隙侵袭, 从而发生转移。

## ■ 研究前沿

现国内外在该领域研究的热点主要是连接蛋白及其基因在恶性肿瘤发生、发展中的作用。

性表达率显著高于低分化胃癌(Cx32:  $\chi^2 = 32.1, P < 0.05$ ; Cx43:  $\chi^2 = 22.6, P < 0.05$ )。间接免疫荧光法结果显示: 在转化的人胃细胞系(GES-1)、胃高分化腺癌细胞系(N87)中Cx32, Cx43的表达均为阳性, 但表达率和表达部位有显著差异。在GES-1中Cx32, Cx43绿色荧光沿其细胞膜呈颗粒状或细线状分布, 其阳性表达率均为100%; 在N87中, Cx32绿色荧光沿其细胞膜呈颗粒状或细线状分布, 其阳性表达率为49%, 而Cx43荧光分布在其细胞质中, 其阳性表达率为55%; 在BGC-823中Cx32, Cx43的表达均为阴性。

**结论:** Cx32, Cx43是影响胃癌转移潜能的一个重要因素。

**关键词:** 连接蛋白; 间隙连接通讯; 胃癌; 转移潜能

吴瑾, 王翠华, 周红凤, 刘丹, 王雯, 张波, 隋广杰. 间隙连接蛋白32,43的表达对胃癌侵袭转移潜能的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(6):557-562  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/557.asp>

## 0 引言

侵袭与转移是恶性肿瘤基本特征之一, 他涉及肿瘤细胞与宿主间一系列复杂多步骤相互作用的过程。任何一种恶性肿瘤都具有侵袭转移潜能, 而其侵袭转移潜能的高低受多方面因素的影响, 连接通讯功能减弱就是一个重要的因素。间隙连接(gap junction, GJ)是普遍存在动物组织中的一种连接方式, 由间隙连接蛋白(connexin, Cx)所构成。相邻细胞间通过间隙连接所介导的细胞间隙连接通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)进行着信息和能量物质的交换, 参与细胞间物质交换的代谢偶联和电信号传递的电偶联, 对细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程起着重要的调控作用<sup>[1-3]</sup>。

恶性肿瘤的侵袭转移潜能与肿瘤的分化程度密切相关。大量研究表明: 高分化肿瘤细胞的转移潜能低, 低分化肿瘤细胞的转移潜能高。随着对连接蛋白及基因研究的深入, 发现连接蛋白与恶性肿瘤的发生、发展关系密切, 但连接蛋白在肿瘤侵袭转移方面的作用还有待于进一步研究。Cx32, Cx43在胃癌组织中的表达已有报道, 但在细胞系方面的报道甚少。本实验应用免疫组化SP法和间接免疫荧光方法分别检测Cx32, Cx43在正常胃组织及不同病理分型的胃癌组织

和不同分化程度胃癌细胞株中的表达, 探讨该蛋白在组织与细胞中表达是否具有统一性, 并分析该蛋白表达对胃癌侵袭转移潜能的影响, 为以后利用细胞系进行体外抗癌转移的研究提供理论依据, 为肿瘤的基因治疗提供新的靶点。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院1997/1999手术切除且资料完整的胃腺癌58例(高中分化28例, 低分化30例), 所有病例均经组织学诊断, 术前未经放疗化疗。GES-1细胞株由北京市肿瘤防治研究所提供; N87细胞株由上海瑞金医院外科消化研究所馈赠; BGC-823细胞株由哈医大肿瘤研究所提供。RPMI 1640、DMEM购自GIBCO公司, 兔抗人Cx43多克隆抗体购自Zymed公司, Cx32山羊抗人多克隆抗体购自Santa公司, 488 nm山羊抗兔IgG购自Invitrogens公司, FITC-兔抗山羊IgG、兔SP试剂盒、山羊SP试剂盒、DAB显色试剂盒均购自北京中杉公司。SV40病毒转化的可传代人胃黏膜上皮细胞系(GES-1)用含150 mL/L灭活胎牛血清和适量抗生素的DMEM培养液, 在含50 mL/L CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养; 高分化胃腺癌细胞株N87、低分化胃腺癌细胞株 BGC-823, 用含150 mL/L灭活胎牛血清和适量抗生素的RPMI 1640培养液, 在含50 mL/L CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养。

**1.2 方法** 石蜡标本连续切片, 石蜡切片经修复抗原后进行免疫组织化学SP法染色, 染色步骤按试剂盒说明进行, DAB显色后苏木素复染。以细胞膜、细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 已知阳性片作阳性对照, PBS替代一抗作阴性对照。每张切片随机抽取10个高倍视野计数阳性细胞, 进行半定量评分, A项按切片中细胞显色有无及深浅计分: 0分细胞无显色; 1分显色为浅黄色; 2分为棕黄色; 3分为棕褐色; B项按显色细胞的比例评分: 0分, <5%; 1分, 5%-15%; 2分, 16%-50%; 3分, 51%-75%; 4分, 76%-100%。根据这两项指标的积分分为: 阴性(-)积分为0分; 弱阳性(+)积分为1-4分; 强阳性(6)积分>4分。

在24孔板中每孔均放置5 mm×5 mm的盖玻片一块, 并加入对数期的GES-1, N87, BGC-823细胞分别为 $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $10 \times 10^4$ 个, 贴壁生长至占盖玻片面积70%时, 进行固定、间接免疫荧光法染色。(1)用吸管将孔中的培养液弃去, 滴加0.01 mol/L, pH7.4的PBS 1 mL冲洗标本3次, 每次5 min, 轻微震荡; (2)40 g/L多聚

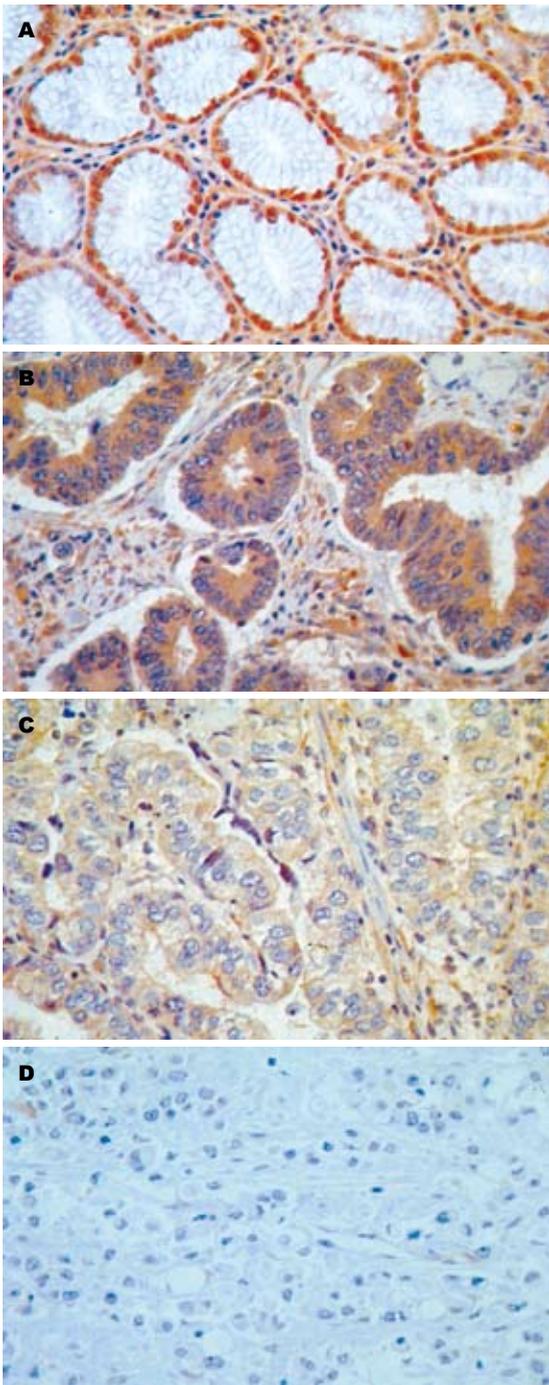


图 1 正常胃组织、高分化胃癌、中分化胃癌和低分化胃癌组织中Cx32的表达( $\times 400$ )。A: 正常胃组织; B: 高分化胃癌组织; C: 中分化胃癌组织; D: 低分化胃癌组织。

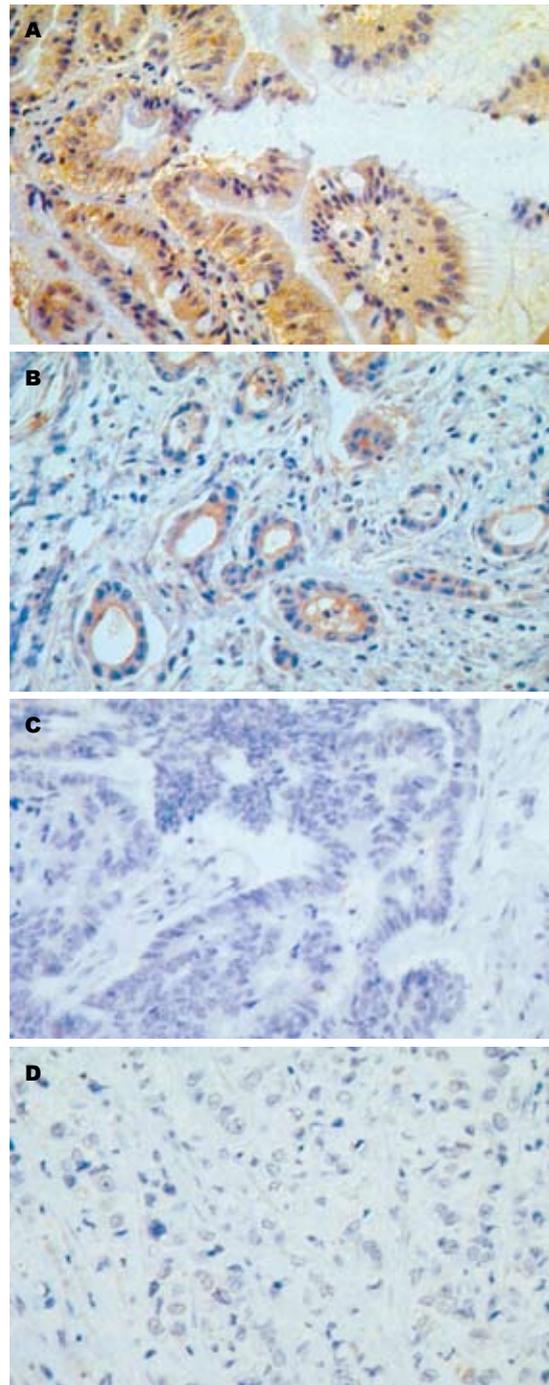


图 2 正常胃组织、高分化胃癌、中分化胃癌和低分化胃癌组织中Cx43的表达( $\times 400$ )。A: 正常胃组织; B: 高分化胃癌组织; C: 中分化胃癌组织; D: 低分化胃癌组织。

■ 创新盘点

目前国外关于连接蛋白主要在心肌、神经等组织的表达研究较多,在肿瘤组织中仅限于生长、分化、增殖方面的研究,而国内关于连接蛋白在组织中表达方面的研究较多,但在细胞系方面的报道甚少,并且研究内容主要是连接蛋白与肿瘤发生、发展的关系,而与肿瘤转移关系的研究未见涉猎。本文通过对细胞连接蛋白(connexin)在人正常胃组织及不同病理分级的胃癌组织和不同分化的胃癌细胞株中表达的差异,探讨连接蛋白与胃癌转移潜能的关系,为以后利用细胞系进行体外抗癌转移的研究提供理论依据,为肿瘤的基因治疗提供新的靶点。

甲醛室温固定30 min; (3)用0.01 mol/L, pH7.4的PBS冲洗10次,轻微震荡; (4)50 g/L BSA封闭30 min(室温); (5)取出玻片,用滤纸吸去多余水分,但不使标本干燥,滴加用0.01 mol/L, pH7.4的PBS 1:200稀释的I级抗体,覆盖已知抗原标本片.将玻片置于湿盒内,4℃过夜; (6)用0.01 mol/L, pH7.4的PBS冲洗10次,不时振荡; (7)取出玻片,用滤纸吸去多余水分,但不使标本

干燥,滴加1:200稀释的488 nm山羊抗兔IgG或1:100稀释的FITC-兔抗山羊IgG II级抗体(在暗室中进行); (8)将玻片平放在湿盒内,室温,2 h; (9)取出玻片,用滤纸吸去多余水分,在荧光显微镜高倍视野下观察.设2组阴性对照:一组不加I抗和II抗,用于荧光强度的基线校正;一组仅加II抗,用于非特异性结合对照.用荧光显微镜在蓝色激发光下观察结果:抗体结合处呈现

### 应用要点

本实验结果证实Cx在恶性肿瘤的转移中具有重要作用,虽然目前的工作还处于探索阶段,但却具有广阔的应用前景,在不久的将来有可能作为肿瘤治疗的辅助手段而应用于临床。

表 1 Cx32, Cx43在正常胃组织、高中分化和低分化胃癌中的表达  $n(\%)$

分组	$n$	Cx32				Cx43			
		-	+	++	+++~++++	-	+	++	+++~++++
正常胃	19	0	1 (5.3)	5 (26.3)	13 (68.4)	0	9 (47.3)	7 (36.8)	3 (15.9)
高中分化胃癌	28	7 (25.0)	12 (42.8)	9 (32.2)	0	5 (17.8)	17 (60.7)	6 (21.4)	0
低分化胃癌	30	30 (100.0)	0	0	0	23 (76.7)	7 (23.3)	0	0

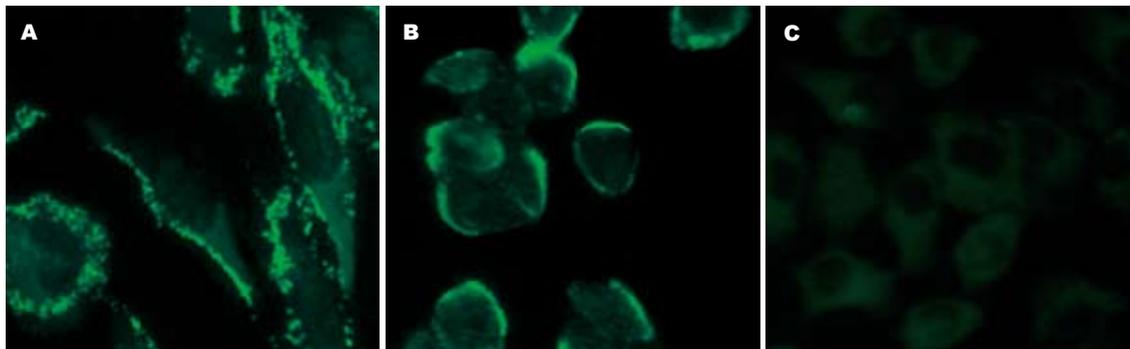


图 3 GES-1、N87及BGC-823中Cx32蛋白的表达和定位(间接免疫荧光法  $\times 400$ )。A: GES-1; B: N87; C: BGC-823.

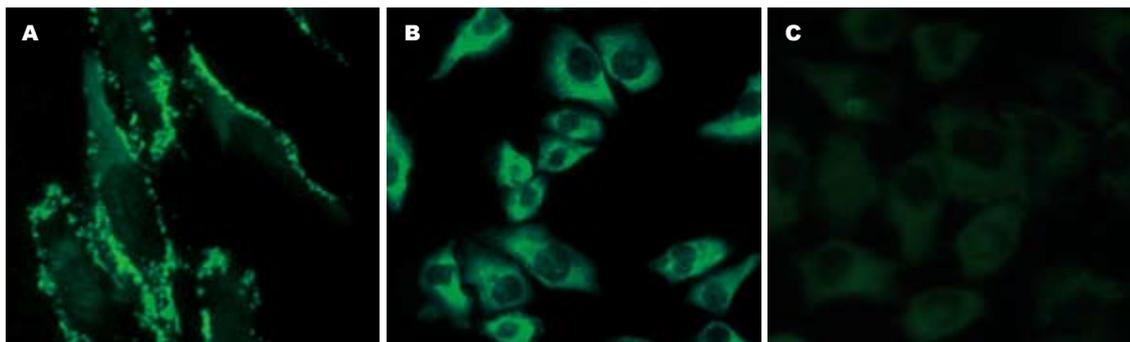


图 4 GES-1、N87及BGC-823中Cx43蛋白的表达和定位(间接免疫荧光法  $\times 400$ )。A: GES-1; B: N87; C: BGC-823.

绿色荧光,说明该处有连接蛋白的存在,判定为阳性表达细胞,如无绿色荧光呈现,判定为阴性表达细胞。每张玻片随机抽取10个高倍视野( $\times 200$ ),先计视野中荧光细胞数(阳性细胞),再在普通光源下计同视野的细胞总数,计算200个普通光源下细胞中阳性细胞所占的比例<sup>[4]</sup>。重复实验三次,取平均值。

**统计学处理** 组间比较应用SPSS10.0统计软件进行 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Cx32, Cx43在正常胃黏膜呈强阳性表达,**阳性表达于细胞膜和细胞质,为棕黄色颗粒(图1A, 2A)。Cx32, Cx43在高中分化的胃黏膜中表达普遍降低,呈淡黄色(图1B, 2B, 图1C, 2C),部分病例不表达。30例原发性低分化胃癌Cx32完全不表达(图1D); 23例Cx43完全不表达, 7例原发性

低分化胃癌表达减低,细胞质呈浅黄色染色(图2D)(表1)。

**2.2 Cx32, Cx43阳性棕黄色颗粒位于细胞膜和细胞质内(图1A, 图2A),**在正常胃组织中的阳性表达率显著高于胃癌组织(Cx32:  $\chi^2 = 23.1, P < 0.05$ , Cx43:  $\chi^2 = 11.6, P < 0.05$ ), Cx32、Cx43在高中分化胃癌的阳性表达率显著高于低分化胃癌(Cx32:  $\chi^2 = 32.1, P < 0.05$ , Cx43:  $\chi^2 = 22.6, P < 0.05$ , 表2)。

**2.3 Cx32, Cx43在转化的人胃细胞系(GES-1)、胃高分化腺癌细胞系(N87)中的表达均为阳性,**但是表达部位有差异。Cx32, Cx43在GES-1的绿色荧光沿其细胞膜呈颗粒状或细线状分布(图3A, 4A); 在N87中, Cx32阳性染色沿其细胞膜呈颗粒状或细线状分布(图3B); Cx43荧光分布在细胞质中(图4B); 在BGC-823中Cx32, Cx43均为阴性(图3C, 4C, 表3)。

表 2 Cx32, Cx43在正常胃组织、高中分化和低分化胃癌中的表达  $n$  (%)

分组	$n$	Cx32	Cx43
正常胃	19	19 (100) <sup>a</sup>	19 (100) <sup>c</sup>
胃癌	58	21 (36.2)	30 (51.7)
高中分化	28	21 (75.0) <sup>b</sup>	23 (82.1) <sup>d</sup>
低分化	30	0	7 (23.3)

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 胃癌; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 低分化胃癌; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 胃癌; <sup>d</sup> $P < 0.05$  vs 低分化胃癌。

### 3 讨论

转移是恶性肿瘤最基本的生物学特征之一。恶性肿瘤细胞具有比相应的正常组织更低的黏着性, 这种黏着力降低是由于瘤细胞之间失去了间隙连接或间隙连接通讯减弱所致。间隙连接能增强细胞之间的结合力, 使细胞不易脱落。如连接通讯功能减弱, 则可引起肿瘤细胞之间失去正常的调控信息, 接触抑制和密度依赖性生长作用丧失并失去器官整体调控作用, 这样肿瘤细胞就会异常生长, 引起局部张力增加, 容易导致肿瘤细胞的脱落并向张力低的基质间隙侵袭<sup>[5-6]</sup>。Nicolson在比较肿瘤细胞转移能力时发现, 高转移潜能细胞系间的间隙连接通讯功能明显低于低转移潜能细胞系间的间隙连接通讯功能, 他首次提出了肿瘤细胞连接通讯功能降低与肿瘤的转移有关。随后他又对一系列不同转移能力的大鼠乳腺癌细胞系应用划痕标记染料示踪技术检测其间隙连接通讯功能, 实验结果进一步证实了上述观点。Brms1基因是最近发现的一个肿瘤转移相关基因, 他的产物可以抑制肿瘤转移。Brms1基因的缺失以及伴随的细胞间隙连接(GJ)的缺失, 可以导致乳腺癌细胞转移能力的增强<sup>[7]</sup>。本结果显示, Cx32, Cx43在正常胃黏膜组织和转化的人胃细胞系(GES-1)中呈强阳性表达且阳性率均为100%, 阳性表达于细胞膜和细胞质(图1A, 2A, 3A, 4A), 而Cx32, Cx43在高中分化的胃癌组织和高分化腺癌细胞N87中虽有一定程度的细胞连接蛋白表达, 但表达的阳性率和表达部位与正常胃黏膜组织和正常胃上皮细胞存在明显差异(图1B, 2B, 3B, 4B, 1C, 2C, 表1, 2), 因而导致GJIC功能下降, 细胞脱离正常分化、繁殖的轨道, 具备了恶性和转移的潜能, 但因仍存在部分GLIC功能, 受一定的正常调控信息的控制, 故转移潜能低。低分化胃癌组织和低分化腺癌细胞BGC-823中连接蛋白Cx32

表 3 胃癌细胞株中Cx32, Cx43表达的阳性率

分组	Cx32 $n$ (%) ( $n = 200$ )	Cx43 $n$ (%) ( $n = 200$ )
GES-1	200 (100)	200 (100)
N87	98 (49) <sup>b</sup>	110 (55) <sup>b</sup>
BGC-823	0 (0)	0 (0)

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs GES-1或BGC-823。

的表达完全缺失(图1D, 3C), 23例低分化胃癌组织中Cx43的表达完全缺失, 7例低分化胃癌组织中Cx43低水平表达(图2D), 造成肿瘤特异性抗原呈递缺损、免疫细胞不能识别肿瘤细胞; 同时伴随GJIC的完全关闭, 不能向免疫细胞提供cAMP、蛋白激酶、IP3等信息物质, 免疫细胞不能被激活及使来自正常细胞的生长调控信息不能到达肿瘤细胞, 肿瘤细胞逃避正常生长控制及免疫监视, 更易于生长扩散和转移。上述结果提示, 间隙连接蛋白Cx32, Cx43表达量及表达部位的差异导致GJIC功能障碍, 从而影响了胃癌细胞的转移潜能。Eghbali *et al*将编码Cx32的cDNA导入缺乏GJIC的肝细胞系SKHep1, 发现细胞系可形成功能性GJ。随后, 使交流缺陷的鼠突变肝细胞系aBI转染Cx43基因后, 其GJIC也得到恢复。由此我们想到将Cx基因转染到胃低分化腺癌细胞使Cx表达增强, GJIC功能恢复, 从而控制胃癌的转移, 为胃癌的基因治疗开辟了新的靶点。另外, 寻找能够上调Cx基因表达和改善GJIC的药物对肿瘤的预防和治疗将有重要的意义。

在肿瘤和转化细胞普遍存在间隙连接蛋白表达的异常和间隙连接通讯功能的缺陷<sup>[8-11]</sup>。在本实验中GES-1是SV40病毒转化的可传代人胃黏膜上皮细胞系, 实验结果显示在GES-1中Cx32和Cx43均阳性, 且阳性率100%, 这可能与GES-1在体外培养中虽获得永生性, 但在裸鼠体内无致瘤性有关<sup>[12]</sup>。已有研究证实: GES-1细胞间隙连接通讯功能与正常胃黏膜相同<sup>[13]</sup>。本实验结果证实胃黏膜组织与GES-1细胞中Cx32, Cx43表达一致。国外一些研究者发现许多肿瘤细胞中连接蛋白基因表达明显降低或消失, 而且表达的连接蛋白的量 and 肿瘤恶性程度之间呈负相关。如Wilgenbus *et al*用人肿瘤组织的冰冻切片, 以免疫组织化学方法研究了连接蛋白基因Cx26、Cx32和Cx43的表达情况, 发现在乳癌、肾细胞癌和肉瘤组织中, Cx水平显著下降。而有关胃癌细胞系方面的研究未见报道, 但在其

### ■名词解释

转移潜能: 恶性肿瘤具有潜在的侵袭转移的能力。大量研究表明: 其与肿瘤的分化程度密切相关, 高分化肿瘤细胞的转移潜能低, 低分化肿瘤细胞的转移潜能高。

### ■同行评价

本文研究的内容对了解Cx32、Cx43表达与胃上皮细胞的分化程度,推测其与转移潜能有一定的理论价值,提供了一定的有意义的信息. 研究具有一定的新颖性,符合伦理学要求.

他细胞系中有报道. Murray *et al*<sup>[5]</sup>应用免疫组化比较正常肾上腺、良恶性肾上腺皮质肿瘤及肾上腺癌细胞株(H295)中Cx43蛋白的水平,在正常和良性肿瘤中可检测到Cx43,在恶性肿瘤和H295中少或无Cx43的表达,与正常细胞比较,肾上腺癌细胞中GJ斑进行性减少. 国内有关组织中Cx的表达情况报道很多<sup>[14-18]</sup>. 沈守荣 *et al*<sup>[18]</sup>研究表明, Cx32和Cx43在正常胃黏膜上皮细胞中高水平表达,在癌旁细胞中表达水平下降; Cx32在癌细胞及癌细胞株(低分化腺癌细胞株MGC-803)均不表达; Cx43在癌细胞中有低水平表达,在癌细胞株(低分化腺癌细胞株MGC-803)中无表达. 本实验结果与上述结果相符,提示可以应用细胞系在体外进行抗癌转移的研究,这为以后利用细胞系进行体外抗癌转移的研究开辟了新的领域,为肿瘤的分化诱导治疗提供新的可能.

总之,本实验结果证实Cx在恶性肿瘤的转移中具有重要作用,而肿瘤细胞Cx基因的转染可抑制肿瘤的发展,逆转其恶性表型. Cx基因抑制恶性肿瘤转移的作用的研究对肿瘤的临床治疗可能有重要意义. 目前的工作还处于探索阶段,但却具有广阔的应用前景,在不久的将来有可能作为肿瘤治疗的辅助手段而应用于临床.

### 4 参考文献

- 1 Krutovskikh VA, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth *in vivo*. *Oncogene* 2000; 19: 505-513
- 2 Nishitani A, Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Hashimoto K, Nakagomi N, Matsuda H. Differential expression of connexin 43 in gastrointestinal stromal tumours of gastric and small intestinal origin. *J Pathol* 2005; 206: 377-82
- 3 Mine T. Role of gap junction in the stomach. *Nippon*

- 4 Shokakibyō Gakkai Zasshi 1998; 95: 865-871
- 5 杨景山主编. 医学细胞化学与细胞生物技术. 第1版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992: 100-101
- 6 Murray SA, Davis K, Fishman LM, Bornstein SR. Alpha1 connexin 43 gap junctions are decreased in human adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 890-895
- 7 Habermann H, Ray V, Habermann W, Prins GS. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol* 2001; 166: 2267-2272
- 8 Suzuki M, Kobayashi H, Kanayama N, Nishida T, Takigawa M, Terao T. CD44 stimulation by fragmented hyaluronic acid induces upregulation and tyrosine phosphorylation of c-Met receptor protein in human chondrosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1591: 37-44
- 8 邱元正, 田勇, 肖健云. 连接蛋白基因与肿瘤研究进展. 国外医学耳鼻喉科学分册 1999; 23: 290-293
- 9 Levin M. Isolation and community: a review of the role of gap-junctional communication in embryonic patterning. *J Membr Biol* 2002; 185: 177-192
- 10 Kanczuga-Koda L. Gap junctions and their role in physiology and pathology of the digestive tract. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2004; 58: 158-165
- 11 Mesnil M, Crespín S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1719: 125-145
- 12 柯杨, 宁涛, 王冰, 路桂荣, 冯莉雅, 李吉友, 吕有勇, 鄂征. 人胃黏膜上皮细胞系GES-1的建立及其生物学特性. 中华肿瘤杂志 1994; 16: 7-10
- 13 李金萍, 张志谦, 宁涛. 胃癌细胞cadherin亚型改变与通讯连接蛋白抑制. 科学通报 2001; 46: 1249-1299
- 14 范松青, 周鸣, 向秋, 王洁如, 熊伟, 王蓉, 魏启幼, 周金平, 李桂源. 细胞间隙连接蛋白在多种癌组织中的原位表达研究. 癌症 2003; 22: 686-690
- 15 黄扬, 陈丽英, 高美钦. 间隙连接蛋白Cx32在胃癌和胃癌前病变的表达及意义. 福建医科大学学报 2002; 36: 257-259
- 16 王宪远, 任景丽, 曾艳丽. 胃癌组织Cx43表达的研究. 中国现代普通外科进展 2004; 7: 60
- 17 秦荣, 晏才杰, 唐开业, 罗云生. 正常胃黏膜、癌旁胃黏膜及胃癌组织Cx32 mRNA表达及意义. 第三军医大学学报 2000; 22: 46-48
- 18 沈守荣, 李伏娥, 刘洋, 施正专, 邹益友, 张熙纯, 汤恢焕. 细胞连接蛋白基因在胃癌中的表达、诱导及突变研究. 中华消化杂志 2000; 20: 304-307

电编 李琪 编辑 潘伯荣

# 利用大鼠Y染色体特异性PCR技术检测卵圆细胞源性肝癌细胞

陈铁军, 方驰华, 朱明德

陈铁军, 方驰华, 朱明德, 南方医科大学珠江医院肝胆外科  
广东省广州市 510282  
陈铁军, 男, 1979-03-05生, 辽宁省鞍山市人, 汉族, 2003年南方医科大学硕士生, 主要从事肝胆胰外科疾病的研究。  
广东省自然科学基金资助项目, No. 2002.020097  
通讯作者: 方驰华, 510282, 广东省广州市, 南方医科大学珠江医院普外科, fch58520@sina.com  
电话: 020-35509612  
收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-02

## Detection of liver cancer cells originated from hepatic oval cells using rats' Y chromosome specific polymerase chain reaction technique

Tie-Jun Chen, Chi-Hua Fang, Ming-De Zhu

Tie-Jun Chen, Chi-Hua Fang, Ming-De Zhu, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangdong 510282, Guangdong Province, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2002.020097  
Correspondence to: Chi-Hua Fang, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangdong 510282, Guangdong Province, China. fch58520@sina.com  
Received: 2005-11-23 Accepted: 2005-12-02

### Abstract

**AIM:** To find out the evidence that hepatic oval cells could differentiated into liver cancer cells, and to provide the theoretical basis for clinical therapy of liver cancer.

**METHODS:** Thirty male Wistar rats were fed with the animal food containing 0.6 g 3'-daminobenzidine (3'-Me-DAB) per kilogram for 4 weeks to establish the model of hepatic oval cell proliferation. Then the hepatic oval cells were extracted and identified by immunohistochemistry under light and electron microscope. Sixty female Wistar rats were randomly and averagely divided into experiment group and control group. The rats in the control group were fed with the DAB-containing food for 14 weeks without transplantation. While the rats in experiment group were narcotized with 25 mg/kg nembutal via abdominal cavity, and the male hepatic oval cells (in suspension) were

inoculated ( $10^6$  each point) under the liver envelope after the abdominal part was cut open. The rats received transplantation were also fed with DAB-containing food for 14 weeks to promote the formation of liver cancer. At the end of 14 wk, the DNA of cancer tissues was extracted from both groups. According to the GenBank, the specific primer of rat SRY gene was designed. Then the extracted DNA was amplified using the specific primer by polymerase chain reaction (PCR). The PCR product was analyzed by electrophoresis.

**RESULTS:** Under light microscope, hepatic oval cells were observed, showing the characteristics of small and clear nucleolus, small sizes (9-12  $\mu$ m in diameter), which were one third of normal liver cells. By electron microscopy, hepatic oval cells manifested typical morphological features of undifferentiation, with some short and tiny microvillus on their surfaces. By immunohistochemistry, c-kit was positively expressed in the oval cells. At the end of 14 wk, liver tumor formed in both groups of rats, and the tumor characters and appearances had no significant difference between experiment and control group. The PCR product showed the same length of positive bands after electrophoresis at the designed ones.

**CONCLUSION:** Hepatic oval cells can differentiate into liver cancer cells.

**Key Words:** Stem cell; Hepatic oval cell; Liver stem cells; Immunohistochemistry

Chen TJ, Fang CH, Zhu MD. Detection of liver cancer cells originated from hepatic oval cells using rats' Y chromosome specific polymerase chain reaction technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):563-567

### 摘要

**目的:** 利用Y染色体体细胞的特异性来寻找卵圆细胞分化为肝癌细胞的直接证据, 从而为卵圆细胞源性的研究及临床肝癌治疗方法提供理论依据。

**方法:** 选择健康♂ Wistar大鼠30只饲喂每千克

**■背景资料**  
在肝脏损伤、肝硬化、肝癌这一递进式过程中, 人们发现卵圆细胞的大量增殖并参与肝脏损伤的修复。卵圆细胞与肝癌细胞间是否有必然的联系? 至今未获得肝癌细胞来源于卵圆细胞的直接证据。在哺乳动物包括人类的Y染色体短臂上存在着决定性别的主宰基因 (sex-determining region of the Y), 并定位于Yp11.3。我们的目的就是利用Y染色体的这种特异性PCR技术检测卵圆细胞源性肝癌细胞, 寻找卵圆细胞分化为肝癌细胞的直接证据, 从而为卵圆细胞源性的研究及临床肝癌治疗方法提供理论依据。

### ■创新盘点

利用PCR加电泳对照的方法来检验卵圆细胞源性的肝癌细胞,国内文献中未见有类似报道.本实验证明大鼠的卵圆细胞可以分化为肝癌细胞,为卵圆细胞源性肝癌细胞的假说提供实验依据.

含0.6 g 3-甲基-4-二甲基偶氮苯(DAB)的饲料4 wk,建立卵圆细胞增生的♂Wistar大鼠动物模型.卵圆细胞的分离、提取和鉴定(光镜、电镜、免疫组化).将实验用♀Wistar大鼠60只随机平分成对照组和实验组.对照组不接种细胞悬液,连续喂含DAB饲料14 wk.实验组按25 mg/kg体重戊巴比妥腹腔麻醉,消毒开腹,用吸取♂Wistar大鼠卵圆细胞悬液,接种至肝脏包膜下,每点 $10^6$ 个,之后连续喂含DAB饲料14 wk,促进肝肿瘤的生成.从GenBank调出雄性大鼠的SRY基因,利用引物设计软件设计引物片断.14 wk后提取两组大鼠肝肿瘤组织的基因组DNA,利用所设计的引物进行PCR扩增,对PCR产物进行电泳分析.

**结果:**光镜下可找到卵圆细胞,核仁小而清晰,胞质少,细胞体积较小,约为正常肝细胞的1/3,直径约9-12  $\mu\text{m}$ 不等.电镜下观察可见细胞表面少量短而小的微绒毛突起,呈现未分化细胞的形态.免疫组化观察肝卵圆细胞胞质c-kit染色呈棕黄色阳性信号.14 wk后对照组和实验组共计60只大鼠均见肝脏肿瘤生成,肿瘤组织在外观上和性状上无显著性差异.实验组电泳后见与设计片断长度相符的电泳阳性条带.

**结论:**大鼠的卵圆细胞可以分化为肝癌细胞,为卵圆细胞源性肝癌细胞的假说提供实验依据.

**关键词:**干细胞;肝卵圆细胞;肝干细胞;免疫组织化学

陈铁军,方驰华,朱明德.利用大鼠Y染色体特异性PCR技术检测卵圆细胞源性肝癌细胞.世界华人消化杂志2006;14(6):563-567

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/563.asp>

## 0 引言

近年来肝脏卵圆细胞的研究越来越受到人们的重视,已成为近年的热点<sup>[5-7]</sup>,在组织胚胎学中发现:肝脏干细胞来源于前肠内胚层,是肝前体细胞.在体内可分化为肝实质细胞或胆管上皮细胞<sup>[8-10]</sup>.在临床研究发现:在肝脏损伤、肝硬化、肝癌这一递进式过程中,人们发现卵圆细胞的大量增殖并参与肝脏损伤的修复.卵圆细胞与肝癌细胞间是否有必然的联系?至今未获得肝癌细胞来源于卵圆细胞的直接证据.我们知道SRY基因是决定人类和其他哺乳动物性别

的重要基因.在1990年首先由Sinclair *et al*<sup>[11]</sup>揭示在哺乳动物包括人类的Y染色体短臂上存在着决定性别的主宰基因(sex-determining region of the Y),并定位于Yp11.3.我们的目的就是利用Y染色体的这种特异性PCR技术检测卵圆细胞源性肝癌细胞.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** (1)实验动物:南方医科大学实验动物中心提供标准动物,选择健康♂Wistar大鼠30只,♀Wistar大鼠60只,体质量为 $120 \pm 20$  g. (2)实验试剂:3'-甲基-4-二甲基偶氮苯(3'-me-DAB)(日本东京化成工业株式会社),他克莫司(Tacrolimus)(日本藤泽药厂),SABC免疫组化试剂盒、小鼠抗大鼠c-kit抗体、癌胚抗原(AFP)(武汉博士德公司),DMEM(高糖)(北京鼎国生物技术有限责任公司),胎牛血清、F12、Hanks液、PBS(广州威佳责任有限公司),Tris饱和酚、氯仿(中山大学遗传教研室提供),DNA抽提试剂盒、Taq DNA聚合酶( $1.667 \times 10^8$  nkat/L)(中山大学达安基因诊断中心),蛋白酶K(Serra公司),琼脂糖(Promega公司),Marker(100 bp DNA LADDER)(大连宝生物公司),所有引物合成(上海博亚公司),DTT(中山大学法医教研室). (3)主要仪器:17597-K针头滤器(广州英韦创津公司),日本Olympus BHSPM-10AD自动曝光显微照像系统,Olympus SIX70型倒置显微镜(日本Olympus公司),JEM-1200EX型电镜(日本电子株式会社JEOL公司),台式高速离心机(TGL-16G)(上海安亭科学仪器厂),电子天平(BS210S)(日本Satorius公司),紫外分光光度计(Shimadzu UV-1206)(日本Shimadzu公司),PCR扩增仪(美国PE公司PE 9600),GDS7600凝胶扫描系统(英国UVP公司),水平式电泳仪(DF-23B)(北京东方仪器厂),普通冰箱(中国青岛海尔公司). (4)其他实验所需物品由南方医科大学组胚教研室提供.

### 1.2 方法

**1.2.1 动物的分组及模型的制备** 选择健康♂Wistar大鼠30只,体质量为 $120 \pm 20$  g.饲养温度为 $28^\circ\text{C}$ ,湿度为40%-70%.正常饲料喂养1 wk后,♂Wistar大鼠30只饲喂含DAB饲料4 wk,4 wk后随机抽取5只处死,取肝脏,多聚甲醛固定,常规石蜡包埋.所有蜡块均做5  $\mu\text{m}$ 厚连续切片,用于HE染色和免疫组化,做光镜、电镜、组织免疫组织化学鉴定卵圆细胞增生.大鼠肝干

细胞的分离、培养采用马俊勋 *et al*<sup>[12-13]</sup>提到的 Percoll 密度梯度离心法。台盼蓝染色细胞活力达 95%，调整细胞浓度为  $5 \times 10^5$ /mL 接种于血清培养基，在 37℃ 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。提取 ♂ Wistar 大鼠的卵圆细胞悬液。选择健康 ♀ Wistar 大鼠 60 只，体质量为  $120 \pm 20$  g，随机均分成对照组和实验组。对照组不接种 ♂ Wistar 大鼠卵圆细胞悬液，连续喂含 DAB 饲料 14 wk。实验组按 25 mg/kg 体质量戊巴比妥腹腔麻醉，消毒开腹，用 4 号针头吸取 ♂ Wistar 大鼠卵圆细胞悬液，接种至肝脏包膜下，每点  $10^6$  个，之后连续喂含 DAB 饲料 14 wk，促进肝肿瘤的生成，用免疫抑制剂他克莫司 0.1 mg/(kg·d) 喂饲抑制免疫排斥反应。

**1.2.2 卵圆细胞的检测方法** (1) 光镜：标本采用多聚甲醛固定后，依次放入 70 mL/L、80 mL/L、90 mL/L、95 mL/L 酒精脱水各 2 h，1 000 mL/L 酒精脱水两次各 1 h，最后将标本放入二甲苯中透明，透明后放入石蜡中包埋，恒温箱 37℃ 过夜，第二日见标本已被石蜡充分浸润固定于包埋器皿中变硬，即可做切片。将蜡块固定于标本台，用石蜡切片机切成厚度为 4-8 μm 的切片。将切片放入 40℃ 温水中，展平，将载玻片伸入水中在切片下托起，置于 37℃ 烤箱中烤干，HE 染色，光镜下观察。(2) 透射电镜：另取门脉处肝脏组织大小 2 mm × 2 mm × 2 mm 于 4℃ 下用多聚甲醛戊二醛 (pH 7.3) 固定 4 h，磷酸蔗糖缓冲液冲洗，锇酸固定 1 h，系列酒精及丙酮脱水，Epon812 渗透包埋，制成超薄切片；醋酸双氢铀及枸橼酸铅双重染色<sup>[14]</sup>，JEM-1200EX 型透射电镜观察并拍照。(3) 免疫组织化学：肝组织 c-kit 抗体的检测：采用 SABC 免疫组化染色法，连续石蜡切片经脱蜡至水后，以 30 mL/L 过氧化氢溶液浸泡 10 min 灭活内源性过氧化物酶，抗原热修复后以正常山羊血清封闭，加 c-kit 抗体 4℃ 过夜，加生物素标记的第二抗体 37℃ 45 min，加结合过氧化物酶链霉亲和素 37℃ 45 min，加 DAB 显色剂，镜下观察并拍照。棕黄色染色者为阳性细胞。

**1.2.3 标本收集** 14 wk 后提取两组大鼠肝肿瘤组织置 -20℃ 低温冰箱保存，备以后集中抽提基因组 DNA。DNA 模板的制备主要按照经典的酚氯仿抽提方法和中山大学达安基因诊断中心组织细胞 DNA 抽提试剂盒说明进行。(1) 酚氯仿抽提方案：取 10 mg 组织，用研钵研磨碎，加入 500 μL STE、3.5 μL 蛋白酶 K，56℃ 消化 2-3 h，定期倒转混匀；加入等体积的 Tris 饱和酚充分混匀 5 min，

8 000 g 离心 10 min，取上清，加入 1/2 体积的 Tris 饱和酚和 1/2 体积氯仿充分混匀 5 min，8 000 g 离心 10 min；取上清加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠和 2 倍体积的预冷无水乙醇，轻轻混匀至可见絮状 DNA 沉淀；用干净吸管或枪头将絮状 DNA 挑出，加入预冷的 75 mL/L 乙醇，10 000 g 离心后弃上清液，自然晾干，加入 100 μL TE 溶解 DNA，4℃ 或 -20℃ 保存备用。(2) 抽提的 DNA 用紫外分光光度计测波长 260 nm、280 nm 处的吸光度 (A) 值，计算两者比值并算出所抽提 DNA 量。

**1.2.4 引物的设计和 PCR 检测** 从 GenBank 调出 ♂ 大鼠的 SRY 基因，用 ABI 公司 primer express 引物设计软件设计如下：SRY 68F: 5' AGGCGCAAGTTGGCTCAAC3'; SRY 168R: 5' GGCCTTTTTTCGGCTTCTG3' 产物长度 101 bp。SRY PCR 反应体系：反应总体积 25 μL。5 × PCR Buffer 5 μL，dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL，引物 SRY 1 μL，Taq DNA 聚合酶 ( $1.667 \times 10^8$  nkat/L) 0.15 μL，模板 DNA 1 μL，补足灭菌去离子水至总体积 25 μL。PCR 反应条件：PE 9 600 扩增仪上，93℃ 预变性 3 min，93℃ 30 s，55℃ 25 s，72℃ 45 s，共 30 个循环，72℃ 延伸 10 min。反应后检测：取 8 μL 扩增产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳 25 min 后，紫外灯下观察、拍照。

## 2 结果

光镜下 HE 染色观察均可找到卵圆细胞，细胞核呈卵圆形，核仁小而清晰，胞质少，细胞体积较小，约为正常肝细胞的 1/3，直径约 9-12 μm 不等。(图 1A)。电镜下观察可见核浆比较大，核仁明显，胞质内细胞器少，仅见少量线粒体和内质网，细胞表面见少量短而小的微绒毛突起，呈现未分化细胞的形态(图 1B)。免疫组化观察肝卵圆细胞胞质 c-kit 染色呈棕黄色阳性信号(图 1C)。对照组不接种 ♂ Wistar 大鼠卵圆细胞悬液，连续喂 DAB 14 wk 后解剖，见全部肝脏组织都有肿瘤生成，肿瘤组织呈现结节状或者菜花状。实验组接种 ♂ Wistar 大鼠卵圆细胞悬液，之后连续喂 DAB 14 wk 后解剖，见全部肝脏组织都有肿瘤生成，肿瘤组织也呈现结节状、菜花状，与对照组的肿瘤组织在外观上和性状上 (AFP 均阳性) 无显著性差异(图 2A-B)。由电泳条带(图 3)可见：♂ 大鼠与肿瘤组织样本有相同的电泳条带 (N1, N2 与 T1, T2, T3, T4, T5 相同)，♂ 大鼠与 ♀ 大鼠有不相同的电泳条带 (N1, N2 与 F 不相同)，电泳阴性对照泳道未见任何电泳条带。

## ■ 同行评价

本文旨在研究肝癌细胞的来源，有重要研究意义，作者采用 Y 染色体特异性基因 SYB 作为标志来追踪检测肝癌细胞的来源有一定新颖性。

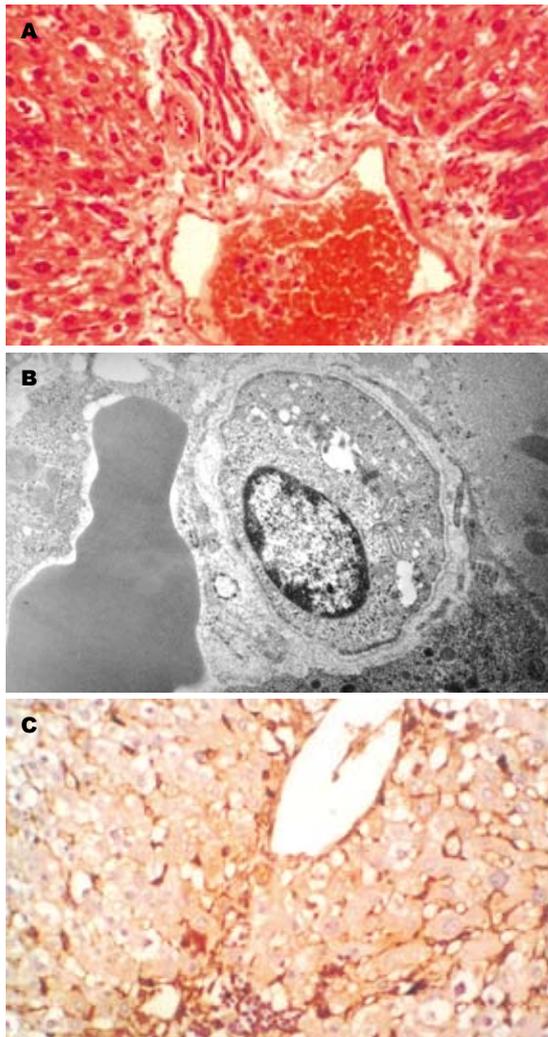


图 1 卵圆细胞检测结果. A: 光镜照片(HE × 400); B: 电镜照片(× 10k); C: 免疫组化光镜照片(SABC × 400).

### 3 讨论

许多证据表明, SRY基因在胚胎的极早期决定着原始性腺向睾丸发育, 该结论经Koopman *et al*<sup>[15]</sup>转基因小鼠实验证明. 国外有人用Y染色体荧光原位杂交法追踪骨髓干细胞<sup>[16]</sup>. 由于真核表达载体表达效率和表达时限<sup>[17-18]</sup>的限制, 移植到体内的基因标记的干细胞常不能被检测到. 相反Y染色体是♂个体的特异性基因结构<sup>[19]</sup>, 不受时间和细胞表型变化的影响, 为此, 我们拟用Y染色体体细胞的特异性来寻找卵圆细胞在体内分化为肝癌细胞的直接证据. 采用Wistar大鼠作为实验动物, 先建立♂大鼠卵圆细胞增生动物模型, 把分离出的♂大鼠肝脏卵圆细胞接种于♀大鼠肝内, 然后对♀大鼠进行致癌剂诱导, 分析♀大鼠肝癌细胞的来源. 如果在癌细胞中发现有Y染色体(+)的细胞可以证明植入的卵圆细胞可以在体内分化为肝癌细胞, 从而得出肝癌细胞可以来源

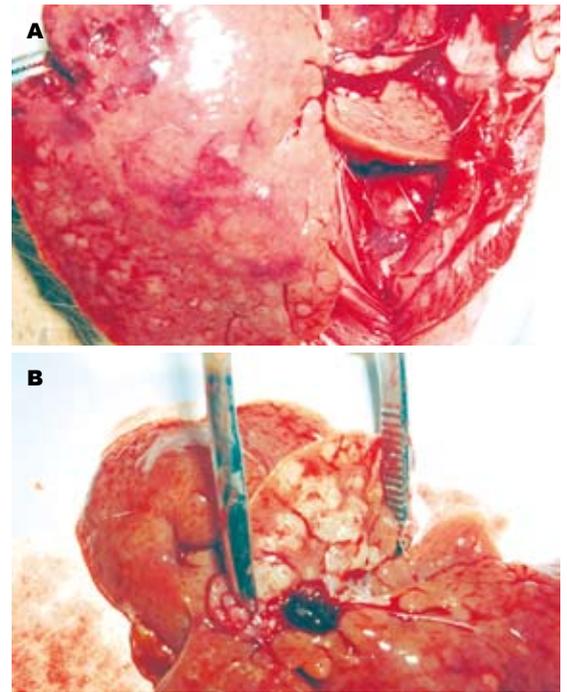


图 2 肝脏组织肿瘤形状. A: 结节状; B: 菜花状.

C T5 T4 T3 T2 T1 F N2 N1 M

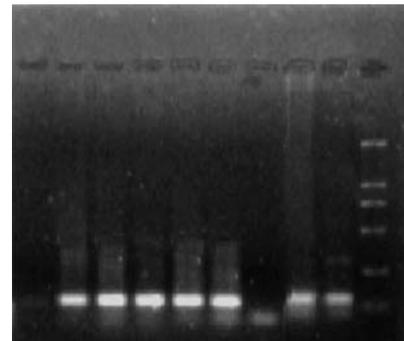


图 3 电泳照片. N1: 正常♂ Wistar大鼠卵圆细胞; N2: 正常♂ Wistar大鼠卵圆细胞; F: 正常♀ Wistar大鼠卵圆细胞; T1: 肿瘤组织1; T2: 肿瘤组织2; T3: 肿瘤组织3; T4: 肿瘤组织4; T5: 肿瘤组织5; C: 阴性对照; M: DNA Marker.

