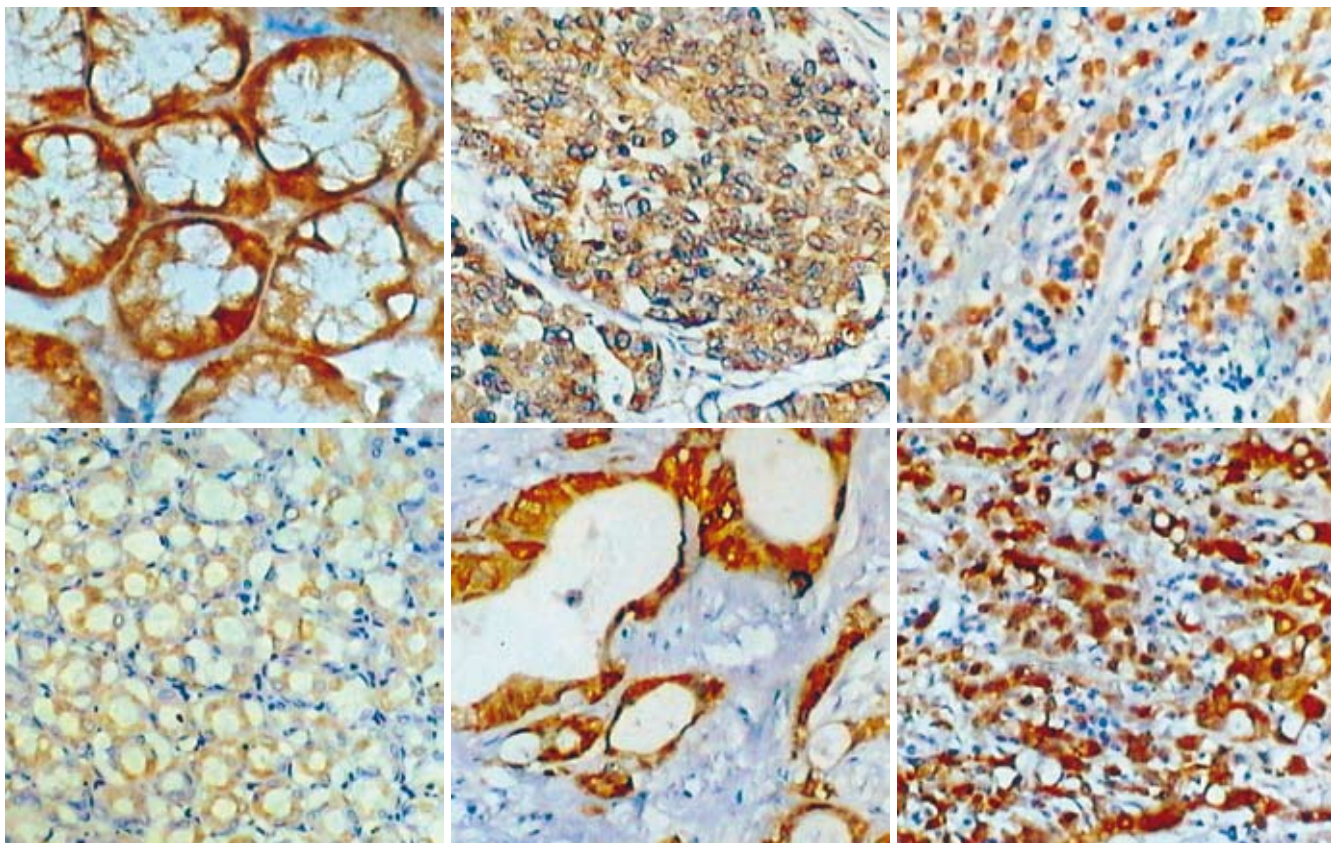


世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 3 月 8 日 第 14 卷 第 7 期 (Volume 14 Number 7)



7 / 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
陈红松副研究员 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
陈凇教授 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
杜群副研究员 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
李永哲副研究员 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 3 月 8 日

第 14 卷

第 7 期

(总第159期)

述 评	645 炎症性肠病发病机制的微生物因素 白爱平
基 础 研 究	650 加味左金丸对大鼠胃癌前病变胃黏膜EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2、P53表达的影响 胡运莲, 姜楠, 谭大琦 655 VEGF基因表达抑制对胃腺癌细胞SGC-7901增殖的影响 徐文华, 葛银林, 徐宏伟, 王秀丽, 耿芳宋 660 胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达的意义 邓玮, 易永芬, 刘丹丹 666 应用基因表达谱芯片筛选胃腺癌相关基因 李曼, 赵作伟, 辛彦 671 肝癌组织RhoC蛋白表达与微血管密度的关系 邱兴峰, 王效民, 殷平, 陈守惠, 纪毅馨 676 槟榔碱促结肠平滑肌细胞收缩及对胞内钙离子浓度的影响 梁宁霞, 衣兰娟, 田琳, 胡凡, 刘翠萍, 魏睦新 682 低压静电场对大肠杆菌生长过程的影响 代群威, 董发勤, 邓建军 687 树突状细胞和调节性T细胞在自身抗原所致小鼠免疫耐受模型中的作用 向明, 张程亮, 邹晓蕾, 蔡晓寒, 彭佳蓓
临 床 研 究	693 肝包虫周围纤维囊壁中骨桥蛋白免疫印记与组化分析 李建辉, 彭心宇, 唐娟, 吴向未, 张示杰, 牛建华, 孙红, 牛少雄, 吕游
文 献 综 述	697 黏附分子cadherin与肝癌生物学特性的关系 张志发, 严群, 黄志勇 702 原发性胆汁性肝硬化发病机制研究进展 赵臣, 夏薇, 李永哲 709 中西医理论治疗食管癌进展 曹志成
研 究 快 报	714 ntPCR-RFLP检测HBV阿德福韦耐药变异—rtA181V变异 闫杰, 谢雯, 王磊, 王晶波, 冯鑫, 宋淑静, 刘顺爱, 魏红山 718 TLR4基因多态性与慢性胃炎幽门螺杆菌感染无相关性 华开罗, 夏冰, 李春, 郭秋莎
临 床 经 验	722 肝硬化红细胞钠钾ATP酶、钙镁ATP酶及钠钾钙镁改变 王方剑, 刘安立, 曹洁, 卢永宏, 赵青城, 韩升祥, 蒙玲 727 肠胆反流对胆管胆色素结石形成的影响 金俊哲, 吴硕东, 苏洋, 张振海, 张立魁, 孔静
病 例 报 告	731 采用内科综合治疗方法抢救暴发性肝豆状核变性1例 何纲, 杨旭 733 食用葵花籽致恶心、腹痛等严重过敏反应1例 田蕾, 尹悦玲 734 Gardner综合征诊治1例 顾国利, 王石林, 周晓武

附 录	736 世界华人消化杂志投稿须知 741 世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息
致 谢	742 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	649 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 659 第十一届全国普通外科学术会议征文通知 670 NERD及相关疾病国际研讨会 675 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议 681 中华消化学会全国第二届炎症性肠病学术会议 686 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 686 专家门诊 701 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议 708 肠屏障功能障碍的基础与临床会议 717 第一届北京国际消化内镜高峰论坛 721 第十二届全国胆道外科学术会议征文通知 726 技法与经验 732 第八届中西医结合实验医学研讨会 732 第十五次全国中西医结合肝病学术会议 735 更正与说明专栏
封面故事	邓玮, 易永芬, 刘丹丹. 胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(7):660-665 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/660.asp
国际会议	Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006 Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 www.asge.org/education World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com

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 2006-03-08
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: wcjd@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

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

March 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 7

EDITORIAL	645 Biological factors in pathogenesis of inflammatory bowel disease <i>Bai AP</i>
BASIC RESEARCH	<p>650 Effect of <i>Jiawei Zuojin Wan</i> on expression of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, C-met, Bcl-2 and P53 protein in rats with gastric precancerous lesions <i>Hu YL, Jiang N, Tan DQ</i></p> <p>655 Effect of down-regulating vascular endothelial growth factor gene on proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901 <i>Xu WH, Ge YL, Xu HW, Wang XL, Geng FS</i></p> <p>660 Significance of Maspin, uPA and MMP-7 expression in human gastric carcinoma <i>Deng W, Yi YF, Liu DD</i></p> <p>666 Screening of genes differentially expressed in gastric adenocarcinoma by gene expression profiling technique <i>Li M, Zhao ZW, Xin Y</i></p> <p>671 Expression of RhoC protein and its relationship with microvessel density in hepatocellular carcinoma <i>Qiu XF, Wang XM, Yin P, Chen SH, Ji YX</i></p> <p>676 Effects of Arecolinehydrobromide on contraction and intracellular free Ca^{2+} concentrations of colonic smooth muscle cells <i>Liang NX, Yi LJ, Tian L, Hu F, Liu CP, Wei MX</i></p> <p>682 Effect of low-voltage static electric field on growth of <i>Esoherichia coli</i> <i>Dai QW, Dong FQ, Deng JJ</i></p> <p>687 Roles of dendritic cells and regulatory T cells in autoantigen-induced murine immune tolerance model <i>Xiang M, Zhang CL, Zou XL, Cai XH, Peng JB</i></p>
CLINICAL RESEARCH	693 Analysis of osteopontin in pericystic layer of hepatic hydatid cyst by Western blotting and immunohistochemical technique <i>Li JH, Peng XY, Tang J, Wu XW, Zhang SJ, Niu JH, Sun H, Niu SX, Lv Y</i>
REVIEW	<p>697 Relationship between adhesion molecule cadherin and biological features of liver cancer <i>Zhang ZF, Yan Q, Huang ZY</i></p> <p>702 Advance in mechanism of primary biliary cirrhosis <i>Zhao C, Xia W, Li YZ</i></p> <p>709 Progress in Traditional Chinese and Western Medicine theory in treatment of esophageal carcinoma <i>Cao ZC</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>714 Application of nest PCR-RFLP in the detection of adefovir dipivoxil resistance-associated mutation in hepatitis B virus <i>Yan J, Xie W, Feng X, Song SJ, Liu SA, Wei HS</i></p> <p>718 No association between Toll-like receptor-4 gene polymorphism and <i>Helicobacter pylori</i> infection in chronic gastritis <i>Hua KL, Xia B, Li C, Guo QS</i></p>

CLINICAL PRACTICE	<p>722 Changes of activities of erythrocyte membrane Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase and concentrations of Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ in erythrocytes of patients with liver cirrhosis <i>Wang FJ, Liu AL, Cao J, Lu YH, Zhao QE, Han SX, Meng L</i></p> <p>727 Influence of duodenal-biliary reflux on formation of bile duct pigment gallstone <i>Jin JZ, Wu SD, Su Y, Zhang ZH, Zhang LK, Kong J</i></p>
CASE REPORT	<p>731 Comprehensive therapy in treatment of fulminant hepatolenticular degeneration: an analysis of 1 case <i>He G, Yang X</i></p> <p>733 One case analysis of severe allergic reaction induced by intake of sunflower seeds <i>Tian L, Yin YL</i></p> <p>734 One case analysis of Gardner syndrome <i>Gu GL, Wang SL, Zhou XW</i></p>
APPENDIX	<p>736 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>741 Feedback information from authors, readers and editorial board of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	742 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Deng W, Yi YF, Liu DD.</i> Significance of Maspin, uPA and MMP-7 expression in human gastric carcinoma. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(7):660-665 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/660.asp
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006</p> <p>Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 www.asge.org/education</p> <p>World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com</p>

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 March 8, 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

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

炎症性肠病发病机制的微生物因素

白爱平

白爱平, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510080

白爱平, 男, 1970-08-07生, 汉族, 2004年四川大学华西医学院博士, 主要从事分子免疫学和肿瘤学的研究。

通讯作者: 白爱平, 510080, 广州市, 中山大学附属第一医院消化内科, baiap@163.com

电话: 020-87755766-8172 传真: 020-87755766-8172

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-21

摘要

炎症性肠病(IBD)的病因和发病机制尚不明确, 肠道微生物与IBD发病关系密切, IBD患者肠道菌群存在失调, 有证据表明, 正常人群的肠黏膜免疫系统对肠道正常菌群存在耐受, 而某些具有IBD遗传易感性人群的肠黏膜免疫系统对其肠道菌群失去耐受, 肠道菌群参与了IBD的发病。肠道细菌及其产物能刺激肠黏膜免疫系统, 诱发这些具有IBD遗传易感性人群肠黏膜免疫系统功能紊乱, 产生异常的免疫反应。不过, 探究肠道细菌与IBD发病之间的关系, 尚需要进一步的临床和实验研究。

关键词: 炎症性肠病; 肠道微生物; 发病机制

白爱平. 炎症性肠病发病机制的微生物因素. 世界华人消化杂志. 2006;14(7):645-649

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/645.asp>

0 引言

人体肠道内大约有400多种细菌, 包括常驻菌和一些暂驻菌。炎症性肠病(IBD)主要包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC), 其病因和发病机制尚不明确。肠道微生物与IBD发病关系密切, 长期以来很多学者致力搜寻与IBD发病密切相关的致病微生物。目前大量的研究显示, 人体肠道内数量巨大的细菌影响肠黏膜免疫系统的功能, 大量肠腔抗原如肠道细菌和细菌产物等, 诱发具有IBD遗传易感性个体的肠道产生异常免疫反应, 导致IBD发病。

1 肠道致病微生物的感染

IBD的发病部位是结肠、直肠、回肠等肠道接触细菌最多的部位, 并且IBD的一些临床特征与

一些肠道感染性疾病类似。虽然目前研究资料不支持某一特异性致病微生物的感染导致IBD发病, 但临床观察发现, 这些微生物所致的肠道感染能诱导缓解期IBD复发。肠道感染使一些条件致病菌和/或致病菌损害肠黏膜屏障, 肠腔内抗原移位至肠黏膜固有层, 并激活肠黏膜免疫系统, 诱导IBD发病。

1.1 副结核分枝杆菌 长期以来, 肠道副结核分枝杆菌感染与IBD发病的关系是IBD病因学的研究热点, 副结核分枝杆菌是否是IBD的病原菌, 目前存在很大的争议。目前检测组织中副结核分枝杆菌较常见的方法是免疫组织化学法、PCR、血清免疫学和细菌的分离培养技术。1984年Chiodini *et al*^[1]自CD患者手术切除的肠组织中成功分离出副结核分枝杆菌, 随后他们将CD患者手术切除的肠组织培养了18-30 mo, 培养液中有菌壁缺如的分枝杆菌菌体, 该细菌见于61%的CD患者, 而UC和其他肠道炎症则没有该菌。他们认为, 这种杆菌能转变成有菌壁的副结核分枝杆菌。Sanderson *et al*^[2]用PCR技术检测了副结核分枝杆菌特异性IS900片段, 他们发现65%的CD、4%的UC和13%正常人的肠组织能检测出副结核分枝杆菌IS900片段。Kreuzpaintner检测了不同人群血清中副结核分枝杆菌特异性抗原(45/48 hu)的抗体, 发现该抗体在CD患者检出率为64.7%, UC为10%, 结肠癌为5%, 而正常人皆阴性, 并且CD患者病变肠段被切除后, 抗体的滴度明显降低^[3]。

不过, 其他学者用同样的方法未能在CD患者炎症肠组织中检测出分枝杆菌。

2000年, Collins *et al*^[4]在美国和丹麦对439例IBD患者及324例正常人进行了多中心实验研究, 结果显示, 19% CD患者和26% UC患者副结核分枝杆菌高特异性的IS900抗体为阳性, 而6%正常人阳性; 美国CD患者副结核分枝杆菌血清抗体阳性率高于UC和正常人, 而丹麦CD患者副结核分枝杆菌血清抗体阳性率与UC和正常人无差别; 美国CD患者的阳性率高于丹麦CD患者, 这

■背景资料

虽然目前有关炎症性肠病(IBD)治疗的实验研究已经取得了很大的进展, 但临床治疗效果却仍难尽如人意。我们很有必要反思现今我们对IBD病因、发病机制理解的正确性。与肠黏膜免疫系统有着密切联系的肠腔内细菌、大量的抗原物质, 在IBD发病中的作用, 可能远比我们想象的复杂。

■研发前沿

IBD的病因和发病机制尚不明确, 但肠道菌群对IBD发病的触发作用日益为人所接受。本文详细地介绍了可能参与IBD发病的肠道病原微生物, 及肠道细菌参与IBD发病可能的机制。

■创新盘点

本文介绍了可能参与IBD发病的病原微生物、肠道菌群失调,并详细介绍了肠道细菌参与IBD发病可能的机制。

可能是因为欧洲的卡介苗接种率高于美国,他们推测,卡介苗的接种能减少副结核分枝杆菌的感染。然而令研究者很难解释的是:美国 and 欧洲IBD的发病率没有差异;对IS900PCR阳性的IBD和正常人肠组织进行培养,都未发现有副结核分枝杆菌的生长。

其他研究结果也显示,副结核分枝杆菌的感染与IBD发病没有明显的联系。例如,在副结核分枝杆菌高感染率的农场,农场家庭的IBD发病率并不高。一些实验试图用副结核分枝杆菌感染动物来诱导出肉芽肿性结肠炎,但实验并没有成功。尽管有报道称部分IBD患者的乳汁中可能会发现副结核分枝杆菌,并且这种可能性高于正常人,但这些患者经乳汁喂养的后代IBD发病率并不比CD患者非乳汁喂养的后代高^[5]。

到现在为止,尚没有发现IBD患者针对副结核分枝杆菌的细胞免疫学证据,而且针对副结核分枝杆菌的抗生素治疗并不能完全缓解IBD患者病情,因此,目前尚不能认为分支杆菌的感染与IBD发病存在一定的联系。

1.2 麻疹病毒 Wakefield *et al*^[6]认为,人体对麻疹病毒抗原存在耐受,麻疹病毒在体内能持续感染,当其他麻疹病毒或病原微生物再感染时,机体对该病毒的耐受被打破并诱发持续的炎症;一些麻疹病毒如副黏液病毒持续感染肠系膜血管内皮细胞,引起肉芽肿性血管炎,造成肠系膜血管灶状缺血,可能会诱发CD的病理改变^[6]。他们同时用免疫组织化学法、原位杂交和电镜等技术,在CD的肠组织尤其是肉芽肿组织中发现了麻疹病毒样的病毒颗粒^[6]。

但近几年来,探讨麻疹病毒感染与IBD发病间关系的研究所得出的结果相互矛盾。有研究认为,麻疹病毒流行感染高峰后3 mo内出生的人群患CD的危险性要明显高于预期的患病率。但其他对照研究未能发现麻疹病毒流行感染与CD发病率间有任何联系。Robertson *et al*^[7]认为没有证据证明麻疹病毒感染是CD的病因。麻疹病毒是否是CD的病原体目前仍有争议,目前不推荐使用麻疹疫苗来预防CD发病。

1.3 其他可能的病原微生物 一些学者对IBD其他可能的病原菌进行了研究。Liu *et al*^[8]报道,75% CD患者肠道病变组织黏膜固有层、肠系膜淋巴结内巨噬细胞中含有李斯特菌抗原,而13% UC患者为阳性,正常人群没有发现该抗原。不过,李斯特菌是一种普遍存在的细菌,通常80%以上

CD患者能同时检测出该菌及大肠杆菌、链球菌的抗原,说明该菌可能是IBD发病后的继发感染菌,而不是病原菌。其他学者在CD患者肠组织中没有检测出李斯特菌。

巨细胞病毒感染与IBD复发可能存在一定的联系。临床上巨细胞病毒感染常见于免疫缺陷的患者,如HIV感染患者出现CD4⁺ T细胞减少,或接受化疗药物治疗的患者。不过,巨细胞病毒感染常导致IBD复发,并且病情进展很快,及时行抗病毒治疗能很好地缓解IBD病情^[9]。因此,当对皮质激素抵抗的IBD患者出现发热、淋巴细胞减少、肌肉疼痛和肝脏转氨酶升高时,要进行巨细胞病毒血清学检测以诊断巨细胞病毒感染。

2 肠道菌群失调

一些学者认为,IBD的发病涉及遗传、肠菌失调和免疫异常等因素,发病的触发点是肠道内致病菌与正常菌群比例失调所致^[10]。IBD患者的肠道菌群存在失调,活动性CD患者肠道厌氧菌,尤其是拟杆菌明显增多,UC患者肠道菌群中需氧菌增多^[10]。

很多实验证实,肠道细菌参与了实验性结肠炎的发病。很多转基因动物在无菌环境中不发生结肠炎,而在有菌环境中则出现慢性结肠炎。例如,先天性IL-10缺陷小鼠置有菌环境中时,2周龄的基因缺陷小鼠肠道尚未有损伤表现,肠道通透性即有增高,并且肠黏膜内IFN- γ 、TNF- α 的浓度也开始增高,肠道通透性增高与IFN- γ 、TNF- α 的浓度相平行。而置无菌环境中的基因缺陷小鼠肠道通透性正常,肠黏膜内IFN- γ 、TNF- α 的表达也正常。该实验说明先天性IL-10缺陷小鼠对肠道菌群的黏膜免疫反应发生异常,导致肠通透性增加,并且肠通透性的增加先于肠道炎症的发生^[11]。IBD患者肠道通透性存在异常,但其原因目前尚存有争议,可能与遗传、肠道炎症、环境因素如吸烟等有关。肠道细菌在人IBD肠道通透性增高中的作用是否与动物结肠炎模型类似,需要更多的研究来探讨。

3 肠道细菌参与IBD发病可能的机制

目前研究认为,肠道细菌可能通过如下一种或多种途径参与IBD发病。

3.1 肠道菌群失调,触发IBD发病 IBD患者肠道菌群失调,肠道内致病菌增多,分泌的肠毒素使

肠上皮通透性增高; 病菌分泌免疫抑制性蛋白, 导致黏膜免疫失调; 增多的致病菌直接侵袭、损伤肠上皮细胞, 破坏肠黏膜屏障^[12].

肠道致病菌分泌的异常肠毒素能使肠道细菌和产物发生移位. 有学者发现, HT-29细胞与拟杆菌*B. fragilis*分泌的肠毒素共育时, 拟杆菌*B. fragilis*所分泌的肠毒素不影响HT-29细胞的活力, 但再加入一些肠道其他细菌如沙门氏菌、李斯特菌、大肠杆菌、肠球菌等, 肠毒素能明显增加这些致病细菌侵入HT-29细胞内的数量^[13].

肠道菌群失调时, 条件致病菌数量增多, 并产生一些能诱导肠道炎症的物质, 这些物质能激活肠黏膜免疫系统. 例如, 细菌的脂多糖(LPS)、糖蛋白-多糖(PG-PS)能诱导易感动物发生结肠炎, PG-PS浆膜下注射能诱导慢性肉芽肿性肠炎复发, 并伴有肠外病变如关节炎、肝炎等^[14]. 肠道细菌产生的甲酰寡肽如甲酰甲二磺酰亮氨酸苯基丙氨酸(FMLP), 参与了肠道炎症的病理生理机制, 并可导致肝胆并发症发生. FMLP在大鼠体内存在肠肝循环, 给大鼠结肠灌注FMLP后, 结肠炎大鼠胆道分泌FMLP是正常大鼠的10倍, 这是由于结肠炎时肠黏膜通透性增高, 增加了FMLP肠肝循环的量^[15]. 细菌的这些产物能激活肠黏膜巨噬细胞, 诱导NF- κ B激活, 并分泌大量细胞因子^[16].

最近研究发现, 细菌DNA的CpG基序能刺激一些免疫细胞产生Th1型为主的免疫反应^[17]. DSS动物结肠炎发生后, 用细菌CpGs处理动物会加重动物急慢性结肠炎的病情; 而在诱导结肠炎开始前, 用细菌CpGs处理动物可能会诱导免疫耐受, 并明显减轻结肠炎病情.

肠道细菌诱发肠道炎症的具体机制尚不清楚. 目前对于以下问题尚存在争议: 与肠黏膜免疫系统存在异常相互作用的肠道细菌及菌体成分如糖蛋白、脂多糖、细菌DNA基序等直接诱发了肠道和肠外炎症, 还是这些细菌仅仅是在炎症肠黏膜出现溃疡等病变后, 侵入病变组织, 加重肠道炎症.

3.2 肠黏膜屏障功能缺陷, 肠道通透性增高, 肠腔内成分诱发异常免疫反应 维持肠黏膜屏障的重要因素包括肠上皮细胞间的紧密连接和上皮细胞表面的黏液, N-cadherin转基因小鼠肠上皮细胞间紧密连接存在缺陷, 导致肠道局部炎症和腺瘤的发生^[18]. 人类IBD和实验性结肠炎的相关实验结果说明, 肠道炎症的发生与肠黏膜屏

障存在缺陷有关. 肠道屏障功能受损, 通透性增高, 肠腔内的抗原、内毒素等促炎症物质进入肠黏膜固有层, 诱发免疫反应. 肠黏膜通透性增高可以导致肠道细菌和细菌产物移位, 细菌产物如LPS、PG-PS、FMLP等进入肠肝循环后, 进一步损坏肠黏膜屏障.

不过, 目前对于IBD患者是否存在先天性肠黏膜屏障功能缺陷尚存有争议. Hilsden *et al*^[19-20]报道, IBD患者健康的直系亲属肠黏膜通透性较正常人增高, 而其他学者并没有发现IBD患者直系亲属肠黏膜通透性增高.

3.3 肠道免疫功能异常, 对肠道内物质失去耐受 正常肠黏膜免疫系统对肠道内正常菌群耐受, 肠黏膜固有层仅保持一定的前炎症状态. 在IBD时, 肠道菌群发生改变, 肠黏膜免疫系统对肠道内已发生变化菌群的耐受被打破.

Duchmann *et al*^[21]研究发现, 从正常小鼠脾脏、小肠和大肠提取的单个核细胞与自体肠菌的裂解液共育时, 不会发生增殖反应, 但与异体肠菌的裂解液共育时, 发生强烈的增殖反应; 并且, TNBS结肠炎小鼠肠黏膜局部和机体系统免疫对肠道细菌的免疫耐受被打破, 如果用IL-10或者抗IL-12抗体治疗, 小鼠的免疫耐受会恢复, 结肠炎也会减轻, 说明TNBS结肠炎为Th1型免疫反应. 但有趣的是, 抗炎细胞因子的治疗只能使机体对自身肠道细菌恢复耐受, 而对异体细菌所引发的增殖反应没有作用. Duchmann *et al*^[22]进一步研究发现, 将活动性IBD患者炎症肠黏膜固有层单个核细胞(LPMC)在体外与自身肠道内细菌裂解液共育后, LPMC发生强烈的增殖反应, 伴有大量的细胞因子如IL-12、IFN- γ 、IL-10等分泌, 而正常人LPMC对自身肠菌裂解液不发生增殖反应, 说明正常人对自身的肠菌存在耐受, IBD患者的这种耐受被打破.

3.4 肠道细菌功能的异常 IBD患者肠道正常细菌的种类、数量和功能发生了改变. 某些过度生长的细菌能影响肠上皮细胞能量代谢, 导致上皮细胞受损伤, 诱发肠道炎症的发生. 丁酸盐和其他短链脂肪酸(SCFA)是厌氧菌在肠道内发酵难于被消化吸收的食物成分, 如碳水化合物和蛋白质等所产生, 由于肠道细菌的种类和功能发生了改变, IBD患者肠腔内SCFA的量明显减少^[23]. SCFA是结肠上皮细胞的主要能量来源, 具有一定的抗炎特性. UC炎症肠道内丁酸盐的浓度明显下降, 因此UC被认为是一种能量饥饿性

■应用要点

目前普遍认为, IBD发病是由于肠道细菌及其产物能刺激肠黏膜免疫系统, 诱发这些具有IBD遗传易感性人群肠黏膜免疫系统功能紊乱, 产生异常的免疫反应. 本文详细介绍了肠道细菌参与IBD发病可能的机制, 这些机制也是目前选择益生菌治疗IBD的参照标准.

■名词解释

肠道菌群失调指人体肠道内致病菌与正常菌群比例失调,致病菌、条件致病菌的数量增多,而双歧杆菌、乳酸杆菌等对人体有益的正常细菌数量减少。

疾病^[23]。最近Luhrs *et al*^[24]观察了丁酸盐灌肠的临床效果,实验中11例UC患者分别接受丁酸盐或安慰剂灌肠,治疗4-8 wk后丁酸盐治疗组患者临床症状明显缓解,炎症肠道中NF- κ B激活的单核细胞数量明显减少,而对照组患者的临床症状没有明显改善,说明丁酸盐对UC具有一定的临床治疗效果。

肠腔内氢化硫与丁酰辅酶A反应,所生成的过硫酸盐能抑制上皮细胞内短链甲酰辅酶A脱氢酶功能和细胞代谢,导致结肠细胞能量缺乏,使肠黏膜炎症持续^[25]。UC患者肠道内氢化硫浓度明显升高^[26],在肠道内能迅速增殖的脱硫酸盐菌如脱磺弧菌,是肠腔内产氢化硫的主要细菌。不过,国内外有关脱磺弧菌的研究比较少,脱磺弧菌与IBD发病的关系尚须进一步研究。

总之,目前大量的实验和临床资料显示,肠道菌群参与了IBD的发病。某些具有遗传易感性的人群肠道菌群失调,细菌及产物等抗原可能诱导肠黏膜免疫功能失衡,使肠黏膜免疫系统对肠腔内抗原失去耐受,引发了肠道炎症。

4 参考文献

- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Coutu JA. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 357-363
- Sanderson JD, Moss MT, Tizard ML, Hermon-Taylor J. Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992; 33: 890-896
- Kreuzpaintner G, Das PK, Stronkhorst A, Slob AW, Strommeyer G. Effect of intestinal resection on serum antibodies to the mycobacterial 45/48 kilodalton doublet antigen in Crohn's disease. *Gut* 1995; 37: 361-366
- Collins MT, Lisby G, Moser C, Chicks D, Christensen S, Reichelderfer M, Hoiby N, Harms BA, Thomsen OO, Skibsted U, Binder V. Results of multiple diagnostic tests for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4373-4381
- Naser SA, Schwartz D, Shafran I. Isolation of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1094-1095
- Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, Pounder RE. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* 1993; 39: 345-353
- Robertson DJ, Sandler RS. Measles virus and Crohn's disease: a critical appraisal of the current literature. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 51-57
- Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995; 108: 1396-1404
- Cottone M, Pietrosi G, Martorana G, Casa A, Pecoraro G, Oliva L, Orlando A, Rosselli M, Rizzo A, Pagliaro L. Prevalence of cytomegalovirus infection in severe refractory ulcerative and Crohn's colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 773-775
- Rogler G. Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 311-317
- Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, Fedorak RN. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 262-270
- Cummings JH, Macfarlane GT, Macfarlane S. Intestinal bacteria and ulcerative colitis. *Curr Issues Intest Microbiol* 2003; 4: 9-20
- Wells CL, van de Westerlo EM, Jechorek RP, Feltis BA, Wilkins TD, Erlandsen SL. Bacteroides fragilis enterotoxin modulates epithelial permeability and bacterial internalization by HT-29 enterocytes. *Gastroenterology* 1996; 110: 1429-1437
- Stimpson SA, Esser RE, Carter PB, Sartor RB, Cromartie WJ, Schwab JH. Lipopolysaccharide induces recurrence of arthritis in rat joints previously injured by peptidoglycan-polysaccharide. *J Exp Med* 1987; 165: 1688-1702
- Hobson CH, Butt TJ, Ferry DM, Hunter J, Chadwick VS, Broom MF. Enterohepatic circulation of bacterial chemotactic peptide in rats with experimental colitis. *Gastroenterology* 1988; 94: 1006-1013
- Hawiger J. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol Res* 2001; 23: 99-109
- Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, Grunwald N, Hedrich HJ, Aschenbrenner E, Schlegelberger B, Rogler G, Scholmerich J, Falk W. CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005; 129: 913-927
- Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995; 270: 1203-1207
- Hilsden RJ, Meddings JB, Sutherland LR. Intestinal permeability changes in response to acetylsalicylic acid in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1996; 110: 1395-1403
- Teahon K, Smethurst P, Levi AJ, Menzies IS, Bjarnason I. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Gut* 1992; 33: 320-323
- Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996; 26: 934-938
- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 448-455
- Ross AS, Cohen RD. Medical therapy for ulcerative colitis: the state of the art and beyond. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 488-495
- Luhrs H, Gerke T, Muller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberge F, Scheppach W, Menzel T. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria

- macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 458-466
- 25 Roediger WE, Duncan A, Kapaniris O, Millard S. Sulphide impairment of substrate oxidation in rat colonocytes: a biochemical basis for ulcerative colitis? *Clin Sci(Lond)* 1993; 85: 623-627
- 26 Pitcher MC, Cummings JH. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* 1996; 39: 1-4

电编 韩江燕 编辑 张海宁

■同行评价

本文综述肠道微生物感染与IBD的关系,探讨IBD的病因和发病机制,对临床防治工作是有意义的。参考的文章数量较多,内容新颖,综述的重点突出,条理性强,观点明确,结论合理。

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年国家级继续医学教育项目,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。

加味左金丸对大鼠胃癌前病变胃黏膜EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2、P53表达的影响

胡运莲, 姜楠, 谭大琦

■背景资料

新观点认为癌变的过程特点是调控失常, 有潜在的逆转可能, 那么, 逆转治疗也重在调控. 多年来研究表明中医药对胃癌前病变有一定逆转作用, 但胃癌前病变阶段存在哪些基因调控异常和中医药对其是否具有调控作用尚不清楚.

胡运莲, 湖北省中医院消化内科 湖北省武汉市 430061
姜楠, 谭大琦, 湖北省中医院中心实验室 430061
胡运莲, 女, 1964-10-18, 湖北宜昌人, 汉族, 2005年湖北中医药大学博士, 主任医师、副教授, 主要从事胃癌的防治方面的研究.
湖北省教育厅资助项目, No. 2003A006
通讯作者: 胡运莲, 430061, 湖北省武汉市武昌区花园山4号, 湖北省中医院消化内科. alianhu1018@163.com
电话: 027-88929327 传真: 027-88020865
收稿日期: 2005-12-18 接受日期: 2006-02-11

Effect of Jiawei Zuojin Wan on expression of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, C-met, Bcl-2 and P53 protein in rats with gastric precancerous lesions

Yun-Lian Hu, Jiang Nan, Da-Qi Tan

Yun-Lian Hu, Digestive internal Department, Hubei Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Jiang Nan, Da-Qi Tan, Focus Lab, Hubei Provincial TCM Hospital, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Supported by the Education Department of Hubei Province, No. 2003A006
Correspondence to: Dr. Yun-Lian Hu, Digestive internal Department, Hubei Provincial TCM Hospital, 4 Mount Huayuan, Wuchang, Wuhan 430061, Hubei Province, China. alianhu1018@163.com
Received: 2005-12-18 Accepted: 2006-02-11

Abstract

AIM: To observe the effect of Jiawei Zuojin Wan (JZW) on the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (VEGF), C-met, Bcl-2 and P53 protein in rats with gastric precancerous lesions (GPL), and to study the possible mechanism of AZP in the treatment of GPL.

METHODS: The model of GPL was established mainly through N-methyl-N-nitro N-nitrosoguanidine (MNNG) together with other factors including 56°C NaCl solution (150 g/L), sodium deoxycholate (8.5 g/L), alcohol stimulation (400 mL/L),

ranitidine (0.3 g/L), and undue hunger and over-eating. The 43 survived rats after modeling were randomly divided into spontaneous recovery (SR), retinoic acid (RA), and high-, moderate-and low-dose JZW group. After the corresponding treatment, the rates of EGFR, VEGF, C-met, Bcl-2 and P53 protein expression was detected by immunohistochemical method in each group.

RESULTS: The rates of EGFR expression in high- and moderate-dose JZW, VEGF expression in moderate-and low-dose JZW, and Bcl-2 expression in high-, moderate- and low-dose JZW were distinctly lower than those in SR group (EGFR: 25.0%, 0 vs 100%, $P < 0.05$, $P < 0.01$; VEGF: 12.5%, 25.0% vs 100%, both $P < 0.05$; Bcl-2: 12.5%, 0, 25.0% vs 100%, $P < 0.01$ or $P < 0.05$), respectively. There were no significant difference in expression rate of EGFR, VEGF, and Bcl-2 protein between JZW groups and RA group ($P > 0.05$). The expression of C-met protein was not significantly different between JZW groups, SR and RA group ($P > 0.05$). The expression rates of P53 protein in all groups were negative.

CONCLUSION: JZW is effective in the treatment of rats with GPL by inhibiting the expression of EGFR, VEGF and Bcl-2 protein.

Key Words: Adjusted Zuojin pills; Gastric precancerous lesions; Epidermal growth factor receptor; Vascular endothelial cell growth factor; C-met; Bcl-2; P53

Hu YL, Jiang N, Tan DQ. Effect of Jiawei Zuojin Wan on expression of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, C-met, Bcl-2 and P53 protein in rats with gastric precancerous lesions. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(7):650-654

摘要

目的: 观察加味左金丸对大鼠胃癌前病变胃黏膜EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2、P53表达的影响.

方法: 采用MNNG、0.3 g/L雷尼替丁、56°C

■研发前沿

胃黏膜上皮细胞癌变机制及中医药对胃癌前病变阻断或逆转治疗机制仍是本研究领域的热点和重点.

150 g/L盐水、8.5 g/L脱氧胆酸钠、400 mL/L乙醇、饥饿失常等多因素造模, 存活的43只大鼠随机分为自然恢复组、维甲酸组、加味左金丸高、中、低剂量组, 各组大鼠作相应的处理后, 免疫组化法检测各组大鼠胃黏膜组织EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2、P53表达水平。

结果: 加味左金丸高、中组EGFR(25.0%, 0 vs 100%, $P<0.05$, $P<0.01$), 中、低组VEGF(12.5%, 25.0% vs 100%, 均 $P<0.05$)、以及高、中、低组Bcl-2蛋白(12.5%, 0, 25.0% vs 100%, $P<0.01$ 或 $P<0.05$)阳性率与自然恢复组比较差异有统计学意义, 与维甲酸组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 加味左金丸各组C-met蛋白阳性率与自然恢复组、维甲酸组比较差异均无统计学意义($P>0.05$); 各组均未见P53表达。

结论: 加味左金丸通过下调EGFR、VEGF、Bcl-2蛋白表达而抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡, 进而发挥治疗大鼠胃癌前病变的作用。

关键词: 加味左金丸; 胃癌前病变; EGFR; VEGF; C-met; Bcl-2; P53

胡运莲, 姜楠, 谭大琦. 加味左金丸对大鼠胃癌前病变胃黏膜癌基因EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2、P53表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(7):650-654
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/650.asp>

0 引言

癌变过程不仅存在细胞增生异常, 而且也存在细胞凋亡异常. 细胞增生与凋亡是受基因控制的, 原癌基因的激活或/和抑癌基因的失活是其重要原因. 原癌基因产物表皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子受体(C-met)、凋亡抑制因子-2(Bcl-2)和抑癌基因产物P53分别与细胞增生或凋亡关系的研究已有较多报道, 但同时研究5个基因和中、西药物对其影响的报道尚未见到. 加味左金丸是全国第二批名老中医药专家程丽芳教授的经验方, 原汤剂临床应用30余年. 先期的临床研究^[1]和实验研究^[2]表明, 加味左金丸对大鼠胃癌前病变有较好的逆转治疗作用(包括对大鼠一般情况、体质量及胃黏膜肉眼观和显微镜镜下观的改善), 其获效机制之一是通过抑制端粒酶活性、细胞增殖活性及COX-2蛋白的高表达而实现的(另文发表). 我们又观察了大鼠胃癌前病变胃黏膜癌基因EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2、P53表

达情况及加味左金丸对其影响, 以进一步探讨加味左金丸的可能治疗机制。

1 材料和方法

1.1 材料 甲硝基亚硝基胍(MNNG)为Fluka公司产品, 每周用双蒸水配成1 g/L的母液4℃避光储存, 临用时用双蒸水配成所需浓度; 脱氧胆酸钠购自湖北省医药公司; 维甲酸由上海第六制药厂生产; 雷尼替丁由杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司生产; 乙醇用双蒸水稀释成400 mL/L的浓度; 加味左金丸水煎液由黄连6 g, 吴茱萸6 g, 党参10 g, 茯苓10 g, 醋柴胡10 g, 白芍15 g, 法半夏10 g, 三七粉3 g(冲), 莪术10 g, 白花蛇舌草15 g, 百合10 g, 炙甘草6 g组成, 由湖北省中医院中药制剂室供给, 浓度为2 kg/L. 即用型EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2、P53免疫组织化学染色SP试剂盒; EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2、P53多克隆抗体, DAB即用型显色试剂盒, 均购自北京中山生物技术公司. 显微摄像全自动图像分析仪由武汉大学医学院病理教研室提供, 软件为同济千屏影像工程公司HPIAS2000型图像分析软件。

1.2 方法 选用SPF级6周龄SD♂大鼠60只, 体质量100-120 g(武汉市疾病预防控制中心提供). 造模参照严茂祥 *et al*^[3-5]综合造模方法并加以改进. 大鼠自购进后适应性喂养1 wk. 从60只大鼠中随机抽取10只作为正常组, 其余50只用于造模. 正常组大鼠不做任何处理; 造模大鼠每日自由饮用100 mg/L MNNG液(饮料瓶用油漆涂黑避光)、进食含0.3 g/L雷尼替丁的纯鼠饲料、上午用56℃ 150 g/L的氯化钠液按10 mL/kg灌胃, 进食2 d, 禁食1 d, 进食当天下午用8.5 g/L脱氧胆酸钠溶液按10 mL/kg灌胃, 禁食当天下午用400 mL/L乙醇按10 mL/kg灌胃, 连续24 wk. 24 wk末时随机抽取正常组和造模大鼠各1只, 杀检, 观察组织病理学变化(以HE染色光学显微镜下观察的结果为主), 确认模型是否成功. 造模过程中共死亡6只. 模型成功后, 将造模存活的43只大鼠随机分为自然恢复组11只, 维甲酸组8只, 加味左金丸高、中、低剂量组(简称高、中、低剂量组)各8只. 高剂量组每日每只按20 g/kg(相当于成人1 d用量的2倍)灌胃, 中剂量组按10 g/kg(相当于成人1 d用量)灌胃, 低剂量组按5 g/kg(相当于成人1 d用量的一半)灌胃. 维甲酸组按40 mg/kg灌胃. 上述治疗16 wk. 自然恢复组同正常组大鼠常规饮食. 40 wk末所有

■ 相关报道

1 白兆芝, 白震宁. 中医药对胃癌前病变基因缺失及点突变的调节作用与辨治思路. 山西中医 2000; 16: 8-10
2 胡玲, 劳绍贤, 周福生. 胃炎消对胃癌前病变相关靶基因蛋白表达的调控作用. 浙江中西医结合杂志 2001; 11: 334-336

■创新盘点

1 尽量模拟人的患病因素,采用7种因素造模。

2 加味左金丸以调和肝胃(脾)、辛开苦降、行气活血,兼调寒热和辅抗癌药物为立法依据。

表 1 大鼠胃黏膜EGFR, VEGF, C-met, Bcl-2, P53蛋白阳性表达 n (%)

分组	n	EGFR	VEGF	C-met	Bcl-2	P53
正常组	9	1 (11.1)	0 (0)	1 (11.1)	0 (0)	0 (0)
自然恢复组	5	5 (100.0)	5 (100.0)	5 (100.0)	5 (100.0)	0 (0)
维甲酸组	8	3 (37.5)	2 (25.0) ^a	5 (62.5)	1 (12.5) ^b	0 (0)
高剂量组	8	2 (25.0) ^a	3 (37.5)	5 (62.5)	1 (12.5) ^b	0 (0)
中剂量组	8	0 (0) ^b	1 (12.5) ^a	3 (37.5)	0 (0) ^b	0 (0)
低剂量组	8	1 (12.5)	2 (25.0) ^a	4 (50.0)	2 (25.0) ^a	0 (0)

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 自然恢复组。

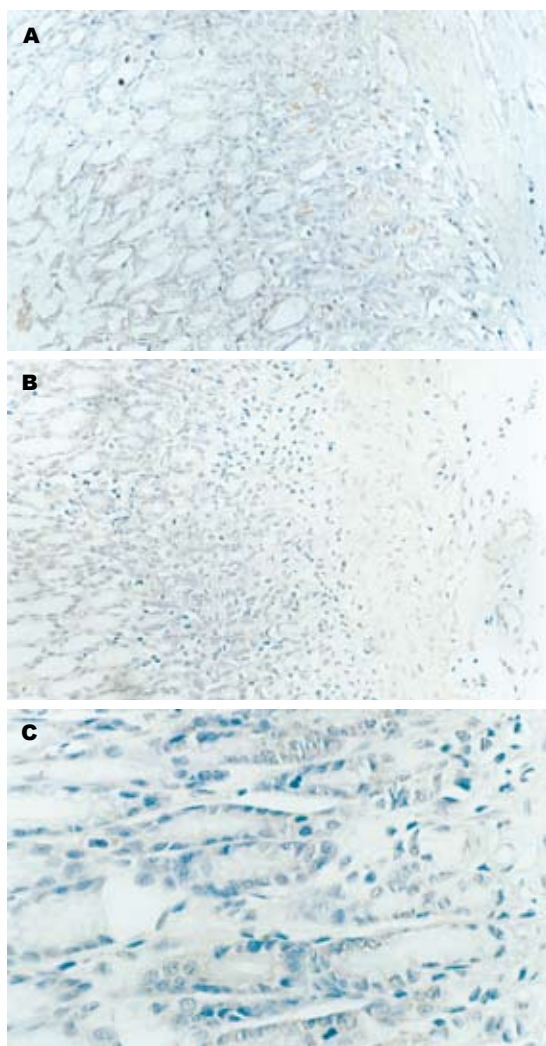


图 1 加味左金丸中剂量组EGFR、VEGF、Bcl-2蛋白的表达。
A: EGFR; B: VEGF; C: Bcl-2。

动物禁食1 d, 处死, 剖腹取胃, 沿胃大弯剪开, 生理盐水冲洗, 肉眼观察, 平铺于硬纸板上, 于胃窦部剪取组织1块, 40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片5 μ m, 免疫组织化学染色。PBS代替一抗作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照。免疫组化染色阳性为棕色或黄褐色。EGFR定位于胞质及胞膜上; VEGF定位于胞质; C-met定位于胞

质; Bcl-2定位于胞质或胞膜; P53定位于胞核。采用显微摄像计算机图像分析系统。数5个以上高倍视野, 不少于1 000个细胞。

EGFR染色结果以阳性百分率表示, 并根据染色深浅和阳性细胞百分数, 将阳性强度判为(+)弱阳性(0%-25%), (++)中等度阳性(25%-50%), (+++)强阳性(>50%)。VEGF阳性细胞按如下方法统计, (-): 无阳性细胞或阳性细胞<5%; (+): 阳性细胞数为5%-20%; (++)阳性细胞数为20%-60%; (+++)阳性细胞数为>60%。C-met阳性细胞按如下方法统计, (-): 无阳性细胞或阳性细胞<30%; (+): 阳性细胞数为30%-50%; (++)阳性细胞数为50%-80%; (+++)阳性细胞数为>80%。Bcl-2阳性细胞按如下方法统计: <10%为阴性, $\geq 10\%$ 定为阳性。

统计学处理 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 胃黏膜EGFR蛋白表达 正常大鼠胃窦黏膜即有EGFR蛋白表达, 主要分布在靠近腺体基底部的增殖细胞中, 呈弥漫性胞质表达(图1A)。自然恢复组5例全呈阳性表达, 阳性率100%。加味左金丸各治疗组EGFR蛋白阳性率与自然恢复组比较差异有统计学意义(中剂量组 $P<0.01$ 或高、低剂量组 $P<0.05$); 维甲酸组EGFR蛋白阳性率与自然恢复组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 加味左金丸各治疗组EGFR蛋白阳性率与维甲酸组比较差异无统计学意义($P>0.05$, 表1)。

2.2 胃黏膜VEGF蛋白表达 VEGF染色阳性定位于胞质(图1B)。正常大鼠胃黏膜没有VEGF蛋白表达。自然恢复组5例全呈阳性表达, 阳性率100%。加味左金丸中、低剂量组VEGF蛋白阳性率与自然恢复组比较差异有统计学意义($P<0.05$), 高剂量组与之比较差异无统计学意义($P>0.05$); 维甲酸组VEGF蛋白阳性率与自然恢

复组比较差异有统计学意义($P<0.05$); 加味左金丸高、中、低剂量组VEGF蛋白阳性率与维甲酸组比较差异无统计学意义($P>0.05$, 表1).