于卵圆细胞的直接证据. 利用PCR加电泳对照的方法来检验卵圆细胞源性的肝癌细胞, 国内文献中未见有类似报道. 肝卵圆细胞的肝脏移植国内文献可供参考的经验很少, 我们用他克莫司0.1 mg/(kg·d)喂饲抑制免疫排斥效果良好<sup>[20]</sup>, 提高了移植成活率. 他克莫司是由日本藤泽制药公司于1982年提取的一种真菌代谢产物, 该药对T细胞具有选择性抑制作用, 主要是通过抑制TH细胞释放IL-2、IL-3、IFN- $\gamma$ , 以及抑制IL-2R的表达而发挥其强大的免疫抑制作用. 适用于防治器官移植后的排斥反应, 据报道其临床疗效是环孢霉素A(CsA)的100倍. 他克莫司能减少肝肾移植受体的急、慢性排斥反应<sup>[21-24]</sup>, 尤其

是该药品有较强的亲肝性, 对肝移植的能效高100倍. 移植 $\delta$ 卵圆细胞的肿瘤肿块组织有与设计片段长度相符的电泳阳性条带, 且与 $\delta$ 大鼠的条带相同, 说明肝癌细胞存在卵圆细胞源性, 即可以来源于卵圆细胞, 结论明确可靠. 电泳阴性对照(图3中的C条带)泳道未见任何电泳条带, 说明标本未被污染, 如出现电泳条带则表明标本可能被污染.

#### 4 参考文献

- 1 姜金兰, 吕文富, 胡春光, 熊炜, 颜伟群, 孙德军. 大鼠肝细胞的分离及原代长期培养. 白求恩医科大学学报 2000; 26: 562-564
- 2 徐哲, 白雪帆, 滕光菊, 黄长形. 大鼠肝细胞分离、原代培养及生物学特性研究. 医学研究生学报 2003; 16: 342-345
- 3 单云峰, 周伟平, 杨文, 刘淑琴, 曹惠芳, 邱秀华, 吴孟超, 王红阳. 大鼠肝卵圆细胞的分离培养和体外分化研究. 中华实验外科杂志 2005; 22: 925-927
- 4 王宇明, 陈耀凯, 郎松, 李俊刚, 刘国栋. 大鼠肝卵圆细胞的分离培养及脾内移植研究. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 328-330
- 5 龚家庆, 方驰华. 成人肝脏干细胞研究现状及展望. 中华外科杂志 2002; 40: 385-387
- 6 甘向阳, 腾皋军. 肝干细胞-肝卵圆细胞的研究进展. 现代医学杂志 2005; 33: 129-131
- 7 龚雪, 刘慧文. 肝干细胞的来源与移植作用. 中国临床康复杂志 2005; 9: 186-188
- 8 Alison M, Sarraf C. Hepatic stem cells. *J Hepatol* 1998; 29: 676-682
- 9 Strani, Crolby HA. Hepatic stem cells. *Gut* 2000; 46: 743-745
- 10 Tian YW, Smith PC, Teoh GC. The oval-shaped cells as a candidate for a liver stem in embryonic, neonatal and precancerous liver: identification based on morphology immunohistochemical staining for albumin and pyruvate kinase isoenzyme expression. *Histo-chem Cell Biol* 1997; 107: 243-250
- 11 Sinclair AH, Berm P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encode a protein with homology to conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; 346: 240-244
- 12 马俊勋, 方驰华, 张伟. 大鼠肝干细胞定位及形态学特征研究. 中华实验外科杂志 2004; 21: 940-941
- 13 马俊勋, 方驰华. 卵圆细胞及其与原发性肝癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 448-451
- 14 薛玲, 文剑明, 吴惠茜, 张萌, 董郡. 大鼠肝卵圆细胞的诱导增生、分离、体外培养和性质鉴定. 中华病理学杂志 1998; 27: 149-150
- 15 Koopman p, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; 351: 117-121
- 16 Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4080-4085
- 17 Grove JE, Lutzko C, Priller J, Henegariu O, Theise ND, Kohn DB, Krause DS. Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to Pulmonary epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 645-651
- 18 Robbins PB, Skelton DC, Yu XJ, Halene S, Leonard EH, Kohn DB. Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10182-10187
- 19 邹西峰, 苏玉金, 鲁玲玲, 杨慧, 李铁林, 徐群渊. 小鼠Y染色体RNA探针的标记和应用. 解剖学报 2004; 35: 664-667
- 20 于立新, 刘小友, 胡敏燕. FK506的药物动力学及临床研究. 第一军医大学学报 2000; 20: 539-545
- 21 Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus(FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cada-veric renal transplantation. *Transplantation* 1997; 15: 977-983
- 22 Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B, Eigler FW, Heemann U, Pichlmayr R, Behrend M, Vanrenterghem Y, Donck J, van Hooff J, Christiaans M, Morales JM, Andres A, Johnson RW, Short C, Buchholz B, Rehmert N, Land W, Schleichner S, Forsythe JL, Talbot D, Pohanka E. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus(FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* 1997; 15: 436-443
- 23 Reimer J, Franke GH, Philipp T, Heemann U. Quality of life in kidney recipients: comparison of tacrolimus and cyclosporine-microemulsion. *Clin Transplant* 2002; 16: 48-54
- 24 Henry MI. Cyclosporine and tacrolimus(FK506): a comparison of efficacy and safety profiles. *Clin Transplant* 1999; 13: 209-220

电编 李琪 编辑 张海宁

# 克隆性分析技术在肝脏局灶性结节性增生诊断中的应用

巩丽, 张宏图, 张伟, 李爱宁, 刘杉, 孙耘田, 刘贵秋, 苏勤

## ■背景资料

多数肿瘤由单克隆细胞组成, 而正常组织和反应性增生的病变是多克隆的。利用克隆性分析方法探讨病变的克隆起源, 以区别其是否为肿瘤。这项技术不但对于阐明某些未知病变的性质有重要价值, 而且对于肿瘤的诊断、预防和治疗均具有重要的意义。

巩丽, 张伟, 李爱宁, 刘贵秋, 苏勤, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科 陕西省西安市 710038  
张宏图, 刘杉, 孙耘田, 苏勤, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科 北京市 100021  
巩丽, 2003年第四军医大学唐都医院病理科硕士生。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30171052和No. 30572125  
通讯作者: 苏勤, 100021, 北京市潘家园南里17号, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科. q.su@wjgnet.com  
电话: 010-87788435 传真: 010-67713359  
收稿日期: 2005-12-27 接受日期: 2006-01-13

## Application of clonality analysis in diagnosis of focal nodular hyperplasia

Li Gong, Hong-Tu Zhang, Wei Zhang, Ai-Ning Li, Shan Liu, Yun-Tian Sun, Gui-Qiu Liu, Qin Su

Li Gong, Wei Zhang, Ai-Ning Li, Gui-Qiu Liu, Qin Su, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Hong-Tu Zhang, Shan Liu, Yun-Tian Sun, Qin Su, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30171052 and No. 30572125

Correspondence to: Dr. Qin Su, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 17 Panjiayuan Nanli, Beijing 100021, China. q.su@wjgnet.com

Received: 2005-12-27 Accepted: 2006-01-13

## Abstract

**AIM:** To study the clonality status of the whole lesions and each nodules of hepatic focal nodular hyperplasia (FNH), and simultaneously compare the clonal composition with hepatocellular adenoma (HA).

**METHODS:** Four FNHs from 3 women, 2 HAs and 4 HCCs were examined by clonality assays based on X-chromosome inactivation mosaicism. Nodules were microdissected from paraffin sections. Genomic DNA was isolated from each nodules, the whole lesions and surrounding liver parenchyma, pretreated with *Hpa* II or *Hha* I, and then amplified via nested polymerase chain reaction (PCR) for phosphoglycerate kinase (PGK) and androgen receptor (AR) genes. The

single nucleotide polymorphism at the PGK locus was identified by incubation with *Bst* XI and agarose gel electrophoresis, and the CAG repeat length polymorphism at AR locus was revealed on denaturing polyacrylamide gels and visualized by silver staining.

**RESULTS:** The FNH lesions sized 1.5-5.3 cm in diameter, without a central stellate scar for all of them. While monoclonality was confirmed in both of 2 HAs and all of 4 HCCs examined, polyclonality was shown in all of the 4 FNHs as determined by the whole lesions, demonstrating its distinction from neoplastic lesions. A total of 61 nodules, including 56 nodules of altered hepatocytes (NAH) and 5 ordinary regenerative nodules, were microdissected from 3 of the 4 FNH lesions. The clonality analysis was successful in 52 NAHs. Loss of X-chromosome inactivation mosaicism was detected in 21 (40.4%) of them, indicating the monoclonal, neoplastic nature. In one FNH, different X-chromosomal inactivation patterns were observed in separate monoclonal nodules, revealing different clonal origins. Polyclonality was demonstrated in all of the 5 ordinary regenerative nodules and the surrounding liver parenchyma.

**CONCLUSION:** FNH is composed of numerous NAHs. The whole lesion shows a polyclonal cell composition, but neoplastic transformation has occurred in some of the nodules. Clonality assay is useful for in the differential diagnosis of FNH from HA, and sampling the whole or larger part of the lesion is necessary.

**Key Words:** Clonality; Focal nodular hyperplasia; Differential diagnosis

Gong L, Zhang HT, Zhang W, Li AN, Liu S, Sun YT, Liu GQ, Su Q. Application of clonality analysis in diagnosis of focal nodular hyperplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):568-575

## 摘要

**目的:** 探讨整个肝局灶性结节性增生(FNH)病变及各结节的克隆性, 以阐明其本质, 同时比

表 1 女患者9例10个肝脏病变临床病理学特征及其病变整体克隆性构成

NO.	年龄(岁)	HBs <sup>1</sup>	血清AFP (μg/L)	周围肝组织	病变整体情况				
					类型及分级 <sup>2</sup>	大小 <sup>3</sup>	CSS	Ki-67-LI	克隆性
1	53	-	<20	正常	FNH <sup>4</sup>	4.8	无	2.0	PC
2	23	-	<20	正常	FNH <sup>4</sup>	4.5	无	2.4	PC
3	46	-	<20	正常	FNH <sup>4</sup>	5.3	无	1.6	PC
				正常	FNH	1.5	无	1.7	PC
4	33	-	<20	正常	HA	2.0	无	4.5	MC
5	40	-	<20	正常	HA	1.5	无	4.0	MC
6	38	+	360	LC	HCC, I级	8.3	无	18.0	MC
7	56	+	1 080	CH	HCC, II级	2.5	无	28.5	MC
8	64	+	200	LC	HCC, I级	3.6	无	5.5	MC
9	77	+	480	LC	HCC, I/II级	5.6	无	16.2	MC

<sup>1</sup>血清学和免疫组织化学检测; <sup>2</sup>Edmondson-Steiner分级; <sup>3</sup>病变长径(cm); <sup>4</sup>这3个病例中的病变分别被编号为FNH01、FNH02和FNH03, 通过显微切割获取多个小结节, 分别进行克隆性检测(表2); AFP: 甲胎蛋白; CH: 慢性肝炎; CSS: 中央星状瘢痕; HA: 肝细胞腺瘤; HBs: 乙型肝炎表面抗原; HCC: 肝细胞癌; FNH: 局灶性结节性增生; Ki-67-LI: Ki-67抗原标记指数(%); LC: 肝硬化; MC: 单克隆性; PC: 多克隆性。

较其与肝细胞腺瘤(HA)鉴别的克隆性组成。

**方法:** 女性肝脏标本3例共4个FNH病灶。在病变区和非病变区取组织提取基因组DNA, 余标本制备石蜡切片, HE染色, 应用显微切割技术分离其中3个FNH内的小结节状病变, 提取基因组DNA, 经甲基化敏感的Hpa II或Hha I消化, 巢式PCR扩增磷酸甘油酸激酶(PGK)和雄激素受体(AR)基因。应用Bst XI酶切和琼脂糖凝胶电泳显示PGK基因的单核苷酸多态性; 应用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示AR基因的CAG重复序列长度多态性。2例HA和4例HCC作为肿瘤参照。

**结果:** 2例HA及4例HCC均为单克隆性。4个FNH病变, 直径1.5-5.3 cm, 但缺乏特征性的中央星状瘢痕, 结果均显示为多克隆性病变; 其中的61个结节性病变中, 56个呈变异肝细胞结节(NAH)形态, 5个为普通再生结节。克隆性分析结果显示, 56个NAH样病变中, 除4个未扩增成功外, 52个NAH中有21个(40.4%)显示X染色体失活嵌合性丢失, 提示为肿瘤性病变; 其中1例FNH的14个单克隆结节中, 有2个与其他病变失活带型不一致, 提示在同一FNH中, 存在着不同起源的NAH样病变。5个普通肝细胞增生结节及病变周围肝组织均为多克隆组成。

**结论:** FNH是由无数个NAH构成的, 其整个病变是多克隆性, 但其中某些结节已经是肿瘤性增生。克隆性检测有助于其与HA的鉴别, 而且所取样本必须是病变的整个切面或其大部分。

**关键词:** 克隆性; 局灶性结节性增生; 诊断

■ 研发前沿

一些作者提出FNH为多克隆细胞组成, 因而认为FNH不是肿瘤性病变; 而另一些作者却有相反的结论。此研究的目的是澄清FNH, 尤其是无中央瘢痕FNH病变的克隆组成, 藉此提供与HA鉴别的一种可靠手段, 并且进一步探讨构成其病变的各个结节的克隆性, 以阐明他的本质。

巩丽, 张宏图, 张伟, 李爱宁, 刘杉, 孙耘田, 刘贵秋, 苏勤. 克隆性分析技术在肝脏局灶性结节性增生诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2006;14(6):568-575  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/568.asp>

0 引言

局灶性结节性增生(focal nodular hyperplasia, FNH)是肝脏一种良性局部病变。多数作者认为他是肝细胞对异常血液供应的增生性反应, 而不是一种肿瘤<sup>[1]</sup>。其发生机制仍未定论。虽然有报道称FNH与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)之间有一定的关联<sup>[2-3]</sup>, 但并未得到广泛承认。大约一半FNH大体上缺乏特征性的中央星状瘢痕<sup>[1]</sup>, 这在与肝细胞腺瘤(hepatocellular adenoma, HA)的鉴别中会遇到困难。克隆性增生是多数肿瘤性病变的特征<sup>[4]</sup>, 已有作者提出FNH为多克隆细胞组成, 因而认为FNH不是肿瘤性病变<sup>[5-6]</sup>。此研究的目的是澄清FNH, 尤其是无中央瘢痕FNH病变的克隆组成, 藉此提供与HA鉴别的一种可靠手段。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-02/2005-10第四军医大学唐都医院和中国医学科学院肿瘤医院病理科女性肝组织标本9例(表1), 均经40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋的手术切除标本。每例标本均经组织学检查, 经3位病理医师(苏勤, 张宏图, 巩丽)确诊, 参照形态学标准检出HA<sup>[7]</sup>, FNH<sup>[8]</sup>及HCC<sup>[7-10]</sup>, 根据Edmondson *et al*的标准<sup>[11]</sup>对HCC进行分级, 根据

### ■创新盘点

本文运用显微解剖技术以及女性体细胞中PGK位点和AR位点多态性的克隆性分析方法,探讨肝局灶性结节性增生整个病变和构成其的小结节的克隆性,阐明了他的本质。

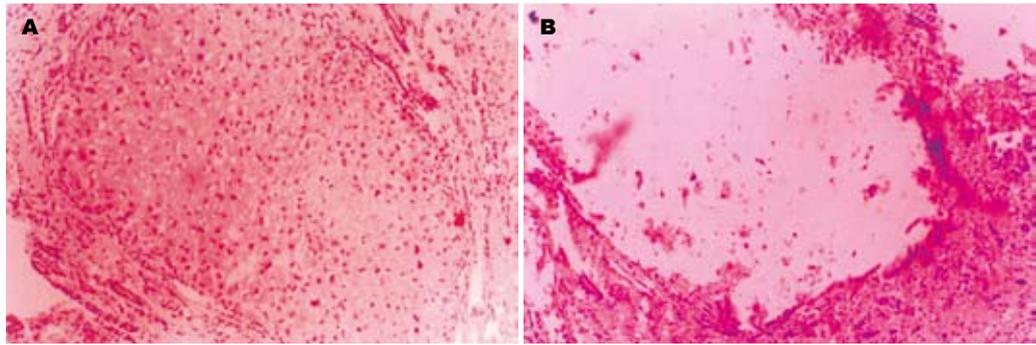


图1 FNH病变中1个NAH, 示显微切割前(A)后(B)的表现 (HE × 100).

我们以前的观察<sup>[9]</sup>检出变异肝细胞结节(nodules of altered hepatocytes, NAH).

#### 1.2 方法

1.2.1 显微切割(microdissection)和DNA提取 分别在4例HCC, 2例HA及3例4个FNH病变区和非病变区随机各取4片组织, HCC、HA和FNH取样面积均大于0.5 cm × 0.5 cm. 用酚-氯仿法提取基因组DNA. FNH标本石蜡包埋后制备15 μm切片8张, 用于病变内不同小结节的显微切割. 经HE染色后, 用100%甘油覆盖组织, 在倒置光学显微镜4倍物镜下用4号半注射器针头将所需的组织剔出(图1), 收集到装有无水乙醇的1.5 mL Eppendorff管内. 同时分离相同面积的病变旁正常肝组织, 作为阴性对照. 经三次无水乙醇洗涤后, 室温放置, 待组织干燥后, 应用QIAamp DNA提取试剂盒(Qiagen GmbH, Germany)按照说明书提取基因组DNA.

1.2.2 克隆性分析 PGK和AR位点的克隆性检测是基于女性体细胞组织的X染色体失活嵌合性, 即所有女性体细胞的2条X染色体中的1条在胚胎发育早期必须通过永久甲基化而随机失活, 另一条保持遗传活性<sup>[12]</sup>. PGK基因多态性表现为在甲基化位点下游有一个可以被*Bst* XI识别的单核苷酸多态性位点, 可经琼脂糖凝胶电泳显示<sup>[13]</sup>. AR基因多态性表现为其第一外显子的CAG串联重复序列(short-tandem repeat, STR)的长度不同, 即(CAG)<sub>n</sub>的n值有差别(11-31), 通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示<sup>[14]</sup>. 具有多态性位点的女性个体中正常和多克隆增生的组织显示两条带, 而肿瘤性病变仅显示一条带或以一条带为主<sup>[4]</sup>. 克隆性检测参照以前的方法进行<sup>[15-16]</sup>. PGK位点所用序列如下: PGK1A, 5'-CTG TTC CTG CCC GCG CGG TGT TCC GCA TTC-3'; PGK1B, 5'-ACG CCT GTT ACG TAA GCT CTG CAG GCC TCC-3'; PGK2A, 5'-AGC TGG ACG

TTA AAG GGA AGC GGG TCG TTA-3'; PGK2B, 5'-TAC TCC TGA AGT TAA ATC AAC ATC CTC TTG-3'. DNA样品经*Hpa* II消化3 h后, 巢式PCR扩增. 第1轮反应含有引物对PGK1A/PGK1B, 97°C 7 min预变性, 94°C变性40 s, 58°C退火50 s, 72°C延伸1 min, 共35个循环, 72°C延伸15 min. 反应产物1:20稀释后, 取5 μL加入第2轮反应体系, 其中含有引物对PGK2A/PGK2B, 除退火温度为56°C外, 余条件与第一轮相同. 第2轮反应产物再经*Bst* XI酶48°C消化8-10 h后, 20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色显示结果. AR位点所用序列如下: AR1A, 5'-GAC GAG CTT TCC AGA ATC TG-3'; AR1B, 5'-CAT GGG CTT GGG GAG A-3'; AR2A, 5'-TCC AGA ATC TGT TCC AGA GC-3'; AR2B, 5'-TGG GGA GAA CCA TCC TCA CC-3'. DNA样品在37°C水浴锅内经*Hha* I消化3 h后, 62°C灭活10 min, 巢式PCR扩增. 第1轮反应和第2轮反应的引物对分别为AR1A/AR1B和AR2A/AR2B, 退火温度均为56°C, 25个循环, 第1轮反应产物1:100稀释后, 取1 μL加入第2轮反应, 余反应参数同PGK位点的扩增反应. 琼脂糖凝胶(20 g/L)电泳评价AR基因扩增效果. 然后将4 μL产物和等体积的上样缓冲液混匀后, 加到厚度为0.8 mm的变性聚丙烯酰胺(100 g/L, 含尿素8 mol/L), 应用miniVE电泳系统(Amersham-Pharmacia Biotech, USA)120 V泳动4 h, 按以前描述的方法<sup>[15]</sup>进行银染. 电泳结果观察分别用UVP凝胶分析系统(UVP, Cambridge, UK)和光学照相记录数据, 用相应软件(LabWorks™, UVP)比较*Hpa* II或*Hha* I消化前后一对等位基因扩增产物的强度差异, 其中1条带可比强度减弱达50%以上时才被认为有意义, 即X染色体失活嵌合性丢失<sup>[16]</sup>.

1.2.3 免疫组织化学 切片4 μm脱蜡入水后分别滴加针对Ki-67抗原、CK19、CK18和HBsAg的

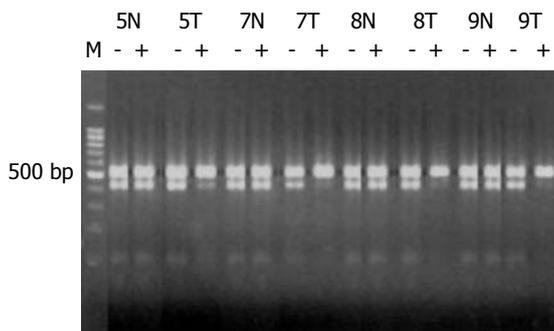


图 2 例5之HA(5T)及病例7-9之HCC标本(7T, 8T, 9T)酶切后下带均明显减弱或消失, 只保留上带, 提示单克隆性增生. N: 相应的瘤旁组织对照.

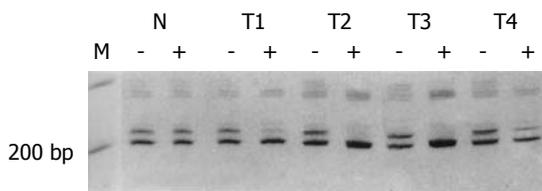


图 3 例4之HA瘤组织四个不同部位(T1-T4)AR位点HhaI酶切前后改变, 酶切后上带明显减弱(T1, 57.13%; T4, 71.8%)或消失(T2和T3). -: 酶切前; +: 酶切后; N: 正常肝组织.

抗体. 参照以前的方法<sup>[9]</sup>, 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(S-P)反应显示抗原-抗体结合, 二氨基联苯胺/过氧化氢溶液染色, 苏木素衬染. 上述试剂均购自福州迈新试剂有限公司. 应用已知有相应抗原表达的标本作为阳性对照; 应用相同稀释度的免疫前小鼠或家兔IgG进行阴性对照反应.

**统计学处理** 应用SPSS 12.0软件包进行统计计算. 应用单因素方差检验比较单克隆结节与多克隆结节的大小,  $P < 0.05$ 被认为有显著性差异.

## 2 结果

HCC(No.7-9)3例和HA(No.5)1例标本有PGK基因位点单核苷酸多态性, *Hpa* II酶切前在530 bp与433 bp处DNA泳动位置各显示1条带, 酶切后下带完全消失或明显减弱, 而瘤旁正常肝组织酶切前后两条带的强度无明显改变(图2), 这些数据显示HCC和HA均为单克隆性. 余1例HA(No.4)和1例HCC(No.6)标本无PGK位点多态性, 但显示出AR基因CAG STR长度多态性. 在病变中多点取组织进行克隆性检测, *Hha* I消化后一条带明显减弱或消失, 证实了他们的单克隆细胞构成(图3, 4).

FNH3例共4个病变, 均为球形, 直径1.5-5.3 cm, 切面呈结节状外观, 未见明显的中

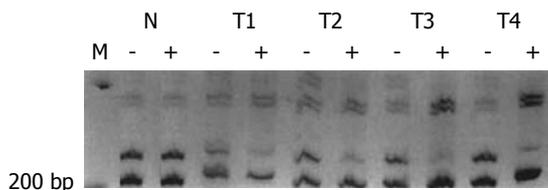


图 4 例6之HCC四个不同部位(T1-T4)AR位点酶切前后改变, 酶切后上带明显减弱(T1, 57.63%; T2, 72.6%; T3, 95.5%; T4, 89.8%). -: 酶切前; +: 酶切后; N: 正常肝组织.

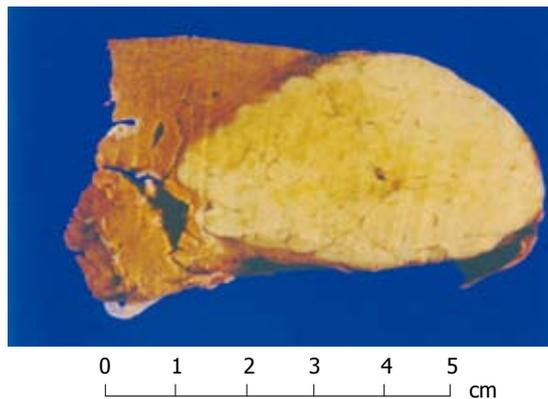


图 5 例3大体标本, 病变界限清楚, 无包膜, 切面呈结节状结构, 但无中央瘢痕.

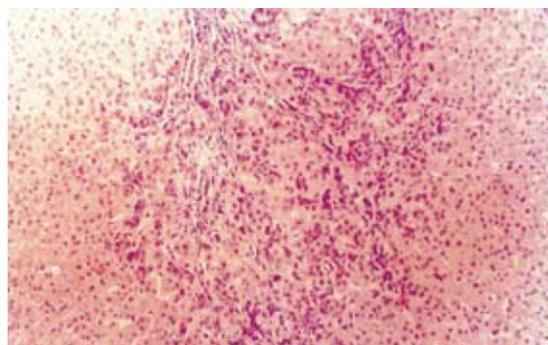


图 6 低倍镜下FNH病变区胆小管增生, 慢性炎细胞浸润(HE × 100).

央星状瘢痕(图5). 每个病变都由许多小结节组成, 其直径1.0-12 mm, 仅部分有纤维组织分隔. 镜下见病变呈膨胀性生长, 并被厚薄不一的纤维组织分隔为小结节. 纤维间隔内许多增生胆小管及慢性炎细胞浸润(图6), 并可见结构异常的血管. 多数小结节由透明细胞和嗜双色细胞构成, 多数肝板厚度约2层细胞, 结构上类似于早先描述的NAH, 但不伴有小细胞性改变(small-cell change, SCC)(图7A-B)<sup>[17]</sup>; 少部分结节形态类似于肝硬化组织中的普通再生结节<sup>[18]</sup>, 结节中心有典型的汇管区. FNH病变区肝细胞Ki-67表达指数仅2.0%; CK19阳性仅见于胆管和

**应用要点**  
本文探讨整个肝局灶性结节性增生病变及各结节的克隆性, 以阐明其本质, 提供与HA鉴别的一种可靠手段, 并为进一步分析肝脏癌前病变, 阐明肝细胞癌的病理发生机制奠定基础. 这对肝细胞癌的预防、早期诊断及治疗均具有重要的意义.

■同行评价

本文探讨了克隆性分析技术在肝脏局灶性结节性增生诊断中的应用,该研究是作者在前期的研究基础之上进行,并具有一定的创新性,为肝脏局灶性结节性增生的诊断和鉴别诊断提供了新思路和新方法.从总体上来看,该文具有一定的创新性和科学意义,可读性较好,能较好地反映我国胃肠病学基础研究水平.

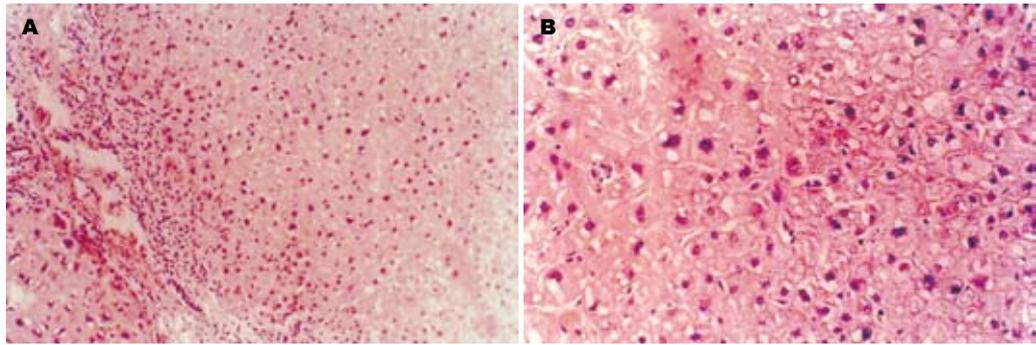


图 7 混合细胞性NAH,不伴有SCC,肝板厚约2-3层(HE, A×100; B×200).

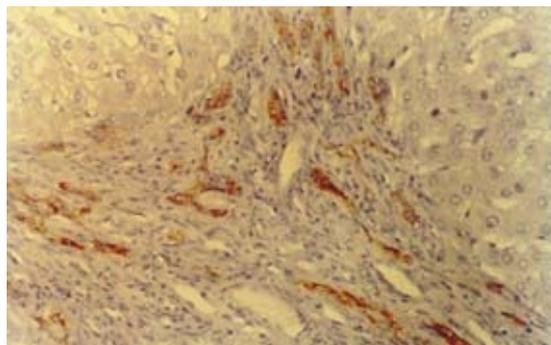


图 8 FNH病变中,CK19阳性(棕黄色)显示增生的胆小管,而肝细胞不表达CK19.

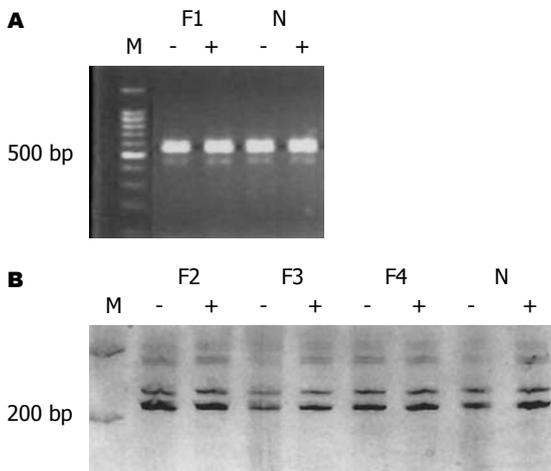


图 9 3例FNH之4个病变(F1-F4) *Hpa* II (A)或*Hha* I (B)酶切前后上下带强度无明显改变. M: DNA标记物; -: 酶切前; +: 酶切后; N: 正常肝组织. A: 例1; B: 例2-4.

胆小管结构(图8).

每个FNH病变中随机取2处片状组织(面积1.5 cm×1.5 cm或最大切面)进行克隆性检测,均显示多克隆性细胞构成(图9A-B).如表1所示,4个FNH中共分离出61个结节.如表2显示,病例1的病变(FNH01)中显微切割共分离出42个小结节(图10),对38个病变的扩增反应成功.这

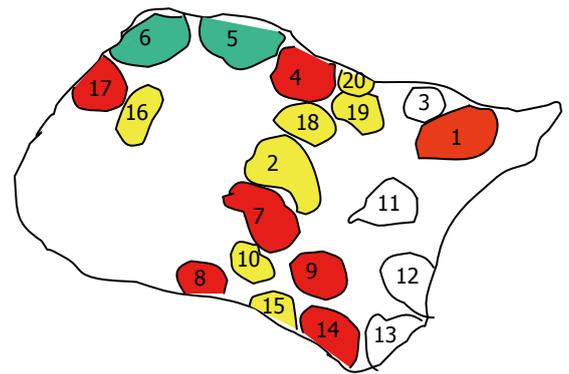


图 10 病例1病变中结节1-20的位置.红色和绿色均表示单克隆性病变,其中红色表示酶切后只保留上带;绿色示酶切后只保留下带;黄色表示多克隆性病变;空白色表示扩增失败.

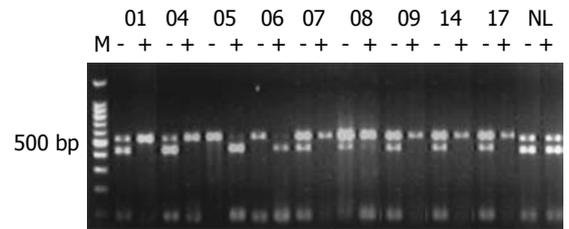


图 11 例1中9个单克隆NAH PGK位点检测结果,其中结节5和结节6酶切后上带几乎完全消失,只保留下带,而其余仅保留上带. M: DNA标记物; -: 酶切前; +: 酶切后; NL: 正常肝组织.

些病变中4个为普通再生结节(长轴直径分别为2-7 mm),显示为多克隆性;其余34个均为混合细胞型NAH病变,14个(41.2%)显示为单克隆性,其中2个NAH与其他10个病变失活带型不一致(图11).病例2病变(FNH02)的3张切片中共分离出6个NAH,其中2个(33.3%)为单克隆性,他们均位于同一张切片的相邻位置.病例3的FNH03中分离出的13个病灶中,1个为普通肝细胞增生结节(直径1 mm),显示为多克隆性;12个为NAH,有5个(41.7%)显示为单克隆性,而且灭活带型相

表 2 3个FNH病变中不同小结节的显微切割、克隆性检测结果及其AR等位基因失活类型

病变编号	显微切割获取小结节数	克隆性检测成功数	单克隆病变数 (%)	单克隆病变的酶切带型	
				保留上带	保留下带
FNH01	42 <sup>1</sup>	38 <sup>2</sup>	14 (36.8) <sup>3</sup>	12	2
FNH02	6	6	2 (33.3)	0	2
FNH03	13 <sup>4</sup>	13 <sup>4</sup>	5 (38.5) <sup>5</sup>	0	5
合计	61	57	21 (36.8) <sup>6</sup>	12	9

<sup>1</sup>含38个NAH和4个普通再生结节; <sup>2</sup>4个NAH病变扩增反应失败; <sup>3</sup>其中检测的34个NAH中14个(41.2%)为单克隆性, 4个普通再生结节全部为多克隆性; <sup>4</sup>含12个NAH和1个普通再生结节; <sup>5</sup>其中检测的12个NAH中5个(41.7%)为单克隆性, 1个普通再生结节为多克隆性; <sup>6</sup>检测的52个NAH病变中21个(40.4%)为单克隆性。

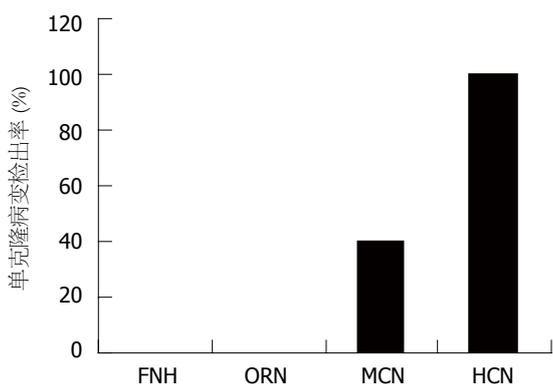


图 12 FNH整个病变及其内不同结节性病变的克隆组成. ORN: 普通再生结节; MCN: 混合细胞性NAH; HCN: 肝细胞肿瘤, 包括HCC和HA.

同. 在分析的3个FNH病变中, 分离的52个NAH中有21个(40.4%)显示为单克隆性细胞构成(图12). 单克隆和多克隆性NAH病变的截面积分别为 $9.8 \pm 7.0 \text{ mm}^2$ 和 $9.5 \pm 6.7 \text{ mm}^2$ , 二者无显著差别( $P = 0.922, F = 0.01$ ).

### 3 讨论

FNH是发生于结构正常肝脏的一种良性增生性疾病, 1958年由Edmondson提出, 并于1975年被WHO确认, 曾被称为“局部硬化”、“肝错构瘤”、“肝腺瘤”等<sup>[19]</sup>. 欧美1960年以来的报道有所增加, 90%左右发生于女性, 好发年龄30-40岁<sup>[20]</sup>. 至于FNH的病因, 国外资料统计50%-75%的患者, 特别是有症状或结节较大者都有口服避孕药应用史, 并且认为是雌激素刺激肝细胞增生和血管改变所致<sup>[21]</sup>. Wanless *et al*<sup>[22]</sup>通过对51例FNH病变的分析提示该病的形成与肝局部血管畸形有关, 肝细胞的结节性增生可能是由于这些畸形血管提供了更多的血流所致. 有报道称FNH是纤维板层型HCC的前期病变, 理由是二者有时先后发生于同一患者<sup>[23]</sup>, 然而, 这种情况极为罕见<sup>[2-3,24]</sup>. FNH的鉴别诊断主要包括

HA和分化好的HCC. 对于典型的病变, 根据周围肝组织基本正常, 中央星状纤维疤痕和纤维隔中大量胆小管结构存在及缺乏小细胞改变不难做出正确诊断. 然而, 约一半的FNH病变缺乏中央星状疤痕这一特征性改变<sup>[1,25-26]</sup>, 他们与HA之间的鉴别常遇到困难; 此研究应用的4个FNH病变都属于这一类型, 基于其小结节状结构以及纤维隔内胆小管显著增生改变, 仍可以将其归入经典型FNH<sup>[1]</sup>; 当这样的病变中纤维间隔内胆小管结构较少时, 与HA的鉴别会构成外科病理诊断的难题. 由于这两种病变的临床表现和外科处理原则不同, 发展一种有助于二者鉴别诊断的客观指标是摆在肝脏病理学家面前的一项迫切任务.

FNH到底是一种反应性增生, 还是一种肿瘤? 目前尚未形成一致结论. Paradis *et al*<sup>[5]</sup>应用X染色体失活相关的克隆性分析技术检查了12例FNH, 均显示为多克隆病变. 据此, 他们认为FNH是一种反应性增生, 而不是肿瘤. Zhang *et al*<sup>[6]</sup>对1例伴有HCC发生的FNH两处病变分别进行了克隆性分析, 得出了相似的结果. Gaffey *et al*<sup>[27]</sup>用相同的方法对7例FNH进行了分析, 结果显示5例是单克隆性病变. Chen *et al*<sup>[28]</sup>对发生于同一个肝脏的FNH和HCC病变分别进行了分析, 都显示为单克隆性增生. 最近, Paradis *et al*<sup>[29]</sup>对一组毛细血管扩张型FNH进行了分析, 显示为单克隆性细胞组成, 据此他们把这种病变归入HA. 此研究中我们对来自3位女性患者4个FNH病变进行了克隆性检测, 显示这些病变整体上均为多克隆性细胞构成, 与Paradis *et al*<sup>[5]</sup>的结果一致. 基于上述数据, 我们认为FNH整体上是多克隆性病变, 据此可与HA和分化好的HCC鉴别.

FNH被认为是一种局部肝硬变表现<sup>[19]</sup>. 对不同原因引起的肝硬变观察显示, 部分所谓

的“再生结节”已经被变异肝细胞占据,并显膨胀性生长,称为NAH<sup>[9]</sup>,这种病变由变异肝细胞病灶(foci of altered hepatocytes, FAH)发展而来<sup>[9]</sup>. FAH广泛出现于实验性肝癌发生模型的肝组织内<sup>[30]</sup>; FAH和NAH为HCC前期病变的不同阶段, SCC, 即肝实质的真性不典型增生<sup>[9-10]</sup>的出现会使进展明显加快. 我们以前的结果已经显示, FAH为HA和HCC的前体, 即肿瘤前期病变(preneoplastic lesion), 少部分(35%)不伴SCC的NAH以及所有伴有SCC的NAH病变是单克隆性, 属于微小肝细胞腺瘤(hepatocytic microadenoma)<sup>[18]</sup>, NAH及FAH内SCC是肝脏的恶性前期病变(premalignant lesion)<sup>[10,31]</sup>. 在FNH病变中, 部分结节性病变由透明细胞性及嗜双色细胞性变异肝细胞组成并呈膨胀性生长, 形态学符合NAH的形态学标准, 属于透明细胞/嗜双色混合细胞性NAH, 只不过不伴SCC. 为了显示这些NAH病变的性质以及探讨文献中对FNH克隆性这一问题分歧的原因, 对这3个FNH中的多个病灶进行了显微切割, 并对分离的病变进行克隆性检测. 结果显示, 5个普通再生结节全为多克隆性, 反映了反应性增生本质; 52个NAH中, 21个(40.4%)是单克隆性(图12), 属于微小肝细胞腺瘤, 这与我们对肝硬化中NAH的分析结果一致<sup>[18]</sup>. 这从另一方面也证实, 这些病变属于NAH. 由此我们推断, FNH实际上是由许多个NAH所构成的局灶性病变. 至于这些肿瘤前期病变在此处成簇发生并进展的原因值得进一步探讨.

基于上述观察, 我们认为, 上述文献中有关FNH克隆性这一问题的分歧是病变中不同性质的结节组合不同以及不同实验室采集样本的大小不同所致. 经典型FNH中的小结节多数为多克隆病变, 即使是单克隆性NAH, 也可具有不同的X染色体失活类型. 当取材面积较大(本研究为1.5 cm×1.5 cm)时, 病变整体为多克隆性; 当取材较局限, 而且恰好位于相同X染色体失活类型的单克隆NAH病变区(图10)时, 可能会得出单克隆性检测结果. 至于毛细血管扩张型FNH的克隆性, 也需要更多的观察. 如果真正象Paradis *et al*<sup>[29]</sup>报道的那样, 整个病变内绝大部分肝细胞具有相同的克隆特征, 应该将其归入HA. 总之, 根据目前的研究, 我们的结果表明, FNH整个病变属于多克隆性, 据此可以与HA相区别. 实际上, FNH是由一簇NAH所构成的混合性病变, 且部分NAH已经属于微小肝细胞腺瘤, 他们才是

FNH发生、发展的最终决定因素. 也许其中某个结节会进展为某种类型的HCC, 就象有的文献<sup>[2-3,24]</sup>指出的那样. 不过, FNH中每个NAH的体积远不如HA大, 因此癌变机率远低于HA.

**致谢** 此研究得益于与刘复生教授的讨论.

#### 4 参考文献

- 1 Nguyen BN, Flejou JF, Terris B, Belghiti J, Degott C. Focal nodular hyperplasia of the liver: a comprehensive pathologic study of 305 lesions and recognition of new histologic forms. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1441-1454
- 2 Saul SH, Titelbaum DS, Gansler TS, Varello M, Burke DR, Atkinson BF, Rosato EF. The fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma. Its association with focal nodular hyperplasia. *Cancer* 1987; 60: 3049-3055
- 3 Saxena R, Humphreys S, Williams R, Portmann B. Nodular hyperplasia surrounding fibrolamellar carcinoma: a zone of arterIALIZED liver parenchyma. *Histopathology* 1994; 25: 275-278
- 4 苏勤, 刘茜, 王淑芳. 基于X染色体基因多态性的克隆性分析技术及其应用. *中华病理学杂志* 2002; 31: 162-164
- 5 Paradis V, Laurent A, Flejou JF, Vidaud M, Bedossa P. Evidence for the polyclonal nature of focal nodular hyperplasia of the liver by the study of X-chromosome inactivation. *Hepatology* 1997; 26: 891-895
- 6 Zhang SH, Cong WM, Wu MC. Focal nodular hyperplasia with concomitant hepatocellular carcinoma: a case report and clonal analysis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 556-559
- 7 Anthony PP. Tumors and tumor-like lesions of the liver and biliary tract: etiology, epidemiology and pathology. In: Macsween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP (eds). *Pathology of the liver*. London: Churchill Livingstone
- 8 Ishak KG, Anthony PR, Sobin LH. Designation and explanatory notes: liver. In: Ishak KG, Anthony PR, Sobin LH (eds). *Histological typing of tumors of the liver*. International Histological Classification of Tumors. Berlin: WHO
- 9 Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch* 1997; 431: 391-406
- 10 Su Q, Bannasch P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2003; 31: 126-133
- 11 Edmondson HA, Steiner PE. Primary earcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954; 7: 462-503
- 12 Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1972; 47: 1-35
- 13 Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6848-6852
- 14 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM,

- Belmont JW. Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1229-1239
- 15 刁小莉, 苏勤, 王淑芳, 冯英明, 刘节. 非放标AR基因多态性分析探讨子宫平滑肌瘤的克隆性. 第四军医大学学报 2002; 23: 1969-1973
- 16 Wang SF, Liu Q, Zhang W, Liu J, Su Q. Clonality of uterine leiomyomas, an assay using X chromosome polymorphism at the phosphoglycerate kinase locus. *DiSi Junyi Daxue Xuebao* 2001; 22: 1576-1582
- 17 Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, Numa Y, Takemoto T, Takahashi T. Morphologic studies of the liver cell dysplasia. *Cancer* 1983; 51: 2197-2205
- 18 初霞, 苏勤, 巩丽, 张伟, 王淑芳, 朱少君, 李爱宁, 冯英明. 慢性乙型肝炎和肝硬化组织中变异肝细胞结节的克隆性. 世界华人消化杂志 2005; 13: 945-952
- 19 Kerlin P, Davis GL, McGill DB, Weiland LH, Adson MA, Sheedy PF 2nd. Hepatic adenoma and focal nodular hyperplasia: clinical, pathologic, and radiologic features. *Gastroenterology* 1983; 84: 994-1002
- 20 Vilgrain V. Focal nodular hyperplasia. *Eur J Radiol* 2006
- 21 Cherqui D, Rahmouni A, Charlotte F, Boulahdour H, Metreau JM, Meignan M, Fagniez PL, Zafrani ES, Mathieu D, Dhumeaux D. Management of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma in young women: a series of 41 patients with clinical, radiological, and pathological correlations. *Hepatology* 1995; 22: 1674-1681
- 22 Wanless IR, Mawdsley C, Adams R. On the pathogenesis of focal nodular hyperplasia of the liver. *Hepatology* 1985; 5: 1194-1200
- 23 Ji Y, Zhu X, Tan Y, Zeng H, Ye Q, Tang Z. A clinicopathological study of hepatic focal nodular hyperplasia. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2000; 29: 334-338
- 24 Imkie M, Myers SA, Li Y, Fan F, Bennett TL, Forster J, Tawfik O. Fibrolamellar hepatocellular carcinoma arising in a background of focal nodular hyperplasia: a report of 2 cases. *J Reprod Med* 2005; 50: 633-637
- 25 Terada T, Kitani S, Ueda K, Nakanuma Y, Kitagawa K, Masuda S. Adenomatous hyperplasia of the liver resembling focal nodular hyperplasia in patients with chronic liver disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 422: 247-252
- 26 Matsushita M, Hajiro K, Suzaki T, Takakuwa H, Sawami H, Kusumi F, Konishi Y, Maruo M, Ohana M, Okano A. Focal nodular hyperplasia of the liver without central scar. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2407-2410
- 27 Gaffey MJ, Iezzoni JC, Weiss LM. Clonal analysis of focal nodular hyperplasia of the liver. *Am J Pathol* 1996; 148: 1089-1096
- 28 Chen TC, Chou TB, Ng KF, Hsieh LL, Chou YH. Hepatocellular carcinoma associated with focal nodular hyperplasia. Report of a case with clonal analysis. *Virchows Arch* 2001; 438: 408-411
- 29 Paradis V, Benzekri A, Dargere D, Bieche I, Laurendeau I, Vilgrain V, Belghiti J, Vidaud M, Degott C, Bedossa P. Telangiectatic focal nodular hyperplasia: a variant of hepatocellular adenoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 1323-1329
- 30 Bannasch P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. II. Preneoplasia in various non-hepatic tissues. *Carcinogenesis* 1986; 7: 849-852
- 31 苏勤. 人肝细胞癌的癌前期病变. 诊断病理学杂志 2003; 10: 112-115

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第二届全国小肠疾病学术会议

本刊讯 第二届全国小肠疾病学术会议将于2006-08-23/27在太原举行, 现将征文通知公布如下:

### 1 稿件要求及截稿日期

全文, 结构式摘要(1 000字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-04-31截稿.

### 2 联系方式

山西省太原市双塔东街29号山西少人民医院内镜中心陈星; 邮编: 030012; 电话: 0351-4960028; E-mail: senj29@163.com.

# HCV p7蛋白反式调节新基因3及其剪切体克隆化和生物信息学分析

陶明亮, 成军, 王春花, 郭江, 袁菊, 靳亚平, 毛羽

## ■背景资料

p7蛋白是丙型肝炎病毒中介于结构蛋白和非结构蛋白之间的一小蛋白, 由于他在脂质膜上可形成六聚体阳离子通道, 在病毒的自然感染过程中起一定的作用, 然而其具体作用机制尚不清楚。研究p7蛋白及其相关基因的反式调节机制可能是解决HCV感染的有效途径之一。

陶明亮, 成军, 王春花, 郭江, 袁菊, 毛羽, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011  
靳亚平, 西北农林科技大学动物科技学院 陕西省杨陵区 712100  
陶明亮, 西北农林科技大学2004级硕士生, 主要从事动物生免疫学方面的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30371288  
国家重点基础研究973项目, No. 2004CB518908  
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所。cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-64481639 传真: 010-6428154  
收稿日期: 2005-12-09 接受日期: 2006-01-14

## Cloning and bioinformatic analysis of new gene p7TP3 and its spliced variant transregulated by hepatitis C virus p7 protein

Ming-Liang Tao, Jun Cheng, Chun-Hua Wang, Jiang Guo, Ju Yuan, Ya-Ping Jin, Yu Mao

Ming-Liang Tao, Jun Cheng, Chun-Hua Wang, Jiang Guo, Ju Yuan, Yu Mao, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China  
Ya-Ping Jin, College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shannxi 712100, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30371288, and the Special Funds for Major State Basic Research 973 Program of China, No. 2004CB518908

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing Dongcheng District, Anwai Street, 13 Ditan Park, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2005-12-09 Accepted: 2006-01-14

## Abstract

**AIM:** To identify and clone a new gene p7TP3 and its spliced variant transregulated by hepatitis C virus p7 protein, and to explore the role of HCV p7 protein in the pathogenesis of HCV infection.

**METHODS:** Based on the construction of expressive vector pcDNA3.1(-)-p7, hepatoblastoma cells HepG2 were transfected with plasmid DNA of pcDNA3.1(-)-p7, and then the total RNA was extracted from the cells. Reverse transcribed cDNA was subjected for microarray assay. The

coding sequence of the new gene and its spliced variant were obtained by bioinformatic methods. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted to amplify p7TP3 gene and its spliced variant using specific primer. The structure was detected and the function was predicted by bioinformatics methods.

**RESULTS:** Sequence analysis confirmed that the coding sequence of p7TP3 gene and its spliced variant were cloned successfully and bioinformatically analyzed. p7TP3 (416 bp) with  $M_r$  14 165.4 is identical to p7TP3 (477 bp) with  $M_r$  17 935.7 except a deletion of 26 amino acid residue (TQNTDVYPGLAVFFQNALIFFSTLIY).

**CONCLUSION:** HCV p7 protein is a potential transregulator. A novel gene and its spliced variant have been identified as the new target transregulated by HCV p7 protein.

**Key Words:** Hepatitis C virus; Spliced variant; p7 protein

Tao ML, Cheng J, Wang CH, Guo J, Yuan J, Jin YP, Mao Y. Cloning and bioinformatic analysis of new gene p7TP3 and its spliced variant transregulated by hepatitis C virus p7 protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):576-580

## 摘要

**目的:** 筛选HCV p7病毒蛋白反式调节的新靶基因p7TP3, 克隆p7TP3基因及其不同剪切体基因序列, 并进行功能分析, 探讨丙型肝炎病毒(HCV)p7病毒蛋白在HCV致病过程中的作用。

**方法:** 依据我们构建的真核表达载体pcDNA 3.1(-)-p7转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取总RNA, 逆转录为cDNA后进行基因表达谱芯片分析, 利用生物信息学技术获得新基因p7TP3及其可变剪切体的编码序列, 设计特异性引物, 并对其进行克隆化研究。

**结果:** 经测序鉴定获得新基因p7TP3的编

码序列, 并发现了p7TP3的不同剪切体, 对p7TP3基因组进行分析, 获得剪切体的编码序列, 并进行了克隆化研究及生物信息学分析. p7TP3(416 bp)编码蛋白质序列比p7TP3(477 bp)少TQNTDVYPGLAVFFQNALIFFSTLIY 26个氨基酸残基, 其余序列相同.

**结论:** HCV p7蛋白是一种典型的病毒基因组编码的具有反式调节作用的蛋白. 利用分子生物学技术与生物信息学分析, 发现并鉴定了HCV p7TP3反式调节作用的新的靶基因p7TP3及其剪切体, 为阐明HCV p7蛋白的反式调节作用及其机制开辟了新的研究方向.

**关键词:** 丙型肝炎病毒; 剪切体; p7蛋白

陶明亮, 成军, 王春花, 郭江, 袁菊, 靳亚平, 毛羽. HCV p7蛋白反式调节新基因3及其剪切体克隆化和生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2006;14(6):576-580

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/576.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒, 属黄病毒科肝炎病毒类. 全世界范围内约有1.7亿人被感染, 在大多数感染人群中HCV表现为持续性感染, 并可导致肝纤维化(LC), 甚至肝细胞癌(HCC)<sup>[1]</sup>. HCV基因组编码一个约3 010个氨基酸残基组成的多蛋白, 被病毒和细胞蛋白酶切割产生至少10个病毒产物<sup>[2-3]</sup>. p7蛋白是存在于HCV结构蛋白和非结构蛋白之间的63个氨基酸残基(aa)组成的小蛋白, 他在脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 研究发现金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物可抑制p7形成的阳离子通道, 从而对HCV的治疗发挥重要作用<sup>[4-7]</sup>. 我们利用基因芯片技术, 对p7表达载体转染的肝母细胞瘤细胞系HepG2的基因表达谱变化进行了比较, 发现了p7蛋白可以反式调节一些基因的表达. 其中包括未知功能基因, 命名为p7TP3. 我们在研究新基因p7TP3过程中, 意外发现了p7TP3基因的不同剪切体, 对p7TP3基因组进行分析, 确定了p7TP3及其剪切体的编码序列, 并进行了克隆化研究和生物信息学分析.

## 1 材料和方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系HepG2和感受态大肠杆菌DH5 $\alpha$ 为本室保存, Taq酶购自Promega公司, pGEM-T载体购自Promega公司. 玻璃奶回收试剂盒购自博大公司. DNA序列测定由北

京奥科公司完成. 利用基因芯片技术对p7蛋白的上调、下调基因进行分析, 结果表明, 1种基因的表达水平显著上调, 22种基因的表达水平显著下调, 下调基因中含有2个未知功能的新基因, 利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN)发现这两个新基因与GenBank中注册的已知功能基因序列没有同源性, 依据GenBank数据库EST中的同源基因片段进行电子拼接, 根据Kozak规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列, 分别命名为HCV p7TP2(p7蛋白反式调节蛋白2)、p7TP3.

1.2 方法 根据p7TP3的全长编码基因, 设计上下游引物. 上游引物5'-GAA TTC CA ATG GCA GGC TTC CTA GA-3', 下游引物5'-GGA TCC GGT CCA TAG CTC TTC GGT TC-3'. 以反转录产物为模板进行PCR, PCR参数如下: 95 $^{\circ}$ C 5 min预变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s变性, 58 $^{\circ}$ C 45 s退火, 72 $^{\circ}$ C 90 s延伸, 共35个循环, 72 $^{\circ}$ C再延伸10 min. 克隆目的片段将PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收PCR产物, 与pGEM-T载体连接, 转化DH5 $\alpha$ 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上, 37 $^{\circ}$ C培养16 h. 挑取白色菌落, 增菌. 提取质粒进行限制性酶切分析鉴定发现两个大小不一致的酶切片段, 挑选相应菌落测序. 将测序得到的两个核苷酸序列进行分析, 其中一个与我们预测的p7TP3序列完全一致, 而另一个序列与p7TP3部分同源. 利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)进行搜索, 确定了两个序列的染色体定位并对其编码的蛋白质功能进行了预测.

## 2 结果

2.1 目的基因的PCR扩增 以HepG2细胞系cDNA文库为模板, PCR反应后经10 g/L琼脂糖凝胶电泳可见长度为477 bp和416 bp的两种电泳条带(图1). PCR产物与T-载体连接, 转化大肠杆菌, 提取质粒进行酶切鉴定(图2).

2.2 将p7TP3(477 bp)与p7TP3(416 bp)编码序列进行比较(图3).

2.3 p7TP3及其剪切体的多序列比对 NCBI中BLASTN核酸序列同源性分析以及基因组序列的内含子/外显子分析, (<http://www.ens-embl.org/>

### ■创新盘点

本文利用PCR和生物信息学技术分析了p7TP3及其剪切体的基因组序列、编码蛋白的一、二级结构、抗原决定簇等生物学功能差异, 但他们之间的功能差异仍需进一步验证.

■应用要点

新基因p7TP3及其剪切体的克隆和功能比较为阐明p7蛋白的生物学功能及其在HCV感染途径的作用开辟了新的方向。

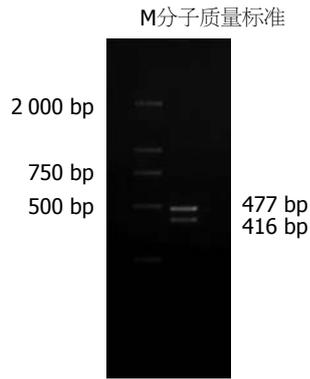


图 1 p7TP3 PCR电泳图.

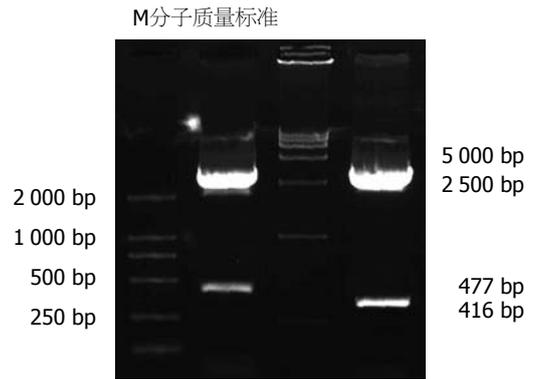


图 2 pGEM-T-p7TP3酶切电泳图.

```

477 ATG GCA GGC TTC CTA GAT AAT TTT CGT TGG CCA GAA TGT GAA TGT ATT GAC TGG AGT GAG
381 ATG GCA GGC TTC CTA GAT AAT TTT CGT TGG CCA GAA TGT GAA TGT ATT GAC TGG AGT GAG
477 AGA AGA AAT GCT GTG GCA TCT GTT GTC GCA GGT ATA TTG TTT TTT ACA GGC TGG TGG ATA
381 AGA AGA AAT GCT GTG GCA TCT GTT GTC GCA GGT ATA TTG TTT TTT ACA GGC TGG TGG ATA
477 ATG ATT GAT GCA GCT GTG GTG TAT CCT AAG CCA GAA CAG TTG AAC CAT GCC TTT CAC ACA
381 ATG ATT GAT GCA GCT GTG GTG TAT CCT AAG CCA GAA CAG TTG AAC CAT GCC TTT CAC ACA
477 TGT GGT GTA TTT TCC ACA TTG GCT TTC TTC ATG ATA AAT GCT GTA TCC AAT GCT CAG GTG
381 TGT GGT GTA TTT TCC ACA TTG GCT TTC TTC ATG ATA AAT GCT GTA TCC AAT GCT CAG GTG
477 AGA GGT GAT AGC TAT GAA AGC GGC TGT TTA GGA AGA ACA GGT GCT CGA GTT TGG CTT TTC
381 AGA GGT GAT AGC TAT GAA AGC GGC TGT TTA GGA AGA ACA GGT GCT CGA GTT TGG CTT TTC
477 ATT GGT TTC ATG TTG ATG TTT GGG TCA CTT ATT GCT TCC ATG TGG ATT CTT TTT GGT GCA
381 ATT GGT TTC ATG TTG ATG TTT GGG TCA CTT ATT GCT TCC ATG TGG ATT CTT TTT GGT GCA
477 TAT GTT ACC CAA AAT ACT GAT GTT TAT CCG GGA CTA GCT GTG TTT TTT CAA AAT GCA CTT
381 TAT GTT ACC CAA A-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
477 ATA TTT TTT AGC ACT CTG ATC TAC AAA TTT GGA AGA ACC GAA GAG CTA TGG ACC TGA
381 --- --- --- --- --T CTG A
    
```

图 3 p7TP3 (477 bp)与p7TP3 (416 bp)编码序列比较.

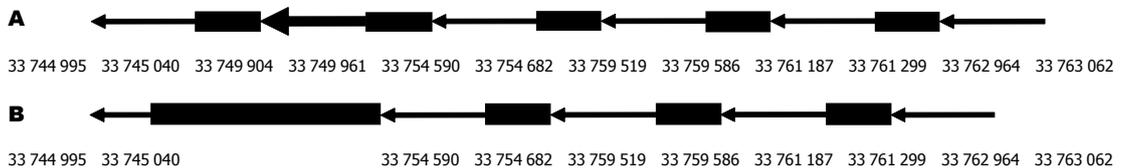


图 4 基因结构示意图. A: p7TP3(477 bp); B: p7TP3(416 bp). ◀: 外显子; ■: 内含子.

index.html)在线分析p7TP3及其剪切体在染色体中定位以及内含子/外显子位点分析. 发现二者均定位于21号染色体, 但其内含子和外显子结构不同, p7TP3(477 bp)与p7TP3(416 bp)基因定位于33 763 062-33 744 995 nt, p7TP3(416 bp)基因与p7TP3(477 bp)相比缺少33749961-33749904的外显子序列.

2.4 编码蛋白质功能预测(图4) 经Protparam tool 在线软件分析, p7TP3(477 bp)基因编码的蛋白的 $M_r$ 为17 935.7, 理论pI 5.23; p7TP3(416 bp)基因编码的蛋白的 $M_r$ 为14 165.4, 理论pI 5.51. p7TP3(477 bp)与p7TP3(416 bp)编码蛋白质均在19-21SeR具有潜在的蛋白激酶C磷酸化位点; 在62-67GVfsTL、108-113GSLiAS、119-124GAyvTQ具有潜在的N-豆蔻酰基化位

点; 在81-83RGD具有潜在的细胞黏附序列位点. 应用ProtScale软件对二者的编码蛋白质分别进行了 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠和无规则卷曲等二级结构预测, 发现他们除在羧基末端稍有差异外, 其蛋白质二级结构基本相同. 经Predicting Antigenic Peptides(<http://bio.dfci.edu/harvard Tools/antigenic.pl>)预测蛋白质抗原决定簇, p7TP3(416 bp)编码蛋白质抗原决定簇的No7序列比p7TP3(477 bp)少TQNTDVYPG-LAVFFQNALIFFSTLIY 26个氨基酸残基, 其余序列相同(表1).

3 讨论

病毒基因组的复制和表达调节与真核细胞类似, 主要是转录水平的调节. 然而在许多情况下病

表 1 p7TP3 (477 bp)编码蛋白的抗原决定簇预测

No	Start Position	Sequence	End Position
1	10	WPECECID	17
2	23	NAVASWAGILFF	35
3	41	MIDAAVVPK	50
4	53	QLNHAFHTCGVF STLAFFMI	72
5	85	YESGCLG	91
6	95	ARVWVFIGF	103
7	106	MFGSLIASMWILFGA YVTQNTDVYPGLAV FFQNALIFFSTLIY	148

毒还必须借助感染的宿主细胞的一些复制和表达的辅助元件完成其生活周期及致病过程<sup>[8]</sup>。在细胞的不同发育阶段和生理状态下, 基因通过不同的拼接方式产生不同的mRNA和翻译产物, 使得细胞所表达的基因类型、表达水平、表达组织和细胞特异性、表达的先后顺序都是不同的。基因可通过如下几种方式产生多个转录体如不同的转录起始位点, 可变剪切, 选择不同的加尾信号位点, RNA编辑等。多种生物中存在可变剪切现象<sup>[9-11]</sup>, 可变剪切主要有四种方式: (1) 剪切产物缺失一个或几个外显子; (2) 剪切产物保留一个或几个内含子作为外显子的编码序列; (3) 外显子中存在5'-剪切位点或3'-剪切位点; (4) 内含子中存在5'-剪切位点或3'-剪切位点, 从而使部分内含子变为编码序列。RNA剪切是真核生物在长期进化过程中形成的, 他也是基因表达调节的重要环节<sup>[12-14]</sup>。

随着以人的基因克隆化为主的不同生物类型基因克隆化研究的进展, 已经积累了大量的不同生物的基因序列、蛋白质的氨基酸残基序列, 并据此建立了庞大的数据库系统。对于这些数据的分析, 必须依靠生物信息学技术不断发展, 为这些资料和数据的分析建立了一些有效平台。对于一种新基因生物学和医学意义的认识, 可以从多方面入手, 其中对于这种蛋白的表达及其在细胞中对于基因表达谱的影响研究, 也是重要的突破口。从目前的研究技术来看, 以基因芯片技术和抑制性消减杂交 (SSH) 技术最为有效。来源于同一个基因的剪切体有时具有相反的生物学功能, 成军 *et al*<sup>[15]</sup> 利用基因芯片技术分别对于NS5ATP2(615 bp)与NS5ATP2(216 bp)反式调节的肝细胞的靶基因类型进行分析, 然后对于不同剪切型

NS5ATP2(615 bp)与NS5ATP2(216 bp)反式调节基因类型的异同进行比较分析, 研究不同剪切型的生物学功能差别, 发现他们的生物学功能具有相同或相似的一面。我们在克隆p7TP3基因的cDNA过程中, 发现了一个p7TP3(477 bp)的mRNA剪切变异体p7TP3(416 bp), 经生物信息学分析, 我们发现p7TP3(477 bp)与p7TP3(416 bp)编码的蛋白质均是跨膜蛋白, 推测其亚细胞定位可能在胞质膜; 使用ProtScale软件对他们编码的蛋白质分别进行了 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠和无规则卷曲等二级结构预测, Predicting Antigenic Peptides软件预测他们编码蛋白质抗原决定簇, 发现他们的生物学功能非常相似, 但是这种生物信息学分析有其局限性, 还必须以实际的研究结果进一步证实。

从分子生物学角度来看, 丙型肝炎病毒发病机制就是肝炎病毒生物大分子与肝细胞相互作用及其后果, 主要内容可以分成3个层次: (1) 肝细胞中调节肝炎病毒复制和表达的蛋白质因子及相应的信号转导; (2) 肝炎病毒蛋白与肝细胞中蛋白之间的相互作用以及后果; (3) 肝炎病毒蛋白的表达对于肝细胞基因表达谱和表达水平的反式调节作用。其中丙型肝炎病毒的反式调节机制在其肝炎病毒发病机制中发挥了重要作用。反式调节机制至少包括三方面的含义<sup>[16-23]</sup>: 一方面是肝炎病毒蛋白对于肝细胞基因组表达调节的反式调节即肝炎病毒蛋白与肝细胞基因组启动子DNA结合对于肝细胞基因表达谱产生影响; 第二方面是肝细胞蛋白对于肝炎病毒基因表达的反式调节。肝炎病毒属于简单的生物类型, 要完成其生活周期必须借助于肝细胞中的蛋白成分, 肝细胞中特有的一些蛋白成分与肝炎病毒基因组DNA/RNA结合对于肝炎病毒基因表达进行调节, 这也是决定肝炎病毒嗜肝特性的重要的分子生物学机制; 第三方面是肝炎病毒蛋白对于肝炎病毒基因组表达的反式调节。目前关于p7蛋白反式调节的靶基因的结构与功能、表达与调控以及新基因在丙型肝炎病毒致病机制中的作用不明, 但是我们相信, 新基因p7TP3及其剪切体的克隆为研究p7蛋白的生物学功能开辟了新的方向。

#### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997: 83-88
- 2 Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Bevitt DJ, Toms GL. Characterization of the genome and

#### ■名词解释

可变剪切: 由于mRNA的编辑产生了不同的多肽, 进而形成不同蛋白质, 这些蛋白质就互称为剪切体 (splice variants) 或者可变剪切。

### ■同行评价

文章发现并鉴定 HCV p7TP3(477 bp)及其剪切体 p7TP3(416 bp)基因,为阐明HCV p7蛋白的反式调节作用及其机制开辟了新的研究方向。该论文具有科学性、创新性和可行性,能较好地反映我国消化病学实验研究的先进水平。

- 3 杨艳杰, 成军, 陈东风, 钟彦伟, 张忠东, 李强. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活作用的研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1011-1014
- 4 Carrere-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, Brulin B, Cocquerel L, Belouzard S, Penin F, Dubuisson J. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem* 2004; 279: 41384-41392
- 5 Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychofski C, Penin F, Dubuisson J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 2002; 76: 3720-3730
- 6 Ghibaudo D, Cohen L, Penin F, Martin A. Characterization of GB virus B polyprotein processing reveals the existence of a novel 13-kDa protein with partial homology to hepatitis C virus p7 protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 24965-24975
- 7 郭江, 成军, 赵龙凤. 丙型肝炎病毒p7蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1692-1694
- 8 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因10的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 935-938
- 9 Sharp PA. Split genes and RNA splicing. *Cell* 1994; 77: 805-815
- 10 Slaughaupt SA. Genetics of familial dysautonomia. Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene. *Clin Auton Res* 2002; 12: I15-I19
- 11 Gelfand MS, Dubchak I, Dralyuk I, Zorn M. ASDB: database of alternatively spliced genes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 301-302
- 12 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(下册). 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 484-485
- 13 Stiles JK, Hicock PI, Shah PH, Meade JC. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in Leishmania. *Ann Trop Med Parasitol* 1999; 93: 781-807
- 14 O'Neill JP, Rogan PK, Cariello N, Nicklas JA. Mutations that alter RNA splicing of the human HPRT gene: a review of the spectrum. *Mutat Res* 1998; 411: 179-214
- 15 成军, 杨倩, 刘妍, 王建军, 纪冬. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白反式调节基因2不同剪切体调节靶基因的比较. 世界华人消化杂志 2005; 13: 198-201
- 16 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003; 11: 888-896
- 17 You LR, Chen CM, Yeh TS, Tsai TY, Mai RT, Lin CH, Lee YH. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* 1999; 73: 2841-2853
- 18 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 939-942
- 19 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因6的反式激活基因的筛选. 世界华人消化杂志 2004; 12: 54-57
- 20 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林. 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白的反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004; 12: 311-314
- 21 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较. 世界华人消化杂志 2004; 12: 327-331
- 22 郭江, 成军, 纪冬, 赵龙凤, 王建军, 刘妍, 黄燕萍. 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选HCV p7蛋白的反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2590-2593
- 23 郭江, 成军, 纪冬, 赵龙凤, 高学松, 刘妍, 吴顺华. 抑制性消减杂交技术克隆和筛选丙型肝炎病毒F蛋白的反式调节基因. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 660-663

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## NERD及相关疾病国际研讨会

本刊讯 NERD及相关疾病国际研讨会将于2006-08在三亚举行, 现将征文通知公布如下:

### 1 稿件要求及截稿日期

全文和结构式摘要800字, 电脑打印附软盘或E-mail, 2006-06-15截稿。

### 2 联系方式

北京市鼓楼大街41号中国医学论坛报社张莉; 邮编: 100009; 电话: 010-64002844; E-mail: NERD@gisummit.com.

# HCV p7蛋白反式调节基因p7TP2的克隆化及生物信息学分析

袁菊, 郭江, 成军, 陶明亮, 蓝贤勇, 洪源, 靳亚平, 毛羽

袁菊, 郭江, 成军, 陶明亮, 蓝贤勇, 洪源, 毛羽, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011  
袁菊, 陶明亮, 蓝贤勇, 靳亚平, 西北农林科技大学动物科技学院 陕西省杨陵区 712100  
袁菊, 西北农林科技大学2004级硕士生, 主要研究方向动物生殖内分泌学。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30371288  
国家重点基础研究973项目, No. 2004CB518908  
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540  
收稿日期: 2005-12-09 接受日期: 2006-01-14

## Cloning and bioinformatics analysis of p7TP2 gene transregulated by hepatitis C virus p7 protein

Ju Yuan, Jiang Guo, Jun Cheng, Ming-Liang Tao, Xian-Yong Lan, Yuan Hong, Ya-Ping Jin, Yu Mao

Ju Yuan, Jiang Guo, Jun Cheng, Ming-Liang Tao, Xian-Yong Lan, Yuan Hong, Yu Mao, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China  
Ju Yuan, Ming-Liang Tao, Xian-Yong Lan, Ya-Ping Jin, College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yang Ling 712100, Shaanxi Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30371288, and the Special Funds for Major State Basic Research 973 Program of China, No. 2004CB518908  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Dongcheng District, Anwai Avenue, 13 Ditan Park, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2005-12-09 Accepted: 2006-01-14

### Abstract

**AIM:** To clone and identify a new gene p7TP2 transregulated by hepatitis C virus p7 protein, and construct its recombinant eukaryotic expression vector to explore its function and structure.

**METHODS:** p7TP2 gene was amplified by reverse chain polymerase chain reaction (RT-PCR) using HepG2 cDNA as template and inserted into the vector pGEM-T by TA cloning. Recombinant eukaryotic expression vector (pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A-p7TP2) was then constructed by subcloning technique which were

all confirmed by restriction enzyme digestion analysis and sequencing. Bioinformatic methods were used to analyze its possible physical and chemical characters, structure, function and chromosome location.

**RESULTS:** p7TP2 gene was successfully amplified by RT-PCR, consisting of 495 nucleotides and coding a protein of 164 amino acid residues. After searching in GenBank, we found the new gene had no significant homology with the known genes. The DNA fragment was inserted into the vector pGEM-T by TA cloning, and the recombinant eukaryotic expression vector (pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A-p7TP2) was then constructed and confirmed correct after restriction enzyme digestion analysis and sequencing. Bioinformatic analysis showed that the new gene was located at chromosome 8q24.3 with  $M_r$  17 146.5 and theoretical pI 9.26. The estimated half-life period was 30 h (mammalian reticulocytes, *in vitro*). The protein was unstable with a high aliphatic index, consisting of 3 helix regions, 4 strand regions, 4 protein kinase C phosphorylation sites, 1 casein kinase II phosphorylation site and 5 N-myristoylation sites. It was predicted that the new protein may be globular, but not as compact as a domain, containing signal peptide and two transmembrane regions.

**CONCLUSION:** A new gene is recognized as the new target transregulated by HCV p7 protein, and its recombinant eukaryotic expression vector (pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A-p7TP2) is successfully constructed.

**Key Words:** HCV p7 protein; Transregulation; Cloning; Bioinformatics analysis

Yuan J, Guo J, Cheng J, Tao ML, Lan XY, Hong Y, Jin YP, Mao Y. Cloning and bioinformatics analysis of p7TP2 gene transregulated by hepatitis C virus p7 protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):581-587

### 摘要

**目的:** 克隆HCV p7蛋白反式调节未知功能新

### 背景资料

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的世界性传染病。全世界约有1.7亿HCV感染者是HIV-1感染者的5倍,但目前还没有特效的治疗技术和方法, HCV p7是一个小的疏水性多蛋白, 编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白之间, 可在黑脂膜中形成六聚体阳离子通道, 推测其功能与病毒离子通道蛋白(viroporin)类似, 可使细胞内膜结构不稳定, 以利成熟的病毒颗粒释放, p7对病毒复制并不是关键的, 但对感染性病毒的产生是必不可缺少的。

## ■ 研究前沿

对p7蛋白的生物学功能有所研究,但其反式调节机制尚不是很明确。p7TP2是利用基因芯片技术筛选得到的p7蛋白反式调节的靶基因,其结构和功能的研究均未有报道。对其进一步的研究期望能在HCV的发病机制方面有所突破。

基因p7TP2,构建其真核表达载体,并应用生物信息学初步探讨其结构及功能。

**方法:**应用PCR技术从HepG2细胞提取的cDNA扩增p7TP2基因,选用pGEM-T载体进行TA克隆,通过PCR,限制性酶切分析及测序进行鉴定,再将其亚克隆到真核表达载体pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A,通过PCR,限制酶切分析进行鉴定,并应用生物信息学初步分析其物理化学性质、蛋白质结构域、功能及染色体定位。

**结果:**成功从HepG2细胞提取的cDNA中扩增出p7TP2基因,编码区为495核苷酸(nt),编码产物为164氨基酸残基(aa),经核苷酸序列数据库(GenBank)同源序列的搜寻,与已知基因序列和蛋白序列之间没有显著同源性,属于未知功能新基因,并成功进行TA克隆,酶切、测序均正确,并进一步亚克隆至pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A真核表达载体,生物信息学分析此基因位于8q24.3, M<sub>r</sub>17 146.5,理论pI: 9.26,半衰期为30 h(体外哺乳类网状细胞),属于不稳定蛋白,疏水指数较高,含有潜在三个螺旋区域,四个β折叠,四个蛋白激酶C磷酸化位点,一个酪蛋白激酶II磷酸化位点,5个N-肉豆蔻酰位点,预测可能为具有不紧密的球蛋白结构,具有信号肽及两个跨膜结构域。

**结论:**发现了HCV p7反式调节新的靶基因,构建了pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A真核表达载体。

**关键词:** HCV p7蛋白; 反式调节基因; 克隆化; 生物信息学分析

袁菊, 郭江, 成军, 陶明亮, 蓝贤勇, 洪源, 靳亚平, 毛羽. HCV p7蛋白反式调节基因p7TP2的克隆化及生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2006;14(6):581-587  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/581.asp>

## 0 引言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的世界性传染病<sup>[1-6]</sup>. 全世界约有1.7亿HCV感染者,是HIV感染者的5倍. HCV感染后约70%转化为慢性并与肝硬化肝衰竭和肝癌的发生密切相关. HCV的基因组含有一个长的开放阅读框架(ORF),编码一个约3 010个氨基酸残基(aa)组成的多蛋白,该多蛋白被细胞和病毒蛋白酶切割产生至少10个病毒基因产物<sup>[7]</sup>. p7是由HCV基因组2 580-2 768核苷酸(nt)之间的基因编码的由63个aa组成的一个小蛋白,关于其功能研究较

少. 为了研究p7蛋白对于宿主细胞基因的上调、下调作用,郭江 *et al*应用基因表达谱芯片技术研究p7蛋白对于宿主细胞基因的上调、下调作用,同时进行了系统的筛选研究,发现并鉴定了一系列p7蛋白反式调节的靶基因,其中包括一些未知功能的新基因. 为探讨其生物学功能及其作用,我们构建其真核表达载体,并对其生物学功能进行预测分析,为今后更加广泛深入地研究新基因的生物学功能打下基础,并为研究HCV p7的反式调节作用、丙型肝炎发病机制创造了条件。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝母细胞瘤细胞系HepG2及感受态大肠杆菌DH5α为本室保存, Taq酶(鼎国生物), T4 DNA连接酶、pGEM-T, IPTG及X-α-gal购于Promega公司,玻璃奶回收试剂盒购自博大泰克公司,引物合成及DNA序列测定均由Invitrogen公司完成, *EcoR* I, *Bam* H I 购自TaKaRa生物公司, pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A由北大人民医院魏来教授惠赠。

**1.2 方法** 郭江 *et al*利用基因芯片技术构建HCV p7蛋白反式调节基因,挑选克隆测序,与GenBank数据库进行初步比较,发现一个新基因,根据基因起始密码子的Kozak规则和终止密码子下游保守的多聚腺苷酸信号序列,电子拼接推定该基因的开放读码框获得相应的全长编码基因,将该未知功能基因命名为p7TP2,发现其开放读码框长495 bp,编码164个氨基酸残基。

根据p7TP2的全长编码基因,设计2条引物,有义链引物5'-GAA TTC CA ATG GTG GAG GTG CCC AGG-3',引入*EcoR* I酶切位点,反义链引物5'-GGA TCC CAT GAC GAC CAG GCC CAG-3',引入*Bam* H I酶切位点,提取HepG2细胞的总RNA,进行反转录,以反转录产物cDNA为模板进行PCR,PCR参数如下: 95℃ 5 min预变性, 94℃ 30 s变性, 72℃ 1 min退火及延伸,共35个循环, 72℃延伸10 min. 将PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶中电泳,切取目的片段,玻璃奶回收PCR产物,与pGEM-T载体连接,转化DH5α感受态细菌,在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上,37℃培养12-16 h. 挑取阳性菌落,增菌. 提取质粒进行限制性酶切分析鉴定,选择经鉴定的克隆送测序. 挑取上述白色菌落扩大培养,碱裂解法提取质粒,选择酶切鉴定阳性克隆,并回收纯化目的p7TP2片段,同时将pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A真核表达载体进行*EcoR*

```

      M V E V P R H H P C
1  ATG GTG GAG GTG CCC AGG CAC CAC CCT TGT
   C L L M A L G W V L
31  TGT CTG CTC ATG GCC TTG GGG TGG GTC CTA
   P S W G S L G A V G
61  CCG AGC TGG GGA AGC CTG GGG GCC GTA GGG
   S P E S A W R R W R
91  AGC CCA GAG TCA GCC TGG AGG AGG TGG CGC
   F G E F G R Q A G V
121 TTT GGT GAG TTT GGA AGG CAA GCA GGG GTG
   S C R G P G K G D C
151 AGC TGC AGG GGG CCA GGA AAG GGT GAC TGT
   D S G S S R A K A L
181 GAC TCT GGG AGC AGC CGT GCC AAG GCC CTG
   G Q E G L G Q P Q G
211 GGA CAG GAG GGG CTT GGC CAG CCT CAA GGC
   L T P A H C T L R F
241 CTT ACT CCA GCC CAC TGC ACT CTC AGA TTC
   Q L P G A G E M A E
271 CAG CTC CCT GGG GCA GGT GAG ATG GCC GAG
   P G P W M I S V P V
301 CCA GGT CCT TGG ATG ATC TCT GTT CCT GTT
   P L F P G S A A E P
331 CCC CTC TTC CCG GGA AGC GCC GCG GAG CCA
   S T A S S S P T W R
361 TCA ACA GCA AGC AGC TCA CCT ACC TGG AGA
   N T G P N R G C G S
391 AAT ACC GGC CCA AAC AGA GGC TGC GGT TCA
   K T H T R T R P G A
421 AAG ACC CAC ACA CGC ACA AGA CCC GGT GCT
   A L C S S G P W L G
451 GCG TTA TGT AGC TCA GGA CCT TGG CTG GGC
   L V V M *
481 CTG GTC GTC ATG TAG
    
```

图 1 P7TP2核苷酸ORF及编码蛋白序列.

I, *Bam*H I 双酶切反应并回收纯化, 以T4连接酶构建pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A-p7TP2重组载体, 按上述方法常规转化感受态细菌, 提取质粒, 作*Eco*R I, *Bam*H I 双酶切鉴定.

将该基因与NCBI进行BLASTN比对分析, 确定其染色体定位, 应用ProtParam工具([www.expasy.ch/tools/protparam.html](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html))对p7TP2蛋白质一级结构的生物信息学预测, 包括蛋白质的相对分子量、理论pI值、消光系数、半衰期、不稳定系数以及总平均亲水性等, 应用nnpredict([www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html](http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html))预测氨基酸序列中各个氨基酸对应的二级结构的程序. 应用PredictProtein([www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html](http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html))对蛋白质结构进行分析, 应用ProtScale([www.expasy.org/tools/protscale.html](http://www.expasy.org/tools/protscale.html))做蛋白质的疏水性分析, 应用SignalP-信号肽预测工具(

图 2 p7TP2 RT-PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析.

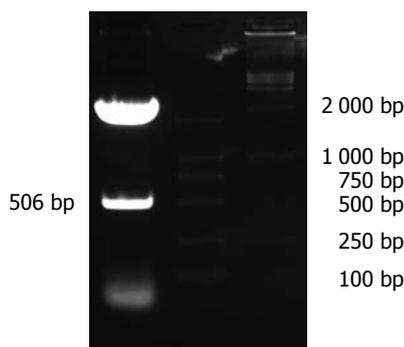


图 3 重组质粒pGEM-T-p7TP2的酶切鉴定.

[www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/))对其进行蛋白质结构信号肽分析, 有助于蛋白质功能域的区别及蛋白质细胞定位. 应用Tmpred-跨膜结构分析([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)), 对于正确认识蛋白质结构、甚至功能具有重要的意义, COILS([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html))预测蛋白质中卷曲螺旋结构.

## 2 结果

2.1 p7TP2的全长编码序列的确定 新基因开放读码框长495 bp, 编码164个氨基酸残基(图1), 该序列被美国核苷酸序列数据库GenBank收录, 收录号码为AY819648.

2.2 p7TP2基因的PCR扩增 以HepG2细胞cDNA文库为模板, PCR反应后经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 可见长度为506 bp左右的电泳条带(图2). 利用pGEM-T vector System I 将纯化PCR产物进行TA克隆, 经*Eco*R I, *Bam*H I 双酶切得到两条带(图3), 然后测序验证是正确的克隆, 命名为pGEM-T-p7TP2, 进一步将pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A和pGEM-T-p7TP2作*Eco*R I, *Bam*H I 双酶切, 回收目的片段, 构建重组真核表达载体pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A-p7TP2, 经酶切鉴定重

## ■ 相关报道

- 1 Ramesh Prabhu, Nutan Khalap, Roberto Burioni, Massimo Clementi, Robert F. Garry, and Srikanta Dash. Inhibition of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein, Helicase Activity, and Viral Replication by a Recombinant Human Antibody Clone. *Am J Pathol* 2004 165: 1163-1173
- 2 Jae-Hwan Nam, Kristina Faulk, Ronald E. Engle, Sugantha Govindarajan, Marisa St. Claire, and Jens Bukh. *In Vivo* Analysis of the 3' Untranslated Region of GB Virus B after *In Vitro* Mutagenesis of an Infectious cDNA Clone: Persistent Infection in a Transfected Tamarin. *J Virol* 2004 78: 9389-9399

### ■创新盘点

本文利用PCR技术克隆了p7TP2的全基因序列,并利用生物信息学技术分析p7TP2基因组序列、编码蛋白的结构、蛋白质功能结构单位等.

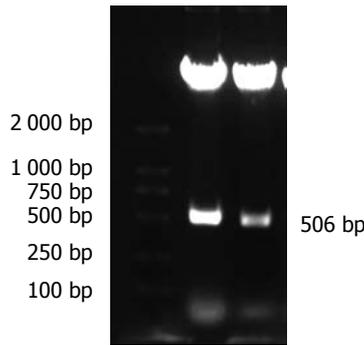


图4 重组质粒pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A-p7TP2的酶切鉴定.

```

1 MVEVPRHHPC CLLMALGWVL PSWGLGAVG SPESAWRRWR FGEFGRQAGV
51 SCRPGKGDG DSGSSRAKx xxxxxxxxxx xTPAHCTLRF QLPGAGEMAE
101 PGPWMISVPV PLFPGxxxxx xxxxxxxxWR NTGPNRGC GS KTHTRTRPGA
151 ALCSSGPWLG LVVM

```

图5 PredictProtein预测结果, x代表低复杂性区域.

组载体在506 bp左右见1条带(图4),证明pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A-p7TP2构建成功.

2.3 p7TP2基因生物信息学分析 将基因测序结果与NCBI进行BLASTN比对分析, p7TP2基因位于人染色体8q24.3, ProtParam分析 $M_r$  17 146.5, 理论pI: 9.26, 消光系数 $38\ 235\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (276 nm);  $39\ 581\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (278 nm);  $39\ 980\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (279 nm);  $40\ 190\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (280 nm);  $39\ 560\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (282 nm)是在6.0 mol/L盐酸胍, 0.02 mol/L磷酸盐缓冲液, pH 6.5以半胱氨酸来计算, 半衰期为30 h(体外哺乳类网状细胞), 大于20 h(酵母体内), 大于10 h(埃希菌属大肠杆菌体内), 不稳定系数是54.82, 一般认为该蛋白是不稳定的, 疏水性指数是60.12, 总平均亲水性-0.243. nnpredict预测的二级结构为

```

-----H H H H---E-----H H H-
HH-----
-----H H H H-----
EE-----
-----E-----E E E--

```

(H表示螺旋, E表示 $\beta$ 折叠, 用“-”表示转角结构), PredictProtein预测包含潜在的蛋白激酶C磷酸化位点(51/SCR, 64/SSR, 87/TLR, 128/TWR), 酪蛋白激酶II磷酸化位点(116/SAAE), N-肉豆蔻酰位点(24/GSLGAV, 30/GSPESA, 63/GSSRAK, 76/GQPQGL, 149/GAALCS), 含2个低复杂性区域结构(图5), 对序列进行PROF预测, 预测包含提交的蛋白质的二级结构含量同疾病分类、蛋白质亲水表面统计、残基组成、预测的二级结构等. OBS-sec表示二级结构的观测值; PROF-sec表示预测的二级结构; Rel-sec为预测

二级结构的可信度, 数值越大表示越可信; SUB-secPROF表示预测的二级结构的集合. 所有区域平均精确度大于82%, H为螺旋; E为折叠; L为随机卷曲; O-3-acc表示相对亲水表面的观测值, 共有3种状态,  $b = 0\%-9\%$ ,  $i = 9\%-36\%$ ,  $e = 36\%-100\%$ . P-3-acc表示预测的相对亲水表面. Rel-acc表示预测亲水表面的可信度. SUB-acc表示预测的亲水表面的集合(图6), 并预测可能为球蛋白, 但结构并不是特别紧密, 蛋白质疏水性预测最大值是2.422, 最小值是-2.289, 在8-32, 100-118, 150-160区域的氨基酸具有很强的疏水性, 其次是84-95的区域具有一定的疏水性(图7). 用SignalP-信号肽预测工具预测该蛋白信号肽概率0.991, 锚定蛋白概率0.005, 最大分隔位点概率是0.471, 位于27与28氨基酸之间(图8). 对其进行跨膜结构的分析包括两个强跨膜螺旋(从11-27, 跨膜方向由内向外; 148-167, 跨膜方向由外向内)(图9), 无明显的卷曲螺旋结构.

### 3 讨论

HCV p7是一个小的疏水性多蛋白, 编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白之间, 可在黑脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 推测其功能与病毒离子孔道蛋白(viroporin)类似, 可使细胞内膜结构不稳定化, 以利于成熟的病毒颗粒释放<sup>[8-9]</sup>, 这一离子通道可被金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物抑制<sup>[10-12]</sup>, p7对病毒复制并不是关键的, 但对感染性病毒的产生是必不可少的. p7仍有许多功能没有研究清楚, 对其反式调节作用的研究更少<sup>[13]</sup>. 为进一步研究p7的功能, 明确p7在丙型肝炎发病机制中的作用, 郭江 *et al*<sup>[14]</sup>曾利

.....1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10.1.....11.1.....12.1.....13.1.....14.1.....15.1,..  
...16.1.

AA  
MVEVPRHHPCLLMALGWVLPWSGLGAVGSPESAWRRWRFGEFGRQAGVSCRGPKGDCDSGSSRAKALGQEGLGQPQLTPAH  
CTLRFLQPGAGEMAEPPWVPLFPGSAAEPSTASSPTWRNTGPNRGCCKTHTTRTPGAALCSSGPWLGLVVM

OBS\_sec

PROF\_sec EE HHHHHHHH HHHHHHHHHHH HHHHHHHH EEEEEEE EEEEE  
EEEE EEEEE

Rel\_sec

92126776257777624301342324541480556432232020441000023566653587456877621147877757733136664436665  
2456774277740457787666667776676423557777665444446664023046862313772

SUB\_sec

L...LLLL.HHHHHH.....L...L.HHH.....LLLLL.LLL.HHHHHH...LLLLLLLLL...EEE...LLLL.LLLL.EEE...LLLLLLLLLLLLL  
LLLLL...LLLLLLLLLL...LLL.....LLL...EE.

O\_3\_acc

bb  
bb

P\_3\_acc

eee ee bbbbbbbb bbee eebebee eeebb b ebbeebe be eeeee ee ee bee eeee e eebeeb b b ee ee bee  
bbbbbbb ee eeeeeeee e ee e eeee e e eebbbbbeee bbbb e

Rel\_acc

30620023022953513001112201001203241331210201211201002212011130233571212332210221100321523202200  
10032112143300112220101133112001001100200110011102211010103011232120

SUB\_acc

..e.....bb.b.....b.....be.....b.....b.....  
.....

■应用要点  
新基因p7TP2的克隆和功能研究,为今后更加广泛深入地研究新基因的生物学功能打下基础,并为研究HCV p7的反式调节作用、丙型肝炎发病机制创造了条件.

图 6 对序列进行的PROF预测.

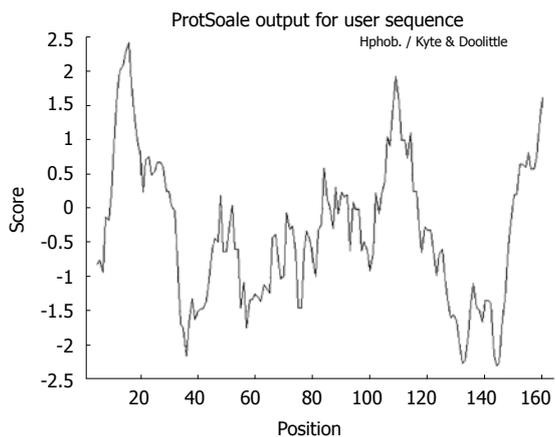


图 7 p7TP2蛋白的疏水性分析.

用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)和基因芯片技术筛选HCV p7反式激活的靶基因,推测其在体内可能存在的功能线索.基因表达谱芯片技术是近年来新发展起来的一项研究差异基因表达的分子生物学

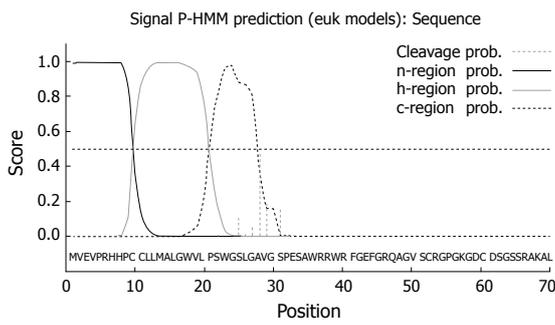


图 8 p7TP2蛋白的信号肽分析.

前沿技术,通过将大量的基因特异的探针火气cDNA片段固定在一块固相载体上,与待测样品杂交后用激光共聚焦荧光检测系统进行结果扫描、监测,对来源不同的个体、组织、发育阶段、分化阶段、病变及刺激条件下的细胞内的mRNA或cDNA进行分析,获得大量有价值的生命信息<sup>[15-16]</sup>,并可以发现未知基因.

确定一个新基因的编码序列,研究该基因

### ■名词解释

反式调节: 基因表达的调节方式分为顺式调节和反式调节, 分子结构内部的基因表达调节元件的作用形式称为顺式调节, 而分子间的基因表达调节元件的作用形式称为反式调节。

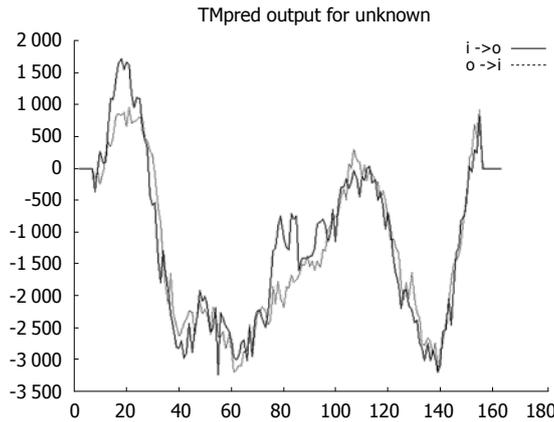


图9 p7TP2蛋白的跨膜结构域分析。

的表达与调控, 编码蛋白的结构与功能, 确定新基因的生物学和医学意义, 是医学分子生物学研究领域一项具有挑战性的工作<sup>[17]</sup>。我们发现了p7TP2基因, 这是一种未知功能的新基因, 对于这一新基因结构与功能的研究目前还是空白, p7TP2基因开放读码框长495 bp, 编码164个氨基酸残基, 该序列被美国核苷酸序列数据库GenBank收录, 收录号码为AY819648, 将基因测序结果与NCBI进行BLASTN比对分析, p7TP2基因位于人染色体8q24.3, ProtParam分析M<sub>r</sub> 17 146.5, 理论pI: 9.26, 半衰期为30 h(体外哺乳类网状细胞), 大于20 h(酵母体内), 大于10 h(埃希菌属大肠杆菌体内), 不稳定系数是54.82, 属于不稳定蛋白, 疏水指数较高60.12, 总平均亲水性-0.243, 在8-32, 100-118, 150-160区域的氨基酸具有很强的疏水性, 含有三个螺旋区域, 四个β折叠, 四个潜在的蛋白激酶C磷酸化位点(51/SCR, 64/SSR, 87/TLR, 128/TWR), 一个酪蛋白激酶II磷酸化位点(116/SAAE), 5个N-肉豆蔻酰位点(24/GSLGAV, 30/GSPESA, 63/GSSRAK, 76/GQPQGL, 149/GAALCS), 其中蛋白激酶C磷酸化位点与介导胞外分泌有关<sup>[18]</sup>, 酪蛋白激酶II磷酸化位点与调节细胞凋亡和细胞周期有关<sup>[19]</sup>, N-豆蔻酰化位点可能定位于内质网或线粒体外膜<sup>[20]</sup>。用SignalP-信号肽预测工具预测该蛋白信号肽概率0.991, 锚定蛋白概率0.005, 对其进行跨膜结构的分析包括两个强跨膜螺旋(从11-27, 跨膜方向由内向外; 148-167, 跨膜方向由外向内)。本实验将该基因构建到真核表达载体pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His A, 为新基因的更进一步研究奠定基础, 同时也为研究HCV p7蛋白的生物学功能, 阐明HCV的致病机制提供了新的方向<sup>[21]</sup>。

生物信息学技术伴随计算机网络的发展而产生, 其强大的功能使其已经成为生命科学研究

的重要手段<sup>[22-26]</sup>, 一方面基因和蛋白质序列数据库的不断累积和计算机技术的进展催生了生物信息学这一崭新学科的诞生, 同时生物信息学技术对于经典的分子生物学技术具有重要的推动作用。本项研究, 首先应用基因芯片技术, 筛选克隆了人的p7TP2编码基因, 随后利用核苷酸数据库的生物信息学分析技术, 确定了基因序列和蛋白质一级结构序列。不仅如此, 利用生物信息学技术, 还确定了该基因的二级结构和功能域及染色体定位, 为进一步研究带该基因的结构和功能、表达与调控, 生物学意义和医学意义奠定了坚实的基础。

### 4 参考文献

- 邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交技术筛选白细胞中HCV NS3蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1897-1900
- 阚全程, 余祖江, 雷延昌, 杨东亮, 郝连杰. 人工构建含丙型肝炎病毒核糖体插入位点的双顺反子表达载体. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1520-1523
- 郝春秋, 冯志华, 周永兴, 聂青和, 李谨革, 贾战生, 梁雪松, 谢玉梅, 曹义战, 康文臻. 复制缺陷型HCV C基因腺病毒表达载体的构建包装及鉴定. 世界华人消化杂志 2003; 11: 144-147
- 梁雪松, 连建奇, 周永兴, 聂青和, 郝春秋. IRES特异性IRNA对HCV IRES启动蛋白翻译细胞内抑制作用. 世界华人消化杂志 2003; 11: 157-160
- 孙利, 周永兴, 郝春秋, 冯志华, 赵君, 胡沛臻, 付勇, 马福成, 常吉庆, 王九平, 聂青和. DNA疫苗对小鼠HCV-C皮下移植瘤的防治. 世界华人消化杂志 2003; 11: 165-168
- 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因TAHCCP2的克隆. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1893-1896
- Lo SY, Selby M, Tong M, Ou JH. Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. *Virology* 1994; 199: 124-131
- Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003; 535: 34-38
- Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6104-6108
- Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 2002; 76: 5326-5338
- Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 2004; 85: 451-461
- Branza-Nichita N, Durantel D, Carrouee-Durantel S, Dwek RA, Zitzmann N. Antiviral effect of

- N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhoea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J Virol* 2001; 75: 3527-3536
- 13 Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. The p7 poly-peptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11646-11651
- 14 郭江, 成军, 纪冬, 赵龙凤, 王建军, 刘妍, 黄燕萍. 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选HCVp7蛋白的反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2590-2593
- 15 Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 1517-1523
- 16 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-537
- 17 成军. 新基因结构与功能研究的策略. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 373-377
- 18 Morgan A, Burgoyne RD, Barclay JW, Craig TJ, Prescott GR, Ciufo LF, Evans GJ, Graham ME. Regulation of exocytosis by protein kinase C. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 1341-1344
- 19 Yamane K, Kinsella TJ. Casein kinase 2 regulates both apoptosis and the cell cycle following DNA damage induced by 6-thioguanine. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2355-2363
- 20 Colombo S, Longhi R, Alcaro S, Ortuso F, Sprocati T, Flora A, Borgese N. N-myristoylation determines dual targeting of mammalian NADH-cytochrome b5 reductase to ER and mitochondrial outer membranes by a mechanism of kinetic partitioning. *J Cell Biol* 2005; 168: 735-745
- 21 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳. 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1700-1704
- 22 Li X, Zhang Y. Bioinformatics data distribution and integration via Web Services and XML. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2003; 1: 299-303
- 23 Friedhoff P. Mapping protein-protein interactions by bioinformatics and cross-linking. *Anal Bioanal Chem* 2005; 381: 78-80
- 24 Pazos F, Guigas D, Valencia A, De Lorenzo V. MetaRouter: bioinformatics for bioremediation. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: D588-D592
- 25 Cattley S. A review of bioinformatics degrees in Australia. *Brief Bioinform* 2004; 5: 350-354
- 26 Cooper MS, Sommers-Herivel G, Poage CT, McCarthy MB, Crawford BD, Phillips C. The Zebrafish DVD Exchange Project: a bioinformatics initiative. *Methods Cell Biol* 2004; 77: 439-457

#### ■同行评价

此课题是国家重点基础研究项目, 是HCV肝炎病毒基因、克隆、生物信息学功能的基础性研究为阐明HCV的致病机制提供了新的方向. 生物信息学技术是生命科学研究的重要手段, 利用生物信息学技术为进一步研究该基因的结构和功能、表达与调控、生物学意义和医学意义结合奠定了坚实的基础.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

## 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会

本刊讯 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会将于2006年秋季在重庆将行, 现将征文通知如下:

### 1 稿件要求及截稿日期

全文及摘要800字(附软盘), 2006-07-15截稿.

### 2 联系方式

重庆市第三军医大学西南医院消化科赵晶京收(邮编: 400038); E-mail: zhaojingjing-1@sina.com.