2.3 胃黏膜C-met蛋白表达 C-met染色阳性定位于胞质. 正常大鼠胃黏膜可有C-met蛋白表达, 主要分布在腺颈部. 自然恢复组大鼠5例全呈阳性表达, 阳性率100%. 加味左金丸高、中、低剂量组及维甲酸组C-met蛋白阳性率与自然恢复组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 加味左金丸高、中、低剂量组C-met蛋白阳性率与维甲酸组比较差异无统计学意义($P>0.05$, 表1).

2.4 胃黏膜Bcl-2蛋白表达 Bcl-2染色阳性定位于胞质(图1C). 正常组大鼠无Bcl-2蛋白阳性表达; 自然恢复组大鼠5例全呈阳性表达, 阳性率100%; 加味左金丸高、中剂量组和维甲酸组Bcl-2蛋白表达与自然恢复组比较差异有统计学意义($P<0.01$), 加味左金丸低剂量组与自然恢复组比较差异有统计学意义($P<0.05$); 加味金丸高、中、低剂量组和维甲酸组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$, 表1).

2.5 胃黏膜P53蛋白表达 P53染色阳性应定位于胞核, 可各组均在胞质可见, 均示为阴性.

3 讨论

1994年加拿大Schipper对经典肿瘤模式提出了新认识, 认为恶变特征是由于少数基因和环境变化的结果, 癌变的过程特点是调控失常, 并且这种癌变过程有潜在逆转可能; 对癌症的治疗应通过调整机体对它们的控制, 而不是必须杀死所有癌细胞, 这种认识与中医的整体观点相吻合^[6]. 我们基于上述理论(即癌变过程有逆转可能和癌症的治疗应整体调控)而设立本研究. EGFR是原癌基因C-erbB-1的表达产物, 它与相应的配体结合后发挥其调节细胞生长的作用. 有研究表明, 正常大鼠胃黏膜中存在EGFR mRNA表达, 表明正常胃黏膜具有合成EGFR的能力, 这对维持胃黏膜细胞的正常生长更替是必要的^[7]; 在胃癌前病变阶段EGFR蛋白的表达与胃癌无差异, 提示EGFR蛋白表达阳性的胃癌前病变可能有较高的癌变易感性^[8]. VEGF是促进血管增生和形成的最重要的因子之一, 大量的研究报道多集中在其与肿瘤生物学行为方面的关系, 是一晚期行为; 但也有部分研究表明它在胃癌前病变阶段即存在较高表达, 在胃癌的发生中即早期阶段可能起了一定的作用^[9]. C-met是原癌基因C-met的表达产物, 称为肝细胞生长因子(HGF)的受体, 通过与HGF结合参与了肿瘤细胞增殖与移动的信

号转导过程^[10]. 有研究显示, C-met蛋白在正常胃黏膜的腺颈部可呈现阳性表达, 提示与胃黏膜上皮的更新与修复活动有关^[11], 在胃癌前病变已有较高表达, 反映胃黏膜细胞的增殖状态并具有恶变倾向, 是胃癌发生中的早期事件^[12]. Bcl-2是目前研究最多的一种凋亡拮抗基因, 主要通过延长细胞寿命而导致异常细胞的积聚, 进而阻止凋亡的发生. 有研究结果显示^[13]从正常胃黏膜→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型增生→胃癌中, Bcl-2的表达逐渐上升, 与癌变前期过程有关, 参与胃癌的启动和胃癌形成的早期, 与肿瘤进展无关. p53本为抑癌基因, 可因不同位点的错义突变或等位基因的缺失失活而表现癌基因的特性. 有研究者指出, p53基因的突变和过表达不仅存在于胃癌各临床分期, 在肿瘤的启动和进展期均起作用, 且可发生于癌变前各阶段^[14-15]. 总之, 众多研究表明, 在胃癌前病变阶段已存在多种癌基因、抑癌基因的结构、表达异常, 使细胞增殖与凋亡平衡失调, 若不及时纠正, 极有可能进一步发展为胃癌.

本研究也显示正常大鼠胃黏膜有少许EGFR和C-met蛋白表达, 其中, EGFR主要分布在靠近腺体基底部的增殖细胞中, C-met主要分布在腺颈部细胞, 但没有VEGF、Bcl-2蛋白阳性表达; 模型大鼠胃黏膜EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2蛋白表达率均100%. 提示在大鼠胃癌前病变阶段即存在EGFR、VEGF、C-met、Bcl-2等多个基因的激活, 也可能是MNNG等诱发大鼠胃癌前病变的重要原因. 但本研究(多个实验室重复)显示P53抑癌基因蛋白均位于胞质, 与许多文献报道的主要位于胞核, 少部分位于胞质或胞质无表达不一致. 分析原因可能与胡氏^[16]一样, 与组织标本经福尔马林固定, 石蜡包埋有关.

早些时候, 如胃舒胶囊^[17]、胃逆转丸^[18]、菱胃散^[19]、养胃冲剂^[20]、摩罗丹^[21]、乐胃煎^[22]、半夏泻心汤^[23]、仁术健胃颗粒^[24]等从不同侧面探索了逆转治疗胃癌前病变的方法, 均取得较好的临床和病理疗效, 其治疗机制研究多集中在增强胃黏膜屏障、调节胃肠运动、阻止胆汁反流、抗H Pylori感染、调节免疫机能及影响细胞动力学等方面. 近年来从分子水平研究其机制虽然有所涉猎, 但仍在探索当中, 如猴菇多糖可降低胃黏膜癌前病变Bcl-2蛋白表达^[25]; 金果胃康颗粒可抑制胃黏膜H-ras、EGFR蛋白表达的异常改变^[26]; 善胃方可降低EGF及EGFR表达水平^[27]; 胃炎消对P21^{ras}, C-erbB-2, Bcl-2蛋白表达有一定调控作用, 但对P53抑癌基因蛋白无明显

■应用要点

弄清胃癌前病变阶段基因等分子异常和中医药对其影响机制, 为胃癌的早期诊断和中药靶基因治疗提供依据; 本项目来源于临床实践, 以期回到实践为广大的胃癌前病变患者服务.

■同行评价

中药对癌前病变的逆转方面有一定作用,但机制尚不清楚,本文拟通过实验研究探讨中药逆转大鼠胃黏膜癌前病变有一定价值。

显影响^[16,28],胃转安方可有效抑制端粒酶活性^[29];三七可降低EGFR、C-erbB-2、H-ras、Bcl-2癌基因的异常表达^[30];胃复春片可降低P21^{ras}、P53表达水平^[31]等。但尚未见到同时研究中药对胃癌前病变5个基因影响的报道。

加味左金丸是我院程丽芳教授的经验方。程师认为由于脾胃本身的生理功能、升降枢纽作用及脏腑之间的相互作用(主要为肝),虽然不同个体在不同阶段其病因病机侧重点有所不同,但其基本病机和病理改变即是肝脾(胃)不调(包括脾失健运,肝失条达,胃失和降),同时变生出气机的升降出入失调、气滞血瘀,寒热虚实错杂等病理情况。所以,治疗胃癌前病变关键在于调和肝胃(脾)、辛开苦降、行气活血,兼调寒热和辅以抗癌药物。加味左金丸便由此法而立,与上述有关药物的立法有所不同。本研究显示加味左金丸各组能不同程度地降低EGFR、VEGF、Bcl-2蛋白的表达,均以中剂量为优,但对C-met蛋白的表达作用不明显,提示加味左金丸则可能是通过对抗C-erbB-1、VEGF、Bcl-2基因的激活,抑制EGFR、VEGF、Bcl-2蛋白的表达,抑制细胞增殖、诱导“病态”细胞尽早凋亡,以恢复细胞凋亡与增殖平衡而发挥治疗胃癌前病变的作用。这种多基因调控作用可能与中药多成分、中医整体调节优势有关,是加味左金丸治疗或逆转大鼠胃癌前病变的机制之一。

阳性对照药维甲酸是细胞分化诱导剂,对胃癌前期病变具有部分阻断和逆转作用^[32]。本实验也表明维甲酸与加味左金丸一样对大鼠胃癌前病变胃黏膜VEGF、Bcl-2蛋白表达具有明显的抑制作用,但对降低EGFR、C-met蛋白的表达作用不明显。

4 参考文献

- 胡运莲. 程丽芳教授用加味左金丸治疗慢性萎缩性胃炎经验(附30例报告). 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 42-43
- 孙丽群, 胡运莲, 谭大琦, 姜楠. 加味左金丸治疗大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变的病理研究. 湖北中医杂志 2005; 27: 11-12
- 李春启, 刘为纹, 房殿春. 甲硝基亚硝基胍和/或雷尼替丁诱发大鼠腺胃黏膜肠上皮化生. 胃肠病学和肝病科学杂志 1995; 4: 254-257
- 石宇, 李连宏. 复合因素诱发大鼠胃黏膜癌前病变的动物模型. 临床与实验病理学杂志 2000; 16: 406-408
- 严茂祥, 陈芝芸, 项柏康, 秦继祖, 曹俊敏. 大鼠胃黏膜癌前病变模型的建立. 浙江中医学院学报 1998; 22: 3-4
- 白兆芝, 白震宇. 中医药对胃癌前病变基因缺失及点突变的调节作用与辨治思路. 山西中医 2000; 16: 8-10
- 赵培林, 庄惠敏, 李肇特. 大鼠胃黏膜EGF受体基因表

- 达的原位杂交定位. 科学通报 1994; 39: 458-460
- 张红, 许磊. 表皮生长因子受体在胃癌及癌前病变中的表达及意义. 肿瘤学杂志 2001; 7: 211-212
- 郑雄伟, 许磊, 赵春利, 陆丽俐, 翁秀琴. 胃炎与胃血管内皮生长因子的表达. 中国肿瘤 2001; 10: 161-162
- 秦荣, 何振平, 赵景宏, 王军平. 人胃癌细胞C-met表达及其在胃癌转移中的意义. 第三军医大学学报 2001; 23: 707-709
- 季峰. 胃癌编码受体酪氨酸激酶的原癌基因研究进展. 浙江医学 1998; 20: 765-767
- Soman NR, Wogan GN, Rhim JS. TPR-MET oncogenic rearrangement: detection by polymerase chain reaction amplification of the transcript and expression in human tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 738-742
- 吴丽华, 张玲, 韩莹. 凋亡相关基因的表达与胃癌的关系. 沈阳医学院学报 2004; 6: 134-135
- 姚伟明, 王桂华. P53蛋白与增殖细胞核抗原在胃癌中的表达及其临床意义. 实用肿瘤学杂志 2003; 17: 50-52
- 杨兰泽, 高静. P53, rasP21基因在胃癌及癌前病变中的表达. 中华医学丛刊 2003; 3: 5-6
- 胡玲, 劳绍贤, 周福生. 胃炎消对胃癌前病变相关靶基因蛋白表达的调控作用. 浙江中西医结合杂志 2001; 11: 334-336
- 陆为民, 单兆伟, 沈洪, 吴静, 朱云华, 朱长乐. 胃舒胶囊防治萎缩性胃炎癌前病变的实验研究. 世界华人消化杂志 1998; 6: 897-898
- 张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆. 胃细胞逆转丸治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变的临床与实验研究. 新消化病学杂志 1997; 5: 216-218
- 蔡锦莲, 黄明河, 陈秀凤, 董新, 廖妙娥, 李健, 黄彬, 张尚斌, 李惠芬, 陈福如. 萎胃散治疗慢性萎缩性胃炎及癌前病变的研究. 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 14-17
- 施玉湘. 养胃冲剂和猴头菇片治疗慢性萎缩性胃炎的比较. 新药与临床 1996; 15: 264-265
- 郭喜军, 李恩复. 摩罗丹治疗慢性萎缩性胃炎肠上皮化生200例疗效观察. 北京中医药大学学报 1994; 17: 33-34
- 王松坡, 蔡淦, 窦丹波, 林江. 乐胃煎对大鼠胃癌前病变胃黏膜异型性的影响. 中国中西医结合消化杂志 2001; 9: 145-147
- 丰素娟. 半夏泻心汤防治胃癌前病变的实验与临床研究. 中成药 2000; 22: 576-577
- 付招锦, 曹玉, 王芳, 韩锐. 仁术健胃颗粒对胃癌及癌前病变的防治作用. 中国药理通讯 2003; 20: 16-17
- 高泽立. 猴菇多糖对胃癌癌前病变的逆转治疗研究. 中成药 2000; 22: 555-558
- 沈舒文, 董盛, 刘俊田, 王晓梅, 王瑞丽. 金果胃康颗粒对胃癌前病变大鼠胃黏膜基因蛋白(H-ras, EGFR)表达影响的实验研究. 中医学刊 2003; 21: 1423-1424
- 袁红霞, 赵强, 黄文政, 方玲, 于强, 王洪俊, 冯莉, 闫小雪, 代二庆. 善胃方对气阴两虚型胃癌前期病变EGF及EGFR的影响. 天津中医药 2004; 21: 9-12
- 唐纯志, 劳绍贤, 胡玲, 匡忠生. 胃炎消治疗胃癌前病变对细胞凋亡及相关基因表达的影响. 中国中西医结合脾胃杂志 2000; 8: 263-267
- 刘华一, 王蓉, 王秀娟, 江海涛. 胃转安方对胃癌前期病变大鼠端粒酶活性干预作用的实验研究. 中医学刊 2004; 22: 1253-1254
- 石雪迎, 赵凤志, 戴欣, 方杰, 杨会敏. 三七对胃癌前病变大鼠胃黏膜癌基因蛋白异常表达的影响. 北京中医药大学学报 2001; 24: 37-39
- 张运贵, 张瑞玲, 黄咏梅, 段学萍, 薛强, 孙兆田. 胃复春对胃癌癌前病变的治疗及对P21^{ras}、P53表达的调节作用研究. 临床消化病学杂志 2004; 16: 162-162
- 李春启, 刘为纹, 王建荣, 房殿春. 维甲酸治疗胃黏膜癌前病变的实验研究. 中国肿瘤临床 1996; 23: 877-880

电编 李琪 编辑 潘伯荣

VEGF基因表达抑制对胃腺癌细胞SGC-7901增殖的影响

徐文华, 葛银林, 徐宏伟, 王秀丽, 耿芳宋

徐文华, 葛银林, 徐宏伟, 王秀丽, 耿芳宋, 青岛大学医学院
生物化学与分子生物学教研室 山东省青岛市 266021
徐文华, 女, 1972-09-15生, 山东省青岛市人, 汉族, 青岛大学
医学院硕士研究生。
青岛市科技局科技计划项目, 03-1-NY-14
通讯作者: 葛银林, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大
学医学院生物化学与分子生物学教研室, geyinlin@126.com
电话: 0532-82991209 传真: 0532-82991009
收稿日期: 2005-12-28 接受日期: 2006-02-10

Effect of down-regulating vascular endothelial growth factor gene on proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901

Wen-Hua Xu, Yin-Lin Ge, Hong-Wei Xu, Xiu-Li Wang, Fang-Song Geng

Wen-Hua Xu, Yin-Lin Ge, Hong-Wei Xu, Xiu-Li Wang, Fang-Song Geng, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Supported by Science Project of Qingdao Science and Technology Administration, No. 03-1-YN-14
Correspondence to: Professor Yin-Lin Ge, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China. geyinlin@126.com
Received: 2005-12-28 Accepted: 2006-02-10

Abstract

AIM: To study the effect of small interfering RNA (siRNA) on the gene expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) as well as the proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901.

METHODS: Two groups of siRNA were designed targeting VEGF mRNA and finally obtained by *in vitro* transcription. Then the obtained siRNA was transfected into cultured human gastric cancer cell line SGC-7901 by Lipofectamine. Hoechst33258 staining was used to observe the apoptotic bodies in the cells, and flow cytometry was used to detect the change of cell cycles. The level of VEGF mRNA expression was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the secretion of VEGF protein in the supernatant was examined by enzyme-linked immunosorbent as-

say (ELISA).

RESULTS: Both groups of VEGF-targeted siRNA inhibited the proliferation of SGC-7901 cells and induced cell apoptosis effectively and after transfection. The percentage of G₀/G₁ phase cells was significantly increased in siRNA₁- and siRNA₂-transfected cells in comparison with that in the control cells (75.04%, 76.52% vs 58.37%, $P < 0.01$), but the percentage of S phase cells was significantly decreased (17.82%, 16.73% vs 39.52%, $P < 0.01$). The level of VEGF mRNA expression was significantly inhibited in siRNA₁- and siRNA₂-transfected cells as compared with that in the controls (0.638 ± 0.078 , 0.656 ± 0.085 vs 0.941 ± 0.046 , $P < 0.01$), and the secretion of VEGF protein was also notably decreased in both siRNA-transfected cells (164.7 ± 22.7 , 166.3 ± 26.6 vs 414.0 ± 61.5 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: VEGF-targeted siRNA can effectively inhibit the proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901.

Key Words: Gastric cancer; SGC-7901; RNA interference; Vascular endothelial growth factor

Xu WH, Ge YL, Xu HW, Wang XL, Geng FS. Effect of down-regulating vascular endothelial growth factor gene on proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):655-659

摘要

目的: 研究siRNA(small interfering RNA)对人胃腺癌细胞SGC-7901的VEGF基因表达的影响。

方法: 选择血管内皮生长因子(VEGF)基因为靶基因, 设计两组针对VEGF mRNA的小干扰RNA, 合成DNA寡核苷酸链, 体外转录合成siRNA。以人胃腺癌细胞系SGC-7901为靶细胞, 应用脂质体转染的方法, 将siRNA导入细胞。采用Hoechst33258染色观察siRNA作用于SGC-7901细胞中出现凋亡小体的情况, 流式细胞仪检测细胞周期的改变, RT-PCR法比较转染前后VEGF mRNA表达水平的变化,

■背景资料

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤, 其死亡率位于恶性肿瘤前列, 探索其治疗方法具有重要应用价值。

■研究前沿

肿瘤的生长与血管的快速生长密切相关。肿瘤血管的形成受多种因子调节,其中最重要的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。在胃腺癌组织中VEGF165高表达。如何抑制VEGF165表达,已成为防治胃癌的热点。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是近几年刚刚发现的自然现象,一小段双链RNA(dsRNA)可引起特定mRNA降解。

ELISA法检测细胞培养液中VEGF蛋白分泌量的变化。

结果: 两组siRNA转染后均能有效地抑制SGC-7901细胞的生长,诱导细胞凋亡产生凋亡小体。siRNA作用于SGC-7901细胞,其细胞周期均发生了明显的变化,主要表现为G₀/G₁期细胞增多,S期细胞减少,并使细胞周期阻滞于G₀/G₁期(siRNA₁组, siRNA₂组G₀/G₁期 *vs* 对照组G₀/G₁期: 75.04%, 76.52% *vs* 58.37%, *P*<0.01; siRNA₁组, siRNA₂组S期 *vs* 对照组S期: 17.82%, 16.73% *vs* 39.52%, *P*<0.01),而其他组则无明显变化。VEGF mRNA的表达量大幅度减少(siRNA₁组, siRNA₂组 *vs* 对照组: 0.638±0.078, 0.656±0.085 *vs* 0.941±0.046, *P*<0.01),相对应的VEGF蛋白水平也显著降低(164.7±22.7, 166.3±26.6 *vs* 414.0±61.5, *P*<0.01),而其他组siRNA转染后则无上述作用。

结论: 应用靶向VEGF基因RNA干扰技术可以有效抑制胃癌细胞SGC-7901的增殖。

关键词: 胃癌; SGC-7901; RNA干扰; 血管内皮细胞生长因子

徐文华, 葛银林, 徐宏伟, 王秀丽, 耿芳荣. VEGF基因表达抑制对胃腺癌细胞SGC-7901增殖的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(7):655-659

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/655.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤,其死亡率居各种恶性肿瘤之首^[1-3]。探索治疗胃腺癌的新方法具有重要的临床价值。肿瘤的基因治疗中抗血管生成疗法成为近年来较为引人注目的一种。肿瘤血管的形成受多种因子调节,其中最重要的是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。VEGF基因位于染色体的6p21.3,全长28 kb,编码VEGF的基因长约14 kb,由8个外显子和7个内含子交替构成。其mRNA的不同剪接产生5种异构体,即VEGF121, 145, 165, 189及206^[4]。大量研究发现,VEGF在胃腺癌组织中高表达,其中VEGF165表达较高^[5-7]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是将双链RNA寡核苷酸片段(dsRNA)导入细胞引起特异基因mRNA降解的一种细胞反应过程^[8-9]。一般使用19-23 bp的dsRNA可特异性地发挥RNAi作用^[10]。通过抑制VEGF的表达抑制肿瘤微血管形成是当前抗肿瘤研究的热点^[11]。RNAi作为生命

科学领域的新技术,其应用非常广泛,从单细胞生物一直到人,作为基因表达干预的理想方法可应用于病毒和肿瘤的基因治疗^[12-13]。目前已成功用于基因功能和信号传递系统上下游分子相互关系的研究,有可能成为继反义核酸、核酶之后的又一新手段^[14]。我们利用设计的针对VEGF基因的两组siRNA(19-23 bp),研究对人胃腺癌细胞系SGC-7901 VEGF基因表达的抑制作用,探讨RNAi在肿瘤基因治疗中的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞株SGC-7901购自中国医学科学院基础医学研究所; LipofectamineTM 2000、Trizol Reagent、RPMI 1640培养基等购自Invitrogen; T7 RiboMAXTM Express RNAi System试剂盒、Access RT-PCR Introductory System购自Promega; 人VEGF ELISA Kit购自武汉博士德生物工程有限公司。从GenBank中获取已知的人VEGF mRNA序列(ACCESSION: AB021221)。采用Promega在线siRNA设计工具,设计两组siRNA序列(每组中第1条链为编码链,第2条为模板链)和错义序列组SCR序列^[15-16](与第2组siRNA序列有相同的GC组成,但是和人的mRNA没有同源性,以此作阴性对照),模板链的5'端带有T7启动子。体外转录出来的siRNA分别标记为siRNA₁、siRNA₂和siRNA_{SCR}。1: 5'-GAUCAAACCUCACCAAGGCUU-3'; 5'-GCCUUGGUGAGGUUUGAUCUU-3'。2: 5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUCUU-3'; 5'-GAUCUCAUCAGGGUACUCCUU-3'。3(SCR组): 5'-GCGUAACGCGGGAAUUUACUU-3'; 5'-GUAAAUUCCCGCGUUACGCUU-3'。目前干扰用siRNA的获得及高通量、大范围的应用仍以体外转录法为主^[20-21],具体参照Promega T7 Ribo MAXTM Express RNAi System试剂盒方案。SGC-7901细胞用含100 mL/L新生牛血清的RPMI 1640培养基,于37℃ 50 mL/L CO₂条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞的凋亡 取对数生长期的SGC-7901细胞,配制6×10⁷/L起始浓度的细胞悬液加到24孔板,同时加入多聚赖氨酸包被的盖玻片,24 h后弃上清,siRNA₁, siRNA₂, siRNA_{SCR}采用脂质体包裹转染的方法(200 nmol/L)转染48 h后,吸净培养液,加入多聚甲醛固定1 h,去固定液,PBS洗3遍,再加入10 mg/L的Hoechst33258(0.5 mL/孔)避光染色10 min,用封片液(500 mL/L

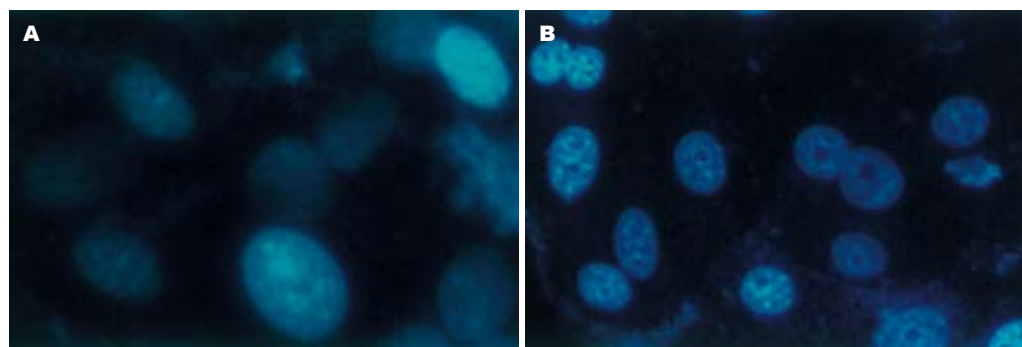


图1 SGC-7901细胞凋亡形态. A: 脂质体对照组; B: siRNA₁转染组SGC-7901细胞Hoechst染色.

■创新盘点

本研究所选靶基因为血管内皮生长因子基因, 不是一般癌基因; 利用DNA模板体外转录法合成小RNA, 纯度高, 无其他化学试剂.

表1 SGC-7901细胞周期变化 (%)

分组	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
siRNA ₁ 组	75.04 ^b	17.82 ^b	7.14
siRNA ₂ 组	76.52 ^b	16.73 ^b	6.75
错义序列组	58.23	41.34	0.43
脂质体组	58.76	40.18	1.06
空白对照组	58.37	39.52	2.11

χ^2 检验, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

PBS+500 mL/L甘油)封片, 荧光显微镜观察. 各组细胞以 1.5×10^5 /L起始密度接种于25 cm²培养瓶, 同样方法转染后继续培养48 h, 胰酶消化离心收集并悬于PBS中, 4℃ 700 mL/L的乙醇固定30 min, 用含RNase及碘化丙啶(propidium iodide, PI)的染色液染色30 min. 根据流式细胞仪(EPICS-ELITE-ESP)进行细胞周期分析, 每个样本约检测11 000个细胞, 得出各期细胞数占细胞总数的百分率.

1.2.2 VEGF基因表达分析 转染24 h后收获细胞, 用总RNA提取试剂盒Trizol提取各组细胞总RNA. 取1 μg总RNA进行RT-PCR扩增VEGF mRNA的部分片段. 上游引物: 5'-AATCGAGACCCTGGTGGACA-3', 下游引物: 5'-TTAACTCAAGCTGCCTCGCC-3'; 内参照基因GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)引物: 上游: 5'-CGTGAAGGACTCATGACCA-3', 下游: 5'-TCCAGGGGTCTTACTCCTTG-3'. 反应体系体积为50 μL, 按照Promega "Access RT-PCR Introductory System" 试剂盒方案: 45℃, 45 min 进行反转录反应; PCR反应条件为94℃, 2 min, AMV反转录酶灭活和RNA/cDNA引物预变性; 94℃ 30 s, 52.5℃ 1 min, 68℃ 2 min, 40个循环, 最后68℃延伸7 min. RT-PCR产物进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶紫外摄像系统中照相, 并运

用天能分析软件对条带进行光密度扫描, 检测各组VEGF mRNA RT-PCR产物与其对应的内参GAPDH mRNA RT-PCR产物 A_{VEGF}/A_{GAPDH} 的比值进行统计分析. 另收取转染24 h后细胞上清用于检测VEGF蛋白分泌量. 严格按试剂盒说明操作, 将不同浓度的VEGF标准品(7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 ng/L)以及不同组细胞上清液于Rayto2100C酶标仪中检测450 nm吸光度值. 读板后仪器自动绘制标准曲线并计算出各待测样本的VEGF定量值.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 采用单因素方差分析, 用SPSS 11.5统计软件进行统计处理.

2 结果

2.1 细胞凋亡 SGC-7901细胞的DNA结合了Hoechst33258之后, 紫外光激发式发射明显的蓝色荧光. siRNA组的细胞核出现典型的凋亡形态学改变, 凋亡细胞的主要特征为核染色质致密深染, 形成致密质块, 有时可碎裂, 产生凋亡小体^[17]. 空白对照组、脂质体组、错义序列组的细胞没有出现这些细胞和染色质的形态学改变(图1).

2.2 细胞周期 流式细胞仪检测细胞周期变化见表1. siRNA作用的细胞G₀/G₁期(细胞静止期和DNA合成前期)比例升高, S期和G₂/M期(DNA合成期与有丝分裂期)比例降低, 错义序列组、脂质体组无此变化, 证明siRNA对SGC-7901细胞生长有抑制作用.

2.3 SGC-7901细胞VEGF表达 转染24 h后VEGF mRNA表达水平可见到明显变化, siRNA₁组和siRNA₂组较正常对照组、脂质体组和错义序列组VEGF mRNA表达水平明显降低, 说明发挥了特异的RNAi作用, 这与细胞增殖实验结果相符(图2, 表2). siRNA₁和siRNA₂组的VEGF分泌含量

■应用要点

本实验设计针对VEGF mRNA的两组siRNA, 抑制人胃腺癌细胞系SGC-7901 VEGF基因的表达, 研究RNAi在肿瘤基因治疗中的应用前景.

■名词解释

1 血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因位于染色体的6p21.3, 全长28 kb, 编码VEGF的基因长约14 kb, 由8个外显子和7个内含子交替构成。其mRNA的不同剪接产生5种异构体, 即VEGF121, 145, 165, 189及206。
2 RNA干扰(RNA interference, RNAi)是将双链RNA寡核苷酸片段(dsRNA)导入细胞引起特异基因mRNA降解的一种细胞反应过程。一般使用19-23 bp的dsRNA可特异性地发挥RNAi作用。

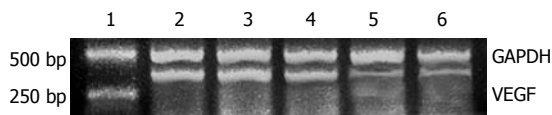


图2 转染siRNA后SGC-7901细胞VEGF mRNA表达水平。1: DNA marker; 2: siRNA₁组; 3: siRNA₂组; 4: 正常对照组; 5: 脂质体组; 6: 错义序列SCR组。

表2 各组SGC-7901细胞VEGF mRNA及上清VEGF蛋白分泌量的比较 (mean ± SD, n = 3)

分组	$A_{\text{VEGF}}/A_{\text{GAPDH}}$	上清VEGF蛋白分泌量 (ng/L)	抑制效率
正常对照组	0.941 ± 0.046	366.3 ± 25.5	/
脂质体组	0.936 ± 0.057	414.0 ± 61.5	/
siRNA _{SCR} 组	0.925 ± 0.052	350.0 ± 25.7	4.46%
siRNA ₁ 组	0.638 ± 0.078 ^b	164.7 ± 22.7 ^b	55.1%
siRNA ₂ 组	0.656 ± 0.085 ^b	166.3 ± 26.6 ^b	54.6%

^bP < 0.01 vs 脂质体对照组, 抑制效率 = (脂质体组 - siRNA组)/脂质体组。

明显低于脂质体对照细胞组等其他3组, siRNA₁和siRNA₂组与脂质体对照组比较均有统计学意义(表2)。

3 讨论

肿瘤(neoplasm)是一种常见多发病。近年来, 我国胃腺癌的发病率逐年增高, 但至今仍无有效疗法。新生血管过度生长是肿瘤快速生长和转移的重要基础。抑制新生血管生长是防治恶性肿瘤的一条重要途径。实体瘤的生长需要血管生成来输送营养和氧。实验发现, 肿瘤细胞集落一旦发生血管化, 肿瘤将以几何数量级倍增。此外, 还有其他多种病理过程与血管过度增生有关。如: 慢性感染、特异性免疫反应等。血管生成与动脉粥样硬化、关节炎、视网膜增生及内皮细胞恶变(如血管瘤)等也密切相关。因而, 抑制新生血管生长是治疗上述疾病, 尤其是防治恶性肿瘤的一条重要途径。目前已有一些血管生成抑制药物, 如某些激素和氨甲喋呤(methotrexate)等, 但大部分都由于毒性太大不能用于临床^[12], 寻找新的高效无毒的血管生成抑制方法, 已引起人们的重视。大量研究发现, VEGF基因在胃腺癌组织中高表达, 在血管生成中起着关键的作用。而RNAi技术为基因表达干预的理想方法, 通过导入一段与内源基因同源的dsRNA序列, 可以高效、特异地降解有关基因的mRNA, 诱使细胞表现出特定基因缺失的

表型^[18]。从而从基因水平抑制VEGF基因的表达, 达到减低甚至阻止VEGF分泌的效果; Spankuch-Schmitt *et al*^[19]在乳腺癌细胞系、子宫颈癌细胞系、结肠癌细胞系等细胞中进行了成功的RNA干扰实验, 并观察到癌细胞增殖明显减少, 凋亡显著增加。同时, RNAi具有特异、高效、毒性小的特点, 在肿瘤的基因治疗中具有良好的应用前景^[16,12]。若能联合上述作用, 必将极大增强多种恶性肿瘤的治疗效果。利用RNAi基因干预技术, 阻止血管生成和淋巴管生成防治癌症的研究, 目前还没有人报道^[20-21]。

我们以人胃腺癌细胞系SGC-7901为对象, 利用分子生物学技术, 设计、体外转录针对VEGF基因的两组siRNA, 转染体外培养的SGC-7901细胞, 遏制VEGF基因的表达, 研究胃腺癌的防治方法。结果表明, 从mRNA转录到蛋白质表达, siRNA都对VEGF基因的表达具有明显的抑制效果, 并抑制了胃腺癌细胞SGC-7901的增殖。在胃腺癌的抗血管生成基因治疗中VEGF可以成为有效的靶位点。实验所用体外转录试剂盒所转录出来的siRNA纯度高, 可直接应用于体外培养细胞的转染。脂质体带正电, 可以靠静电作用结合RNA形成RNA-阳离子脂质体复合物, 同时又吸附在带负电的细胞膜表面。因此, 脂质体转染法在短期应用的基因治疗中具有明显优点^[16,22-23]。

总之, 我们的结果为RNAi应用于肿瘤的基因治疗提供了一些实验基础。验证了应用RNA干扰技术可以有效抑制肿瘤相关基因的表达, 从而抑制瘤细胞的增殖、防治肿瘤的基因治疗思路, 为下一步动物实验打下了基础。当然, 针对VEGF的RNAi技术临床应用于胃腺癌治疗尚需要进一步的细胞实验以及动物实验。

4 参考文献

- 1 吴汉平, 吴开春, 李玲, 么立萍, 兰梅, 王新, 樊代明. 人环氧化酶-2(hCOX-2)编码基因的克隆及其反义核酸转染胃癌细胞的初步研究. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1211-1217
- 2 邓大君, 鄂征. 胃癌病因: 人N-亚硝酰胺暴露. 世界华人消化杂志 2000; 8: 250-252
- 3 薛绪潮, 方国恩, 华积德. 胃癌与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999; 7: 359-361
- 4 杨英. 血管内皮生长因子在肿瘤中的作用. 国外医学肿瘤学分册 2004; 31: 18-20
- 5 杨维良, 张东伟. 大肠癌基因治疗的研究现状及展望. 中华实验外科杂志 2004; 21: 778-780
- 6 林方才, 关文曾, 佟蔚廷, 王梓桢, 韩英杰. 大肠癌微血管密度和血管内皮生长因子表达的研究. 肿瘤研究与临床 1999; 11: 75-77

- 7 马占龙, 邓红. VEGF及其促肿瘤血管形成作用的研究进展. *江苏医药* 2004; 30: 50-51
- 8 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 9 Williams BR. Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 509-513
- 10 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 11 Kollerlmann J, Helpap B. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor Flk-1 in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 115-121
- 12 顾健人. 基因治疗的新进展. 2002济南国际肿瘤防治前沿学术大会 2002: 10
- 13 Sohail M, Doran G, Riedemann J, Macaulay V, Southern EM. A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e38
- 14 Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 110-119
- 15 Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 2001; 114: 4557-4565
- 16 Martinez LA, Naguibneva I, Lehmann H, Vervisch A, Tchenio T, Lozano G, Harel-Bellan A. Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14849-14854
- 17 苏长青. 细胞凋亡的形态代谢特点及生物学意义. *临床与实践病理学杂志* 1996; 12: 346-348
- 18 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366
- 19 Spankuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, Strebhardt K. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1863-1877
- 20 萧东, 丁健. 肿瘤新生血管生成抑制剂的研究进展. *中国新药杂志* 2001; 10: 248-251
- 21 吕联煌. 反义基因药物治疗血液肿瘤研究进展. *中华医学会第七次全国血液学学术大会* 2002: 11
- 22 Donze O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e46
- 23 孟和, 陈学辉, 潘玉春. RNA干扰用siRNA的体外转录合成. *上海交通大学学报(农业科学版)* 2004; 22: 64-68

■同行评价

本研究为RNAi应用于肿瘤的基因治疗提供了一些实验基础, 验证了应用RNA干扰技术可以有效抑制肿瘤相关基因的表达, 从而抑制瘤细胞的增殖、防治肿瘤的基因治疗思路, 为下一步动物实验打下了基础. 当然, 针对VEGF的RNAi技术临床应用于胃腺癌治疗尚需要进一步的细胞实验以及动物实验.

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 •

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: (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 征稿要求

征稿要求包括: (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.

胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达的意义

邓玮, 易永芬, 刘丹丹

■背景资料

Maspin是一种新发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂, 已在多种肿瘤中证实其具有抑制肿瘤侵袭、转移的作用。但有关Maspin在胃癌中的研究, 国内外报道很少。我们对Maspin在胃癌组织的表达进行了研究, 探讨了其表达与临床病理的关系, 首次分析了胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达的相关性及其意义, 初步探讨了Maspin可能的作用机制, 为以后更深入的研究打下基础。

邓玮, 易永芬, 刘丹丹, 重庆医科大学病理教研室 重庆市400016

邓玮, 2003年重庆医科大学硕士生, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

重庆市教委资助项目, No. 040310

通讯作者: 易永芬, 400016, 重庆市医学院路1号, 重庆医科大学病理科, yiyongfen1953@yahoo.com.cn

电话: 023-68485789

收稿日期: 2005-12-31 接受日期: 2006-01-26

Significance of Maspin, uPA and MMP-7 expression in human gastric carcinoma

Wei Deng, Yong-Fen Yi, Dan-Dan Liu

Wei Deng, Yong-Fen Yi, Dan-Dan Liu, Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Supported by the Fund from Chongqing Education Committee, No. 040310

Correspondence to: Yong-Fen Yi, Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. Yiyongfen1953@yahoo.com.cn

Received: 2005-12-31 Accepted: 2006-01-26

Abstract

AIM: To investigate the expression of Maspin, urokinase-type plasminogen activator (uPA) uPA and Matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and their roles in the tumorigenesis and progression of gastric cancer.

METHODS: Immunohistochemistry SP method was used to detect the expression of Maspin, uPA and MMP-7 in tissues from gastric adenocarcinoma ($n = 30$), signet-ring cell carcinoma ($n = 30$), and normal gastric mucosa ($n = 20$).

RESULTS: The positive rates of Maspin, uPA and MMP-7 were 50%, 70% and 80%, respectively, in gastric adenocarcinoma, and they were 46.7%, 76.7% and 90%, respectively, in signet-ring cell carcinoma. However, the positive rates of Maspin, uPA, and MMP-7 were 90%, 35%, and 30%, respectively, in normal gastric mucosa. Maspin, uPA, and MMP-7 expression were significantly different between tissues from carcinoma and normal mucosa ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Maspin expression was significantly related to

the depth of invasion and lymph node metastasis, but not to tumor size and TNM staging. The expression of uPA and MMP-7 were markedly related to the depth of invasion, lymph node metastasis and TNM staging, but not to tumor size. Maspin expression had a negative correlation with uPA and MMP-7 ($P = 0.012$, $r = -0.322$; $P = 0.008$, $r = -0.341$), while uPA expression had a positive correlation with MMP-7 ($P = 0.034$, $r = 0.274$).

CONCLUSION: Down-regulated expression of Maspin and up-regulated expression of uPA and MMP-7 play important roles in the invasion and metastasis of gastric carcinoma. They may serve as effective markers of reflecting the biopathological behaviors of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric tumor; Maspin; Urokinase-type plasminogen activator; Matrix metalloproteinase-7

Deng W, Yi YF, Liu DD. Significance of Maspin, uPA and MMP-7 expression in human gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):660-665

摘要

目的: 观察胃癌及正常胃黏膜Maspin, uPA, MMP-7表达的意义。

方法: 应用免疫组化SP法检测胃管状腺癌30例, 胃印戒细胞癌30例, 正常胃黏膜组织20例中Maspin, uPA, MMP-7的表达情况。

结果: 在胃管状腺癌中Maspin, uPA, MMP-7阳性表达率分别为50%, 70%和80%; 胃印戒细胞癌中阳性表达率分别为46.7%, 76.7%和90%; 正常胃黏膜组织中阳性表达率分别为90%, 35%和30%。Maspin的表达与浸润深度、淋巴结转移相关, 而与肿块的大小和TNM分期无关。uPA和MMP-7的表达与浸润深度、淋巴结转移、TNM分期相关, 而与肿块的大小无关。Maspin的表达与uPA和MMP-7的表达呈负相关($P = 0.012$, $r = -0.322$; $P = 0.008$, $r = -0.341$); uPA的表达与MMP-7的表达呈正相关($P = 0.034$, $r = 0.274$)。

结论: Maspin在胃癌中表达下调, uPA和MMP-7在胃癌中过表达, 他们在胃癌的浸润转移中起重要作用, 可作为反应胃癌病理生物学行为的有效指标。

关键词: 胃癌; Maspin; 尿激酶型纤溶酶原激活物; 基质金属蛋白酶-7

邓玮, 易永芬, 刘丹丹. 胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(7):660-665
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/660.asp>

0 引言

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 许多基因在胃癌的浸润转移中发挥重要作用. Maspin基因是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的一种, 分子质量为42 ku, 具有肿瘤抑制活性. 大量研究表明, 在多种肿瘤比如乳腺癌、口腔鳞癌中, Maspin的表达与其预后有关. 而Maspin基因的缺失会导致肿瘤浸润转移能力的增强. MMP-7和uPA分别属于金属蛋白酶类和丝氨酸蛋白酶类, 他们能有效地降解细胞外基质, 与恶性肿瘤发生和发展密切相关. 但是, 联合检测Maspin, uPA, MMP-7与胃癌的生物学特性的关系尚未见报道. 我们应用免疫组化SP染色法, 检测Maspin, uPA, MMP-7在胃管状腺癌、胃印戒细胞癌及正常胃黏膜组织中的表达, 并探讨他们之间的关系及其在胃癌浸润转移中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 1998-01/2004-01手术切除(术前未化疗)的胃癌组织石蜡块80例, 其中胃管状腺癌30例, 印戒细胞癌30例. 正常胃黏膜组织20例取自胃癌手术切除标本的正常切缘, 切缘经组织学证实无癌组织浸润. 胃癌中肿块 ≥ 4 cm 36例, < 4 cm 24例. 侵及黏膜及黏膜下层者8例, 侵及固有肌层者13例, 侵及浆膜层者39例. 有局部淋巴结转移者36例, 无淋巴结转移者24例. TNM 0, I期24例; II, III, IV期36例. Maspin即用型mAb(MS-1767-R7)购自美国Neomaker公司, uPA mAb购自武汉博士德公司, MMP-7 mAb购自福州迈新公司, SP-9000购自北京中杉生物公司.

1.2 方法 采用免疫组化SP法, 切片常规脱蜡至水, 30 mL/L过氧化氢孵育10 min, pH 8.0的EDTA缓冲液微波修复5 min, 滴加正常山羊血清工作液孵育10 min, 一抗4℃过夜, 滴加二抗, 孵育15 min, 滴加三抗, 孵育15 min, DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. PBS代替一抗作

阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照. Maspin定位于细胞质内或细胞质细胞核同时着色. 依据染色强度及阳性细胞率来计算评分. 染色强度: 0为阴性, 1为弱阳性, 2为阳性, 3为强阳性; 阳性细胞数0, $< 1\%$, $< 10\%$, $< 1/3$, $< 2/3$, $> 2/3$ 分别积分为0, 1, 2, 3, 4, 5; 两项之和0-2分为阴性(-), 3-5分为阳性(+), 6-8分为强阳性(++). uPA定位于细胞质内, 细胞质呈棕黄色者为阳性细胞, 依据染色强度及阳性细胞率来计算评分. 染色强度: 0为阴性, 1为弱阳性, 2为阳性, 3为强阳性; 阳性细胞数0, 1% - 25% , 25% - 50% , $> 50\%$ 分别积分为0, 1, 2, 3; 两项之和为3-6分者评为免疫组织化学染色阳性. MMP-7定位于细胞质内, 取10个高倍视野1 000个细胞计数阳性细胞数, 阳性细胞 $< 10\%$ 为阴性, $\geq 10\%$ 为阳性.

统计学处理 应用SPSS 11.5统计软件进行统计分析. 采用 χ^2 检验及Spearman等级相关分析. 检验水准为0.05.

2 结果

2.1 Maspin, uPA, MMP-7的表达 Maspin主要表达于正常胃黏膜的腺上皮细胞和胃癌细胞的细胞质(图1). 在胃管状腺癌中Maspin阳性表达率为50%(15/30), 9例为阳性(+), 6例为强阳性(++), 强阳性率为20%; 胃印戒细胞癌中Maspin阳性表达率为46.7%(14/30), 10例为阳性(+), 4例为强阳性(++), 强阳性率为13.3%; 正常胃黏膜组织中Maspin阳性表达率为90%(18/20), 5例为阳性(+), 13例为强阳性(++), 强阳性率为65%. 正常胃黏膜组织中Maspin阳性表达率和阳性表达强度明显高于胃管状腺癌和胃印戒细胞癌($P < 0.05$), 而胃管状腺癌和胃印戒细胞癌之间Maspin阳性表达率无明显差别($P > 0.05$). uPA阳性物质主要位于正常胃黏膜的腺上皮细胞和肿瘤细胞的胞质(图2), 30例胃管状腺癌中uPA阳性表达率为70%(21/30), 30例胃印戒细胞癌中uPA阳性表达率为76.7%(23/30), 20例正常胃黏膜组织中uPA阳性表达率为35%(7/20). 正常胃黏膜组织中uPA阳性表达率明显低于胃管状腺癌和胃印戒细胞癌($P < 0.05$), 而胃管状腺癌和胃印戒细胞癌之间无明显差别($P > 0.05$). 正常胃黏膜和肿瘤细胞MMP-7阳性者为胞质中出现棕黄色颗粒(图3). 30例胃管状腺癌中MMP-7阳性表达率为80%(24/30), 30例胃印戒细胞癌中阳性表达率90%(27/30), 20例正常胃黏膜组织中阳性表达率为30%(6/20). 正常胃黏膜组织中MMP-7阳性表达率明显低于胃管状腺癌和胃印戒细胞癌

■创新盘点

我们对Maspin在胃癌组织的表达进行了研究, 探讨了其表达与临床病理的关系, 首次分析了胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达的相关性及其意义, 初步探讨了Maspin可能的作用机制, 为以后更深入的研究打下基础.

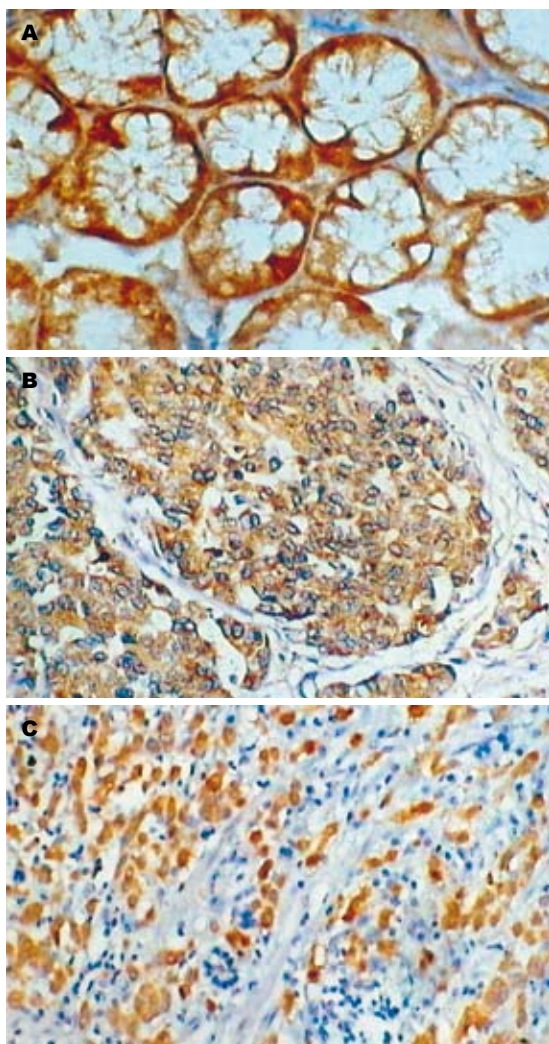


图1 胃黏膜Maspin阳性表达. A: 正常; B: 胃管状腺癌; C: 胃印戒细胞癌.

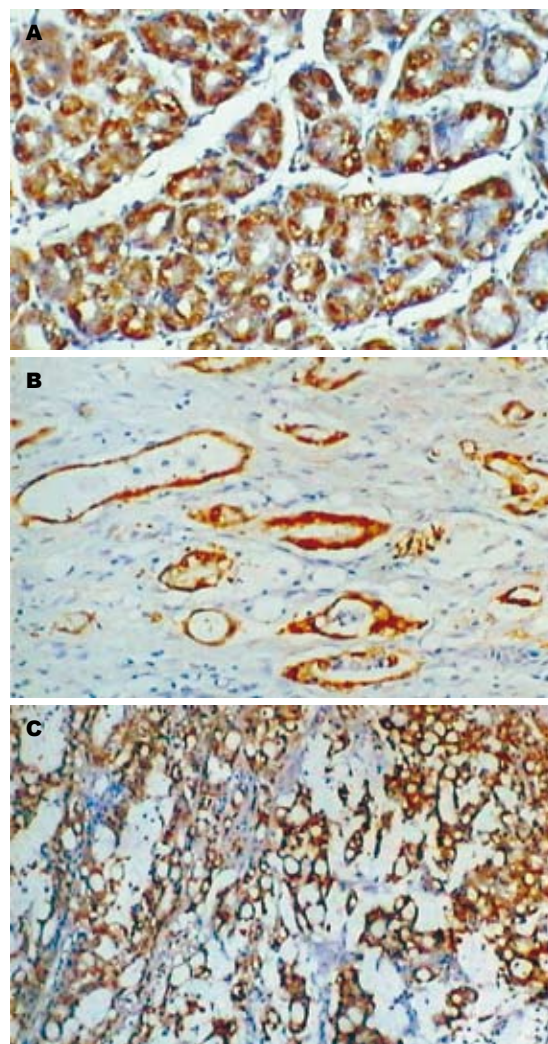


图2 胃黏膜uPA阳性表达. A: 正常; B: 胃管状腺癌; C: 胃印戒细胞癌.

表1 胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7 +, ++ (%) 的表达

分组	n	Maspin		uPA		MMP-7	
		+ ~ ++ (%)		+ ~ ++ (%)		+ ~ ++ (%)	
胃管状腺癌	30	9	6 (50.0) ^b	21	(70.0) ^a	24	(80.0) ^b
胃印戒细胞癌	30	10	4 (46.7) ^b	23	(76.7) ^b	27	(90.0) ^b
正常胃黏膜	20	5	13 (90.0)	7	(35.0)	6	(30.0)

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常胃黏膜.

($P < 0.05$), 而胃管状腺癌和胃印戒细胞癌之间无明显差别($P > 0.05$, 表1).

2.2 Maspin, uPA, MMP-7与胃癌临床病理特征的关系 肿瘤的大小和TNM分期与Maspin的阳性表达率无明显关系($P > 0.05$). 而浸润深度与Maspin的阳性表达率有相关性, 侵及黏膜及黏膜下、侵及肌层和侵及浆膜层者阳性率分别为75%(6/8), 61.5%(8/13), 38.5%(15/39), 有统

计学意义($P < 0.05$). 无淋巴结转移者Maspin的阳性表达率为66.6%(16/24), 有淋巴结转移者为36.1%(13/36), 前者明显高于后者($P < 0.05$). 肿瘤的大小与uPA和MMP-7的阳性表达率无明显关系($P > 0.05$). 60例胃癌组织中uPA的阳性表达与浸润深度有关, 侵及黏膜及黏膜下、侵及肌层和侵及浆膜层者阳性率分别为50%(4/8), 61.5%(8/13), 82.1%(32/39), 有统计学意义($P < 0.05$); 无淋巴结转移者阳性表达率为54.2%(13/24), 有淋巴结转移者阳性表达率86.1%(31/36), 差异有显著性; TNM分期中0, I期和II, III, IV期胃癌组织阳性表达率分别为58.3%(14/24), 83.3%(30/36), 有统计学意义($P < 0.05$). 胃癌组织中MMP-7的阳性表达与浸润深度有关, 侵及黏膜及黏膜下、侵及肌层和侵及浆膜层者阳性率分别为62.5%(5/8), 76.9%(10/13), 92.3%(36/39), 有统

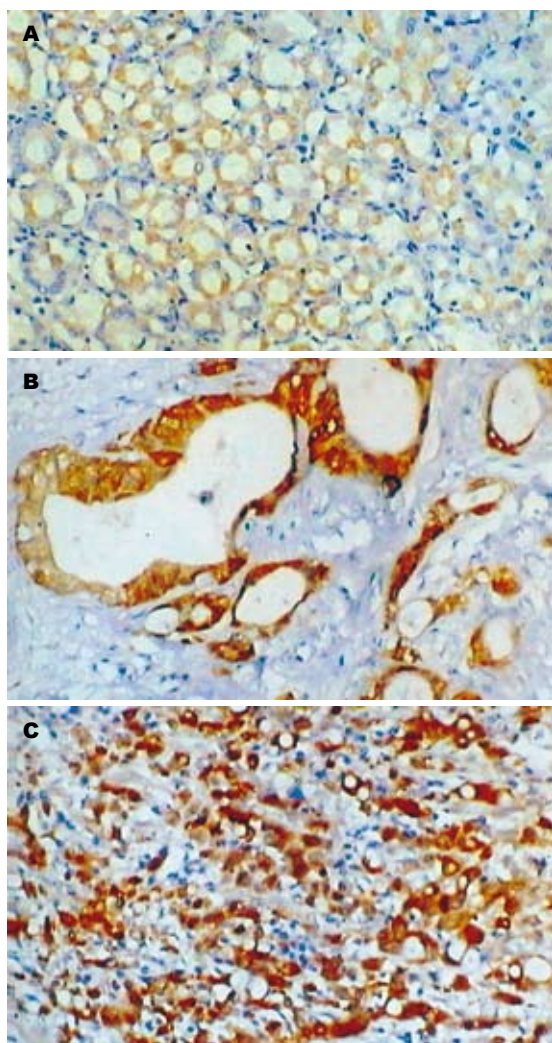


图3 胃黏膜MMP-7阳性表达。A: 正常; B: 胃管状腺癌; C: 胃印戒细胞癌。

计学意义($P<0.05$); 无淋巴结转移者阳性表达率为70.8%(17/24), 有淋巴结转移者阳性表达率94.4%(34/36), 二者有显著差异; TNM分期中0, I期和II, III, IV期胃癌组织阳性表达率分别为70.8%(17/24), 94.4%(34/36), 二者有显著差异(表2)。

2.3 胃癌Maspin, uPA, MMP-7表达的相关性 胃癌组织中17例Maspin与uPA同时阳性表达, 4例Maspin与uPA同时阴性表达, Maspin与uPA表达呈负相关($P<0.05$)。21例Maspin与MMP-7同时阳性表达, 1例同时阴性表达, Maspin与MMP-7表达呈负相关($P<0.05$)。40例uPA与MMP-7同时阳性表达, 9例uPA与MMP-7同时阴性表达, uPA与MMP-7表达呈正相关($P<0.05$, 表3)。

3 讨论

Maspin是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中的一种, 具有抑制肿瘤的活性。目前研究表明Maspin

表2 胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达与临床病理特征的关系

临床病理	<i>n</i>	Maspin	uPA	MMP-7
肿块大小				
<4 cm	24	13	18	20
≥4 cm	36	16	26	31
浸润深度				
达黏膜及黏膜下	8	5	4	5
达固有肌层	13	9 ^a	8 ^a	10
达浆膜层	39	15	32	36
淋巴结转移				
无	24	16	13	17
有	36	13 ^a	31 ^b	34 ^a
TNM分期				
0, I期	24	13	14	17
II, III, IV	36	16	30 ^a	34 ^a

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ 。

表3 胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达的关系

项目	Maspin		r_s	P 值	uPA		r_s	P 值
	-	+			-	+		
MMP-7	1	8			9	0		
	30	21	-0.341	0.008	11	40	0.274	0.034
uPA	4	12						
	27	17	-0.322	0.012				

在多种正常细胞如乳腺、阴道、前列腺、皮肤的上皮细胞中高表达^[1-2], 而在癌细胞如口腔鳞癌、乳腺癌中表达下调或缺失^[3-6]。我们的研究也显示正常胃黏膜中Maspin的阳性表达率明显高于胃管状腺癌和胃印戒细胞癌, 而胃管状腺癌和胃印戒细胞癌之间的阳性表达率无显著差异。此结果提示Maspin表达下调与胃癌的恶性演进有关。有作者报道癌细胞中Maspin的启动子出现cytosine甲基化, 而用甲基化抑制剂后, Maspin重新表达, 且出现剂量依赖, 这提示Maspin基因表达的下调与甲基化有关^[7-9]。也有作者认为Maspin表达下调与转录因子Ets和Ap1的转录活性失活有关, 正常上皮细胞中Ets可和Ap1协同作用, 激活启动子转录, 而癌细胞中Ets和Ap1正调节作用减弱, Maspin表达降低^[10]。我们讨论了Maspin的表达与临床病理特征的关系, 发现Maspin的表达与浸润和转移有关。即浸润越深、有转移者Maspin表达越低。这提示Maspin作为肿瘤转移抑制基因在胃癌演进中起着重要的抑制作用, 这与Maspin在其他肿瘤演进中

的表现是吻合的^[11-15]。大量研究表明, Maspin在肿瘤浸润转移的各个环节中起着重要的作用: Maspin能改变细胞表面整合素的结构, 增强细胞对细胞外基质的黏附能力, 影响细胞内的信号传导, 使细胞向更良性表型转化^[16]; Maspin能有效阻止内皮细胞对血管生长因子的反应, 抑制内皮细胞的生长, 阻止其形成管道结构, 使肿瘤微血管的密度减少^[17-19]。最近的研究表明Maspin还可以通过调节小G蛋白Rac1和PAK1(p21-活性激酶)的活性来抑制细胞的运动, 通过磷酸肌醇-3激酶(PI3K)和细胞外信号调节激酶(ERK)途径来调节细胞的黏附^[20]。

uPA是一种丝氨酸蛋白酶, 与特异性受体(uPAR)结合后, 具有活性, 能启动纤溶酶原活化为纤溶酶, 后者能降解肿瘤细胞外基质, 促进肿瘤的浸润转移。我们发现, 正常胃黏膜中uPA的阳性表达率明显低于胃管状腺癌和胃印戒细胞癌, 且胃癌中浸润越深、有转移者uPA阳性表达越高。这与Okusa *et al*^[21]发现uPA高活性与肿瘤浸润深度和转移相关是一致的。我们还发现Maspin的表达与uPA呈负相关, Biliran *et al*^[22]发现Maspin可特异抑制细胞表面相关的uPA, 从而降低体外细胞的浸润运动潜能。且有作者发现重组Maspin的反应活性部位是RSL结构, 能特异地与单链纤维蛋白溶酶原激活物结合, 形成稳定的复合物, 从而抑制纤维蛋白溶酶原激活物的活性^[23-25]。此外, Maspin可与uPA结合形成一种抗SDS的蛋白酶复合物, 降低uPA的释放能力, 减少纤溶酶原活化为纤溶酶。

MMP-7是MMP家族的重要成员, 他能降解基底膜成分如IV型胶原和弹性蛋白。有作者发现胃癌中MMP-7表达增强^[26-28]。本研究发现正常胃黏膜中MMP-7的阳性表达率明显低于胃腺癌和胃印戒细胞癌, 且胃癌中浸润越深、有转移者MMP-7阳性表达越高。这与其他作者的发现是一致的。此外, uPA与MMP-7表达呈正相关。有研究表明: uPA可以激活MMP, 开启MMP对细胞外基质的降解机制, 主要是uPA通过细胞外信号通路酪氨酸激酶活性包括Src和磷酸肌醇-3激酶(PI3K), 与整合素 β 1结合, 激活pro-MMP, 从而调节MMP的活性^[29-30]。Maspin与MMP-7表达呈负相关, 这提示Maspin对MMP-7可能有下调作用, 我们推测其机制可能是Maspin通过下调uPA的表达, 从而影响信号传导系统使MMP-7的表达下降, 但其具体作用机制有待进一步探讨。

总之, 我们的结果提示, Maspin表达的下调

和uPA, MMP-7的过表达在胃癌的浸润转移中起重要作用, 他们可以作为反映胃癌病理生物学行为的指标。但三者之间是如何调节的有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Cao D, Wilentz RE, Abbruzzese JL, Ho L, Maitra A. Aberrant expression of Maspin in idiopathic inflammatory bowel disease is associated with disease activity and neoplastic transformation. *Int J Gastrointest Cancer* 2005; 36: 39-46
- 2 Marioni G, Blandamura S, Giacomelli L, Calgaro N, Segato P, Leo G, Fischetto D, Staffieri A, de Filippis C. Nuclear expression of Maspin is associated with a lower recurrence rate and a longer disease-free interval after surgery for squamous cell carcinoma of the larynx. *Histopathology* 2005; 46: 576-582
- 3 Xia W, Lau YK, Hu MC, Li L, Johnston DA, Sheng S, El-Naggar A, Hung MC. High tumoral Maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 2398-2403
- 4 Umekita Y, Yoshida H. Expression of Maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma. *Histopathology* 2003; 42: 541-545
- 5 Friedrich MG, Toma MI, Petri S, Cheng JC, Hammerer P, Erbersdobler A, Huland H. Expression of Maspin in non-muscle invasive bladder carcinoma: correlation with tumor angiogenesis and prognosis. *Eur Urol* 2004; 45: 737-743
- 6 Chen Z, Fan Z, McNeal JE, Nolley R, Caldwell MC, Mahadevappa M, Zhang Z, Warrington JA, Stamey TA. Hepsin and Maspin are inversely expressed in laser capture microdissected prostate cancer. *J Urol* 2003; 169: 1316-1319
- 7 Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, Domann FE. Role for DNA methylation in the control of cell type specific Maspin expression. *Nat Genet* 2002; 31: 175-179
- 8 Ito R, Nakayama H, Yoshida K, Oda N, Yasui W. Loss of Maspin expression is associated with development and progression of gastric carcinoma with p53 abnormality. *Oncol Rep* 2004; 12: 985-990
- 9 Primeau M, Gagnon J, Momparler RL. Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 2003; 103: 177-184
- 10 Zhang M, Magit D, Sager R. Expression of Maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5673-5678
- 11 Machtens S, Serth J, Bokemeyer C, Bathke W, Minssen A, Kollmannsberger C, Hartmann J, Knuchel R, Kondo M, Jonas U, Kuczyk M. Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features. *Int J Cancer* 2001; 95: 337-342
- 12 Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N, Kumamoto Y, Kuratomi Y, Tomita K, Komiyama S. Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001; 23: 962-966
- 13 Maass N, Hojo T, Rosel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasa-

- ki K. Down regulation of the tumor suppressor gene Maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem* 2001; 34: 303-307
- 14 Reddy KB, McGowen R, Schuger L, Visscher D, Sheng S. Maspin expression inversely correlates with breast tumor progression in MMTV/TGF- α transgenic mouse model. *Oncogene* 2001; 20: 6538-6543
- 15 Domann FE, Rice JC, Hendrix MJ, Futscher BW. Epigenetic silencing of Maspin gene expression in human breast cancers. *Int J Cancer* 2000; 85: 805-810
- 16 Seftor RE, Seftor EA, Sheng S, Pemberton PA, Sager R, Hendrix MJ. Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 5681-5685
- 17 Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N. Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med* 2000; 6: 196-199
- 18 Shi HY, Zhang W, Liang R, Abraham S, Kittrell FS, Medina D, Zhang M. Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by Maspin in a syngeneic breast cancer model. *Cancer Res* 2001; 61: 6945-6951
- 19 Wang MC, Yang YM, Li XH, Dong F, Li Y. Maspin expression and its clinicopathological significance in tumorigenesis and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 634-637
- 20 Odero-Marah VA, Khalkhali-Ellis Z, Chunthapong J, Amir S, Seftor RE, Seftor EA, Hendrix MJ. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 398-403
- 21 Okusa Y, Ichikura T, Mochizuki H. Prognostic impact of stromal cell-derived urokinase-type plasminogen activator in gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 1033-1038
- 22 Biliran H Jr, Sheng S. Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive Maspin. *Cancer Res* 2001; 61: 8676-8682
- 23 Zhang W, Zhang M. Tissue microarray analysis of Maspin expression and its reverse correlation with mutant p53 in various tumors. *Int J Oncol* 2002; 20: 1145-1150
- 24 Cher ML, Biliran HR Jr, Bhagat S, Meng Y, Che M, Lockett J, Abrams J, Fridman R, Zachareas M, Sheng S. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7847-7852
- 25 Kitoh T, Yanai H, Saitoh Y, Nakamura Y, Matsubara Y, Kitoh H, Yoshida T, Okita K. Increased expression of matrix metalloproteinase-7 in invasive early gastric cancer. *J Gastroenterol* 2004; 39: 434-440
- 26 Ajisaka H, Yonemura Y, Miwa K. Correlation of lymph node metastases and expression of matrix metalloproteinase-7 in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 900-905
- 27 Chen JQ, Zhan WH, He YL, Peng JS, Wang JP, Cai SR, Ma JP. Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 776-782
- 28 Aihara R, Mochiki E, Nakabayashi T, Akazawa K, Asao T, Kuwano H. Clinical significance of mucin phenotype, beta-catenin and matrix metalloproteinase 7 in early undifferentiated gastric carcinoma. *Br J Surg* 2005; 92: 454-462
- 29 Festuccia C, Angelucci A, Gravina G, Eleuterio E, Vicentini C, Bologna M. Bombesin-dependent pro-MMP-9 activation in prostatic cancer cells requires beta1 integrin engagement. *Exp Cell Res* 2002; 280: 1-11
- 30 Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2000; 2: 545-551

电编 张敏 编辑 潘伯荣

应用基因表达谱芯片筛选胃腺癌相关基因

李曼, 赵作伟, 辛彦

■背景资料

本研究通过基因芯片技术获得胃癌组织和癌旁正常组织在不同状态下的基因表达谱, 通过生物信息学处理, 对其进行比较, 确定正常组织和胃癌组织的基因表达上的差异以及不同基因在表达上的相关性, 进而帮助人们在基因水平上深入了解胃癌的发生、发展。

李曼, 辛彦, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所 辽宁省沈阳市 110001

赵作伟, 大连医科大学附属第一医院普外科 辽宁省大连市 116023

李曼, 女, 1973-02-19生, 辽宁省本溪人, 汉族, 2004年中国医科大学博士生, 就职于大连医科大学附属第二医院肿瘤科, 主要从事胃癌转移的研究。

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. yanxin90@yahoo.com
电话: 024-23256666-6351

收稿日期: 2005-12-14 接受日期: 2006-01-25

Screening of genes differentially expressed in gastric adenocarcinoma by gene expression profiling technique

Man Li, Zuo-wei Zhao, Yan Xin

Man Li, Yan Xin, Cancer Institute, the First affiliated Hospital of China Medical University, ShenYang 110001, Liaoning Province, China

Zuo-wei Zhao, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Shenyang 110011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Yan Xin, Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yanxin90@yahoo.com

Received: 2005-12-14 Accepted: 2006-01-25

Abstract

AIM: To investigate the genes differently expressed between gastric adenocarcinoma and normal mucosal tissues by cDNA microarray technique.

METHODS: The total RNA was extracted from gastric adenocarcinoma and normal mucosal tissues and then purified. The cDNA was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and then labeled with Cy5 and Cy3 fluorescence as probes, which were hybridized with gene chip containing 14 784 human 14KcDNA. Subsequently, the signal images were scanned by Agilent fluorescence scanner and analyzed by Pix QuantArray software.

RESULTS: Of the 14 784 target genes, 29 genes were screened out for differences in gene expres-

sion level between gastric adenocarcinoma and normal gastric mucosa. Ten of the 29 genes were up-regulated, of which 2 were with unknown function, and 19 were down-regulated.

CONCLUSION: Multiple genes take part in the carcinogenesis of gastric adenocarcinoma. The 29 gene differentially expressed may be involved in the occurrence and development of gastric cancer.

Key Words: Gastric adenocarcinoma; Gene expression profile; Differentially expressed genes

Li M, Zhao ZW, Xin Y. Screening of genes differentially expressed in gastric adenocarcinoma by gene expression profiling technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):666-670

摘要

目的: 利用基因芯片技术筛选胃腺癌组织和癌旁正常组织间的差异表达基因。

方法: 分别抽取胃腺癌组织和癌旁正常组织的总RNA。采用逆转录的方法, 制成cDNA链, 并以两种荧光Cy5和Cy3标记后作为探针, 与含有14 784条人类14KcDNA基因表达谱芯片进行杂交。以Agilent荧光扫描仪扫描芯片上两种荧光信号, 并用计算机处理和分析。

结果: 在14 784条基因中, 4例胃腺癌组织和癌旁正常组织共同差异表达基因29条, 其中上调基因10条, 下调基因19条, 上调的基因中有2条功能信息不明。

结论: 胃腺癌发生过程中有多基因的参与, 胃腺癌与癌旁正常组织共同差异表达的29条基因可能与胃癌的发生、发展有关。

结论: 胃腺癌发生过程中有多基因的参与, 胃腺癌与癌旁正常组织共同差异表达的29条基因可能与胃癌的发生、发展有关。

关键词: 胃腺癌; 基因表达谱芯片; 差异表达基因

李曼, 赵作伟, 辛彦. 应用基因表达谱芯片筛选胃癌相关基因. 世界华人消化杂志 2006;14(7):666-670
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/666.asp>

0 引言

胃癌是严重威胁人类健康的主要恶性肿瘤, 其中胃腺癌占绝大多数, 约为40%-60%, 成为胃癌最常见的组织学类型. 目前对胃癌病因、发病机制的研究已经进入了分子水平, 认为胃癌的发生和发展是多种肿瘤相关基因表达失常. 基因表达谱芯片为研究胃癌相关基因表达提供了理想的技术支持, 通过对来源不同个体、不同组织、不同刺激条件下的组织细胞内表达情况的对比分析, 筛选出具有个体特异性、组织特异性、刺激特异性差异表达基因群, 并对基因群的变化特征和规律进行描述^[1-2]. 我们利用基因芯片技术的同步高通量、高灵敏度、平行性的特性, 应用含有14 784条人类14KcDNA基因表达谱芯片, 以临床切除的胃腺癌组织和癌旁正常组织标本为研究对象, 对其差异基因进行研究, 探讨相关基因与胃腺癌生物学特性可能的内在联系.

1 材料和方法

1.1 材料 手术病理检查证实的胃腺癌和癌旁正常组织标本4例, 术前均未经放疗和化疗. 男女各2例. 平均年龄49(42-71)岁, 高分化腺癌1例, 中低分腺癌2例, 低分化腺癌1例. 无转移2例, 淋巴结转移1例, 肝转移1例, 癌旁组织取自距肿瘤基底部至少5 cm外黏膜. 芯片采用上海生物芯片有限公司提供的人14KcDNA表达谱芯片, cDNA克隆用通用引物进行PCR扩增, 扩增片段长度为800-3 000 bp, PCR产物用异丙醇纯化, 通过琼脂糖电泳监控PCR质量, 将样品cDNA溶解于3×SSC盐溶液中, 用Gene machine公司Omigrad Sloa点样仪进行自动点样, 将点样后的玻片进行扫描, 然后经水合1-2 h, 室温下干燥, 置于紫外交联仪中交联, 以2 g/L SDS、水及2 g/L 硼氢化钠溶液处理, 晾干备用, 人14KcDNA表达谱芯片基因总数14 784个, 矩阵点数为18点×18点×48(亚矩阵), 点间距230 μm.

1.2 方法 按Trizol一步法抽提胃癌组织和癌旁正常组织总RNA, 使用QIAGEN Rneasy Kit进一步纯化总RNA, 应用琼脂糖凝胶电泳判断28S和18S的亮度比例评价总RNA的质量, 分离mRNA. 在20 μL逆转录体系中加入10 μg mRNA, 参照Scheda *et al*^[3]的方法逆转录cDNA

探针并标记mRNA, 用Cy3-dUTP标记胃癌组织mRNA, 用Cy5-dUTP标记癌旁正常组织mRNA. 用无水乙醇将上述两种标记的探针沉淀, 再混合溶解在杂交试剂中(杂交试剂由上海生物芯片公司提供). 将含混合探针的杂交液与芯片分别经95℃变性后, 将杂交液滴于芯片点样区, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用Parafilm密封, 42℃温水浴杂交16 h. 芯片杂交完成后分别用洗液I (2×SSC+2 g/L SDS)、洗液II (0.1×SSC+2 g/L SDS)、洗液III (0.1×SSC)洗涤10 min, 室温晾干. 采用激光共聚焦荧光扫描仪Agilent扫描芯片, 用QuantArray^R分析软件读取数据, 分辨率Scan resolution为10 μm, PMT为100%, 采用Genespring进行标准化处理分析, 得出Cy3和Cy5标记的强度值, 计算Ratio值为Cy3/Cy5. Cy3和Cy5信号荧光强度必须有一个>800; Ratio(Cy3/Cy5)比值的自然对数绝对值>2或<0.5, 判断为差异表达的基因.

2 结果

2.1 总RNA提取 总RNA提取结果良好, 提取胃癌组织和癌旁正常组织中总RNA的含量在50-100 μg之间, 琼脂糖凝胶电泳结果分析RNA, 28S RNA和18S RNA条带清晰, 5S条带模糊, 说明RNA纯度和完整性较好(图1).

2.2 芯片杂交结果的可靠性 为了监控芯片和杂交过程, 设立5个阴性对照, 结果这些点的杂交信号极低, 说明杂交时无外源污染. 空白对照分散于48个亚矩阵中, 杂交信号低, 证明实验中不存在交叉污染. 在每个亚矩阵中设立的11个管家基因均为阴性, 在数据处理时能校对2种荧光标记之间的信号强度, 保证检测体系正常, 杂交结果的可靠性.

2.3 差异表达基因筛选结果 胃腺癌组织和癌旁正常组织(图2-3)中共同差异表达基因29条, 其中表达上调基因10条(表1), 表达下调基因19条(表2), 发现功能信息不明新基因2条, 均为上调基因.

3 讨论

自从1972年Huebner和Todar提出细胞癌变的癌基因学说后, 对肿瘤机制的研究在近几年已进入分子水平. 目前认为肿瘤是一个多因素、多步骤、多基因参与的复杂过程, 是由一组基因的变化及其相互作用决定的, 不是一两个或少数几个基因所能决定的. 基因表达谱芯片的应用提供了相关基因的基因组学的证据, 突破了

■应用要点

基因芯片是目前筛选差异表达基因较为成熟的方法, 寻找并克隆与肿瘤相关差异表达基因是肿瘤基因诊断和基因治疗的关键.

同行评价

本研究利用基因芯片技术筛选胃癌组织和癌旁正常组织间的差异表达基因,对于两种组织之间已知基因表达的差异提供了初步的研究结果,表明胃癌发生发展过程中多基因参与的特性,具有一定的探索性。

表 1 胃腺癌组织与癌旁正常组织比较共表达上调基因

GenBank ID	ratio	gene_description
BG540617	6.24	
NM_014297	2.76	Homo sapiens ethylmalonic encephalopathy 1 (ETHE1)
NM_006412	3.302	Homo sapiens 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (AGPAT2)
NM_004444	2.581	Homo sapiens EphB4 (EPHB4)
NM_000308	2.231	Homo sapiens protective protein for beta-galactosidase (galactosialidosis) (PPGB)
AW962980	5.451	'EST375053 MAGE resequences, MAGH Homo sapiens cDNA, mRNA sequence
AW054747	2.019	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2501448 3'
NM_001091	9.894	Homo sapiens amiloride binding protein 1 (ABP1)
NM_007329	22.75	Homo sapiens deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1)
AW966777	3.018	'EST378851 MAGE resequences, MAGI Homo sapiens cDNA, mRNA sequence

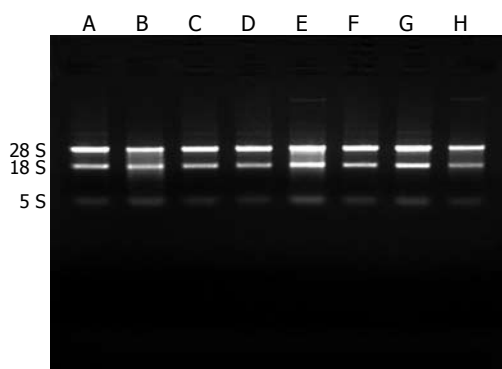


图 1 总RNA凝胶电泳图。ACEG: 胃腺癌组织; BDFH: 癌旁正常组织。

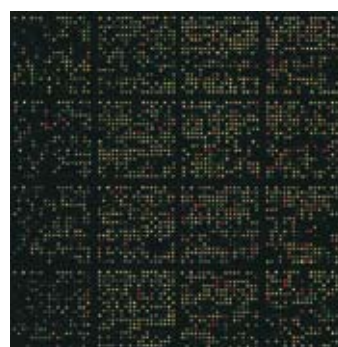


图 2 胃腺癌组织与癌旁正常组织(局部)双色荧光叠加图。芯片为18点×18点×48(亚矩阵),对于某一点的两种叠加荧光信号,如果Cy3信号较强,该点多显绿色(下调趋势);如果Cy5信号较强,该点多显红色(上调趋势);如果信号强度相似,即显黄色。

以往单个基因孤立研究的局限,从整体上全面了解整个基因组多个基因的变化,为在全基因组范围内寻找与肿瘤发生、发展相关的基因变化提供了一个强有力的手段。

我们应用含14 784个基因的基因芯片技术比较胃癌原发灶与癌旁正常组织之间基因表达谱的差异,发现在两组间共同差异表达基因29条,涉及癌基因、抑癌基因、免疫相关基因、细胞信号和传递蛋白相关基因、细胞周期蛋白相关基因和细胞受体相关基因,与肿瘤的发生和发展过程有着密切的关系。这一结果进一步证实胃癌的发生是一个多基因参与的过程,多基因变异的结果。在胃腺癌组织中呈上调表达的基因中, EphB4是受体酪氨酸蛋白激酶癌基因,编码具有酪氨酸蛋白激酶活性的受体蛋白,酪氨酸蛋白激酶在细胞生长、增殖、分化、转化过程中起着重要的作用,与肿瘤的发生密切相关。Xia *et al*^[4]报道抑癌基因p53, PTEN的缺失和酪氨酸激酶及其受体、胰岛素样生长因子及其受体的改变能够诱导EphB4基因表达,增强酪氨酸蛋白激酶活性,激活细胞内信号传递系统,刺激细胞生长与增殖、转化恶变。研

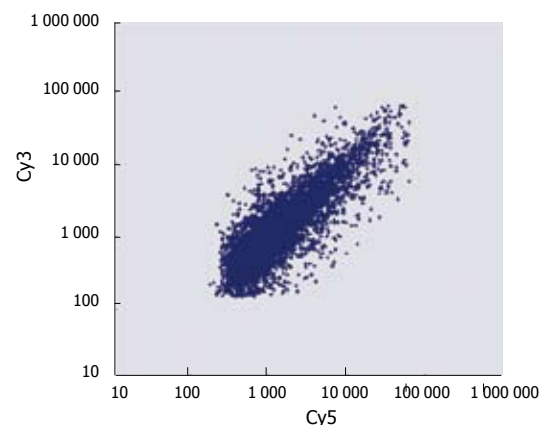


图 3 基因芯片杂交信号的散点图。X轴以Cy5荧光强度前景值为坐标, Y轴以Cy3荧光强度前景值为坐标,每一个数据点代表芯片上一个基因的杂交信号。

究表明EphB4癌基因在前列腺癌、乳腺癌、头颈鳞癌等恶性肿瘤细胞中高表达,促进肿瘤形成^[4-6]。Xia *et al*^[4]报道利用RNA干扰或反义寡核苷酸技术敲除EphB4编码的癌蛋白,使肿瘤细胞生长、迁移和侵袭受到明显抑制并诱导凋亡,这表明EphB4基因可以直接或间接参与肿瘤细胞的增殖调控过程。DMBT1基因是从染色

表 2 胃腺癌组织与癌旁正常组织比较共表达下调基因

GenBank ID	ratio	gene_description
NM_002065	0.138	Homo sapiens glutamate-ammonia ligase (GLUL)
NM_198057	0.265	Homo sapiens delta sleep inducing peptide, immunoreactor (DSIP)
AL831930	0.113	'Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761C2021
NM_006472	0.243	Homo sapiens thioredoxin interacting protein (TXNIP)
NM_198159	0.350	Homo sapiens microphthalmia-associated transcription factor (MITF)
BC011762	0.211	
NM_021069	0.485	Homo sapiens Arg/Abl-interacting protein ArgBP2 (ARGBP2)
NM_018192	0.398	Homo sapiens myxoid liposarcoma associated protein 4 (MLAT4)
NM_001647	0.436	Homo sapiens apolipoprotein D (APOD)
NM_001823	0.094	
NM_001442	0.364	Homo sapiens fatty acid binding protein 4, adipocyte (FABP4)
NM_002084	0.258	Homo sapiens glutathione peroxidase 3 (plasma) (GPX3)
		Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)
NM_005398	0.427	subunit 3C (PPP1R3C)
NM_018185	0.366	Homo sapiens chromosome 13 open reading frame 17 (C13orf17)
		Homo sapiens vascular endothelial growth factor and type I
AF480883	0.472	collagen inducible protein (VCIP)
		Homo sapiens creatine kinase, brain (CKB)
NM_001823	0.084	Homo sapiens protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B'',
NM_002718	0.453	alpha (PPP2R3A)
AF318382	0.278	'Homo sapiens pp9974 mRNA, complete cds
NM_003819	0.271	

体10q25.3-26.1分离出来的, 近来被认为是食管癌、胃癌、大肠癌和肺癌新的候选抑癌基因^[7]. Kang *et al*^[8]报道在胃黏膜分化过程中, 通过激活细胞内信号分子蛋白激酶C(PKC)和细胞外调节蛋白激酶(ERK), 催化核内转录因子磷酸化反应, 调节基因的转录, 使DMBT1基因表达降低, 从而启动细胞分裂和增殖, 引起肿瘤的发生. 但是在本实验中原发胃腺癌组织DMBT1基因高表达的原因还不清楚.

与癌旁正常组织相比, 在胃腺癌组织表达下调的基因中, TXNIP基因是细胞氧化还原过程中的调控子, 也是转录因子的抑制剂, 通过抑制特异性基因表达所需的某些转录因子活性而抑制细胞分化. Takahashi *et al*^[9]报道利用原位杂交技术检测出TXNIP基因转录多发生在细胞分化末期, 其mRNA水平在胃肠道上皮细胞中低表达, 而在淋巴滤泡里的淋巴细胞中高表达, 这说明TXNIP基因可能在胃肠道上皮细胞分化和黏膜免疫反应中起作用. 作为血浆脂质转运系统中的ApoD基因是乳腺癌和前列腺癌的雄激素调节蛋白^[10], 对正常细胞有负向调节作用, 通过选择性地抑制血小板衍生的生长因子BB诱导细胞外信号调节激酶的核转运, 从而抑制血管平滑肌细胞增殖, 对一些肿瘤细胞的侵袭具有抑制作用, 被看作是肿瘤细胞分化和生长停滞的标记物^[11], 在乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌和视

网膜母细胞癌中低表达^[10,12]. 1960年代人们第一次发现鼠MITF基因转录因子突变, 之后在基因座中发现了24个自发的和诱发的MITF基因突变体^[13]. MITF基因编码具有碱性区螺旋环-螺旋-拉链亚型Myc基因家族的转录因子, 与结构相似的基因形成同质二聚体或异质二聚体, 此二聚体与DNA特异性结合, 起转录调节作用, 引起细胞增殖, 产生促癌作用. 本研究中MITF基因表达下调与以上作用机制不同, 很可能存在其它的致癌途径. Hershey *et al*^[14]报道MITF基因是破骨细胞、黑色素细胞、视网膜上皮细胞、肥大细胞和自然杀伤细胞发育过程中所必需的转录因子, 本研究中MITF基因表达下调是否与抑制自然杀伤细胞转录调节功能导致癌变的发生有关, 有待进一步证实. CKB基因在卵巢癌细胞和神经胶质瘤细胞等恶性肿瘤细胞中高表达, 并能促进癌细胞转移^[15-16]. 而本研究中胃腺癌组织与癌旁正常组织相比, CKB基因表达下调, 其机制有待进一步探讨.

通过上述研究, 我们已经筛选出一些胃腺癌相关表达基因, 有助于人们从分子水平理解胃腺癌发生的病因, 为寻找理想的胃腺癌肿瘤标志物和探索基因治疗提供可靠的线索. 但由于本研究为初步试验结果, 许多基因在胃腺癌发生过程中存在什么样的时空关系、彼此有何联系, 以及哪些基因是真正的胃腺癌易感基因,

目前还了解甚少,有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Yeatman TJ. The future of cancer management: translating the genome, transcriptome, and proteome. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 7-14
- 2 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
- 3 Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470
- 4 Xia G, Kumar SR, Masood R, Zhu S, Reddy R, Krasnoperov V, Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL, Pinski JK, Daneshmand S, Buscarini M, Stein JP, Zhong C, Broek D, Roy-Burman P, Gill PS. EphB4 expression and biological significance in prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 4623-4632
- 5 Cromer A, Carles A, Millon R, Ganguli G, Chalmel F, Lemaire F, Young J, Dembele D, Thibault C, Muller D, Poch O, Abecassis J, Wasylyk B. Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene* 2004; 23: 2484-2498
- 6 Wu Q, Suo Z, Risberg B, Karlsson MG, Villman K, Nesland JM. Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 26-33
- 7 Imai MA, Moriya T, Imai FL, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Uzawa K, Tanzawa H. Down-regulation of DMBT1 gene expression in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2005; 15: 585-589
- 8 Kang W, Nielsen O, Fenger C, Leslie G, Holmskov U, Reid KB. Induction of DMBT1 expression by reduced ERK activity during a gastric mucosa differentiation-like process and its association with human gastric cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1129-1137
- 9 Takahashi Y, Ishii Y, Murata A, Nagata T, Asai S. Localization of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) mRNA in epithelium of human gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 973-976
- 10 Rodriguez JC, Diaz M, Gonzalez LO, Sanchez J, Sanchez MT, Merino AM, Vizoso F. Apolipoprotein D expression in benign and malignant prostate tissues. *Int J Surg Invest* 2000; 2: 319-326
- 11 Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, Yablonsky S, Leung W, Massaeli H, Prichett W, Veinot JP, Rassart E, Rabinovitch M. Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 2172-2177
- 12 Alvarez ML, Barbon JJ, Gonzalez LO, Abelairas J, Boto A, Vizoso FJ. Apolipoprotein D expression in retinoblastoma. *Ophthalmic Res* 2003; 35: 111-116
- 13 Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 365-411
- 14 Hershey CL, Fisher DE. Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone* 2004; 34: 689-696
- 15 Huddleston HG, Wong KK, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC. Clinical applications of microarray technology: creatine kinase B is an up-regulated gene in epithelial ovarian cancer and shows promise as a serum marker. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 77-83
- 16 Willis D, Zhang Y, Molloy GR. Transcription of brain creatine kinase in U87-MG glioblastoma is modulated by factor AP2. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1728: 18-33

电编 李琪 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

肝癌组织RhoC蛋白表达与微血管密度的关系

邱兴烽, 王效民, 殷平, 陈守惠, 纪毅馨

邱兴烽, 王效民, 福建医科大学, 厦门大学附属中山医院肝胆外科 福建省厦门市 361004

殷平, 陈守惠, 纪毅馨, 厦门大学附属中山医院病理科 福建省厦门市 361004

邱兴烽, 福建医科大学2003级硕士, 助教, 主要从事肝癌侵袭转移的研究。

通讯作者: 王效民, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院肝胆外科。wxm@xmzsh.com

电话: 0592-2292203

收稿日期: 2005-12-23 接受日期: 2006-02-11

Expression of RhoC protein and its relationship with microvessel density in hepatocellular carcinoma

Xing-Feng Qiu, Xiao-Min Wang, Ping Yin, Shou-Hui Chen, Yi-Xin Ji

Xing-Feng Qiu, Xiao-Min Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Fujian Medical University, Xiamen 361004, Fujian, China

Ping Yin, Shou-Hui Chen, Yi-Xin Ji, Department of Pathology, Zhongshan Hospital, Fujian Medical University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Correspondence to: Dr. Xiao-Min Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, 201 Hubin South Road, Xiamen 361004, Fujian Province, China. wxm@xmzsh.com

Received: 2005-12-23 Accepted: 2006-02-11

Abstract

AIM: To explore the expression of RhoC protein and its relations with microvessel density (MVD) in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Immunohistochemical staining was used to detect the expression of RhoC protein and MVD in the tissues from HCC ($n = 49$), metastatic focus of HCC and normal liver ($n = 9$). The relationship between the RhoC expression and pathological features as well as MVD was evaluated.

RESULTS: The positive rate of RhoC expression was 73.5% (36/49) in HCC, 81.8% (18/22) in the metastatic focus of HCC and 11.1% (1/9) in normal liver tissues, and there was significant difference between the former two and the latter ($P < 0.01$). The expression of RhoC protein in HCC was not correlated with the age, gender of

patients, tumor size, α -fetoprotein expression, HBsAg and tumor encapsulation ($P > 0.05$), but significantly correlated with the Edmondson grading ($\chi^2 = 8.037$, $P = 0.005$) and tumor metastasis ($\chi^2 = 7.335$, $P = 0.007$). The value of MVD in HCC, metastatic focus of HCC was markedly higher than that in the normal tissues ($H = 4.564$, $P < 0.01$; $H = 4.442$, $P < 0.01$). Meanwhile, the value of MVD in HCC with positive and negative expression of RhoC was $93.3 \pm 25.0/\text{mm}^3$ and $55.7 \pm 23.4/\text{mm}^3$, respectively, and there was notable difference between them ($P < 0.01$).

CONCLUSION: RhoC expression may be a good marker in the identification of HCC patients with high risks in the angiogenesis, invasion and metastasis.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Metastasis; RhoC; Microvessel density

Qiu XF, Wang XM, Yin P, Chen SH, Ji YX. Expression of RhoC protein and its relationship with microvessel density in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):671-675

摘要

目的: 探讨RhoC蛋白表达和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)临床病理的关系及其和微血管生成之间的联系。

方法: 应用免疫组织化学法, 检测49例HCC、22例肝癌转移灶组织、9例正常肝组织内RhoC蛋白表达和微血管密度(microvessel density, MVD), 并将检测结果与患者的临床资料进行统计分析。

结果: RhoC蛋白在9例正常肝组织中有1例呈阳性表达, 占11.1%, 而在49例HCC中有36例阳性表达, 占73.5%, 22例肝癌转移灶中有18例呈阳性表达, 占81.8%, 正常肝组织组与另两组比较有显著性差异($P < 0.01$); RhoC蛋白表达强度与年龄、性别、肝癌大小、AFP表达量、HBsAg是否阳性及有无包膜无关($P > 0.05$), 而与肝癌分化程度、有无侵袭转移有显著关系($\chi^2 = 8.037$, $P = 0.005$; $\chi^2 = 7.335$,

■背景资料

RhoC基因作为肿瘤转移相关基因近年来得到广泛关注, 当前众多研究表明RhoC的过量表达与肺癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤等恶性肿瘤的侵袭转移密切相关。一些研究利用分子生物学方法表明RhoC与肝癌的关系, 而本研究则利用免疫组化方法证实了RhoC在HCC组织中的表达上调与HCC分化程度、侵袭转移能力密切相关, 推测RhoC基因可能是通过调控肝癌细胞运动和促进肝癌血管生成来促进肝癌的侵袭转移。相信RhoC有可能成为判断HCC侵袭转移能力及肝癌患者预后后的一个新指标。

■创新盘点

一些研究利用分子生物学方法表明RhoC与肝癌的关系,而本研究则利用免疫组化方法证实了RhoC在HCC组织中的表达上调与HCC分化程度、侵袭转移能力密切相关,推测RhoC基因可能是通过调控肝癌细胞运动和促进肝癌血管生成来促进肝癌的侵袭转移。

$P = 0.007$). 肝癌、肝癌转移灶中MVD显著高于正常肝组织($H = 4.564$, $P < 0.01$; $H = 4.442$, $P < 0.01$). RhoC阳性表达的肝癌MVD值为 $93.3 \pm 25.0/\text{mm}^3$, 阴性表达的肝癌MVD值为 $55.7 \pm 23.4/\text{mm}^3$, 前者明显高于后者($t = 4.715$, $P < 0.01$).