# 冷缺血时间及组织相容性对胰岛细胞活性的影响

高宏君, 徐达传, 赵明, 李民, 范礼佩, 李留洋, 钱俊, 蔡德鸿

## ■背景资料

加拿大埃德蒙顿阿尔波特大学在2000年左右成功的进行了7例胰岛细胞移植, 和以往不同的是此种移植后患者的血糖完全控制在正常范围内, 经过随访表明移植效果满意。本文目的在于探讨冷缺血时间及组织相容性对胰岛细胞活性的影响。

高宏君, 赵明, 李民, 范礼佩, 李留洋, 钱俊, 蔡德鸿, 南方医科大学附属珠江医院器官移植科 广东省广州市 510280

徐达传, 南方医科大学解剖学教研室 广东省广州市 510515  
高宏君, 男, 1972-05-18, 吉林省长春人, 满族, 1995年吉林大学(原白求恩医科大学)博士, 主治医师, 主要从事器官移植方面的研究。

通讯作者: 高宏君, 510280, 广东省广州市海珠区工业大道, 南方医科大学附属珠江医院器官移植科, gao4056@163.com

电话: 0771-2188219 传真: 0771-2188219

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

## Influence of cold ischemia preservation time and histocompatibility on activity of islet cells

Hong-Jun Gao, Da-Chuan Xu, Ming Zhao, Min Li, Li-Pei Fan, Liu-Yang Li, Jun Qian, De-Hong Cai

Hong-Jun Gao, Ming Zhao, Min Li, Li-Pei Fan, Liu-Yang Li, Jun Qian, De-Hong Cai, Department of Transplantation, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China

Da-Chuan XU, Department Of Anatomy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 980240

Correspondence to: Dr. Hong-Jun Gao, Department of Transplantation, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China. gao4056@163.com

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-06

## Abstract

**AIM:** To investigate the impacts of cold ischemia preservation time and histocompatibility on the activity of islet cells during the islet transplantation.

**METHODS:** Pancreas was obtained from brain-dead donors, whose blood and HLA types were known. After *in situ* perfusion with hypertonic citrate adenine solution (HC-A) via aorta, the liver, kidney, and pancreas were resected in combination or separately. The changes of islet cell activity under different time of cold ischemia preservation were observed. The compatibility of islet cells with recipients was detected and the relationship between the histocompatibility and islet cell survival were analyzed.

## ■研究前沿

胰岛细胞移植需要移植的胰岛细胞数量很多, 至少要2-3个供体的胰腺, 目前随着技术成熟逐渐向单一供体的胰岛细胞移植发展, 要实现单一供体移植成功, 如何保证获得足量活性良好的胰岛细胞是关键。

**RESULTS:** Resection in combination or alone was successfully performed, and the rate of islet cell activity was all above 80% after cold ischemia for 5 h. Resection style in the purpose of transplantation had no impact on the activity of islet cells, while the cold ischemia preservation time was in negative correlation with it. When presented in blood, human islets induced a rapid consumption of blood cells. Both in HLA incompatibility and compatibility groups, the numbers of platelets, neutrophils, and monocytes were notably reduced  $[(1.0 \pm 0.72) \times 10^9/L, (0.54 \pm 0.24) \times 10^9/L, (0.01 \pm 0.00) \times 10^9/L]; (6.0 \pm 0.27) \times 10^9/L, (0.63 \pm 0.19) \times 10^9/L, (0.03 \pm 0.01) \times 10^9/L]$ . When heparin was used, these events were obviously avoided. The numbers of platelets, neutrophils, and monocytes were significantly increased in HLA incompatibility  $[(57.2 \pm 21.10) \times 10^9/L, (1.74 \pm 0.87) \times 10^9/L, (0.75 \pm 0.24) \times 10^9/L]$  and compatibility group  $[(67.9 \pm 19.0) \times 10^9/L, (3.42 \pm 0.61) \times 10^9/L, (0.47 \pm 0.08) \times 10^9/L]$  in comparison with those in control group ( $P < 0.05$ ). After cultivates 24 hours, HLA typing compatible groups  $(1.085 \pm 0.167 \times 10^5/L)$ , HLA typing incompatibility groups  $(0.697 \pm 0.193 \times 10^5/L)$ , the quantity of living islets in HLA typing compatible groups is more than the groups which HLA typing is incompatibility ( $P < 0.05$ ). After cultured for 24 h *in vitro*, the number of active islet cells in HLA compatibility group was significantly larger than that in HLA incompatibility group  $[(1.085 \pm 0.167) \times 10^5/L vs (0.697 \pm 0.193) \times 10^5/L, P < 0.05]$ .

**CONCLUSION:** The survival rate of islet cells during transplantation can be enhanced by reducing cold ischemia preservation time and using HLA compatible donors.

**Key Words:** Islet; Cold ischemia preservation; Compatibility; Transplantation

Gao HJ, Xu DC, Zhao M, Li M, Fan LP, Li LY, Qian J, Cai DH. Influence of cold ischemia preservation time and histocompatibility on activity of islet cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):588-593

## 摘要

目的: 探讨胰岛细胞移植中冷缺血时间、组

组织相容性对于胰岛细胞活性的影响.

**方法:** 采用脑死亡自愿捐赠器官的供者胰腺(已知血型和HLA配型); 高渗枸橼酸盐嘌呤溶液经过经主动脉原位灌注后, 肝、肾、胰腺联合及分别切取, 测定不同的冷却血时间条件下胰岛细胞活性的变化. 测定胰岛细胞和血液组织相容性, 分析供受者的组织相容性和胰岛细胞存活的关系.

**结果:** 肝脏、胰腺、肾脏联合切取及各器官的单独切取顺利, 在冷却血5 h以内胰岛细胞活性率都在80%以上, 用于胰岛细胞移植的胰腺和其他器官的切取不会影响胰岛细胞的活性; 人类胰岛暴露于未经抗凝的人类血中, 胰岛将诱发一个迅速血细胞消耗. 进行血小板激、中性粒细胞和单核细胞计数, HLA错配组分别为 $(1.0 \pm 0.72) \times 10^9/L$ ,  $(0.54 \pm 0.24) \times 10^9/L$ ,  $(0.01 \pm 0.00) \times 10^9/L$ , HLA匹配组为 $(6.0 \pm 0.27) \times 10^9/L$ ,  $(0.63 \pm 0.19) \times 10^9/L$ ,  $(0.03 \pm 0.01) \times 10^9/L$ , 无论HLA错配还是匹配血细胞都发生明显的消耗; 加入肝素后血细胞计数HLA错配组分别为 $(57.2 \pm 21.10) \times 10^9/L$ ,  $(1.74 \pm 0.87) \times 10^9/L$ ,  $(0.75 \pm 0.24) \times 10^9/L$ , HLA匹配组为 $(67.9 \pm 19.0) \times 10^9/L$ ,  $(3.42 \pm 0.61) \times 10^9/L$ ,  $(0.47 \pm 0.08) \times 10^9/L$ , 与对照组比较反应明显减轻( $P < 0.05$ ); 胰岛细胞体外培养24 h后, 匹配组活性胰岛细胞数量分别为 $(1.085 \pm 0.167) \times 10^5/L$ , 错配组为 $(0.697 \pm 0.193) \times 10^5/L$ , 具有显著性差异( $P < 0.05$ ).

**结论:** 把握胰岛细胞移植过程中冷缺血时间及组织相容性关系能够提高胰岛细胞的存活.

**关键词:** 胰岛细胞; 冷缺血; 相容性; 移植

高宏君, 徐达传, 赵明, 李民, 范礼佩, 李留洋, 钱俊, 蔡德鸿. 冷缺血时间及组织相容性对胰岛细胞活性的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(6):588-593

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/588.asp>

## 0 引言

胰岛细胞移植中足量活性良好胰岛细胞数量及其存活是胰岛细胞移植成功的关键, 我们采用高渗枸橼酸盐嘌呤溶液原位灌注, 进行人的胰腺保存和分离, 并探讨其及冷缺血时间对于胰岛细胞活性影响. 移植中组织相容性和细胞的存活及功能密切相关<sup>[1]</sup>. 胰岛移植后, 即可能发生有害的组织不相容性反应. 故我们根据美国国立器官移植分配中心(UNOS)制定的HLA交叉反应组

(CREG)的配型原则来进行胰岛细胞体外和血液的组织相容性测试.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 采用脑死亡自愿捐赠者的器官(已知血型和HLA配型), 在其他器官切取后或同时进行胰腺的获取; 血型相同, HLA配型相符的血液、HLA配型高致敏(错配3个以上位点)或PRA>50%或淋巴毒阳性受者的血液; 分离纯化后的胰岛细胞悬浊液, 经过70  $\mu\text{m}$ 的筛网滤过后, 保留直径大于70  $\mu\text{m}$ 的胰岛细胞, 配置成浓度 $1.20 \times 10^5/L$ 左右活性胰岛细胞悬浊液.

### 1.2 方法

**1.2.1 胰腺的获取** 采用胰腺、肾脏的联合切取, 肝脏、胰腺、肾脏的单独切取及联合切取<sup>[2]</sup>.

**1.2.2 胰岛的分离** 采用胶原酶P进行消化分离<sup>[3]</sup>.

**1.2.3 胰岛细胞活性测定及胰岛细胞与冷缺血时间的关系** 双硫腙(DTZ)、 $\gamma$ 脲橙(AO)染色判定活性胰岛细胞活性, 制备胰岛细胞团的电镜标本透射电镜观察<sup>[3]</sup>.

**1.2.4 胰岛细胞和血液组织相容性测定** 根据血液和胰岛细胞的HLA配型情况分为: HLA匹配组: 受者全血+胰岛细胞, 受者全血+胰岛细胞+肝素; 错配组: 受者全血+胰岛细胞, 受者全血+胰岛细胞+肝素; 对照组: 受者全血+RPMI 1640<sup>[4]</sup>.

**1.2.5 计算方法** 根据70-350  $\mu\text{m}$ 各个数量级胰岛细胞的分布, 参照Ricordi的换算<sup>[5,17]</sup>, 得出每克湿质量胰腺直径150  $\mu\text{m}$ 的胰岛换算值(IEQ, 150  $\mu\text{m}$  islet equivalent), 冷保存指数(或输注指数)=收获的胰岛数量(IEQ)  $\times 10^{-3}$ /冷缺血时间.

**统计学处理** 定量实验数据以mean  $\pm$  SD表示, 统计分析以SPSS10.0软件, 组间用t检验作显著性判断, 处理方法为配伍组方差分析并作两两比较.

## 2 结果

**2.1 切取器官无污染, 效果满意.** 用于切取的时间: 胰腺肾脏的联合切取、肝脏胰腺肾脏的联合切取方法平均需15 min, 肝脏、胰腺、肾脏的单独切取平均需20 min, 用于胰岛分离的胰腺12份, 冷缺血时间2.5-8 h. 冷缺血时间在5 h以内的9份, 温缺血时间0-3 min, 消化时间15  $\pm$  2.4 min. 胰岛收获量 $2.38 \pm 0.67(10^3 \text{ IEQ/g})$ . 纯化后胰岛细胞的活性: 19%-83%. 冷保存指数(或输注指数): 9.8-66.4. 缺血时间在5 h以内的胰岛细

### ■ 创新盘点

活性胰岛收获量的评估=收获的胰岛数量(IEQ)  $\times \ln[\log(\text{收获的胰岛数量(IEQ)} \times 10^{-3}/\text{冷缺血时间})+G]$ , 将能够更加准确的评估胰岛的质量和数量(G是每一种保存液所特有的系数), 第一次将组织配型学引进胰岛细胞移植中, 证实了在胰岛细胞的移植中应当考虑组织相容性对其的影响.

### ■应用要点

高渗枸橼酸盐嘌呤溶液是国内目前应用最多的器官保存液, 本文证实其对于胰腺的保存时间最多超过5-6 h, 否则会影响胰岛细胞活性率. 本文将组织配型引入胰岛细胞的移植中, 为胰岛细胞的长期存活提供了依据.

表 1 HLA错配组中血细胞的计数 ( $n = 9$ , mean  $\pm$  SD,  $\times 10^9/L$ )

	实验前1 h	培养1 h后		
		对照组	肝素组	无肝素组
血小板	117 $\pm$ 13.09	80.1 $\pm$ 11.72	57.2 $\pm$ 21.10	1.0 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>
中性粒细胞	2.47 $\pm$ 0.32	2.07 $\pm$ 0.27	1.74 $\pm$ 0.87	0.54 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
单核细胞	1.08 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.13	0.75 $\pm$ 0.24	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
淋巴细胞	0.91 $\pm$ 0.40	0.84 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.31	0.84 $\pm$ 0.11

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组, 肝素组.

表 2 HLA匹配组中血细胞的计数 ( $n = 9$ , mean  $\pm$  SD,  $\times 10^9/L$ )

	实验前1 h	培养1 h后		
		对照组	肝素组	无肝素组
血小板	139 $\pm$ 10.82	96.0 $\pm$ 10.14	67.9 $\pm$ 19.0	6.0 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
嗜中性粒细胞	4.83 $\pm$ 0.41	4.05 $\pm$ 0.30	3.42 $\pm$ 0.61	0.63 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
单核细胞	0.67 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.08	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
淋巴细胞	1.04 $\pm$ 0.12	0.96 $\pm$ 0.12	0.86 $\pm$ 0.24	0.68 $\pm$ 0.13

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组, 肝素组.

表 3 胰岛细胞培养24 h后活性胰岛细胞数量 ( $n = 9$ , mean  $\pm$  SD,  $\times 10^5/L$ )

	肝素组	对照组
匹配组	1.079 $\pm$ 0.142	1.085 $\pm$ 0.167
错配组	1.001 $\pm$ 0.240	0.697 $\pm$ 0.193

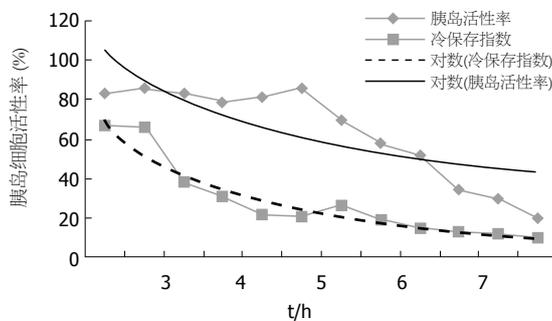


图 1 胰岛活性率及冷保存指数及对数与冷缺血时间的关系.

胰岛细胞的活性都在80%以上, 3, 4, 5 h分别是84.4%, 82.3%, 82.4%(图1).

透射电镜下观察:  $\beta$ 细胞膜完整, 细胞质内的高尔基体及线粒体丰富, 内质网清晰可见, 胞质内充满核心颗粒, 细胞核居中, 核膜完整(图2).

2.2 当胰岛细胞加入血液当中后, 胰岛细胞诱发了血细胞类似炎症反应, 血小板在数量上迅速减少和随后的单核细胞、巨噬细胞减少. 围绕胰岛细胞出现了血细胞的聚集, 胰岛细胞被包裹在当中. HLA匹配组和错配组之间没有显著性差别( $P > 0.05$ ). 加入肝素后抑制了血细胞凝集, 并且二者在统计学上没有差别(表1, 2).

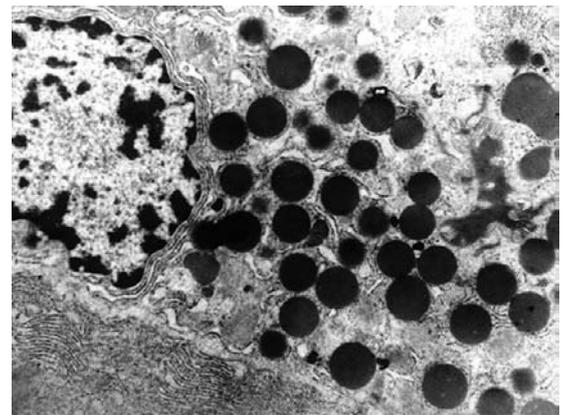


图 2 活性胰岛细胞的透射电镜.

2.3 HLA匹配组中, 肝素的加入经1 h的培养, 没有改变活性胰岛细胞数量. 错配组中, 加入肝素后经1 h的培养(淋巴毒阳性的除外), 明显提高了活性胰岛细胞数量. 24 h培养后, HLA匹配组的活性胰岛细胞数量和HLA错配组的活性胰岛细胞数量出现了明显的差异( $P < 0.05$ ); HLA匹配组中, 有无添加肝素对1 h和24 h培养后的活性胰岛细胞数量影响不大( $P > 0.05$ ); HLA错配组中肝素的加入对培养1 h后的活性胰岛细胞数量影响较大( $P < 0.05$ )(表3).

### 3 讨论

Edmonton研究表明, 胰岛细胞移植可以成功的治愈糖尿病<sup>[6]</sup>. 这种成功是建立在多因素联合的基础之上的, 如减少冷缺血时间, 足量的胰岛细胞及合理的免疫抑制方案. 1992年Hessellj发

现经原位灌注胰腺的胰岛细胞活性和产量明显高于未经原位灌注胰腺. 因为原位灌注可显著的减少热缺血时间, 使要切取器官迅速降低温度. 在胰岛移植中, 胰腺的整体灌注更能起到良好的作用<sup>[7]</sup>: 第一, 整体灌注可以使胰腺组织迅速降温, 保证胰腺组织功能的良好性; 第二, 整体灌注可以冲洗掉胰腺组织内的血细胞, 使在消化后的胰腺组织更加有利于胰岛的分离纯化; 第三, 减少在转运过程中胰管内的胰液对组织的消化, 在相同的保存条件下, 使胰岛细胞的活性保持的更好<sup>[5]</sup>. 采用高渗枸橼酸盐嘌呤溶液 1 500-2 000 mL, 对腹腔器官进行原位灌注, 我们在胰岛的制备过程中发现5 h以内的胰腺所制备胰岛活性和数量上并没有显著的差异. 可以看出, 高渗枸橼酸盐嘌呤溶液原位灌注的胰腺其胰岛细胞的活性和数量均可以满足移植的要求, 美中不足就是对于冷缺血时间要求比较高.

本试验中单位时间内(5 h以内)的冷保存指数与胰岛活性率的变化率相近. 在冷缺血时间小于5 h的情况下获取的胰腺, 均可以用于临床胰岛细胞移植的胰腺获取. 超过7 h, 胰岛细胞活性明显下降, 超过8 h, 胰岛细胞的活性率只有19%, 甚至更低, 而其活性的胰岛细胞的质量也不能满足临床移植的要求. 高渗枸橼酸盐嘌呤溶液原位整体灌注情况下, 用于胰岛移植的胰腺的冷缺血时间不宜超过5-6 h. 如何延长胰腺的保存时间<sup>[8-9]</sup>及冷缺血对于胰岛细胞损伤机制有待于进一步研究<sup>[10]</sup>. 实验结果分析后发现: 活性胰岛收获量的评估=收获的胰岛数量(IEQ)×ln[log(收获的胰岛数量(IEQ)×10<sup>-3</sup>/冷缺血时间)+G]. 将能够更加准确的评估胰岛的质量和数量(G是每一种保存液所特有的系数).

胰岛细胞经门静脉移植入血流丰富的肝脏, 保证胰岛细胞能够获得充足的养分<sup>[11]</sup>. 胰岛细胞一旦移植入血, 就引起血液中类似炎症的反应. 本研究中无论HLA配型的结果如何, 在数分钟之内都发生了这种凝集反应, 血细胞凝集在胰岛细胞的表面. 血小板在血液中迅速消耗, 是由于β-TG和P选择素同时诱发了血小板的活性, 在胰岛细胞的表面形成纤维蛋白包裹. 目前对胰岛细胞表面的血小板黏附配合体还没有定论, 虽然发现人的胰岛细胞表面有I、III、IV、V胶原存在, 但却是胶原蛋白介导了血小板的黏附和活动<sup>[12-13]</sup>. CD36和P65都可能作为血小板胶原的受体, 当胰岛细胞暴露在血中时其他蛋白像血小板配合体一样开始黏附激活<sup>[14]</sup>, 血小板在数量上首先迅

速减少, 随后的单核细胞、巨噬细胞减少. 伴随着单核细胞、巨噬细胞围绕在已经黏附血小板胰岛细胞周围, 胰岛细胞周围黏附的血小板开始溶解, 说明了这一过程是由血小板激活的. 关于单核细胞、巨噬细胞对胰岛细胞的黏附一种解释是由lex(乳酸提取物)介导的, 由血小板表面的P选择素黏附于胰岛细胞表面<sup>[15]</sup>. 另一种解释是CD11b<sup>+</sup>淋巴细胞减少, CD11b<sup>+</sup>被纤维网所捕捉后由CD11b/CD18介导的黏附过程. 胰岛细胞移植后15-30 min, 胰岛细胞核染色加重, 周围黏连大量的CD11b<sup>+</sup><sup>[16]</sup>. 单核细胞和中性粒细胞消耗的同时, 胰岛细胞内低水平的消化酶也造成胰岛细胞的损伤. 一个70 kg的患者需要移植的胰岛细胞数量600 000 IEQ, 胰岛细胞总表面积可能达到400 cm<sup>2</sup>, 这样大的面积在低压、流速缓慢的门静脉中很容易出现凝集的现象. 为了克服这种类似炎症的损伤, 目前很多移植中心在进行同种胰岛细胞移植的时候都使用一定数量的肝素, 一般肝素的剂量为75 IE/kg, 相对应的来说, 一个70 kg的人达到肝素浓度1 IE/mL将需要5 000 IE的肝素<sup>[17]</sup>.

由于移植器官持续的表达同种异体的HLA抗原, 因而可以在移植后的任何时期诱导排斥反应. 早期很多移植中心在临床移植过程中, 没有进行HLA的配型, 除了血型相同, 少数仅有交叉配型<sup>[18]</sup>, 所以临床结果并不理想. 群体反应性抗体(PRA)是患者HLA抗原体液致敏的结果, 是造成排斥的主要危险因素<sup>[1,18-19]</sup>. 临床移植中, 对于PRA高的, 特别是>50%, 应当严格按照HLA配型, 尽量选择与受者HLA表现型完全相容的供体, 或者相容程度高且没有与受者预致敏的HLA抗体特异性所对应抗原的供体, 移植的结果将提高. 本文对照组中PRA>50%的培养后胰岛细胞比匹配组出现了更大量的死亡. 形态学的观察中, 匹配组1 h培养血细胞对胰岛细胞凝集没有明显变化, 这说明供者的HLA分子可能没有激活T细胞, 没有诱发对于胰岛细胞的毒性反应和过敏反应<sup>[18,20]</sup>. 对照组1 h观察中, 血细胞大量的凝集在胰岛细胞的周围, 淋巴毒阳性的已经出现胰岛细胞的大量死亡, 血细胞对于胰岛细胞的侵害明显高于匹配组. 不仅如此, 破坏的胰岛细胞内分泌酶释放, 也造成血细胞的破坏, 进而加速了血细胞和胰岛细胞之间的相互破坏<sup>[21]</sup>. 对照组血细胞的凝集在胰岛细胞周围可能如同血管内皮细胞缺损一样, 引起胰岛细胞周围一个类似炎症的损害, 这种损害可能比

#### ■名词解释

IEQ: 150 μm的胰岛换算值, 因为胰岛是由细胞团构成, 所以细胞团直径差距很大, 50-350 μm各个数量级胰岛细胞的分布, 参照Ricordi的换算得出不同直径胰岛细胞相当于150 μm直径胰岛细胞的数量.

### ■同行评价

胰岛移植作为治疗糖尿病并阻止糖尿病并发症的发生、发展的新方法,日益受到重视。但在胰腺的保存、胰岛的分离、纯化及移植后的活性保持等方面仍有许多未知的东西需要不断深入研究。本文选择了其中关于切除、保存及移植的并发症进行研究和探讨,内容较新,研究方法较先进,结果可信,结论恰当,具有一定的科学意义。

较轻,并不是造成胰岛细胞死亡实质损害原因。错配组不仅发生这种类似炎症的反应,而且进一步出现了细胞毒性反应或过敏反应,从而造成移植胰岛细胞的排斥反应,胰岛细胞大量的死亡<sup>[19,22]</sup>。

在胰岛移植过程中,胰岛细胞的数量和胰岛细胞的活性是非常重要的,对于60 kg人至少需要360 000个胰岛细胞<sup>[23]</sup>。埃德蒙顿的患者平均需要移植857 318个胰岛细胞<sup>[24]</sup>,从胰岛细胞的数量上每位患者需要移植至少2个胰腺的胰岛细胞,使用单一胰腺使移植获得成功成为探索的方向<sup>[25]</sup>,获得足量胰岛细胞及其存活数量将是移植成功的关键所在<sup>[26]</sup>。组织相容性对于胰岛细胞长期存活有着重要意义<sup>[27]</sup>,随着干细胞、基因学及转基因研究的深入<sup>[28-30]</sup>,也必将为解决胰岛细胞移植提供新思路、新方法。

### 4 参考文献

- Bouwman LH, Ling Z, Duinkerken G, Pipeleers DG, Roep BO. HLA incompatibility and immunogenicity of human pancreatic islet preparations cocultured with blood cells of healthy donors. *Hum Immunol* 2005; 66: 494-500
- 高宏君,徐达传,李民,范礼佩,赵明,顾新伟,陈桦. 人胰岛细胞移植中胰岛细胞活性研究. *中国临床康复杂志* 2005; 9: 85-87
- 高宏君,林民专,李民,范礼佩,赵明,蔡德鸿. 成人胰岛细胞的分离. *中华器官移植杂志* 2004; 25: 48-49
- 高宏君,林民专,李民,范礼佩,赵明,蔡德鸿. 人类胰岛细胞移植中的组织相容性关系. *广东医学杂志* 2003; 24: 1049-1051
- Murdoch TB, McGhee-Wilson D, Shapiro AM, Lakey JR. Methods of human islet culture for transplantation. *Cell Transplant* 2004; 13: 605-617
- Hesse UJ, Meyer GP, Weyer J, Schmitz-Rode M, Danis J, Tunggal B. *In situ* intraductal collagenase injection for preparation of islets of Langerhans in the pig. *Transplant Proc* 1992; 24: 1007-1009
- Rose NL, Palcic MM, Shapiro AM, Lakey JR. Endogenous pancreatic enzyme activity levels show no significant effect on human islet isolation yield. *Cell Transplant* 2004; 13: 153-160
- Carter J, Karmioli S, Nagy M, McElreath R, Calloway C, Motley A, Neill A, Jang HJ, Posselt A, Stock P. Pretransplant islet culture: a comparison of four serum-free media using a murine model of islet transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3446-3449
- Barnett MJ, McGhee-Wilson D, Shapiro AM, Lakey JR. Variation in human islet viability based on different membrane integrity stains. *Cell Transplant* 2004; 13: 481-488
- Stagner JL, Parthasarathy SN, Wyler K, Parthasarathy RN. Protection from ischemic cell death by the induction of cytoglobin. *Transplant Proc* 2005; 37: 3452-3453
- Froud T, Ricordi C, Baidal DA, Hafiz MM, Ponte G, Cure P, Pileggi A, Poggioli R, Ichii H, Khan A, Ferreira JV, Pugliese A, Esquenazi VV, Kenyon NS, Alejandro R. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant* 2005; 5: 2037-2046
- Van Deijnen JH, Van Suylichem PT, Wolters GH, Van Schilfgaarde R. Distribution of collagens type I, type III and type V in the pancreas of rat, dog, pig and man. *Cell Tissue Res* 1994; 277: 115-121
- van Suylichem PT, van Deijnen JE, Wolters GH, van Schilfgaarde R. Amount and distribution of collagen in pancreatic tissue of different species in the perspective of islet isolation procedures. *Cell Transplant* 1995; 4: 609-614
- Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ. Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood* 1998; 91: 491-499
- Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* 1997; 89: 1270-1278
- Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA, Keymeulen B, Pipeleers D, Drijfhout JW, Roep BO. Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18425-18430
- Ricordi C, Tzakis AG, Carroll PB, Zeng YJ, Rilo HL, Alejandro R, Shapiro A, Fung JJ, Demetris AJ, Mintz DH. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation* 1992; 53: 407-414
- Bennet W, Sundberg B, Groth CG, Brendel MD, Brandhorst D, Brandhorst H, Bretzel RG, Elgue G, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O. Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? *Diabetes* 1999; 48: 1907-1914
- Speiser DE, Jeannet M. Renal transplantation to sensitized patients: decreased graft survival probability associated with a positive historical cross-match. *Transpl Immunol* 1995; 3: 330-334
- White SA, Davies JE, Pollard C, Swift SM, Clayton HA, Sutton CD, Weymss-Holden S, Musto PP, Berry DP, Dennison AR. Pancreas resection and islet autotransplantation for end-stage chronic pancreatitis. *Ann Surg* 2001; 233: 423-431
- Eckhoff DE, Smyth CA, Eckstein C, Bilbao G, Young CJ, Thompson JA, Contreras JL. Suppression of the c-Jun N-terminal kinase pathway by 17beta-estradiol can preserve human islet functional mass from proinflammatory cytokine-induced destruction. *Surgery* 2003; 134: 169-179
- Sutton VR, Estella E, Li C, Chen M, Thomas HE, Kay TW, Trapani JA. A critical role for granzyme B, in addition to perforin and TNFalpha, in alloreactive CTL-induced mouse pancreatic beta cell death. *Transplantation* 2006; 81: 146-154
- Warnock GL, Rajotte RV. Critical mass of purified islets that induce normoglycemia after implantation into dogs. *Diabetes* 1988; 37: 467-470
- Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbutt GS, Kneteman NM, Bigam D, Rajotte RV, Shapiro AM.

- Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 2002; 51: 2148-2157
- 25 Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, Matsumoto I, Ihm SH, Zhang HJ, Parkey J, Hunter DW, Sutherland DE. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005; 293: 830-835
- 26 Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbutt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton Protocol. *Diabetes* 2001; 50: 710-719
- 27 Biancone L, Cantaluppi V, Romanazzi GM, Russo S, Figliolini F, Beltramo S, Scalabrino E, Deregibus MC, Romagnoli R, Franchello A, Salizzoni M, Perin PC, Ricordi C, Segoloni GP, Camussi G. Platelet-activating factor synthesis and response on pancreatic islet endothelial cells: relevance for islet transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 511-518
- 28 Roche E, Reig JA, Campos A, Paredes B, Isaac JR, Lim S, Calne RY, Soria B. Insulin-secreting cells derived from stem cells: clinical perspectives, hopes and hopes. *Transpl Immunol* 2005; 15: 113-129
- 29 Deng S, Vatamaniuk M, Lian MM, Doliba N, Wang J, Bell E, Wolf B, Raper S, Matschinsky FM, Markmann JF. Insulin gene transfer enhances the function of human islet grafts. *Diabetologia* 2003; 46: 386-393
- 30 Wang H, Lee SS, Dell'Agnello C, Tchipashvili V, D'Avilla J, Czismadia E, Chin BY, Bach FH. Bilirubin can induce tolerance to islet allografts. *Endocrinology* 2006; 147: 762-768

电编 李琪 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

## 第十届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 由解放军普通外科专业委员会主办, 南京军区福州总医院承办的“第十届全国普通外科学术会议”拟定于2006-07在福州举行. 会议采用院士论坛、专题报告等形式, 对普通外科近年来的新技术、新方法及发展趋势进行介绍和讨论. 欢迎军内外普通外科医师参加会议.

### 1 征文内容

有关普通外科疾病的诊断、治疗的基础和临床研究及护理内容.

### 2 征稿要求

(1)要求中文全文(4 000字以内)及摘要(500字以内)各1份. 稿件请寄软盘(Word 格式), 欢迎用电子邮件方式投稿. (2)来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿, 恕不退稿), 请在信封左下角注明“会议征文”字样.

来稿请寄: 邮编: 350025 福建省福州市西二球路156号 南京军区福州总医院普通外科 王烈收. 电子邮件地址: [www.fzptwk@public.fz.fj.cn](mailto:www.fzptwk@public.fz.fj.cn) 传真: 0591-83796855, 电话: 0591-24937077, 军线: 0611-97077, 959770. 联系人: 王烈.

# 溃疡性结肠炎结肠黏膜修复中HGF, c-Met, EGFR的作用

陈凡, 林琳, 张红杰, 叶晓霞, 赵伟志, 王涛, 杨希宁

## ■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)近年来在我国乃至亚洲发病率逐渐上升, 部分患者可发生溃疡性结肠炎相关性大肠癌变。UC发病机制迄今未完全阐明, 治疗棘手, 探讨生长因子在UC结肠黏膜损伤后修复重建机制, 对于开发生长因子类药物治疗UC提供一定的理论依据。

陈凡, 林琳, 张红杰, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029  
叶晓霞, 赵伟志, 马钢医院病理科 安徽省马鞍山市 243000  
王涛, 杨希宁, 马钢医院消化科 安徽省马鞍山市 243000  
陈凡, 1986年安徽医科大学学士, 2001年南京医科大学在职硕士生, 副主任医师, 主要从事炎症性肠病临床和研究工作  
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2004158  
江苏省135工程重点人才基金资助项目, No. 苏卫科教[2003]19号  
通讯作者: 林琳, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. lin9100@yahoo.com.cn  
电话: 025-83718836-6920 传真: 025-83673363  
收稿日期: 2005-12-30 接受日期: 2006-01-03

## Roles of hepatocyte growth factor, c-Met and epidermal growth factor receptor in repair of colonic mucosa from patients with ulcerative colitis

Fan Chen, Lin Lin, Hong-Jie Zhang, Xiao-Xia Ye, Wei-Zhi Zhao, Tao Wang, Xi-Ning Yang

Fan Chen, Lin Lin, Hong-Jie Zhang, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
Xiao-Xia Ye, Wei-Zhi Zhao, Department of Pathology, Magang Hospital, Ma'anshan 243000, Anhui Province, China  
Tao Wang, Xi-Ning Yang, Department of Gastroenterology, Magang Hospital, Ma'anshan 243000, Anhui Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2004158, and the Fund from "135 Project" for the Key Talents of Health and Science Education Department of Jiangsu Province, No. [2003]19

Correspondence to: Dr. Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn

Received: 2005-12-30 Accepted: 2006-01-03

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of hepatocyte growth factor (HGF), c-Met and epidermal growth factor receptor (EGFR) in colonic mucosa from patients with active or inactive ulcerative colitis and their clinical significances.

**METHODS:** Forty-two patients with ulcerative colitis were divided into 2 groups (active:  $n = 25$ ; inactive:  $n = 17$ ) according to the modified Williams Disease Activity Index (DAI). Health examinees from outpatient department

or patients hospitalized for irritable bowel syndrome were selected as controls. All colonic mucosa specimens were obtained from colonoscopic examination. SABC immunohistochemistry was used to evaluate the expression of hepatocyte growth factor and c-Met, and SP immunohistochemistry was used to evaluate the expression of epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen.

**RESULTS:** In control group, active and inactive ulcerative colitis group, the positive rates of HGF expression were 25%, 88% and 100%, respectively, and those of c-Met expression were 25%, 92% and 100%, respectively. There were significant differences among the above three groups (HGF:  $\chi^2 = 62.84, P < 0.01$ ; c-Met:  $\chi^2 = 62.34, P < 0.01$ ). The expression of EGFR in control group, active and inactive ulcerative colitis group were 25%, 92% and 100%, respectively, and those of PCNA were 0, 36%, and 100%, respectively. There also existed significant differences among the above three groups ( $\chi^2 = 54.34, P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 67.50, P < 0.01$ ). In addition, the expression of HGF, c-Met and EGFR in ulcerative colitis were significantly correlated with the over-expression of PCNA ( $r = 0.648, P < 0.01$ ;  $r = 0.645, P < 0.01$ ;  $r = 0.565, P < 0.01$ , respectively).

**CONCLUSION:** HGF, c-Met and EGFR may be involved in the repair process of inflamed mucosa in ulcerative colitis.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Hepatocyte growth factor; c-Met; Epidermal growth factor receptor; Proliferating cell nuclear antigen

Chen F, Lin L, Zhang HJ, Ye XX, Zhao WZ, Wang T, Yang XN. Roles of hepatocyte growth factor, c-Met and epidermal growth factor receptor in repair of colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):594-599

## 摘要

**目的:** 观察并分析肝细胞生长因子(HGF)及其受体c-Met与表皮生长因子受体(EGFR)在溃疡性结肠炎(UC)活动和非活动阶段患者结肠黏膜的表达情况, 探讨其表达的临床意义。

**方法:** 根据改良Williams 疾病活动指数(DAI)将42例UC患者分为活动期( $n = 25$ )和非活动期( $n = 17$ )2组, 对照组( $n = 20$ )为门诊健康体检者或肠易激综合征患者. 结肠镜下活检各组患者结肠黏膜组织, 采用免疫组化SABC法检测各组患者结肠黏膜HGF及c-Met表达; SP法检测EGFR及增殖细胞核抗原(PCNA)表达.

**结果:** 对照组、活动期UC患者、非活动期UC患者HGF阳性表达率分别为22%, 88%, 100%( $\chi^2 = 62.84, P < 0.01$ ); c-Met阳性表达率分别为25%, 92%, 100%( $\chi^2 = 62.34, P < 0.01$ ); EGFR阳性表达率分别为25%, 92%, 100%( $\chi^2 = 54.34, P < 0.01$ ); PCNA过表达率分别为0, 36%, 100%( $\chi^2 = 67.50, P < 0.01$ ), 组间比较差异显著. HGF, c-Met和EGFR在UC患者结肠黏膜表达与PCNA过表达正相关( $r = 0.648, 0.645, 0.565, P < 0.01$ ).

**结论:** HGF, c-Met, EGFR及PCNA在非活动期UC患者结肠黏膜中的表达较活动期UC患者和对照组明显增加. HGF及其受体c-Met与EGFR在UC患者结肠炎症黏膜修复过程中可能起一定作用.

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 肝细胞生长因子; c-Met; 表皮生长因子受体; 增殖细胞核抗原

陈凡, 林琳, 张红杰, 叶晓霞, 赵伟志, 王涛, 杨希宁. 溃疡性结肠炎结肠黏膜修复中HGF, c-Met, EGFR的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14(6): 594-599

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/594.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)确切发病机制迄今未完全阐明, 可能与黏膜上皮免疫反应异常以及黏膜损伤后保护重建功能失调有关. 关于UC结肠黏膜修复机制鲜有报道. 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)能促进各种上皮细胞增殖, 包括胃肠道上皮细胞的重建<sup>[1-4]</sup>, HGF受体是原癌基因c-Met编码的酪氨酸激酶. 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是原癌基因erbB1编码的蛋白产物, 其配体表表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及转化生长因子- $\alpha$ (transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ )等与EGFR结合, 使其磷酸化激活, 调节细胞的分裂、分化和增殖<sup>[5]</sup>. 研究发现UC患者结肠炎症黏膜HGF, c-Met基因表达增强<sup>[6]</sup>, EGFR表达亦增强<sup>[7]</sup>, 增殖细胞核抗原

(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)反映细胞的增殖活性<sup>[8]</sup>, 我们用免疫组织化学方法检测溃疡性结肠炎活动阶段和非活动阶段患者及对照组结肠黏膜组织中HGF, c-Met, EGFR, PCNA的表达, 分析UC结肠黏膜组织中HGF, c-Met, EGFR的表达与PCNA表达的相关性, 探讨这两种生长因子与受体在UC结肠炎症黏膜修复中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2001-05/2005-05在马钢医院消化科住院符合2000年成都会议溃疡性结肠炎诊断标准<sup>[9]</sup>, 经电子结肠镜检查全部结肠并于结肠病变处活检, 病理学确诊的UC患者42例, 男31例, 女11例, 平均年龄 $42.3 \pm 15.7$ 岁. 平均病程 $18.5 \pm 37.9$  mo. 病变累及全结肠21例, 左半结肠5例, 直乙结肠9例, 直肠7例. 对照组(健康体检或肠易激综合征患者)20例, 男12例, 女8例, 平均年龄 $48.6 \pm 15.2$ 岁. 根据改良Williams疾病活动指数(diseased activity index, DAI)<sup>[10]</sup>将UC患者分为活动期和非活动期2组, 大于9分为活动期, 小于或等于8分为非活动期, 分组后活动阶段患者25例, 非活动阶段患者17例. 对照组与UC组患者的性别构成、平均年龄比较无统计学意义, 2组资料具有可比性.

**1.2 方法** 电子结肠镜下UC组在结直肠黏膜炎症最明显处, 对照组在直乙交界处取肠黏膜组织2-3块, 以40 g/L甲醛固定, 送病理检查. 常规石蜡包埋, 每块组织均作连续4  $\mu$ m厚切片, 经HE染色再次确诊. HGF及c-Met检测采用免疫组化SABC法, HGF及c-Met一抗工作液浓度为1 : 100, DAB显色, 阳性对照用已知HGF及c-Met阳性的肝癌组织切片, 用PBS代替一抗作为阴性对照. 兔抗人HGF、c-Met多克隆抗体、SABC试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司. 严格按照试剂盒说明书操作. EGFR和PCNA检测采用免疫组化SP法, DAB显色, 阳性对照用已知EGFR及PCNA阳性的鳞癌组织切片, 用PBS代替一抗作为阴性对照. 即用型鼠抗人EGFR、PCNA mAb、SP试剂盒、DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司. 严格按试剂盒说明书操作. 阳性反应物呈棕黄色颗粒, HGF, c-Met及EGFR免疫阳性反应位于胞质及胞膜; PCNA免疫阳性反应位于胞核. 每张切片随机选取5个高倍镜视野, 盲法观察计数阳性反应的上皮细胞. HGF, c-Met或EGFR阳性

## ■ 相关报道

- 1 Kitamura S, Kondo S, Shinom-ura Y, Isozaki-K, Kanayama-S, Higashimoto Y, Minami T, Kiyohara T, Ya-sunaga Y, Ishi-kawa H, Ohtani T, Ishiguro S, Matsuzawa Y. Expression of hepatocyte growth factor and cmet in ulcerative colitis. *InflammRes* 2000; 49: 320-324
- 2 Hoffmann P, Reinshagen M, Zeeh JM, Laksh-manan J, Wu VS, Goebell, Gerken G, Eysselein VE. Increased expression of epidermal growth factor-receptor in an experimental model of colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1174-1180

### ■创新盘点

相关文章多为用外源性生长因子治疗UC, 本文将确诊的UC患者分为结肠黏膜炎症活动期和非活动期2组, 检测结肠黏膜HGF, c-Met, EGFR的阳性表达差异, 了解内源性生长因子及受体在UC结肠黏膜炎症修复中的作用。

表 1 结肠黏膜HGF, c-Met, EGFR免疫组化表达

分组	n	HGF				c-Met				EGFR			
		阴性	阳性	强阳性	阳性率 (%)	阴性	阳性	强阳性	阳性率 (%)	阴性	阳性	强阳性	阳性率 (%)
对照组	20	15	4	0	20	15	5	0	25	15	5	0	25
活动期	25	3	19	3	88 <sup>b</sup>	2	20	3	92 <sup>b</sup>	2	21	2	92 <sup>b</sup>
非活动期	17	0	3	14	100 <sup>b</sup>	0	3	14	100	0	8	9	100

<sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组, 非活动期UC组。

表 2 结肠黏膜PCNA免疫组化表达

分组	n	I	II	III	IV	过表达率 (%)
对照组	20	16	4	0	0	0
活动期UC	25	1	15	8	1	36 <sup>b</sup>
非活动期UC	17	0	0	11	6	100

<sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组, 非活动期UC组。

表 3 HGF, c-Met, EGFR阳性表达与PCNA过表达相关性

	r 值	P 值
HGF	0.648	<0.01
c-Met	0.645	<0.01
EGFR	0.565	<0.01

细胞数/所有上皮细胞数 $\leq$ 5%时记为0,  $\leq$ 50%为1,  $>$ 50%为2; 根据染色强度记为不着色0, 黄色为1, 棕色为2; 两者相加: 0-1为阴性、2-3为阳性、4为强阳性。PCNA阳性核染色细胞数/所有上皮细胞数 $\leq$ 25%时为I级, 26%-50%为II级, 51%-75%为III级,  $\geq$ 76%为IV级, III级和IV级为PCNA过表达。

**统计学处理** 所有数据用SPSS 13统计软件分析, HGF, c-Met, EGFR, PCNA在对照组、活动期UC患者和非活动期UC患者结肠黏膜组织表达阳性率之间比较用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确概率计算法检验; 等级资料分析: 2组之间的比较用非参数检验中Kruskal-Wallis检验, 3组间等级资料之间的比较用非参数检验中Mann-Whitney检验, HGF, c-Met, EGFR, PCNA在UC结肠黏膜组织中表达的相关性用相关性检验中Spearman进行分析, 检验水准 $P\leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 结肠黏膜组织HGF, c-Met, EGFR表达** 对照组HGF, c-Met, EGFR阳性表达频率为4/20, 5/20, 5/20; 活动期UC患者结肠黏膜组织中HGF, c-Met, EGFR阳性表达频率为22/25, 23/25,

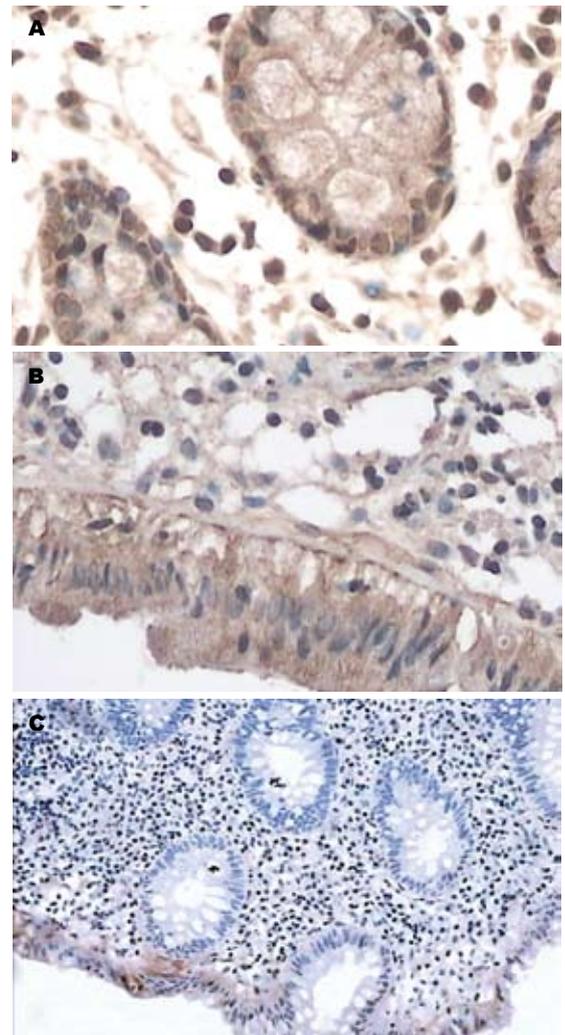


图 1 溃疡性结肠炎非活动阶段结肠黏膜组织中HGF, c-Met, EGFR的表达。A: HGF; B: c-Met; C: EGFR。

23/25; 非活动期UC结肠黏膜组织中HGF, c-Met, EGFR全部表达为阳性。对照组、活动期UC组、非活动期UC组HGF, c-Met, EGFR阳性表达率逐渐上升, 组间比较差异显著( $P<0.01$ , 表1, 图1)

**2.2 结肠黏膜组织PCNA的表达** 对照组结肠黏膜增殖活性最低, 16例PCNA表达I级; 活动期UC结肠黏膜增殖活性增强, PCNA过表达频率为9/25; 非活动期UC结肠黏膜组织PCNA全部为过表达。对照组、活动期UC患者、非活动期UC患

者结肠黏膜组织PCNA过表达率依次上升, 组间比较差异显著( $P < 0.01$ , 表2).

2.3 HGF, c-Met, EGFR表达强度与PCNA过表达相关性 HGF, c-Met, EGFR表达强度与PCNA过表达密切相关( $P < 0.01$ , 表3).

### 3 讨论

UC的特征是黏膜上皮的损伤和破坏导致细菌及食物抗原直接侵入黏膜的免疫系统引起炎症反应<sup>[11]</sup>, 结肠黏膜炎症持续活动以及黏膜修复功能失调, 是造成UC治疗困难的主要原因. 生长因子及其受体在细胞增殖、运动、损伤修复、细胞外基质形成、溃疡愈合及免疫调节等方面起重要作用. 正常情况下, 胃肠道表面细胞脱落造成的细胞缺失由细胞的不断更新而达到动态平衡, 这种动态平衡与生长因子的作用有关. HGF可刺激胃肠道上皮细胞增殖, 促进胃肠道黏膜损伤的愈合<sup>[1,12,13]</sup>. 本研究结果显示活动期UC患者结肠黏膜组织HGF及其受体c-Met表达较对照组增高, 非活动期UC患者结肠黏膜组织较活动期UC患者结肠黏膜组织表达亦增高, 提示HGF、c-Met可能参与UC结肠炎症黏膜的修复. Oh *et al*<sup>[14]</sup>用人HGF cDNA转染实验性结肠炎大鼠后诱导出肠道c-Met酪氨酸磷酸化, 抑制凋亡, 促进肠上皮细胞有丝分裂和重建功能, 表明HGF通过与受体c-Met结合发挥作用; HGF cDNA转染还明显抑制Th1细胞因子mRNA的表达, 如IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ 等, 调节促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡. Ortega-Cava *et al*<sup>[15]</sup>研究发现用5%DSS饲养大鼠7 d, 大鼠出现腹泻、血便、体质量下降等严重的大肠炎症状, 停止DSS喂养后大肠炎症状逐渐减轻, HGF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Cox-2的表达明显增加, 并伴随结肠增殖上皮细胞数目增加, 由此得出结论: 促炎细胞因子和Cox-2可能启动结肠炎症黏膜中HGF基因表达, 通过增加HGF的产生, 在UC炎症黏膜修复中起作用.

促炎细胞因子IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 在UC结肠炎症黏膜表达增加<sup>[16-17]</sup>, IL-1, TNF- $\alpha$ 能刺激纤维原细胞产生HGF<sup>[18]</sup>, HGF mRNA在UC患者结肠黏膜的水平与结肠黏膜中炎症细胞特别是中性粒细胞浸润程度相关<sup>[6]</sup>; 离体实验中, c-Met基因表达由IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 等上调<sup>[19]</sup>, 表明UC结肠炎症黏膜中HGF基因及c-Met基因表达是由炎症因子介导并启动的. 重组人HGF静脉注射或腹腔灌注治疗大鼠实验性UC, 均可加速

结肠黏膜c-Met酪氨酸磷酸化作用, 结肠上皮细胞重建加快, 减轻炎症细胞浸润, 减轻症状及黏膜损伤, PCNA免疫染色证实结肠上皮细胞增殖明显增强<sup>[20-21]</sup>. HGF-Met系统可加快结肠黏膜的修复, 尽快恢复结肠上皮屏障功能, 减少黏膜上皮接触肠腔内造成炎症持续的各种抗原, 减轻炎症反应而起到治疗作用.

Babyatsky *et al*<sup>[22]</sup>发现TGF- $\alpha$ 在非活动期UC患者结肠黏膜中表达较活动期UC患者及对照组增高2-3倍, 且随病程的延长表达增加. EGF可促进UC溃疡修复<sup>[23-24]</sup>. EGF和TGF- $\alpha$ 需要与他们共同的受体EGFR结合, 激活EGFR发挥作用. 研究显示UC结肠黏膜损伤的早期阶段EGFR表达即增加, 支持EGF、TGF- $\alpha$ 和EGFR在结肠黏膜保护及修复过程中起重要作用这一观点<sup>[7]</sup>. 本研究显示活动阶段UC患者结肠黏膜EGFR表达比对照组增高, 非活动阶段UC患者结肠黏膜EGFR表达比活动阶段UC增高, 与上述文献结论一致, 提示EGFR在UC结肠炎症黏膜修复过程中起一定作用. 近来研究发现EGFR可激活肠黏膜上皮细胞的离子通道, 促进钠离子的吸收, 减轻UC的腹泻症状<sup>[25]</sup>. PCNA反映细胞的增殖活性. 本研究显示PCNA在UC患者活动阶段的结肠组织中表达增加, 而在UC非活动阶段较活动阶段结肠组织中表达明显增强, 证实结肠黏膜上皮细胞增殖可促进结肠黏膜损伤的修复. 本实验还显示: HGF, c-Met和EGFR阳性表达强度与PCNA过表达明显正相关, 表明生长因子及其受体的酪氨酸磷酸化作用有助于结肠上皮增殖及黏膜修复.