结论: RhoC在HCC组织中的表达上调与其血管生成和侵袭转移有关。

关键词: 肝癌; 转移; RhoC蛋白; 微血管密度

邱兴辉, 王效民, 殷平, 陈守惠, 纪毅馨. 肝癌组织RhoC蛋白表达与微血管密度的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(7):671-675

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/671.asp>

0 引言

近年来研究表明, RhoC GTP酶的过量表达与肿瘤的侵袭转移密切相关^[1-2]. 我们通过分析RhoC在肝细胞癌组织内的表达及与肝癌微血管密度和临床病理学征象之间的关系, 探讨RhoC在肝癌侵袭转移和血管生成中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 厦门大学附属中山医院2002-01/2004-12肝癌手术切除标本49例, 肝癌转移灶标本22例(含门静脉、胆管癌栓、肝内转移灶、腹壁、腹腔、脑、牙龈等远处转移灶), 另外选取9例肝外伤患者肝脏标本作为对照组. 肝癌患者中男39例, 女10例, 年龄25-75(平均47)岁, 均经手术后病理切片证实为HCC, HCC病理分级采用Edmondson 4级法: I-II级29例, III-IV级20例; 肿瘤直径 ≤ 5 cm的25例, > 5 cm的24例; AFP ≤ 7.02 $\mu\text{g/L}$ 9例, > 7.02 $\mu\text{g/L}$ 40例; HBsAg(+)33例, HBsAg(-)16例; 具有包膜的28例, 无包膜21例; 有脉管癌栓或远处转移灶的27例, 镜下无脉管侵袭或转移的22例. 所有组织均经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 厚4 μm 连续切片, 分别作苏木精-伊红(HE)和免疫组织化学染色。

1.2 方法 所有标本均行RhoC和CD34免疫组织化学染色, 分别采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(S-P)方法和Envision法检测RhoC和CD34的表达. 羊抗人RhoC多克隆抗体(美国Santa Cruz公司产品)工作浓度1:100; 鼠抗人CD34单克隆抗体及Envision plus试剂盒(美国Neomarkers公司产品)购自福州迈新生物公司. 操作步骤按试剂盒说明书进行. 用PBS替代一

抗阴性对照. RhoC免疫组化染色位于细胞质和胞膜, 染色强度为黄色、棕黄色或棕褐色. 根据瘤组织或非瘤肝组织中染色程度分为4个等级: 缺乏细胞质染色或弱染的评分为0~+, 判定为阴性细胞; 弥漫的, 中到强细胞质染色评分为++~+++ (“0”未染色; “+”呈黄色; “++”呈棕黄色; “+++”呈棕褐色), 判定为阳性细胞^[3]. 阳性细胞数 $\geq 30\%$ 者为阳性, $< 30\%$ 为阴性. 微血管密度测定参照Weidner方法, 即先在低倍镜($\times 40$)下扫视整个切片, 选取血管密度最高的5个区域, 再在高倍镜($\times 200$, $0.74 \text{ mm}^3/\text{视野}$)下计数被染成棕黄色的血管数目, 共记录5个视野中的MVD值, 取其平均数作为该切片的MVD值. 由于观察中发现一种特殊类型的血管, 其管腔很大, 单位面积内的血管数目相对较少, 因此采用Tanigawa *et al*^[4]报道的改良法计数, 即每40 μm 长度的此类血管计数为1个MVD值. 以上均请两位专职病理科医师以双盲法分别进行评估, 两者意见不统一时, 由两位医师讨论后作出结论。

统计学处理 利用SPSS 11.5统计分析软件包处理. 统计分析方法为 χ^2 检验和 t 检验(方差不齐时采用两独立样本非参数检验Mann-Whitney U 检验).

2 结果

2.1 肝脏组织RhoC的表达 肝癌及肝癌转移灶组织阳性表达率明显高于正常肝组织(36/49, 18/22 vs 1/9, $\chi^2 = 16.174$, $P < 0.01$), 而肝癌和肝癌转移灶组织阳性表达率无差别($\chi^2 = 0.581$, $P > 0.05$). RhoC主要表达于癌细胞胞质和胞膜中, 呈棕黄至棕褐色(图1A). 染色强弱与细胞分化程度相关, 腺样多角形癌细胞分化程度相对较高, 呈巢样结构, 相对局限化, 侵袭能力较低, RhoC染色较弱; 梭形样癌细胞异型性明显, 分化程度较低, RhoC染色强, 呈条索状分布, 并与肿瘤的侵袭性生长相一致(图1B).

2.2 RhoC表达与肝细胞癌临床病理特征的关系 RhoC表达阳性率与肝癌患者的病理分级和有无侵袭转移相关($P < 0.01$, 表1), 而且表达水平与肝癌患者的病理分级和有无侵袭转移也密切相关($P < 0.05$, 表2), 但与患者性别、年龄、肿瘤大小、胞膜有无、AFP水平及是否合并乙肝无关($P > 0.05$, 表1).

2.3 MVD与HCC临床病理特征及RhoC的关系 CD34标记血管内皮, 阳性染色局限于血管内皮细胞的胞质和胞膜, 呈棕褐色, 形成条状(纵切

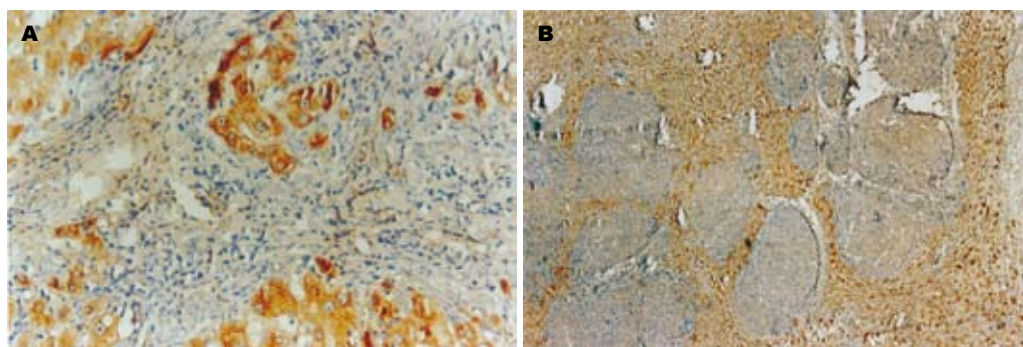


图1 肝癌组织RhoC表达(S-P)。A: 癌细胞胞质和胞膜呈棕褐色($\times 100$); B: 腺样多角形癌细胞分化程度较高, RhoC染色较弱; 周边棱形癌细胞异型性明显, 分化程度低, RhoC染色强($\times 40$)。

应用要点
RhoC有可能成为判断HCC侵袭转移能力及肝癌患者预后的一个新指标。

表1 肝癌患者临床病理特征与RhoC表达间的关系

临床病理特征	<i>n</i>	RhoC+	χ^2	<i>P</i> 值
年龄				
>40岁	31	23	0.000	1.000
≤40岁	18	13		
性别				
男	39	28	0.015	0.902
女	10	8		
肿瘤大小				
>5 cm	24	17	0.168	0.682
≤5 cm	25	19		
包膜				
无	21	15	0.790	0.779
有	28	21		
AFP				
+	40	30	0.009	0.925
-	9	6		
HBsAg				
+	33	25	0.031	0.860
-	16	11		
病理分级				
I-II	29	17	8.037	0.005
III-IV	20	19		
转移				
无	22	12	7.335	0.007
有	27	24		

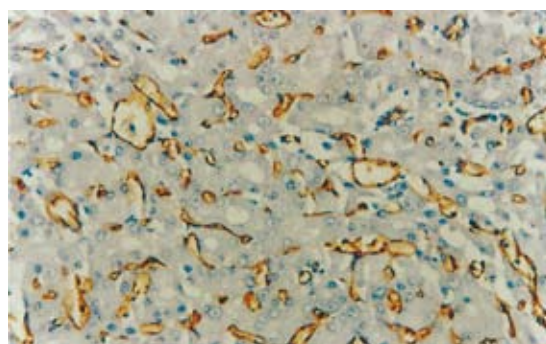


图2 肝癌组织中CD34染色阳性局限于血管内皮细胞的胞质和胞膜, 呈棕褐色, 形成条状或环状, 呈弥漫性分布(Envision $\times 100$)。

表2 RhoC的表达强度与肝癌病理分级和侵袭转移的关系

病理特征	<i>n</i>	+ ~ +++	+++
病理分级			
I ~ II	29	17	7
III ~ IV	20	19 ^b	14 ^a
转移			
无	22	12	4
有	27	24 ^b	17 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

面)或环状(横切面), 在肝癌组织中多为弥漫性分布(图2), MVD值为 61.7 ± 11.9 , 而在正常肝组织中MVD值为 11.3 ± 6.9 , 两者有显著差异($H = 4.564$, $P < 0.01$); 在侵袭转移肝癌组中MVD值 74.4 ± 12.2 ; 无转移肝癌组MVD值 46.0 ± 11.1 , 前者高于后者, 具显著意义($H = 4.442$, $P < 0.01$)。MVD值与患者年龄、性别、AFP水平、肿瘤大小及病理分级间无统计学意义($P > 0.05$)。RhoC阳性表达的肝癌MVD值为 $93.3 \pm 25.0/\text{mm}^3$, 阴性表

达的肝癌MVD值为 $55.7 \pm 23.4/\text{mm}^3$, 前者明显高于后者($t = 4.715$, $P < 0.01$)。

3 讨论

Rho GTP酶是Ras超家族小分子G蛋白的成员, 包括Rho(RhoA, RhoB, RhoC), Rac, cdc42, Rnd, RhoD, TTF等6个亚家族共22种成员蛋白^[5], 其中的RhoC基因定位于1p13-p21, RhoC蛋白含193个氨基酸。肿瘤细胞的运动能力是肿瘤侵袭的先决条件, 是肿瘤转移扩散的关键。肿瘤细胞的移动包括细胞前进端质膜的突起; 前进端与胞

■同行评价

本文层次结构清楚,推论合理,具有一定的科学性和临床实用价值。

外基质新的黏附位点的形成;尾端与旧黏附点的脱离;最后以细胞内肌动球蛋白为基础的细胞骨架收缩促使细胞整体向前移动。研究表明,Rho刺激、调节纤维母细胞及其他一些黏附细胞的肌动蛋白张力纤维和局灶性黏附,介导肌动蛋白结构重组,通过调节肌球蛋白轻链磷酸化,使肌球蛋白和肌动蛋白丝相互作用,形成收缩性的肌动-球蛋白束,最终导致癌细胞极性消失及促进细胞运动。RhoC则能通过调节细胞骨架蛋白来加快细胞迁移的这些步骤^[1,6],例如在黑色素瘤细胞的转移和扩散中RhoC蛋白是必需的^[1];Ikoma *et al*^[7]在对鼠的肺癌模型进行基因转导研究时发现,过度表达RhoC组能显著增加纵隔淋巴结转移,相反,过表达显性失活Rho组纵隔淋巴结转移的大小明显减少,质量也明显减轻。同样在体外迁移和侵袭实验中,RhoC的过表达提高了迁移和侵袭能力(后者比前者明显),而过表达显性失活Rho能同时抑制迁移和侵袭。这些结果表明RhoC可能通过调节细胞移动来促进肺癌的转移。另外Ikoma *et al*^[7]还发现过度表达RhoC能导致MMP-2, MMP-9, MT1-MMP和TIMP-2等mRNA表达的显著升高,反之过表达显性失活Rho能降低上述MMP的mRNA表达水平。运用酶谱分析法也证实了过度表达RhoC不但明显上调MMP-2和MMP-9的前体(失活状态),还明显上调活性状态的MMP-2,从而首次揭示了RhoC和MMPs在癌中的关系,并提出了RhoC作用新机制:RhoC不但能明显上调MMPs的表达水平,同时也能增加MMPs的活性,使降解胞外基质能力增强,从而导致肿瘤侵袭活性的增强。

和Ras超家族的所有成员一样,RhoC在非活性GDP结合形式和活性GTP结合形式之间循环,与GDP结合游离于胞质中,与GTP结合作用于细胞内的效应分子。但和Ras不同的是RhoC极少突变^[8],更多的是表达水平上的异常。如通过使用基因芯片技术对比高转移性和低转移性黑色素瘤细胞,发现前者RhoC明显升高^[1];Kleer *et al*^[9]也发现RhoC的表达水平与乳腺癌侵袭转移特性密切相关。研究显示在恶性肿瘤的转变中,Rho蛋白与GTP或GDP结合形式的转换起着重要作用,而RhoC的过量表达则可能加快GTP与GDP的循环转换过程。近年来,RhoC的表达与肿瘤侵袭转移的关系成为研究热点,已有大量资料发现肿瘤组织中异常表达RhoC与其侵袭转移相关^[1-2,7,9-24]。我们通过免疫组织化学法检测了RhoC蛋白在正常肝、肝癌及其转移灶中的表

达。结果表明,RhoC蛋白表达水平在伴有侵袭转移的肝癌中明显高于无侵袭转移的肝癌,而无论在伴有转移还是不伴有转移的肝癌以及肝癌转移灶中,RhoC的表达水平都明显高于正常肝组织,且肝癌恶性程度越高,RhoC表达越强。此外,我们还观察到,强RhoC染色的肝癌细胞分布呈条索状,与肿瘤细胞的侵袭性生长相一致。因此我们推测,RhoC基因与肝癌的侵袭转移密切相关,可能是通过调控癌细胞的运动促进肿瘤的侵袭转移。

肝癌的侵袭转移大多是通过血管途径转移。本研究显示,RhoC的表达强度与新生血管数量有关,表明两者之间存在密切的关系。在研究乳腺癌中发现,RhoC GTP酶的过量表达能特异而直接的通过炎性乳腺癌细胞来控制血管生成因子的合成^[25-26],因此我们推测,RhoC也能促进肝癌血管生成,增加肝癌细胞进入血管的可能性,促进肝癌的扩散转移。然而,其中具体机制尚不完全清楚,需要进一步研究。本研究结果提示,RhoC基因的表达与HCC分化程度、侵袭转移能力密切相关。RhoC有可能成为判断HCC侵袭转移能力及肝癌患者预后的一个新指标。

4 参考文献

- 1 Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000; 406: 532-535
- 2 邱兴峰,王效民,殷平. RhoC与恶性肿瘤的侵袭转移. 国外医学·生理病理科学与临床分册 2005; 25: 136-139
- 3 Kleer CG, van Golen KL, Zhang Y, Wu ZF, Rubin MA, Merajver SD. Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. *Am J Pathol* 2002; 160: 579-584
- 4 Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, Miura S. Quantitation of sinusoid-like vessels in hepatocellular carcinoma: its clinical and prognostic significance. *Hepatology* 1997; 26: 1216-1223
- 5 Aspenstrom P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 2004; 377: 327-337
- 6 Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 2001; 114: 2713-2722
- 7 Ikoma T, Takahashi T, Nagano S, Li YM, Ohno Y, Ando K, Fujiwara T, Fujiwara H, Kosai K. A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1192-1200
- 8 Oxford G, Theodorescu D. Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett* 2003; 189: 117-128
- 9 Kleer CG, Griffith KA, Sabel MS, Gallagher G, van Golen KL, Wu ZF, Merajver SD. RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast. *Breast Cancer*

- Res Treat* 2005; 93: 101-110
- 10 Shikada Y, Yoshino I, Okamoto T, Fukuyama S, Kameyama T, Maehara Y. Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5282-5286
- 11 Kondo T, Sentani K, Oue N, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W. Expression of RHOC is associated with metastasis of gastric carcinomas. *Pathobiology* 2004; 71: 19-25
- 12 Wang W, Yang LY, Yang ZL, Huang GW, Lu WQ. Expression and significance of RhoC gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1950-1953
- 13 Wang W, Yang LY, Huang GW, Lu WQ, Yang ZL, Yang JQ, Liu HL. Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis. *Br J Cancer* 2004; 90: 2349-2355
- 14 Takamura M, Sakamoto M, Genda T, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S. Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology* 2001; 33: 577-581
- 15 Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 2001; 61: 2129-2137
- 16 Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2632-2641
- 17 Horiuchi A, Imai T, Wang C, Ohira S, Feng Y, Nikaido T, Konishi I. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab Invest* 2003; 83: 861-870
- 18 Hakem A, Sanchez-Sweetman O, You-Ten A, Duncan G, Wakeham A, Khokha R, Mak TW. RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev* 2005; 19: 1974-1979
- 19 Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Nielsen T, Loader J, Terris B, Stamp G, Baron A, Scarpa A, Lemoine NR. Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas. *Oncogene* 2002; 21: 4587-4594
- 20 Collisson EA, Kleer C, Wu M, De A, Gambhir SS, Merajver SD, Kolodney MS. Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 941-948
- 21 Carr KM, Bittner M, Trent JM. Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma. *Oncogene* 2003; 22: 3076-3080
- 22 Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* 2002; 87: 635-644
- 23 van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao LW, Merajver SD. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 2000; 60: 5832-5838
- 24 Suwa H, Ohshio G, Imamura T, Watanabe G, Arai S, Imamura M, Narumiya S, Hiai H, Fukumoto M. Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer* 1998; 77: 147-152
- 25 Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere S, Colpaert CG, van Dam P, Merajver S, Kleer CG, Harris AL, Van Marck EA, Dirix LY, Vermeulen PB. Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 85: 13-22
- 26 van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao L, Merajver SD. RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia* 2000; 2: 418-425

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 •

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3000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熔教授, 电话: 13313695959, E-mail: liubingrong@medmail.com.cn

槟榔碱促结肠平滑肌细胞收缩及对胞内钙离子浓度的影响

梁宁霞, 衣兰娟, 田琳, 胡凡, 刘翠萍, 魏睦新

■背景资料

结肠动力障碍性疾病(如慢性传输性便秘等)在我国发病率较高, 促结肠动力是治疗此类疾病的主要手段。而目前临床常用的促结肠动力药物较少, 且大多具有不同的副作用, 如西沙比利, 由于心脏和其他方面的毒副作用, 使其应用受到限制。因此, 研究和开发高效、低毒的促结肠动力新药具有重要意义。临床和实验证实, 很多种类中药具有不同程度的促结肠动力作用, 其中槟榔被认为具有开发前景的促胃肠动力中药。槟榔碱是从槟榔中分离得到的一种生物碱, 近年来主要被用于防治钉螺, 在促胃肠动力作用方面研究不多。

梁宁霞, 衣兰娟, 田琳, 魏睦新, 南京医科大学第一附属医院中医科 江苏省南京市 210029

刘翠萍, 南京医科大学第一附属医院内分泌科 江苏省南京市 210029

胡凡, 南京医科大学 江苏省南京市 210029

梁宁霞, 2005年南京医科大学硕士, 讲师, 主要从事胃肠动力方面研究。

江苏省科技厅国际合作项目, No. BZ2002066

江苏省“135”工程重点人才项目, No. RC2002049

通讯作者: 魏睦新, 210029, 江苏省南京广州路300号, 南京医科大学第一附属医院中医科。

收稿日期: 2005-12-24 接受日期: 2006-02-11

Effects of Arecolinehydrobromide on contraction and intracellular free Ca^{2+} concentrations of colonic smooth muscle cells

Ning-Xia Liang, Lan-Juan Yi, Lin Tian, Fan Hu, Cui-Ping Liu, Mu-Xin Wei

Ning-Xia Liang, Lan-Juan Yi, Lin Tian, Mu-Xin Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Cui-Ping Liu, Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Fan Hu, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by International Cooperation Projects from Science and Technology Department of Jiangsu Province, No. BZ2002066, and 135 Medical Emphasis grant from Government of Jiangsu Province, No. RC2002049

Correspondence to: Dr. Mu-Xin Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Received: 2005-12-24 Accepted: 2006-02-11

Abstract

AIM: To explore the possible role of Arecolinehydrobromide (Ah) in the dynamics of digestive tract and the effects of Ah on the contraction of colon smooth muscle cells (SMCs) and the concentration of intracellular $[Ca^{2+}]_i$.

METHODS: SMCs from colon of mice were cultured *in vitro*. Based on different treatment methods, four groups were divided into as follows: Ah group in which cultured SMCs were stimulated by Ah; control group in which there

was no additional treatment on cultured SMCs; Acetylcholine (Ach) group in which cultured SMCs were stimulated by Ach; Atropine group in which cultured SMCs were pretreated with atropine before Ah was added. Laser scanning confocal microscope (LSCM) was used to measure the concentration of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ and the contraction of colon SMCs in the above four groups.

RESULTS: No spontaneous cellular contraction took place in control group in which there was a tendency of decrease in fluorescent intensity because of attenuation of the indicator. In Ah group, a rapid elevation in the concentration of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ occurred shortly after Ah was added, which was recorded as a pulse wave. Then there was a gradual and slow increase in intracellular $[Ca^{2+}]_i$ which reached its peak at 484.0 ± 47.6 s. The peak was followed by a quite long plateau and afterward returned to the resting level at 1 400 s. The percentage of cellular contraction was $20.70\% \pm 0.07\%$. In Ah and Ach groups, a tendency of SMCs contraction in accordance with elevation of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ was observed following Ah or Ach was added. However, the effect was faster and shorter in Ah group than that in Ach group. The contractive effect of Ah was completely inhibited in SMCs pretreated by atropine.

CONCLUSION: Ah can cause contraction of SMCs of colon and increase of intracellular $[Ca^{2+}]_i$. The contractive effect of Ah can be effectively inhibited by atropine. Ah may be promising for improving dynamics of digestive tract.

Key Words: Colon; Smooth muscle cells; Cell culture; Arecolinehydrobromide; Calcium; Laser scanning confocal microscope

Liang NX, Yi LJ, Tian L, Hu F, Liu CP, Wei MX. Effects of Arecolinehydrobromide on contraction and intracellular free Ca^{2+} concentrations of colonic smooth muscle cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):676-681

摘要

目的: 观察氢溴酸槟榔碱(Ah)促进培养的结肠

平滑肌细胞收缩作用及对胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响。

方法: 培养大鼠结肠平滑肌细胞, 分为4组: 正常对照组、Ah刺激组、乙酰胆碱(Ach)刺激组、阿托品预处理组。应用特异性 Ca^{2+} 荧光批示剂Fluo-3/AM负载细胞, 激光共聚焦显微镜检测游离 Ca^{2+} 浓度和细胞收缩率。

结果: 正常对照组细胞未发生自主性收缩, 因指示剂的衰减, 荧光强度(FI)有递减的趋势; Ah刺激组在加药后短时间内胞内钙离子浓度迅速升高, 出现一个波峰, FI平均基础值与峰值有差异($P<0.05$), 而后胞内钙离子浓度再缓慢攀升, 在 484.0 ± 47.6 s达到高峰, 而后有一个较长时间的平台期, 在1 400 s左右恢复至静息水平, FI基础值与峰值有显著差异($P<0.01$), 细胞收缩百分数为 $20.70\%\pm 0.07\%$; Ach刺激组在加药后胞内钙离子浓度升高, 形成一个小波峰, FI基础值和峰值差异有显著性($P<0.01$)。随后胞内钙离子浓度缓慢攀升, 在600 s左右达到高峰, 而后有一个较长时间的平台期。FI基础值与峰值差异有显著性($P<0.001$); 经阿托品预孵育处理后的细胞, 加入Ah后, 其收缩效应被完全抑制。

结论: Ah可引起结肠平滑肌细胞收缩, 升高胞内游离 Ca^{2+} 浓度。其收缩效应可以被M受体阻断剂阿托品所抑制。

关键词: 结肠; 平滑肌细胞; 细胞培养; 槟榔碱; 钙离子; 激光共聚焦显微镜

梁宁霞, 衣兰娟, 田琳, 胡凡, 刘翠萍, 魏睦新. 槟榔碱促结肠平滑肌细胞收缩及对胞内钙离子浓度的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(7):676-681

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/676.asp>

0 引言

氢溴酸槟榔碱(arecoline hydrobromide, Ah)是从槟榔中分离得到的一种生物碱, 作为槟榔的有效成分, 槟榔碱近些年来主要被用于防治钉螺, 在促胃肠动力作用方面的研究不多^[1]。我们采用了离体结肠单个平滑肌细胞制备及其运动记录技术观察了不同浓度的Ah对大鼠急性分离结肠平滑肌细胞的直接作用, 证实了Ah可使游离的单个结肠平滑肌细胞收缩^[2]。细胞内游离钙在细胞信息传递过程中起着重要作用。钙离子作为细胞内第二信使, 在细胞兴奋、增殖及收缩等细胞反应中起重要作用, 游离钙离子浓度, 能反

映细胞的状态、药物和环境等对细胞的影响^[3]。目前, Ah对培养的结肠平滑肌细胞收缩及胞内钙离子浓度的影响未见报道。我们采用激光共聚焦显微镜技术, 观察加入Ah后细胞的收缩反应及测定和分析Ah对培养的结肠平滑肌细胞内钙离子的动态变化。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠, 雌雄不拘, 体质量250 g左右。由南京医科大学医学实验动物中心提供。胎牛血清, DMEM培养基, Gibco公司产品。II型胶原酶、大豆胰蛋白酶抑制剂, 槟榔碱, Sigma公司产品。N-2羟乙基哌嗪-N-2'-乙烷磺酸(HEPES), BSA, Amerseco公司产品。Fluo-3/AM乙酰甲酯: Calbiochem公司产品。谷氨酸钠: 中国医药集团上海化学试剂产品。Trypan蓝: 北京有机化工厂产品。其他均为国产分析纯试剂。Hepes Ringer缓冲液的配制(mmol/L): HEPES 24.5, NaCl 101, KCl 13, NaH_2PO_4 2.5, CaCl_2 21.8, MgCl_2 21.2, 谷氨酸钠5, 谷氨酰胺2, 葡萄糖11.5, BSA 1 g/L。pH值用70 g/L NaHCO_3 调至7.2。PBS液的配制(0.01 mol/L): NaCl 2 g, KCl 0.05 g, NaH_2PO_4 0.287 5 g, KH_2PO_4 0.05 g, 双蒸水加至200 mL。超净工作台(苏州净化设备厂); 24孔细胞培养板(丹麦Nunc); 25 cm^2 细胞培养瓶(丹麦Nunc); Beckman离心机(美国Beckman公司); TH-C型恒温震荡器(江苏太仓实验设备厂); 体视显微镜; 倒置显微镜(Olympus); 动物手术器械; 细胞计数板(上海光学仪器厂); 尼龙筛网(100目); CO_2 细胞培养箱(Type4, 德国Heraeus); 激光扫描共聚焦显微镜(Carl Zeiss公司, 德国)。

1.2 方法 结肠平滑肌细胞培养见参考文献[4]。每次取正常大鼠一只, 实验时断椎处死, 在无菌条件下快速自肛门上2 cm取结肠10-15 cm, 生理盐水中反复灌肠冲洗, 移入含青链霉素的Hepes Ringer缓冲液中浸泡。超净工作台上在体视显微镜下仔细刮去黏膜及浆膜层, 将肌层组织剪碎成匀浆状, 加入到4 mL含1 g/L II胶原酶和0.1 g/L大豆胰蛋白酶抑制剂的消化液中, 30℃恒温水浴20 min, 离心, 弃消化液。再加入6 mL消化液中, 30℃震荡30 min。消化后再对倍缓冲液稀释以中止消化, 用滴管反复轻柔吹打, 1 000 r/min离心3 min, 用10 mL DMEM培养液重悬细胞, 过100目筛网, 取细胞滤液用Trypan蓝染色检查细胞活性, 确认活细胞在90%以上。用DMEM培养液将细胞浓度调整至 $5\times 10^7/\text{L}$, 接种至培养瓶

■研发前沿

以现代科学技术为依托, 胃肠动力中药研究方法学上呈现出从整体水平到细胞水平乃至分子水平不断深入、从单味药向药物单体成分上发展的趋势。最常采用的两种实验方法是生理仪测定肌条张力变化、急性分离或体外培养的胃肠平滑肌细胞结合共聚焦技术测定胞内钙离子浓度。

■创新盘点

体外培养细胞影响因素单一,是激光共聚焦显微镜观察的最适宜的细胞,但可能是因为结肠的生物学特性和采集环境的特殊性而造成细胞培养难度大。本研究在国内首次报道了大鼠结肠平滑肌细胞培养,并在此基础上结合共聚焦技术,探讨了槟榔碱对结肠平滑肌细胞内钙离子的影响。

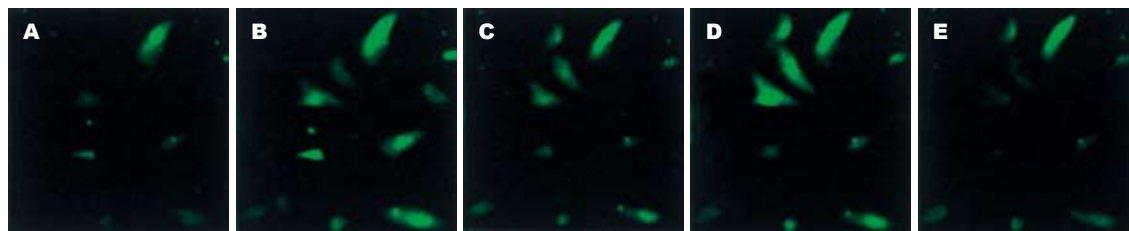


图1 Ah刺激诱导的结肠平滑肌细胞内钙荧光强度的动态变化. A: 加药前; B: 加药后25 s; C: 加药后183.24 s; D: 加药后484.017 s; E: 加药后1400 s.

中,放入培养箱内,37℃,950 mL/L O₂和50 mL/L CO₂条件下培养.细胞培养24 h后换液,弃去未贴壁细胞,加入培养液继续培养,以后每3-4 d换液1次,期间用倒置显微镜观察细胞生长情况.7-9 d,细胞长满后用胰酶传代.取第2代培养细胞观察.培养的结肠平滑肌细胞分为1:正常对照组;2: Ah刺激组:即时加入 1×10^{-5} mol/L的Ah刺激结肠平滑肌细胞;3: Ach刺激组:即时加入 1×10^{-3} mol/L的Ach刺激结肠平滑肌细胞;4:阿托品组:以0.5 g/L阿托品处理5 min,再用 1×10^{-5} mol/L的Ah刺激平滑肌细胞.

1.2.1 胞内钙离子浓度变化 Fluo-3/AM用纯二甲亚砜(DMSO)配成1 mol/L的储备液,低温保存备用,实验前Fluo-3/AM用PBS液稀释10倍.将培养的细胞标本内培养液弃去,用PBS液冲洗细胞3次,加入探针,放入37℃孵箱中约20 min,于荧光显微镜下观察负载情况,如荧光强度较低,可适当延长5-10 min,然后用PBS洗去细胞外残余染料.将探针孵育好的细胞,置于200倍光学显微镜下,选择单个或两个细胞及其层面,再在激光显微镜下进行连续动态扫描.与钙离子结合的Fluo-3在波长488 nm处激发,发射波长526 nm,计算机记录结肠平滑肌细胞的钙离子荧光强度并储存结果.细胞内荧光强度变化可指示细胞内游离钙离子浓度的变化.实验结果以给药前后单个细胞的荧光强度(fluorescent intensity, FI)及幅度的变化表示细胞内游离钙离子浓度的相对变化.

1.2.2 细胞收缩反应的测量 在激光共聚焦显微镜下连续动态扫描的荧光图像中,随机抽取6个细胞,测量加药前后细胞的长度.细胞收缩反应以给药前后细胞平均长度下降百分数表示.

公式为:细胞收缩百分数 = (给药前平均细胞长度 - 给药后平均细胞长度) / 给药前平均细胞长度 $\times 100\%$ [2].

统计学处理 数据经计算机系统对图形及时间进行实时测量而获得.使用软件为LSM510自

带软件.实验结果均以mean \pm SD表示.统计处理采用SPSS软件.

2 结果

2.1 Ah对结肠平滑肌细胞内游离的钙离子荧光图像的影响 结肠平滑肌细胞以Fluo-3/AM负载后,在激光共聚焦显微镜下观察,呈规则的梭形或多边形,轮廓清晰.胞核荧光较强,胞质较弱.由于细胞所处状态不同,各细胞荧光强度有差异,有的细胞荧光强度强,有的细胞荧光强度弱(图1A).用Fluo-3/AM负载结肠平滑肌细胞荧光图像清晰,强弱变化,可较好地显示细胞内游离钙离子浓度的变化过程.在加药后细胞荧光强度增强,后逐渐变弱,再渐渐由弱变强,最后再由强变弱,在1400 s左右恢复至原荧光强度(图1B-E).

2.2 Ah组结肠平滑肌细胞内游离钙离子变化 Time course所示动态曲线表明细胞内标记区域荧光强度(FI)的变化. FI与钙离子浓度呈正比,因此在本实验中以FI表示钙离子浓度的变化.加药后短时间内胞内钙离子浓度迅速升高,出现第一个波峰(图2), FI平均基础值与峰值有差异($P < 0.05$),随后胞内钙离子浓度再缓慢攀升,出现第二个波峰,在 484.01 ± 47.55 s时达到高峰, FI基础值与峰值有显著差异($P < 0.01$, 表1).而后有一个较长时间的平台期,在1400 s左右恢复至静息水平.正常对照组结肠平滑肌细胞游离钙离子浓度变化曲线较为平坦,没有出现较大的波动(图3),因为观察时间较长,荧光指示剂衰减,曲线出现下降趋势. FI基础值与峰值差异无显著性($P > 0.05$, 表1). 1×10^{-3} mol/L Ach能引起胞内钙离子浓度迅速升高,出现第一个波峰(图4), FI基础值和峰值差异有显著性($P < 0.01$).随后胞内钙离子浓度缓慢攀升,出现第二个波峰,在600 s左右达到高峰, FI基础值与峰值差异有显著性($P < 0.001$, 表1).而后有个较长时间的平台期.经过阿托品孵育5 min后, 1×10^{-5} mol/L Ah升高

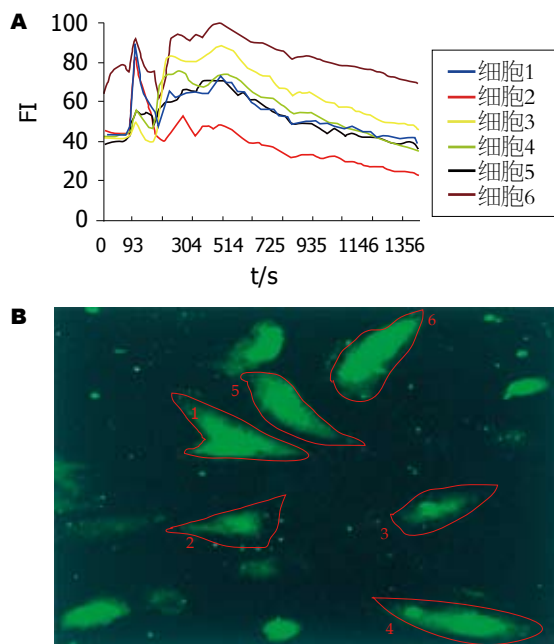


图 2 ACh刺激组胞内游离钙离子荧光强度变化. A: Time course所示动态曲线; B: 激光共聚焦显微镜下荧光图像.

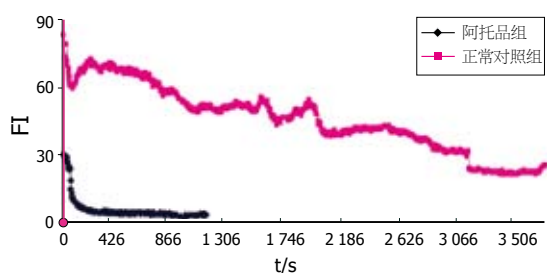


图 3 正常对照组、阿托品组结肠平滑肌细胞游离钙离子浓度变化曲线.

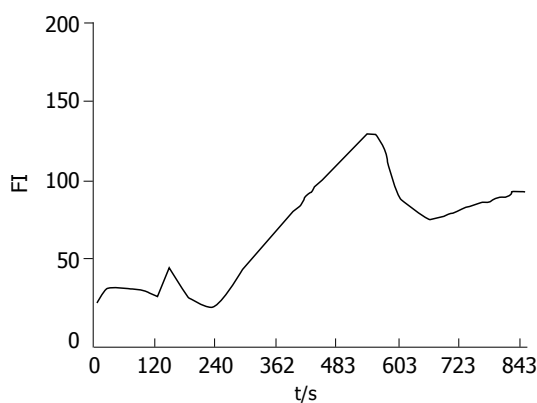


图 4 ACh刺激组胞内游离钙离子荧光强度变化.

胞内钙离子浓度的作用被抑制(图3). FI基础值与峰值差异无显著性($P>0.05$, 表1).

2.3 ACh对结肠平滑肌细胞的收缩作用 1×10^{-5} mol/L的ACh对结肠平滑肌细胞具有显著的收缩作用(图5), 其细胞收缩百分数为 $20.70\% \pm 0.07\%$.

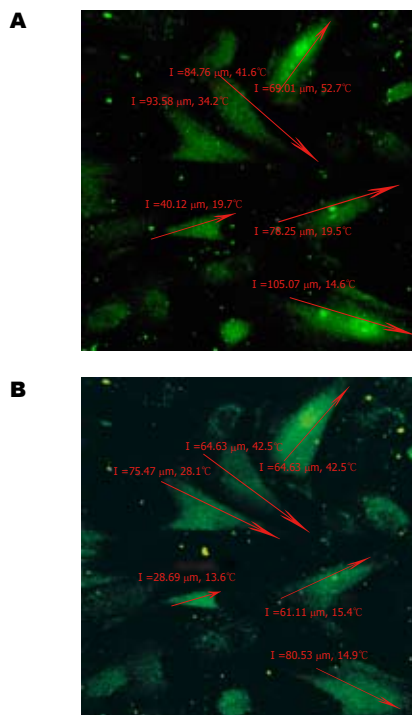


图 5 细胞的长度. A: ACh加入前; B: ACh加入后.

表 1 各实验组FI静息值与增高值变化 (mean \pm SD, FI)

分组	静息值	增高值
正常对照	60.1 \pm 11.5	65.6 \pm 11.9
ACh刺激 第1峰	41.5 \pm 16.9	62.0 \pm 26.3 ^a
第2峰	42.9 \pm 18.4	63.0 \pm 17.4 ^b
ACh刺激 第1峰	26.9 \pm 17.4	50.7 \pm 16.9 ^b
第2峰	16.1 \pm 7.4	101.0 \pm 16.8 ^b
阿托品	5.5 \pm 1.6	4.8 \pm 1.4

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 静息值.

3 讨论

当前, 结肠动力障碍性疾病(如慢性传输性便秘等)在我国的发生率较高, 其病理生理主要表现为结肠运动功能的减退, 促进结肠动力是治疗此类疾病的主要手段. 而目前临床上常用的促结肠动力药物较少, 且大多数具有不同的副作用, 如5-HT₄受体激动剂西沙比利, 经研究证实对结肠有一定的兴奋作用^[6], 但由于心脏和其他方面的毒副作用^[7-8]近年来人们就中药对胃肠动力的影响及其调节机制作了一些探索, 并提出了“胃肠动力中药”这概念^[9], 其中槟榔被认为是具有开发前景的促胃肠动力中药, 其主要有效成分槟榔碱为M受体激动剂^[10-11], 通过激动M₂受体, 槟榔碱可兴奋神经元^[12], 增加细胞内钙离子浓度^[13].

■应用要点

本文为筛选中药的活性成分建立在细胞水平层面上更可行、结果更可靠的实验方法. 通过激光共聚焦显微镜离子通道观察技术, 能够证实中药促胃肠动力作用的部分机制, 为筛选中药的活性成分的研究搭建了高通量、高度可靠的细胞学实验平台.

■同行评价

选题科研方向明确, 科研设计详细, 技术路线可行, 内容新颖, 结论有说服力, 研究结果有一定学术价值。

目前, 激光共聚焦图像系统结合新一代荧光染料的使用, 已广泛应用于精确分析活细胞内钙离子的动态变化。脂溶性钙荧光指示剂Fluo-3/AM可穿越细胞膜进入细胞内, 被活细胞内的非特异酯酶水解后, 与细胞内游离钙呈高度特异性结合, 并在一定波长激发光激发后产生荧光。由于Fluo-3/AM是一种单波长的发光基团, 其荧光强度与 $[Ca^{2+}]_i$ 成正比, 因而可精密观察分析细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的动态变化。本实验中以荧光强度(FI)表示浓度的变化。与以往的细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定方法比较, 此项技术以激光为光源, 结果准确, 背景噪音小, 对细胞损伤小^[14]。Fluo-3/AM为新型、可激发出可见光的钙荧光指示剂, 较易负载染色至细胞内, 对游离钙离子敏感性高, 可连续动态监测钙离子浓度的变化^[15]。

由于胃肠道平滑细胞膜上的钙通道远比骨骼肌细胞膜上的钙通道多, 而钠通道又比骨骼肌少许多, 所以钙离子和钙通道在胃肠平滑肌动作电位产生中居主导地位^[16]。现在一般认为, 平滑肌收缩活动与胞内钙离子浓度变化密切相关。高浓度 Ca^{2+} 引起平滑肌收缩, 低浓度 Ca^{2+} 引起平滑肌舒张。平滑肌收缩时的钙离子来源于细胞外液 Ca^{2+} 内流和细胞内钙库 Ca^{2+} 释放(主要是肌质网, SR)^[17]。胞外 Ca^{2+} 内流是通过质膜钙离子通道来控制的。质膜钙离子通道分为两类: 电压门控钙通道和配体门控钙通道。电压门控通道是主要通道^[18], 他又可分为T型和L型通道。肌质网的 Ca^{2+} 释放调节机制至少有两种: 一是三磷酸肌醇[inositol(1, 4, 5)-friphosphate, IP_3]与其受体(IP_3R)结合后, 引起钙通道开放; 二是ryanodine受体(RyR)钙通道。 IP_3 介导的 Ca^{2+} 释放是量子化, 具有“全或无”的特性。在无 Ca^{2+} 条件下 IP_3 几乎不能诱导其受体开放, 当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高时, IP_3R 释放 Ca^{2+} 增加, 构成正反馈; 如果 Ca^{2+} 浓度升高超过300 nmol/L时, IP_3R 对 IP_3 变得不敏感, Ca^{2+} 释放被抑制, 此属负反馈^[18]。现在认为与钙离子诱导的钙离子释放(calcium induced calcium release, CICR)有关, 并有四步模型可以解释CICR: (1)胞外钙离子进入细胞内钙库; (2)充满钙离子的钙库被少量钙离子通过 IP_3R 和RyR释放钙离子到胞质; (3)钙离子作为信使导致周围钙库释放钙离子并产生钙波; (4)钙离子释放通过负反馈效应而停止。钙泵使胞质钙离子排出胞外或进入胞内钙库而恢复静止态, 并准备进入下一个反应循环。

在消化道平滑肌收缩过程中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加的

两种动员途径存在器官和种属的特异性, 并与引起收缩的激动剂有关。猫食管环形平滑肌细胞收缩时 $[Ca^{2+}]_i$ 增加主要通过细胞外 Ca^{2+} 内流, 而下食管括约肌及基底部细胞则通过肌质网 IP_3 敏感地贮存 Ca^{2+} 释放^[19]。狗结肠平滑肌细胞收缩时 Ca^{2+} 动员通过细胞外 Ca^{2+} 内流和肌质网 IP_3 、RyR敏感地贮存 Ca^{2+} 释放^[20]。招明高 *et al*^[5]研究认为, 在培养的胃底平滑肌细胞5-羟色胺可引起 $[Ca^{2+}]_i$ 的迅速升高, 然后是一个持续的、升高的、稳定的平台期。 $[Ca^{2+}]_i$ 的迅速升高依赖于胞外 Ca^{2+} 的流入和胞内 Ca^{2+} 的释放, 而平台期依赖于 Ca^{2+} 的内流。

目前采用激光共聚焦技术观察药物对结肠平滑肌细胞钙离子影响的报道不多, 国内只有天津总医院Ma *et al*^[21]有报道。他们认为, 在急性分离的结肠平滑肌细胞大黄素引起 $[Ca^{2+}]_i$ 短暂的升高后下降到一个持续的、稳定的、比静息状态稍高 $[Ca^{2+}]_i$ 的平台期, 他认为 $[Ca^{2+}]_i$ 的迅速升高依赖于肌质网 IP_3 、RyR敏感地贮存 Ca^{2+} 释放, 而平台期是胞外钙离子内流而引起的。

本研究采用Fluo-3/AM荧光指示剂对培养的结肠平滑肌细胞钙离子变化进行观察, 显示 1×10^{-5} mol/L Ah刺激可使结肠平滑肌细胞内在短时间内钙离子浓度有个迅速、显著增加, 而后钙离子出现缓慢、更高幅度的升高, 随之下降到一个持续的、稳定的、比静息状态稍高的、较长时间的平台期。同时平滑肌细胞产生收缩效应。

我们与Ma *et al*的研究结果相比, 有一定的差异。Ma *et al*观察的细胞钙离子变化图只出现了一个波峰, 而我们观察的细胞钙离子变化图出现了两个波峰。这个图形是否符合CICR的四步模型^[18], 即Ah引起胞内钙离子出现的第一个快速升高的波峰是由胞外钙离子的迅速内流后进入胞内钙库而引起的, 第二个缓慢升高的波峰是由钙库被少量钙离子通过 IP_3R 和RyR释放钙离子到胞质和钙离子作为信使导致周围钙库释放钙离子而产生的, 可以通过从钙离子释放的各个途径选择相应的拮抗剂来进一步证实。

Ah和Ach组结肠平滑肌细胞内游离钙离子变化升高趋势一致, 但Ah组作用时间短, 效应更快, 说明Ah促结肠动力作用更加明显。预先用M受体阻断剂阿托品处理后, Ah上述作用被抑制, 证明Ah是通过激动M受体而产生效应的。

本研究旨在为筛选中药的活性成分建立起

在细胞水平层面上更可行、结果更可靠的实验方法。通过激光共聚焦显微镜离子通道观察技术, 能够证实中药槟榔胃肠活性的部分机制, 为筛选中药的活性成分的研究搭建了高通量、高度可靠的细胞学实验平台。

4 参考文献

- 1 梁宁霞. 槟榔药理作用研究进展. 江苏中医药 2004; 25: 55-57
- 2 司春峰, 魏睦新, 轩原清史. 氢溴酸槟榔碱对大鼠离体结肠平滑肌细胞作用的研究. 上海中医药杂志 2004; 38: 48-50
- 3 戴芸, 刘新光. 钙离子在胃肠平滑肌收缩机制中的作用. 国外医学·消化系疾病分册 2002; 22: 17-20
- 4 梁宁霞, 衣兰娟, 田琳, 刘翠萍, 魏睦新, 朱兰兰. 鼠结肠平滑肌细胞的分离、培养与鉴定. 江苏医药 2005; 31: 433-435
- 5 招明高, 王剑波, 梅其炳, 陈丹, 赵德化, 王春梅, 张延凤. 5-羟色胺对心肌细胞内游离钙浓度的影响. 第四军医大学学报 2001; 22: 1641-1644
- 6 Syed M, Tokuno H, Tomita T. Effects of cisapride on isolated guinea pig colon. *Jpn J Pharmacol* 1989; 51: 47-56
- 7 Benatar A, Feenstra A, Decraene T, Vandenplas Y. Effects of cisapride on corrected QT interval, heart rate, and rhythm in infants undergoing polysomnography. *Pediatrics* 2000; 106: E85
- 8 Enger C, Cali C, Walker AM. Serious ventricular arrhythmias among users of cisapride and other QT-prolonging agents in the United States. *Pharmacoevidenciol Drug Saf* 2002; 11: 477-486
- 9 魏睦新, 魏兰福, 邹百仓, 赵国平. 胃肠动力中药作用机制研究. 中西医结合学报 2004; 2: 163-166
- 10 Soncrant TT, Holloway HW, Greig NH, Rapoport SI. Regional brain metabolic responsivity to the muscarinic cholinergic agonist arecoline is similar in young and aged Fischer-344 rats. *Brain Res* 1989; 487: 255-266
- 11 Vanderheyden P, Gies JP, Ebinger G, De Keyser J, Landry Y, Vauquelin G. Human M1-, M2- and M3-muscarinic cholinergic receptors: binding characteristics of agonists and antagonists. *J Neurol Sci* 1990; 97: 67-80
- 12 Yang YR, Chang KC, Chen CL, Chiu TH. Arecoline excites rat locus coeruleus neurons by activating the M2-muscarinic receptor. *Chin J Physiol* 2000; 43: 23-28
- 13 Leonard A, Cuq P, Magous R, Bali JP. M3-subtype muscarinic receptor that controls intracellular calcium release and inositol phosphate accumulation in gastric parietal cells. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 839-845
- 14 Qiao GF, Zhou H, Li BY, Li WH. Antagonistic effects of berbamine on $[Ca^{2+}]_i$ mobilization by KCl, norepinephrine, and caffeine in newborn rat cardiomyocytes. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 1999; 20: 292-296
- 15 耿东进, 苏敏, 王君, 蔡琰. 活性细胞内钙检测方法研究进展. 国外医学生理、病理科学与临床分册 1994; 14: 24-26
- 16 陈哲宇, 齐清会. 胃肠平滑肌运动的细胞信号转导机制. 国外医学·消化系疾病分册 2003; 23: 138-141
- 17 Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372: 231-236
- 18 Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ. The control of calcium release in heart muscle. *Science* 1995; 268: 1045-1049
- 19 Mittal RK, Frank EB, Lange RC, McCallum RW. Effects of morphine and naloxone on esophageal motility and gastric emptying in man. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 936-942
- 20 Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier JC, Parmentier M. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8666-8670
- 21 Ma T, Qi QH, Yang WX, Xu J, Dong ZL. Contractile effects and intracellular Ca^{2+} signalling induced by emodin in circular smooth muscle cells of rat colon. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1804-1807

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 •

中华消化学会全国第二届炎症性肠病学术会议

本刊讯 中华消化学会全国第二届炎症性肠病学术会议将于2006-06-18/20在广州举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

结构式摘要800字(附软盘), 2006-06-30截稿。

2 联系方式

广州市中山大学一院消化科高翔收(邮编: 510080)

低压静电场对大肠杆菌生长过程的影响

代群威, 董发勤, 邓建军

■背景资料

如何保护人体正常菌群的微生态平衡并进一步利用其来达到治疗部分细菌性疾病成为研究的热点. 相关报道大部分注重于医用抗生素等药物对正常菌群平衡的影响, 而忽视了人类日常生活环境对其带来的影响. 电场对微生物生长影响也主要集中在利用高压、高频电磁场杀菌的研究上, 而未见有关低压静电场对微生物生长的影响研究, 本文就是基于以上两个方面进行试验研究的.

代群威, 董发勤, 西南科技大学环境与资源学院 四川省绵阳市 621010

邓建军, 绵阳市第四人民医院检验科微生物室 四川省绵阳市 621000

代群威, 男, 1978-11-20, 河南省漯河市人, 汉族, 2005年西南科技大学硕士, 讲师, 主要从事环境协调材料及环境医学研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 40072020

通讯作者: 董发勤, 621010, 四川省绵阳市, 西南科技大学环境与资源学院. fqdong@swust.edu.cn

电话: 0816-6089120 传真: 0816-6089124

收稿日期: 2006-01-10 接受日期: 2006-02-08

Effect of low-voltage static electric field on growth of *Esoherichia coli*

Qun-Wei Dai, Fa-Qin Dong, Jian-Jun Deng

Qun-Wei Dai, Fa-Qin Dong, College of Environment and Resources, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan Province, China
Jian-Jun Deng, Department of Microbiological Laboratory, the Forth People's Hospital of Mianyang, Mianyang 621000, Sichuan Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 40072020

Correspondence to: Dr. Fa-Qin Dong, College of Environment and Resources, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan Province, China. fqdong@swust.edu.cn

Received: 2006-01-10 Accepted: 2006-02-08

Abstract

AIM: To study the influence of static electric field with different intensities on the growth of *Esoherichia coli*.

METHODS: The static electric field of 3 and 24 volt were used upon the big tubes ($\Phi = 30$ mm) in which *E. coli* were cultured. The optical density and bacterial colony numbers were measured during the growth process of *E. coli*. Meanwhile, the morphology of *E. coli* under the action of 24-volt static electric field was observed by scanning electron microscopy (SEM) comparatively analyzed with the control group.

RESULTS: The growth of *E. coli* obviously restrained during the prophase of culturing under the experiment conditions. Stable growth period of *E. coli* was advanced 2 and 4 hours under the

action of static electric fields of 3 and 24 volt, respectively. *E. coli* appeared the second logarithm growth period 6-8 h after the first stable period started. That was the growth remediation of bacteria. And in the experimental conditions, the intensity of static electric field was in inverse relation with the restoring speed of *E. coli*. In addition, the morphological distortion of *E. coli* was found under the SEM.

CONCLUSION: The external low-voltage static electric field has inhibitory effect on the growth of *E. coli*.

Key Words: Static electric field; *Esoherichia coli*; Restraint; Growth remediation

Dai QW, Dong FQ, Deng JJ. Effect of low-voltage static electric field on growth of *Esoherichia coli*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):682-686

摘要

目的: 研究不同强度低压静电场对大肠杆菌 (*E. coli*) 生长过程的影响.

方法: 将3 V和24 V两种不同强度低压静电场施加于培养大肠杆菌的大试管($\Phi = 30$ mm), 测量大肠杆菌生长过程中的吸光度 A_{540nm} 及菌落数, 并对24 V静电场作用下8 h的大肠杆菌进行扫描电镜(SEM)观察, 对比其与对照管的菌体形态变化特征.

结果: 大肠杆菌的生长在培养前期受到了明显的抑制. 3 V和24 V静电场作用下大肠杆菌进入稳定生长期的时间分别提前了2 h和4 h, 当第1个稳定生长期持续6-8 h后出现第2次生长, 即出现“生长修复”. 且在试验条件下, 外加静电场越强, 修复速度就越慢. 扫描电镜分析发现了试验条件下大肠杆菌菌体形态出现了一定的变异, 进一步说明了外加低压静电场对大肠杆菌生长存在一定程度的影响作用.

结论: 外加低压静电场对大肠杆菌生长存在一定的抑制作用.

关键词: 静电场; 大肠杆菌; 抑制; 生长修复

代群威, 董发勤, 邓建军. 低压静电场对大肠杆菌生长过程的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(7):682-686
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/682.asp>

0 引言

正常情况下, 人体正常菌群(normal flora)在维持人体与外界平衡, 增加人体免疫力甚至治疗部分疾病等方面起着重要作用^[1-5]. 近年来, 人们在逐步认识人体正常菌群作用的同时, 有关外界环境(如: 过量服用抗生素及外界物理损伤等)对人体微生态平衡影响研究在国内外开始引起重视^[6-9].

电场对微生物影响研究主要集中在脉冲电场上, 包括利用脉冲电场低温杀菌^[10-14]及其在食品灭菌储藏中的应用研究, 弥补高温消毒的弊端^[15-17]; 脉冲电场与磁场, CO₂等其他物理条件协同作用杀菌能够进一步提高杀菌效果^[18-20]; 脉冲电场以及直流电场对微生物生长过程的影响研究及其杀菌机制研究等^[21-30]. 有关静电场对微生物影响研究较少, 且所选静电场主要为高压静电场^[31]. 然而低压静电场对微生物生长的影响, 特别是对人体正常菌群的微生态平衡影响方面研究目前少见报道. 我们对大肠杆菌在低压静电场(low-voltage static electric field)下生长情况进行了研究, 初步探讨了其对大肠杆菌生长的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌(ATCC25922)来自卫生部临床检验中心. 营养肉汤培养基: 牛肉膏5 g, 蛋白胨10 g, NaCl 5 g, 加蒸馏水1 000 mL, 调pH 7.2左右. 营养琼脂培养基: 牛肉膏5 g, 蛋白胨10 g, NaCl 5 g, 琼脂18 g, 加蒸馏水1 000 mL, 调pH 7.2左右. 葡萄糖溶液: 葡萄糖30 g, 加蒸馏水100 mL, 浓度为300 g/L. 以上全部经过高压蒸汽消毒, 备用. LEO S440型扫描电子显微镜; 国产721型分光光度计; 国产DG-410型电热恒温培养箱; 低压静电场3 V, 24 V.

1.2 方法 接种一环*E.coli*菌种于10 mL液体培养基中, 置于36℃培养箱中, 24 h后取出, 作为原菌液备用; 取5 mL的葡萄糖溶液加入到250 mL液体培养基中, 混匀后分装到直径为30 mm的大试管中各30 mL; 在大试管中插入电极并用棉塞塞紧(图1). 在每支试管中加入50 μL的原菌液, 将低压静电场作用管(以下简称试验管)分别接通试验所需电源, 同时做无外加静电场的对照管. 将整个装置置于36℃恒温培养箱中, 每隔

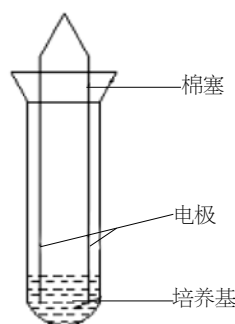


图1 低压静电场作用试验装置.

一定时间各取2 mL菌液(摇匀)测吸光度A值, 并用倾注法测菌落数. 测定时以无菌蒸馏水做空白对照, 选用540 nm波长, 用光程为0.5 cm的比色杯, 并将测试结果绘制曲线.

统计学处理 数据用mean±SD表示, 采用SPSS 10.0统计软件处理. 试验组与对照组间比较采用t检验.

2 结果

2.1 大肠杆菌生长过程 24 V试验管大肠杆菌从6 h处开始细菌悬液的吸光度A值基本出现稳定, 证明开始进入“稳定生长期”, 相对正常情况下提前了4 h, 3 V试验管则相对提前了2 h; 另外对照管相对试验管在该时期的A值较大, 表现为生长曲线相对较“高”. 试验管整个生长曲线有2个“台阶”, 即2个稳定生长期, 第2台阶开始于24 h处. 可能由于大肠杆菌在实验静电场作用下经过多代生长繁殖, 对外界环境干扰产生了耐受性, 逐渐适应了电流对其生长的抑制作用, 在第1个稳定生长期持续6-8 h后出现第2次生长, 即其生长出现了“反弹现象”, 或者说是“生长修复”. 从菌落数对数曲线可以看出, 与对照相比, 试验管曲线较低且中间出现了波动, 24 V静电场作用下大肠杆菌衰亡期延迟, 电压越大, 修复速度就越慢(表1, 图2).

2.2 扫描电镜下大肠杆菌形态变化 对照样*E.coli*菌体形态均一(SEM×50 000). 24 V静电场作用下, 大肠杆菌出现畸形. 部分大肠杆菌菌体变宽, 中部出现凹陷, 整个菌体变“瘪”, 形态不规则, 呈“哑铃状”; 另有菌体变消长, 其长度为正常菌体的3-4倍. 实验外加低压静电场对大肠杆菌的生长具有明显的影响, 造成了其形态的变化(图3).

3 讨论

细菌固体成分的50%-80%是蛋白质, 细菌蛋白

■ 研发前沿

探讨利用高频、高压脉冲电场及静电场的杀菌效果, 目的是实现低温下杀菌, 为食品、医药等行业提供更有有效的低温灭菌手段. 人体正常菌群的微生态平衡与人体健康之间的关系, 医用药物对人体正常菌群的微生态平衡的影响以及对其的防护等为当前研究热点.

■创新盘点

本文首次采用内置电极法模拟低压静电场, 人体安全电压(3 V和24 V)对人体正常菌株——大肠杆菌的生长过程影响进行了研究, 不同于其他有关的高频、高压电磁场与微生物相互作用的研究报道。

表 1 大肠杆菌在不同环境下生长情况比较 (mean \pm SD, $n = 3$)

取样时间 (h)	A_{540nm}			ΔA_{540nm}			菌落数 (10^9 CFU/L)		
	3 V	24 V	对照	3 V	24 V	对照	3 V	24 V	对照
0	0.095 \pm 0.001	0.095 \pm 0.001	0.095 \pm 0.001	0	0	0	5.0 \pm 1.0	5.0 \pm 1.0	5.0 \pm 1.0
4	0.226 \pm 0.002 ^b	0.257 \pm 0.003 ^b	0.220 \pm 0.001 ^b	0.131 \pm 0.001 ^b	0.162 \pm 0.002 ^b	0.125 \pm 0.001 ^b	1.2 $\times 10^2 \pm 6.0^b$	8.7 $\times 10^1 \pm 2.0^b$	8.0 $\times 10^1 \pm 5.0^b$
6	0.442 \pm 0.001 ^b	0.472 \pm 0.002 ^b	0.464 \pm 0.002 ^b	0.216 \pm 0.001 ^b	0.215 \pm 0.001 ^b	0.244 \pm 0.001 ^b	5.6 $\times 10^2 \pm 14.0^b$	4.0 $\times 10^2 \pm 8.0^b$	1.2 $\times 10^3 \pm 15.0^b$
8	0.475 \pm 0.003 ^b	0.480 \pm 0.002 ^b	0.568 \pm 0.001 ^b	0.033 \pm 0.002 ^b	0.008 \pm 0.001 ^b	0.104 \pm 0.001 ^b	3.0 $\times 10^3 \pm 11.0^b$	1.8 $\times 10^3 \pm 17.0^b$	5.0 $\times 10^3 \pm 10.0^b$
10	0.480 \pm 0.002 ^b	0.492 \pm 0.002 ^b	0.600 \pm 0.001 ^b	0.005 \pm 0.001 ^b	0.012 \pm 0.001 ^b	0.032 \pm 0.001 ^b	5.0 $\times 10^2 \pm 13.0^b$	1.0 $\times 10^3 \pm 15.0^b$	7.5 $\times 10^3 \pm 17.0^b$
12	0.510 \pm 0.001 ^a	0.505 \pm 0.003 ^b	0.602 \pm 0.002 ^b	0.030 \pm 0.001 ^b	0.013 \pm 0.001 ^b	0.002 \pm 0.001 ^b	3.8 $\times 10^3 \pm 23.0^b$	5.0 $\times 10^2 \pm 15.0^b$	1.0 $\times 10^4 \pm 35.0^b$
14	0.512 \pm 0.002 ^a	0.517 \pm 0.002 ^b	0.615 \pm 0.002 ^b	0.002 \pm 0.001 ^b	0.012 \pm 0.001 ^b	0.013 \pm 0.001 ^b	4.5 $\times 10^3 \pm 21.0^b$	2.0 $\times 10^3 \pm 14.0^b$	8.0 $\times 10^3 \pm 13.0^b$
24	0.587 \pm 0.002 ^a	0.580 \pm 0.002 ^b	0.622 \pm 0.001 ^b	0.075 \pm 0.001 ^b	0.063 \pm 0.001 ^b	0.007 \pm 0.001 ^b	1.3 $\times 10^3 \pm 15.0^b$	4.8 $\times 10^3 \pm 26.0^b$	1.5 $\times 10^3 \pm 19.0^b$
36	0.585 \pm 0.001 ^b	0.590 \pm 0.002 ^b	0.650 \pm 0.002 ^b	-0.002 \pm 0.001 ^b	0.010 \pm 0.001 ^b	0.028 \pm 0.001 ^b	2.0 $\times 10^2 \pm 8.0^b$	5.5 $\times 10^2 \pm 7.0^b$	2.5 $\times 10^2 \pm 14.0^b$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

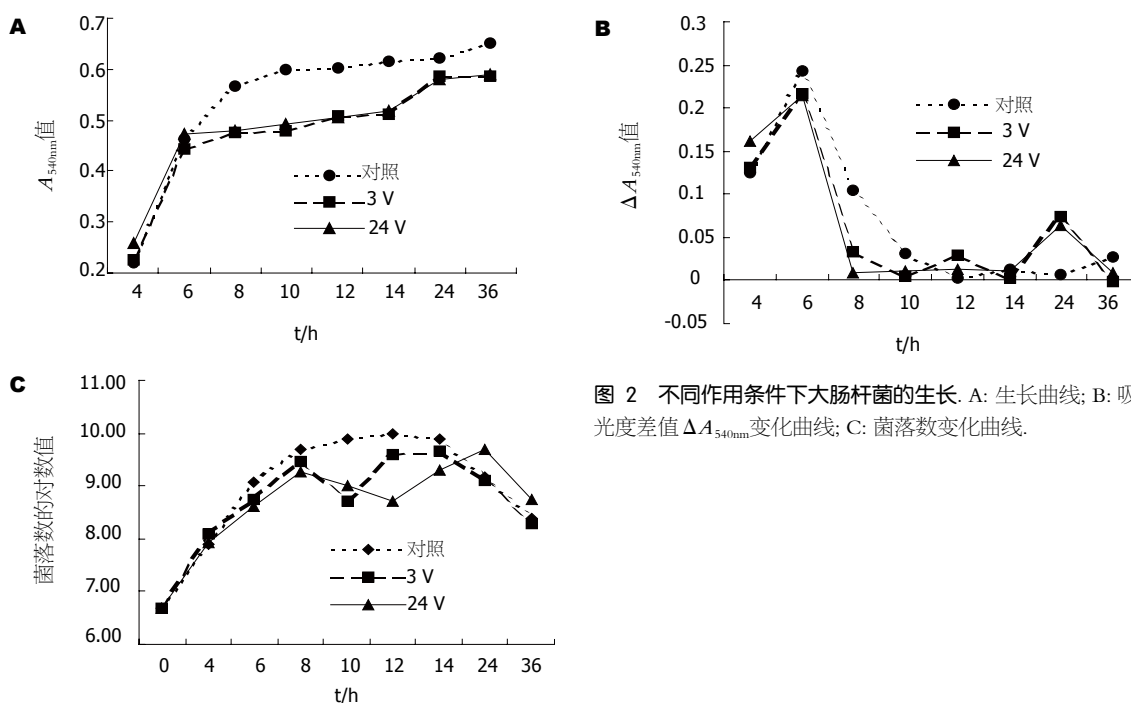


图 2 不同作用条件下大肠杆菌的生长。A: 生长曲线; B: 吸光度差值 ΔA_{540nm} 变化曲线; C: 菌落数变化曲线。

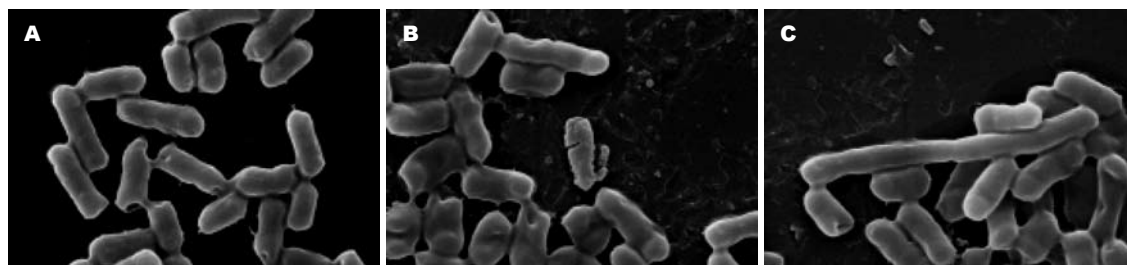


图 3 正常条件和24 V静电场作用下*E. coli*生长8 h的SEM照片 ($\times 50\ 000$)。A: 正常条件下; B, C: 24 V静电场作用下。

质和其他蛋白质一样, 由多种氨基酸组成, 是一种两性离子, 具有两性游离性质, 在溶液中可电离成带负电荷的羧基(COO^-)和带正电荷的氨基(NH_3^+), 氨基酸的电离与溶液的pH值有关。即当细菌所处的环境pH高于等电点时, 带正电。溶液

的pH 2-5之间时细菌处于等电点, 通常细菌所处的环境呈弱碱性(pH 7.2-7.6), 因此细菌带负电荷。在实验外加低压静电场的作用下, 电极周围形成静电场, 改变了菌体正常生长环境下的原有“电位差”, 从而打破了细胞内外的离子

浓度平衡状况, 也就影响到细菌的生长. 另外, 直流电场作用胶体除了使带电离子产生电泳外, 还会使悬浮粒子的均匀媒质(如水)产生电渗. 因为蛋白质中羧基电解会产生 H^+ , H^+ 被水分子包围, 形成水合离子并向阴极移动, 使阴极附近的水分增多, 阳极的水分减少. 含水量的变化将影响生物功能.

由于大肠杆菌菌体本身带负电荷, 要顺着电场方向移动, 即向电极方向移动, 而由于电极的水分减少会使菌体水分部分渗出, 造成细菌细胞的“塌陷”变瘪. 从而给细菌带来一定的损伤甚至是破坏, 一定程度上抑制了细菌的生长, 这种抑制作用在细菌培养后期减弱, 出现了“生长修复”现象. 也可能是外加静电场影响细菌菌体内一些酶的生成或活力, 从而抑制了大肠杆菌的生长. 其中具体作用机制还有待进一步研究. 这对一些细菌性疾病的临床治疗以及探讨外部环境对人体内正常菌群平衡的影响方面都具有一定的参考价值, 同时也为微生物物理学方面的研究提供了一些理论依据.

4 参考文献

- Guarner F. The intestinal flora in inflammatory bowel disease: normal or abnormal? *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 414-418
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5721-5732
- Karlsson H, Hessel C, Rudin A. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. *Infect Immun* 2002; 70: 6688-6696
- Reid G, Beuerman D, Heinemann C, Bruce AW. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 32: 37-41
- Yoshimura T, Okamura H. Short term oral estriol treatment restores normal premenopausal vaginal flora to elderly women. *Maturitas* 2001; 39: 253-257
- Gemensky-Metzler AJ, Wilkie DA, Kowalski JJ, Schmall LM, Willis AM, Yamagata M. Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations. *Am J Vet Res* 2005; 66: 800-811
- Seppala H, Al-Juhaish M, Jarvinen H, Laitinen R, Huovinen P. Effect of prophylactic antibiotics on antimicrobial resistance of viridans streptococci in the normal flora of cataract surgery patients. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 307-315
- Acar JF. A comparison of side effects of levofloxacin to other agents concerning the ecological and microbiological effects on normal human flora. *Chemotherapy* 2001; 47: 15-23
- Erdogan H, Kemal M, Toker MI, Topalkara A, Bakici Z. Effect of frequent-replacement contact lenses on normal conjunctival flora. *CLAO J* 2002; 28: 94-95
- Garcia D, Gomez N, Manas P, Condon S, Raso J, Pagan R. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *J Appl Microbiol* 2005; 99: 94-104
- Aronsson K, Ronner U, Borch E. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to membrane permeabilization and subsequent leakage of intracellular compounds due to pulsed electric field processing. *Int J Food Microbiol* 2005; 99: 19-32
- Caubet R, Pedarros-Caubet F, Chu M, Freye E, de Belem Rodrigues M, Moreau JM, Ellison WJ. A radio frequency electric current enhances antibiotic efficacy against bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4662-4664
- Rodrigo D, Barbosa-Canovas GV, Martinez A, Rodrigo M. Weibull distribution function based on an empirical mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* by pulsed electric fields. *J Food Prot* 2003; 66: 1007-1012
- Evrendilek GA, Zhang QH. Effects of pH, temperature, and pre-pulsed electric field treatment on pulsed electric field and heat inactivation of *Escherichia coli* O157: H7. *J Food Prot* 2003; 66: 755-759
- Ayhan Z, Zhang QH, Min DB. Effects of pulsed electric field processing and storage on the quality and stability of single-strength orange juice. *J Food Prot* 2002; 65: 1623-1627
- Iu J, Mittal GS, Griffiths MW. Reduction in levels of *Escherichia coli* O157: H7 in apple cider by pulsed electric fields. *J Food Prot* 2001; 64: 964-969
- Evrendilek GA, Zhang QH, Richter ER. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Escherichia coli* 8739 in apple juice by pulsed electric fields. *J Food Prot* 1999; 62: 793-796
- Spilimbergo S, Dehghani F, Bertuccio A, Foster NR. Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO₂ at low temperature. *Biotechnol Bioeng* 2003; 82: 118-125
- Unal R, Kim JG, Yousef AE. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Lactobacillus leichmannii* by combinations of ozone and pulsed electric field. *J Food Prot* 2001; 64: 777-782
- McCann J, Dietrich F, Rafferty C. The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutat Res* 1998; 411: 45-86
- Liu Z, Chen W, Papadopoulos KD. Electrokinetic movement of *Escherichia coli* in capillaries. *Environ Microbiol* 1999; 1: 99-102
- Shiina S, Ohshima T, Sato M. Extracellular release of recombinant alpha-amylase from *Escherichia coli* using pulsed electric field. *Biotechnol Prog* 2004; 20: 1528-1533
- Ohshima T, Hama Y, Sato M. Releasing profiles of gene products from recombinant *Escherichia coli* in a high-voltage pulsed electric field. *Biochem Eng J* 2000; 5: 149-155
- Suleymanoglu E. Electorelease of *Escherichia coli* nucleoids. *Folia Microbiol (Praha)* 2002; 47: 365-370
- Zrimec A, Jerman I, Lahajnar G. Alternating electric fields stimulate ATP synthesis in *Escherichia coli*. *Cell Mol Biol Lett* 2002; 7: 172-174

■应用要点

本文对模拟低压静电场对大肠杆菌生长过程的影响进行了研究, 并证实外加低压静电场对大肠杆菌生长存在一定的抑制作用, 这对一些细菌性疾病的临床治疗以及维护人体正常菌群的微生态平衡有一定的价值.

■同行评价

课题设计新颖, 合理, 结果可信, 具有一定的科学意义. 对一些细菌性疾病的临床治疗以及探讨外部环境对人体内正常菌群平衡的影响方面具有一定的参考价值, 同时也为微生物物理学方面的研究提供了一些理论依据.

- 26 Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Elkin B, Brunner H, Bernhagen J. Amplifiable DNA from gram-negative and gram-positive bacteria by a low strength pulsed electric field method. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E37
- 27 Oshima T, Sato M. Bacterial sterilization and intracellular protein release by a pulsed electric field. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004; 90: 113-133
- 28 Aronsson K, Borch E, Stenlof B, Ronner U. Growth of pulsed electric field exposed *Escherichia coli* in relation to inactivation and environmental factors. *Int J Food Microbiol* 2004; 93: 1-10
- 29 Reyns KM, Diels AM, Michiels CW. Generation of bactericidal and mutagenic components by pulsed electric field treatment. *Int J Food Microbiol* 2004; 93: 165-173
- 30 Kermanshahi RK, Sailani MR. Effect of static electric field treatment on multiple antibiotic-resistant pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect* 2005; 38: 394-398
- 31 Umarov GR, Boichenko VS, Umarov MG. Effect of electrostatic field on bacteria *E. coli*. *Aviakosm Ekolog Med* 1999; 33: 61-62

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。

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台,邀请本刊编委为专栏撰稿,每期1-3个专家门诊。写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言; 1 诊断; 2 治疗; 3 特色; 4 门诊时间

树突状细胞和调节性T细胞在自身抗原所致小鼠免疫耐受模型中的作用

向明, 张程亮, 邹晓蕾, 蔡晓寒, 彭佳蓓

向明, 张程亮, 邹晓蕾, 蔡晓寒, 彭佳蓓, 华中科技大学同济医学院药学院药理教研室 湖北省武汉市 430030

向明, 女, 湖南溆浦人, 华中科技大学同济医学院药学院药理教研室副教授, 博士, 主要从事免疫药理学即自身免疫发病机制和治疗方法研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30200343

通讯作者: 向明, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院药学院药理教研室. xiangming@mails.tjmu.edu.cn

电话: 027-83657813 传真: 027-83692892

收稿日期: 2006-01-10 接受日期: 2006-02-08

Roles of dendritic cells and regulatory T cells in autoantigen-induced murine immune tolerance model

Ming Xiang, Cheng-Liang Zhang, Xiao-Lei Zou, Xiao-Han Cai, Jia-Bei Peng

Ming Xiang, Cheng-Liang Zhang, Xiao-Lei Zou, Xiao-Han Cai, Jia-Bei Peng, Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30200343

Correspondence to: Ming Xiang, Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. xiangming@mails.tjmu.edu.cn

Received: 2006-01-10 Accepted: 2006-02-08

Abstract

AIM: To investigate the important roles of dendritic cells (DC) and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in immune prevention against insulin dependent diabetes (IDDM) by autoantigen insulin administration.

METHODS: The model of IDDM was established by intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin (STZ) 40 mg/kg per day for 5 consecutive days in Balb/c mice. The bovine insulin (100 µg) in incomplete Freund's adjuvant (IFA, emulsified 1:1) was given subcutaneously to the mice weekly for 4 weeks. The blood glucose was examined once a week and all the mice were killed after 5 weeks. Pancreas tissues were collected for histopathological examination. DC

precursor cells from bone marrow and lymphocytes from spleen were isolated. The phenotype of DC and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells were analyzed by fluorescence activated cell sorter (FACS). DC-stimulated proliferation of lymphocytes was determined by allo-mixed lymphocyte reaction (aMLR).

RESULTS: The level of blood glucose was decreased significantly after insulin injection in comparison with that in the model control group (13.79 ± 2.71 mmol/L vs 20.98 ± 1.43 mmol/L, $P < 0.05$). Fewer lymphocytes infiltration was observed and pancreatic histological structure was intact. The surface marker CD11c on DC from bone marrow was decreased markedly in IDDM mice (26.4%) than that in normal mice (47.5%). DC differentiated abnormally, and the capacity of stimulating proliferation of allogeneic T cell was weakened as compared with that of normal mice (1.47 ± 0.01 vs 2.93 ± 0.01 , $P < 0.01$, and 1.32 ± 0.01 vs 2.94 ± 0.02 , $P < 0.01$, at DC/T ratios of 1:10 and 1:20, respectively). The percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells were decreased to 1.43%, while it was 5.09% in normal mice. In contrast, blood glucose in mice given insulin subcutaneously was well controlled, and the amount of DC with CD11c was increased (50% approximately); the expression of CD86 and MHC-II was low (26.6% and 28.8%, respectively) and MLR showed that DC capacity in stimulating T cell proliferation was lower than those from the normal mice, but higher than those from IDDM model mice (2.30 ± 0.06 and 2.17 ± 0.02 , at DC/T ratios of 1:10 and 1:20, respectively); the percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells from spleen was enhanced to 7.15%.

CONCLUSION: Subcutaneous administration of insulin can confer protection to mice against IDDM induced by STZ. The immune protection of autoantigen may be associated with the establishment of immune tolerance by improving the function of abnormal DC and promoting the production of CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo*.

■背景资料

1型糖尿病属于自身免疫性疾病, 目前尚无有效药物防治1型糖尿病的发生, 因此成功诱导免疫耐受是防治1型糖尿病的最佳方式. 近些年来, 以自身抗原为研究对象并经各种途径在糖尿病转基因动物中诱导免疫耐受已进行了大量的研究, 然而对于在疾病动物模型体内诱导免疫耐受的研究却少见报道.

■ 研究前沿

树突状细胞的不同状态在自身免疫病发病和诱导免疫耐受中所起的作用,一直是该领域研究的热点,如何发挥和调控树突状细胞诱导免疫耐受是基础研究和临床应用研究领域所关注的焦点。

Key Words: Autoantigen; Dendritic cells; Regulatory cells; Insulin dependent diabetes

Xiang M, Zhang CL, Zou XL, Cai XH, Peng JB. Roles of dendritic cells and regulatory T cells in autoantigen-induced murine immune tolerance model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):687-692

摘要

目的: 探讨树突状细胞(DC)及CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在胰岛素自身抗原sc所诱导的小鼠胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)的免疫耐受中的重要作用。

方法: 低剂量链脲佐菌素(STZ)(40 mg/kg)ip连续5次在Balb/c小鼠体内建立IDDM模型,胰岛素(100 μg)与不完全弗氏佐剂(IFA, 1:1)混合液sc 1次/wk,连续4 wk。模型建立后每周测定血糖,5 wk时处死动物,取胰腺进行病理组织学检查。分离骨髓DC前体及脾脏T淋巴细胞并进行体外培养。采用流式细胞术测定DC表型和CD4⁺CD25⁺调节性T细胞,以同种淋巴细胞刺激实验检测DC刺激淋巴细胞增殖功能。

结果: 胰岛素sc 4 wk后可明显降低小鼠的血糖,与模型对照组有极显著差异(13.79 ± 2.71 mmol/L vs 20.98 ± 1.43 mmol/L, $P < 0.05$)。胰岛内炎症细胞浸润减少,组织结构完整。IDDM模型建立后,小鼠骨髓来源树突状细胞CD11c表达为26.4%, DC分化异常,而正常小鼠CD11c表达为47.5%;混合淋巴细胞反应中DC刺激能力减弱,刺激指数分别为 1.47 ± 0.01 和 1.32 ± 0.01 (刺激细胞和反应细胞比例分别为1:10和1:20),与正常小鼠相比,差别具有极显著性意义(P 值均小于0.01)。脾脏CD4⁺CD25⁺调节性T细胞减少到1.43%,而正常小鼠为5.09%。与此相反,胰岛素自身抗原连续应用后,不仅使血糖得到控制,表达CD11c的树突状细胞数量增加,CD86和MHC-II表面分子表达降低到26.6%和28.8%,刺激淋巴细胞反应的能力弱于正常DC,但强于模型小鼠的DC,刺激指数分别为 2.30 ± 0.06 (1:10)和 2.17 ± 0.02 (1:20),CD4⁺CD25⁺调节性T细胞数量上升到7.15%。

结论: 胰岛素sc可预防STZ所致小鼠IDDM的发生,自身抗原可以通过改善功能异常的树突状细胞,诱导CD4⁺CD25⁺调节性T细胞分化在模型小鼠体内建立免疫耐受。

关键词: 自身抗原; 树突状细胞; 调节性T细胞; 1型糖尿病

向明, 张程亮, 邹晓蕾, 蔡晓寒, 彭佳蓓. 树突状细胞和调节性T细胞在自身抗原所致小鼠免疫耐受模型中的作用. *世界华人消化杂志* 2006;14(7):687-692

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/687.asp>

0 引言

1型糖尿病,即胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)是T细胞介导的。以胰岛素分泌性胰岛β细胞破坏为主要病理特点的自身免疫性疾病^[1]。建立抗原特异性T细胞耐受是目前防治自身免疫病的主要研究方向。大量研究发现,如果在自身免疫反应前期给予一定数量的可溶性β细胞或胰岛素自身抗原,可通过诱导免疫耐受而发挥预防IDDM作用^[2-5]。去除或抑制CD4⁺CD25⁺调节性T细胞能打破天然的免疫耐受平衡,导致自身免疫病^[6-7]。而体外处理或修饰树突状细胞可在NOD小鼠体内促进Th细胞的免疫偏离,预防IDDM发生^[8]。因此免疫耐受与调节性T细胞和树突状细胞的关系倍受关注。但目前对于诱导IDDM免疫耐受的方法较多,结论也不完全一致^[9]。此外大多数耐受建立在NOD小鼠体内,该种类小鼠发病有性别限制,且口服抗原治疗仅使50%-60%的小鼠产生耐受^[10]。因此我们拟在IDDM模型小鼠体内建立胰岛素自身抗原诱导免疫耐受的方法,并深入探讨免疫耐受与CD4⁺CD25⁺调节性T细胞以及树突状细胞的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 牛胰岛素、链脲佐菌素(STZ)购自Sigma公司。不完全弗氏佐剂(IFA)购自Difco公司。Ficoll-Paque淋巴细胞分层液购自Amersham公司。MTT购自Amresco公司。RPMI 1640完全培养基购自Gibco公司。FITC标记anti-mouse CD4, PE标记anti-mouse CD25购自eBioscience公司。集落刺激因子(GM-CSF)和白介素4(IL-4)购于R&D公司。FITC标记抗小鼠CD11c mAb, FITC标记抗小鼠CD86, MHC-II (I-A^d)单克隆抗体购自BD Pharmingen公司。♂ Balb/c小鼠,平均体质量22 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.2 方法 制备小鼠IDDM模型并诱导免疫耐受:小鼠每日ip 40 mg/kg的链脲佐菌素,连续5 d,建立IDDM模型。于造模前1 d分别sc或口服灌胃胰岛素和IFA的混合乳剂(1:1, 100 μg/只),每周给药1次或2次,连续4 wk。经尾静脉采血测血糖。在非禁食状态下,2次血糖值在16.7 mmol/L

以上者确定为糖尿病. 胰岛病理组织学分析: 颈椎脱臼处死小鼠, 取胰腺, 于40 g/L中性甲醛固定, 制作石蜡切片, 镜检, 观察病理组织学变化. DC的制备及鉴定: 取小鼠胫骨骨髓, 过无菌尼龙网去除杂质, 清洗, 即可获得骨髓细胞悬液. 以淋巴细胞分层液分离细胞. 取 3×10^7 细胞加入含100 mL/L胎牛血清(FCS)的RPMI 1640液, 置于37℃ 50 mL/L CO₂培养箱内培养过夜. 次日弃上清液和悬浮细胞, 清洗并加入RPMI 1640完全培养液(含20 μg/L GM-CSF和20 μg/L IL-4), 于37℃ 50 mL/L CO₂培养箱内培养. 至第7天收获细胞, 于 1×10^9 /L细胞悬液200 μL中分别加入FITC标记抗小鼠CD11 mAb、FITC标记抗小鼠CD86和MHC-II(I-A^d)mAb. 4℃孵育30 min后, 以PBS离心洗2次, 重新悬于0.4 mL的PBS液后, 采用FACScan(Becton-Dickinson公司)流式细胞仪检测树突状细胞表型. 另设正常小鼠淋巴细胞对照. 混合淋巴细胞增殖反应(MLR): 取培养7 d的DC用完全RPMI 1640培养液悬浮, 加入终浓度为25 mg/L的丝裂霉素C(MMT), 37℃孵育30 min作为刺激细胞. 无菌分离昆明种小鼠脾脏淋巴细胞, 于96孔板内每孔分别加入 2×10^5 个细胞作为反应细胞. 再分别加入 2×10^4 、 1×10^4 刺激细胞, 终体积200 μL, 每组设3个复孔. 37℃ 50 mL/L CO₂条件下培养72 h后, 每孔加入5 g/L的MTT 20 μL, 继续培养4 h, 离心弃上清液, 每孔加入DMSO 150 μL, 用酶标仪在550 nm波长下测定各孔A值. 以刺激指数(刺激指数 = 实验组A值/对照组A值)评定细胞增殖程度. CD4⁺CD25⁺ T细胞亚群分析: 取小鼠脾脏, 碾磨过无菌尼龙网收集细胞, 清洗, 采用淋巴细胞分层液分离制备淋巴细胞悬液, 于 1×10^{10} /L细胞悬液200 μL中分别加入FITC标记抗小鼠CD4和PE标记抗小鼠CD25mAb或相关阴性对照, 同上法处理后, 采用流式细胞仪检测.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 各组资料分析应用二组均数t检验法.

2 结果

2.1 小鼠IDDM模型的建立以及自身抗原对血糖的影响 低剂量STZ连续5次ip后, Balb/c小鼠体内血糖明显升高(图1). 非禁食血糖值大于16.7 mmol/L, 因此确定为糖尿病. 此后至5 wk时, 高血糖持续存在, 与空白对照小鼠相比有极显著差异. 病理组织学分析显示, STZ模型组多数胰岛结构不完整, 且有明显的淋巴细胞及中

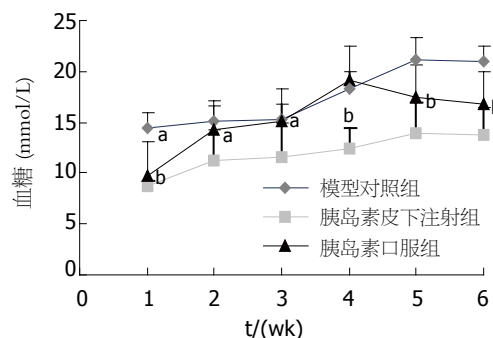


图1 胰岛素自身抗原对IDDM模型小鼠血糖的影响.
* $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型对照组.

性粒细胞浸润, 残余胰岛细胞散在分布, 呈现明显的炎性破坏. 由此提示在Balb/c小鼠体内少量多次给予STZ可以诱导IDDM. 模型建立前1 wk开始sc胰岛素, 1次/wk, 小鼠血糖略有升高, 但连续5 wk均低于16.7 mmol/L, 没有出现糖尿病, 且胰岛HE染色显示多数胰岛结构保持完好, 胰岛细胞清晰可见, 几乎没有炎性细胞浸润. 胰岛素口服给药, 开始可控制血糖, 但2 wk后血糖便持续增高, 与模型对照组无明显区别. 结果说明胰岛素皮下注射可预防IDDM发展, 有效控制血糖.

2.2 DC表面抗原分析 正常小鼠DC前体经体外诱导培养7 d后, 镜下观察可见形态不规则、呈现树突状的典型DC表现. 47.5%的贴壁细胞经流式细胞术检测为表达CD11c的树突状细胞. IDDM模型组表达CD11c的细胞仅为26.4%, 且细胞形态异常. 胰岛素皮下注射组CD11c表达与正常组相当, 约为50%. 此外胰岛素处理组细胞表面抗原MHC-II和共刺激分子CD86的表达显著低于正常组, 表现为非成熟状态, 而模型组表面抗原和共刺激分子的表达则低于胰岛素给药组(图2). DC表面抗原分析显示IDDM小鼠DC表型异常, DC的标志抗原CD11c表达明显降低, 胰岛素皮下注射组DC表型未受到明显破坏, 而且DC处于非成熟免疫耐受状态.

2.3 胰岛素sc对DC刺激淋巴细胞增殖能力的影响 STZ诱导糖尿病模型组DC刺激脾T淋巴细胞增殖的能力比空白对照组明显降低($P < 0.01$, 图3). 胰岛素皮下注射组, 小鼠DC刺激淋巴细胞增殖的能力高于模型组, 但与正常小鼠DC刺激淋巴细胞的功能相比明显减弱($P < 0.05$). 此结果与DC表型分析一致, STZ所致的糖尿病模型DC表型和功能明显异常, 胰岛素皮下注射后, DC的表型和功能分析显示DC处于耐受状态, 与IDDM得以有效控制的结果一致.

■ 创新盘点

研究采用自身抗原皮下注射的方式在STZ诱导的IDDM模型中建立免疫耐受, 并且探讨树突状细胞和调节性T细胞的作用, 目前国内尚无报道, 而研究结果对于免疫耐受的基础研究和应用都具有重要的指导意义.

■应用要点

本文研究内容对于利用树突状细胞和调节性T细胞诱导自身免疫病免疫耐受发挥对疾病尤其是IDDM的免疫保护作用,提供了理论依据,也为自身抗原胰岛素诱导免疫耐受的临床应用提供重要的参考。

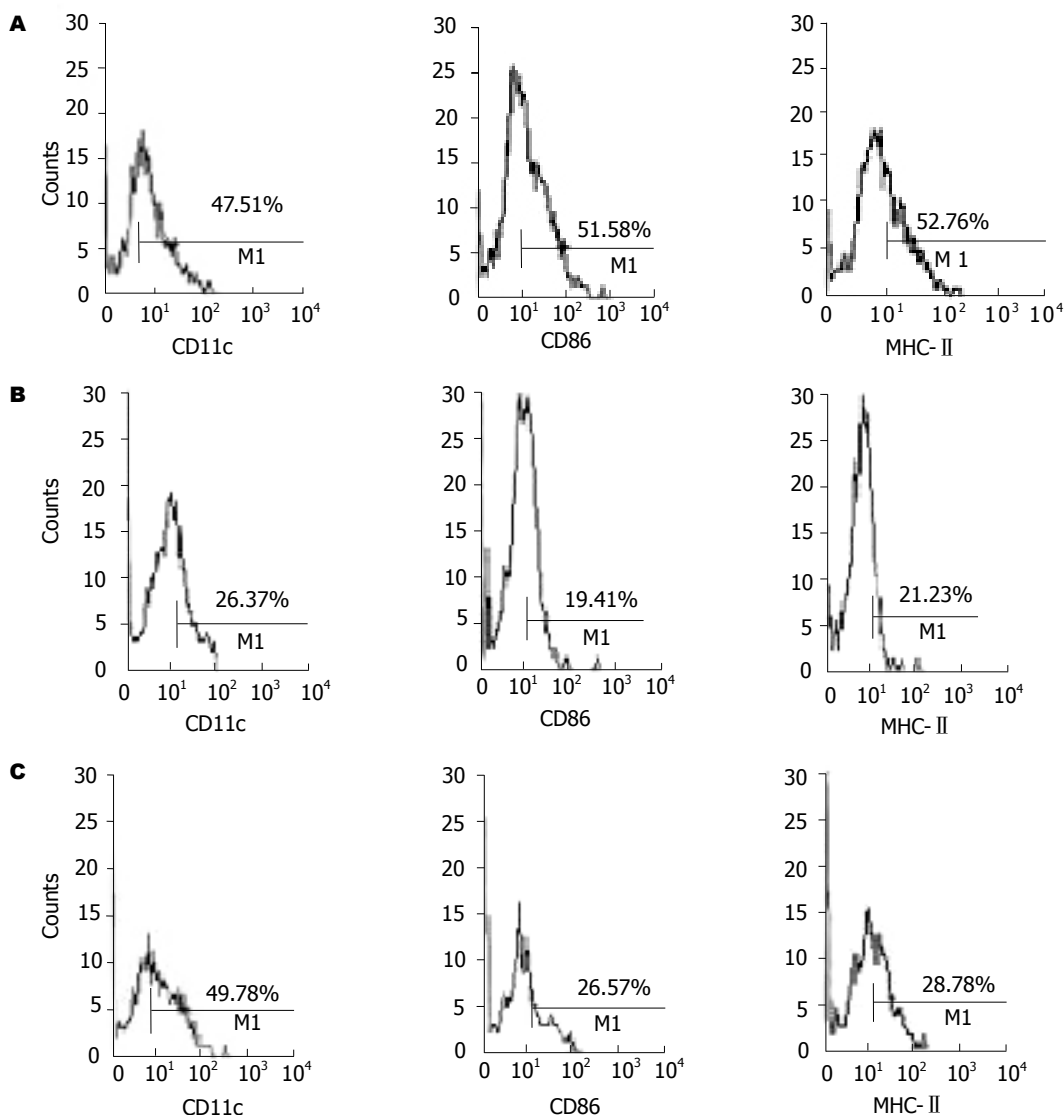


图2 DC表面抗原分析. A: 空白对照组; B: IDDM模型对照组; C: 胰岛素sc组.

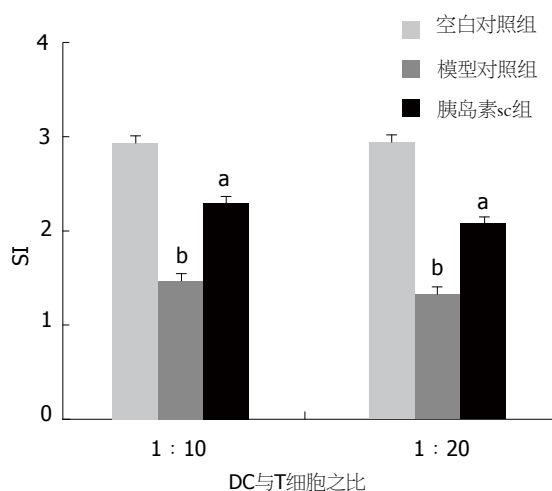


图3 胰岛素sc对DC刺激T细胞增殖反应的影响.

2.4 $CD4^+CD25^+$ T细胞亚群分析 STZ诱导的IDDM可持续发病5 wk以上,模型建立后小鼠

脾脏 $CD4^+CD25^+$ T细胞经流式细胞仪检测仅为1.43%,明显低于正常小鼠的5.09%,由此说明STZ导致糖尿病小鼠外周调节性T细胞下降,外周免疫耐受遭到破坏.而胰岛素皮下注射4 wk后, $CD4^+CD25^+$ T细胞增加到7.15%,明显高于模型对照组(图4),每图右上象限表示 $CD4^+CD25^+$ T细胞亚群.以上结果进一步说明胰岛素sc可上调 $CD4^+CD25^+$ T细胞水平,建立外周免疫耐受,保护胰岛 β 细胞免受损害.