慢性持续型溃疡性结肠炎病程中, 活动性炎症往往持续存在, 结肠黏膜的损伤和修复不断重复进行, 增加发生结肠癌的风险<sup>[26-28]</sup>. Kitamura *et al*<sup>[6]</sup>证实UC患者结肠炎症部位的黏膜HGF及c-Met表达增加, 而发生在UC基础上的结肠癌病变部位c-Met过表达, 提示c-Met在UC病人结肠炎症组织中, 可能兼有炎症黏膜修复和发生结直肠癌的双重作用.

Malecka-Panas *et al*<sup>[29]</sup>研究缓解期UC、腺瘤型结肠息肉及结肠腺癌3组患者以及对照组结肠黏膜PCNA指数及EGFR酪氨酸激酶活性时发现前两组患者表达比对照组增高, 在结肠腺癌表达更明显增高, 表明EGFR酪氨酸激酶的磷酸化作用可能是了解结肠黏膜癌变倾向的一个早期信号. EGFR受体信号通路不仅促进细胞增殖, 且抑制细胞凋亡, 在损伤修复和癌症发生机制中均起一定的作用<sup>[30]</sup>.

### ■应用要点

进一步分析研究UC相关性大肠癌患者结肠黏膜HGF, c-Met, EGFR表达, 找出HGF/c-Met系统和EGFR在UC结肠黏膜损伤修复与结肠上皮细胞恶性转化之间的关系及机制, 结合结肠镜随访, 可能早期发现和干预UC相关性结直肠癌的发生.

### ■名词解释

UC相关性大肠癌: 是UC严重并发症, 指发生在慢性反复发作为UC基础上的结直肠癌变, 发病机制不同于散发性结直肠癌。

由此可见, 适当的HGF/c-Met系统和EGFR表达在UC结肠黏膜组织损伤修复中起关键作用, 过度不恰当的表达可能在细胞的恶性转化中起作用, 促进溃疡性结肠炎相关性结直肠癌的发生。溃疡性结肠炎是一种慢性炎症性疾病, 也是公认的癌前病变; 炎症反复发作, 结肠黏膜不断破坏和修复, 可能导致HGF/c-Met和erbB1基因突变及表达产物的积聚<sup>[6,31]</sup>, 上皮细胞出现无限制增殖并向恶性细胞转化发生癌变, 其病理机制未完全阐明。

临床上常用结肠镜监控慢性溃疡性结肠炎相关性结直肠癌变的发生, 需要长期定期检查, 患者依从性较差。我们设想若能找出HGF/c-Met系统和EGFR在溃疡性结肠炎结肠黏膜损伤修复与结肠上皮细胞恶性转化之间的关系及机制, 结合结肠镜随访, 可能早期发现和干预溃疡性结肠炎相关性结直肠癌变的发生, 值得进一步研究。

### 4 参考文献

- 1 Kuenzler KA, Pearson PY, Schwartz MZ. Hepatocyte growth factor pretreatment reduces apoptosis and mucosal damage after intestinal ischemiareperfusion. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 1093-1097;
- 2 Hanawa T, Suzuki K, Kawauchi Y, Takamura M, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Asakura H, Miyazaki JI, Maruyama H, Aoyagi Y. Attenuation of mouse acute colitis by naked hepatocyte growth factor gene transfer into the liver. *J Gene Med* 2006;
- 3 Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci* 1999; 4: D303-D309
- 4 Ido A, Numata M, Kodama M, Tsubouchi H. Mucosal repair and growth factors: recombinant human hepatocyte growth factor as an innovative therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2005; 40: 925-931
- 5 Sutter AP, Hopfner M, Huether A, Maaser K, Scherubl H. Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (Tarcevatrade mark) for the treatment of esophageal cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 1814-1822
- 6 Kitamura S, Kondo S, Shinomura Y, Isozaki K, Kanayama S, Higashimoto Y, Minami T, Kiyohara T, Yasunaga Y, Ishikawa H, Ohtani T, Ishiguro S, Matsuzawa Y. Expression of hepatocyte growth factor and c-met in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2000; 49: 320-324
- 7 Hoffmann P, Reinshagen M, Zeeh JM, Lakshmanan J, Wu VS, Goebell H, Gerken G, Eysselein VE. Increased expression of epidermal growth factor-receptor in an experimental model of colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1174-1180
- 8 Furihata T, Kawamata H, Kubota K, Fujimori T. Evaluation of the malignant potential of aberrant crypt foci by immunohistochemical staining for beta-catenin in inflammation-induced rat colon carcinogenesis. *Int J Mol Med* 2002; 9: 353-358

- 9 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. *中华消化杂志* 2001; 21: 236-239
- 10 谢艳, 魏兵, 欧阳钦. 疾病活动指数在炎症性肠病诊治中的应用. *中华消化杂志* 2001; 21: 559-560
- 11 何青雯, 陈耀明, 贾友兰, 李晓燕, 蒋海燕. 免疫复合物对溃疡性结肠炎的致病作用. *华人消化杂志* 1998; 6: 87
- 12 Mukoyama T, Kanbe T, Murai R, Murawaki Y, Shimomura T, Hashiguchi K, Saeki T, Ichiba M, Yoshida Y, Tanabe N, Kurimasa A, Harada K, Yashima K, Hisatome I, Ito H, Murawaki Y, Shiota G. Therapeutic effect of adenoviral-mediated hepatocyte growth factor gene administration on TNBS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 1217-1224
- 13 Kuroiwa T, Kakishita E, Hamano T, Kataoka Y, Seto Y, Iwata N, Kaneda Y, Matsumoto K, Nakamura T, Ueki T, Fujimoto J, Iwasaki T. Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *J Clin Invest* 2001; 107: 1365-1373
- 14 Oh K, Iimuro Y, Takeuchi M, Kaneda Y, Iwasaki T, Terada N, Matsumoto T, Nakanishi K, Fujimoto J. Ameliorating effect of hepatocyte growth factor on inflammatory bowel disease in a murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G729-G735
- 15 Ortega-Cava CF, Ishihara S, Kawashima K, Rumi MA, Kazumori H, Adachi K, Kinoshita Y. Hepatocyte growth factor expression in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2275-2285
- 16 Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* 2002; 441: 500-513
- 17 Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H. Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 647-654
- 18 Tamura M, Arakaki N, Tsubouchi H, Takada H, Daikuhara Y. Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 alpha and -1 beta and tumor necrosis factor alpha by fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 1993; 268: 8140-8145
- 19 Moghul A, Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y, Zarnegar R. Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* 1994; 9: 2045-2052
- 20 Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 146-151
- 21 Numata M, Ido A, Moriuchi A, Kim I, Tahara Y, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Miyata Y, Uto H, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor facilitates the repair of large colonic ulcers in 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 551-558
- 22 Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996; 110: 975-984

- 23 Sinha A, Nightingale J, West KP, Berlanga-Acosta J, Playford RJ. Epidermal growth factor enemas with oral mesalamine for mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis or proctitis. *N Engl J Med* 2003; 349: 350-357
- 24 Castagliuolo I, Mortheau O, Keates AC, Valenick L, Wang CC, Zacks J, Lu B, Gerard NP, Pothoulakis C. Protective effects of neurokinin-1 receptor during colitis in mice: role of the epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 271-279
- 25 McCole DF, Rogler G, Varki N, Barrett KE. Epidermal growth factor partially restores colonic ion transport responses in mouse models of chronic colitis. *Gastroenterology* 2005; 129: 591-608
- 26 Watanabe T, Nagawa H. Epidemiology of ulcerative colitis-comparison between Japan and western countries. *Nippon Rinsho* 2005; 63: 750-756
- 27 Chambers WM, Warren BF, Jewell DP, Mortensen NJ. Cancer surveillance in ulcerative colitis. *Br J Surg* 2005; 92: 928-936
- 28 Rosman-Urbach M, Niv Y, Birk Y, Morgenstern S, Schwartz B. Relationship between nutritional habits adopted by ulcerative colitis relevant to cancer development patients at clinical remission stages and molecular-genetic parameters. *Br J Nutr* 2006; 95: 188-195
- 29 Malecka-Panas E, Kordek R, Biernat W, Tureaud J, Liberski PP, Majumdar AP. Differential activation of total and EGF receptor (EGF-R) tyrosine kinase (tyr-k) in the rectal mucosa in patients with adenomatous polyps, ulcerative colitis and colon cancer. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 435-440
- 30 McKinnon C. Epidermal growth factor receptor targeting. *IDrugs* 1999; 2: 633-635
- 31 Trzcinski R, Bry M, Krajewska W, Kulig M, Dzyiki A. ErbB-1 expression in experimental model of inflammatory bowel disease in rats. *Acta Chir Iugosl* 2004; 51: 85-89

#### ■同行评价

HGF, c-Met, EGFR在UC结肠黏膜修复中的作用已有类似报道, 本文通过观察上述指标UC活动和非活动阶段患者结肠黏膜的表达差异, 提出内源性生长因子及受体在UC结肠炎症修复中具有一定的作用和临床意义, 有一定参考价值。

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

## 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会 暨第三届全国普通外科主任论坛通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

在各方面的大力支持下, 国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会已于2004-12在武汉成功举办, 与会代表一千余人, 中国人大副委员长吴阶平院士、国际肝胆胰前主席刘允怡教授、Jim Tooli教授, 国际肝胆胰协会候任主席Büechler教授和欧洲肝胆胰协会主席Broelsch教授等亲自到会。会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏, 并受到国际肝胆胰协会的通报好评, 会议取得巨大成功。

第二届会议将邀请国外和国内著名专家做专题讲座, 针对国际国内肝胆胰外科进展及近年来的热点、难点问题进行讨论; 并交流诊治经验, 推广新理论、新技术、新方法, 了解国内外肝胆胰疾病诊断、治疗发展趋势; 同时放映手术录像。大会热烈欢迎全国各地肝胆胰领域的内科、外科、影像科各级医师以及科研人员积极投稿和报名参加。

会议同时召开第三届全国普外科主任论坛, 因此也欢迎从事医疗卫生管理的各级医院正、副院长及正、副主任积极投稿和报名参加。

本次会议已列入2006年国家继续医学教育项目, 参会代表均授予国家级继续医学教育学分10分。

来稿要求: 寄全文及500-800字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件。以附件的形式发送至 chenxp@medmail.com.cn, 也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道1095号, 武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收), 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599。

# 肝脏移植耐受及其抗原递呈细胞相关作用的研究进展

汪艳, 高毅

## ■背景资料

肝脏特有的免疫学特性表现在其生理和病理过程的各个方面, 已成为肝脏学研究一个新的分支和热点. 本文主要侧重于对肝脏的耐受调节作用, 尤其是在移植医学中表现的免疫调节作用进行介绍, 并以肝脏抗原递呈细胞为主, 对肝脏免疫耐受调节作用的机制研究进展, 以及其中尚存在的问题进行论述.

汪艳, 高毅, 南方医科大学珠江医院普外科 广东省广州市 510282

广东省自然科学基金重点资助项目, No. 037055

通讯作者: 高毅, 510282, 广东省广州市, 南方医科大学珠江医院普外科, gaoyi6146@163.com

电话: 020-61643210

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2006-02-11

## 摘要

免疫排斥反应是移植器官组织最终能否成活的最大障碍. 解决此问题最理想的方法是诱导特异性免疫耐受. 肝脏除了有代谢消化功能外, 还能够处理外来抗原并诱导机体对其产生特异性免疫耐受反应, 尤其是在移植耐受中表现出了独特作用. 目前相关机制研究发现, 除了特殊的微环境外, 肝脏还拥有大量的驻留和非驻留型抗原提呈细胞参与内部免疫反应. 肝脏抗原递呈细胞在移植耐受诱导过程中占有重要地位.

**关键词:** 肝脏; 抗原递呈细胞; 移植耐受

汪艳, 高毅. 肝脏移植耐受及其抗原递呈细胞相关作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(6):600-606

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/600.asp>

## 0 引言

器官移植是目前解决肾脏、肝脏、心脏以及肺脏等器官终末期疾病的主要治疗手段之一. 历经50 a的发展, 移植外科技术和现代免疫抑制药物治疗都取得了重大的发展, 由于急性排斥反应的发生而造成器官丢失的情况已明显减少. 但是人们对于慢性排斥反应的控制还是显得无能为力. 术后, 移植器官会逐渐因慢性排斥反应性血管病变, 以及免疫抑制剂长期使用引起的毒性反应和心血管疾病等原因而进入终末期状态, 宿主将面临再次移植甚至死亡. 耐受是相对于排斥的另一免疫学现象, 他是指免疫系统对某抗原发生特异性的不反应. 目前移植医学中免疫耐受的概念为: 在缺乏外源性免疫抑制的情况下移植物被受体接受而长期存活<sup>[1]</sup>. 如果能建立受体对移植物的免疫耐受, 以上问题就会得以解决: 他可以阻止排斥反应的发生, 进而可

以减少免疫抑制药物的使用, 避免药物毒性作用; 他不影响受体免疫系统对其他抗原产生正常反应, 这样可以避免继发感染和肿瘤的发生等. 因此, 解决移植排斥问题, 建立受体对移植物的免疫耐受是理想的、也是最终必行的治疗方向.

## 1 诱导免疫耐受的现有方案

诱导免疫耐受, 即通过某种方式重新调整机体免疫系统, 使受体免疫系统对移植物抗体特异性不识别. 根据理论依据的不同可分为两大类方式: 一类是根据中央耐受理论设计的诱导方式, 其中最为广泛研究的是利用供体骨髓移植制造嵌合状态以获得供体器官耐受<sup>[2]</sup>. 基于此设想和动物实验基础, 国内外开展了骨髓联合其他器官移植的临床研究, 诱导结果报道不一, 其中情况包括同时获得嵌合与耐受<sup>[3]</sup>, 获得嵌合但未同时获得耐受<sup>[4]</sup>, 获得耐受但未获得持续稳定的嵌合<sup>[5]</sup>, 以及两者都未获得<sup>[6]</sup>. 其直接原因可能与各研究单位采用不同具体方案有关<sup>[7]</sup>. 而且, 这种诱导形式对于迄今仍占移植器官大多数来源的尸体供器官不适用. 另一类是外周耐受诱导方案, 其中研究较广泛的是阻断T细胞抗原识别共刺激信号<sup>[8]</sup>, 此类研究在动物实验中获得了延长移植物存活时间的效果. 但由于针对主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)这类有着极丰富遗传多样性的抗原, 人体T细胞中有相当高比例(约0.1%-10%)的克隆<sup>[9]</sup>能够迅速发生识别并激活, 产生一系列复杂的免疫反应, 显而易见仅阻断其中几个共刺激通路不能完全解决临床移植耐受的问题. 所以, 在临床实验中, 他必须选择性与免疫抑制剂联合使用以控制排斥反应; 其他方案还有体内诱导扩增调节性T细胞<sup>[10]</sup>, 树突状细胞诱导耐受<sup>[11]</sup>等, 目前研究仅在啮齿类动物实验取得进展, 大动物乃至临床实验的安全性和有效性还有待观察. 总之, 由于问题本身的复杂性以及来自研究具体方式的多变性等种种原因, 至今所取得的进展尚不如人们预想中的顺利.

## 2 肝脏特有的免疫耐受现象

2.1 肝脏对生理抗原表现出耐受现象 事实上, 接触大量外来抗原的情况在体内的正常生理状态下也是始终存在的. 针对这些外来抗原的耐受现象集中特异地表现于肝脏. 已知, 来自消化道的血液中有大量的异源性物质, 包括大分子多肽、多糖以及由寄居于消化道的细菌微生物产生的可以引起炎症反应的各种毒素代谢物. 而肝脏在血循环中的位置特殊: 就人体来说, 每日有超过2 000 L血流经肝固有动脉和门静脉双重血供通过肝脏, 其中包括了几乎全部的来自消化道的血液; 外周血白细胞每日经过肝脏的次数平均超过300次. 这些基本生理数据表明了, 肝脏是机体免疫系统直接与外来抗原性物质发生密切接触的特殊部位. 理论上认为, 肝脏内部以及全身都会发生严重的持续的免疫反应. 但事实并非如此, 在正常生理状况下, 肝脏并不会对此发生炎症反应, 整个机体的免疫系统对其内部流经的抗原性物质也“视而不见”, 即表现为肝脏诱导机体对这些抗原性物质产生了免疫耐受.

2.2 肝脏在移植免疫中表现的耐受现象 肝脏不仅可以诱导对外来抗原的免疫耐受, 大量研究表明, 肝脏在移植耐受方面也表现了特殊的作用. 1965年Garnier *et al*<sup>[12]</sup>首次发现, 在未使用免疫抑制剂的情况下, 远系遗传关系的猪之间进行肝移植, 一些移植物可以长期存活. 该现象随后被广泛证明<sup>[13-15]</sup>. 这些研究还发现, 接受了供体肝的受体可明显延长原供体其他移植物, 如小肠、皮肤的存活时间, 但对于来自第三者的其他移植物仍有明显排斥作用, 表明肝脏有诱导受体对供体抗原产生特异性免疫耐受的能力. 该现象同样出现在大鼠<sup>[16-17]</sup>和小鼠<sup>[18]</sup>肝移植实验研究中.

人类器官移植治疗也有类似情况. 相对于肾脏、心脏等其他移植器官, 虽然都需要使用免疫抑制剂, 但肝脏表现出明显的免疫调节作用. 如目前已共知的, HLA配型相合情况并不是影响移植肝脏长期存活的主要决定因素<sup>[19]</sup>; ABO血型不合常常会加速对移植肾脏和心脏排斥反应, 而在肝脏移植中却很难见到<sup>[20]</sup>; 移植肝脏通常对体液免疫排斥反应有抵抗力. 因此, 较肾移植中, 由于受者体内已有抗供者的移植物抗体存在而造成超急性排斥反应的情况, 在肝移植则很少发生<sup>[19]</sup>; 肝移植因慢性排斥反应造成移植物丢失的情况也较其他器官为少<sup>[21]</sup>; 肝

移植患者停用免疫抑制剂后长期存活的文献报道相对较丰富全面<sup>[22]</sup>.

与肝脏有关的耐受现象不仅表现于肝脏移植中免疫排斥反应低以及出现供体特异性免疫耐受, 人们还发现, 预先经门静脉给予供体脾细胞, 或者将移植器官灌流血管引流至门脉系统, 可以减轻受体对同种异基因移植入皮肤、肝脏、小肠等的排斥反应, 延长存活时间, 甚至诱导免疫耐受<sup>[23]</sup>. 这些研究的基本思路是利用肝脏的特殊免疫学作用, 通过门静脉通路, 诱导供体特异性免疫耐受. 该模型与其他模拟机体自我免疫耐受机制的模型相比, 显然具有简单可行、效果确切明显、更接近机体生理特点等优势.

那么, 肝脏的免疫学特性有什么作用基础, 他诱导机体对非自我抗原产生耐受的机制是什么? 作为供体时, 他诱导机体对其产生耐受的机制又是什么? 关键环节在哪里? 如何利用其特点更高效地诱导耐受? 对以上问题的深入探讨不仅对于肝脏移植研究本身有重要意义, 而且对解决如何控制排斥反应建立免疫耐受, 都可能会提供重要的新思路和新策略.

## 3 肝脏抗原递呈细胞可以作为其耐受现象研究的着眼点之一

经由肝脏出现的耐受现象显示肝脏必然存在关键的内部免疫调节机制. 关于肝脏组成的细胞学研究揭示了肝脏特殊免疫学特性的基础. Kita *et al*<sup>[24]</sup>报道, 肝脏中占细胞总数70%-80%的肝细胞组成了肝实质, 肝脏非实质细胞占20%-30%. 非实质细胞的组成分别为: 淋巴细胞25%, 枯否氏细胞(kupffer cell, KC)接近20%, 肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSEC)50%, 胆管细胞5%, 其他还有少量肝星形细胞、树突状细胞(dendritic cell, DC)等. 对于其中免疫细胞的研究还发现, 各类细胞及其亚型的比例都与外周血中的情况有很大的差异<sup>[24-25]</sup>. 目前研究<sup>[26-27]</sup>认为: 除了胆管细胞, 其余细胞群几乎都有明确免疫学功能, 而且有可能参与免疫耐受的诱导作用.

其中, 肝脏抗原递呈细胞(liver antigen-presenting cell, LAPC)可以作为着重研究的对象. 这是因为: (1)现代免疫学认为, 特异性免疫应答反应首先需要发生抗原识别过程: 抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC)先对抗原进行吞噬处理和递呈形成MHC-抗原肽复合物, 再与表面具有特异性识别受体的同源淋巴细胞接触. 在此过程中, APC和淋巴细胞之间以双信号系统接

### ■ 研发前沿

本文涉及研究领域的热点问题为: 在不同生理病理状态下, 肝脏特殊免疫表现的内在调节机制. 其中又包括抗原递呈细胞的作用机制、T、B、NK等细胞的作用机制、肝脏微环境对其特殊免疫作用表现的影响等.

### ■创新盘点

本文的特点在于:以客观全面的角度向读者展示肝脏抗原递呈细胞在耐受作用机制研究中的最新研究观点,阅读本文可以使读者对该方面的研究有较综合的认识;考虑信息量大,本文精心选择了参考文献,使对某研究点有兴趣的读者可在其中获得准确线索。

触识别,组成所谓“免疫突触”;再加上他们共同分泌的其他信号接触,接触时间以及周围细胞因子微环境等因素,最终决定了淋巴细胞将来对抗原特异性识别反应的质量和力度<sup>[28]</sup>,也即形成免疫应答或免疫耐受。所以,对APC抗原递呈作用过程的研究可以作为特异性免疫反应机制探讨的切入点。(2)肝脏是体内最重要的代谢器官,对血液中外来抗原的吞噬、处理和免疫调节都由LAPC直接或间接参与完成。目前认为,肝脏对体内免疫系统更新代谢也起了特殊作用。对体内淋巴细胞变化的相关研究发现,抗原激活的T细胞在外周淋巴结中的数量迅速减少,而在肝脏发生汇集,其中尤其是CD8<sup>+</sup>T细胞选择性地停留在肝脏,发生凋亡而被吞噬<sup>[29-31]</sup>。该现象从一个侧面再次反映了肝脏在整个机体免疫调节过程中的重要地位,另外值得注意的是,其发生的整个过程都有LAPC直接参与。通常认为童贞(naïve)T细胞只在血液和淋巴中徘徊,在淋巴器官发生预激(primary activation)和分化后才会进入非淋巴组织。研究发现,肝脏虽然不是传统的淋巴器官,却也可以对抗原特异性童贞T细胞发生预激作用,而且这一过程是在LAPC的参与下发生的<sup>[32-34]</sup>。可以说,在与各种淋巴细胞的接触与协助的过程中,LAPC可能是肝脏内部免疫调节走向的“指挥员”。所以,了解LAPC有关作用机制,对揭示肝脏特殊的抗原处理能力,尤其是诱导机体产生对移植物特异性免疫耐受能力的根本机制有重要意义。

#### 4 肝脏抗原提呈细胞在移植耐受反应中的作用

肝脏内可以标定为LAPC的细胞主要有三种,分别是LSEC、KC和DC。LSEC组成了肝窦的内壁;KC主要在门静脉周围以及肝窦内游走;DC主要集中在门脉区的血管和胆管周围。

4.1 KC与肝脏移植耐受的相关性研究 KC是肝脏特有的吞噬细胞之一,占全身常驻型巨噬细胞总数的80%-90%。有关KC在移植免疫反应中作用的相关研究,Perez *et al*<sup>[35]</sup>通过门静脉注射供体血细胞诱导了心脏移植物特异性免疫耐受。其中发现,伴随着移植物存活时间延长,KC内花生四烯酸代谢水平发生变化,伴随具有免疫抑制性调节作用的前列腺素PGE<sub>2</sub>的分泌增加;KC COX1和COX2 mRNA转录水平提高,而阻断COX1/2,则耐受现象消失。由此推测门脉注射诱导的耐受现象是由KC参与实现的。还有一些研究<sup>[36-37]</sup>认为,KC通过表达Fas配体,诱导

激活的T细胞发生凋亡,而参与肝脏移植耐受的实现。但KC在移植肝脏中的作用也并非完全如此,因为当肝脏本身既作为外来抗原,又作为有潜在免疫调节能力的器官进入机体时,他首先面临受体免疫系统的打击,表现为各组成细胞群不同程度的功能受损以及局部强烈炎症症状;其后急性炎症逐渐消失,肝脏各组成细胞群和功能逐渐恢复;最终可能产生免疫调节作用造成免疫耐受,这其中有复杂多变的过程。所以在另一些报道中,关于KC作用机制的结论与以上观点不尽相同。Savner *et al*<sup>[38]</sup>认为大鼠肝移植后KC可能参与了随即发生的急性排斥反应,造成移植肝急性损伤。用氯化钆预先处理供体,特异性阻断KC,则改善了移植肝脏的早期功能并延长了存活时间<sup>[39]</sup>。Akamatsu *et al*<sup>[40]</sup>利用脂质体包被的二氯亚甲基二磷酸盐(dichloromethylene diphosphonate)除去供肝中KC和移入的受体来源巨噬细胞,显著延长了移植存活时间。Imamura *et al*<sup>[41]</sup>则发现,去除供体KC组与未处理KC组移植肝脏存活及肝功能情况没有统计学意义上的不同,由此认为KC对排斥反应没有重要的调节作用。Wang *et al*<sup>[42]</sup>观察到,肝脏移植后KC表现为选择性的吞噬功能持续恶化,其功能恢复也落后于肝细胞和LSEC,这对其调节功能的正常发挥显然不利。肝脏恢复期各组成细胞群中有一些细胞由受体来源细胞替代,形成了所谓嵌合现象。有关研究<sup>[43]</sup>以嵌合现象为主要病理活观察对象,追踪其与预后关系发现,移植后肝组织内小部分供体来源的淋巴细胞和KC一直都存在,并且连续出现受体来源的淋巴细胞和KC。但是受体来源KC的出现情况对器官存活没有显著性的预见意义,而移植后1 wk内供体来源淋巴细胞和KC比例低则与预见较高器官存活几率有一定相关性。该研究认为肝脏固有KC和其淋巴细胞对肝移植后耐受的诱导形成并不起主要作用。

4.2 DC与肝脏移植耐受的相关性研究 DC在肝脏中担当免疫监视功能。作为目前普遍公认的一种专业APC,DC能够快速反应并聚集于在发生炎症或感染的部位,捕获处理抗原后进入肝脏淋巴管道,至肝脏附属淋巴结中将抗原递呈给T和B淋巴细胞,启动免疫反应<sup>[44]</sup>。研究<sup>[45]</sup>认为,DC有两个发育阶段:未成熟DC,分布于外周器官组织中,表达与吞噬作用有关的受体,具有活跃的吞噬能力,但是并不表达共刺激信号分子;成熟DC,一旦接触抗原,DC发生活化,分泌DC-CK来

吸引童贞T细胞, 与T细胞接触后受到来自T细胞的信号完全成熟, 引发抗原的特异性识别反应. 不同成熟阶段、亚型以及活化信号, 决定了DC对T细胞的交叉递呈(cross presentation)作用可能产生不同的免疫反应类型<sup>[45-46]</sup>. 如果未成熟DC提供抗原但不能同时提供促进应答反应的共刺激信号, 将引起针对此抗原的不反应状态; 成熟DC具备完整诱导免疫识别和激活应答的能力, 将可能引起炎症反应. 有报道从肝脏刚分离出的DC主要表现为未成熟表型特征<sup>[47]</sup>, 故推测是他参与了诱导特异性T细胞免疫耐受<sup>[48-49]</sup>. 但另一些实验中<sup>[50-51]</sup>对肝脏移植小鼠使用内源性的造血生长因子Flt3L(Fms-like tyrosine kinase 3 ligand), 肝脏DC的数量增加, 却导致了移植迅速被排斥, 而中和DC分泌IL-12, 或阻碍共刺激信号, 移植肝脏可以继续存活. 这里DC活化状态变化的原因可以排除, 因为相关研究<sup>[52]</sup>发现: Flt3L处理组DC表型与未处理组DC表型, 在小鼠体内的分布上是相同的, 也即是, Flt3L仅增加了DC的数量, 对DC的作用特点没有影响. 对移植肝脏中DC进行的研究<sup>[53]</sup>发现, 他们虽然表达未成熟特征表型, 但有激活特异性T细胞免疫应答的作用. 所以上述研究又反映了肝脏DC没有促进免疫耐受的作用. 目前对以上诸多结果的解释是: DC有各种不同表型和功能的亚型; 肝脏中存在至少4种DC亚型<sup>[46]</sup>, 一些研究把他们简要归为骨髓来源(myeloid)DC和淋巴来源(lymphoid)DC两大类, 不同亚型DC免疫调节作用也不相同, 包括表面特征标记、细胞因子分泌、抗原递呈能力等<sup>[48,54]</sup>; 不同条件下DC亚型比例的变化, 即DC的可塑性(plasticity), 可能是导致其免疫调节作用表现不同的主要原因<sup>[55]</sup>. 所以, 如何更好地利用DC的可塑性为移植耐受提供诱导方案, 其中还有许多工作需要完成.

### 5 LSEC与肝脏移植耐受的相关性研究

LSEC是构成肝窦壁的主要细胞成分, 他通过吞噬、递呈和分泌抑制性因子等方式, 参与对肝脏内日常抗原免疫原性的处理<sup>[56-57]</sup>. 在移植免疫研究方面, LSEC已引起重视. 其主要原因在于: (1)LSEC在解剖学条件上有“第一线”参与肝内免疫反应的“优越性”. LSEC在肝脏组成细胞中所占比例为19%, 其数量仅次于肝细胞. 肝窦表面积占肝脏总膜面积的26%, 肝窦内血流较慢, LSEC有最多时间和机会清除血液中的大分子和接触其中白细胞, 作用直接而迅速.

(2)LSEC是肝脏独有的APC. 其独有性不仅在于其分布位置, 与其他器官的内皮细胞相比, LSEC有独特的免疫学表型, 如LSEC构成性地表达MHC I 和 II 类分子, 以及与T细胞接触必需的所有共刺激分子. LSEC还表达CD11c和CD4, 这使其表型更类似于未成熟DC, 而与其他器官内皮细胞大不相同<sup>[58]</sup>. 近期关于移植肝内微嵌合现象的研究发现, 供体肝中肝细胞和LSEC有来源于受体细胞的重组, 但比例非常低, 为0%-1%, 而受体来源KC则可以在较短的时间达到69%-100%<sup>[58-59]</sup>. 这反映了LSEC在发育来源方面也有其独特性. (3)LSEC有高效的处理抗原本领. LSEC不需要类似于DC的成熟过程, 可以同步完成抗原的摄取、处理和递呈过程. LSEC表面有丰富的吞噬受体, 如Scavenger受体, Mannose受体, CD14, Toll-like受体, L-SIGN, CD36, Fc $\gamma$ 受体等, 可以高效地吞噬肝窦血液中的大分子、病原体等. 对凋亡细胞也有吞噬作用<sup>[59]</sup>. (4)LSEC有确切的免疫调节功能. LSEC紧邻肝细胞, 可以对不同的免疫情况作出有效迅速的反应. 长期接触外来抗原以及肠道细菌代谢物, 在正常水平情况下, LSEC和KC可以分泌有抗炎或免疫抑制活性的细胞因子, 如IL-10, TGF $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, 维持肝内的免疫平衡. 肝窦的结构决定了LSEC有更多机会接触各种免疫细胞, LSEC也表达了多种黏附分子, 如CD54, CD102, CD106等, 可以“主动”与淋巴细胞相互作用. LSEC能够将外源可溶性抗原处理后以MHC限制性方式递呈给童贞CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞, 造成免疫耐受表现型CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞<sup>[60-61]</sup>. LSEC还能够表达Fas L, 在体外实验中表现出介导淋巴细胞凋亡的能力<sup>[62]</sup>. Onoe *et al*<sup>[63]</sup>发现, 在肝非实质细胞(liver nonparenchymal cell, LNPC)与同种转基因淋巴细胞混合培养试验中, 完整LNPC不会造成T细胞增殖反应, 而从中心除去LSEC, 则会出现阳性反应. 对LSEC作用机制继续研究发现, 他能够通过Fas/Fas L的方式直接调节T细胞发生免疫耐受. 该研究组在经门脉输入供体细胞模型中又证明了, LSEC能够通过移植抗原的间接识别模式诱导抗原反应性T细胞产生耐受<sup>[64]</sup>. 另一研究对肝移植受体使用抗LSEC抗体, 发现肝组织中TGF $\beta$ 水平显著下降, 此处理方法明显增强了免疫排斥反应<sup>[65]</sup>. 以上研究初步显示LSEC可能在肝脏耐受现象中起了重要作用.

总之, 肝脏聚集了一系列在不同免疫环境下吞噬并递呈抗原的细胞群, 其作用过程直接

### ■应用要点

本文讨论的研究内容可为移植免疫耐受研究提供新思路和新方法, 对肝脏学和免疫学研究都有重要意义和价值.

### ■同行评价

本文内容为肝移植领域重要课题, 颇具新意, 综述了目前有关肝移植耐受方面的研究进展, 对该领域的研究具有一定的推动作用。

影响到机体对外来抗原的反应如何——发生免疫应答或是产生免疫耐受。虽然对其作用机制的研究中还存在许多疑问, 这一方面体现了肝脏为适应其内部复杂的免疫学变化而进化形成的免疫活动多面性, 另一方面也向我们展示了众多有益的提示和理念, 甚至研究新方向。因此, 对肝脏特有抗原递呈细胞的研究不仅对于移植医学、肝脏病学有重要意义, 对于免疫学研究的整体发展都会有重要价值。

## 6 参考文献

- Waldmann H, Cobbold S. Exploiting tolerance processes in transplantation. *Science* 2004; 305: 209-212
- Spitzer TR, Delmonico F, Tolkoff-Rubin N, McAfee S, Sackstein R, Saidman S, Colby C, Sykes M, Sachs DH, Cosimi AB. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999; 68: 480-484
- Trivedi HL, Vanikar AV, Modi PR, Shah VR, Vakil JM, Trivedi VB, Khemchandani SI. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, mixed chimerism, and tolerance in living related donor renal allograft recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 737-742
- Kawai T, Cosimi AB, Wee SL, Houser S, Andrews D, Sogawa H, Phelan J, Boskovic S, Nadazdin O, Abrahamian G, Colvin RB, Sach DH, Madsen JC. Effect of mixed hematopoietic chimerism on cardiac allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 2002; 73: 1757-1764
- Buhler LH, Spitzer TR, Sykes M, Sachs DH, Delmonico FL, Tolkoff-Rubin N, Saidman SL, Sackstein R, McAfee S, Dey B, Colby C, Cosimi AB. Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 2002; 74: 1405-1409
- Rolles K, Burroughs AK, Davidson BR, Karatapanis S, Prentice HG, Hamon MD. Donor-specific bone marrow infusion after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1994; 343: 263-265
- Tryphonopoulos P, Tzakis AG, Weppler D, Garcia-Morales R, Kato T, Madariaga JR, Levi DM, Nishida S, Moon J, Selvaggi G, Regev A, Nery C, Bejarano P, Khaled A, Kleiner G, Esquenazi V, Miller J, Ruiz P, Ricordi C. The role of donor bone marrow infusions in withdrawal of immunosuppression in adult liver allotransplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 608-613
- Kurtz J, Shaffer J, Lie A, Anosova N, Benichou G, Sykes M. Mechanisms of early peripheral CD4 T-cell tolerance induction by anti-CD154 monoclonal antibody and allogeneic bone marrow transplantation: evidence for anergy and deletion but not regulatory cells. *Blood* 2004; 103: 4336-4343
- Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells *in vivo*: new answers to an old question. *J Immunol* 2001; 166: 973-981
- Bharat A, Fields RC, Mohanakumar T. Regulatory T cell-mediated transplantation tolerance. *Immunol Res* 2006; 33: 195-212
- Barratt-Boyes SM, Thomson AW. Dendritic cells: tools and targets for transplant tolerance. *Am J Transplant* 2005; 5: 2807-2813
- Garnier H, Clot JP, Bertrand M, Camplez P, Kunlin A, Gorin JP, Le Goaziou F, Levy R, Cordier G. Liver transplantation in the pig: surgical approach. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1965; 260: 5621-5623
- Calne RY, White HJ, Yoffa DE, Maginn RR, Binns RM, Samuel JR, Molina VP. Observations of orthotopic liver transplantation in the pig. *Br Med J* 1967; 2: 478-480
- Cortesini R, Semprebene L, Baroni B, Cucchiara G, Casciani C. Functional alterations in pig liver allografts. *Transplant Proc* 1971; 3: 509-511
- Gatti S, Rossi G, Albani AP, Reggiani P, Caccamo L, Gridelli B, Lucianetti A, Paone G, Campanati L, Melada E. Orthotopic liver-small bowel allotransplantation-surgical technique in the pig. *Transplant Proc* 1994; 26: 1627-1628
- Kataoka M, Margenthaler JA, Ku G, Eilers M, Flye MW. "Infectious tolerance" develops after the spontaneous acceptance of Lewis-to-Dark Agouti rat liver transplants. *Surgery* 2003; 134: 227-234
- Wang C, Li J, Cordoba SP, McLeod DJ, Tran GT, Hodgkinson SJ, Hall BM, McCaughan GW, Bishop GA. Posttransplant interleukin-4 treatment converts rat liver allograft tolerance to rejection. *Transplantation* 2005; 79: 1116-1120
- Dahmen U, Qian S, Rao AS, Demetris AJ, Fu F, Sun H, Gao L, Fung JJ, Starzl TE. Split tolerance induced by orthotopic liver transplantation in mice. *Transplantation* 1994; 58: 1-8
- Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S, Gordon RD, Esquivel CO, Tzakis AG, Makowka L, Marsh JW, Koneru B, Stieber A. Experience in 1,000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy: a survival report. *Transplant Proc* 1988; 20: 498-504
- Gugenheim J, Samuel D, Reynes M, Bismuth H. Liver transplantation across ABO blood group barriers. *Lancet* 1990; 336: 519-523
- Wong T, Nouri-Aria KT, Devlin J, Portmann B, Williams R. Tolerance and latent cellular rejection in long-term liver transplant recipients. *Hepatology* 1998; 28: 443-449
- Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Egawa H, Kiuchi T, Fujita S, Hayashi M, Kanematsu T, Tanaka K. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 2001; 72: 449-454
- Yu S, Nakafusa Y, Flye MW. Portal vein administration of donor cells promotes peripheral allospecific hyporesponsiveness and graft tolerance. *Surgery* 1994; 116: 229-234
- Kita H, Mackay IR, Van De Water J, Gershwin ME. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* 2001; 120: 1485-1501
- Mackay IR. Hepatoimmunology: a perspective. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 36-44
- Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today* 1999; 20: 27-32
- Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Roubourdin-Combe C. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* 1998; 28: 221-236
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw

- AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; 285: 221-227
- 29 Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* 1999; 163: 3202-3210
- 30 Kuniyasu Y, Marfani SM, Inayat IB, Sheikh SZ, Mehal WZ. Kupffer cells required for high affinity peptide-induced deletion, not retention, of activated CD8+ T cells by mouse liver. *Hepatology* 2004; 39: 1017-1027
- 31 John B, Crispe IN. TLR-4 regulates CD8+ T cell trapping in the liver. *J Immunol* 2005; 175: 1643-1650
- 32 Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, Fazekas de St Groth B. Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *J Immunol* 2001; 166: 5430-5438
- 33 Bertolino P, McCaughan GW, Bowen DG. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 84-92
- 34 Bertolino P, Schrage A, Bowen DG, Klugewitz K, Ghani S, Eulenburg K, Holz L, Hogg N, McCaughan GW, Hamann A. Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8+ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice. *Hepatology* 2005; 42: 1063-1071
- 35 Perez R, Johnson J, Winkler JD, Rudich S, Carter L, Katznelson S, German JB. Kupffer cell-mediated lymphocyte apoptosis: a PGE2-dependent mechanism of portal venous transfusion-induced immunosuppression? *J Surg Res* 1998; 78: 37-41
- 36 Sun Z, Wada T, Maemura K, Uchikura K, Hoshino S, Diehl AM, Klein AS. Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl* 2003; 9: 489-497
- 37 Sun Z, Wada T, Hoshino S, Uchikura K, Klein AS. Immunomodulatory role of Kupffer cell in liver allografts. *Comp Hepatol* 2004; 3: S32
- 38 Savier E, Lemasters JJ, Thurman RG. Kupffer cells participate in rejection following liver transplantation in the rat. *Transpl Int* 1994; 7: S183-S186
- 39 von Frankenberg M, Golling M, Mehrabi A, Nentwich H, Klar E, Kraus TW. Donor pretreatment with gadolinium chloride improves early graft function and survival after porcine liver transplantation. *Transpl Int* 2003; 16: 806-813
- 40 Akamatsu Y, Ohkohchi N, Doi H, Satomi S. Effect of elimination of donor Kupffer cells and/or recipient macrophages on acute rejection in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1105-1110
- 41 Imamura H, Laberge S, Brault A, Cote J, Huet PM. Immunogenic role of Kupffer cells in a rat model of acute liver allograft rejection. *Liver Transpl Surg* 1995; 1: 389-394
- 42 Wang L, Florman S, Roayaie S, Basile J, Zhang ZY, Machac J, Boros P, Miller CM. Differential *in vivo* recovery of sinusoidal endothelial cells, hepatocytes, and Kupffer cells after cold preservation and liver transplantation in rats. *Transplantation* 1998; 66: 573-578
- 43 Bittmann I, Bottino A, Baretton GB, Gerbes AL, Zachoval R, Rau HG, Lohrs U. The role of graft-resident Kupffer cells and lymphocytes of donor type during the time course after liver transplantation-a clinico-pathological study. *Virchows Arch* 2003; 443: 541-548
- 44 Matsuno K, Ezaki T. Dendritic cell dynamics in the liver and hepatic lymph. *Int Rev Cytol* 2000; 197: 83-136
- 45 Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001; 2: 585-589
- 46 Lian ZX, Okada T, He XS, Kita H, Liu YJ, Ansari AA, Kikuchi K, Ikehara S, Gershwin ME. Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *J Immunol* 2003; 170: 2323-2330
- 47 Abe M, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Induction of cytokine production and proliferation of memory lymphocytes by murine liver dendritic cell progenitors: role of these progenitors as immunogenic resident antigen-presenting cells in the liver. *J Hepatol* 2001; 34: 61-67
- 48 Wu W, Zheng N, Wang Y, J Fung J, Lu L, Qian S. Immune regulatory activity of liver-derived dendritic cells generated *in vivo*. *Microsurgery* 2006; 26: 17-20
- 49 Thomson AW, Lu L, Murase N, Demetris AJ, Rao AS, Starzl TE. Microchimerism, dendritic cell progenitors and transplantation tolerance. *Stem Cells* 1995; 13: 622-639
- 50 Li W, Lu L, Wang Z, Wang L, Fung JJ, Thomson AW, Qian S. IL-12 antagonism enhances apoptotic death of T cells within hepatic allografts from Flt3 ligand-treated donors and promotes graft acceptance. *J Immunol* 2001; 166: 5619-5628
- 51 Li W, Lu L, Wang Z, Wang L, Fung JJ, Thomson AW, Qian S. Costimulation blockade promotes the apoptotic death of graft-infiltrating T cells and prolongs survival of hepatic allografts from FLT3L-treated donors. *Transplantation* 2001; 72: 1423-1432
- 52 Drakes ML, Lu L, Subbotin VM, Thomson AW. *In vivo* administration of flt3 ligand markedly stimulates generation of dendritic cell progenitors from mouse liver. *J Immunol* 1997; 159: 4268-4278
- 53 Bosma BM, Metselaar HJ, Mancham S, Boor PP, Kusters JG, Kazemier G, Tilanus HW, Kuipers EJ, Kwekkeboom J. Characterization of human liver dendritic cells in liver grafts and perfusates. *Liver Transpl* 2006; 12: 384-393
- 54 Yang GX, Lian ZX, Kikuchi K, Moritoki Y, Ansari AA, Liu YJ, Ikehara S, Gershwin ME. Plasmacytoid dendritic cells of different origins have distinct characteristics and function: studies of lymphoid progenitors versus myeloid progenitors. *J Immunol* 2005; 175: 7281-7287
- 55 Cabillic F, Rougier N, Basset C, Lecouillard I, Quelvenec E, Toujas L, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response. *J Hepatol* 2006; 44: 552-559
- 56 Knolle PA, Limmer A. Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol* 2001; 22: 432-437
- 57 Ng IO, Chan KL, Shek WH, Lee JM, Fong DY, Lo CM, Fan ST. High frequency of chimerism in transplanted livers. *Hepatology* 2003; 38: 989-998
- 58 Wagers AJ, Sherwood RL, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259
- 59 Dini L, Pagliara P, Carla EC. Phagocytosis of apoptotic cells by liver: a morphological study. *Microsc Res Tech* 2002; 57: 530-540
- 60 Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, Gerken G, Lohse AW. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells

- by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 1999; 116: 1428-1440
- 61 Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000; 6: 1348-1354
- 62 Muschen M, Warskulat U, Douillard P, Gilbert E, Haussinger D. Regulation of CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand expression by lipopolysaccharide and dexamethasone in parenchymal and nonparenchymal rat liver cells. *Hepatology* 1998; 27: 200-208
- 63 Onoe T, Ohdan H, Tokita D, Shishida M, Tanaka Y, Hara H, Zhou W, Ishiyama K, Mitsuta H, Ide K, Asahara T. Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol* 2005; 175: 139-146
- 64 Tokita D, Ohdan H, Onoe T, Hara H, Tanaka Y, Asahara T. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int* 2005; 18: 237-245
- 65 Ge X, Karrar A, Ericzon BG, Broome U, Sumitran-Holgersson S. Antibodies to liver sinusoidal endothelial cells modulate immune responses in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3335-3337

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

## 第十二届全国胆道外科学术会议征文通知

**本刊讯** 中华医学会外科学分会胆道外科学组拟定于2006-07在辽宁省沈阳市召开第12届全国胆道外科学术会议. 此次会议由全国胆道外科学组委托中国医科大学附属第二医院(盛京医院)承办, 中国实用外科杂志社协办. 大会将全面展示我国胆道外科近年来的新进展、新成果. 届时将邀请国内外知名肝、胆外科专家作专题演讲. 凡参会者均颁发国家级继续教育学分证书. 现将征集论文的有关事宜通知如下:

### 1 征文内容

征文内容包括: (1)胆道外科学基础研究(胆道解剖与胆道疾病、胆石成因、胆道感染、胆道肿瘤、胆胰管结合部异常与胆道先天性疾病). (2)胆道外科的临床研究(胆囊、胆管结石、胆道肿瘤、意外性胆管癌、胆道损伤、肝移植后胆道狭窄等). (3)胆道外科诊断与治疗的新技术、新方法(腹腔镜技术、内镜技术、介入技术、影像技术等). (4)胆道外科疾病的其他诊疗经验等.

### 2 征文要求

征文要求包括: (1)请寄论文全文及800字以内的摘要各一份. 4号字打印, 附电子稿件. 无摘要者恕不受理. (2)论文要求科学性强、数据可靠、重点突出、文字精炼且未经发表者. 论文须由作者所在单位审查盖章同意, 并在信封正面注明会议征文字样. (3)截稿时间: 2006-05-08(当时邮戳为准). 稿件邮寄地址: 辽宁省沈阳市和平区三好街36号 中国医科大学附属第二医院 第一微创、胆道外科; 邮政编码: 110004. 联系人: 吴硕东. 投稿E-mail地址为: wushudong@yahoo.com.cn

# 骨髓干细胞分化为肝细胞的多种移植途径

穆丽雅, 韩明子

穆丽雅, 韩明子, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
通讯作者: 穆丽雅, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科. lqz321521@163.com  
电话: 0451-86605143  
收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2005-12-20

## 摘要

近年来许多研究证实,人类和啮齿类动物的骨髓细胞可分化为多种细胞类型,包括骨骼肌细胞、心肌细胞、神经细胞和肝细胞等,这些骨髓干细胞的可塑性研究,为肝细胞移植提供了新的供体来源.骨髓干细胞替代肝细胞进行移植具有来源丰富,费用相对低廉,对患者损伤小等优点,且自体骨髓干细胞移植可以完全避免移植排斥反应,同时,骨髓干细胞只有5-15  $\mu\text{m}$ ,移植后不会发生栓塞等并发症.因此骨髓干细胞移植在治疗肝病以及解决供体肝脏来源短缺方面具有广泛的应用前景.本文就骨髓干细胞的移植途径做一综述.

**关键词:** 干细胞; 门静脉; 尾静脉; 脾静脉; 腹腔; 肝内; 移植

穆丽雅, 韩明子. 骨髓干细胞分化为肝细胞的多种移植途径. 世界华人消化杂志 2006;14(6):607-610  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/607.asp>

## 0 引言

肝功能衰竭是死亡率极高的危重病,近年来干细胞移植的研究为急慢性肝功能衰竭患者的治疗提供了新思路.骨髓干细胞在体内外均可以分化为功能完备的肝细胞<sup>[1-12]</sup>,用骨髓干细胞替代成熟肝细胞进行移植治疗肝病<sup>[13-16]</sup>,有望使细胞移植在肝病治疗方面取得重大突破.骨髓干细胞的移植途径有门静脉、肝内、股动脉、脾内、外周静脉、腹腔等,本文就各种移植途径的优、缺点做一综述.

## 1 门静脉移植

从理论上讲,肝脏本身是肝细胞移植的最佳器官,因为门脉内含高浓度的嗜肝细胞因子和局部生长因子,并且肝内微循环和门脉血中的营

养成分,对移植的肝细胞有益.多个门脉内输注的研究显示<sup>[17-21]</sup>,移植肝细胞可在不改变器官微结构的情况下与受体肝实质相融合. Avital *et al*<sup>[19]</sup>利用两步免疫磁珠技术分离大鼠骨髓中的 $\beta 2\text{m}^-/\text{Thy-1}^+$ 细胞经门静脉移植到同系大鼠体内,移植的细胞整合到受体肝板,分化成表达肝细胞特异性标记的细胞,并且能够合成尿素.同时有动物实验证明<sup>[20]</sup>,原位肝移植术后,经门静脉注入 $\beta 2\text{m}^-/\text{Thy-1}^+$ 细胞,可以明显减轻肝脏的移植排斥反应.王平 *et al*<sup>[21]</sup>将DAPI标记的大鼠骨髓基质细胞,经门静脉移植入受体(移植细胞数为 $10^5$ /只),各组受体鼠分别于移植后2 h、1 wk、2 wk、3 wk、4 wk处死.结果发现,DAPI标记的细胞在肝脏内分布出现由门静脉小分支逐渐向肝实质内迁移的过程,细胞大约在1 wk开始通过血管间隙向肝实质移行,至第4周几乎全部散在分布于肝实质内,与肝细胞紧密结合呈索状排列.同时在肺脏的冰冻切片则未见明显DAPI标记细胞,在一定程度上提示经过门静脉途径移植细胞可以起到良好的细胞选择性分布作用.而且骨髓干细胞直径小,移植入肝后不会引起栓塞等并发症,因此,门静脉是普遍使用的移植途径.