3 讨论

1型糖尿病患者和NOD小鼠体内, Th1细胞针对自身抗原如胰岛素、谷氨酸脱羧酶(GAD)65或热休克蛋白(hsp)60肽p277产生Th1应答,使体内DC异常,不能促进足够的调节性T细胞生成,由此导致免疫调节紊乱^[1]. 本研究发现STZ所致的

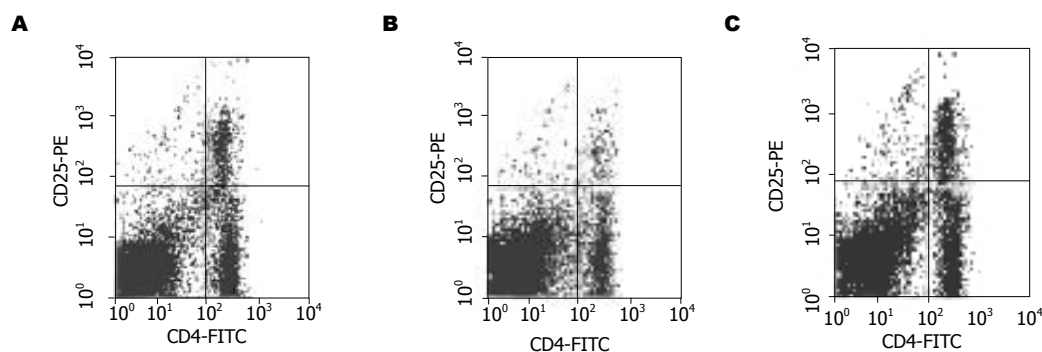


图 4 胰岛素sc后小鼠体内CD4⁺CD25⁺ T细胞亚群的变化. A: 正常小鼠 (5.09%); B: STZ模型组 (1.43%); C: 胰岛素sc组 (7.15%).

糖尿病模型小鼠表达CD11c的DC明显减少, 刺激T细胞增殖的能力减弱, CD4⁺CD25⁺ T细胞亚群也明显低于正常小鼠. 此结果与在IDDM患者和NOD小鼠发病后所观察到的树突状细胞表型和功能异常一致^[12-15]. 因此我们采用STZ诱导小鼠糖尿病模型^[16], 探讨DC及CD4⁺CD25⁺ T调节性细胞在胰岛素自身抗原诱导免疫耐受中的作用. 成熟的树突状细胞(mDC)是强抗原提呈细胞, 可促进T细胞免疫应答, 不成熟树突状细胞(iDC)在稳定状态下诱导外周T细胞耐受^[17]. 然而临床上iDC并不适用于自身免疫病的治疗, 因为iDC很有可能在炎症环境下转化为mDC^[18], 因此有效的治疗方法应该是采用特殊的淋巴因子、免疫原或者药物制剂诱导促进T调节性细胞分化的耐受性DC^[19-21].

胰岛素是在胰岛β细胞上表达的特异性抗原. 完整的胰岛素分子, 胰岛素β链及其肽段B9-23经适宜的途径均可有效预防NOD小鼠、BB大鼠发病^[22-23]. 研究发现, NOD小鼠口服胰岛素能诱导抗原特异性调节T细胞产生, 通过分泌IL-4, IL-10, TGF-β在胰岛内抑制Th1型细胞及其他效应细胞, 使IFN-γ和诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)表达显著下调, 从而保护胰岛免受破坏, 分泌胰岛素维持正常血糖^[24]. 本结果显示, 胰岛素sc可有效防止IDDM的发生, 血糖虽高于正常小鼠, 但与模型组相比显著下降, 始终控制在正常范围内. 实验结果与文献报道的不同之处是口服胰岛素对STZ诱导的IDDM几乎无效. 其原因可能是模型本身与NOD小鼠有一定区别, 如发病率和性别限制等. 另外胰岛素可能在胃内代谢失活而影响结果. STZ所致小鼠IDDM, 除出现血糖升高和胰腺炎症细胞浸润等典型病理特征外, DC表型和功能明显异常, CD11c标志性表面抗原下调, DC减少, 混合淋巴细胞反应明显减弱, 骨髓DC分化异常. 相比之下胰岛素sc明显降

低STZ所致的高血糖的同时, 也观察到DC表面抗原MHC-II和共刺激分子CD86表达下降, DC刺激脾T淋巴细胞增殖能力减弱, 但DC表面抗原CD11c与正常小鼠接近, DC数量维持正常, 因此胰岛素sc后所产生的免疫保护作用可能与诱导耐受性DC形成, 减弱对T细胞增殖和分泌Th1型细胞因子的作用有关^[25]. 我们还发现, 糖尿病模型小鼠脾脏CD4⁺CD25⁺ T细胞较正常小鼠低, 小鼠皮下注射胰岛素后, 脾脏CD4⁺CD25⁺ T细胞显著升高, 明显高于正常小鼠. 因CD4⁺CD25⁺ T细胞与控制自身免疫病发展的Th2细胞偏离有关^[26-28]. 尽管耐受性DC和调节性T细胞均有免疫保护作用, 但无论是抗原特异性耐受还是针对T细胞的抗体防御措施均涉及调节性T细胞的活化和功能的发挥^[29]. 因此推测胰岛素sc后诱导DC耐受, 外周不成熟的DC摄取抗原成分, 进入次级淋巴结, 刺激T细胞的前体分化为CD4⁺CD25⁺ T调节细胞, 后者一方面抑制抗原特异性T细胞增殖, 另一方面通过负反馈下调DC表面MHC分子和共刺激分子^[30], 结果抑制DC与T细胞的相互作用, 导致生成更多的调节性T细胞, 诱导并维持免疫耐受, 防止由胰岛局部炎症所致的β细胞破坏, 从而发挥抗IDDM作用.

总之, 自身抗原胰岛素皮下注射可在STZ所致IDDM小鼠体内诱导免疫耐受的形, 其机制与诱导耐受性DC产生, 促进CD4⁺CD25⁺调节性T细胞分化, 抑制T淋巴细胞低免疫应答有关. 自身抗原诱导免疫耐受中树突状细胞与调节性T细胞相互作用的方式以及耐受性树突状细胞和调节性T细胞的作用机制还有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest* 2005; 115: 5-12
- 2 Bercovici N, Delon J, Cambouris C, Escriou N, Debre P, Liblau RS. Chronic intravenous injections

■名词解释

树突状细胞(dendritic cell): 已知机体内最重要的专职抗原提呈细胞(APC), 在体内数量较少, 是机体免疫应答的主要启动者, 同时在自身免疫耐受的维持中也发挥重要的作用.

免疫耐受(immune tolerance): 指在一定条件下, 机体免疫系统接触某种抗原后所产生的对该抗原的特异性弱应答或无应答状态.

- of antigen induce and maintain tolerance in T cell receptor-transgenic mice. *Eur J Immunol* 1999; 29: 345-354
- 3 Ploix C, Bergerot I, Fabien N, Perche S, Moulin V, Thivolet C. Protection against autoimmune diabetes with oral insulin is associated with the presence of IL-4 type 2 T-cells in the pancreas and pancreatic lymph nodes. *Diabetes* 1998; 47: 39-44
 - 4 Maron R, Guerau-de-Arellano M, Zhang X, Weiner HL. Oral administration of insulin to neonates suppresses spontaneous and cyclophosphamide induced diabetes in the NOD mouse. *J Autoimmun* 2001; 16: 21-28
 - 5 Hartmann B, Bellmann K, Ghiea I, Kleemann R, Kolb H. Oral insulin for diabetes prevention in NOD mice: potentiation by enhancing Th2 cytokine expression in the gut through bacterial adjuvant. *Diabetologia* 1997; 40: 902-909
 - 6 Akbar AN, Taams LS, Salmon M, Vukmanovic-Stejic M. The peripheral generation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Immunology* 2003; 109: 319-325
 - 7 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18-32
 - 8 Hackstein H, Morelli AE, Thomson AW. Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol* 2001; 22: 437-442
 - 9 韩根成. 免疫耐受的形成、维持及诱导. 国外医学免疫学分册 2005; 28: 4-7
 - 10 Ridgway WM. The non obese diabetic (NOD) mouse: a unique model for understanding the interaction between genetics and T cell responses. *Rev Endocr Metab Disord* 2003; 4: 263-269
 - 11 顾春瑜, 郑磊, 王前. 树突状细胞治疗自身免疫性疾病的机制及应用研究进展. 现代免疫学 2005; 25: 253-255
 - 12 Todd JA, Wicker LS. Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity* 2001; 15: 387-395
 - 13 Skarsvik S, Tiittanen M, Lindstrom A, Casas R, Ludvigsson J, Vaarala O. Poor *in vitro* maturation and pro-inflammatory cytokine response of dendritic cells in children at genetic risk of type 1 diabetes. *Scand J Immunol* 2004; 60: 647-652
 - 14 Lee M, Kim AY, Kang Y. Defects in the differentiation and function of bone marrow-derived dendritic cells in non-obese diabetic mice. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 217-223
 - 15 Strid J, Lopes L, Marcinkiewicz J, Petrovska L, Nowak B, Chain BM, Lund T. A defect in bone marrow derived dendritic cell maturation in the nonobesediabetic mouse. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 375-381
 - 16 Mensah-Brown EP, Stosic Grujicic S, Maksimovic D, Jasima A, Shahin A, Lukic ML. Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes. *Mol Immunol* 2002; 38: 941-946
 - 17 Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445-449
 - 18 Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193: F5-F9
 - 19 Adorini L, Penna G, Giaratana N, Uskokovic M. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem* 2003; 88: 227-233
 - 20 Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 2001; 22: 394-400
 - 21 Adorini L. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987: 258-261
 - 22 Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren N. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulinitis characterized by diminished intraslet interferon-gamma transcription. *J Clin Invest* 1995; 95: 628-634
 - 23 Alleva DG, Gaur A, Jin L, Wegmann D, Gottlieb PA, Pahuja A, Johnson EB, Motheral T, Putnam A, Crowe PD, Ling N, Boehme SA, Conlon PJ. Immunological characterization and therapeutic activity of an altered-peptide ligand, NBI-6024, based on the immunodominant type 1 diabetes autoantigen insulin B-chain (9-23) peptide. *Diabetes* 2002; 51: 2126-2134
 - 24 Leng Q, Bentwich Z. Beyond self and nonself: fuzzy recognition of the immune system. *Scand J Immunol* 2002; 56: 224-232
 - 25 Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. *Immunity* 2003; 18: 605-617
 - 26 Pontoux C, Banz A, Papiernik M. Natural CD4 CD25(+) regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol* 2002; 14: 233-239
 - 27 Piccirillo CA, Shevach EM. Naturally-occurring CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: central players in the area of peripheral tolerance. *Semin Immunol* 2004; 16: 81-88
 - 28 Jaffar Z, Sivakuru T, Roberts K. CD4⁺CD25⁺ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J Immunol* 2004; 172: 3842-3849
 - 29 刘丹, 于春雷. CD4⁺ CD25⁺调节性T细胞与自身免疫耐受. 国外医学免疫学分册 2005; 28: 44-48
 - 30 Morelli AE, Hackstein H, Thomson AW. Potential of tolerogenic dendritic cells for transplantation. *Semin Immunol* 2001; 13: 323-335

电编 张敏 编辑 潘伯荣

肝包虫周围纤维囊壁中骨桥蛋白免疫印记与组化分析

李建辉, 彭心宇, 唐娟, 吴向未, 张示杰, 牛建华, 孙红, 牛少雄, 吕游

李建辉, 彭心宇, 吴向未, 张示杰, 牛建华, 孙红, 牛少雄, 吕游, 石河子大学医学院第一附属医院普外一科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

唐娟, 新疆石河子大学医学院组胚教研室 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

李建辉, 男, 1980-06-21生, 山西太原人, 汉族, 石河子大学医学院附属第一医院普外一科在读硕士研究生, 主要从事肝脏外科研究。

国家自然科学基金攻关项目, No. 30260108

教育部科学技术研究重点项目, No. 03162

通讯作者: 彭心宇, 832008, 新疆维吾尔自治区, 石河子大学医学院附属第一医院普外一科. pengxinyu2000@sina.com.cn

电话: 0993-2858842 传真: 0993-2858842

收稿日期: 2005-12-23 接受日期: 2006-01-14

Analysis of osteopontin in pericystic layer of hepatic hydatid cyst by Western blotting and immunohistochemical technique

Jian-Hui Li, Xin-Yu Peng, Juan Tang, Xiang-Wei Wu, Shi-Jie Zhang, Jian-Hua Niu, Hong Sun, Shao-Xiong Niu, You Lv

Jian-Hui Li, Xin-Yu Peng, Xiang-Wei Wu, Shi-Jie Zhang, Jian-Hua Niu, Hong Sun, Shao-Xiong Niu, You Lv, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Juan Tang, Department of histology, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30260108

Correspondence to: the First Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. pengxinyu2000@sina.com.cn

Received: 2005-12-23 Accepted: 2006-01-14

Abstract

AIM: To investigate the expression and distribution of osteopontin (OPN) in hepatic hydatid cyst and its significances.

METHODS: Proteins extracted from 60 surgically excised hydatid cyst tissues were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis followed by Western blotting, using polyclonal antibodies directed against OPN; the distribution of OPN

was also observed by immunohistochemical techniques.

RESULTS: OPN expression was detected in 48(80%) cases of cysts by Western blotting. OPN was mainly distributed in the side of pericystic layer near the parasite, which was significantly higher than that distributed near the liver (75% vs 8.3%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: OPN plays a regulated role in the granuloma reaction of the pericystic layer of hepatic hydatid cyst.

Key Words: Liver; Echinococcus; Osteopontin; Western blotting

Li JH, Peng XY, Tang J, Wu XW, Zhang SJ, Niu JH, Sun H, Niu SX, Lv Y. Analysis of osteopontin in pericystic layer of hepatic hydatid cyst by Western blotting and immunohistochemical technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):693-696

摘要

目的: 研究肝细粒棘球蚴(肝包虫)周围纤维囊壁中骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达定位。

方法: 采用免疫印记法检测OPN在肝细粒棘球蚴($n = 48$)周围纤维囊壁中的表达, 并结合免疫组化方法观察其组织学分布。

结果: 肝细粒棘球蚴周围纤维囊壁经免疫印记分析80%有OPN表达, 形态学观察集中分布于近虫体侧纤维性囊壁(内层), 与近肝侧纤维性囊壁(外层)比较有显著差异(75% vs 8.3%, $P < 0.05$)。

结论: OPN参与肝细粒棘球蚴周围内层纤维性囊壁肉芽肿反应的调节。

关键词: 肝; 细粒棘球蚴; 骨桥蛋白; 免疫印记

李建辉, 彭心宇, 唐娟, 吴向未, 张示杰, 牛建华, 孙红, 牛少雄, 吕游. 肝包虫周围纤维囊壁中骨桥蛋白免疫印记与组化分析. *世界华人消化杂志* 2006;14(7):693-696

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/693.asp>

■背景资料

肝细粒棘球蚴病是一种在我国西北部牧区广泛流行的人畜共患寄生虫病。由于目前尚无特效药物, 外科治疗仍为首选。彭心宇在外科实践中发现肝包虫周围纤维性囊壁的病理组织结构与传统理论不符, 外囊可分为内层和外层, 两层之间有可分离间隙存在, 沿此间隙可完整摘除包虫-“肝包虫外膜内完整摘除术”。我们对肝包虫周围纤维性囊壁形成机制的阶段实验结果表明: 肝包虫周围纤维性囊壁分层, 且形成机制不同, 近肝侧外层纤维性囊壁主要以受挤压和纤维化的Glisson系统和肝静脉系统为主; 并观察到内层纤维性囊壁以肉芽肿反应为主。

■研发前沿

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一个磷酸化的钙结合蛋白。最初发现OPN与骨病理生理、一些肿瘤及心血管疾病发生、发展相关,近来一些学者研究发现OPN参与结核病、矽肺、血吸虫卵肉芽肿病灶的形成过程,研究表明在肉芽肿病理方面OPN可能调节巨噬细胞聚集,而参与正常的肉芽肿形成。

0 引言

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一个磷酸化的钙结合蛋白,为骨的有机基质^[1-2]。最初发现OPN与骨病理生理、一些肿瘤及心血管疾病的发生、发展相关,近来一些学者研究发现OPN参与结核病、矽肺、血吸虫卵肉芽肿病灶的形成过程^[3-11]。前期研究初步证实肝包虫纤维囊壁分层且形成机制不同:近肝侧外层纤维囊壁为受挤压的Glisson系统和肝静脉系统纤维化所致,并初步认为近虫体侧内层纤维囊壁为肉芽肿反应的产物,这一研究结果为“肝包虫外膜内完整摘除术”提供了初步的理论基础^[12-17]。我们采用免疫印记和免疫组化方法检测OPN在肝包虫周围纤维囊壁中的表达和分布,旨在进一步探讨肝包虫周围纤维囊壁的形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料 电泳仪,垂直电泳槽以及电泳转移槽(Bio-Rad公司),低温高速离心机(Backman公司),脱脂奶粉(伊犁牌产品),三氨基甲烷(Tris),丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(分析纯)、 β 2巯基乙醇、十二烷基硫酸钠(SDS)、低分子量标准蛋白和硝酸纤维素膜,二巯苏糖醇(DTT)、苯甲基磺酰氟化物(PMSF)、B-巯基乙醇, Tween 20(上海生物工程有限公司);兔抗人OPN多克隆抗体(效价为1:200,美国NeoMarkers公司,福州迈新生物技术有限公司提供);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(北京中杉生物有限公司),二氨基联苯胺(DAB)(美国Sigma公司),EnVision免疫组化试剂盒(Dako,美国)。我院2002/2005行肝包虫外膜内完整摘除术的肝包虫病患者60(男36,女24)例,年龄5-82岁。

标本来源及取材:收集新鲜手术切除肝包虫囊肿60例,实验标本均从囊壁多部位取材,并包括肝包虫周围纤维囊壁及其邻近肝实质组织。标本用40 g/L福尔马林固定,石蜡包埋,制成厚4-5 μ m连续切片,用于病理学检查。同时一部分新鲜标本取材后立即置于液氮,于-80℃冰箱保存,用于免疫印记分析。

1.2 方法

1.2.1 免疫印记分析 样品缓冲液含100 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 200 mL/L甘油, 2.5 g/L溴酚蓝, 200 mmol/L DTT。取手术切除肝包虫周围纤维囊壁及周围正常肝组织分别称质量,用冰生理盐水冲洗干净,盛放在一干净培养皿中。用经酒精消毒过的剪刀将组织块剪碎,转移至组织研

磨器中。向研磨器中加入5倍组织块体积的生理盐水和苯甲基磺酰胺(PMSF)溶液,将组织块研磨,制成匀浆,12 000 r/min离心10 min,取上清为待检蛋白样品,-20℃保存。沸水浴加热上清液,使样品变性,经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶浓度150 g/L,分离胶浓度100 g/L,上样量每孔分别按20 μ L)。电泳完毕,小心剥下凝胶,将凝胶在中央位置切为左右两半,一半用于考马斯亮蓝染色,脱色后拍照分析;另一半用于下步实验。将切好的另一半凝胶转膜至硝酸纤维素膜(NC膜)上,NC膜经丽春红染色,用防水性印度墨汁标出标准分子质量位置,50 g/L脱脂奶粉PBS溶液4℃封闭2 h,兔抗人OPN多克隆抗体(1:500)4℃缓摇孵育过夜,PBS洗膜3次,每次15 min,羊抗兔IgG-HRP(1:1 000)室温缓摇2 h,PBS溶液清洗3次,每次10 min,加入DAB显色清晰后用EDTA缓冲液终止反应,PBS和水冲洗薄膜后拍照分析,室温下将膜晾干永久保存^[18]。

1.2.2 免疫组织化学定位 采用免疫组织化学二抗-酶标多聚体(EnVision)二步法。兔抗人骨桥蛋白(1:100),每批染色以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性空白对照。结果判断:细胞质、膜、间质出现棕黄色颗粒为OPN表达阳性;根据显色深浅划分为4级,呈棕褐色或棕黄色反应分别为强阳性(+++)或阳性(++),呈浅黄色反应为弱阳性(+),无着色为阴性(-)^[15-17]。

统计学处理 统计学处理采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 免疫印记结果 蛋白质电泳(SDS-PAGE)后,考马斯亮蓝染色,呈现清晰显色条带,这些条带与转移到NC膜上的丽春红染色带相对应,说明转移电泳成功(图1)。经抗人OPN多克隆抗体,免疫印记结果显示48例(80%)内层纤维囊壁出现分子量约50.5 ku的特异性条带(图2,结合电泳图经Quantity One软件初步确定分子质量),相邻正常肝组织及近肝侧外层纤维囊壁未见该蛋白明确表达。

2.2 免疫组织化学染色结果 OPN表达 45例(75%)囊壁中观察到不同程度的OPN表达,OPN表达呈棕黄色片状,集中分布于近虫体侧纤维性囊壁(内层),近肝侧纤维性囊壁(外层)表达甚少,二者比较有显著差异($P<0.05$),内外层交界处浸润细胞胞质亦有散在表达,肝细胞未见明确表达(图3)。

■创新盘点

在我们前期研究的基础上,本研究进一步证实肝包虫周围纤维性囊壁可分为内外两层,且形成机制不同,内层为肉芽肿反应的结果,为临床开展“肝包虫外膜内完整摘除术”提供新的理论依据。

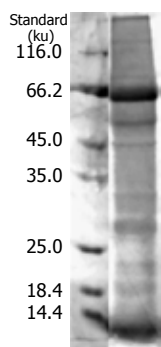


图 1 肝包虫肝周围纤维囊壁组织SDS-PAGE凝胶电泳.

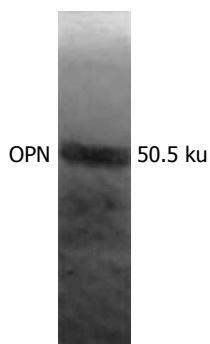


图 2 肝包虫周围纤维囊壁中OPN的Western blot测定.

表 1 骨桥蛋白在肝包虫周围纤维囊壁中的免疫组织化学定位

囊壁	n	骨桥蛋白				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
内层	60	15	10	18	17	75 ^b
外层	60	55	0	0	0	8.3

^b $P < 0.01$ vs 外层.

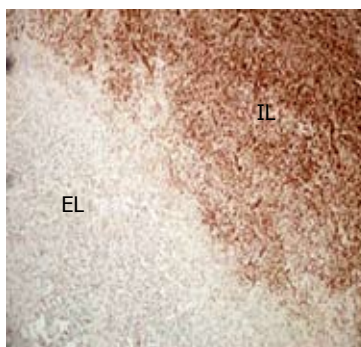


图 3 肝包虫周围纤维囊壁OPN表达, 集中分布于内层纤维囊壁 (+++), 而近肝侧外层未见明确表达(-), SP × 200.

3 讨论

彭心宇在外科实践中发现肝包虫周围纤维性囊壁可分为内层和外层, 两层之间有可分离间隙存在, 沿此间隙可完整摘除包虫-“肝包虫外膜内完整摘除术”^[12-14]. 该术式在达到根治目的同时, 极大减少了手术并发症, 明显优于其他根治性术式^[19-20]. 基于这一发现, 我们对肝包虫周围纤维性囊壁形成机制的阶段性的实验结果表明: 肝包虫周围纤维性囊壁分层, 且形成机制不同, 近肝侧外层纤维性囊壁主要以受挤压和纤维化的Glisson系统和肝静脉系统为主; 并观察到内层纤维性囊壁为肉芽肿反应为主^[15-17]. 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一个磷酸化的钙结合蛋白^[1-2]. 最初发现OPN与骨病理生理、一些肿瘤及心血管疾病发生、发展相关, 近来一些学者研究发现OPN可能通过调节巨噬细胞聚集, 参与结核病、矽肺、血吸虫卵肉芽肿病灶的形成过程^[3-11]. 因电泳条件及蛋白表达翻译后修饰等因素, 文献报道OPN分子质量为45-75 ku^[21-22].

本实验用免疫印记的方法检测到80%肝细粒棘球蚴周围纤维囊壁有OPN表达, 其分子量约为50.5 ku; 免疫组化染色观察OPN集中分布于近虫体侧纤维性囊壁(内层), 与近肝侧纤维性囊壁(外层)比较有显著差异($P < 0.05$). 其中3例免疫组化观察阴性的囊壁, 经免疫印记可检测到OPN的表达, 分析可能与实验方法检测灵敏度

有关. OPN这种选择性分布的特点进一步证实肝包虫周围纤维性囊壁的分层, 且形成机制不同, 内层纤维性囊壁为肉芽肿反应的结果.

许多寄生虫感染都可引起宿主的肉芽肿反应, 但关于肉芽肿的定义与分类一直不十分明确. James^[23]对肉芽肿的定义解释为“肉芽肿是一种由于非降解产物引起机体持续性超敏反应, 主要由炎症细胞, 单核细胞聚集形成的局限性病灶. Warren^[24]根据肉芽肿的形成机制是否为免疫反应, 将肉芽肿分为免疫学的与非免疫学的二类. 沈一平^[25]在Warren分类的基础上分为免疫性肉芽肿, 非特异炎症性肉芽肿及原因不明(包括未研究)的肉芽肿三类. 结合本实验及前期研究^[15-17], 我们认为肝包虫内层纤维囊壁为特殊类型的肉芽肿反应的结果: 一方面作为宿主对致病因子的一种免疫应答, 该肉芽肿反应将虫体局限, 并能隔离和清除虫卵释放的抗原^[26]; 另一方面, 由于其内部虫体不断生长导致该肉芽肿组织随之受压、膨大并逐渐增厚, 最终形成一层纤维囊壁(内层), 在内层纤维囊壁膨胀性形成过程中, 囊周Glisson系统和肝静脉系统受挤压并不断纤维化, 形成另一层纤维囊壁(外层).

本实验有12例未检测到囊壁中OPN的表达, 在相同样本进行的其他实验中表明, 该12例囊壁均未观察到明显钙盐沉积, OPN表达阳性的样本均合并有不同程度的钙化, 提示作为一种

■应用要点

本研究首次检测到肝包虫周围纤维性囊壁中有骨桥蛋白(OPN)表达, 为阐明肝包虫周围纤维囊壁形成机制提供了依据和新的线索, 深入研究将有助于了解虫体宿主免疫作用机制, 对于开辟新的治疗途径具有潜在的理论意义和实用价值.

■名词解释

肝包虫病属于自然疫源性疾病, 人类作为中间宿主而受害. 绝大多数细粒棘球绦虫(犬绦虫)的幼虫, 少数由泡状棘球绦虫的幼虫入侵肝后致病, 以形成寄生虫性肝包囊为特征, 故又分别称作肝棘球蚴病或肝泡球蚴病. 我国主要流行于西北、内蒙、西藏等牧畜地区, 20-40岁的青壮年就诊率较高, 男女之比约为2:1. 该病已见于世界上许多国家, 成为日趋严重的全球性问题.

同行评价

本文为国家自然科学基金攻关项目的一部分, 学术价值较好, 有一定创新。

钙结合蛋白^[27], OPN亦参与囊壁钙化的调节; 其表达与内层纤维囊壁形成进程某一阶段有关(未发表数据)。目前对肝包虫肉芽肿的形成机制及免疫调控的研究较少。我们检测到OPN在囊壁中的表达, 虽然其生物学意义仍然需要进一步验证, 但为阐明肝包虫周围纤维囊壁形成机制提供了依据和新的线索。深入研究将有助于了解虫体宿主免疫作用机制, 并对于开辟新的治疗途径具有潜在的理论意义和实用价值。

致谢: 石河子大学医学院病理教研室, 李洪安, 蒋金芳两位研究员在本实验过程中给予的支持与帮助。

参考文献

- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8819-8823
- Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin-a molecule for all seasons. *QJM* 2002; 95: 3-13
- O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 373-390
- O'Regan AW, Hayden JM, Body S, Liaw L, Mulligan N, Goetschkes M, Berman JS. Abnormal pulmonary granuloma formation in osteopontin-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 2243-2247
- O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995; 92: 2163-2168
- Nau GJ, Guilfoile P, Chupp GL, Berman JS, Kim SJ, Kornfeld H, Young RA. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and sili-cosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6414-6419
- Nau GJ, Chupp GL, Emile JF, Jouanguy E, Berman JS, Casanova JL, Young RA. Osteopontin expression correlates with clinical outcome in patients with mycobacterial infection. *Am J Pathol* 2000; 157: 37-42
- Diaz A, Willis AC, Sim RB. Expression of the proteinase specialized in bone resorption, cathepsin K, in granulomatous inflammation. *Mol Med* 2000; 6: 648-659
- Harada K, Ozaki S, Sudo Y, Tsuneyama K, Ohta H, Nakanuma Y. Osteopontin is involved in the formation of epithelioid granuloma and bile duct injury in primary biliary cirrhosis. *Pathol Int* 2003; 53: 8-17
- Tanaka K, Morimoto J, Kon S, Kimura C, Inobe M, Diao H, Hirschfeld G, Weiss JM, Uede T. Effect of osteopontin alleles on beta-glucan-induced granuloma formation in the mouse liver. *Am J Pathol* 2004; 164: 567-575
- Morimoto J, Inobe M, Kimura C, Kon S, Diao H, Aoki M, Miyazaki T, Denhardt DT, Rittling S, Uede T. Osteopontin affects the persistence of beta-glucan-induced hepatic granuloma formation and tissue injury through two distinct mechanisms. *Int Immunol* 2004; 16: 477-488
- 彭心宇, 张示杰, 牛建华, 吴向未, 潘惠忠, 莫拉提, 陈裕, 杨宏强. 肝包虫外膜内完整摘除术. *中华普通外科杂志* 2002; 17: 529-530
- 彭心宇, 吴向未, 张示杰, 牛建华. 肝包虫囊肿周围纤维囊壁病理结构的再认识. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 276-279
- 彭心宇. 肝包虫病的外科治疗新观点. *中国实用外科杂志* 2003; 23: 651-653
- 陈雪玲, 吴向未, 彭心宇, 张示杰, 牛建华, 孙红. PDGF、TNF- α 在人肝细粒棘球蚴囊壁周围组织的分层表达. *现代免疫学杂志* 2004; 24: 207-209
- Wu XW, Peng XY, Zhang SJ, Niu JH, Sun H, Xi Y. Formation mechanisms of the fibrous capsule around hepatic and splenic hydatid cyst. *Zhongguo Jishengchongxue Yu Jishengchongbing Zazhi* 2004; 22: 1-4
- 吴向未, 陈雪玲, 彭心宇, 张示杰, 牛建华, 孙红. TGF- β 1、TNF- α mRNA在肝包虫囊肿周围人体纤维囊壁中的特异性分层表达. *中国地方病学杂志* 2004; 23: 311-313
- 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 第1版, 北京: 科学技术出版社, 2000
- Buttenschoen K, Carli Buttenschoen D. Echinococcus granulosus infection: the challenge of surgical treatment. *Langenbecks. Arch Surg* 2003; 388: 218-230
- Cirenei A, Bertoldi I. Evolution of surgery for liver hydatidosis from 1950 to today: analysis of a personal experience. *World J Surg* 2001; 25: 87-92
- Rittling SR, Feng F. Detection of mouse osteopontin by western blotting. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 287-292
- Johnson GA, Burghardt RC, Joyce MM, Spencer TE, Bazer FW, Gray CA, Pfarrer C. Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45-kDa cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. *Biol Reprod* 2003; 69: 92-98
- James DG. A clinicopathological classification of granulomatous disorders. *Postgrad Med J* 2000; 76: 457-465
- Warren KS. The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis: *in vivo* models. *Immunol Rev* 1982; 61: 189-213
- 沈一平. 寄生虫与临床. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 156-175
- Vuitton DA. The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? *Acta Trop* 2003; 85: 119-132
- Makiishi-Shimobayashi C, Tsujimura T, Iwasaki T, Kakihana M, Shimano K, Terada N, Sakagami M. Localization of osteopontin at calcification sites of cholesteatoma: possible role as a regulator of deposition of calcium phosphate in the middle ear. *Auris Nasus Larynx* 2004; 31: 3-9

电编 李琪 编辑 潘伯荣

黏附分子cadherin与肝癌生物学特性的关系

张志发, 严群, 黄志勇

张志发, 严群, 黄志勇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科中心 湖北省武汉市 430030

国家自然科学基金资助课题, No.30471694

通讯作者: 黄志勇, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科中心.

zyhuang@medmail.com.cn

电话: 027-83663871 传真: 027-83663400

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-13

摘要

肝癌是恶性程度极高的肿瘤, 目前对其发生、发展的分子机制尚不清楚. 黏附分子cadherin分子超家族参与机体内许多生物过程, 包括调节钙介导的细胞黏附、细胞极性及其形态形成, 细胞的聚集和迁移, 细胞的识别和信号传导机制. 近年来研究发现cadherin分子与肝癌的恶性生物学特征如肿瘤恶性增殖、侵袭及转移特征有密切相关性. 如经典的E-cadherin的表达下调与肝癌细胞的高侵袭表型、癌细胞扩散密切相关. 非经典的cadherin分子T-cadherin已发现具有抑制乳腺癌和胶质母细胞瘤增殖及转移的特征, 肝癌中T-cadherin表达缺失可能提示与肝癌的恶性生物学特征的相关性. cadherin分子与肝癌的生物学特征的关系的研究进展, 可为肝癌的治疗提供新的研究思路.

关键词: cadherin; 肝癌

张志发, 严群, 黄志勇. 黏附分子cadherin与肝癌生物学特性的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(7):697-701

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/697.asp>

0 引言

肝癌是一种高度恶性的肿瘤, 具有进展快、侵袭性强、转移早等特点, 其死亡率高居我国肿瘤死亡率的第二位. 近年来, 对细胞黏附分子cadherin这一大类介导细胞间黏附作用的跨膜蛋白已有诸多研究, 发现他不仅参与介导正常细胞间的黏附, 而且还参与细胞间的信号传导机制来调节正常细胞生长的接触性抑制^[1-2]. 研究还发现cadherin分子家族成员与肝癌的增殖及转移等恶性生物学特征有密切的关系, 深入研究cadherin分子与肝癌的恶性生物学特征, 如恶性分化、远处转移和复发的关系及其调控机制,

可为肝癌的治疗提供新的研究思路.

1 cadherin的分类和主要功能

cadherin分子超家族据其结构的不同分为经典cadherin分子和非经典cadherin分子两大类.

经典的cadherin超家族均为跨膜糖蛋白, 由细胞外区, 跨膜区和细胞内区三部分组成, 他们位于细胞结合位点上而介导特定组织或器官的同质细胞间的黏附, 其黏合的稳定性主要是由黏附分子胞内区的连环素蛋白和细胞骨架蛋白来维系. 根据分布部位的不同, 经典的cadherin分子主要有三大类: (1)上皮型钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin): 主要存在于人和动物的上皮细胞, 是维护上皮细胞形态和结构的完整性和极性的主要分子. (2)神经型钙黏蛋白(neural cadherin, N-cadherin): 存在于肌肉和神经细胞. (3)胎盘型钙黏蛋白(placental cadherin, P-cadherin): 最初发现于鼠胎盘中, 后发现同时存在于人类极少数上皮细胞中. 在经典cadherin中, 对E-cadherin和N-cadherin的研究比较深入. 其蛋白链的羧基端和氨基端分别位于细胞的胞内和胞外, 虽然其胞外部分包含保守的钙结合域, 但却表现出不同的结构组合. 胞外区由5个重复串联的结构单元组成(EC1-EC5), 每个结构单元大约由110个氨基酸构成, EC1羧基端的第一个重复序列中包含His-Ala-VaL基序的结构域, 决定了E-cadherin嗜同性结合的特异性^[3]. 研究显示: 因其胞外独特的结构, E-cadherin和N-cadherin两者中任何一种表达在细胞表面均可导致细胞的聚集和同质性的黏附. 经典cadherin分子胞内部分首先与 β -连环素直接相连, 而后通过 β -连环素的中介作用同 α -连环素接触^[4-5], 从而激活肌丝蛋白网络系统中 β -连环素, 作为WNT(wingless/int)信号传导途径正向调节的重要效应物^[6]. 近年来, 人们主要从结构和功能两方面来研究经典cadherin的分子机制. 最初cadherin超家族仅被认为是细胞黏附分子, 后来人们发现cadherin参与机体内许多生物加工过程, 包括调节钙介导的细胞黏附、细胞极性

■同行评价

本文对cadherin分子超家族与肝癌生物学特征关系的最新研究进展进行了较为全面的总结, 突出强调cadherin分子缺失与肝癌生物学特征进展的密切关系, 并进一步对研究T-cadherin分子与肝癌的恶性生物学特征的关系的意义进行了较为深入的阐述, 为肝癌的治疗提供了新的研究思路.

及形态形成,细胞的聚集和迁移,细胞的识别和信号传导机制,甚至于许多病理过程如恶性肿瘤的演进等都有一定的相关性^[7-9]。恶性肿瘤从原发灶向远处组织器官转移是一个涉及多个步骤的过程。原发恶性肿瘤转移发生的首要条件就是肿瘤细胞能从原发灶脱落,而这一生物学特性和cadherin的功能有密切关系。肿瘤细胞之间通过cadherin的作用而发生黏附,不易脱落。但是当cadherin表达下降时,就会使肿瘤细胞间的黏附减弱,从而易引起肿瘤的转移。如经典的cadherin: E-、N-cadherin分子,他们的缺失或突变引起的表达下调在多种肿瘤如肝癌、胃癌、大肠癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤细胞十分的常见,其表达水平的降低与肿瘤细胞的浸润转移能力呈明显的相关性^[10-11]。

非经典黏附分子主要是指T-cadherin,他因为缺失经典cadherin分子所具有的跨膜区而经糖基磷脂酰肌醇分子附着于细胞膜上^[7],故而命名truncated-cadherin(即T-cadherin,又称CDH13或H-cadherin)。T-cadherin首先在鸡的神经系统中被发现的,后来证明他也存在于灵长类动物体多种组织中,甚至于在骨骼肌、心肌、肾和主动脉组织也有表达。因此,T-cadherin被认为是各种正常的末期分化细胞上的标志性蛋白,在维持正常细胞的表型方面就有一定的调节功能。T-cadherin的氨基端没有His-Ala-Val序列,但由五个重复体组成的胞外区的结构同经典的cadherin结构非常相似。T-cadherin除没有跨膜区外,也缺乏胞内区,但研究发现T-cadherin仍能调节同种悬浮细胞的黏附^[12]。所以T-cadherin与大多数通过跨膜区和胞内区发挥黏附作用的经典cadherin所介导的细胞黏附机制明显不同^[13]。早期Koller *et al*^[9]研究认为T-cadherin和E-cadherin在极化的细胞中的功能就有差别,T-cadherin更应该被看作在细胞的黏附过程中发挥识别信号的作用,而不应仅仅是黏附作用。这一点在后来Philippova *et al*^[14]研究中得到了验证。T-cadherin是完整的分布在整个细胞上,而经典cadherin则均匀分布于细胞间接触的部位,因此他们认为T-cadherin具有介导细胞迁移的能力,准确的说他应该是作为调节细胞间识别的受体,即让细胞感受到周围环境改变的感受器。另外,T-cadherin另一个不常见的特性是他能在细胞表面同时表达组成他的两种蛋白质形式,即一种成熟蛋白质分子和另一种包含功能尚不清楚的前体分子^[12]。近年来,T-cadherin分子与恶性肿瘤

的生物学特征的关系已开始引起人们的重视,研究发现,在肝癌、乳腺癌、肺癌、结直肠癌、卵巢癌及皮肤鳞状细胞癌等多种肿瘤中观察到T-cadherin缺失^[15-21],将T-cadherin转染肿瘤细胞可抑制瘤细胞的增殖^[22],表明T-cadherin可能还在调节肿瘤的恶性生物学特征方面发挥重要作用。

2 经典的cadherin与肝癌的生物学特性

E-cadherin介导细胞与细胞之间的黏附,维持细胞结构和形态的稳定;其表达下降可影响细胞间的黏附,使细胞容易分离。对经典cadherin分子与肝癌的恶性生物学特征的相互关系,人们进行了深入的研究。研究表明,E-cadherin在肝癌中的表达同他在其他肿瘤如大肠癌、乳腺癌等的表达相似,均呈低度表达。因此,人们推测E-cadherin的表达下调使肝癌细胞出现高侵袭表型,同种细胞间的黏附减弱或丧失,促进了癌细胞扩散。Saeki *et al*^[23]在体外用生长因子刺激具有高、低不同侵袭力的肝癌细胞亚株G5、G1后,发现E-cadherin在高侵袭力G5细胞株中表达下降,而在低侵袭力的G1细胞株的表达无明显变化。表明肝癌细胞中E-cadherin的表达与肝癌的侵袭力呈负向相关,揭示了E-cadherin对肝癌肿瘤侵袭能力影响的重要性。Nam *et al*^[24]从E-cadherin信号传导途径着手,发现在某些需要Src族激酶激活的肿瘤分子中,Src族激酶的抑制因子pp2不仅能恢复E-cadherin/catenin的表达,而且也能上调由E-cadherin调节的钙离子依赖性的细胞间的黏附作用,这种改变有助于减少肝肿瘤转移的机率。在转基因鼠肝癌模型的研究中,已证实了E-cadherin的下降调节可能参与肝癌侵袭转移^[25]。另外,E-cadherin的表达与肝癌的分化程度和术后复发也有密切关系。Shimoyama *et al*^[26]对64例原发性肝癌中E-cadherin的表达进行研究,将其按病理学特征分为四期,发现I-III期的癌组织都表达E-cadherin,而在IV期未分化癌中则缺失表达。表明E-cadherin表达的高低与肝癌的分化程度呈负相关。Inayoshi *et al*^[27]将36例直径小于6 cm的原发性肝癌根据结节的数量分为三类:I为单结节生长,II为不多于两个结节,III为多结节。发现E-cadherin的表达率在II类和III类中表达缺失或是下降,但在E-cadherin的表达率高于II类和III类患者的I类患者术后复发率较II类和III类患者复发率明显降低。这些研究结果均表明了E-cadherin表达缺失与肝癌的转移、复发及恶性分化程度之间具有密切的关系。

尽管目前对E-cadherin在肝癌中表达缺失的分子机制尚不十分清楚, 研究已表明E-cadherin基因启动子甲基化、转录水平的下调和基因突变可能是导致E-cadherin在肝癌中表达缺失的主要机制. 目前研究的较为深入的是关于E-cadherin基因启动子甲基化和基因突变的机制. 针对E-cadherin在肝癌中低表达这一现象, Kwon *et al*^[28]对E-cadherin基因启动子附近的CpG岛甲基化现象进行了研究, 发现在64例肝癌患者中有32例检测到CpG岛甲基化, 而CpG岛甲基化与E-cadherin的低表达存在显著的相关性. Huang *et al*^[29]认为E-cadherin的表达下调与肝癌的早期复发有一定的联系, 其表达下调的机制可能是发生在转录时或转录后. Slagle *et al*^[30]对中国人由于HBV病毒引起的肝癌进行研究时发现, 在64%的被检患者中E-cadherin的表达下降, 并进一步揭示E-cadherin的表达下降是由于E-cadherin基因上一个片段的缺失造成的.

间充质来源的细胞表达的N-cadherin与上皮组织细胞表达的E-cadherin结构相似, 均具有介导细胞黏附的功能. 研究者在较早前就已经发现在神经胚的发育过程中, 神经上皮细胞的钙黏蛋白从E-cadherin向N-cadherin转变^[31]. 最近, 在对脊索瘤^[32]、膀胱癌^[33]、胃癌、肺癌、乳腺癌^[34]的研究中发现: N-cadherin和E-cadherin的表达呈现负相关, 而E-cadherin表达的下降则明显增加了患者的死亡率, N-cadherin的高表达能延长患者的存活率. 虽然N-cadherin在肿瘤中的高表达具有普遍性, 但是在肝癌中是否也存在这种现象却有待研究. 早期对P-cadherin在肿瘤方面所进行的研究则仅仅是揭示这种蛋白的表达下降同肺癌^[35]和黑色素瘤^[36]的转移力具有相关性. 而最近Paredes *et al*^[37]研究发现P-cadherin的表达同肿瘤的侵袭能力密切相关, 是一个较好的临床诊断指标. 但P-cadherin表达与肝癌恶性生物学特征的关系目前尚未见研究报道.

3 T-cadherin与肝癌的生物学特性

人们认识T-cadherin的功能是在肿瘤细胞中发现的, 相对于正常的组织中T-cadherin的表达, 他在肿瘤中的表达是降低的. T-cadherin在人类癌细胞中表达减少, 可能暗示他在维持正常细胞表型方面同经典的cadherin都有着同样重要的作用. 在早期, 有研究者^[38]将一携带T-cadherin cDNA的表达型的质粒转染到T-cadherin阴性的NH-12成神经细胞瘤中, 发现表达T-cadherin的

神经瘤细胞失去了表皮生长因子引发的增殖反应. Lee *et al*^[39]研究发现在体外转染T-cadherin cDNA的肿瘤细胞的增殖和侵袭能力减弱, 而在裸鼠内^[38]接种表达T-cadherin肿瘤细胞也失去了对其生长因子的敏感性. T-cadherin作为肿瘤抑制因子的推测, 逐渐引起人们的注意. Huang *et al*^[22]近期的研究表明, 将T-cadherin基因导入缺失表达T-cadherin分子的大鼠胶质母细胞瘤C6细胞使其过度表达T-cadherin分子后, C6细胞的增殖及侵袭能力显著受抑, 证实T-cadherin在大鼠胶质母细胞瘤中的肿瘤抑制功能, 并进一步揭示其抑制机制是T-cadherin分子通过诱导p21^{CIP1/WAF1}表达致使肿瘤细胞于细胞周期G2期阻滞. 胶质母细胞瘤是恶性程度极高的肿瘤, T-cadherin对大鼠胶质母细胞瘤恶性生物学特征的抑制功能引起了人们对T-cadherin与肝癌的恶性生物学特征关系的研究兴趣. T-cadherin基因位于染色体16q24位上, 肝癌的发生与染色体16q24的缺失、突变密切相关^[40]. Riou *et al*^[15]对染色体16q24处的13个常常在肝癌中缺失表达的基因的转录进行研究发现: T-cadherin mRNA在HepG2, PLC/RPF/C, TONG和HA22TNGH四种肝癌细胞株中缺失表达, 但T-cadherin基因本身并未发生缺失突变. Yu *et al*^[41]进一步研究显示T-cadherin基因启动子在肝癌中存在甲基化, 且T-cadherin基因启动子甲基化与T-cadherin基因失活密切相关. 这些研究表明T-cadherin基因启动子甲基化是T-cadherin基因在肝癌中失活的主要机制. 但是目前对T-cadherin基因失活与肝癌恶性分化程度、肝内外转移及复发等恶性生物学特征的关系的研究并不太清楚, 仍是需要继续研究的方向. 总之, 经典cadherin分子中E、N-cadherin表达的缺失或下降与肝癌的低分化、高侵袭、远处转移和高复发率呈正相关, 是预示肿瘤进展及患者预后指标之一^[42], 而非经典的T-cadherin在肝癌中的缺失表达是否是导致肝癌恶性分化程度、肝内转移及复发等恶性生物学特征发生的因素之一, 也逐渐为人们所重视. 所以, 虽然对于cadherin与原发性肝癌恶性生物学特征关系及机制还不完全为人们所了解, 但是cadherin在肝细胞癌发生、发展过程中可能发挥着重要的作用已开始为人们所认识. cadherin在肝癌发生、发展的过程中或许只是导致正常肝组织发生病变的多基因改变中的一步, 但研究肝癌中cadherin的表达改变与恶性生物学特征关系, 则有益于人们在微观方面更好

的认识肝癌在分子水平上的复杂改变. 通过对 cadherin 在肝癌中的基因功能深入研究, 或许能为更有效的治疗这一恶性肿瘤提供新的思路和方法.

4 参考文献

- 1 Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991; 251: 1451-1455
- 2 Levenberg S, Yarden A, Kam Z, Geiger B. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene* 1999; 18: 869-876
- 3 Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry(Mosc)* 2001; 66: 1174-1186
- 4 Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4246-4250
- 5 Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and-bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8813-8817
- 6 Lim SC, Lee MS. Significance of E-cadherin/beta-catenin complex and cyclin D1 in breast cancer. *Oncol Rep* 2002; 9: 915-928
- 7 Angst BD, Marozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 2001; 114: 629-641
- 8 Kemler R. Classical cadherins. *Semin Cell Biol* 1992; 3: 149-155
- 9 Koller E, Ranscht B. Differential targeting of T- and N-cadherin in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 30061-30067
- 10 Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, Gemmill RM, Drabkin HA, Franklin WA. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2417-2428
- 11 Wei Y, Van Nhieu JT, Prigent S, Srivatanakul P, Tiollais P, Buendia MA. Altered expression of Ecadherin in hepatocellular carcinoma: correlations with genetic alterations, beta-catenin expression, and clinical features. *Hepatology* 2002; 36: 692-701
- 12 Vestal DJ, Ranscht B. Glycosyl phosphatidylinositol-anchored T-cadherin mediates calcium-dependent, homophilic cell adhesion. *J Cell Biol* 1992; 119: 451-461
- 13 Nagafuchi A, Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 1988; 7: 3679-3684
- 14 Philippova M, Ivanov D, Tkachuk V, Erne P, Resink TJ. Polarisation of T-cadherin to the leading edge of migrating vascular cells *in vitro*: a function in vascular cell motility? *Histochem Cell Biol* 2003; 120: 353-360
- 15 Riou P, Saffroy R, Comoy J, Gross-Goupil M, Thiery JP, Emile JF, Azoulay D, Piatier-Tonneau D, Lemoine A, Debuire B. Investigation in liver tissues and cell lines of the transcription of 13 genes mapping to the 16q24 region that are frequently deleted in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3178-3186
- 16 Sato M, Mori Y, Sakurada A, Fujimura S, Horii A. The H-cadherin(CDH13)gene is inactivated in human lung cancer. *Hum Genet* 1998; 103: 96-101
- 17 Lee SW. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat Med* 1996; 2: 776-782
- 18 Zhong Y, Delgado Y, Gomez J, Lee SW, Perez-Soler R. Loss of H-cadherin protein expression in human non-small cell lung cancer is associated with tumorigenicity. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1683-1687
- 19 Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Miyajima K, Makarla P, Sathyanarayana UG, Yin J, Sato F, Shivapurkar N, Meltzer SJ, Gazdar AF. Aberrant methylation of the CDH13(H-cadherin)promoter region in colorectal cancers and adenomas. *Cancer Res* 2002; 62: 3382-3386
- 20 Takeuchi T, Liang SB, Matsuyoshi N, Zhou S, Miyachi Y, Sonobe H, Ohtsuki Y. Loss of T-cadherin(CDH13, H-cadherin)expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 1023-1029
- 21 Kawakami M, Staub J, Cliby W, Hartmann L, Smith DI, Shridhar V. Involvement of H-cadherin(CDH13)on 16q in the region of frequent deletion in ovarian cancer. *Int J Oncol* 1999; 15: 715-720
- 22 Huang ZY, Wu Y, Hedrick N, Gutmann DH. T-cadherin-mediated cell growth regulation involves G2 phase arrest and requires p21(CIP1/WAF1)expression. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 566-578
- 23 Saeki Y, Hazeki K, Matsumoto M, Toyoshima K, Akedo H, Seya T. Correlation between metastatic potency and the down-regulation of E-cadherin in the mouse hepatoma cell lines G-1 and G-5. *Oncol Rep* 2000; 7: 731-735
- 24 Nam JS, Ino Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2430-2436
- 25 Calvisi DF, Ladu S, Conner EA, Factor VM, Thorgerirsson SS. Disregulation of E-cadherin in transgenic mouse models of liver cancer. *Lab Invest* 2004; 84: 1137-1147
- 26 Shimoyama Y, Hirohashi S. Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas: loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett* 1991; 57: 131-135
- 27 Inayoshi J, Ichida T, Sugitani S, Tsuboi Y, Genda T, Honma N, Asakura H. Gross appearance of hepatocellular carcinoma reflects E-cadherin expression and risk of early recurrence after surgical treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 673-677
- 28 Kwon GY, Yoo BC, Koh KC, Cho JW, Park WS, Park CK. Promoter methylation of E-cadherin in hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 242-247
- 29 Huang GT, Lee HS, Chen CH, Sheu JC, Chiou LL, Chen DS. Correlation of E-cadherin expression and recurrence of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1923-1927
- 30 Slagle BL, Zhou YZ, Birchmeier W, Scorsone KA. Deletion of the E-cadherin gene in hepatitis B virus-positive Chinese hepatocellular carcinomas.

- Hepatology* 1993; 18: 757-762
- 31 Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* 1997; 181: 64-78
- 32 Triana A, Sen C, Wolfe D, Hazan R. Cadherins and catenins in clival chordomas: correlation of expression with tumor aggressiveness. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1422-1434
- 33 Rieger-Christ KM, Lee P, Zagha R, Kosakowski M, Moinzadeh A, Stoffel J, Ben-Ze'ev A, Libertino JA, Summerhayes IC. Novel expression of N-cadherin elicits *in vitro* bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. *Oncogene* 2004; 23: 4745-4753
- 34 Ciolczyk-Wierzbicka D, Gil D, Hoja-Lukowicz D, Litynska A, Laidler P. Carbohydrate moieties of N-cadherin from human melanoma cell lines. *Acta Biochim Pol* 2002; 49: 991-998
- 35 Smythe WR, Williams JP, Wheelock MJ, Johnson KR, Kaiser LR, Albelda SM. Cadherin and catenin expression in normal human bronchial epithelium and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1999; 24: 157-168
- 36 Seline PC, Norris DA, Horikawa T, Fujita M, Middleton MH, Morelli JG. Expression of E and P-cadherin by melanoma cells decreases in progressive melanomas and following ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 1320-1324
- 37 Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jeronimo C, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5869-5877
- 38 Takeuchi T, Misaki A, Liang SB, Tachibana A, Hayashi N, Sonobe H, Ohtsuki Y. Expression of T-cadherin(CDH13, H-Cadherin)in human brain and its characteristics as a negative growth regulator of epidermal growth factor in neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2000; 74: 1489-1497
- 39 Lee SW, Reimer CL, Campbell DB, Cheresh P, Duda RB, Kocher O. H-cadherin expression inhibits *in vitro* invasiveness and tumor formation in vivo. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1157-1159
- 40 Marchio A, Meddeb M, Pineau P, Danglot G, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A. Recurrent chromosomal abnormalities in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18: 59-65
- 41 Yu J, Ni M, Xu J, Zhang H, Gao B, Gu J, Chen J, Zhang L, Wu M, Zhen S, Zhu J. Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *BMC Cancer* 2002; 2: 29
- 42 McNeill H, Ozawa M, Kemler R, Nelson WJ. Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 1990; 62: 309-316

电编 韩江燕 编辑 王瑾晖

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, 现将征文通知如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文(3000字), 结构式摘要(1000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: 10080; 电话: 0451-57752440; E-mail: 211zyke@163.com

原发性胆汁性肝硬化发病机制研究进展

赵 臣, 夏 薇, 李永哲

■背景资料

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种累及中小胆管的慢性肝病,病情反复发作,迁延不愈,患者以女性为主,且发病率逐年升高。PBC是一种自身免疫性疾病,他的发病机制目前尚未完全阐明,现在认为遗传易感性、免疫机制、感染因素及化学物质等方面因素参与了PBC的发病机制。了解PBC的发病机制对于采取合理的治疗方案,降低其发病率和死亡率意义重大。本文就遗传易感性、免疫机制、感染因素及化学物质等几方面对PBC发病机制的研究进行了综述,并对HLA II类抗原、非HLA遗传性基因、AMA、ANA及抗EPO抗体、感染因素以及化学物质与PBC发病机制的关系进展进行了重点介绍。

赵臣, 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
夏薇, 吉林省北华大学, 吉林医学院 吉林市 132000
国家自然科学基金资助项目, No. 30471617
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, yongzhelipumch@yahoo.com.cn
电话: 010-65295416 传真: 010-65295416
收稿日期: 2006-01-11 接受日期: 2006-02-08

摘要

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)的病因不清, 国内外学者从多个角度入手对其发病机制进行了深入研究并提出了多个假设, 取得了较大进展。PBC患者的家庭成员有较高的患病风险, 且其一级亲属多伴有其他自身免疫性疾病; PBC与HLA II型抗原关系较密切, 但欧美各国与中国研究结果存在差异, 说明PBC的遗传学与流行病学可能与地理分布有关; 非HLA遗传因素单核苷酸多态性(SNPs)在CTLA-4、IL、维生素D及细胞色素P450等方面的研究都取得了不同进展; PBC易感性还可能与X连锁基因相关; 近期利用重组丙酮酸脱氢酶复合体E2亚单位(PDC-E2)特异性二聚体IgA单克隆抗体(mAbs)杆状病毒表达系统对AMA进行的研究阐述了IgA在PBC患者胆管上皮细胞(BECs)损伤中的作用, 并提出了新的假设。对Sp 100的研究发现其对抗原始内皮细胞血管生成中的作用, 与PBC的发病存在一定关系。近来不断有新的物质被鉴定与PBC发病相关。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 自身免疫; 环境因素; 发病机制; 感染

赵臣, 夏薇, 李永哲. 原发性胆汁性肝硬化发病机制研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(7):702-708
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/702.asp>

0 引言

PBC是一种慢性胆汁淤积性肝病, 病因不清, 他导致进行性非化脓性中、小肝内胆管破坏, 最后肝硬化和衰竭, 女性患者多见, 发病高峰为50-60岁, 最高发病率为400例/百万人^[1-2]。目前

PBC被认为是一种典型的自身免疫性疾病, 具有高特异性的自身抗体, 他的发生和发展与环境因素及个体易感性密切相关, 下面我们从基因、免疫与环境等角度探讨PBC发病机制。

1 PBC的遗传易感性

1.1 家族聚集性PBC PBC患者的家庭成员有较高的患病风险, 在以往的研究中发现, PBC患者家庭内常有多个病例发生, 各国对此报道不一。Arbour *et al*^[3]报道, PBC患者家庭成员中21岁以上的一级亲属患病风险为4%, 但如果仅考虑妇女则为10%。而对冰岛PBC患者的相关研究中发现, 在85个一级亲属中只有一个受影响^[4]。研究发现, PBC患者亲属中, 轻度的特异性免疫失调普遍存在。Watt *et al*^[5]发现, 160个PBC患者中14%的一级亲属至少有一种自身免疫病, 其中, 系统性硬皮病是最常见的。Arbour *et al*^[3]的研究中PBC患者一级亲属有21%存在自身免疫性疾病, 其中关节炎占60%, 甲状腺病16%, SLE12%, 说明PBC和其他自身免疫性疾病有强烈的基因遗传倾向, 并且与其他常见环境因素结合在一起。而在Bittencourt *et al*^[6]的研究中, 26个患者5%的一级亲属中有自身免疫性疾病(如: 关节炎、SLE、甲状腺病等), 且母女和姐妹组合最常发生, 而经血清自身抗体检测, 大多数病例没有伴随自身免疫病临床症状。

1.2 MHC与PBC

1.2.1 HLA I类抗原 以往的研究认为人类白细胞抗原(HLA) I与PBC之间没有伴随关系, 但Invernizzi *et al*^[7]认为, 过去的研究由于时间和条件的限制, 在病例采集及实验方法上均存在一定缺陷, 他的小组研究了186个意大利PBC患者, 并用558名年龄、性别及地理分布相匹配的健康人做对照, 结果发现, 在PBC进展过程中HLA-DRB1*11显著减少, 没有发现HLA-DRB1*08伴随关系, B*15, B*41, B*55 和B*58等位基因在PBC中出现频繁。HLA多态性出现频率在进展及非进展期以及伴或不伴AMA的PBC患者中相似。因此他认为PBC与HLA I类基因存在联系。

1.2.2 HLA II类抗原 对HLA II类抗原等位基因在高加索人与亚洲人中与PBC伴随关系的研究很广泛。以往欧美各国的研究中, HLA-DR8(DRB1*08)在PBC患者中显著高于对照组; 数据表明DR8可能是高加索地区PBC发病的危险因素^[8]。英国Donaldson *et al*^[9]发现, 晚期患病组HLA DRB1*0801-DQA1*0401-DQB1*0402单体型基因显著升高, 但在早期患者中没有发现。证明HLA DRB1*0801-DQA1*0401-DQB1*0402伴随PBC的进展。Mullarkey *et al*^[8]证明, 少数PBC患者中存在1个DRB1*08-DQA1*0401-DQB1*0401单倍型伴随基因。而Invernizzi *et al*^[7]与Bittencourt *et al*^[10]在美国和巴西的研究却未证实这种伴随的存在。Liu *et al*^[11]对中国地区PBC患者的研究发现, DRB1*0701的频率与对照组相比显著升高。没有发现HLA-DRB1*08伴随现象。A*2等位基因在PBC组出现频率很高。其他A、B和DRB1等位基因在患者组及对照组相似。据此说明中国人对PBC易感性伴随DRB1*0701等位基因, 与北美、南美、北欧甚至日本不同。但是这种伴随情况并不是严格出现在任何特殊的患者中, 并且指出HLA DRB1第78号位上的缬氨酸可能在PBC的发病机制上起着重要的作用。总之, HLA II类抗原与PBC的伴随关系相当复杂, PBC的遗传背景及流行病学分布可能与地理分布相关。

1.2.3 HLA III类抗原 以往研究中发现, 一个区域基因多态性升高能产生更频繁的TNF1变化^[12], Fan *et al*^[13]认为, 尽管TNF- α *2百分率在PBC患者中下降, 但在中国PBC患者及健康对照之间没有显著差别。结果表明中国人TNF基因型与疾病的易感性和起病之间没有伴随关系。Bittencourt *et al*^[10]发现PBC患者中TNFA与细胞毒性T细胞受体4(CTLA-4)等位基因之间没有伴随关系。组织学也显示HLA与TNFA及CTLA-4等位基因不相关。因此认为巴西人PBC易感性与HLA-DR、DQ抗原及CTLA-4无伴随关系, TNFA对疾病进展没有影响。

1.2.4 非HLA遗传性基因 研究表明, PBC中单核苷酸多态性(SNPs)与调节免疫反应有关。CTLA-4是一种负调节蛋白, 在CD4(+)T细胞激活中起至关重要的作用, Fan *et al*^[14]发现, CTLA-4基因外显子49A/G多态性(A49G SNP)在PBC及对照组间有显著的伴随关系, 并且G等位基因与对照组相比显著升高。尽管CTLA-4外显子1启动子基因型分布在PBC患者及对照组

间无显著不同, GG-CC在患者组中是升高的。因此认为CTLA-4基因多态性与中国人群PBC易感性相关。而Bittencourt *et al*^[10]认为, PBC易感性与HLA-DR、DQ抗原及CTLA-4无伴随关系。Donaldson *et al*^[9]发现, PBC患者中IL-1B*1,1及IL-1RN*1,1基因型水平较高, 而IL-1B*1,2、IL-1B*2,2及IL-1RN*1,2基因型水平较低。IL-1B*1,1基因型分布的不同在早期患者中更显著, 而IL-1RN基因型分布在患病早期与晚期是相似的。数据表明IL-1等位基因是疾病易感性和进展程度的双重标志, 他可能影响疾病的进展。Fan *et al*^[15-16]发现, 大部分中国人包括患者和健康对照者伴有IL-1B 1,1基因型, PBC患者和对照组无差异。在PBC与对照之间IL-1RN基因多态性有显著统计学意义。PBC患者IL-1RN1,1基因型频率显著升高, IL-1RN1,2基因型显著下降。而77例PBC患者中有4例表达IL-6-174GG基因型, IL-6-174GG的出现频率与对照组相比显著升高。没有发现IL-10启动子基因型在AIH和PBC中与对照组有差异。说明IL-1RN与IL-6-174G/C基因多态性与中国PBC患者相伴随。维生素D受体基因的SNPs在一些实验中的研究相互矛盾, Fan *et al*^[17]发现中国人VDR基因多态性的分布与韩国、日本相似, 与德国及西班牙人不同。PBC患者Bb表现型携带者的百分率与健康对照组相比显著降低, 而bb表现型携带者的百分率与健康对照组相比显著升高。在中国PBC患者中发现PBC和VDR的BsmI之间存在显著的伴随关系。Kimura *et al*^[18]对编码细胞色素P450(CYP)2E1和2D6进行了基因分析, 没有发现多态现象伴随PBC易感性, 而CYP2E1 c2等位基因与疾病严重程度有关。此外, Hiraide *et al*^[19]没有发现PBC患者与正常对照组间在Fas多态性基因型的等位基因频率方面有统计学意义。

最近, 关于双生子与PBC的关系也受重视, 而Selmi *et al*^[22]在世界范围内1400个家庭中选择16对双生子进行研究, 结果发现, 16对双生子中8对是单卵双生子, 8对中有5对均患PBC, 患病一致率为63%。在双卵双生子中, 没有发现PBC一致性。有趣的是, 单卵双生子的发病年龄均在4-5岁, 但在病史及病情严重程度上却不一致。说明其患病情况不仅是遗传学的作用, 后天因素和环境因素也起着至关重要的作用。

1.3 PBC与性染色体 X连锁基因已知决定性相关特征, 他还调节免疫功能, 特别是维持耐受。

■ 研发前沿

目前对PBC的研究热点集中在遗传、自身抗体、感染及化学因素方面。尤其是近年来提出的HLA抗原、细菌*N. aromaticivorans*及多种食品添加剂在PBC发病机制中的作用越来越受到重视。

Invernizzi *et al*^[23]研究了100例PBC妇女、50例慢性肝炎、50例健康对照外周血单个核细胞X单体率,结果发现所有组X单体率均随年龄增高而上升,但PBC组显著高于对照组,他认为伴X基因单倍量不足可能是女性自身免疫病突出的关键因素.最近Invernizzi *et al*^[24]再次对女性系统硬皮病(SSc)、自身免疫性甲状腺疾病(AITD)及年龄匹配的健康妇女外周血单个核细胞作X单体存在率进行了研究,结果发现X单体随年龄升高而增加.X单体存在率SSc及AITD显著高于健康对照妇女.重要的是,X单体率在外周T和B淋巴细胞中比其他血细胞中要常见得多,并且在男性胎儿中不存在.这些数据强调了SSc和AITD妇女染色体异常是常见的^[25].结合PBC主要影响绝经后妇女的事实,说明PBC易感性可能与X连锁基因相关.

2 PBC的免疫机制

2.1 自身抗体 (1)抗线粒体抗体(AMA/AMA-M2):高滴度血清AMA是PBC的敏感性指标,超过95%的患者血清中都能检测到^[1];AMA可分为A1-A9共9个亚型,其中M2为PBC特异性抗体.AMA-M2的靶位是2-氧酸脱氢酶(2-OADC)复合物家族成员,包括丙酮酸脱氢酶复合物E2亚单位(PDC-E2)、支链2-氧酸脱氢酶复合物、酮戊二酸脱氢酶复合物和二氢硫辛酰胺脱氢酶结合蛋白^[25].大多数情况下,AMA与PDC-E2发生反应,一些患者AMA单纯与PDC-E2发生反应.尽管所有有核细胞都含有线粒体自身抗原,但其仅针对肝胆管线粒体自身抗原进行免疫攻击,其机制尚不清楚.但从临床观点来看,AMA与疾病预后的严重性无关^[26].Fukushima *et al*^[27]制作了重组PDC-E2特异性二聚体IgA单克隆抗体(mAbs)杆状病毒表达系统,研究数据表明IgA能通过多聚免疫球蛋白受体(pIgR)特异性进入PBC患者胆管上皮细胞(BECs)并与PDC-E2结合,从而造成BECs的病理学改变.他们还提出两个可能对BECs损伤作出解释的机制,而且两个机制都能损伤线粒体功能:(1)IgA以线粒体自身作为靶点;(2)IgA在运输过程中结合到细胞质中新生的PDC-E2上.此外,重组PDC-E2特异性单克隆抗体提供了一个进一步研究PBC发病机制中抗PDC-E2 IgA作用的工具.(2)抗核抗体(ANA):PBC特异性ANA在超过50%患者中出现,甚至在AMA阴性患者中更常见.包括核膜型和斑点型,分别为抗gp210抗体、抗核孔蛋白62

抗体和抗核体蛋白Sp100抗体^[28].Yordy *et al*^[29]发现Sp100是通过负向调节内皮素1(ETS1)的作用来实现其生物学作用的.ETS1转录因子是保守的序列特异性的DNA结合蛋白Ets家族的一个成员.ETS1对细胞增殖、分化、淋巴样发育、活力、侵袭及血管发生等不同的进程起着重要作用.Sp100与ETS1之间存在功能性相互作用.而且在体内、体外均有相互作用.Sp100位于核小体,ETS1在活细胞表达改变核小体的形态.Sp100负性调节ETS1 MMP1和uPA启动子转录活性,降低这些内源性基因的表达,减少ETS1 DNA结合.Yordy *et al*^[30]发现Sp100表达能被干扰素类上调,在内皮细胞中负向调节ETS1的活性,抗原始内皮细胞血管生成.因此当Sp100作为抗原被抗Sp100抗体攻击后,ETS1作用增强,原始内皮细胞血管生成增加,细胞分化、增殖等作用加剧导致一系列生物学作用发生,但其与PBC发病之间的关系还需进一步验证.Nakamura *et al*^[31]发现,几乎所有PBC样本小胆管的BECs的核包膜gp210抗原表达明显上升.相反,在正常肝脏小胆管的BECs核包膜gp210抗原表达是阴性的,此外,小胆管的BECs核包膜gp210抗原表达程度与PBC肝门炎症、肝小叶间的炎症呈正相关.这些结果指出小胆管gp210表达的升高可能伴随BECs炎性损伤,对核包膜gp210抗原持续抗体反应表明PBC患者有高风险进展到晚期肝衰竭.Janka *et al*^[32]最近发现小泛素样修饰因子(SUMO)与Sp100共价结合,在99例PBC患者血清样本研究中发现,抗SUMO-2和SUMO-1自身抗体分别在42%和15%抗ND阳性PBC血清中检测到,SUMO也构成独立的特异性的PBC自身抗原.(3)抗嗜酸性粒细胞过氧化物酶抗体(抗EPO抗体):嗜酸性粒细胞过氧化物酶(EPO)是一种嗜酸性粒细胞颗粒蛋白之一,EPO是过氧化物酶多基因家族成员,由一个14 ku的轻链和一个58 ku的重链组成.有趣的是,人EPO和中性粒细胞髓过氧化物酶(MPO)分子克隆显示他们的轻链69%的氨基酸相似,并且重链70%相似.EPO在嗜酸性粒细胞颗粒基质中是过剩的,并且对于寄生虫和哺乳动物内皮细胞是强毒物质.Takiguchi *et al*^[33]发现,血清抗EPO抗体在PBC患者中显著高于其他自身免疫性疾病及健康对照组,并考虑抗-MPO抗体可能是ANCA的一种,这是首次报道在PBC中检测到抗EPO抗体,但他与PBC发病机制的作用还需进一步研究.

2.2 细胞因子 既往研究发现PBC患者肝脏中

IFN- γ 和IL-4 mRNA阳性细胞比对照组显著升高. 丝裂原刺激T细胞浸润的PBC肝脏IL-4和IL-10显著升高. 近期Takii *et al*^[34]的研究表明IFN- α 在PBC中表达上调, 与PBC发病机制有关. 这些结果表明1型细胞因子在PBC中起主要作用. 导致PBC患者肝中T细胞聚集的机制仍然是谜, 可能在不同的状态, T细胞向肝细胞的迁移由不同途径控制.

2.3 过氧化物酶增殖活化受体(PPAR- γ) 过氧化物酶增殖活化受体 γ (PPAR- γ)的作用是抑制致炎症因子的产生. 在Th1优势的疾病中, PPAR- γ 能通过下调致炎症因子的表达来改善临床严重程度. PBC具有慢性破坏性胆管炎伴Th1占优势的环境的特征. Harada *et al*^[35]发现, 在PBC患者的肝样本里, PPAR- γ 蛋白在肝内胆管的表达无处不在, 然而他的蛋白和mRNA在受损的胆管却是减少的. 在培养细胞中可以由IL-4(IL-4;Th2-type)诱导上调, 而由IFN- γ (Th1-type)诱导下调. 他的配体负性调节脂多糖诱导的NF-kappaB活性. 还有, 这种配体的抑制作用可用IFN- γ 预处理减弱. 总之, PPAR- γ 可能对保持肝内胆管上皮组织内环境的稳定有很大的作用. 并且他在PBC肝胆管内的减少可能伴随Th1占优势的环境和慢性胆管炎的发展. 使用PPAR- γ 配体进行免疫抑制可能对减弱PBC胆管炎症有益.

2.4 赖氨酰氧化酶(Lox)和赖氨酰氧化酶样蛋白2 (Loxl2) Vadasz *et al*^[36]发现, 在正常肝脏中表达无显著意义, 相反, Wilson's病和PBC患者肝细胞内表达Lox和赖氨酰氧化酶样蛋白2(Loxl2或LOR-1), 并且这种表达伴随肝细胞周围胶原沉淀发生. 赖氨酰氧化酶还在其他肝纤维化疾病中表达, 例如乙肝、丙肝. 但这些疾病中的表达仅限于纤维变性损伤并且肝细胞周围没有胶原沉淀. Lox12能氧化胶原残余的赖氨酸, 这与Lox相类似. 铜离子螯合剂D-青霉胺抑制Loxl2诱导胶原氧化, 但Lox抑制剂 β -氨基丙腈却不抑制他的氧化, 而在相同浓度下Lox活性被完全抑制. Lox12还催化HepG2细胞表面蛋白氧化抑制他们扩增. 因此, Wilson's病和PBC患者肝细胞内Lox和Loxl2上调可能通过各种机制导致肝损伤, 与PBC发病机制相关.

此外, Isse *et al*^[37]发现趋化因子Fractalkine及其受体CX3CR1在受损的PBC胆管中表达上调. CX3CR1在PBC患者的肝门束浸润单核细胞和受损的胆管上皮淋巴细胞的CD3(+), CD4(+)和

CD8(+)中表达. Notas *et al*^[38]发现校正总抗氧化能力(CTAC)在PBC患者中显著升高, 而且仅在疾病的早期出现, 可能与疾病病理生理学机制相关.

3 感染和化学因素

3.1 感染因素 Wang *et al*^[39]发现, 细菌脂多糖受体TLR4可能与肝胆管疾病的发病机制有关. PBC肝组织胆管上皮细胞显著表达TLR4, 而慢性丙肝患者胆管上皮细胞几乎不表达TLR4. 晚期PBC患者TLR4的表达还在PBC肝组织门静脉周围的肝细胞发现, 他的表达扩展到了小叶间肝细胞, 提示在PBC炎症过程中可能包含细菌病原体和TLR4的作用. Jones *et al*^[40]的SJL/J鼠模型为研究PBC的发病机制提出了可能, 他能通过用自己和非己(牛)PDC-E2共免疫鼠诱导体液和细胞自身免疫反应. 通过分子模拟研究发现大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、金黄色葡萄球菌、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)、 β -逆转录病毒以及新发现的细菌*Novosphingobium aromaticivorans*^[41-43]等细菌或病毒等原核抗原与体液的交叉反应可能导致AMA和/或自身反应性T细胞的出现. 其中最近新发现的细菌*N. aromaticivorans*可能是诱导PBC的最好的代表. 他在环境中广泛存在, 有4个硫辛酰功能域, 与人硫辛酰化自身抗原具有惊人的同源性; 在近25%的生活在一起的PBC患者和非PBC对照组的排泄物中检测到该菌的特异性16S rRNA基因组; 他能将环境中雌激素代谢为有活性的雌二醇. 在原发性胆汁性肝硬化患者中, 抗*N. aromaticivorans*硫辛酰功能域抗体滴度是抗大肠杆菌抗体滴度的1 000倍, 10^{-6} 浓度在23%的抗PDC-E2阳性血清中仍能检测到, 在无症状患者和疾病早期患者中可见到这样的反应性^[39]. Padgett *et al*^[44]通过克隆、序列分析和蛋白表达等方式对其进行了确认. 他对四种编码*N. aromaticivorans*免疫反应蛋白的基因进行了研究, 发现他们与所有主要人类线粒体抗原PDC-E2有着惊人的氨基酸同源性. 他们还包含一个硫辛酰功能域, 这个区域可以被AMA阳性血清识别, 并与特异性线粒体抗原的单克隆抗体发生反应. 因此他们认为*N. aromaticivorans*具有打破遗传易感性个体自身耐受的可能性. 最重要的是, 该菌能通过卤化作用代谢数量不断增长的化学物质; 而Long *et al*^[45]曾报道卤化

■同行评价

本文对原发性胆汁性肝硬化发病机制的国内外最新进展分别从遗传易感性、免疫机制、感染因素及化学物质等方面进行了综述, 文献复习全面, 思路清晰, 论述准确有指导意义.

化学异物能诱导动物产生高滴度的线粒体抗体,与PBC发病机制相关.因此我们可以假设 *N.aromaticivorans*或其他具有*N.aromaticivorans*主要特征的细菌可能是诱导PBC发病过程中的重要环节.

也有报道指出肺炎衣原体感染可能是PBC的触发剂或是病原体的假设^[46],而Taylor-Robinson *et al*^[47]研究与此相反,肺炎衣原体感染不象是PBC的病因.另外,虽然缠绕杆菌种属DNA已经在PBC和PSC患者肝组织中检测到,但Boomkens *et al*^[48]认为PBC不太可能是由缠绕杆菌感染引起.

3.2 化学物质 肝脏是主要的解毒器官,这使肝细胞和BECs摄取、吸入了更多的化学物质.化学物质是化学复合物,他可能修饰或结合到自身分子,因此通过免疫反应改变他们的识别和导致最终侵袭相似的自身分子. Long *et al*^[45]证实,类似丙酮酸脱氢酶复合物自身抗原表位的化学物质,被循环抗体识别,这些抗体是从原发性胆汁性肝硬化患者血清中分离出来的,针对这些化学物质的抗体亲和力一般比对天然线粒体抗原的亲和力大.这些化合物很多是卤化碳氢化合物,他们广泛分布于自然界,杀虫剂和清洁剂中也可见到.一种卤化复合物溴己酸酯,与牛血清白蛋白耦联时,诱导动物产生高滴度的线粒体抗体,这些抗体的数量和质量特征与人抗线粒体抗体相似. Amano *et al*^[49]报道了包括2-苯甲酸、氯乙酸等在内的139种环境、化妆品、食品添加剂中常见的外源化学物质可成为PBC抗原. Amano *et al*^[50]证明,用结合非PDC-E2的卤化复合物免疫动物模型导致血清AMA出现,而当免疫反应中断时这种结果是可逆的.重要的是,用共价修饰自身PDC-E2免疫SJL/J鼠能引出T和B细胞同时打破耐受^[51].

总之,大量数据显示遗传、免疫、环境等因素共同引起PBC的发病.但在PBC遗传易感性、自身抗体AMA与ANA等在PBC发病过程中所起的作用尚需进一步研究; SJL/J鼠模型的建立以及新发现的细菌*N. aromaticivorans*为研究PBC的发病机制提出了可能,但深层次的研究还有待于进一步开展;越来越多的感染因素及外源化学物质参与到PBC的发病机制中,这些常见的外源物质在PBC发病机制中所起的作用越来越受到重视,对其进行深入研究分析有利于揭开PBC损伤之谜.总之,对PBC发病机制的探讨还在继续进行,许多不解之谜有待进一步揭开.

参考文献

- 1 Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2003; 362: 53-61
- 2 Sood S, Gow PJ, Christie JM, Angus PW. Epidemiology of primary biliary cirrhosis in Victoria, Australia: high prevalence in migrant populations. *Gastroenterology* 2004; 127: 470-475
- 3 Arbour L, Rupps R, Field L, Ross P, Erikson A, Henderson H, Hill W, Yoshida E. Characteristics of primary biliary cirrhosis in British Columbia's First Nations population. *Can J Gastroenterol* 2005; 19: 305-310
- 4 Olafsson S, Gudjonsson H, Selmi C, Amano K, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME. Antimitochondrial antibodies and reactivity to *N. aromaticivorans* proteins in Icelandic patients with primary biliary cirrhosis and their relatives. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2143-2146
- 5 Watt FE, James OF, Jones DE. Patterns of autoimmunity in primary biliary cirrhosis patients and their families: a population-based cohort study. *QJM* 2004; 97: 397-406
- 6 Bittencourt PL, Farias AQ, Abrantes-Lemos CP, Goncalves LL, Goncalves PL, Magalhaes EP, Carrilho FJ, Laudanna AA, Cancado EL. Prevalence of immune disturbances and chronic liver disease in family members of patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 873-878
- 7 Invernizzi P, Battezzati PM, Crosignani A, Perego F, Poli F, Morabito A, De Arias AE, Scalapogna M, Zuin M, Podda M. Peculiar HLA polymorphisms in Italian patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 38: 401-406
- 8 Mullarkey ME, Stevens AM, McDonnell WM, Loubiere LS, Brackensick JA, Pang JM, Porter AJ, Galloway DA, Nelson JL. Human leukocyte antigen class II alleles in Caucasian women with primary biliary cirrhosis. *Tissue Antigens* 2005; 65: 199-205
- 9 Donaldson P, Agarwal K, Craggs A, Craig W, James O, Jones D. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. *Gut* 2001; 48: 397-402
- 10 Bittencourt PL, Palacios SA, Farias AQ, Abrantes-Lemos CP, Cancado EL, Carrilho FJ, Laudanna AA, Kalil J, Goldberg AC. Analysis of major histocompatibility complex and CTLA-4 alleles in Brazilian patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1061-1066
- 11 Liu HY, Deng AM, Zhang J, Zhou Y, Yao DK, Shen F, Tu XQ, Fan LY, Zhong RQ. Analysis of HLA alleles polymorphism in Chinese patients with primary biliary cirrhosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 410-413
- 12 Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 353
- 13 Fan LY, Zhong RQ, Tu XQ, Pfeiffer T, Feltens R, Zhu Y, Zhou L. Genetic association of tumor necrosis factor (TNF)-alpha polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune liver diseases in a Chinese population. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 160-162
- 14 Fan LY, Tu XQ, Cheng QB, Zhu Y, Feltens R,

- Pfeiffer T, Zhong RQ. Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene polymorphisms confer susceptibility to primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis in Chinese population. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3056-3059
- 15 Fan LY, Zhu Y, Zhong RQ, Tu XQ, Ye WM, Chen QB, Zeng WJ, Kong XT. Genetic association between interleukins gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis in Chinese population. *Zhongguo Yixuekexueyuan Xuebao* 2004; 26: 505-509
 - 16 Fan LY, Tu XQ, Zhu Y, Pfeiffer T, Feltens R, Stoecker W, Zhong RQ. Genetic association of cytokines polymorphisms with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis in the Chinese. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2768-2772
 - 17 Fan LY, Zhong RQ, Tu XQ, Zhu Y, Gong CL, Zhou L, Zhao ZX, Feltens R, Pfeiffer T. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune liver diseases on Chinese. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003; 83: 1852-1855
 - 18 Kimura Y, Selmi C, Leung PS, Mao TK, Schauer J, Watnik M, Kuriyama S, Nishioka M, Ansari AA, Coppel RL, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME. Genetic polymorphisms influencing xenobiotic metabolism and transport in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 55-63
 - 19 Hiraide A, Imazeki F, Yokosuka O, Kanda T, Kojima H, Fukai K, Suzuki Y, Hata A, Saisho H. Fas polymorphisms influence susceptibility to autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1322-1329
 - 20 MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 30-37
 - 21 Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 624-628
 - 22 Selmi C, Mayo MJ, Bach N, Ishibashi H, Invernizzi P, Gish RG, Gordon SC, Wright HI, Zweiban B, Podda M, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* 2004; 127: 485-492
 - 23 Invernizzi P, Miozzo M, Battezzati PM, Bianchi I, Grati FR, Simoni G, Selmi C, Watnik M, Gershwin ME, Podda M. Frequency of monosomy X in women with primary biliary cirrhosis. *Lancet* 2004; 363: 533-535
 - 24 Invernizzi P, Miozzo M, Selmi C, Persani L, Battezzati PM, Zuin M, Lucchi S, Meroni PL, Marasini B, Zeni S, Watnik M, Grati FR, Simoni G, Gershwin ME, Podda M. X chromosome monosomy: a common mechanism for autoimmune diseases. *J Immunol* 2005; 175: 575-578
 - 25 Parikh-Patel A, Gold EB, Worman H, Krivy KE, Gershwin ME. Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the united states. *Hepatology* 2001; 33: 16-21
 - 26 Vleggaar FP, van Buuren HR. No prognostic significance of antimitochondrial antibody profile testing in primary biliary cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 937-940
 - 27 Fukushima N, Nalbandian G, Van De Water J, White K, Ansari AA, Leung P, Kenny T, Kamita SG, Hammock BD, Coppel RL, Stevenson F, Ishibashi H, Gershwin ME. Characterization of recombinant monoclonal IgA anti-PDC-E2 autoantibodies derived from patients with PBC. *Hepatology* 2002; 36: 1383-1392
 - 28 Invernizzi P, Selmi C, Ranftler C, Podda M, Wesierska-Gadek J. Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 298-310
 - 29 Yordy JS, Li R, Sementchenko VI, Pei H, Muise-Helmericks RC, Watson DK. SP100 expression modulates ETS1 transcriptional activity and inhibits cell invasion. *Oncogene* 2004; 23: 6654-6665
 - 30 Yordy JS, Moussa O, Pei H, Chaussabel D, Li R, Watson DK. SP100 inhibits ETS1 activity in primary endothelial cells. *Oncogene* 2005; 24: 916-931
 - 31 Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T, Shimizu-Yoshida Y, Koyabu M, Matsuyama M, Mori T, Kamihira T, Daikoku M, Migita K, Yatsushashi H, Nozaki N, Shimoda S, Ishibashi H. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2006; 26: 138-145
 - 32 Janka C, Selmi C, Gershwin ME, Will H, Sternsdorf T. Small ubiquitin-related modifiers: A novel and independent class of autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 609-616
 - 33 Takiguchi J, Ohira H, Rai T, Abe K, Takahashi A, Sato Y. Anti-eosinophil peroxidase antibodies detected in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2005;
 - 34 Takii Y, Nakamura M, Ito M, Yokoyama T, Komori A, Shimizu-Yoshida Y, Nakao R, Kusumoto K, Nagaoka S, Yano K, Abiru S, Ueki T, Matsumoto T, Daikoku M, Taniguchi K, Fujioka H, Migita K, Yatsushashi H, Nakashima M, Harada M, Ishibashi H. Enhanced expression of type I interferon and toll-like receptor-3 in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 2005; 85: 908-920
 - 35 Harada K, Isse K, Kamihira T, Shimoda S, Nakanuma Y. Th1 cytokine-induced downregulation of PPARgamma in human biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 1329-1338
 - 36 Vadasz Z, Kessler O, Akiri G, Gengrinovitch S, Kagan HM, Baruch Y, Izhak OB, Neufeld G. Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *J Hepatol* 2005; 43: 499-507
 - 37 Isse K, Harada K, Zen Y, Kamihira T, Shimoda S, Harada M, Nakanuma Y. Fractalkine and CX3CR1 are involved in the recruitment of intraepithelial lymphocytes of intrahepatic bile ducts. *Hepatology* 2005; 41: 506-516
 - 38 Notas G, Miliaraki N, Kampa M, Dimoulis F, Maltella E, Hatzidakis A, Castanas E, Kouroumalis E. Patients with primary biliary cirrhosis have increased serum total antioxidant capacity measured with the crocin bleaching assay. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4194-4198
 - 39 Wang AP, Migita K, Ito M, Takii Y, Daikoku M, Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H. Hepatic expression of toll-like receptor 4 in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2005; 25: 85-91
 - 40 Jones DE, Palmer JM, Bennett K, Robe AJ, Yeaman SJ, Robertson H, Bassendine MF, Burt AD, Kirby JA. Investigation of a mechanism for accelerated

- breakdown of immune tolerance to the primary biliary cirrhosis-associated autoantigen, pyruvate dehydrogenase complex. *Lab Invest* 2002; 82: 211-219
- 41 Shimoda S, Nakamura M, Shigematsu H, Tanimoto H, Gushima T, Gershwin ME, Ishibashi H. Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 1212-1216
- 42 Indik S, Gunzburg WH, Salmons B, Rouault F. Mouse mammary tumor virus infects human cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6651-6659
- 43 Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, Ansari AA, Coppel RL, Podda M, Leung PS, Kenny TP, Van De Water J, Nantz MH, Kurth MJ, Gershwin ME. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology* 2003; 38: 1250-1257
- 44 Padgett KA, Selmi C, Kenny TP, Leung PS, Balkwill DL, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from *Novosphingobium aromaticivorans*, implications for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2005; 24: 209-219
- 45 Long SA, Quan C, Van de Water J, Nantz MH, Kurth MJ, Barsky D, Colvin ME, Lam KS, Coppel RL, Ansari A, Gershwin ME. Immunoreactivity of organic mimeotopes of the E2 component of pyruvate dehydrogenase: connecting xenobiotics with primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 2001; 167: 2956-2963
- 46 Liu HY, Deng AM, Zhang J, Zhou Y, Yao DK, Tu XQ, Fan LY, Zhong RQ. Correlation of Chlamydia pneumoniae infection with primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4108-4110
- 47 Taylor-Robinson D, Sharif AW, Dhanjal NS, Taylor-Robinson SD. Chlamydia pneumoniae infection is an unlikely cause of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005; 42: 779-780
- 48 Boomkens SY, de Rave S, Pot RG, Egberink HF, Penning LC, Rothuizen J, Zondervan PE, Kusters JG. The role of *Helicobacter spp.* in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44: 221-225
- 49 Amano K, Leung PS, Rieger R, Quan C, Wang X, Marik J, Suen YF, Kurth MJ, Nantz MH, Ansari AA, Lam KS, Zeniya M, Matsuura E, Coppel RL, Gershwin ME. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic, and food additive, 2-octynoic acid. *J Immunol* 2005; 174: 5874-5883
- 50 Amano K, Leung PS, Xu Q, Marik J, Quan C, Kurth MJ, Nantz MH, Ansari AA, Lam KS, Zeniya M, Coppel RL, Gershwin ME. Xenobiotic-induced loss of tolerance in rabbits to the mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis is reversible. *J Immunol* 2004; 172: 6444-6452
- 51 Palmer JM, Robe AJ, Burt AD, Kirby JA, Jones DE. Covalent modification as a mechanism for the breakdown of immune tolerance to pyruvate dehydrogenase complex in the mouse. *Hepatology* 2004; 39: 1583-1592

电编 李琪 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 •

肠屏障功能障碍的基础与临床会议

本刊讯 肠屏障功能障碍的基础与临床会议将于2006-06-17/18在上海举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文和800字摘要, 2006-05-30截稿.

2 联系方式

上海市北京西路1623号上海市医学会中华消化杂志编辑部候虹鲁主任(邮编: 200032), 封面注明: 肠屏障会议征文.