## 2 肝内移植

吴理茂 *et al*<sup>[22]</sup>用肝脏局部注射乙醇的方法复制急性局限性肝损伤模型,然后在肝脏坏死区边缘多点注射骨髓干细胞悬液( $1 \times 10^7$ 个),2 wk后发现移植骨髓干细胞组的肝组织坏死区明显小于模型组.作者又用复合因素( $\text{CCl}_4$ 、乙醇、高脂、低蛋白)刺激复制大鼠肝纤维化模型,采用肝右大叶3点移植骨髓干细胞( $1 \times 10^6$ 个),5 wk后,移植的细胞在汇管区聚集较多,有些以单个细胞散在形式存在,有些以小克隆形式存在,部分已经迁移到肝实质深处,大部分表现肝细胞的形态,免疫组化双标技术显示骨髓来源的干细胞表达肝细胞特有的角蛋白CK18.因此,肝内注射也可以作为干细胞移植的途径之一.但是此种方法具有出血倾向,故临床应用上受到患

## ■背景资料

骨髓干细胞研究的不断深入,为肝细胞移植提供了新的种子细胞.大量的实验证明,骨髓干细胞可以分化成肝细胞,但是其分化机制各学者观点不一.移植的干细胞是否能起到治疗肝病的作用仍在探讨之中.有学者提出,采取不同的移植途径,在肝脏定居的细胞数是有差异的,但是此种观点缺乏实验依据.而且有关比较移植途径的实验研究也较少,故本文就骨髓干细胞的移植途径做一综述,供广大学者参考.

## ■ 相关报道

- 1 肝干细胞的可塑性和分化机制的研究进展. 生物化学与生物物理进展 2003; 30: 864-867
- 2 一种肝细胞移植的新来源—骨髓干细胞可塑性的应用研究. 国外医学外科学分册 2002; 29: 200-202

者凝血机制的限制。

### 3 股动脉移植

北京军区总医院的姚鹏 *et al*<sup>[23]</sup>已经将骨髓干细胞移植应用于临床,用自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化30例.在X光透视下,经股动脉插管至肝固有动脉,将分离好的骨髓干细胞注入肝内,移植后大多数患者临床症状有明显改善,多数患者谷丙转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)逐渐降低,凝血酶原活动度(PTA)逐渐升高.在30例移植患者中未发现严重不良反应及并发症.近年来介入技术的开展,为干细胞动脉移植提供了便利条件,而且此种方法具有创伤小、操作简单等优点,故首先应用于临床。

### 4 脾内移植

有人认为,外源干细胞移植于坏死的肝内不易存活,所以,对于外源干细胞参与肝损伤修复的研究多将干细胞移植于脾内.脾窦巨大的储存量有利于移植细胞的存留,来自门脉血的丰富营养物质,尤其是脾红髓的网状组织结构,有利于细胞间的相互作用,同时具有诱导免疫耐受的作用.蔡云峰 *et al*<sup>[24]</sup>采用免疫磁珠法从骨髓中分离β2m<sup>+</sup>细胞,体外培养后经脾移植到肝再生模型鼠体内,在移植2 wk后观察到脾内肝细胞样细胞集落,同样表达白蛋白、AFP、CK8/18等,说明β2m<sup>+</sup>细胞在脾内能够向肝细胞分化,故脾内移植也可认为是骨髓干细胞移植的途径之一.脾内肝细胞移植<sup>[25-26]</sup>为效果比较确切的方法,但是移植于脾内的干细胞多呈结节状生长<sup>[27]</sup>,而且对肝功能恢复的确切效果有限。

### 5 外周静脉移植

Wang *et al*<sup>[28]</sup>通过I型酪氨酸蛋白血症模型小鼠的实验证实,通过外周静脉骨髓干细胞移植,骨髓干细胞替代肝细胞的过程是少量而且缓慢的,同时这种替代的现象与肝功能已受损程度无关.Mitchell *et al*<sup>[29-30]</sup>认为,只有选择压力存在即肝功能继续损害的前提下,才有相当数量的骨髓干细胞向肝细胞分化而可能达到治疗作用.此外,Kanazawa *et al*<sup>[31]</sup>研究了三种肝损伤模型小鼠:(1)CCl<sub>4</sub>肝损伤小鼠;(2)白蛋白-尿激酶转基因小鼠;(3)乙肝病毒转基因小鼠.作者将骨髓细胞通过尾静脉移植到三种模型小鼠体内,结果在分析的18只小鼠中只有5只小鼠的肝内发现骨髓来源的肝细胞.因此作者对于骨髓源性的肝细胞修

复损伤肝脏的可能性提出质疑.由于经过外周静脉移植细胞,要经过全身血液循环后才可能到达肝脏,这样是否会影响到达肝脏定居分化的细胞数量?国内外众多学者都已证明,经尾静脉移植的骨髓干细胞可以定居肝脏并分化成肝细胞<sup>[32-35]</sup>.但这种分化的肝细胞是否能起到治疗肝病的作用,仍没有定论.但是值得一提的是Lagasse *et al*<sup>[36]</sup>在FAH缺陷大鼠模型中证实,经外周静脉移植的骨髓造血干细胞能在肝脏内分化为功能完备的肝细胞,改善FAH缺陷大鼠的症状,只要50个干细胞就能达到良好的效果。

### 6 腹腔移植

技术简单,移植的细胞数量大,营养和代谢产物交换面积大,但植入的异种肝细胞炎症反应和细菌感染的可能性也较大,易引起腹膜炎和腹腔黏连.鉴于成熟肝细胞腹腔移植<sup>[37-39]</sup>的经验,腹腔移植也可能是干细胞移植的途径之一<sup>[40-41]</sup>.

因为骨髓源性干细胞定向分化为肝细胞的研究涉及到干细胞分化的重要机制<sup>[42-45]</sup>,又与今后可能的临床应用密切相关,近年对此方面的研究成为热点.同时,众多学者也期望为终末期肝病的治疗寻找一个经济易行的方法.但是对于干细胞科学,还处于黑暗年代,其临床应用中仍有许多尚未解决的问题.尽管许多文献报道骨髓干细胞可以分化为肝细胞,但是其分化率报道不一<sup>[46]</sup>,而且这种分化在没有肝损伤存在的条件下是否能够发生,仍然未得到解决.只有当一定数量的移植细胞定位到肝脏并在肝脏增生时,才能替代病变肝组织的功能,移植的部位不同是否会影响到移植细胞的归巢和治疗效果仍在探讨之中.张刚庆 *et al*<sup>[47]</sup>比较了门静脉和尾静脉两条途径移植骨髓间充质(MSC)细胞在肝脏的定居情况,结果发现,所移植的MSC定居于肝脏和是否分化为正常肝细胞和卵圆细胞与其移植途径无明显关系,与肝脏是否受损伤相关,优先定植于受损伤的靶器官,与移植途径和移植后的时间无明显关系.但其具体机制,仍待进一步研究。

总之,骨髓干细胞自体移植刚刚起步,尚存在一些问题:如(1)移植的方式和部位;(2)移植细胞的数量;(3)移植后干细胞在体内的归巢和定位等.随着这些问题的解决,骨髓干细胞将有着广阔的应用前景。

### 7 参考文献

- 1 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM,

- Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 2 Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-695
- 3 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539
- 4 Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-2822
- 5 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504
- 6 Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 24-30
- 7 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 8 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- 9 Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. ClqRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10441-10445
- 10 Alison MR, Poulos R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- 11 Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 487-500
- 12 蔡云峰, 闵军, 何劲松, 魏菁, 莫隽全, 陈积圣. 骨髓源性肝干细胞的确认及定向分化的实验研究. *中国普通外科杂志* 2003; 12: 287-290
- 13 Kumar KS, Lefkowitz J, Russo MW, Hesdorffer C, Kinkhabwala M, Kapur S, Emond JC, Brown RS Jr. Successful sequential liver and stem cell transplantation for hepatic failure due to primary AL amyloidosis. *Gastroenterology* 2002; 122: 2026-2031
- 14 Terai S, Yamamoto N, Omori K, Sakaida I, Okita K. A new cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *J Gastroenterol* 2002; 37: 162-163
- 15 王平, 王建华, 颜志平. 骨髓干细胞移植: 肝功能衰竭治疗的一个新研究方向. *中华放射学杂志* 2004; 38: 202-205
- 16 安伟德, 胡祥, 曹亮, 王金晶, 刘巨超, 李力, 宋旭华, 徐迎新. 骨髓间充质干细胞定向分化肝细胞及肝内移植研究. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 917-919
- 17 王温芳, 南雪, 尉承泽, 李艳华, 张锐, 管立东, 岳文, 裴雪涛. 丙稀醇致肝损伤微环境定向诱导骨髓干细胞向肝细胞分化. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 274-277
- 18 展玉涛, 魏来, 陈红松, 丛旭, 费然, 王宇. 骨髓干细胞在大鼠肝纤维化形成环境中的分化. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 673-675
- 19 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 156-164
- 20 Avital I, Ferrareso C, Aoki T, Hui T, Rozga J, Demetriou A, Muraca M. Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection. *Surgery* 2002; 132: 384-390
- 21 王平, 王建华, 颜志平, 胡美玉, 王艳红, 李文涛, 林根来. 大鼠骨髓基质细胞分离培养和经门静脉途径移植的初步研究. *中华放射学杂志* 2004; 38: 129-132
- 22 吴理茂, 李连达, 刘红, 宁可永, 李贻奎. 自体骨髓干细胞移植与归元方联用治疗急性肝损伤实验研究. *中国工程科学* 2004; 6: 34-44
- 23 姚鹏, 王帅, 胡大荣, 闻炜, 周一鸣, 龚丽娟. 肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化30例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1639-1640
- 24 蔡云峰, 陈积圣, 闵军, 魏菁, 何劲松, 莫隽全. 骨髓源性肝干细胞定向分化及脾内移植研究. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 551-553
- 25 巴明臣, 周晓东, 陈积圣, 刘丽. 倒千里光碱处理SD大鼠永生代肝细胞同种脾内移植增殖实验研究. *第一军医大学学报* 2003; 23: 546-552
- 26 钱世鹏, 张天顺, 肖晓琴, 厉鼎琦, 高良辉, 卢盛祁. DiI荧光示踪剂在大鼠脾内肝细胞移植中的研究. *中华器官移植杂志* 2000; 21: 337-338
- 27 苏娟, 姚玉成, 余宏宇, 朱海英, 王新民, 王忠华, 胡以平. 肝干细胞在小鼠脾脏中集落样生长. *科学通报* 2001; 46: 1625-1628
- 28 Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161: 565-574
- 29 Mitchell C, Fausto N. Bone marrow-derived hepatocytes: rare but promising. *Am J Pathol* 2002; 161: 349-350
- 30 Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, Kahn A, Gilgenkrantz H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002; 35: 799-804
- 31 Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11850-11853
- 32 周播江, 钟翠平, 顾云娣, 张新华, 梁春敏, 吴超群. 肝再生大鼠血清诱导骨髓干细胞向肝细胞分化的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 730-733
- 33 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- 34 马军, 段芳龄, 李文晰, 颜伏归, 王晓, 王智卿, 朱武凌, 陈香宇, 高天慧. 大鼠移植骨髓细胞向肝细胞转化的实验研究. *胃肠病和肝病学杂志* 2003; 12: 138-143
- 35 Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolta JA. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human he-

#### 同行评价

本文对骨髓干细胞分化为肝细胞的移植途径进行了综述, 基本包括了动物实验及临床上使用的所有移植途径, 具有一定的新颖性。

- matopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101: 4201-4208
- 36 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
- 37 徐兵, 江家骥, 潘晨, 李丽, 胡盈莹, 陈怡, 李勤光. 胶原凝胶包埋肝细胞体外培养和腹腔移植. *中西医结合肝病杂志* 2001; 11: 9-10
- 38 李羽, 白雪帆, 张海, 张岩. 肝细胞移植对大鼠实验性肝衰竭的疗效研究. *第四军医大学学报* 2002; 23: 896-899
- 39 张阳德, 马仁, 何剪太, 彭健. 微囊化同系、同种异体、异种肝细胞腹腔移植对急性肝衰竭治疗作用. *中华实验外科杂志* 2001; 18: 47-49
- 40 张国新, 赵志泉. 肝脏干细胞移植. *中华消化杂志* 2004; 24: 382-384
- 41 Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; 169: 12-20
- 42 Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904
- 43 Alvarez-Dolado M, Pardo R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425: 968-973
- 44 Dahlke MH, Popp FC, Larsen S, Schlitt HJ, Rasko JE. Stem cell therapy of the liver--fusion or fiction? *Liver Transpl* 2004; 10: 471-479
- 45 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901
- 46 Crosby HA, Strain AJ. Adult liver stem cells: bone marrow, blood, or liver derived? *Gut* 2001; 48: 153-154
- 47 张刚庆, 方驰华, 颜政. 同种异体MSC移植在大鼠肝内定居的病理检测. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1198-1201

电编 李琪 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

## 第十届全国临床营养支持学术会议通知

本刊讯 经中华医学会外科学分会批准,“第十届全国临床营养支持学术会议”将于2006-05在上海召开。本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办,主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结。现将征文要求通知如下:

### 1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号,上海中山医院外科吴国豪收,邮编:200032;同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn,注明上海中山医院外科吴国豪收。征文请自留底稿,恕不退稿。

### 2 截稿日期

征文截止日期:2006-03-15.

本次会议举行优秀论文评奖活动,欢迎踊跃投稿。会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分。

# 重症急性胰腺炎心脏损伤临床表现与机制研究进展

张喜平, 戴金, 陈汉卿

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006  
戴金, 陈汉卿, 浙江中医学院 浙江省杭州市 310053  
浙江省中医药卫生科计划项目, No.2003C130、  
No.2004C142  
杭州市重大科技发展计划项目, No.2003123B19  
杭州市医药卫生重点项目, No.2004Z006  
浙江省医药卫生科技计划项目, No.2003B134  
杭州市科技计划项目, No.2005224  
杭州市医药卫生科技项目, No.2003A004  
通讯作者: 张喜平, 310006, 浙江省杭州市, 杭州市第一人民医院普外科. zxp99688@vip.163.com  
电话: 0571-87065701  
收稿日期: 2005-12-08 接受日期: 2005-12-24

## 摘要

重症急性胰腺炎(SAP)是较常见的急腹症,其发病凶险,病情演变迅速,并发症多,危害极大,死亡率高,近几年来发病率呈上升趋势。SAP可以引发局部和全身性过度炎症反应,造成血管渗出、低血容量、休克和多脏器功能障碍等全身炎症反应综合征(SIRS),甚至导致多器官功能不全综合征(MODS)。随着对SIRS、MODS等的深入研究,SAP时的心脏损伤逐渐被人们重视。在SAP胰外器官损害中,对心脏损害的研究较少,但SAP时心脏失代偿是导致死亡的最高并发症之一。因此,进行SAP心脏损伤临床表现与机制的研究对治疗SAP患者有重要意义。我们将对SAP心脏损伤临床表现与机制的研究进展进行阐述。

**关键词:** 重症急性胰腺炎; 心脏损伤

张喜平, 戴金, 陈汉卿. 重症急性胰腺炎心脏损伤临床表现与机制研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(6):611-617  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/611.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎(sever acute pancreatitis, SAP)可通过多种途径损伤心脏,引起心功能改变、心律失常、心源性休克、中毒性心肌炎、心包炎、心肌梗死、心包积液等临床表现和心脏实验室检查异常。我们探讨了SAP引起的心脏损害的临床表现和机制研究进展,希望为临床上救治这类患者提供一些理论依据。

## 1 临床表现与检查

及时、准确地了解SAP时患者心功能的变化,对救治SAP患者有很大的帮助。临床上除了患者有气短、胸闷、胸痛、心悸等症状供医生参考外,还必须依靠实验室检查,主要有心电图(electrocardiogram, ECG)、心肌酶谱、心肌肌钙蛋白(cardiac troponin, CTn)等。

1.1 心电图改变 SAP影响到心脏,继而引起心电图改变多有报道,可出现的变化有:窦性心动过速、窦性心动过缓、室上性心动过速、室性心动过速、房性早搏、室性早搏、心房纤颤、窦房阻滞、房室传导阻滞、左束支传导阻滞、右束支传导阻滞、ST段抬高、ST段压低、T波改变、QT间期延长、一过性Q波等<sup>[1-8]</sup>。其中以窦性心动过速和ST段改变最为常见<sup>[2,6]</sup>。对于SAP时出现心电图改变的机制尚存在争议,可能机制主要为:代谢紊乱、迷走神经反射、冠状动脉痉挛、血流动力学不稳定、血管升压类药物的应用、心包炎、心肌炎、凝血紊乱以及潜在心脏疾病的恶化等<sup>[9]</sup>。此外, Pezzilli *et al*<sup>[6]</sup>研究显示SAP时出现心电图异常的患者50%以上存在电解质异常, Rubio-Tapia *et al*<sup>[12]</sup>研究也证明SAP时出现心电图异常与电解质改变有很大的关系,提示SAP时出现心电图改变可能与体内电解质异常有密切联系。

1.2 心肌酶谱变化 目前用于检测心脏损伤的心肌酶主要有:肌酸激酶(creatinine kinase, CK)、CK-MB、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、LDH<sub>1</sub>等。SAP并发心脏损伤可以引起这些心肌酶的升高,及时观察这些酶的变化有利于提早采取措施保护心脏,控制病情发展。CK-MB和LDH<sub>1</sub>是目前常用来反映心肌损伤的酶谱,因为他们主要存在于心肌中,对心肌损伤的特异性和敏感性均较高<sup>[10-13]</sup>。临床研究显示,SAP时血清心肌酶较轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)时有明显增高,提示AP患者早期就有心肌损伤出现,且病情越重升高越明显<sup>[14-15]</sup>。但是,我们也应该注意假阳性的出现,如

## ■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是较常见的急腹症,其发病凶险,病情演变迅速,并发症多,危害极大,死亡率高,近几年来发病率呈上升趋势。在SAP胰外器官损害中,对心脏损害的研究较少,但SAP时心脏失代偿是导致死亡最高的并发症之一。

## ■ 研究前沿

SAP时心脏损伤的ECG和心肌酶异常临床报道较多,炎症介质和细胞因子损伤心脏的机制逐渐被人们重视。

CK-MB可在肾衰竭、肌损伤、肌肉组织疾病时升高<sup>[16]</sup>,提示SAP时出现心肌酶的升高也应适时考虑其他并发症。另外CK-MB高峰出现早,消失较快,灵敏度较低,有时会影响诊断,临床上应该注意。

1.3 肌钙蛋白变化 心肌肌钙蛋白(CTn)是心肌横纹肌兴奋收缩的主要调节蛋白,由三种亚单位组成。心肌肌钙蛋白I(CTnI)是其亚单位之一,他是再生的骨骼肌中不重新表达的唯一心肌损伤标志物。迄今为止,人们尚未发现CTnI在骨骼肌中表达,被认为唯一特异的心肌蛋白,即使有骨骼肌疾病或晚期肾功能不全患者血清中CTnT增高时,CTnI水平仍未见异常,故在诊断心肌缺血、损伤、坏死的特异性上优于CK-MB、肌红蛋白、CTnT,具有高度心肌特异性,故在诊断心肌缺血损伤、坏死的特异性上优于心肌酶<sup>[17-19]</sup>。当心肌细胞受到损害时,游离型CTnI就首先迅速透过细胞膜(其分子量仅22 500,较CK-MB小,心肌含量为CK-MB的13倍<sup>[20]</sup>)释放入血,因而具有很高的敏感性。所以,CTnI的早期阳性率较高,并能帮助检出微小心肌损伤<sup>[21]</sup>。当持续性损伤或不可逆损伤激活蛋白分解酶时,引起结合型蛋白的降解和释放,使CTnI在血中升高持续时间延长,为临床提供了一个较宽的诊断时间窗。CTnI在SAP患者中异常升高的释放动力学特点与心肌梗塞时不一致,呈较长时间平缓的抬高曲线,没有明显的峰,其可能的机制是由于致伤因素持续存在,心肌不断受损,而不是心肌梗塞的单次损伤<sup>[17,22]</sup>。

SAP时心脏表现多样化,因此需重视诊断与鉴别诊断,注重与原发心脏疾病的鉴别,尤其是与心绞痛与急性心肌梗死的鉴别<sup>[23]</sup>。心绞痛多为短暂的胸骨后压榨性痛,服硝酸甘油多在5 min内缓解,而胰心综合征多以持续的剧烈腹痛为主,服硝酸甘油无效;急性心肌梗死与胰心综合征的不同主要为ECG的典型表现及演变规律、CTnI升高的曲线特征和正常的血清淀粉酶<sup>[24]</sup>。因此SAP如伴有心脏异常表现,在排除原发性心脏疾病的前提下方可作出诊断。

## 2 损伤机制

### 2.1 炎症介质和细胞因子

由于异常激活的胰酶,在造成胰腺本身损伤的同时激活了机体的多种炎症细胞,释放出大量炎症介质和细胞因子,如白介素(interleukin, IL)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,

TNF- $\alpha$ )、氧自由基(oxygen free radical, OFR)、磷脂酶A<sub>2</sub>(phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>)、内皮素(endothelin, ET)、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)、内毒素(endotoxin, ETX)等,这些炎症介质和细胞因子与心脏损害息息相关。

2.1.1 TNF- $\alpha$  TNF- $\alpha$ 是SAP时体内最重要的细胞因子之一,在SAP发病后较早产生,且迅速升高,特别是发生内毒素血症、休克时TNF- $\alpha$ 升高更加明显。TNF- $\alpha$ 在SAP时对全身器官的损害发挥着重要的作用,其中对心脏的损害包括:(1)TNF- $\alpha$ 有较强的负性肌力作用,可通过改变细胞内钙的平衡以及 $\beta$ -肾上腺素刺激导致环磷酸腺苷(cAMP)降低及介导肾上腺素信号G蛋白缺乏,从而对心肌产生抑制,引起心肌收缩力降低<sup>[25,26]</sup>;(2)TNF- $\alpha$ 可诱导一氧化氮(NO)的产生,损害心脏的功能<sup>[27]</sup>;(3)TNF- $\alpha$ 刺激心肌细胞表达功能性的TNF受体1(TNFR<sub>1</sub>),启动心肌细胞的凋亡<sup>[28,29]</sup>;(4)TNF- $\alpha$ 可以显著增加心肌细胞和血管内皮细胞的细胞间黏附分子(ICAM-1)表达,显著增强激活的淋巴细胞和粒细胞对心肌细胞、内皮细胞的黏附,导致心肌损害<sup>[30]</sup>;(5)心脏在发生缺血再灌注时自身可高度表达TNF- $\alpha$ ,进一步加重心脏缺血再灌注损害<sup>[31]</sup>。

2.1.2 ET-1 ET-1主要由血管内皮细胞分泌释放,在生理浓度下有助于稳定体内心血管功能。在心血管系统,ET-1主要作用在血管平滑肌,SAP时ET-1水平升高,其损伤心脏机制包括:(1)ET-1促进心肌缺血再灌注损伤。ET-1是迄今发现的最强的长效缩血管物质,其中对冠状动脉的作用最强。研究发现ET-1对血管的作用具有浓度依赖性,即ET-1浓度越高其引起的血管收缩就越持久、越强烈。SAP时ET-1水平显著增高,使冠状动脉持续强烈收缩,导致心肌缺血坏死<sup>[32-34]</sup>。在猪的研究证明,缺血心肌组织中ET-1水平较非缺血心肌组织高7倍,ET-1升高的水平与心肌缺血时间呈显著正相关<sup>[35]</sup>。(2)ET-1可引起心肌重塑。ET-1可通过正性肌力、强烈持久的收缩血管、加强心肌细胞和成纤维细胞的有丝分裂,促进DNA和蛋白质的合成等致心肌肥厚及激活或(和)促进其它激素(血管紧张素II,心房利钠因子等)引起心脏结构和功能的变化<sup>[36,37]</sup>。(3)ET-1可使毛细血管通透性增加,毛细血管渗漏增多,使血液浓缩、血液黏度升高,造成血液流变学变化,使回心血量减少和微血栓形成,导致心脏缺血缺氧,甚至发生栓塞<sup>[38,39]</sup>。Kirchengast

*et al*<sup>[40]</sup>研究显示用内皮素受体拮抗剂不仅对治疗SAP有良好的效果, 而且在阻滞心血管疾病发生方面也有很好的效果. 因此, 内皮素在SAP心脏损伤中起了重要作用.

2.1.3 PLA<sub>2</sub> PLA<sub>2</sub>对心肌的损害主要为对心肌细胞中的膜结构的破坏, 这是因为磷脂是构成细胞膜和细胞器膜的主要物质基础, 而PLA<sub>2</sub>可以破坏磷脂正常的代谢, 使膜结构损坏和功能紊乱, 最终使细胞变性、坏死<sup>[41-44]</sup>. 有研究证明, PLA<sub>2</sub>升高可使心肌组织的超微结构改变, 包括细胞膜破坏出现髓样结构, 线粒体增生、肿胀、溶解, 肌丝溶解断裂等<sup>[42,44]</sup>. 另有研究显示, PLA<sub>2</sub>能抑制心肌质膜的钙泵, 使心肌细胞内钙离子浓度降低, 造成心肌细胞功能下降<sup>[44-46]</sup>. 此外, PLA<sub>2</sub>是调控PAF、白细胞三烯(leucotriene, LT)等合成的关键酶, PLA<sub>2</sub>活性的升高可诱导这些介质对心肌的损害<sup>[47]</sup>.

2.1.4 ETX SAP时产生大量的ETX引起内毒素血症, 可导致休克、DIC、甚至多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 其中ETX对心脏的损害是其重要毒性作用之一. 内毒素引起心脏损害的原因很多, 主要与下列因素有关: (1)内毒素可以直接或间接激活血管的内皮细胞, 促进内皮细胞释放大量细胞因子(IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 等), 导致心肌细胞内能量代谢紊乱, 心肌脂质过氧化和氧自由基产生增多, 进一步引起血管内皮细胞、心肌细胞的功能和结构的损伤<sup>[48-50]</sup>; (2)细菌内毒素的心脏毒性作用<sup>[51]</sup>; (3)内毒素可以诱导NO水平发生剧烈波动, 先快速降低然后又急速上升<sup>[52-53]</sup>. NO对血管的作用快速而直接, 他的剧烈波动对血管的影响相当不利, 尤其对心脏的血管<sup>[54-56]</sup>.

2.1.5 PAF PAF是一种强效的内源性磷脂类介质, 可由血小板、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等多种细胞产生. SAP时当细胞受到TNF、IL-1、IL-8及ETX等刺激后, 可形成并释放大量活化的PAF, 其生物学活性是通过与反应性细胞膜上的PAF受体的结合而发挥的<sup>[57]</sup>. SAP时PAF损伤心脏的机制可能有: (1)PAF通过G蛋白偶联受体使心肌产生负性肌力作用, 其具体机制还不是很明确, 磷酸肌醇3激酶 $\gamma$ 和一氧化碳合成酶3可能参与了这一过程<sup>[58]</sup>. (2)PAF通过激活中性粒细胞、促进中性粒细胞的黏附聚集、增加氧自由基的释放等, 在加重心肌缺血再灌注损伤中有着重要的作用<sup>[59]</sup>. Loucks *et al*<sup>[60]</sup>实验显示在心肌缺血再灌注损伤时PAF可能通过调整血管内皮一氧化

碳合成酶mRNA的表达诱导心肌细胞发生凋亡. (3)PAF可以活化血小板, 促进血小板聚集、血栓形成和损害血管内皮细胞使血管通透性增加<sup>[61]</sup>, 造成心脏微循环障碍, 导致心肌缺血缺氧, 甚至发生梗塞. (4)心脏自身可以产生PAF, 表达PAF受体, 在导致心脏疾病中也有重要作用<sup>[62]</sup>.

2.1.6 NO NO是一种无机小分子化合物, 属于一种自由基, 在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化下以左旋精氨酸为底物而生成, 是重要的舒血管物质. 其作用具有双重性, 小剂量NO常有细胞保护作用, 而过量NO与许多疾病的发生有关<sup>[56]</sup>. 赵敏 *et al*<sup>[63]</sup>研究显示, 从诱导产生急性坏死性胰腺炎后5 min, 就开始持续产生大量的NO, 通过产生过氧化的硝酸盐或其毒性中间产物损伤组织细胞, 加重胰腺的损伤. 过量NO促进了SAP所致的心脏损伤, 其机制可能为: (1)NO引起持续性血管扩张, 造成顽固性低血压, 使心肌缺血缺氧<sup>[64]</sup>; (2)参与心肌缺血再灌注损伤. Di Napoli *et al*<sup>[65]</sup>动物试验证明, 持续给予NOS抑制剂可以显著降低心肌缺血再灌注时的损伤.

2.2 心肌细胞离子电流的变化 研究心肌细胞离子电流的变化, 了解心肌细胞电生理特性的改变, 对于理解心律失常发生的机制具有重要作用, 这与心肌细胞钠通道电流(I<sub>Na</sub>)、L-钙通道电流(I<sub>Ca-L</sub>)活性有关. 丁超*et al*<sup>[66]</sup>研究表明, SAP时心室肌细胞I<sub>Na</sub>、I<sub>Ca-L</sub>的电压依赖性、I-V曲线形态轨迹未变, 但I<sub>Na</sub>、I<sub>Ca-L</sub>电流密度明显下降. I<sub>Na</sub>内流形成细胞动作电位的上升相, 同时也是心脏组织传导速度的一个决定因素, 钠快速内流受阻, 冲动传导减慢, 可导致兴奋折返性心律失常. I<sub>Ca-L</sub>在心脏复极中起重要作用, SAP时心室肌细胞I<sub>Ca-L</sub>受到抑制, 其峰值电流明显降低, 可引起心室肌细胞动作电位2相时程相对缩短, 复极加速, 容易形成室内折返, 发生室性心律失常. 其可能的机制主要是: (1)SAP通过体内存在的炎症介质如IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-12等各种细胞因子以及内毒素、血小板活化因子、心肌抑制因子、磷脂酶A<sub>2</sub>等可使心肌细胞离子电流发生变化导致心肌的损伤<sup>[67-70]</sup>; (2)SAP炎症渗出刺激腹腔神经丛, 反射性引起冠脉痉挛也可通过改变心肌细胞离子电流导致心肌缺血<sup>[71-73]</sup>.

2.3 心肌细胞的凋亡 细胞凋亡是指细胞接受某种信号或受到某些因素刺激后, 为了维持内环境稳定, 而发生的一种主动性消亡过程, 又称程序性细胞死亡. 他不同于组织坏死或突发性细胞死亡. 有证据表明, 心肌缺血、低氧、缺血再灌

#### ■创新盘点

文章将SAP心脏并发症的发病机制、临床表现、诊断结合起来, 论述了心肌细胞离子电流的变化和心肌细胞的凋亡可能参与发病的机制.

### ■应用要点

本文可以增加读者对SAP时心脏并发症的认识,进一步提高读者对SAP及其心脏并发症的预防和治疗观念。

注损伤、心肌过负荷、细胞内钙超载、自由基形成、高浓度血管紧张素II及去甲肾上腺素、病毒感染、先天发育不良等均可引起心肌细胞凋亡<sup>[74-76]</sup>。SAP时引起细胞凋亡的机制可能是:(1)SAP早期低血容量、缺氧、疼痛和应激等可使心肌 $\beta$ -肾上腺素能神经兴奋性增加;SAP大量渗液进入腹腔后,刺激腹腔神经丛反射性引起包括冠状动脉在内的广泛血管痉挛,这些都导致心肌缺血缺氧。Hauck *et al*<sup>[77]</sup>认为缺氧导致细胞死亡的主要方式通过诱导细胞凋亡而产生。他可激活心肌细胞Caspases家族,裂解心肌细胞DNA和破坏钙泵功能,造成心肌细胞凋亡<sup>[78-80]</sup>;(2)SAP时产生大量氧自由基,其细胞毒作用的重要机制之一就是诱导心肌细胞凋亡。氧自由基可以使胞膜的葡萄糖与脂质过氧化,蛋白质变性,酶失活,并使细胞内的DNA链断裂,从而诱导细胞凋亡<sup>[81-83]</sup>;而抑制凋亡的基因Bcl-2主要分布于线粒体内膜、细胞内膜表面、核膜等膜结构处,氧自由基破坏膜结构使Bcl-2基因表达受阻,进一步促进心肌细胞的凋亡<sup>[83]</sup>;(3)SAP时大量产生的TNF- $\alpha$ 可以诱导心肌细胞的凋亡。刘亮 *et al*<sup>[84]</sup>实验证明在心肌缺血再灌注损伤时,给予抗肿瘤坏死因子单克隆抗体能明显降低TNF- $\alpha$ 水平和减轻心肌细胞凋亡程度。

2.4 其他 (1)SAP时产生的剧烈疼痛,通过神经反射,导致冠状动脉痉挛引起心肌缺血而出现心绞痛,或通过神经反射导致各种心律失常<sup>[85,86]</sup>;(2)SAP时胰蛋白酶直接损害心肌或高浓度胰蛋白酶引起高凝状态,促使冠状动脉内血小板凝集及血栓形成,并且胰腺释放的心肌抑制因子及坏死物质对心肌也有毒性作用<sup>[87,88]</sup>;(3)SAP时胰酶通过各种管道进入心包,引起心外膜脂肪坏死和心包积液<sup>[89,90]</sup>;(4)SAP引起微循环障碍,可能诱发心脏冠状动脉微循环障碍,使冠状动脉过度扩张或痉挛,血流速度降低,心肌缺血缺氧,发生心绞痛等症状<sup>[91,92]</sup>。(5)SAP时的电解质紊乱也是发生胰心综合征的重要因素,尤其是低钙血症,另外有效血容量的降低致冠状动脉供血不足也可引发胰心综合征<sup>[90,93-96]</sup>。

以上,我们论述了SAP时心脏损伤的临床表现和损伤机制,随着对SAP时心脏损伤的逐渐重视和损伤机制的进一步明确,以及实验室诊断技术的进步,显示了对SAP时心脏保护和治疗的良好的前景。Bulava *et al*<sup>[97]</sup>报道用血管形成术来改善SAP时的心功能。Yekebas *et al*<sup>[98]</sup>动物实验证明缓激肽拮抗剂艾替班特能明显延缓SAP时心血

管循环系统的损害,延长存活时间。中医治疗临床多有报道,如益活清胰汤、大黄附子汤、大黄牡丹汤、大承气汤、复元活血汤、柴苓承气汤、丹参注射液、生脉注射液等,都取得了很好的疗效<sup>[99-101]</sup>。

### 3 参考文献

- 1 Ates F, Kosar F, Aksoy Y, Yldrm B, Sahin I, Hilmioğlu F. QT interval analysis in patients with acute biliary pancreatitis. *Pancreas* 2005; 31: 238-241
- 2 Rubio-Tapia A, Garcia-Leiva J, Asensio-Lafuente E, Robles-Diaz G, Vargas-Vorackova F. Electrocardiographic abnormalities in patients with acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 815-818
- 3 Sakagami J, Kataoka K, Sogame Y, Usui N, Kanemitsu D, Takada R, Ito R, Motoyoshi T, Mitsuyoshi M, Yasuda H, Mitsufuji S, Okanoue T. Increased QT dispersion in patients with alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 2004; 28: 380-386
- 4 董艳妮, 乔燕燕. 非梗死性Q波的鉴别诊断. 实用心电图学杂志 2004; 13: 359
- 5 Albrecht CA, Laws FA. ST segment elevation pattern of acute myocardial infarction induced by acute pancreatitis. *Cardiol Rev* 2003; 11: 147-151
- 6 Pezzilli R, Barakat B, Billi P, Bertaccini B. Electrocardiographic abnormalities in acute pancreatitis. *Eur J Emerg Med* 1999; 6: 27-29
- 7 姜崔华, 朱玉生. 急性出血坏死性胰腺炎心电图改变的预后意义. 现代中西医结合杂志 2002; 11: 641
- 8 Mofrad PS, Rashid H, Tracy CM. New-onset QT prolongation and torsades de pointes accompanied by left ventricular dysfunction secondary to acute pancreatitis. *Pacing Clin Electrophysiol* 2003; 26: 1765-1768
- 9 Yahalom M, Gellerman M, Wishniak A, Brezins M, Roguin N. The clinical significance of postictal electrocardiographic changes mimicking acute myocardial infarction. *Harefuah* 2003; 142: 80
- 10 Wu AH. Markers for early detection of cardiac diseases. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2005; 240: 112-121
- 11 Ramsay J, Shernan S, Fitch J, Finnegan P, Todaro T, Filloon T, Nussmeier NA. Increased creatine kinase MB level predicts postoperative mortality after cardiac surgery independent of new Q waves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129: 300-306
- 12 Damry N, Anaye A, Tran E, Avni F, Christophe C. Acute myocardial infarction and MRI: a comparison of infarct size by MRI and peak creatine kinase after a first episode. *Ann Cardiol Angeiol* 2005; 54: 250-256
- 13 郭衡山. 急性心肌梗死血清酶谱和生化指标的变化及其临床意义. 新医学 1999; 30: 727-728
- 14 Randeve HS, Bolodeoku J, Mikhailidis DP, Winder AD, Press M. Elevated serum creatine kinase activity in a patient with acute pancreatitis. *Int J Clin Pract* 1999; 53: 482-483
- 15 Karachaliou I, Papadopoulou K, Karachalios G, Charalabopoulos A, Papalimneou V, Charalabopoulos K. An increase in creatine kinase secondary to acute pancreatitis: a case report. *Int J Clin Pract Suppl* 2005; 147: 40-42
- 16 Khan IA, Wattanasuwan N. Role of biochemical markers in diagnosis of myocardial infarction. *Int J*

- Cardiol* 2005; 104: 238-240
- 17 章华萍, 徐颖鹤, 林荣海. 肌钙蛋白I测定在急性胰腺炎中的意义. *中国现代医学杂志* 2001; 11: 38-41
  - 18 Scirica BM, Morrow DA. Troponins in acute coronary syndromes. *Prog Cardiovasc Dis* 2004; 47: 177-188
  - 19 Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* 2005; 173: 1191-1202
  - 20 Adams JE 3rd, Schechtman KB, Landt Y, Ladenson JH, Jaffe AS. Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. *Clin Chem* 1994; 40: 1291-1295
  - 21 Cubrilo-Turek M, Topic E, Stefanovic M, Simundic AM, Kern J, Pilas V. New biochemical markers in the assessment of minor myocardial damage in critically ill patients. *Acta Med Croatica* 2004; 58: 381-388
  - 22 Yu AC, Riegert-Johnson DL. A case of acute pancreatitis presenting with electrocardiographic signs of acute myocardial infarction. *Pancreatology* 2003; 3: 515-517
  - 23 栾开建, 马东升. 胰心综合征临床特点与发病机制. *中国危重病急救医学* 2005; 17: 164
  - 24 曾靖. 胰心综合征的临床特点及其意义. *中国危重病急救医学* 1997; 9: 174
  - 25 张妞. 急性坏死性胰腺炎的心肺损伤. *国外医学外科学分册* 1999; 26: 208-210
  - 26 Gao Q, Zhang SZ, Cao CM, Bruce IC, Xia Q. The mitochondrial permeability transition pore and the Ca(2+)-activated K(+) channel contribute to the cardioprotection conferred by tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine* 2005; 28:
  - 27 Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 2000; 87: 241-247
  - 28 Rodriguez DA, Moncada C, Nunez MT, Lavandero S, Ponnappa BC, Israel Y. Ethanol increases tumor necrosis factor-alpha receptor-1 (TNF-R1) levels in hepatic, intestinal, and cardiac cells. *Alcohol* 2004; 33: 9-15
  - 29 D'Ascia C, Cittadini A, Monti MG, Riccio G, Sacca L. Effects of biventricular pacing on interstitial remodelling, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptotic death in failing human myocardium. *Eur Heart J* 2005; 16:
  - 30 李祥平, 许顶立, 贾满盈. 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和血管紧张素 II 对心肌细胞的细胞间粘附分子-1表达的影响. *中国病理生理杂志* 2000; 16: 77
  - 31 Pevni D, Frolkis I, Shapira I, Schwartz D, Yuhay Y, Schwartz IF, Chernichovski T, Uretzky G. Heparin added to cardioplegic solution inhibits tumor necrosis factor-alpha production and attenuates myocardial ischemic-reperfusion injury. *Chest* 2005; 128: 1805-1811
  - 32 Goodwin AT, Amrani M, Gray CC, Jayakumar J, Marchbank AJ, Yacoub MH. Differential effects of endothelin-1 on isolated working rat hearts before and after ischaemia and reperfusion. *Clin Sci* 2002; 103: 189-193
  - 33 Zeng XH, Zhu SQ, Zhang XM, Luo WJ, Li SW. Plasma endothelin and nitric oxide levels in patients with acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 140-142
  - 34 Widlitz AC, Barst RJ, Horn EM. Sitaxsentan: a novel endothelin-A receptor antagonist for pulmonary arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 985-991
  - 35 Gourine AV, Gonon AT, Pernow J. Involvement of nitric oxide in cardioprotective effect of endothelin receptor antagonist during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: 1105-1112
  - 36 Sugden PH, Clerk A. Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 343-351
  - 37 Wainwright CL, McCabe C, Kane KA. Endothelin and the ischaemic heart. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 333-341
  - 38 Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T. Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis. *Gut* 2000; 46: 390-394
  - 39 Plusczyk T, Bersal B, Menger MD, Feifel G. Differential effects of ET-1, ET-2, and ET-3 on pancreatic microcirculation, tissue integrity, and inflammation. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1343-1351
  - 40 Kirchengast M, Luz M. Endothelin receptor antagonists: clinical realities and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 182-191
  - 41 Mayer JM, Laine VJ, Kolodziej S, Nevalainen TJ, Beger HG. Acute pancreatitis in transgenic mice expressing human group IIA phospholipase A2. *Pancreas* 2002; 25: 188-191
  - 42 吴晓云, 匡凤梧, 罗子国, 邓兵, 吴春, 王兴勇. 体外循环中心肌组织胞浆型磷脂酶A2- $\gamma$ 亚型激活与心肌细胞损伤关系的研究. *中国危重病急救医学* 2005; 17: 417-420
  - 43 De Windt LJ, Willems J, Roemen TH, Coumans WA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ, Van Bilsen M. Ischemic-reperfused isolated working mouse hearts: membrane damage and type IIA phospholipase A2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: 2572-2580
  - 44 张红, 李永渝. 磷脂酶A2在大鼠急性胰腺炎并发肺损伤中的作用及维拉帕米的治疗效应. *中国危重病急救医学* 2003; 15: 418-421
  - 45 Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res* 2004; 95: 1140-1153
  - 46 Xiao YF, Zeind AJ, Kaushik V, Perreault-Micale CL, Morgan JP. Mechanism of suppression of cardiac L-type Ca(2+) currents by the phospholipase A(2) inhibitor mepacrine. *Eur J Pharmacol* 2000; 399: 107-116
  - 47 刘洪斌, 崔乃强, 李东华, 王倩. 磷脂酶A2与NF- $\kappa$ B活化在大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤中的作用. *中国中西医结合外科杂志* 2004; 11: 115-119
  - 48 Geisler F, Algul H, Riemann M, Schmid RM. Questioning current concepts in acute pancreatitis: endotoxin contamination of porcine pancreatic elastase is responsible for experimental pancreatitis-associated distant organ failure. *J Immunol* 2005; 174: 6431-6439
  - 49 Wang X, Wu L, Wu K, Zhang R, Dong Y. Roles of endotoxin-related signaling molecules in the progression of acute necrotizing pancreatitis in mice. *Pancreas* 2005; 31: 251-257
  - 50 Pitcher JM, Tsai BM, Wang M, Kher A, Brown JW, Meldrum DR. Sexual dimorphism in myocardial tumor necrosis factor-alpha and cardiac function during endotoxin tolerance. *Surgery* 2005; 138: 223-228

## ■名词解释

细胞凋亡是指细胞接受某种信号或受到某些因素刺激后为了维持内环境稳定而发生的一种主动性消亡过程,属于细胞的自杀性死亡.细胞凋亡又可称之为程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),因他常涉及一系列的基因激活、表达以及调控等作用.虽然目前人们常习惯于将细胞凋亡和程序性细胞死亡互用,但事实上二者在概念上还是有区别的.细胞凋亡可以说是一种形态学概念,而程序性细胞死亡则是机制或功能方面的概念,强调这种细胞死亡是一个有序的过程,该过程一经启动,便会按既定的程序自动进行下去.

### ■同行评价

重症急性胰腺炎以发病急、进展快、死亡率高所著称,对其发病机制、病理生理变化和临床表现的研究,对提高人们对该疾病的认识以及进一步指导临床治疗有重要意义,本文选题有实际应用价值。

- 51 Tissier S, Lancel S, Marechal X, Mordon S, Depon-tieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R. Calpain inhibitors improve myocardial dysfunction and inflammation induced by endotoxin in rats. *Shock* 2004; 21: 352-357
- 52 Thiru Y, Pathan N, Bignall S, Habibi P, Levin M. A myocardial cytotoxic process is involved in the cardiac dysfunction of meningococcal septic shock. *Crit Care Med* 2000; 28: 2979-2983
- 53 Arlati S, Brenna S, Prencipe L, Marocchi A, Casella GP, Lanzani M, Gandini C. Myocardial necrosis in ICU patients with acute non-cardiac disease: a prospective study. *Intensive Care Med* 2000; 26: 31-37
- 54 Kozlov AV, Albrecht M, Donnelly EM, Jafarmadar M, Szelenyi Z, Nohl H, Redl H, Bahrami S. Release and hemodynamic influence of nitro-glycerine-derived nitric oxide in endotoxemic rats. *Vascul Pharmacol* 2005; 43: 411-414
- 55 Kovesi T, Szabo A, Royston D, Marczin N. Correlation between pulmonary gas exchange and basal and nitroglycerin (GTN)-induced exhaled nitric oxide (eNO) in patients undergoing cardiac surgery. *Vascul Pharmacol* 2005; 43: 434-440
- 56 张在兴, 孙家邦. -氧化氮生物学作用的两面性与急性胰腺炎. 首都医科大学学报 2001; 22: 282-284
- 57 宋颖芳, 李焕章. 血小板激活因子与急性肺损伤. 国外医学呼吸系统分册 2004; 24: 228-230
- 58 Alloatti G, Levi R, Malan D, Del Sorbo L, Bosco O, Barberis L, Marcantoni A, Bedendi I, Penna C, Az-zolino O, Altruda F, Wymann M, Hirsch E, Mon-trucchio G. Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient hearts are protected from the PAF-dependent depression of cardiac contractility. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 242-249
- 59 Hu G, Vasiliasukas T, Salem MR, Rhone DP, Crystal GJ. Neutrophils pretreated with volatile anesthetics lose ability to cause cardiac dysfunction. *Anesthesiology* 2003; 98: 712-718
- 60 Loucks EB, Godin DV, Walley KR, McManus BM, Rahimian R, Granville DJ, Hong JM, Aktary FM, Qayumi AK. Role of platelet activating factor in cardiac dysfunction, apoptosis and nitric oxide synthase mRNA expression in the ischemic-reperfused rabbit heart. *Can J Cardiol* 2003; 19: 267-274
- 61 Wang WZ, Guo SZ, Tsai TM, Anderson GL, Miller FN. Platelet-activating factor contributes to post-ischemic vasospasm. *J Surg Res* 2000; 89: 139-146
- 62 Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2000; 80: 1669-1699
- 63 赵敏, 陈瑞芬, 周以健. 内源性-氧化氮在急性出血坏死性胰腺炎发病中的作用. 首都医科大学学报 2003; 24: 243-246
- 64 陈爱华. -氧化氮与心脑血管疾病. 中国医药导刊2000; 2: 6-8
- 65 Di Napoli P, Taccardi AA, Grilli A, De Lutis MA, Barsotti A, Felaco M, De Caterina R. Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 462-471
- 66 丁超, 胡丽叶, 齐书英. 急性坏死性胰腺炎对心室肌细胞钠和钙离子电流的影响. 中国病理生理杂志 2004; 20: 1609-1611
- 67 Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* 2000; 47: 546-452
- 68 Takeda K. Role of increase in permeability and circulatory failure in the development of organ dysfunction in severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 1999-2004
- 69 Uehara S, Gothoh K, Handa H, Tomita H, Tomita Y. Immune function in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 363-370
- 70 Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001; 128: 13-16
- 71 王建营, 刘淑君. 用心阻抗图观察急性胰腺炎患者心功能. 中国心血管杂志 2001; 6: 354
- 72 艾宇航, 徐道妙, 陈江辉. 重症急性胰腺炎并发心肌损害. 中国普通外科杂志 2000; 9: 339-342
- 73 Khairy P, Marsolais P. Pancreatitis with electrocardiographic changes mimicking acute myocardial infarction. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 522-526
- 74 Sabbah HN, Sharov VG, Goldstein S. Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 2000; 5: 131-138
- 75 Mel'nikova NP, Timoshin SS, Jivotova EY, Pellinemi LJ, Jokinen E, Abdelwahid E. Angiotensin-II activates apoptosis, proliferation and protein synthesis in the left heart ventricle of newborn albino rats. *Int J Cardiol* 2005; 15:
- 76 张毓芳, 刘恩桥. 细胞凋亡与心血管疾病研究进展. 中国心血管杂志 2004; 9: 385-387
- 77 Hauck L, Hansmann G, Dietz R, von Harsdorf R. Inhibition of hypoxia-induced apoptosis by modulation of retinoblastoma protein-dependent signaling in cardiomyocytes. *Circ Res* 2002; 91: 782-789
- 78 Laugwitz KL, Moretti A, Weig HJ, Gillitzer A, Pinkernell K, Ott T, Pragst I, Stadele C, Seyfarth M, Schomig A, Ungerer M. Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 2051-2063
- 79 Li H, Kolluri SK, Gu J, Dawson MI, Cao X, Hobbs PD, Lin B, Chen G, Lu J, Lin F, Xie Z, Fontana JA, Reed JC, Zhang X. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 2000; 289: 1159-1164
- 80 Henaff M, Antoine S, Mercadier JJ, Coulombe A, Hatem SN. The voltage-independent B-type Ca<sup>2+</sup> channel modulates apoptosis of cardiac myocytes. *FASEB J* 2002; 16: 99-101
- 81 von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 1999; 99: 2934-2941
- 82 Stangl V, Baumann G, Stangl K, Felix SB. Negative inotropic mediators released from the heart after myocardial ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 12-30
- 83 方宏, 冯义柏, 方盈. 缺氧前激活  $\alpha_1$  受体对心肌细胞凋亡的影响及机制. 中国病理生理杂志 2005; 21: 714-717
- 84 刘亮, 张万义, 叶平. 抗肿瘤坏死因子单克隆抗体对心肌细胞凋亡的影响. 军医进修学院学报 2004; 25: 404-405
- 85 李广阔, 田伏洲, 栗永萍. 继发性胰腺感染对重症胰腺炎患者预后的影响. 中国危重病急救医学 2004; 16: 2-5
- 86 Ro TK, Lang RM, Ward RP. Acute pancreatitis mimicking myocardial infarction: evaluation with myocardial contrast echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2004; 17: 387-390
- 87 那开究. 谈谈胰心综合征. 中国临床医生 2000; 28: 49-50
- 88 Haddad NG, Croffie JM, Eugster EA. Pancreatic enzyme elevations in children with diabetic keto-acidosis. *J Pediatr* 2004; 145: 122-124
- 89 罗小岚, 赵延恕, 赵水平. 重症急性胰腺炎的心血管表

- 现. 中国现代医学杂志 2004; 14: 82-83
- 90 Imperadore F, Accardi R, Spagnolli W, Bonadies D, Vergara G. Heart arrest caused by ventricular fibrillation in acute biliary pancreatitis: a case report and etiopathogenetic hypothesis. *Ital Heart J Suppl* 2000; 1: 419-422
- 91 Nishikawa S, Ito K, Takata H, Tsubakimoto Y, Yuba T, Adachi Y, Kato S, Azuma A, Sugihara H, Nakagawa M. Assessment of microcirculation disturbance with nuclear cardiology in a patient with coronary ectasia: a case report. *Kaku Igaku* 2003; 40: 17-22
- 92 Nakano A, Lee JD, Shimizu H, Ueda T. Microvascular angina, adverse outcome: a case report. *Int J Cardiol* 2005; 98: 501-502
- 93 Zwadlo C, Borlak J. Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and Ca(2+)-handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207: 244-256
- 94 Eyben FE, Graugaard C, Vaeth M. All-cause mortality and mortality of myocardial infarction for 989 legally castrated men. *Eur J Epidemiol* 2005; 20: 863-869
- 95 Mantadakis E, Anagnostatou N, Smyrnaki P, Spanaki AM, Papavasiliou ES, Briassoulis G, Kalmanti M. Life-threatening hypercalcemia complicated by pancreatitis in a child with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27: 288-292
- 96 Targos B, Baranowska J, Pomorski P. Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 379-409
- 97 Bulava A, Skvarilova M, Marek O, Lukl J. Electrocardiographic changes in patients with acute pancreatitis. Case report and review of the literature. *Vnitr Lek* 2001; 47: 407-410
- 98 Yekebas E, Treede H, Jochum M, Gippner-Steppert C, Bloechle C, Knoefel WT, Scholz J, Fink E, Izbicki JR. Bradykinin B2-receptor antagonism attenuates fatal cardiocirculatory breakdown induced by severe experimental pancreatitis. *Crit Care Med* 2000; 28: 1119-1127
- 99 陈龙, 牟科媛. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎. 实用中西医结合临床 2005; 5: 13
- 100 欧宏宇. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎临床观察. 中华中医药杂志 2005; 20: 408-409
- 101 路小光, 战丽彬, 曲明阳. 大黄附子汤对重症急性胰腺炎大鼠细胞因子的影响. 中国中西医结合急救杂志 2004; 11: 352-354

电编 张勇 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

## 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议

本刊讯 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议将于2006-08在哈尔滨举行, 现将征文通知公布如下:

### 1 稿件要求及截稿日期

全文(3 000字), 结构式摘要(1 000字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-05-31截稿.

### 2 联系方式

哈尔滨市南岗区学府路45号解放军第211医院中医科 孙旗立; 邮编: 150080; 电话: 0451-57752440; E-mail: 211zyke@163.com.

# 医用微型机器人对肠道损伤的探讨

刘金华, 王树卿, 刘丹阳

## ■背景资料

目前应用在医学领域的机器人有脑外科机器人和应用在肠道内的胶囊机器人。胶囊机器人只能进行图像采集,而不能进行标本采集和具体治疗,微型软体机器人的不断改进和完善会给医学带来新的治疗手段。

刘金华, 王树卿, 刘丹阳, 佳木斯大学附属第一医院 黑龙江省佳木斯市 154003  
黑龙江省研究生创新科研项目, No. YJSCX2005-122HLJ  
通讯作者: 王树卿, 154003, 黑龙江省佳木斯市德祥街238号, 佳木斯大学附属第一医院. 0408flower@163.com  
电话: 0454-8623332 传真: 0454-8632305  
收稿日期: 2006-01-01 接受日期: 2006-01-21

## Investigation of miniature robot-induced injury in intestinal tract

Jin-Hua Liu, Shu-Qing Wang, Dan-Yang Liu

Jin-Hua Liu, Shu-Qing Wang, Dan-Yang Liu, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, Heilongjiang Province, China  
Supported by the Graduate Student Innovation Foundation of Heilongjiang, No. YJSCX2005-122HLJ  
Correspondence to: Shu-Qing Wang, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, 238 Dexiang Street, Jiamusi 154003, Heilongjiang Province, China. 0408flower@163.com  
Received: 2006-01-01 Accepted: 2006-01-21

## Abstract

**AIM:** To investigate whether the application of miniature robot can result in intestinal injury.

**METHODS:** Experimental pig intestines ( $n = 20$ ) were used in this study. Tissue sections were prepared from where the miniature robot passed. The structures of the intestinal mucosa were observed under light microscope.

**RESULTS:** Intact structures of intestines were observed under microscope. All the 20 pieces of pig intestines had no ruptures and shedding of microvilli, and injuries of submucosa.

**CONCLUSION:** The miniature robot can walked through the intestinal tract and do no harm to the intestinal mucosa.

**Key Words:** Miniature robot; Small intestines of pigs; Trauma

Liu JH, Wang SQ, Liu DY. Investigation of miniature robot-induced injury in intestinal tract. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):618-620

## ■研发前沿

本文研究的热点和重点是微型软体机器人对肠道的作用。

## 摘要

**目的:** 探讨医用微型机器人在肠道内行走是否对肠道造成损伤。

**方法:** 完整肠系膜的猪小肠20根,对机器人行走过的肠道进行切片检查,显微镜下观察小肠组织结构。

**结果:** 镜下显示猪小肠组织结构完整,20例猪小肠都没有出现小肠微绒毛断裂、脱落,黏膜下层没有出现组织破损,肌层的平滑肌完好无损。

**结论:** 该医用微型机器人没有对肠道造成损伤。

**关键词:** 医用微型机器人; 猪小肠; 损伤

刘金华, 王树卿, 刘丹阳. 医用微型机器人对肠道损伤的探讨. *世界华人消化杂志* 2006;14(6):618-620  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/618.asp>

## 0 引言

微型机器人是机器人领域的一个分支,是先进科学技术发展的必然结果,是我国科教兴国战略带来的一项成果.我国机器人领域经过十几年的研制、生产、应用,得到了飞速的发展,特别是863计划的实施,使我国基本掌握了喷涂机器人、弧焊机器人、点焊机器人、搬运机器人、装配机器人、特种机器人<sup>[1]</sup>的设计制造技术,而且还解决了控制、驱动系统的设计和配置、软件的设计和编制等关键技术,本实验设计的微型机器人是受到医学领域的脑外科机器人<sup>[2]</sup>和内镜治疗疾病<sup>[3-17]</sup>的启发,采用负压吸引装置抓吸小肠.将来随着实验的深入,其可能会应用到普通外科和消化内科.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 新鲜的带完整肠系膜的猪小肠20根、医用微型机器人、负压吸引机、主机、冷光源、显示器、固定液、冰箱、切片机、显微镜、微机等。

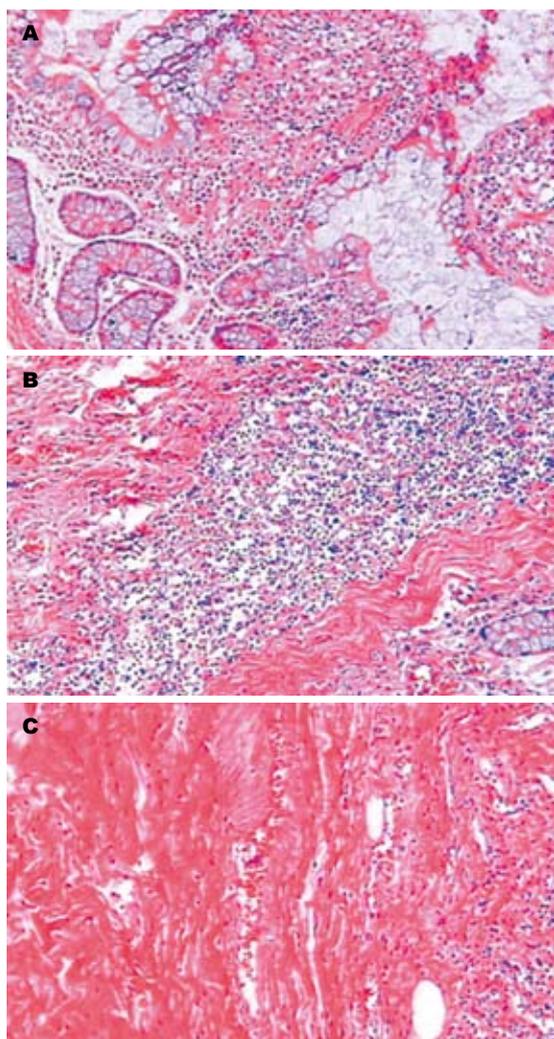


图1 机器人工作部抓吸过的小肠. A: 小肠微绒毛; B: 小肠黏膜下层; C: 小肠肌层.

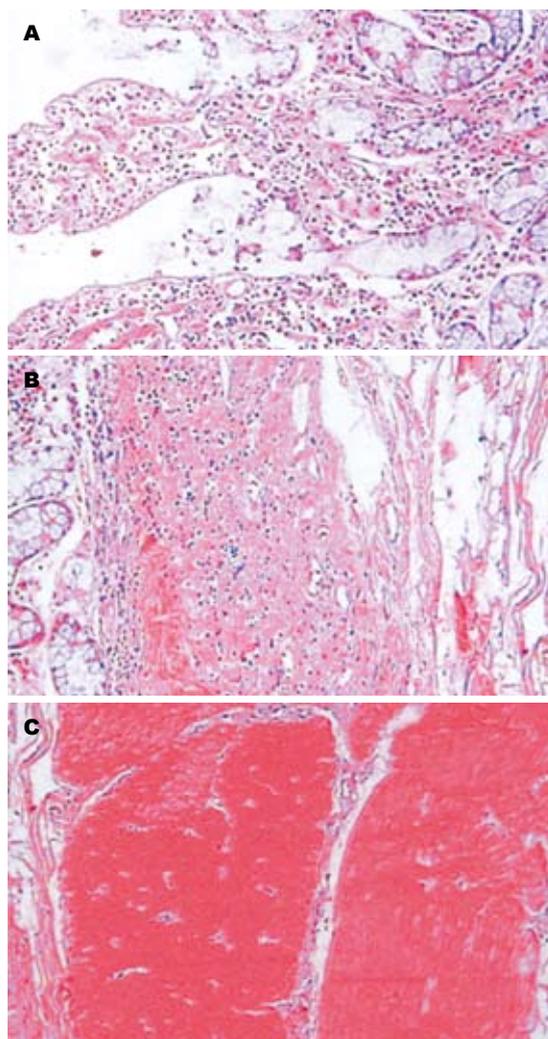


图2 未被机器人工作部抓吸过的小肠. A: 小肠微绒毛; B: 小肠黏膜下层; C: 小肠肌层.

**■应用要点**  
本文为负压吸引原理的机器人提供了科学的实验依据, 将进一步完善机器人的性能和结构的优化.

1.2 方法 在机器人工作部抓吸过小肠的地方用笔标记, 同时取材固定做切片, 显微镜下观察小肠组织结构有无损伤. 同时在一根肠道内未被工作部抓吸的地方也取材固定做切片, 对比观察看是否出现小肠微绒毛断裂、黏膜下层受损或者是肌层出现断裂等现象.

**统计学处理** 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,  $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

镜下组织切片发现机器人工作部抓吸过的20例小肠都没有出现小肠微绒毛断裂、脱落, 黏膜下层没有出现组织破损, 肌层的平滑肌完好无损( $P < 0.01$ , 图1). 未被工作部抓吸的地方也取材固定做切片(图2). 微型机器人能够行走, 借助连接身体外的负压吸引装置所产生的负压吸引力在操作者的控制下能够从十二指肠端顺利进入

小肠. 机器人的构造原理采用软体设计, 气动装置, 负压吸引产生动力为原理, 工作部好似寄生虫的吸盘. 机器人能够行走的压力值要大于 $3.50 \times 10^3 \text{ kPa}$ 的负压吸引值, 在行走过程中有滑脱现象, 滑脱的相对肠管长度约是 $0.04 \text{ m}$ , 加大体外外部负压后, 滑脱现象消失, 滑脱现象消失的压力值要大于 $3.60 \times 10^3 \text{ kPa}$ 的负压吸引力. 工作部负压值为 $-3\ 600 \pm 100 \text{ kPa}$ , 所消耗的时间为 $1.02 \pm 0.04 \text{ h}$ .

## 3 讨论

通过实验证明该医用微型机器人在肠道内行走对肠壁未造成任何损害, 行走过的肠道特别是被抓吸过的肠壁没有受到破坏. 从片子上可以清晰看出肠微绒毛结构清晰, 黏膜下层亦完好无损, 说明该微型机器人负压抓吸原理可行. 从实验中测得开口面积处产生的压强为 $-3.5 \times 10^3$

### ■名词解释

滑脱现象: 由于吸力值不大导致机器人行走时抓不住肠壁, 造成相对位移缩短的现象。

kPa, 也就是说猪小肠承受负压能力强, 肠道对微型机器人动力臂产生的负压能够承受。因而从客观上保证了微型机器人的进一步制作和深入研究。如果肠道耐受不了行走负压, 那么也就标志了该种设计原理是不可行的。通过对微型机器人行走后对肠道损伤的探讨, 我们知道了该微型机器人行走原理及设计是可行的, 对指导将来活体动物实验提供了客观依据。而且从实验测试中得知, 行走负压尽量不能超过 $-3.7 \times 10^3$  kPa, 为将来提供了实验数据参照。而且通过实验我们还发现肠道的折叠性很强, 仅机器人尾部大约0.2 m的距离就可以折叠近1 m的小肠, 说明肠道还有很强的可折叠性。综上所述, 对肠道的深入研究可以得知肠道各方面的性质, 对指导机器人吸盘的大小、负压值是多少, 都提供了客观的指标。对早日进入临床实验提供了数据支持。

### 4 参考文献

- 1 罗海堤, 李洁, 黄平. 微机器人在消化道内摩擦行为的研究. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2115-2118
- 2 张仕刚, 谢耀钦, 包尚联. 计算机辅助立体定向神经外科手术导航系统. 中国医学影像技术 2004; 20: 82-89
- 3 覃华, 程继华, 侯伟, 李荣香, 赵秋, 刘南植. 经内镜治疗急性胆源性胰腺炎临床疗效/费用分析. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2517-2519
- 4 葛勤利, 杨伟捷, 张红霞. 内镜下综合治疗食管恶性肿瘤85例. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2884-2885
- 5 刘运祥, 黄留业, 吴承荣, 周福润, 刑艳芳, 刘辉. 内镜超声检查评价胃底静脉曲张血栓术. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 248-249
- 6 刘变英, 原丽莉, 侯波. 双气囊电子小肠镜34例应用体会. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 263-265
- 7 温小恒, 陆星华, 钱家鸣. 胶囊内镜在小肠疾病诊断中的应用研究. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 199-200
- 8 赵秋, 覃华, 李荣香, 侯伟, 廖家智, 黎培员, 刘南植, 王家驹. ERCP对肝移植术后胆漏诊治作用的前瞻性临床观察. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 150-153
- 9 张开光, 王巧民, 郑帮海, 吴正祥, 胡运彪. 结肠血管发育不良的肠镜诊治与随访研究. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 380-383
- 10 邵伟, 刘成国. 内镜下金属钛夹联合硬化剂治疗上消化道出血. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 126-127
- 11 刘冈峰, 罗光辉, 黄艳兰, 苏兴桂. 内镜下套扎联合部分脾栓塞术治疗门静脉高压症的临床研究. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 187-188
- 12 李玉明, 顾留根, 王亚民, 钱俊波, 陈天敏, 葛振明, 朱云松, 仇建伟. 鼻胃镜检查1400例临床评估. 中华消化杂志 2005; 25: 687-688
- 13 麻树人, 张宁, 赵志峰, 赵云峰, 潘汝明. 内镜综合治疗慢性胰腺炎. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 158-160
- 14 李凡, 丁一娟, 陈明锴, 蔡佳, 李曦, 罗和生. 结肠镜检查对回盲部溃疡的诊断意义. 中华消化杂志 2004; 24: 376-377
- 15 张文洁, 梁洁华, 杨冬华. 胰腺癌内镜介入治疗的现状与展望. 临床肝胆病杂志 2003; 19: 12-13
- 16 黄勤. Barrett食管内镜和病理学诊断中存在的问题和对策. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 77-79
- 17 李运红, 徐肇敏, 陈隆典, 韩树堂, 于成功, 张志宏. 胶囊内镜诊断小肠出血及与手术结果的对照研究. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 313-315

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

### • 消息 •

## 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教研究人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

# 大鼠溃疡性结肠炎模型肠组织中MIF的表达和NF-κB的激活

黄超, 邓长生

黄超, 邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

通讯作者: 黄超, 430071, 湖北省武汉大学中南医院消化内科. hc2558@126.com

电话: 027-87330294 传真: 027-87330294

收稿日期: 2005-12-12 接受日期: 2005-12-31

## Expression of macrophage migration inhibitory factor and activation of nuclear factor-κB in colon tissues of rats with ulcerative colitis

Chao Huang, Chang-Sheng Deng

Chao Huang, Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Chao Huang, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China. hc2558@126.com

Received: 2005-11-23 Accepted: 2005-11-25

### Abstract

**AIM:** To detect the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and nuclear factor-κB (NF-κB) in the colon tissues of rats with ulcerative colitis, and investigate the role of MIF in pathogenesis of ulcerative colitis.

**METHODS:** Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normal group ( $n = 8$ ), model group I ( $n = 8$ ), model group II ( $n = 8$ ); The rat in model group I and II treated with 50 and 100 mg/kg 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), respectively, to establish light and severe colitis model. The disease activity index (DAI) was calculated every day, and the expression of MIF in colon tissues was detected by semi-quantitative reverse transcription chain reaction (RT-PCR). The expression of NF-κB was examined by immunohistochemistry, and the myeloperoxidase (MPO) activity was detected by biochemistry.

**RESULTS:** In normal group, the MPO activity, DAI, NF-κB and MIF mRNA level were  $0.38 \pm$

$0.18 \text{ U/g}$ ,  $0.51 \pm 0.28$ ,  $0.18 \pm 0.05$  and  $0.11 \pm 0.03$ , respectively; in model group I they were  $1.68 \pm 0.45 \text{ U/g}$ ,  $5.04 \pm 0.73$ ,  $0.62 \pm 0.08$  and  $0.65 \pm 0.04$ , respectively; in model group II they were  $2.70 \pm 0.35 \text{ U/g}$ ,  $8.13 \pm 0.71$ ,  $0.78 \pm 0.11$  and  $0.81 \pm 0.05$ , respectively. In comparison with that in the normal controls, the expression of MIF mRNA increased significantly ( $P < 0.05$ ), and the activity of NF-κB and MPO and DAI also increased significantly ( $P < 0.05$ ) in model group, especially in model group II.

**CONCLUSION:** MIF may be involved in the pathogenesis of TNBS-induced ulcerative colitis and the mechanism may be correlated with NF-κB activation and excessive expression of inflammatory cytokine.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Macrophage migration inhibitory factor; Nuclear factor-κB

Huang C, Deng CS. Expression of macrophage migration inhibitory factor and activation of nuclear factor-κB in colon tissues of rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):621-625

### 摘要

**目的:** 检测其肠组织中巨噬细胞移动抑制因子(MIF), 核因子-κB(NF-κB)的表达, 探讨两者与溃疡性结肠炎(UC)的关系及MIF在UC发病机制中的作用。

**方法:** 采用三硝基苯磺酸(TNBS)溶液诱导大鼠溃疡性结肠炎模型, 动物分为正常组, 轻、重模型组共三组。每天观察各组疾病活动指数(DAI); 采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术, 对肠组织MIF的表达水平进行半定量测定; 应用免疫组织化学染色检测肠组织NF-κB的表达; 生化法检测髓过氧化物酶(MPO)活性。

**结果:** 正常组MPO活性, DAI, NF-κB及MIF mRNA的表达水平依次为  $0.38 \pm 0.18 \text{ U/g}$ ,  $0.51 \pm 0.28$ ,  $0.18 \pm 0.05$ ,  $0.11 \pm 0.03$ ; 模型 I

### ■背景资料

IBD病因和发病机制复杂, 涉及到免疫学、遗传学、内分泌学以及环境因素等多方面的问题。目前免疫因素在IBD发病中的作用已经得到肯定且研究日益深入, 而细胞因子在炎症性肠病免疫发病过程中扮演重要角色, 他能诱导或激活T细胞和B细胞, 并能诱导多种致炎因子的产生, 使炎症局部的中性粒细胞和巨噬细胞聚集, 损害肠黏膜。现已证实IBD中NF-κB具有调节细胞因子产生的作用。

### ■应用要点

1 IBD肠组织MIF的表达量可以反映肠组织的病理损害程度,对于IBD病情的评估,可能具有潜在的指导意义。

2 为寻找有效药物治疗IBD提供新的途径:应用抗MIF抗体或MIF反义mRNA以及MIF受体拮抗剂以阻止MIF的作用,可能有治疗作用,但需进一步探索。

组1.68±0.45 U/g, 5.04±0.73, 0.62±0.08, 0.65±0.04;模型II组2.70±0.35 U/g, 8.13±0.71, 0.78±0.11, 0.81±0.05。与正常组相比,模型组肠组织中MIF mRNA的表达显著增强( $P<0.05$ ), NF- $\kappa$ B和MPO活性及DAI也显著增高( $P<0.05$ ),且在病情严重组增高尤为明显。

**结论:** MIF参与了溃疡性结肠炎的发病过程,其机制可能与激活NF- $\kappa$ B, 诱导炎症细胞因子的过量表达有关。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 巨噬细胞移动抑制因子; 核因子- $\kappa$ B

黄超, 邓长生. 大鼠溃疡性结肠炎模型肠组织中MIF的表达和NF- $\kappa$ B的激活. 世界华人消化杂志 2006;14(6):621-625  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/621.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种非特异性的肠道炎症性疾病,其发病与免疫功能紊乱有关已得到普遍认同,而具有免疫调节作用的细胞因子在UC的发病过程中起重要作用。巨噬细胞移动抑制因子(macroPhage migration inhibitory factor, MIF)是较早发现的淋巴细胞因子之一。现今认为, MIF是集细胞因子、生长因子、激素和酶特性于一身的多效能蛋白分子<sup>[1-2]</sup>,它具有多种生物活性,如抑制活化的巨噬细胞游走、激活淋巴细胞、杀伤肿瘤细胞等,并可诱导巨噬细胞等产生多种促炎因子,以及抑制糖皮质激素的抗炎作用<sup>[3]</sup>。MIF在炎症性疾病的发生发展过程中起着不可忽视的作用,近年来,国外研究<sup>[4-6]</sup>发现MIF与人类炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发病过程有关,但具体发病机制不明。在UC发生、发展过程中,细胞因子扮演了重要角色,且认为与基因启动子结合的核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)的异常活化有关, MIF与这些信号转导因子之间的关系如何,我们通过建立大鼠UC模型,初步探讨了MIF在UC发病过程中的可能机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 24只成年SD♀大鼠,体质量约150-200 g,武汉大学动物实验中心提供; 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)、DEPC, 美国Sigma公司产品; NF- $\kappa$ B P65单克隆抗体, 北京中山试剂公司产品; MPO检测试剂盒, 南京建成生物工程公司产品; Trizol Reagent, 美国GIBCO公司产品;

表1 DAI评分标准

体质量下降(%)	大便性状	大便隐血/肉眼血便	计分
0	正常	正常	0
1-5	松散	隐血阳性	1
5-10			2
10-15	稀便	肉眼血便	3
>15			4

Taq DNA聚合酶, AMV逆转录酶, dNTP, 北京中山生物技术有限公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠处理 24只大鼠正常喂养,随机分为正常组,模型I、II组共3组,每组8只:正常对照组一直自由饮用蒸馏水,模型组按照参考文献建立大鼠溃疡性结肠炎模型,模型I、II组分别以含50 mg/kg, 150 mg/kg TNBS的500 mL/L乙醇溶液缓慢推入结肠,诱导轻重不同的溃疡性结肠炎模型,灌肠后2 wk,大鼠经水合氯醛麻醉后取出全结肠,纵向剪开,冲洗掉污物,在病变严重处剪取一块,甲醛固定,石蜡包埋,切片、HE染色,光镜下观察病理组织学变化,再剪取病变范围内一块约500 mg的组织,测定生化指标,同时取30-50 mg肠黏膜提取RNA。

1.2.2 疾病活动指数(DAI)的评估 每日观察大鼠的体质量,大便性状和隐血情况,按表1进行评分<sup>[7]</sup>,将体质量下降,大便性状和隐血情况的评分相加,得出每只大鼠的DAI,以评估疾病活动情况。大便性状评分标准:(1)正常大便:成形大便;(2)松软大便:不黏附于肛门的糊状、半成形大便;(3)稀便:可黏附于肛门的稀水样便。

1.2.3 结肠黏膜MPO活性测定 采用生化方法,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.4 肠组织NF- $\kappa$ B的表达 采用免疫组织化学(SP法)染色,严格按照试剂盒说明书要求操作, NF- $\kappa$ B P65抗体的稀释浓度为1:100,已知阳性标本作为阳性对照,以PBS缓冲液代替一抗作空白对照。阳性细胞为细胞质或细胞核中出现棕黄色颗粒沉淀。每张切片均应用医学彩色图像分析系统进行扫描分析,每张切片随机取5个不重复的视野,取其光密度的均值作为该切片的实验结果,留待统计分析。

1.2.5 RNA提取和逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR) 按Trizol试剂盒说明书的要求提取总RNA, RNA样品的纯度用分光光度计根据在260 nm及280 nm吸光度的比值来判断,确保比值在1.8-2.0之间。MIF引物由软件设计合成,以GADPH为

表 2 各组DAI评分、NF- $\kappa$ B表达和MPO活性检测结果 (mean  $\pm$  SD)

分组	n	DAI	MPO活性 (U/g)	NF- $\kappa$ B (阳性密度)
正常组	8	0.51 $\pm$ 0.28	0.38 $\pm$ 0.18	0.18 $\pm$ 0.05
模型 I 组	8	5.04 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	1.68 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
模型 II 组	8	8.13 $\pm$ 0.71 <sup>ac</sup>	2.70 $\pm$ 0.35 <sup>ac</sup>	0.78 $\pm$ 0.11 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.05 vs 正常组; <sup>c</sup> $P$ <0.05 vs 模型 I 组.

表 3 大鼠肠黏膜活检组织中细胞因子MIFmRNA表达与炎症程度的关系(mean  $\pm$  SD)

分组	n	MIFmRNA
正常组	8	0.11 $\pm$ 0.03
模型 I 组	8	0.65 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
模型 II 组	8	0.81 $\pm$ 0.05 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.05 vs 正常组; <sup>c</sup> $P$ <0.05 vs 模型 I 组.

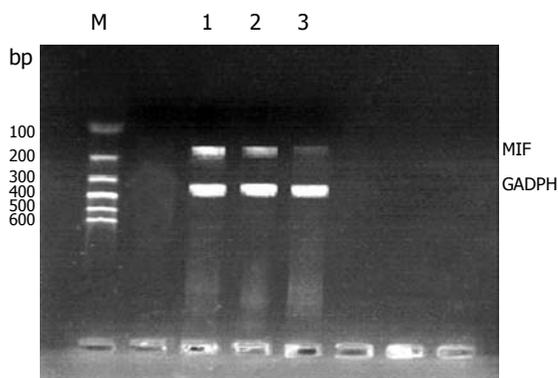


图 1 各组大鼠肠组织中MIFmRNA RT-PCR产物电泳分析图。M: DNA分子量标准; 1: 模型 II 组; 2: 模型 I 组; 3: 正常组。

内参照, 引物序列及PCR产物如下: GAPDH(330 bp), 上游引物: 5'-GATGGGTGTGAACCACGA GAAA 3', 下游引物: 5'-ACGGATACATTGGG-GGTAGGAA 3'; MIF(178 bp), 上游引物: 5'-TCTCCGCCACCATGCCTATG 3', 下游引物: 5'-GGGTCGCTCGTGCCACTAAA 3'。RT-PCR方法: 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 上、下游引物各0.5  $\mu$ L, DNA模板1  $\mu$ L, 三蒸水19  $\mu$ L, Taq酶0.5  $\mu$ L, 总反应体系25  $\mu$ L。在PCR扩增仪上完成。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min后, 进入循环, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 重复25个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸7 min, 终止反应。取5  $\mu$ L扩增产物常规进行2.5 g/L琼脂糖凝胶电泳。用凝胶分析仪拍照, 并以MIF和GAPDH DNA条带的光密度比值来表示MIF mRNA的表达水平。

**统计学处理** 所有数据经SPSS统计软件处理, 各组资料以mean  $\pm$  SD表示, 采用单因素方差

分析, 组间差异采用 $q$ 检验,  $P$ <0.05认为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 模型组大鼠的大体实验观察** 模型 I、II 组大鼠每天体质量增加值均小于正常对照组, 灌肠后第2 d出现大便松软, 有部分大鼠隐血试验阳性, 第6 d大部分出现腹泻及肉眼血便, 至处死仍不见减轻。正常对照组无上述异常变化。同正常对照组相比, 模型 I、II 组的DAI评分明显增加, 且在模型 II 组更为明显( $P$ <0.05), 各组的DAI评分结果见表2。

**2.2 NF- $\kappa$ B免疫组化染色结果及MPO的活性检测** NF- $\kappa$ B表达阳性细胞主要为黏膜上皮细胞, 单核细胞及巨噬细胞。阳性细胞胞质和胞核都含有棕色颗粒, 但以胞核为主。正常组仅见少量的NF- $\kappa$ B表达, 而模型组表达水平明显增加, 且在模型 II 组更为明显( $P$ <0.05), 模型组MPO的活性也明显增加( $P$ <0.05)(表2)。

**2.3 肠黏膜活检组织中MIF mRNA的表达与炎症程度的关系** 模型组MIF的表达较对照组显著增加, 随着炎症程度加重, 细胞因子MIF mRNA表达逐渐增强, 且各组间差异均有显著性( $P$ <0.05)(表3)。MIF表达的RT-PCR凝胶电泳检测结果见图1。

## 3 讨论

近年来, 越来越多的证据表明, 溃疡性结肠炎的发病机制可能与肠道黏膜对微生物抗原不正常免疫反应而造成的慢性炎症、遗传和环境因素有关。其中免疫系统是引起肠道炎症与损伤的重要因素<sup>[8]</sup>, 而细胞因子在调节肠道免疫中起重要作用。MIF是一种特殊的细胞因子, 他不属于目前已发现的任何细胞因子家族, 最近的研究显示, MIF由免疫系统的大多数细胞类型产生, 包括淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞, 此外, MIF在很多组织中表达, 并可参与多种病理生理过程<sup>[9-10]</sup>。在溃疡性结肠炎患者中, MIF可能具有促进巨噬细胞在

## ■ 创新盘点

国内对MIF的研究主要在系统性红斑狼疮, 狼疮性肾炎, 鼻咽癌等疾病方面, 而MIF参与IBD发病过程的研究尚未见报道。MIF在IBD中确切的发病机制还不清楚, 本文通过研究MIF和NF- $\kappa$ B在实验性大鼠结肠炎组织的表达及其相互关系, 探讨MIF介导IBD的致病作用。

### ■同行评价

该研究目的明确,方法可行,结果可靠,对探讨溃疡性结肠炎的发病机制有一定帮助,有一定创新性及可读性。

局部肠黏膜浸润,并通过这些巨噬细胞产生炎症细胞因子诱导肠黏膜损害的作用<sup>[11]</sup>。

MPO主要存在于炎症细胞,尤其是中性粒细胞的细胞质中,其活性反映了组织中炎症细胞的浸润程度,即炎症的活动程度,被认作是量化炎症的一项重要指标<sup>[12]</sup>。DAI评分是用来评估疾病活动情况的指标。我们采用TNBS/乙醇诱导形成大鼠溃疡性结肠炎,并以不同剂量TNBS制备病情轻重不同的疾病模型,本研究结果显示,大鼠溃疡性结肠炎的DAI与MPO活性的检测结果呈一致性,腹泻、便血越重, MPO活性越高,且均具有显著差异性( $P<0.05$ ),故根据症状可以推断疾病的严重程度。本实验还显示随着大鼠病情程度的加重,大鼠溃疡性结肠炎MPO活性,DAI评分等炎症指标与NF- $\kappa$ B及MIF mRNA表达同时增高,提示NF- $\kappa$ B和MIF mRNA的表达与炎症程度相关。

Ohkawara *et al*<sup>[13]</sup>研究发现葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的MIF转基因小鼠,其结肠黏膜MIF mRNA表达水平和血清MIF蛋白较DSS诱导的野生型小鼠明显增加, MPO活性也显著增强,在克罗恩病和溃疡性结肠炎患者血浆MIF水平也较正常组明显增高, Ohkawara *et al*<sup>[5]</sup>通过免疫组化的方法,在小鼠结肠肠组织的上皮细胞和渗出的免疫细胞可以观察到MIF的强阳性染色,且中和MIF生物活性的抗MIF抗体明显减少小鼠结肠TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 及基质金属蛋白酶的表达。我们的实验结果表明,与正常对照组相比,UC大鼠肠组织中MIF mRNA的表达明显增强( $P<0.05$ ),且在大剂量TNBS的模型II组尤为明显。以上结果均提示MIF在UC的发病过程中起重要作用。但MIF究竟是通过什么机制参与UC的发病过程,目前仍不清楚。

NF- $\kappa$ B是一种具有基因转录调节作用的核蛋白,可以调控多种炎症细胞因子的表达。而在UC中能激活NF- $\kappa$ B的刺激尚未完全明确。促进和抑制炎症细胞因子分泌失衡在UC的发病机制中起枢纽性的作用已得到公认。而MIF可通过抑制糖皮质激素对胞液I $\kappa$ B $\alpha$ 表达的上调,拮抗糖皮质激素在NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ 信号转换通路中的效应,促使NF- $\kappa$ B进入核内和相应DNA序列结合,诱导大量炎症因子释放<sup>[14]</sup>。研究发现<sup>[13]</sup>MIF加重DSS诱导的小鼠结肠炎,可能部分经由中性粒细胞聚集和对糖皮质激素生物活性的抑制作用。

TOLL样受体4(TLR4)是脂多糖(LPS)的信号转换分子,是LPS复合受体中的关键成分,可活化

NF- $\kappa$ B,且发现TLR4/NF- $\kappa$ B信号传导通路是IBD发病过程中的重要环节。有研究发现<sup>[15]</sup>,用MIF反义mRNA质粒转染小鼠巨噬细胞RAW26417,其MIF表达明显减少,TLR4 mRNA和蛋白质的基线水平极度降低, NF- $\kappa$ B活性下降。而我们的研究发现在UC大鼠结肠黏膜内, MIF的表达较对照组显著增加,同时NF- $\kappa$ B的表达也明显增强( $P<0.05$ ),这就从反方向证实了MIF可以调控NF- $\kappa$ B的表达,而激活的NF- $\kappa$ B又可调控多种炎症细胞因子的释放。NF- $\kappa$ B是否调节MIF基因的表达还不清楚。因此推测MIF在UC中的发病机制可能部分与活化NF- $\kappa$ B有关,其可能的机制系通过抑制糖皮质激素诱导I $\kappa$ B $\alpha$ 的合成,促使NF- $\kappa$ B进入核内和相应DNA序列结合,从而诱导大量炎症因子释放;或通过LPS信号传导通路,上调TLR4的表达,导致NF- $\kappa$ B过度激活,引起炎症因子的级联放大反应。

总之,我们推测MIF与UC的发病关系密切,对NF- $\kappa$ B的调控可能是其机制之一。此外,本研究显示在UC大鼠的肠黏膜内, MIF mRNA的表达与UC的炎症程度相关,随着炎症程度的加重, MIF mRNA的表达逐渐增强,提示该细胞因子的mRNA可作为临床上判断疾病严重程度和疗效的指标,有潜在的临床实用价值。业已证实<sup>[4]</sup>,抗MIF抗体可抑制小鼠实验性结肠炎的发展。因此,将MIF作为靶点有望成为治疗UC的新途径。

### 4 参考文献

- 1 Ross R. Atherosclerosis - AN inflammatory disease *N Engl Med* 1999; 340: 115-126
- 2 Meyer-Siegler KL, Leifheit EC, Vera PL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells. *BMC Cancer* 2004; 4: 34
- 3 Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* 2002; 4: 449-460
- 4 de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Alsahli M, ten Hove T, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, van Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2001; 2: 1061-1066
- 5 Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, Iwanaga T, Nakamura H, Mizue Y, Asaka M. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 256-270
- 6 Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerat-

- ive colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 337-343
- 7 Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 51-58
- 8 Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206: 296-305
- 9 Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2002; 128: 504-510
- 10 Baugh JA, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 2002; 30: S27-S35
- 11 Donnelly SC, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1997; 3: 502-507
- 12 Opavsky MA, Martino T, Rabinovitch M, Penninger J, Richardson C, Petric M, Trinidad C, Butcher L, Chan J, Liu PP. Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsackievirus-induced myocarditis. *J Clin Invest* 2002; 109: 1561-1569
- 13 Ohkawara T, Miyashita K, Nishihira J, Mitsuyama K, Takeda H, Kato M, Kondo N, Yamasaki Y, Sata M, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M. Transgenic overexpression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 241-248
- 14 Daun JM, Cannon JG. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic IkappaBalpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: R1043-R1049
- 15 Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 2001; 414: 920-924

电编 韩江燕 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 中华消化学会第一届全国肝胆疾病学术研讨会

本刊讯 中华消化学会第一届全国肝胆疾病学术研讨会将于2006-07-27/30在长春举行, 现将征文通知如下:

### 1 稿件要求及截稿日期

结构式摘要(500字)及全文3 000字各1份, 2006-03-31截稿。

### 2 联系方式

长春市新民大街1号吉林大学白求恩医学部一院消化科迟宝荣教授(130021); 电话: 0431-4612437; E-mail: chibaorong@sohu.com.

# 小鼠甲胎蛋白基因的克隆表达鉴定及稳定表达甲胎蛋白的小鼠肿瘤细胞株的建立

田耕, 易继林, 刘积良, 翁准

## ■背景资料

近来的研究表明, 人AFP存在四个特殊的免疫表位, 这四个表位经加工提呈后能够被人T细胞识别, 并能分别诱导培养的人T细胞和转基因小鼠产生AFP特异性的CTL。另外还发现, 尽管小鼠AFP终生存在(甚至高于人的水平), 其免疫系统也能够产生针对此癌胚抗原的T细胞免疫。以上发现为针对AFP的肝癌免疫基因治疗提供了依据。

田耕, 刘积良, 翁准, 深圳市第二人民医院肿瘤科 广东省深圳市 518035  
易继林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030  
通讯作者: 田耕, 518035, 广东省深圳市福田区笋岗西路3002号, 深圳市第二人民医院肿瘤科, tiangeng666@yahoo.com.cn  
电话: 0755-83366388-2118  
收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2006-01-11

## Gene cloning and expression identification of murine $\alpha$ -fetoprotein gene and establishment of a cell line stably expressing $\alpha$ -fetoprotein

Geng Tian, Ji-Lin Yi, Ji-Liang Liu, Zhun Weng

Geng Tian, Ji-Liang Liu, Zhun Weng, Tumor Department, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China  
Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Correspondence to: Dr. Geng Tian, Tumor Department, Shenzhen Second People's Hospital, 3002 Sungang West Road, Futian District, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China. tiangeng666@yahoo.com.cn  
Received: 2005-10-14 Accepted: 2006-01-11

## Abstract

**AIM:** To clone the murine  $\alpha$ -fetoprotein (mAFP) gene, construct the eukaryotic expression vector of AFP and establish a cell line stably expressing AFP.

**METHODS:** The total RNA was extracted from Hepa1-6 cells. The mAFP gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 to construct pmAFP. The pmAFP was identified by restriction enzyme analysis and sequencing, and then stably transfected into EL-4 cell line. Western blot and RT-PCR were used to detect the expression of mAFP protein and mRNA, respectively. EL-4 cells stably expressing mAFP were inoculated in the back of 6 mice to observe the tumor formation.

**RESULTS:** The mAFP gene with a length of

1.8 kb was successfully cloned from the total RNA of Hepa1-6 cells. Restriction enzyme analysis and sequencing showed that the 1.8 kb mAFP gene was successfully cloned and inserted into pcDNA3.1. RT-PCR and Western blot showed mAFP was stably expressed in EL-4 cell line. The tumor grew to a volume of  $2\,279.97 \pm 235.13\text{ mm}^3$  22 d after inoculation in 5 mice.

**CONCLUSION:** The mAFP gene is successfully cloned and a cell line stably expressing mAFP, named EL-4 (mAFP), is established. EL-4 (mAFP) has a good tumor-forming capacity in mice.

**Key Words:**  $\alpha$ -fetoprotein; Mice; Eukaryotic expression vector; Cell line

Tian G, Yi JL, Liu JL, Weng Z. Gene cloning and expression identification of murine  $\alpha$ -fetoprotein gene and establishment of a cell line stably expressing  $\alpha$ -fetoprotein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):626-629

## 摘要

**目的:** 克隆小鼠甲胎蛋白(AFP)基因并进行表达鉴定, 构建小鼠AFP真核表达载体并建立稳定表达甲胎蛋白的小鼠肿瘤细胞株。

**方法:** 从Hepa1-6细胞中提取总RNA进行RT-PCR, 克隆出小鼠AFP基因, 亚克隆于pcDNA3.1中构建真核表达载体pmAFP, 进行酶切、测序和表达鉴定, pmAFP稳定转染EL-4细胞建立EL-4(mAFP)细胞株, RT-PCR检测EL-4(mAFP)细胞mAFP mRNA的表达, Western blot检测mAFP蛋白表达, 将EL-4(mAFP)细胞种植于6只小鼠背部皮下观察成瘤情况。

**结果:** RT-PCR成功克隆出小鼠AFP基因, 酶切、测序和表达鉴定证实真核表达载体pmAFP构建成功, RT-PCR及Western blot检测证实EL-4(mAFP)细胞中有mAFP mRNA及蛋白的表达, 5只小鼠背部皮下种植处有肿瘤形成, 22 d肿瘤体积为 $2\,279.97 \pm 235.13\text{ mm}^3$ 。

**结论:** 小鼠mAFP基因克隆成功, 真核表达载体构建成功, 建立的EL-4(mAFP)细胞株能有效表达小鼠甲胎蛋白, 在小鼠体内成瘤性良好。

**关键词:** 甲胎蛋白; 小鼠; 真核表达载体; 细胞株

田耕, 易继林, 刘积良, 翁准. 小鼠甲胎蛋白基因的克隆表达鉴定及稳定表达甲胎蛋白的小鼠肿瘤细胞株的建立. 世界华人消化杂志 2006;14(6):626-629

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/626.asp>

## 0 引言

肝细胞肝癌(HCC)作为常见消化系统肿瘤, 复发率高, 预后较差<sup>[1-7]</sup>. 甲胎蛋白(AFP)作为肝癌的相关抗原在70%以上的肝癌中高表达, 近来的研究发现AFP存在CTL免疫显性表位, 完全可以作为肝癌免疫治疗的靶点<sup>[8-13]</sup>, 为肝癌的免疫基因治疗开辟了新的途径. 但现在还没有合适的用来研究基于AFP的肝癌免疫基因治疗的小鼠肿瘤细胞株, 为此, 我们克隆了小鼠AFP基因, 构建真核表达载体, 并成功建立了稳定表达甲胎蛋白的小鼠肿瘤细胞株, 为进一步研究基于AFP的肝癌免疫基因治疗奠定了基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 小鼠肝癌细胞系Hepal-6和小鼠淋巴瘤细胞系EL-4由第二军医大学王皓老师惠赠. CHO细胞株由中国典型培养物保藏中心提供. 真核表达载体pcDNA3.1/myc-His购自Invitrogen公司. RT-PCR试剂盒(Ver.2.1)、Ex Taq高保真Taq酶、限制性内切酶、T4 DNA连接酶和DNA Marker(DL2000)购自宝生物工程(大连)有限公司. Trizol试剂和RPMI 1640培养基为Gibco公司产品, 胎牛血清为Hyclone公司产品. 脂质体Lipofectamine 2000和Opti-MEM培养基为Invitrogen公司产品. 质粒小量制备试剂盒和琼脂糖凝胶核酸纯化回收试剂盒为Omega公司产品. 羊抗人AFP多克隆抗体购自Sant Cruz公司. HRP标记的抗羊二抗为北京中山生物工程公司进口分装产品. ECL显色剂为Pharmacia公司产品. 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 小鼠AFP基因的克隆** 培养Hepal-6细胞至对数期, 用Trizol试剂提取细胞总RNA. 为了克隆包括分泌信号在内的AFP全长基因, 设计的引物为P1、P2, P1: 5'-CTCAGGAATTCGCCATGAAGTGGATCACA-3', 在5'端引入酶切位点EcoR

I; P2: 5'-CTCTGCTCTAGATTACTCGAGAAGGCCCAAAGCATCACG-3', 在3'端引入酶切位点Xba I. 利用RT-PCR试剂盒反转录出cDNA第一链, 引物采用Oligo dT. 采用Ex Taq高保真Taq酶进行随后的PCR. 取3 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

**1.2.2 重组质粒的构建、酶切及测序鉴定** 克隆的小鼠AFP基因经EcoR I和Xba I同时双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳回收、纯化; 质粒pcDNA3.1/myc-His同样经EcoR I和Xba I同时双酶切后, 回收纯化. 目的基因与质粒按3:1的比例混合, 加入T4 DNA连接酶进行连接反应(18°C, 16 h). 构建的质粒命名为pmAFP. 将上述连接产物转化大肠杆菌DH5α, 涂平板, 氨苄青霉素筛选阳性菌落. 挑取单个菌落培养, 小量质粒制备. pmAFP用EcoR I和Xba I进行单酶切或双酶切鉴定. 酶切鉴定正确的质粒, 挑取相应菌落培养后送上海博亚生物工程公司进行双向测序。

**1.2.3 pmAFP转染CHO细胞与蛋白表达检测** 利用脂质体Lipofectamine 2000瞬时转染CHO-K1细胞, 按说明书进行操作, 同时做空载体对照. 在6孔板每孔中加入 $5 \times 10^5$ 个CHO-K1细胞, 24 h后加入分别稀释于Opti-MEM培养基的4 μg质粒和10 μL Lipofectamine 2000, 48 h后裂解细胞, 提取蛋白. 蛋白质经电泳后, 半干法转印至硝酸纤维素膜上, 一抗为羊抗人AFP多克隆抗体, 然后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗羊二抗孵育, 增强化学发光(ECL)显色。

**1.2.4 建立EL-4(mAFP)细胞系** 采用脂质体Lipofectamine 2000将pmAFP转染EL-4细胞, G418(0.4 g/L)筛选, 并以G418(0.3 g/L)维持筛选. 抗药克隆用RT-PCR检测mAFP mRNA的表达. Western blot检测mAFP蛋白表达。

**1.2.5 检测EL-4(mAFP)细胞在小鼠体内的成瘤情况** 5-8周龄♀C57BL/6小鼠6只, 按 $2 \times 10^9$ 细胞/L于小鼠背部皮下接种EL-4(mAFP)细胞, 观察肿瘤生长情况, 每周两次测量肿瘤大小, 按 $4/3 \pi R^3$  ( $R$  = 半径)计算肿瘤体积。

## 2 结果

**2.1 小鼠AFP基因的克隆** 提取的总RNA  $A_{260}/A_{280}$  比值为1.885, 表明总RNA较纯. 以反转录的cDNA为模板, 用设计引物进行PCR扩增, 所得特异性条带与预期长度为1.8 kb的目的基因相符(图1)。

**2.2 重组质粒酶切及测序鉴定** 酶切结果证明重

### ■ 研发前沿

肝癌的免疫基因治疗作为一种有潜力的新疗法, 是当今研究的热点. 目前表达AFP的小鼠肝癌细胞系均来源于小鼠自发肝癌细胞系BW7756. 由于此细胞系从1957年传代至今, 已检测不到MHC I和MHC II的表达. 所以现在还没有合适的研究基于AFP的肝癌免疫基因治疗的小鼠细胞株. 建立表达AFP的小鼠肝癌细胞系是肝癌免疫基因治疗研究的必备条件之一。

### ■创新盘点

EL-4细胞是一种小鼠淋巴瘤细胞,高表达MHC I和MHC II,易于在C57BL/6小鼠体内成瘤,非常适合用作肿瘤免疫治疗研究.本实验建立的EL-4(mAFP)细胞株既保留了高表达MHC I和MHC II的特点,又能表达mAFP,为开展基于AFP的肝癌免疫基因治疗提供了较好的研究对象.

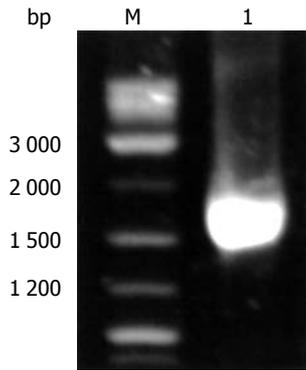


图1 RT-PCR获得小鼠AFP基因. M: DNA marker; 1: 小鼠AFP基因.

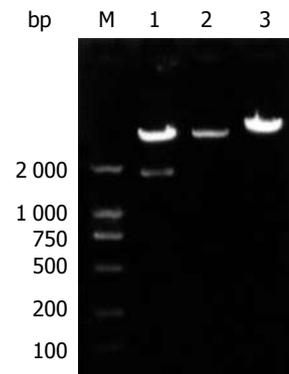


图2 重组质粒pmAFP酶切鉴定. M: DNA marker (DL2000); 1: pmAFP (*EcoR* I + *Xba* I); 2: pcDNA3.1 (*EcoR* I); 3: pmAFP (*EcoR* I).

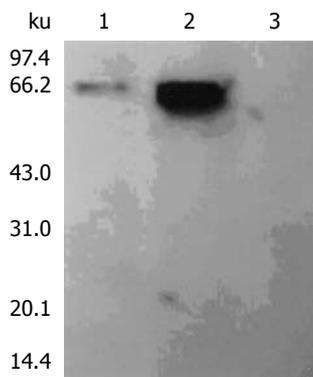


图3 Western blot检测结果. 1: CHO-K1/pmAFP; 2: Hepa1-6; 3: CHO-K1/pcDNA3.1.

重组质粒带有相应的目的基因(图2).对重组子进行测序,结果与GenBank blast比对,本实验克隆出的小鼠AFP基因与GenBank所给出的小鼠AFP基因有99.7%的碱基相同,共有5个碱基不同,其中有两个碱基为密码子的第3位碱基,未改变所编码的氨基酸.

2.3 Western blot检测蛋白表达 利用脂质体Lipofectamine 2000瞬时转染CHO-K1细胞,48 h后

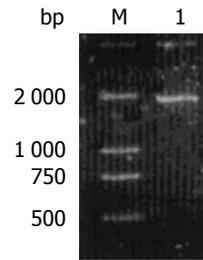


图4 RT-PCR检测EL-4(mAFP)细胞mAFP mRNA的表达. M: DNA marker; 1: EL-4(mAFP).

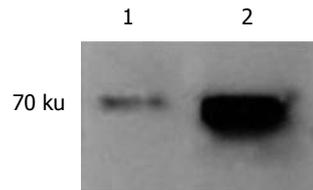


图5 Western blot检测EL-4(mAFP)细胞mAFP的表达. 1: EL-4(mAFP); 2: Hepa1-6.

提取蛋白. Western blot检测可检出转染细胞中有 $M_r$  70 000的特异性蛋白条带(图3),表明小鼠AFP基因在真核细胞内得到表达.

2.4 RT-PCR检测EL-4(mAFP)细胞mAFP mRNA的表达 RT-PCR检测EL-4(mAFP)细胞mAFP mRNA的表达(图4),方法同上.

2.5 Western blot检测EL-4(mAFP)细胞mAFP蛋白的表达 Western blot检测EL-4(mAFP)细胞mAFP的表达(图5),方法同上.

2.6 EL-4(mAFP)细胞在小鼠体内的成瘤情况 肿瘤潜伏期8-12 d,至2 wk时5只小鼠种植处皮下可触及肿瘤;22 d时,肿瘤体积为 $2\ 279.97 \pm 235.13\ \text{mm}^3$ ,3只小鼠于4 wk时死亡,2只于5 wk时死亡.

### 3 讨论

AFP是由胚胎卵黄囊和胎肝合成、分泌的胚性糖蛋白,因其与肝癌的高度相关性已被作为诊断肝癌的两个重要指标之一.由于对胚胎期经胸腺阴性选择后体内是否仍然存在抗AFP的T细胞存有疑虑,致使以AFP结构本身作为肝癌免疫基因治疗靶点的设想一直未能付诸实施.近来的研究表明,人AFP存在四个特殊的表位,这四个表位经加工与HLA-A0201结合后能够被人T细胞识别,并能分别诱导培养的人T细胞和HLA-A0201/ $K^b$ 转基因小鼠产生AFP特异性的CTL<sup>[8-10]</sup>.另外还发现,尽管小鼠AFP终生存在(甚至高于人的水平),其免疫系统也能够产生针

对此癌胚抗原的T细胞免疫<sup>[10-13]</sup>. 这些研究结果为探索基于AFP的肝癌免疫基因治疗提供了理论依据. 针对多种肿瘤抗原的DNA疫苗研究已取得令人瞩目的进展<sup>[14-19]</sup>.

本实验克隆出的小鼠AFP基因共有1 818个核苷酸, 与GenBank所给出的小鼠AFP基因有99.7%的核苷酸相同, 共有5个核苷酸不同, 其中有2个核苷酸为密码子的第三位核苷酸, 未改变所编码的氨基酸. 存在差异的原因可能是GenBank所给出的小鼠AFP基因来源于小鼠13 d胚胎的肝脏<sup>[20]</sup>.

目前表达AFP的小鼠肝癌细胞系有BWIC3和由其派生出的Hepa1-6. 这两个细胞系来源于小鼠自发肝癌细胞系BW7756. 由于此细胞系从1957年传代至今, 已检测不到MHC I 和MHC II 的表达<sup>[12]</sup>. 所以现在还没有合适的研究基于AFP的肝癌免疫基因治疗的小鼠细胞株. 故本实验建立了EL-4(mAFP)细胞株, EL-4细胞<sup>[15]</sup>是一种小鼠淋巴瘤细胞, 高表达MHC I 和MHC II, 易于在C57BL/6小鼠体内成瘤, 非常适合用作肿瘤免疫治疗研究. 本实验建立的EL-4(mAFP)细胞株既保留了高表达MHC I 和MHC II 的特点, 又能表达mAFP, 为开展基于AFP的肝癌免疫基因治疗提供了较好的研究对象. 但EL-4(mAFP)细胞不是肝脏来源的细胞, 其生物学特性必然与肝癌细胞有差异, 是其不足之处.

#### 4 参考文献

- Hubner M, McCormack L, Clavien PA. Surgical therapy of liver tumors: resection vs. ablation. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2005; 94: 1255-1259
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 445-454
- Parks RW, Garden OJ. Liver resection for cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 766-771
- Lin NF, Tang J, Ismael HS. Study on environmental etiology of high incidence areas of liver cancer in China. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 572-576
- Wang JH, Lin G, Yan ZP, Wang XL, Cheng JM, Li MQ. Stage II surgical resection of hepatocellular carcinoma after TAE: a report of 38 cases. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 133-136
- Wu MC. Clinical research advances in primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 471-474
- He XS, Huang JF, Liang LJ, Lu MD, Cao XH. Surgical resection for hepatoportal bile duct cancer. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 128-131
- Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tsuji H, Yamashita T, Kaneko S. Identification of alpha-fetoprotein-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2006; 118: 1194-1204
- Butterfield LH, Meng WS, Koh A, Vollmer CM, Ribas A, Dissette VB, Faull K, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. T cell responses to HLA-A\*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein. *J Immunol* 2001; 166: 5300-5308
- Butterfield LH, Koh A, Meng W, Vollmer CM, Ribas A, Dissette V, Lee E, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. Generation of human T-cell responses to an HLA-A2.1-restricted peptide epitope derived from alpha-fetoprotein. *Cancer Res* 1999; 59: 3134-3142
- Meng WS, Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Heller JB, Miranda GA, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. alpha-Fetoprotein-specific tumor immunity induced by plasmid prime-adenovirus boost genetic vaccination. *Cancer Res* 2001; 61: 8782-8786
- Vollmer CM Jr, Eilber FC, Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Koh A, Montejo LD, Lee MC, Andrews KJ, McBride WH, Glaspy JA, Economou JS. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 3064-3067
- Hanke P, Serwe M, Dombrowski F, Sauerbruch T, Caselmann WH. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 346-355
- Prud'homme GJ, Lawson BR, Chang Y, Theofilopoulos AN. Immunotherapeutic gene transfer into muscle. *Trends Immunol* 2001; 22: 149-155
- Stevenson FK, Zhu D, Rice J. New strategies for vaccination and immunomodulation in NHL. *Ann Hematol* 2001; 80: B132-B134
- Xu HY, Yang YL, Guan XL, Song G, Jiang AM, Shi LJ. Expression of regulating apoptosis gene and apoptosis index in primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 721-724
- Grimm CF, Ortmann D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, Encke J, Blum HE, Geissler M. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 1104-1112
- Irvine KR, Parkhurst MR, Shulman EP, Tupesis JP, Custer M, Touloukian CE, Robbins PF, Yafal AG, Greenhalgh P, Suttmuller RP, Offringa R, Rosenberg SA, Restifo NP. Recombinant virus vaccination against "self" antigens using anchor-fixed immunogens. *Cancer Res* 1999; 59: 2536-2540
- Han R, Cladel NM, Reed CA, Peng X, Budgeon LR, Pickel M, Christensen ND. DNA vaccination prevents and/or delays carcinoma development of papillomavirus-induced skin papillomas on rabbits. *J Virol* 2000; 74: 9712-9716
- Carninci P, Hayashizaki Y. High-efficiency full-length cDNA cloning. *Methods Enzymol* 1999; 303: 19-44

#### ■名词解释

1 表位: 又称抗原决定簇, 是指抗原物质表面决定该抗原特异性的特殊化学基团.  
2 主要组织相容性复合体(MHC): 是位于脊椎动物某对染色体的特定区域、紧密连锁的编码主要组织相容性抗原系统的基因群, 其编码产物主要分布在细胞膜表面, 在免疫应答过程中起重要作用.

电编 张敏 编辑 张海宁

## 叶酸治疗萎缩性胃炎并改变P16蛋白表达

刘丽华, 吴汉平, 张方信, 刘斌, 董亮, 钱震

### ■背景资料

DNA甲基化异常是胃癌发生的重要机制之一, 为了能尽早发现并纠正, 胃黏膜癌前病变中DNA甲基化状态的研究日益受到重视。研究表明, 胃黏膜癌前病变中多种基因存在甲基化异常, 而且其程度与年龄、性别、活动性炎症、肠化及幽门螺杆菌感染有关; 叶酸缺乏可导致DNA甲基化的紊乱和DNA修复机制效率的减弱, 为了明确叶酸缺乏的胃黏膜癌前病变中是否存在DNA甲基化异常, 经叶酸治疗能否纠正这种异常, 我们不仅观察了叶酸干预萎缩性胃炎黏膜病理改变、P16蛋白表达变化, 也观察了p16基因甲基化状态的变化。

刘丽华, 吴汉平, 张方信, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院消化科 甘肃省兰州市 730050  
刘斌, 董亮, 钱震, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院病理科 甘肃省兰州市 730050  
甘肃省中青年科学技术基金资助项目, No. YS031-A21-023  
通讯作者: 刘丽华, 730050, 甘肃省兰州市小西湖西街98号, 兰州军区兰州总医院消化科, LLH487726@163.com  
收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-09-30

### Effect of folic acid on atrophic gastritis and expression of P16 protein

Li-Hua Liu, Han-Ping Wu, Fang-Xin Zhang, Bin Liu, Liang Dong, Zhen Qian

Li-Hua Liu, Han-Ping Wu, Fang-Xin Zhang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China  
Bin Liu, Liang Dong, Zhen Qian, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China  
Supported by the Science and Technology Foundation for Young and Middle-Aged People of Gansu Province, No. YS031-A21-023

Correspondence to: Li-Hua Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, 98 Xiaoxihu West Street, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. LLH487726@163.com  
Received: 2005-09-28 Accepted: 2005-09-30

### Abstract

**AIM:** To study the mucosal changes, P16 protein expression and p16 gene methylation status in atrophic gastritis after treatment of folic acid (FA).

**METHODS:** Fifty-six patients, who were diagnosed with gastroendoscopy and pathological examination, were randomly assigned into FA and non-FA treatment group (control). Before and after treatment, the clinical symptoms of the patients, the levels of plasma FA, and the expression of P16 protein were observed. Meanwhile, the methylation status of p16 gene was detected by methylation specific polymerase chain reaction (MSP).

**RESULTS:** After treatment with FA, The clinical symptoms of patients alleviated rapidly and lasted a longer period in FA group. Meanwhile,

the level of plasma FA was significantly increased ( $47.98 \pm 2.68 \mu\text{g/L}$  vs  $14.37 \pm 3.56 \mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$ ). The pathological changes were notably improved and the efficacy rate was 80.8% in FA group, which was markedly higher than that in the controls (39.3%,  $P < 0.01$ ). The expression of P16 protein was increased with a rate of 61.6% ( $P < 0.01$ ) in comparison with that of control group. The methylation status of p16 gene was normal in both groups before and after treatment.

**CONCLUSION:** Lack of FA plays an important role in the pathogenesis of atrophic gastritis. FA treatment can elevate the plasma FA level, improve the clinical symptoms, and reverse the pathological changes to some extent. No aberrant methylation exists in atrophic gastritis.

**Key Words:** Atrophic gastritis; Folic acid; DNA methylation; P16 protein

Liu LH, Wu HP, Zhang FX, Liu B, Dong L, Qian Z. Effect of folic acid on atrophic gastritis and expression of P16 protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(6):630-633

### 摘要

**目的:** 研究叶酸干预萎缩性胃炎后的黏膜改变、P16蛋白表达变化及p16基因甲基化状态。

**方法:** 根据胃镜及病理结果确诊为萎缩性胃炎的患者56例, 随机分为叶酸治疗组( $n = 28$ )和非叶酸治疗组( $n = 28$ ), 治疗前后观察临床症状、血浆叶酸水平、黏膜病理、P16蛋白表达变化, 并采用甲基化敏感的内切酶酶切后PCR法检测p16基因甲基化状态。

**结果:** 叶酸治疗组临床症状缓解快而持久, 患者血浆叶酸水平升高( $47.98 \pm 2.68 \mu\text{g/L}$  vs  $14.37 \pm 3.56 \mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$ ), 病理改变逆转(有效率: 80.8% vs 39.3%,  $P < 0.01$ ), P16蛋白表达增强, 有效率达61.6%( $P < 0.01$ ), 而p16基因甲基化状态两组在治疗前后均正常。

**结论:** 萎缩性胃炎的发生与叶酸缺乏有关, 叶酸治疗可以提高血浆叶酸水平, 有效改善临床症状, 一定程度上逆转胃黏膜的萎缩、肠化和

不典型增生, 能提高P16蛋白表达. 萎缩性胃炎中不存在甲基化异常.

**关键词:** 萎缩性胃炎; 叶酸; P16蛋白; 甲基化

刘丽华, 吴汉平, 张方信, 刘斌, 董亮, 钱震. 叶酸治疗萎缩性胃炎并改变P16蛋白表达. 世界华人消化杂志 2006;14(6):630-633  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/630.asp

## 0 引言

萎缩性胃炎是胃黏膜癌前病变之一, 如何使其逆转已成为目前研究热点. 目前, 国内外研究发现, DNA甲基化异常与衰老和癌症的发生关系密切<sup>[1]</sup>. 流行病学研究已证实, 低叶酸饮食人群患食管癌、贲门癌、胃癌的相对危险性明显增高<sup>[2]</sup>. 动物实验证明, 叶酸摄入充足可有效预防胃癌的发生<sup>[3]</sup>. 萎缩性胃炎通常被看作胃黏膜的老化现象, 在此过程中可能存在叶酸缺乏导致的DNA甲基丢失、DNA修复能力降低. 因此, 本研究旨在观察叶酸干预萎缩性胃炎后的黏膜改变及P16蛋白表达及p16基因甲基化状态.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2003-02/2005-02, 我院门诊就诊患者中有食欲减退、恶心、呕吐、腹胀、腹泻、舌质红、舌面光滑等消化道症状的患者, 进一步胃镜检查, 根据2000-05全国井冈山会议制定的慢性萎缩性胃炎诊断标准而确定为慢性萎缩性胃炎, 伴有肠化或(和)中、重度不典型增生的患者56例, 年龄50-72岁, 平均54岁, 男35例, 女21例. 随机分为叶酸治疗组和对照组. 叶酸组28例, 其中病理结果根据异型程度分级<sup>[4]</sup>轻度9例, 中度15例, 重度4例. 对照组28例, 其中病理分级轻度11例, 中度14例, 重度3例. 两组年龄、性别、病情、病程无明显差异. 以上病例标本在离体后一部分固定后石蜡包埋, 另一部分常规酚-氯仿提取DNA, -20℃保存.

### 1.2 方法

1.2.1 干预方法 两组患者均在必要时间断给予抑酸、或促动力、或助消化药物的对症治疗. 叶酸组自实验开始给予叶酸10 mg, 3次/d, 疗程为6 mo, 治疗过程中不坚持服药者, 退出实验. 对照组仅仅常规的间断给予抑酸、或促动力、或助消化药物必要的对症治疗. 两组均不给予胃黏膜保护剂治疗. 治疗过程中每月随访1次.

1.2.2 血浆叶酸测定 治疗前后空腹采外周静脉血8 mL, 分离血浆以美国DPC公司叶酸单标记试剂盒行放射免疫测定.

1.2.3 胃镜和病理组织学检查 每个患者治疗前后由同一消化内镜医师检查及同一病理医师阅片. 疗效观察指标: 减二级或以上为“显效”; 减一级为“有效”; 无变化甚至加重为“无效”.

1.2.4 两组治疗前后均进行免疫组化检测P16蛋白表达 采用ABC法, P16单克隆抗体生物素化的兔抗鼠IgG和ABC复合物均来自迈新公司. 结果判断: P16染色阳性者可见胞质或细胞膜呈棕黄色, 根据切片中阳性细胞占全部细胞数的百分数, P16的染色结果判断以(+)表示, 表达强度分4级: (±)阳性细胞数<10; (+)阳性细胞数10-30; (++)阳性细胞数31-50; (+++)阳性细胞数>50. (±)(+)为弱表达, (++)(+++)为强表达.

1.2.5 两组治疗前后均采用酶切后PCR法检测DNA甲基化状态 治疗前后取大致相同部位黏膜提取DNA, 用甲基化敏感的*Msp* I、*Hap* II内切酶(中山公司)孵育后进行PCR扩增, 对p16基因外显子2区域的甲基化状态进行测定, 此区域有1个*Msp* I酶切位点, 3个*Hap* II酶切位点, 如这些位点未被甲基化或甲基化发生异常, 就能被*Msp* I、*Hap* II内切酶切开, 所提取的DNA就不能扩增. p16引物(上海生工生物工程公司)P1: 5'-CTGCTTGCGGTGAGGGGG-3', P2: 5'-GGAAGGTCCCTCAGGTGAGG-3', 反应体系为: 总体积为25 μL, dNTP 0.2 mmol, 上下游引物各1 μmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol, Taq酶1.25 U, 1×反应缓冲液. 扩增条件为: 94℃, 2 min→94℃, 1 min→57℃, 1 min; 72℃, 1.5 min; 40个循环→72℃, 5 min. 扩增片段长度为402 bp, 取扩增产物10 μL行2 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察. GAPDH作为外参照, 引物为P1: 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3', P2: 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAC-3', 扩增片段长度为598 bp.

统计学处理 采用*t*检验及 $\chi^2$ 检验.

## 2 结果

叶酸治疗组有2例患者因其他疾病中途退出治疗, 对照组无患者退出. 叶酸治疗组患者食欲减退、恶心、呕吐、腹胀、腹泻、舌质红、舌面光滑等症状体征明显改善, 发作频次明显少于对照组.

2.1 两组治疗前后血浆叶酸浓度的变化(表1) 叶酸治疗组患者血浆叶酸含量明显上升, 与对照组比较差异显著(采用*t*检验,  $P<0.01$ ).

2.2 两组治疗前后胃镜下及病理变化结果(表2) 叶酸治疗组胃黏膜萎缩、肠化及不典型增生有明显的改善(图1, 2), 总有效率80.8%, 对照

### ■应用要点

叶酸治疗可以一定程度上逆转胃黏膜的萎缩、肠上皮化生和不典型增生, 提高P16蛋白表达.

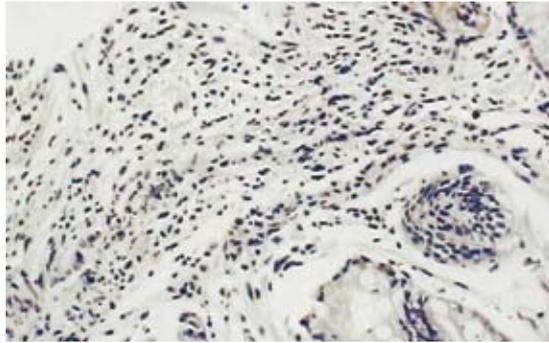


图1 叶酸治疗前的病理情况(萎缩、肠化明显存在)及P16蛋白表达降低(免疫组化染色)(ABC × 100).

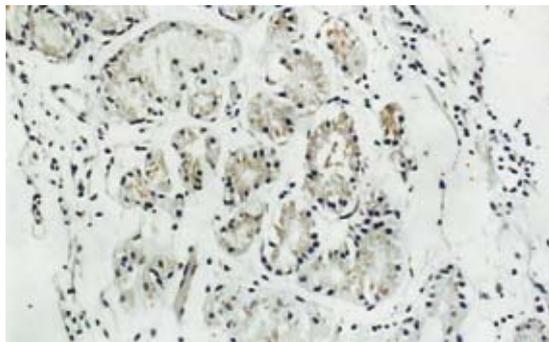


图2 叶酸治疗后的病理情况(萎缩、肠化减轻,腺体增生活跃)及P16蛋白表达增强(免疫组化染色)(ABC × 100).

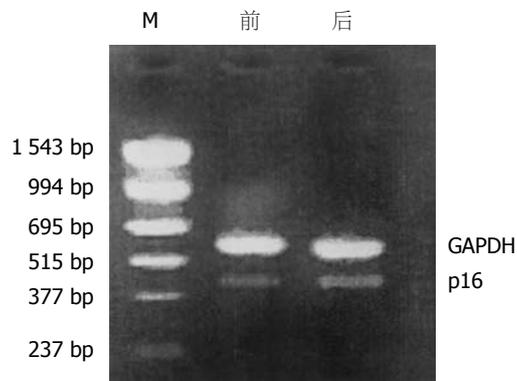


图3 治疗前后p16基因的甲基化状态. M: maker; 前: 叶酸治疗前; 后: 叶酸治疗后.

组总有效率39.3%, 两组差异显著(采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.01$ ).

2.3 两组治疗前后免疫组化检测P16蛋白表达结果 叶酸治疗组治疗前P16蛋白表达为强阳性者8例, 弱阳性者16例, 2例重度萎缩性胃炎的患者P16蛋白表达为阴性. 治疗后P16蛋白表达强阳性者15例, 弱阳性者11例, P16蛋白表达均为阳性. 16例P16蛋白表达为非强阳性患者的P16蛋白表达均有变化, 变化率或者说有效率达61.6%(图1, 图2). 而对照组治疗前P16蛋白表达

表1 治疗前后血浆中叶酸含量(mean ± SD)

组别	治疗前 ( $\mu\text{g/L}$ )	治疗后 ( $\mu\text{g/L}$ )
叶酸治疗组	15.23 ± 6.74	47.98 ± 2.68 <sup>a</sup>
对照组	16.02 ± 9.32	14.37 ± 3.56 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 叶酸治疗前; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 叶酸治疗组.

表2 治疗前后两组病理学疗效比较

组别	n	显效	有效	无效	有效率 (%)
叶酸组	26	13	8	5	80.8% <sup>a</sup>
对照组	28	4	7	17	39.3%

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

为强阳性者7例, 弱阳性者19例, 1例重度萎缩性胃炎的患者P16蛋白表达为阴性. 对照组治疗后P16蛋白表达强阳性者8例, 弱阳性者18例, 1例重度萎缩性胃炎的患者P16蛋白表达仍为阴性. 患者的P16蛋白表达无明显变化.

2.4 两组治疗前后p16基因外显子2的甲基化状态的变化 叶酸治疗组和对照组在治疗前后取大致相同部位黏膜提取DNA, 用甲基化敏感的*Msp* I、*Hap* II内切酶孵育后进行PCR扩增, 所有标本均能扩增, 在2 g/L琼脂糖凝胶上观察到电泳带, 说明p16基因外显子2区域的甲基化状态正常(图3).

### 3 讨论

本次研究结果显示, 胃黏膜癌前病变萎缩性胃炎患者的血浆中叶酸水平下降, 口服叶酸治疗, 可使患者的临床症状好转, 提高患者血浆叶酸水平, 使胃黏膜病理改善, 能增强P16蛋白表达, 但是p16基因启动子区域均未发生高甲基化. 以上结果使我们得出如下结论: 叶酸缺乏是萎缩性胃炎形成原因之一; 叶酸缺乏可能导致萎缩性胃炎胃黏膜细胞中P16蛋白表达下降; 补充叶酸治疗可使萎缩性胃炎胃黏膜细胞中P16蛋白表达增强, 黏膜损伤得以修复, 病理改善; 在萎缩性胃炎形成和逆转过程中p16基因的甲基化状态并未发生变化.

在萎缩性胃炎的发生、发展中叶酸缺乏起了怎样的作用呢? 叶酸为B族维生素, 主要存在于蔬菜和水果, 人体自身不能合成叶酸, 必须从膳食获取. 研究表明, 在人体细胞中, 为消除因体内、外各种因素导致的DNA损伤, 修复机制必不可少, 叶酸缺乏导致DNA甲基化的紊乱和DNA修复机制效率的减弱. 朱舜时 *et al*<sup>[5-6]</sup>就叶

酸对胃癌和其他胃肠道癌发生的干预作用进行了7 a随访,证实叶酸对胃肠道癌的发生有干预作用,叶酸可治疗萎缩性胃炎,改善胃黏膜病理。他认为补充叶酸可以影响胃黏膜基因调控,减轻损伤,抑制增殖,使萎缩、肠化及异型增生明显改善,从而阻断胃癌前病变的进展。本研究结果与上述研究结果相同。因此,叶酸缺乏可能是胃黏膜老化、损伤不能及时得以修复,进而萎缩、肠化及异型增生发生并不断加重的可能原因之一。那么,叶酸到底是如何促使黏膜修复的呢?

叶酸是甲基的重要提供者<sup>[5-6]</sup>,DNA甲基化是最常见的复制后及转录后修饰方式之一,在基因表达、调控、发育调节、基因组印迹等方面发挥重要作用<sup>[7]</sup>。因此,要想知道叶酸如何促使黏膜修复,就必须知道在萎缩性胃炎中黏膜细胞DNA甲基化异常发生在复制后,还是转录后?当甲基缺乏时,DNA复制后不能得到准确的修饰,在DNA进一步的复制过程中,抑癌基因等这样的调控基因不断的丢失。Jang *et al*<sup>[8]</sup>研究证明p16启动子区域出现甲基化异常,是胃癌发生早期的频繁事件。关志宇 *et al*<sup>[9]</sup>报道胃癌患者p16启动子区域出现甲基化异常而不表达P16蛋白者占22%,但在胃炎中该基因启动子未发生甲基化异常,而43%的胃癌和59%的癌组织附近的癌前病变组织中出现p16启动子甲基化异常现象,说明该基因启动子甲基化异常发生在胃癌形成的早期,而且频率很高,可成为胃癌危险性的预测性生物标记。本研究结果显示萎缩性胃炎中p16基因启动子未发生甲基化异常。既然p16复制后未发生甲基化异常,那么,推测P16蛋白表达异常可能是p16基因转录后的甲基化修饰过程中发生了异常。

甲基化不仅是复制后修饰方式之一,也是转录后修饰方式之一。Jang *et al*<sup>[8]</sup>认为在mRNA的加工过程中,常有甲基化修饰,这种修饰主要形成6-甲基腺嘌呤(6 mA)。修饰过的碱基存在于5' Apm6ApC 3'和5' Gpm6ApC 3'这两种序列中。哺乳动物mRNA中每100-400个腺嘌呤中就有一个是甲基化的,这种甲基化修饰可能发生在mRNA剪接之前,目前还不清楚其发生的确切时间和意义。推测叶酸缺乏时首先造成基因转录后甲基化修饰减少,使mRNA链转录合成后在拼接、末端修饰和内部修饰等过程中出现错误,不能生成成熟的mRNA、rRNA、tRNA,进一步将mRNA翻译为蛋白质的一级结构中由于携带

信息的不足,造成部分基因蛋白表达的下降或丢失。在萎缩性胃炎中可能发生了p16基因转录后的不当修饰或未被修饰,导致其不能表达或表达降低。

另外,推测叶酸缺乏可能导致了萎缩性胃炎黏膜细胞中p16转录后基因沉默。近年来人们提出基因沉默现象<sup>[10]</sup>。尽管转录后水平的基因沉默是指转基因在细胞核里能稳定转录,细胞质里却无相应的稳定态mRNA存在的现象,且由于转录出的mRNA降解,不能正常地翻译成蛋白质造成的。关于转录后基因沉默的发生机制,人们提出了一系列的假说,如转基因的甲基化、重复拷贝以及与内源基因的同源序列等都可以引起转基因的沉默。尽管其确切机制还不清楚,但科学家们认为基因沉默是自然界中一个非常复杂和普遍的现象。因而推测,萎缩性胃炎这一胃黏膜的老化过程中首先发生的是基因转录后沉默,当这种情况得不到及时恰当的更正后,细胞过度凋亡,老化加速,或进一步出现DNA复制过程中的紊乱,导致癌变。这种推理尚需在以后的研究中得到证实。

#### 4 参考文献

- 1 刘光谱,曾昭贤. DNA甲基化、衰老和癌. 国外医学老年医学分册 1994; 15: 101-103
- 2 Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, Chow WH, Gammon MD, Vaughan TL, Farrow DC, Schoenberg JB, Stanford JL, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1055-1062
- 3 Xiao SD, Meng XJ, Shi Y, Hu YB, Zhu SS, Wang CW. Interventional study of high dose folic acid in gastric carcinogenesis in beagles. *Gut* 2002; 50: 61-64
- 4 林三仁. 消化系统疾病电子内镜图谱. 北京大学医学出版社. 北京, 2003: 34-35
- 5 朱舜时, Joel Mason, 施尧, 胡运彪, 李蓉蓉, 汪敏, 周怡和, 金冠球, 谢宇野, 鄂桂泉, 夏德凤, 钱珍华, 宋海连, 屠伯强, 张丽冬, Robert Russell, 萧树东. 叶酸对胃癌和其他胃肠道癌发生的干预作用-临床试验七年随访. *胃肠病学* 2002; 7: 73-78
- 6 朱舜时, 夏书军, 陈晓宇, 汪敏, 彭延申, 施尧. 叶酸治疗萎缩性胃炎并干预胃癌生成的分子生物学机制. *胃肠病学* 2002; 7: 86-89
- 7 Monk M. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev Genet* 1995; 17: 188-197
- 8 Jang TJ, Kim DI, Shin YM, Chang HK, Yang CH. p16(INK4a) Promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation. *Int J Cancer* 2001; 93: 629-634
- 9 关志宇, 戴冬秋. DNA甲基化与胃肠道肿瘤. 国外医学肿瘤学分册 2005; 32: 135-138
- 10 房师松, 邓平建, 赵树进. 基因沉默机制与预防对策. *卫生研究* 2004; 33: 508-510

电编 张敏 编辑 张海宁

# 胆囊黏膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤1例

赵闯, 戴朝六, 舒红

**■背景资料**  
MALT多发于胃肠道, 本文报道1例罕见的胆囊B细胞来源MALT.

赵闯, 戴朝六, 中国医科大学盛京医院肝胆乳腺外科 辽宁省沈阳市 110004  
舒红, 中国医科大学盛京医院病理科 辽宁省沈阳市 110004  
通讯作者: 戴朝六, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院肝胆外科. daicl-sy@tom.com  
电话: 024-81161715 传真: 024-23926097  
收稿日期: 2006-01-21 接受日期: 2006-02-09

## 摘要

患者, 女, 77岁, 因“尿黄, 皮肤黄染伴瘙痒半个月”入院, 伴白色陶土样便, 半个月体质量下降约10 kg. CT和MRCP诊断为胆囊癌、胆道高位梗阻, 后经病理确诊为胆囊黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(B细胞来源), 此病例罕见.

**关键词:** 黏膜相关淋巴组织型淋巴瘤; 胆囊

赵闯, 戴朝六, 舒红. 胆囊黏膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤1例. 世界华人消化杂志 2006;14(6):634-636  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/634.asp>

## 0 引言

黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALT)属淋巴结以外与黏膜组织相关的一种淋巴组织肿瘤性疾病. MALT多发生于胃肠道, 胆囊发病者极为罕见, 我院于近期收治1例胆囊MALT, 现报道如下.

## 1 病例报告

患者, 女, 77岁, 以“尿黄, 皮肤黄染伴瘙痒半个月”于2005-06-30来院就诊. 该患者于半个月前尿色加深, 呈豆油状, 全身皮肤黄染, 伴瘙痒, 大便呈白陶土样, 半个月体质量下降约10 kg. 1 a前曾因子宫肉瘤行子宫及双附件切除、盆腔淋巴结清除术; 无慢性病史及药物过敏史. 查体: 全身皮肤黏膜黄染, 未扪及浅表淋巴结肿大, 腹平软, 右上腹深压痛, 无反跳痛及肌紧张, 肝肋下约两指, 脾脏未扪及, 肝区叩痛(+), 肠鸣音正常. 肝脏CT: 考虑为胆囊癌, 累及胆囊管及肝门部胆管(图1A), MRCP: 高位胆道梗阻, 肝内胆管扩张, 肝门胆管癌可能性大, 不排除胆囊癌(图1B). 患者于2005-07-05行肿瘤根治性切除、胆

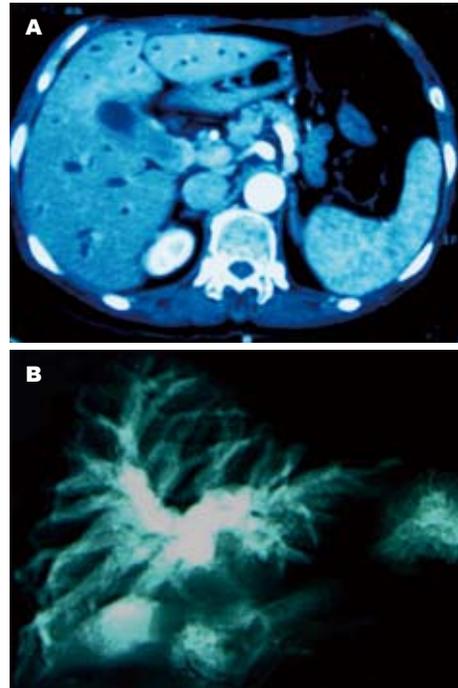


图1 影像学表现. A: CT胆囊颈部病变累及胆囊管; B: MRCP肝内胆管扩张.

肠Roux-en-Y吻合术. 术中见肝脏增大, 肋下约5-6 cm, 表面尚光滑. 胆囊水肿、壁厚, 大小约7 cm×5 cm×3 cm, 近胆囊颈部胆囊管处可及块状物, 质韧, 已侵及肝总管, 至左右肝管分叉部; 左右肝管扩张, 周围未见转移淋巴结.

病理: (1)大体所见: 胆囊7 cm×3.5 cm×2.5 cm, 壁厚1.5 cm, 黄色, 黏膜尚光滑, 黏膜及黏膜下组织呈灰白色, 质韧, 胆囊管黏膜呈天鹅绒状. (2)镜下所见: 胆囊黏膜腺体存在, 无异型性, 间质见瘤细胞弥漫状排列浸至肌肉层; 瘤细胞小圆形, 核大浓染, 核仁明显, 分裂像多见(图2A-B). (3)免疫组化: CK瘤细胞(-), 腺上皮(+); LCA瘤细胞(+); CD20大部分为瘤细胞(+); CD3瘤细胞(-), 有个别正常淋巴细胞(+)(图2C-F). 病理诊断: 胆囊黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(B细胞来源).

患者于术后2 wk顺利康复出院, 目前还在随访中.

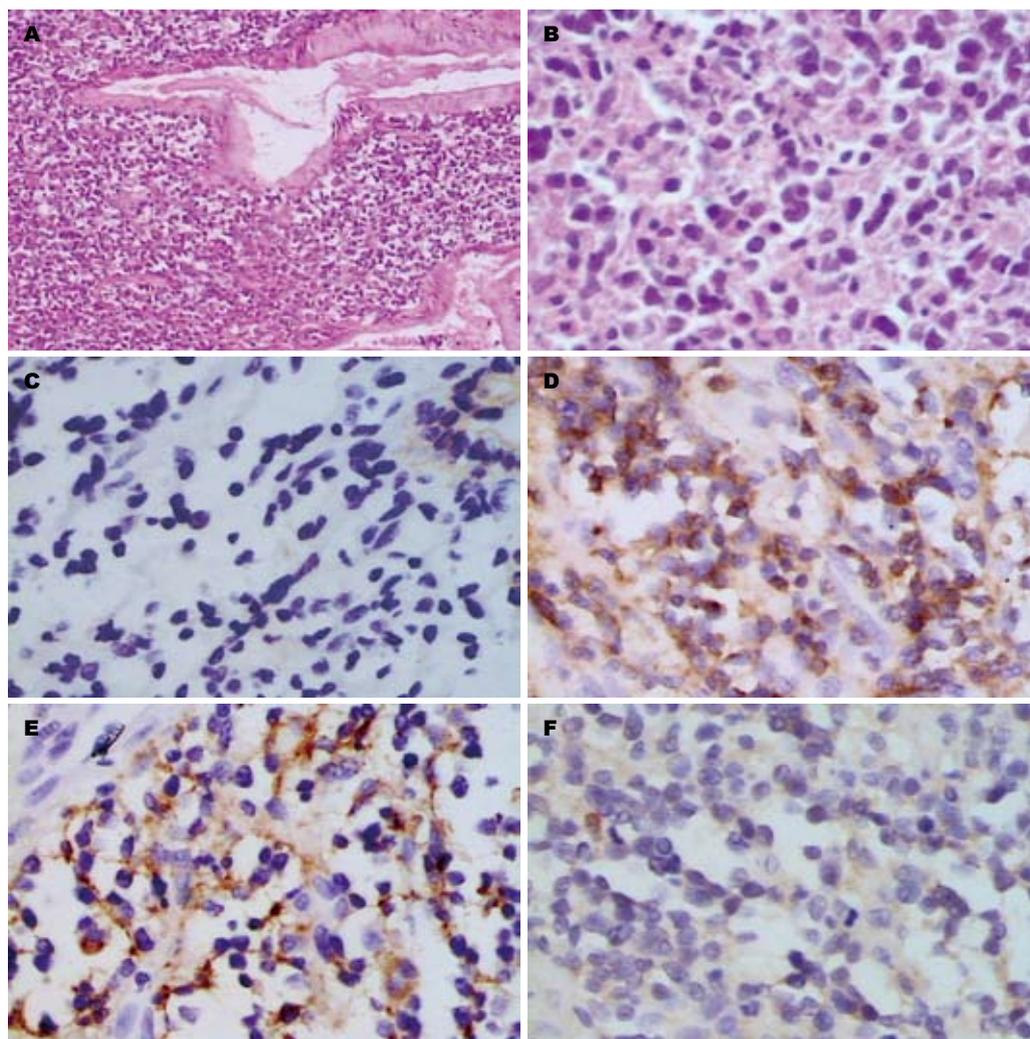


图 2 A: 瘤细胞弥漫状排列、浸至肌肉层(HE × 100); B: 瘤细胞小圆形, 分裂, 像多见(HE × 400); C: CK瘤细胞(-), 腺上皮(+); D: LCA瘤细胞(+); E: CD20大部分瘤细胞(+); F: CD3瘤细胞(-), 个别正常淋巴细胞(+).

## 2 讨论

MALT的概念是由英国病理学家Isaacson *et al*<sup>[1]</sup>在1983年首先提出的, 并于1988年得到国际公认. 现已确定MALT淋巴瘤是起源于黏膜相关淋巴组织并具有特定的生物学特性和病理学改变的一类淋巴瘤, 属非霍奇金淋巴瘤(NHL)中的一种特殊亚型. MALT的发病机制尚不清楚, 有研究认为与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)感染有关<sup>[2]</sup>.

MALT可发生在各组织器官, 据资料统计涉及部位达15处之多, 多见于胃肠道, 而发生于胆囊者罕见, 目前国内只报道2例胆囊MALT<sup>[3]</sup>, 国外报道亦仅有11例<sup>[4]</sup>. MALT临床缺乏特征性表现, 早期不易确诊<sup>[5]</sup>, 与其他类型的肿瘤难以鉴别, 一般均需借助影像学检查或内镜检查来发现病灶, 最后需靠病理检查确诊. 本例患者以梗阻性黄疸为首要症状就诊, CT及MRCP均考虑

为胆囊或肝门部胆管肿瘤, 最后经病理确诊为胆囊黏膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤. 此外该患者1 a前曾患子宫肉瘤并行手术治疗, 本次患MALT属于重复癌.

MALT需与其他淋巴瘤侵犯相鉴别, 根据有关资料认为<sup>[6]</sup>: (1)必须经病理组织学证实是起源于黏膜相关淋巴组织; (2)临床及各项辅助检查除原发病灶及原发病灶相应引流区域淋巴结肿大外, 无其他部位淋巴组织病变存在; (3)外周血细胞计数及分类正常, 无异常细胞发现, 肝脾正常. 免疫组化检测既可排除与淋巴瘤难以鉴别的其他类型的恶性肿瘤, 又可进一步确定MALT的组织学起源、类型、性质和程度, 有助于临床制定相应的治疗方案.

MALT淋巴瘤预后较结内淋巴瘤好, 尤其是低度恶性者, 绝大部分可获得长期生存. 目前对MALT淋巴瘤的治疗尚缺乏统一规范方案, 一

般认为手术切除加化疗及放疗或中医中药等综合治疗可提高生存率. 化疗方案常用CHOP方案(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、泼尼松).

### 3 参考文献

- 1 Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 1983; 52: 1410-1416
- 2 Sherman PM, Lin FY. Extradigestive manifestation of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. *Can J Gastroenterol* 2005; 19: 421-424
- 3 赵英豪, 鲍永仪. 黏膜相关淋巴组织淋巴瘤61例临床分析. *中华内科杂志* 2000; 39: 852
- 4 Jelic TM, Barreta TM, Yu M, Frame JN, Estallila OC, Mellen PF, Newman SS, Chang HH. Primary, extranodal, follicular non-Hodgkin lymphoma of the gallbladder: case report and a review of the literature. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 381-387
- 5 周兰, 林金容, 王晓怀, 周殿元. 原发性结肠恶性淋巴瘤19例临床分析. *新医学* 1999; 30: 332-333
- 6 黄锦雄. 33例原发胃肠道淋巴瘤临床分析. *临床血液学杂志* 2000; 13: 88-89

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

## 第十一届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 中华普通外科杂志编辑部将于2006-07下旬在内蒙古呼和浩特市召开“第十一届全国普通外科学术会议”。本次会议将围绕普通外科手术并发症与外科再手术的主题就普通外科临床与基础研究、外科并发症、以及外科再手术等问题进行研讨. 会议邀请国内外著名外科专家, 对热点问题做专题演讲, 参会代表进行学术交流, 经验介绍、开展讨论.

### 1 征文内容

征文内容包括: (1)腹部外科手术并发症和外科再手术经验; (2)普通外科的新进展、新诊断、新技术、新方法、新手术、新经验; (3)临床研究、基础研究、实验研究; 手术适应证、禁忌证问题; (4)腹腔镜手术; (5)肿瘤的放化疗; (6)手术并发症和再手术的营养支持; (7)手术并发症和再手术的护理等.

### 2 征文要求

征文要求包括: (1)请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要各1份, 并附拷贝软盘, 寄到100034, 北京西城区阜内大街133号 齐老师 收, 联系电话: 010-66168321转3126, 010-66164704. (2)来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿, 恕不退稿), 请在信封左下角注明“普外会议征文”字样. 参会代表将获得国家级继续医学教育一类学分. (3)截稿日期: 2006-06-30.

## 肠易激综合征的诊断和治疗

蔡淦

蔡淦, 教授, 1938-08生于上海, 1962年毕业于上海中医学院, 同年应聘上海曙光医院。现任该院消化科督导、上海中医药大学内科教授、博士生导师、博士后流动站导师、专家委员会委员。兼任上海市中医脾胃病医疗协作中心主任、国家中医药管理局重点专科脾胃病学科带头人、全国老中医药专家学术经验继承人导师、国家自然科学基金评委、上海市科技进步奖评委等职。曾任上海中医药大学中医系副主任, 中医内科学教研室主任, 学位评审委员会评委, 中医内、妇、儿科分会主任, 上海中医药研究院第二临床研究所副所长, 曙光医院副院长, 新加坡中医学院客座教授, 美国宝华医学会消化科顾问等职。

蔡教授长期从事中医内科的医疗、教学和科研工作, 尤其擅长于胃肠疾病的治疗和研究, 主持省部级课题10项, 并获省部级以上科技进步奖5项; 曾二度荣获上海市中医药大学优秀博士生导师称号, 1995年被上海市人民政府评定为首届名中医。蔡教授主编或编写教材、专著共26部, 其中《高等中医院校教学参考丛书·中医内科学》获国家科技成果奖。鉴于对该书的突出贡献, 1997年蔡教授应邀出席了国家科技奖励大会, 受到党和国家领导人的亲切接见并合影留念。  
通讯作者: 蔡淦, 200021, 上海市普安路185号, 上海曙光医院消化内科, caiganp@126.com  
收稿日期: 2006-03-07 接受日期: 2006-03-11

### 0 引言

肠易激综合征(Irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的胃肠功能紊乱性疾病。具有与排便相关或肠道习惯改变相关的腹痛, 并伴有不正常排便及腹胀的特征。近年欧美大样本调查显示: 肠易激综合征分别占普通人群的22%和11.6%, 我国报道, IBS占胃肠道专科门诊量1/3, 占人群的15%左右。由于症状反复发作, 长期存在, 对患者生活影响及给工作带来的不便相当明显, 各种检查和治疗的花费更为可观。目前对本病的治疗尚缺少的治疗方法, 中医药由于对IBS从整体观着眼治疗, 疗效肯定, 副作用少, 其药物开发正受到国内外重视, 中医药治疗胃肠功能紊乱性功能性疾病有着广阔的前景。

### 1 诊断

罗马II标准: 在过去的12 mo中至少有12 wk(可以是连续的, 也可以是累计的)时间中出现腹部不适或腹痛, 伴有排便行为的异常, 具体表现为: 腹部不适或腹痛, 并有以下三项中的二项者: (1)于排便后缓解; (2)伴有大便次数的改变; (3)伴有大便性状的改变。三项指标中以第一项最为重要, 加上第二或第三项中的一项即可诊断。如果具有下述症状更支持IBS的诊断: (1)每周排便<3次; (2)每天排便>3次; (3)硬或干结的大便; (4)稀溏或水样便; (5)排便有紧迫感; (6)便急; (7)排便不尽感; (8)排黏液便; (9)腹部饱胀感。



### 2 治疗

治疗的目的是消除患者顾虑, 改善症状, 提高生活质量。治疗原则是建立在良好医患关系基础上, 根据主要症状类型进行对症治疗和根据症状严重程度进行分级治疗。

### 3 特色

运用中医辨证论治的方法, 注重调和肝脾, 做到治疗措施的个体化和综合运用。

### 4 门诊时间

每周二上午8:00-11:30 上海曙光大厦名医中心门诊部; 每周三上午8:00-11:30 上海曙光医院门诊八楼专家诊室; 每周五上午8:00-11:30 上海曙光医院门诊八楼特需门诊。

电编 张敏 编辑 张海宁

# 世界华人消化杂志投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 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。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000字以内, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD<sub>50</sub>, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD改为M<sub>r</sub> 30 000(M大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用分子质量, 其单位是ku, “原子量”应改为相对原子质量, 即A<sub>r</sub>(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. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml 应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, t=28.4±0.2°C. BP用kPa, RBC数用×10<sup>12</sup>/L, WBC数用×10<sup>9</sup>/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M<sub>r</sub>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、CO<sub>2</sub>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B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、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B<sub>12</sub>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; 七年, 7 a; 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<sup>-3</sup> g与5×10<sup>-7</sup> g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 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<sup>-6</sup>; 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.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英文大写F; (3)卡方检验用希腊文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写r; (5)自由度用希腊文小写 $\gamma$ ; (6)样本数用英文小写n; (7)概率用英文斜体大写P. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01(P>0.05不注). 如同一表中另有一套P值, 则<sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01; 第三套为<sup>e</sup>P<0.05, <sup>f</sup>P<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

World Journal of Gastroenterology 自2005-01-01起为周刊发行, 每月7、14、21、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-261. WJG出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

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,  $3.5 \pm 0.5$  mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean  $\pm$  SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 $3.6 \pm 0.4$  kg, 过多的位数并无意义. 又如 $8.4 \pm 0.27$  cm, 其SD/3=0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq$  分母 $\leq 1 000$ , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字左右, 最好不超过26个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格).

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 男, 1966-02-26生, 河北省定县人, 汉族. 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如: 通讯作者: 马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心. [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

#### 3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象,应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度,研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征,如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准,如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 $P$ ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨,高瑞丰,李炳庆,马连生,梅立新,吴玉珍,刘凤芹,廖振林.胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3).

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释

而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表 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:  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP<0.05$ ,  $^dP<0.01$ ; 第3套为 $^eP<0.05$ ,  $^fP<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴.

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262. 《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

World Journal of Gastroenterology 创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95) 225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

#### 4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (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, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理.

录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 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寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

4.5 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》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》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.

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893  
Email: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息

**编者按** 世界华人消化杂志自创刊已有14 a历史, 目前已经发展成为旬刊. 2006年本刊开辟了“海宁信箱”专栏, 旨在促使形成作者、读者、编者互动的局面, 适应我国消化病事业的飞速发展, 创办高质量的学术期刊, 进一步活跃学术界. 本专栏面向作者、读者、以及编委征集反馈信息, 希望借用大家的力量来引导杂志向更高的质量迈进. 反馈信息包括对杂志的总体评价、事实纠错、文字更正、解释说明, 编辑部会如实地将这些信息以公开或匿名的方式刊登在每期的固定位置. 反馈信息可以通过Email发送至h.n.zhang@wjgnet.com, 也可以发送手机短信至13910684938.

### 1 反馈信息

1.1 本杂志内容广泛, 涉及消化系多种疾病; 栏目设置合理, 适应多种类型论文的刊登, 反映出本学科的进展; 印刷精致, 版式新颖. (阴赓宏 研究员, 首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科)

1.2 杂志印刷精美, 版面设计新颖, 尤其是同行评价、背景资料、应用要点、创新盘点等内容言简意赅, 提纲携领, 给人耳目一新的感觉, 充分体现了杂志色创新之处. 杂志所刊文章, 科学性强, 其中可圈可点的精品不少. 2006年第1期

第60页, 该文是对肝门阻断前后肠道颜色及组织结构的客观描述, 故用“症状明显”不妥, 应改为“现象明显”. (黄颖秋 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科)

1.3 拜读世界华人消化杂志2006年第14卷第1期后, 颇感欣慰. 贵刊为国内消化学术界提供了一个基础好、立意新、前景远的交流平台. 贵刊吸引并聚集了国内本领域几乎所有高层次的专家为其撰稿、审稿, 我们可以从中领略到国内一流水平的文章. 医学科学史一个基础与实践相结合的学科, 基础研究只有应用于实践才能产生质的飞跃. 希望贵刊在今后的内容涉及中, 适当增加临床经验体会和总结文章, 可以吸引更多不同层次的读者群. 希望贵刊越办越好. (陈治水 主任医师, 解放军第211医院中医科)

### 编辑回应

首先, 对所有关注和支持本刊的读者、作者、以及编委表示衷心感谢, 对他们的批评我们一定虚心接受. 我们保证在以后的工作中一定加强监督、规范工作流程, 不断提高杂志的质量. 其次, 有了这些高度敬业、严肃对待学术的读者、作者、以及编委, 我们有信心将本刊进一步推向更高的发展领域.

2006年, 《世界华人消化杂志》在线办公系统将正式开通, 从投稿到出版所有环节一律在网上实现, 将会大大缩短从投稿到出版的时间. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号 电话: 010-85381901 <http://www.wjgnet.com/wcjd/index.jsp>.

## 致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 主治医师  
中山大学附属第一医院消化内科

蔡淦 教授  
上海曙光医院蔡淦工作室

陈海龙 教授  
大连医科大学附属第一医院

陈其奎 教授  
中山大学附属第二医院消化内科

陈祖林 副教授  
重庆中国人民解放军第三军医大学新桥医院普外科

程英升 副教授  
上海交通大学附属第六人民医院放射科

崔云甫 教授  
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

旦增 副主任医师  
西藏自治区人民医院消化科

范志宁 主任医师  
南京医科大学第二附属医院内镜中心

房殿春 教授  
第三军医大学西南医院消化内科

高春芳 研究员  
第二军医大学附属长征医院实验诊断科

戈之铮 教授  
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

江学良 副主任医师  
上海市第二军医大学长海医院消化科

李国威 教授  
西安交通大学医学院第二医院普外科

李涛 主治医师  
北京大学人民医院肝胆外科

刘连新 教授  
哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

吕明德 教授  
中山大学附属第一医院

李永哲 副教授  
中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院检验科

李兆申 教授  
上海第二军医大学附属长海医院消化内科

陆才德 教授  
宁波大学医学院附属李惠利医院普外科

马春红 副教授  
山东大学医学院免疫学研究所

牛建昭 教授  
北京中医药大学

彭曦 副研究员  
第三军医大学西南医院烧伤研究所

秦环龙 教授  
上海交通大学附属第六人民医院外科

邱双健 副教授  
复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

沈薇 教授  
重庆医科大学附属第二医院消化内科

石统东 副教授  
重医附属二院肝炎所感染病科

宋振顺 教授  
第四军医大学西京医院肝胆外科

谭学瑞 教授  
汕大医学院第一附属医院 院长室

唐文富 主治医师  
四川大学华西医院中西医结合科

向德兵 讲师  
重庆第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科

肖恩华 教授  
中南大学湘雅二医院放射教研室

徐小元 教授  
北大医院感染科

杨刚毅 副教授  
重庆医科大学附属第二医院内分泌科

姚云清 副教授  
重庆医科大学附属第一医院

钟鸣 研究员  
广西民族医药研究所