中西医理论治疗食管癌进展

曹志成

曹志成, 伊利沙伯医院临床肿瘤科 香港特别行政区
通讯作者: 曹志成, 香港九龙加士居道30号伊利沙伯医院R座13楼1327室, 临床肿瘤科肿瘤研究部,
williamcscho@gmail.com
电话: 852-94720348 传真: 852-27156139
收稿日期: 2006-02-12 接受日期: 2006-02-21

摘要

食管癌是世界第八大癌症, 死亡率更高居全球第6位。尽管放射治疗和化学治疗技术近年不断改进, 但是患者5 a生存率仍低。外科切除手术为本病的根治方法, 然而, 只有早期患者才适合作手术治疗。随着人类对基因和蛋白质的更深认识, 靶向治疗日趋成熟, 近年基因治疗的开发为食管癌的治疗提供了新希望。鉴于手术、放化疗的不良副作用, 中医药治疗和饮食治疗尤适合帮助食管癌患者的调理和恢复, 并能配合西医治疗手段, 以达相辅相成之效。本文对食管癌作出较详尽的介绍, 并阐述目前食管癌治疗的最新进展。

关键词: 食管癌; 分子治疗; 中医药治疗; 饮食治疗

曹志成. 中西医理论治疗食管癌进展, 世界华人消化杂志 2006;14(7):709-713
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/709.asp>

0 引言

食管癌是指下咽部至胃之间食管上的恶性肿瘤, 发生部位以食管中段最多(约占50%), 下段次之(约占40%), 上段最少(约占10%)。作为世界第八大癌症, 其死亡率全球排名第六, 在中国癌症死亡率更高居第四位, 欧美国家的发病率也呈上升趋势。平均发病年龄为60岁左右, 50-70岁为发病高峰年龄。本病好发于男性, 男女发病比例约为2:1。食管癌是地理分布差异很大的一种癌症, 好发于中国中北部、中亚至伊朗北部、波多黎各、南美洲及非洲东北部, 据世界卫生组织2002年统计, 全球每年约有46万例食管癌, 发展中国家约占85%^[1]。我国高发区有河南、河北、山西三省交界的太行山区、秦岭东部山区、大别山区、四川北部的盐亭、广东的油

头、福建的南安县、苏北的扬中县、新疆的托里县等。

1 病因及高危因素

1.1 饮食吸烟酗酒 食管癌的发生与流行和某些地区人民的生活习惯、地理自然环境等因素有关。(1)亚硝胺: 亚硝胺类化合物是公认的致癌物, 大量摄入腌渍、腌熏等含有亚硝酸盐的食物, 如酸菜、泡菜、咸菜、咸肉、咸鱼、香肠等, 会增加食管癌发生的危险性^[2]。(2)霉菌: 发霉变质的食物中含有大量串珠镰刀菌毒素, 食用含有霉菌的食物, 是致癌原因之一^[3]。(3)食管损伤: 进食粗糙、坚硬食物可能引起食管黏膜损伤, 常食粗硬的食物, 反复损伤可造成黏膜增生、间变, 导致癌变。(4)热烫饮食: 常进食热烫的饮食, 会引致食管黏膜发炎, 是罹患食管癌的一个危险因素^[4]。(5)营养和矿物质: 流行病学显示, 食管癌高发区的人普遍缺乏维生素A、B、C、E, 核黄素、尼克酸、动物蛋白、脂肪、蛋类、新鲜蔬果等, 长期缺乏营养可增加患食管癌的风险^[5]; 此外, 食管癌高发区水土中的钼、硒、钴、锰、铁、镍和锌等微量元素的含量明显偏低, 提示缺乏这些矿物质亦会提高患病机率^[6]。(6)长期吸烟和酗酒与食管癌的发病有密切关系, 根据统计, 吸烟和饮非烈性酒者患食管癌的机率比少吸烟饮酒者大3.88倍, 而吸烟加饮烈性酒者发病率更比少吸烟饮酒者高6.3倍^[7]。

1.2 遗传和基因 林州(原名林县)是我国的食管癌高发区之一, 也是全球食管癌最高发地区。自1959年起, 大批肿瘤医学专家在林州开展了以预防食管癌为主的多项研究工作, 发现林州食管癌有家族聚集现象, 并有逐代显性遗传倾向。经过多年研究, 发现林州存在一个人群频率约19%的常染色体隐性基因, 约有4%的人群在环境因子的作用下有易患食管癌的倾向。已知与食管癌有关的基因有粒线体基因^[8]、错配修复基因 $hMLH1$ 和 $hMSH2$ ^[9]、血管细胞黏附分子-1(CD 106)^[10]、环氧化酶-2(COX-2)^[11]、乙醛脱氢酶2(ALDH2)^[12]、染色体13q33-q34的缺失^[13]、

■背景资料

食管癌是严重威胁人类生命安全的疾病, 近年中西医学界协同科学界携手合作, 令食管癌的诊疗方法和技术均有不少改进, 但患者的5 a生存率仍低, 要攻克这恶性肿瘤, 仍需继续努力。

■研发前沿

本文对目前食管癌的诊疗做了详细论述, 除了传统的西医治疗外, 还提供了中医治疗、中西医结合治疗和饮食治疗的详尽介绍。

■创新盘点

一般综述在介绍食管癌的病因时,很少从分子和基因的层面加以剖析,本文对食管癌患者的基因突变,做了较多的介绍。

MDM2、*cyclin D1*、*pRB*、*p16*和*p53*^[14-15]等,而肿瘤坏死因子单核苷酸多态性*TNF- α -308G/A*和*TNF- β -252G/A*的基因型鉴定更可作为预测食管癌的标志物^[16]。处于后基因组年代,运用先进的质谱技术,亦发现了很多与食管癌有关的蛋白质^[17],包括*stefin A*^[18], *clusterin*^[19], *PERP*, *S100A2*, *SPRR3*^[20], *serum amyloid A (SAA)*, *amyloid related serum protein*, *haptoglobin*^[21], *enolase*, *elongation factor Tu*, *isocitrate dehydrogenase*, *tubulin alpha-1 chain*, *tubulin beta-5 chain*, *actin (cytoplasmic 1)*, *glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase*, *tropomyosin isoform 4 (TPM4)*, *prohibitin*, *peroxiredoxin 1 (PRX1)*, *manganese-containing superoxide dismutase (MnSOD)*, *neuronal protein*, *transgelin*, *TPM1*, *squamous cell carcinoma antigen 1 (SCCA1)*, *stratifin*, *peroxiredoxin 2 isoform A*和*alpha B crystalline*^[22]。这些基因和蛋白质的变异可能引致食管癌的发生和发展;此外,实验证明*CXCR4*蛋白质与食管癌的转移有关^[23]。

1.3 病毒和炎症 研究发现,人乳头瘤状病毒可能与食管癌有关,其中HPV16型与食管鳞癌发生有关,而HPV18型则与食管腺癌有关,我国约半数食管癌患者体内有该病毒的基因^[24]。慢性返流性食管炎患者,尤其是巴瑞特食管症患者,因胃的内容物返流到食管,造成食管鳞状上皮细胞被柱状上皮所取代,在返流物的长期刺激下,容易演变为食管癌^[25]。

2 临床诊断

2.1 临床症状 早期食管癌多无明显症状,至晚期因肿瘤变大,明显阻塞食管才会引起吞咽困难,临床上95%食管癌患者以吞咽困难及有异物感为最初表征,患者在吞咽时感到食物卡在食管及胸骨后方,引起隐痛并吐黏沫和黏液痰等。早期患者只有吃固体食物时才会有疼痛感觉,当肿瘤逐渐变大且食管通道愈来愈窄时,甚至连饮用液体都会疼痛。食管癌有时也会引起呕吐、咳嗽、声音嘶哑、胸骨后方有压迫或刺痛感、咽喉痛及呛咳等症状,中晚期患者体质量会骤减。终末期食管癌可能会出现食物返流、吐血、黑便、呼吸困难等症状,若侵犯到邻近的主动脉,甚至可能会引发致死性大出血。依不同转移的器官表现不同症状,如转移至颈部淋巴结会出现淋巴结肿大症状;转移至肺部会出现咳嗽、咳血、胸痛等症状;转移至骨骼会出

现骨骼疼痛症状;转移至肝脏会出现黄疸、腹胀、腹痛等症状。

2.2 实验室检查 (1)食管摄影。患者喝下钡显影剂,钡显影剂可附着于食管表面,通过X射线让病变处、食管阻塞的程度及病变的范围等显示出来。(2)食管镜检查。以内窥镜直接观察食管病变的部位及范围,医生可通过食管镜取出食管壁病变部位的细胞或部分组织做切片检查,此法可与食管摄影检查两者相辅相成。食管镜检查及细胞或组织切片检查是确立诊断的重要手段,病理组织切片合并细胞检查的诊断正确率高达98%。近年内窥镜技术更不断改进,如荧光内窥镜、散射分光镜等。(3)其他检查。胸部X射线、电脑断层扫描、腹部超声波、正电子放射断层摄影、骨骼扫描检查等可用以评估食管癌是否已经转移。

2.3 分型 临床治疗一般多可区分为局部型、局部转移型(肿瘤已侵犯至食管以外或附近淋巴结)和远处转移型。

3 治疗

3.1 西医治疗 (1)外科手术:早期食管癌患者可接受食管、附近淋巴结及组织切除术,剩余的食管再与胃部重新连结,有时可利用消化道(如结肠)来取代被切除的食管。当肿瘤逐渐变大且食管通道愈来愈窄而无法进食时,医生可另做一条管道,称为“胃造口术”,这种手术可将食物直接灌入胃部;医生亦可在食管狭窄处置入扩张支架,以保持食管畅通^[27-28]。(2)放射线治疗:利用放射线在外科手术前缩减肿瘤大小,或在手术后消灭残留的癌细胞。当肿瘤的大小及位置不适于作手术切除处理时,或患者的其他因素不适于作手术时,放射治疗(放疗)是可取代手术的另一种选择。近年引进了一些新的放疗技术,如“三度空间立体定位顺形放疗”和“强度调控放疗”等,更有针对减少放疗对心脏造成伤害的“4方向照射方式”^[29]。(3)化学治疗:可结合放射治疗来减小手术前肿瘤的大小,或消灭手术后残存的癌细胞。目前常用的化疗药物有*taxol*, *vinorelbine*和*gemcitabine*等;此外,近年更引进了不少新药和联合化疗,如*irinotecan*、针对*COX-2*的*celecoxib*、联合*docetaxel*和*cisplatin*作一线治疗。另一方面,实验证明维生素C协同5-FU或*cisplatin*使用,通过抑制*NF-kappaB*和*AP-1*蛋白质的定位转移,能增强抗癌作用^[30]。(4)光动力治疗:近年新的光敏物质和内窥镜技术

的进步使光动力疗法得以进一步改善, 成为一线治疗后常用的救援治疗手段. (5) 分子治疗: 之前的研究显示食管癌细胞中生存素表达量会增加, 在这一基础上, 中国医学科学院/协和医科大学的研究人员设计了针对生存素的核糖核酸干扰, 并将其导入人食管癌细胞系KYSE510, 获得稳定细胞克隆后进行蛋白质印迹检测其表达水平. 研究人员并分别应用台盼蓝染色排除法和裸鼠进行体内和体外实验检测肿瘤细胞生长情况, 以及磷脂结合蛋白V/PI双染色法和常规原位末端标记法进一步检测细胞系和裸鼠中的细胞凋亡情况, 最后证明生存素可以强烈抑制体内和体外食管癌细胞生长. 这一研究不仅加深了对食管癌分子机制的了解, 而且说明生存素可能是治疗食管癌潜在的靶位点^[31].

3.2 中医治疗 食管癌属于中医“噎膈”范畴, 《诸病源候论》记述: “噎膈者, 饥欲得食, 但噎塞迎逆于咽喉胸膈之间, 在胃口之上, 未曾入胃即带痰涎而出。”“其槁在上, 近咽之下, 水饮可行, 食物难入, 名曰噎。”本病的病变部位在食管, 故清代杨素园谓: “食管中系有形之物, 阻挠其间, 而非无故狭窄者明矣。”清代何梦瑶《医碥·反胃噎膈》有云: “酒客多噎膈, 饮热酒者尤多, 以热伤津液, 咽管干涩, 食不得入也。”其发病与痰瘀交结、脾肾亏虚有关, 治疗原则为除痰祛瘀、健脾益气、滋阴养血. 在治疗方面, 先察其标本虚实, 抓住痰、瘀、虚这主要病理. 病程初起或体质强壮者, 宜以理气除痰、祛瘀解毒为主; 久病则多有体虚衰弱, 治疗上宜以扶正驱邪为主. (1) 痰湿内阻者, 症见吞咽梗阻, 进食不畅, 胸膈痞闷, 伴有胸痛隐隐, 疲倦乏力, 纳呆, 大便溏, 舌质淡胖, 苔白腻, 脉滑. 治宜健脾理气, 燥湿化痰. 方以旋覆代赈汤加减, 药如旋覆花、代赈石、党参、法半夏、苏梗、浙贝、山慈菇、八月札、生南星、生苡仁、守宫、瓜蒌皮等. (2) 气滞血瘀者, 症见进食梗阻, 食不得下, 甚至水饮难下, 食后即吐, 吐物如豆汁, 胸膈疼痛或痛连肩背, 便如羊屎, 形体消瘦, 面色晦暗, 肌肤甲错, 舌质暗红, 或有瘀点瘀斑, 苔薄黄, 脉涩或弦细. 治宜理气化痰, 活血祛瘀. 方以通幽汤化裁, 药如桃仁、红花、当归、生地、丹参、田七、八月札、威灵仙、急性子、五灵脂、橘红、甘草等. (3) 津亏血枯者, 症见进食梗涩难下, 甚至水饮难咽, 形体消瘦, 口干咽燥, 五心烦热, 大便秘结, 舌质红干, 或带裂纹, 无苔或薄黄苔, 脉弦细. 治宜养阴生津, 补血润

燥. 方以百合固金汤加减, 药如百合、玄参、麦冬、生地、熟地、白芍、川贝、桔梗、甘草、野葡萄藤、守宫、山海螺等. (4) 晚期食管癌气虚阳微者, 症见饮食难下, 泛吐清涎, 形体消瘦, 面色泛白, 形寒肢冷, 面浮足肿, 舌质暗淡, 苔薄白, 脉沉细. 治宜健脾益气, 温阳散结. 方以补气运脾汤加减, 药如党参、黄芪、白术、茯苓、法夏、陈皮、桂枝、八月札、全虫、山慈菇、白芍、熟附子等. (5) 放射治疗后热盛津伤络阻者, 症见皮肤潮红、瘙痒、渗液破溃, 胸痛干咳, 吞咽疼痛, 进食梗阻加重, 纳呆, 口干舌燥, 小便短赤, 大便干结, 舌暗红, 苔黄, 脉细数. 治宜清热解暑, 益气养阴, 活血化痰. 药如黄芪、北沙参、石斛、花粉、银花、栀子、瓜蒌、竹茹、陈皮、茯苓、红花、桃仁、焦六曲、鸡内金、女贞子等. (6) 化学治疗后脾肾亏虚、胃失和降者, 症见疲倦乏力, 脘痞恶心欲吐, 便溏或腹泻, 纳呆, 舌淡, 苔薄, 脉细. 治宜健脾补肾, 和胃调中. 药如黄芪、太子参、鸡血藤、白术、茯苓、姜半夏、陈皮、木香、柿蒂、鸡内金、焦六曲、泽泻、女贞子、枸杞子、生姜、大枣等. 近年研究显示, 有些中医药能调控转录因子NF- κ B的表达, 阻断癌细胞的增殖^[32]; 亦可降低放疗食管癌组织中细胞黏附分子CD44v6的表达, 从而起到抑制食管癌浸润和转移的作用^[33]. (7) 针灸治疗. 针刺天鼎、天突、膻中以下气宽胸除痰, 上脘、中脘、下脘和降胃气, 内关、足三里健脾胃以资气血生化之源. 病灶在食管上段加期门、不容等, 痰多便秘加丰隆、大肠俞, 胸痛引背加心俞及阿是穴, 进食困难重刺内关, 胸脘痞闷加大陵. 均用平补平泻法. 外敷疗法: 软坚散结膏由归尾、桔梗、川姜活、白芷、元明粉、木鳖子、三棱、白芨、白薇、生地、黄芪、天花粉、川乌等20余种药物组成, 以麻油、广丹熬制成膏药, 摊在布上均匀撒上散坚丹(明矾、冰片、樟脑等), 贴于病灶对应处, 也可贴于肿大的淋巴结处, 具止痛功效. 耳针: 取穴肾、胃、食道、神门、内分泌, 用于食管癌吞咽梗阻, 饮食不下.

3.3 饮食治疗 《素问·平人氣象論》曰: “有胃氣則生, 無胃氣則死.” 《景岳全書·論脾胃》亦云: “土氣為萬物之源, 胃氣為養生之主. 胃強則強, 胃弱則衰.” 可見腸胃的功能和飲食對全身之氣的形成與盛衰具有極重要的作用. 孫思邈更指出: “食能排邪而安臟腑, 悅情爽志以資氣血.” 提出“為醫者, 當曉病源, 如其所犯, 以

■ 名詞解釋

1 光動力治療: 首先替患者注射光敏劑, 然後用激光照射要治療的腫瘤, 光敏劑受到激光的刺激會把能量傳遞給細胞周圍的氧, 氧會變成活性很強的單態氧, 再和腫瘤細胞發生反應, 進而導致腫瘤細胞受損死亡.

2 分子治療: 以腫瘤基因學與生物學變異及相關機制異常為標的治療策略, 包括抑制腫瘤的血管新生與細胞內的訊息傳遞、改變細胞周期、促進細胞調亡的進程等;

3 個體化治療: 按每個個體的基因組合及身體情況量身設計治療方法;

4 靶向治療: 針對腫瘤的特異性分子靶點設計腫瘤治療方案, 包括具有靶向性的表皮生長因子受體阻斷劑、針對某些特定細胞標志物的單克隆抗體、針對某些癌基因和癌細胞遺傳學標志的藥物、抗腫瘤血管生成的藥物、抗腫瘤疫苗以及基因治療等.

■应用要点

本文对食管癌的诊疗做了较全面的总结和资料汇编,对临床研究和治疗有一定指导作用。

食治之,食疗不愈,然后命药。”的临床治疗原则,认为医生“若能用食平之,适性遣疾者,可谓良工。”惟食疗实质应用仍需辨证论治,以取得较佳效果。(1)痰湿内阻者,宜祛湿化痰、理气止咳,可用陈皮法夏薏苡仁粥;(2)脾虚痰湿阻滞者,宜健脾祛湿,可用薏苡仁淮山龟肉汤或薏苡仁菱角田七瘦肉汤;(3)脾胃虚寒者,宜健脾和胃,可用砂仁鱼鳔瘦肉羹或粟米淮山猴头菇水鸭汤;(4)气滞血瘀者,宜活血祛瘀、通络止痛,可用田七桃仁瘦肉汤;(5)因病虚损者,宜补肾填精、健脾养胃,可用冬虫草炖鸭肉;手术的创伤、出血、发炎、贫血或消化不良,需要大量营养以补充和修复机体;化疗引起的消化系统黏膜溃疡和恶心、呕吐、腹痛、腹泻等消化吸收不良综合病征,更加深了营养吸收障碍;而放疗因照射部位的不同,除有各式各样消化道反应外,还可能导致进食困难,自然对营养吸收有很大影响。西医治疗告一段落后,食疗的意义十分重大,尤其是现代医学治疗后的患者,食欲大都不佳或有厌食现象,特别需要补充营养,以尽快恢复体力。由于营养可以影响到机体各种防御功能的运作,对癌细胞是否增殖、复发或转移也有一定作用。疗养中的食管癌患者,需要良好的营养以增强免疫力,从而改善抗癌治疗后所造成的消化能力降低症状^[5]。(6)外科手术后气血两虚、创口难以愈合者,宜益气养血、补虚生肌,可用人参黄芪炖生鱼。临床报告显示,在食管癌手术全期护理中,服用黄芪可明显增强机体免疫力^[34];(7)放射治疗后阴津亏损者,宜清胃止呕、益气祛痰,可用芦根洋参柿霜粥、无花果败酱草瘦肉汤或蛇莓龙葵半枝莲瘦肉汤;(8)手术、放射治疗或化学治疗后身体亏虚者,宜健脾益气、滋阴补肾,可用淮杞炖鳖。

平均而言,食管癌的预后不佳,其主要原因是无法早期发现、及早治疗。食管癌患者的5 a存活率介于10%-20%之间,患者如无法施行根治性治疗,只做姑息性缓解治疗者,存活期约只有6 mo。早期食管癌有极高的5 a存活率,局部转移型的患者5 a存活率约20%,但已发生远程转移者则预后不良,5 a存活率甚低。食管癌经过治疗后,仍需定期追踪检查。外科手术切除后,局部复发或远程转移大都在两年内发生,5 a之后复发的机会很微。

总之,纠正不良的饮食习惯,不吃发霉变质的食物,尽量少吃酸菜、腌鱼、腌肉,避免进食粗硬、热烫的饮食,戒烟、少喝酒,及时治疗食

管炎等均有助预防食管癌;多吃蔬菜(如芦筍、南瓜、海带、冬菇等)和水果(如木瓜、山楂、猕猴桃等),研究发现,多喝绿茶也能预防食管癌。有条件的食管癌高发区,应开展定期的食管癌普查,注意早期发现食管癌的症状,及时到医院确诊。食管癌高发区也可试用药物预防。英国科学家已开始进行一项大规模临床试验,测试一种以抗溃疡药物与阿司匹林的复合疗法预防食管癌的疗效,这项临床试验将对5 000名有患食管癌危险的人进行长达10 a的跟踪观察,是迄今最大规模的癌症预防临床试验之一。食管癌的初期症状是胃酸返流,对食管内壁细胞造成伤害,试验期间,研究人员将根据不同程度的症状让患者服用阿司匹林和治溃疡药物“耐信”,据估计,如果能在初期有效治疗胃酸返流症状,食管癌发病率将下降一半。近年运用先进的技术平台,如单核苷酸多态性分析、基因芯片、质谱仪等,科学界对肿瘤基因表达、基因组和蛋白质组得以更深入了解,这无疑为个体医疗和靶向治疗的发展提供更佳的条件^[35]。期望在不久的将来,食管癌的防治得以有效改进,为万千病患带来新的曙光。

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 074-108
- 2 Lin K, Shen ZY, Lu SH, Wu YN. Intake of volatile N-nitrosamines and their ability to exogenously synthesize in the diet of inhabitants from high-risk area of esophageal cancer in southern China. *Biomed Environ Sci* 2002; 15: 277-282
- 3 Wang H, Wei H, Ma J, Luo X. The fumonisin B1 content in corn from North China, a high-risk area of esophageal cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 139-141
- 4 Mengesha B, Ergete W. Staple Ethiopian diet and cancer of the oesophagus. *East Afr Med J* 2005; 82: 353-356
- 5 Odelli C, Burgess D, Bateman L, Hughes A, Ackland S, Gillies J, Collins CE. Nutrition support improves patient outcomes, treatment tolerance and admission characteristics in oesophageal cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2005; 17: 639-645
- 6 Franceschi S, Bidoli E, Negri E, Zamboni P, Talamini R, Ruol A, Parpinel M, Levi F, Simonato L, La Vecchia C. Role of macronutrients, vitamins and minerals in the aetiology of squamous-cell carcinoma of the oesophagus. *Int J Cancer* 2000; 86: 626-631
- 7 Sakata K, Hoshiyama Y, Morioka S, Hashimoto T, Takeshita T, Tamakoshi A. Smoking, alcohol drinking and esophageal cancer: findings from the JACC Study. *J Epidemiol* 2005; 15 Suppl 2: S212-S219
- 8 Kose K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K. Somatic mutations of mitochondrial DNA in digestive tract cancers. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1679-1684

- 9 Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Kurokawa T, Murakami S, Fukunaga A, Ebihara Y, Kaneko H, Hashimoto H, Murakami Y, Shichinohe T, Kawarada Y, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. Deficiency of hMLH1 and hMSH2 expression is a poor prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2005; 92: 109-115
- 10 Heidemann J, Maaser C, Luger A, Spahn TW, Zimmer KP, Herbst H, Rafiee P, Domschke W, Kriegelstein CF, Binion DG, Kucharik TF. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (CD 106) in normal and neoplastic human esophageal squamous epithelium. *Int J Oncol* 2006; 28: 77-85
- 11 Tuynman JB, Buskens CJ, Kemper K, ten Kate FJ, Offerhaus GJ, Richel DJ, van Lanschot JJ. Neoadjuvant selective COX-2 inhibition down-regulates important oncogenic pathways in patients with esophageal adenocarcinoma. *Ann Surg* 2005; 242: 840-849
- 12 Yang CX, Matsuo K, Ito H, Hirose K, Wakai K, Saito T, Shinoda M, Hatooka S, Mizutani K, Tajima K. Esophageal cancer risk by ALDH2 and ADH2 polymorphisms and alcohol consumption: exploration of gene-environment and genegene interactions. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6: 256-262
- 13 Guo GM, Huang XP, Dong JT, Caia Y, Xu X, Han YL, Wu M, Zhan QM, Wang MR. A novel region of deletion on 13q33-q34 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2005; 14: 1639-1646
- 14 Hong Y, Miao X, Zhang X, Ding F, Luo A, Guo Y, Tan W, Liu Z, Lin D. The role of P53 and MDM2 polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 9582-9587
- 15 Sakaguchi S, Yokokawa Y, Hou J, Zhang XL, Li XP, Li SS, Li XX, Zhu DC, Kamijima M, Yamanoshita O, Nakajima T. Environmental exposure and p53 mutations in esophageal cancer patients in areas of low and high incidence of esophageal cancer in China. *Tohoku J Exp Med* 2005; 207: 313-324
- 16 Guo W, Wang N, Li Y, Zhang JH. Polymorphisms in tumor necrosis factor genes and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma in a population of high incidence region of North China. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 1870-1878
- 17 Hayashida Y, Honda K, Osaka Y, Hara T, Umaki T, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S, Yamada T. Possible prediction of chemoradiosensitivity of esophageal cancer by serum protein profiling. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8042-8047
- 18 Li W, Ding F, Zhang L, Liu Z, Wu Y, Luo A, Wu M, Wang M, Zhan Q, Liu Z. Overexpression of stefin A in human esophageal squamous cell carcinoma cells inhibits tumor cell growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8753-8762
- 19 Zhang LY, Ying WT, Mao YS, He HZ, Liu Y, Wang HX, Liu F, Wang K, Zhang DC, Wang Y, Wu M, Qian XH, Zhao XH. Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 650-654
- 20 Luthra R, Wu TT, Luthra MG, Izzo J, Lopez-Alvarez E, Zhang L, Bailey J, Lee JH, Bresalier R, Rashid A, Swisher SG, Ajani JA. Gene expression profiling of localized esophageal carcinomas: association with pathologic response to preoperative chemoradiation. *J Clin Oncol* 2006; 24: 259-267
- 21 An JY, Fan ZM, Zhuang ZH, Qin YR, Gao SS, Li JL, Wang LD. Proteomic analysis of blood level of proteins before and after operation in patients with esophageal squamous cell carcinoma at high-incidence area in Henan Province. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3365-3368
- 22 Qi Y, Chiu JF, Wang L, Kwong DL, He QY. Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Proteomics* 2005; 5: 2960-2971
- 23 Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P, Heinecke A, Pantel K, Izbicki JR. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1840-1847
- 24 Shen ZY, Hu SP, Lu LC, Tang CZ, Kuang ZS, Zhong SP, Zeng Y. Detection of human papillomavirus in esophageal carcinoma. *J Med Virol* 2002; 68: 412-416
- 25 Murphy SJ, Anderson LA, Johnston BT, Fitzpatrick DA, Watson PR, Monaghan P, Murray LJ. Have patients with esophagitis got an increased risk of adenocarcinoma? Results from a population-based study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7290-7295
- 26 Leon X, Quer M, Diez S, Orus C, Lopez-Pousa A, Burgues J. Second neoplasm in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 1999; 21: 204-210
- 27 Homs MY, Kuipers EJ, Siersema PD. Palliative therapy. *J Surg Oncol* 2005; 92: 246-256
- 28 Yang HS, Zhang LB, Wang TW, Zhao YS, Liu L. Clinical application of metallic stents in treatment of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 451-453
- 29 Cominos M, Mosleh-Shirazi MA, Tait D, Henrys A, Cornes P. Quantification and reduction of cardiac dose in radical radiotherapy for oesophageal cancer. *Br J Radiol* 2005; 78: 1069-1074
- 30 Abdel-Latif MM, Raouf AA, Sabra K, Kelleher D, Reynolds JV. Vitamin C enhances chemosensitization of esophageal cancer cells in vitro. *J Chemother* 2005; 17: 539-549
- 31 Wang Y, Zhu H, Quan L, Zhou C, Bai J, Zhang G, Zhan Q, Xu N. Downregulation of Survivin by RN-Ai Inhibits the Growth of Esophageal Carcinoma Cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 974-978
- 32 Zhao JX, Qu Y, Chen XZ. Clinical observation on effect of fuzheng yiliu granule on cell cycle and nuclear transcription factor-kappa B in tissue of esophagealgastric carcinoma *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2003; 23: 908-910
- 33 Zhao JX, Li XF. Effects of Fuzheng Yiliu Granule on expression of CD44v6 and nm23-H1 in esophageal carcinoma treated with radiotherapy *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2004; 2: 262-264
- 34 Gao XP, Zhao WX, Zhang ZL. Effect of huangqi zengmian powder on interstitial response in patients with esophageal cancer at peri-operational period *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2001; 21: 171-173
- 35 Cho WC. New medical trend-personalized medicine. *Popular Medicine* 2004; 10: 74-75

■同行评价

本文对目前食管癌治疗的最新进展做了详细论述,对临床研究和治疗有一定参考作用。

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

ntPCR-RFLP检测HBV阿德福韦耐药变异—rtA181V变异

闫杰, 谢雯, 王磊, 王晶波, 冯鑫, 宋淑静, 刘顺爱, 魏红山

■背景资料

阿德福韦酯是抗HBV核苷类似物, 目前发现HBV对该药存在耐药现象, 已得到学术界公认的耐药株有两种: rtN236T变异和rtA181V变异。研究针对该药物的HBV耐药变异快速检测方法对指导临床合理用药意义重大。

闫杰, 谢雯, 冯鑫, 宋淑静, 刘顺爱, 魏红山, 北京地坛医院北京市 100011
王磊, 王晶波, 山东大学医学院济南市传染病医院 山东省济南市 250021

首都医学发展科研基金, No. 2002-3046

通讯作者: 闫杰, 100011, 北京市安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院, jieyan@bbn.cn

电话: 010-64211031-2330 传真: 010-64281540

收稿日期: 2006-03-06 接受日期: 2006-03-16

Application of nest PCR-RFLP in the detection of adefovir dipivoxil resistance-associated mutation in hepatitis B virus

Jie Yan, Wen Xie, Lei Wang, Jing-Bo Wang, Xin Feng, Shu-Jing Song, Shun-Ai Liu, Hong-Shan Wei

Jie Yan, Wen Xie, Xin Feng, Shu-Jing Song, Shun-Ai Liu, Hong-Shan Wei, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Lei Wang, Jing-Bo Wang, Ji'nan Hospital of Infectious Diseases, Medical College of Shandong University, Ji'nan 250021, Shandong Province, China

Supported by the Capital Medical Science Foundation, No. 2002-3046

Correspondence to: Jie Yan, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China. jieyan@bbn.cn

Received: 2006-03-06 Accepted: 2006-03-16

Abstract

AIM: To establish a simple, accurate and practical method for the detection of adefovir dipivoxil resistance-associated mutation (rtA181V mutation) in hepatitis B virus.

METHODS: Four shares of serum were collected from patients who had been treated with adefovir dipivoxil for more than 1 year, and HBV DNA replication reoccurred. Two pairs of primers were designed to amplify the region of HBV reverse transcriptase codon 181(rt181) in order to introduce a *Bsp*I restriction site upon PCR product of wild type (wt). After amplification, the PCR products were digested with *Bsp*I and then subjected to electrophoresis. The patterns of rtA181V mutation were detected by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

RESULTS: Of the 4 patients, rtA181V mutation

was detected in 2 cases by the above method. The established nest PCR-RFLP assay could detect HBV DNA at the level of 10^3 copies/L. The result of RFLP analysis was in accordance with that of DNA sequencing.

CONCLUSION: The ntPCR-RFLP assay is a rapid, simple, specific and sensitive method for the detection of rtA181V mutation in HBV.

Key Words: Adefovir dipivoxil; Hepatitis B virus; Mutation

Yan J, Xie W, Wang L, Wang JB, Feng X, Song SJ, Liu SA, Wei HS. Application of nest PCR-RFLP in the detection of adefovir dipivoxil resistance-associated mutation in hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):714-717

摘要

目的: 建立一种简便、快速、实用的乙型肝炎病毒(HBV)阿德福韦(ADV)耐药变异—rtA181V变异的快速检测方法。

方法: 根据GenBank收录的HBV基因全序设计巢式PCR引物, 使野生株(rt181 A)PCR产物中含有*Bsp*I酶切位点(5'-GCTNAGC3'), 而变异株(rt181V)无此限制性酶切位点。选取4份应用ADV治疗1 a以上出现HBV DNA反跳的临床耐药慢性乙型肝炎患者血清, 经PCR扩增、*Bsp*I酶切、30 g/L琼脂糖凝胶电泳, 进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析。并选择经该方法鉴定的野生株及变异株各一例进行HBV RT区基因序列分析及对照质粒的构建。

结果: 自4份血清标本中检测到2例rtA181V变异。所建立的ntPCR-RFLP方法灵敏度高, 可以检测到 10^3 copies/L的HBV DNA; 特异性强, 其RFLP分析结果与DNA测序结果一致。

结论: 应用ntPCR-RFLP方法检测rtA181V变异具有灵敏、特异、简便的优点, 适用于ADV耐药变异的临床监测工作。

表 1 PCR引物序列

引物	nt	序列
P1	105-122	5'CCTCACCCATATCGTCAA3'
P2	1 255-1 238	5'CCTCACCCATATCGTCAA3'
rt181up	362-380	5'CCTGGT(C)TATCGC(T)TGGATGT 3'
rt181low	692-672	5'TGAACAAATG(T)GCACTAGTAAGCTGA 3'

rt aa seq 176-S	P	F	L	L	A	Q	F	T	S
nt seq 655-AGT	CCG	TTT	CTC	CTG	GCT	CAG	TTT	ACT	AGT
						rt181 low primer			
		L	A	Q	F				
(wild)rt 181A	CTG	GCT	CAG	CTT					
		B/p I site							
		L	V	Q	F				
(mutant)rt 181V	CTG	GTT	CAG	CTT					
		no B/p I site							

图 1 PCR-RFLP检测rtA181V变异的设计.

关键词: 阿德福韦; 肝炎病毒; 乙型; 变异

闫杰, 谢雯, 王磊, 王磊波, 冯鑫, 宋淑静, 刘顺爱, 魏红山. ntPCR-RFLP检测HBV阿德福韦耐药变异—rtA181V变异. 世界华人消化杂志 2006;14(7):714-717
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/714.asp

0 引言

抗乙型肝炎病毒(HBV)新药-阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)已经国家食品药品监督管理局(SFDA)批准在我国上市. 临床研究表明ADV能有效地抑制HBV DNA复制, 使HBV DNA滴度迅速降低, 而且在出现拉米夫定(lamivudine)耐药的患者中ADV能继续有效地抑制变异株^[1-3]. 但随着ADV的长期应用, 目前已发现该药亦存在耐药现象; 现已得到学术界公认的耐药株有两种: rtN236T变异和rtA181V变异^[4-5]. 此前我们已建立了基于巢式聚合酶链反应-限制性片段长度多态技术(ntPCR-RFLP assay)的rtN236T变异快速检测方法^[6]. 进一步应用该技术建立用于rtA181V变异的快速检测方法, 以期对ADV耐药变异进行更为全面的监测.

1 材料和方法

1.1 材料 4份慢性乙型肝炎(CHB)血清取自北京地坛医院及济南传染病医院就诊患者. 4患者均应用ADV治疗1 a以上, 治疗过程中曾出现HBV DNA阴转, 此后再次出现HBV DNA反跳.

1.2 方法 胃采用异硫氰酸胍一步法提取血清中

的DNA. 待检血清50 μL加入含4 mol/L异硫氰酸胍的裂解液60 μL, 37℃温育10 min; 加入酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)50 μL, 震荡混匀后13 000 g离心10 min; 取上清, 加入等量异丙醇, -20℃沉淀2 h, 13 000 g离心10 min, 弃上清; 加入600 mL/L乙醇50 μL, 13 000 g离心10 min, 弃上清, 室温干燥后加入双蒸水20 μL溶解, -20℃保存.

rtA181V变异是由于HBV基因组第671碱基由胞嘧啶(C)突变为胸腺嘧啶(T), 从而导致HBV聚合酶B区rt181氨基酸由丙氨酸(alanine, A)变异为缬氨酸(valine, V)(图1). 故而以此为基础, 检索GenBank收录的HBV基因全序, 采用Primer Premier 5.0及Oligo 6.67软件辅助分析, 设计巢式PCR引物(外引物: P1、P2, 内引物: rt181up, rt181low); 旨在使野生株(rt181 A)PCR产物中含有B/p I 酶切位点(5' GCTNAGC3'), 而变异株(rt181V)无此限制性酶切位点(图1, 表1).

以血清提取物为模板进行巢式PCR反应: 30 μL PCR反应体系含Taq酶1 U, 10×扩增缓冲液3 μL, 25 mol/L dNTP 0.12 μL、50 μmol/L引物0.12 μL; 第一轮PCR模板为血清提取物6 μL, 引物为P1, P2; 第二轮PCR模板为第一轮PCR产物3 μL, 引物为rt181up, rt181low. 两轮PCR循环条件均为94℃ 3 min, 94℃ 10 s, 53℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 30循环, 72℃ 7 min. 取第二轮PCR产物8 μL, 以10 g/L琼脂糖凝胶电泳, EB染色后于紫外灯下观察结果, 于331 bp处出现荧光条带者为

■创新盘点

本文应用ntPCR-RFLP技术对rtA181V变异进行快速检测, 显示其具有灵敏、特异、简便、实用之优点.

■同行评价

本文针对常见的HBV的ADV耐药株建立了一种操作简单、反应灵敏的检测方法,具有较好的实用性,具有推广价值。

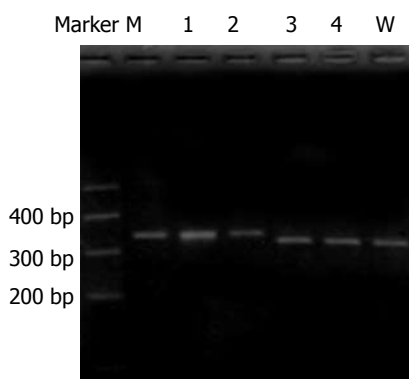


图2 *Bsp* I 酶切产物电泳结果. M: 变异型对照质粒; W: 野生型对照质粒; 1-4: 血清标本。

阳性。

Bsp I 酶切: 10 μ L酶切反应体系内含第二轮PCR产物8 μ L, *Bsp* I 10 U, 酶切缓冲液1 μ L, 于37 $^{\circ}$ C酶切4 h. 将全部酶切产物以30 g/L琼脂糖凝胶电泳, EB染色后于紫外灯下观察结果. PCR产物经酶切后野生株较变异株缺失21 bp, 故电泳速度稍快。

对照质粒的构建: 同时采用PCR产物直接测序方法对经该方法鉴定的野生株及变异株进行HBV RT区基因序列分析(方法见参考文献[7], 序列测定由上海生工生物工程技术服务公司完成); 并将上述PCR产物纯化后与T-载体(美国Promega公司)连接, 构建重组质粒, 转化JM109菌, 经双脱氧末端终止法进行测序鉴定后用作对照质粒。

2 结果

以不同HBV DNA浓度的血清提取物为模板进行PCR检测, 终检浓度为 10^3 copies/L(HBV DNA荧光定量试剂盒购自深圳匹基生物技术公司), 表明该巢式PCR反应具有良好的灵敏度. 阳性标本PCR产物大小与预期值相符(331 bp), 表明该巢式PCR反应具有高度特异性. RFLP分析: *Bsp* I 酶切后电泳结果显示, 4份血清标本中有2份被完全酶切, 为野生株(rt181A); 尚有2份未被酶切, 为变异株(rt181V)(图2). HBV RT区基因序列测定结果与RFLP分析结果一致(图3), 并将2条变异株RT区基因序列提交至GenBank, 其序列号(accession number)分别为: DQ343155、DQ343156。

3 讨论

随着ADV临床应用时间的延长, 与之相关的HBV

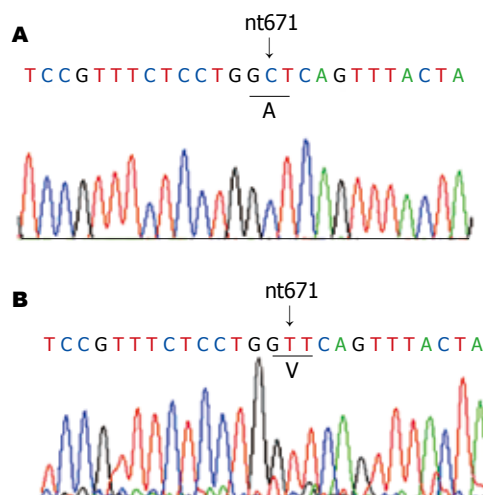


图3 HBV RT区基因序列测定结果. A: 野生型对照质粒(nt: GCT, aa: A); B: 变异型对照质粒(nt: GGT, aa: V)。

耐药变异发生率亦逐年增多, 并且该类耐药变异的出现可能会导致严重的肝脏失代偿^[8]. 我国HBV慢性感染患者众多, 在ADV广泛应用之前应建立完善的耐药监测体系以指导临床合理用药^[9], 为此亟待建立一种简便、快速的ADV耐药变异检测方法. 目前得到学术界公认的耐药株有两种: rtN236T变异和rtA181V变异^[4-5], 此前我们已建立了基于巢式聚合酶链反应-限制性片段长度多态技术(ntPCR-RFLP assay)的rtN236T变异快速检测方法^[6]; 为了能够对ADV耐药变异进行更为全面的监测, 进一步应用该技术建立用于rtA181V变异的快速检测方法。

在技术路线方面, 仍采用用于检测rtN236T变异的ntPCR-RFLP技术和30 g/L琼脂糖凝胶电泳; 是因为基于上述技术的拉米夫定耐药变异检测方法已为国内众多实验室广泛应用, 具有灵敏、特异、简便、实用之优点^[10-13], 故而采用该技术便于在国内推广, 建立全国性的完善的ADV耐药监测体系。

目前已有两种品牌的阿德福韦酯在我国上市, 随着用药时间的延长, 已有部分患者出现HBV DNA反跳, 甚至临床症状的加重. 我们应用ntPCR-RFLP技术检测4例服用ADV 1 a以上出现临床耐药的患者的血清中HBV变异情况, 发现2例rtA181V变异和1例rtN236T(将于另文报道); 可见对ADV耐药变异进行临床监测确系刻不容缓。

4 参考文献

- 1 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG,

- Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis Be antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 800-807
- 2 Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis Be antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 808-816
- 3 Schiff ER, Lai CL, Hadziyannis S, Neuhaus P, Terrault N, Colombo M, Tillmann HL, Samuel D, Zeuzem S, Lilly L, Rendina M, Villeneuve JP, Lama N, James C, Wulfsohn MS, Namini H, Westland C, Xiong S, Choy GS, Van Doren S, Fry J, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology* 2003; 38: 1419-1427
- 4 Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A, Locarnini S. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 2003; 125: 292-297
- 5 Villeneuve JP, Durantel D, Durantel S, Westland C, Xiong S, Brosgart CL, Gibbs CS, Parvaz P, Werle B, Trepo C, Zoulim F. Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient. *J Hepatol* 2003; 39: 1085-1089
- 6 闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴钊. ntPCR-RFLP检测HBV阿德福韦耐药变异—rtN236T变异. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 543-545
- 7 闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 李蕴钊. 拉米夫定治疗中病毒核酸无应答患者体内乙型肝炎病毒逆转录酶基因变异分析. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 130-132
- 8 Fung SK, Andreone P, Han SH, Rajender Reddy K, Regev A, Keeffe EB, Hussain M, Cursaro C, Richtmyer P, Marrero JA, Lok AS. Adefovir-resistant hepatitis B can be associated with viral rebound and hepatic decompensation. *J Hepatol* 2005; 43: 937-943
- 9 茅益民, 曾民德. 抗乙型肝炎新药—阿德福韦酯. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 61-63
- 10 封波, 魏来, 陈明, 李秀华. 包含YMDD基因序列的乙型肝炎病毒P区基因变异的研究. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 29-31
- 11 丁静娟, 张伟三, 张莉莎. 乙型肝炎病毒耐拉米夫定多聚酶基因变异检测方法研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2004; 18: 24-27
- 12 赵平, 李捍卫, 楼敏, 程勇前, 兰云, 福军亮. 拉米夫定耐药的慢性乙肝患者联合干扰素或苦参素治疗疗效观察. *中华实验和临床病毒学杂志* 2004; 18: 80-82
- 13 刘艳, 胡毅文, 乐晓华, 王召钦, 袁静, 林奕, 骆子义, 蒋小玲. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎1-3年随访结果. *中华传染病杂志* 2004; 22: 204-206

电编 李琪 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 •

第一届北京国际消化内镜高峰论坛

本刊讯 第一届北京国际消化内镜高峰论坛将于2006-06-02/04在北京举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

中英文结构式摘要(800字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-04-30截稿.

2 联系方式

北京东单三条甲七号中华医学会北京分会消化内镜委员会崔宇星 (100005); 电话010-85111196; E-mail: xhnj1196@yahoo.com.cn.

TLR4基因多态性与慢性胃炎幽门螺杆菌感染无相关性

华开罗, 夏冰, 李春, 郭秋莎

■背景资料

幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染是慢性胃炎的主要病因。脂多糖(LPS)通过Toll样受体4(TLR4)激活NF- κ B, 在抗感染免疫应答中起着启动及调节作用。TLR4基因发生Asp299Gly突变可中断TLR4介导LPS信号传导。本文旨在研究人群TLR4基因-299位点A/G多态性与慢性胃炎及幽门螺杆菌感染的关系。

华开罗, 武汉大学医学院附属中山医院消化内科 湖北省武汉市 430033

夏冰, 武汉大学中南医院综合医疗科 湖北省武汉市 430071
李春, 郭秋莎, 武汉大学中南医院综合医疗科, 湖北省武汉市 430071

通讯作者: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科. bingxia2004@yahoo.com.cn

电话: 027-67812985-2985 传真: 027-87330795

收稿日期: 2005-12-22 接受日期: 2006-01-26

No association between Toll-like receptor-4 gene polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in chronic gastritis

Kai-Luo Hua, Bing Xia, Chun Li, Qiu-Sha Guo

Kai-Luo Hua, Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430033, Hubei Province, China
Bing Xia, Department of Internal Medicine and Geriatrics, Research Center of Digestive Diseases, Zhongnan Hospital, Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Chun Li, Qiu-Sha Guo, Department of Internal Medicine and Geriatrics, Research Center of Digestive Diseases, Zhongnan Hospital, Key Lab of Allergy and Immune-related Diseases, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Bing Xia, Department of Internal Medicine and Geriatrics, Research Center of Digestive Diseases, Zhongnan Hospital, Wuhan University School of Medicine, 169 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. bingxia2004@yahoo.com.cn

Received: 2005-12-22

Accepted: 2006-01-26

Abstract

Aims: To study the distribution of Toll-like receptor-4 (TLR4) gene Asp299Gly polymorphism and to define association between TLR4 genotype and *Helicobacter Pylori* associated chronic gastritis in Han Chinese of Hubei province.

Methods: One hundred and fifteen patients with chronic superficial gastritis and 264 healthy controls were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for TLR4 gene Asp299Gly polymorphism. Meanwhile, *H. pylori* infection was also detected in all the individuals.

Results: The rate of *H. pylori* infection was 89.6% in patients with chronic superficial gastritis, and 61.7% in the healthy controls, and there was significant difference between them ($P < 0.0001$, $OR = 5.319$, 95% CI: 2.784-10.162). All the individuals had the same TLR4 Asp299Gly genotypes (AA). The distributions of the genotypes and allele frequencies of TLR4 Asp299Gly were not significantly different between gastritis patients and healthy controls.

Conclusion: There is no marked correlation between TLR4 Asp299Gly polymorphism and *H. pylori* associated chronic gastritis in Han Chinese of Hubei province.

Key Words: Toll-like receptor 4; *Helicobacter Pylori*; lipopolysaccharide; gene polymorphism

Hua KL, Xia B, Li C, Guo QS. No association between Toll-like receptor-4 gene polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in chronic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):718-721

摘要

目的: 研究我国湖北汉族人群TLR4基因Asp299Gly多态性与慢性浅表性胃炎及幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染的关系。

方法: 采用病例-对照研究和多聚酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法, 检测115例慢性浅表性胃炎患者115例和正常对照者264例的TLR4等位基因Asp299Gly基因型分布。

结果: 慢性浅表性胃炎患者的*H. pylori*阳性率89.6%, 显著高于正常对照组61.7% ($P < 0.0001$, $OR = 5.319$, 95% CI: 2.784-10.162)。在*H. pylori*感染相关性的慢性胃炎组和正常对照组中TLR4基因Asp299Gly基因型所有个体均为AA纯合子, 未发现的突变型, 其基因型、等位基因以及携带者频率总体分布无显著性差异。

结论: TLR4基因Asp299Gly基因多态性与*H. pylori*相关性慢性胃炎无明显相关性。

关键词: Toll样受体4; 幽门螺杆菌; 基因多态性

华开罗, 夏冰, 李春, 郭秋莎. TLR4基因多态性与慢性胃炎幽门螺杆菌感染无相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(7):718-721

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/718.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是人类最常见的慢性感染之一,也是慢性胃炎病因之一。然而,仅极少部分的*H pylori*感染者发展成为慢性胃炎,具体机制除了可能与细菌数量、毒力以及环境因素有关外,可能与宿主的易感性、胃肠黏膜内环境也存在一定的关系。TLR4是细菌LPS的受体^[1],在LPS诱导的信号传导中起着重要作用^[2]。TLR4将LPS传导通路的信号迅速传至核内,激活NF- κ B通路,刺激NO分泌,消灭病原;此外,激活相关细胞因子表达,释放促炎细胞因子,激活特异性免疫反应^[3],因而在机体的先天性免疫中起到重要作用。近年来,Arbour *et al*^[4]证实Asp299Gly多态性与LPS的反应减低有关,Asp299Gly等位基因杂合子和纯合子个体与野生型基因型的个体相比,吸入性LPS的气道反应明显减低。小鼠TLR4基因突变导致对LPS无反应,或LPS信号途径的抑制。野生型TLR4的表达增强可使LPS信号传导增强。我们将TLR4基因与*H pylori*感染相关性慢性胃炎研究联系起来,研究TLR4基因突变与*H pylori*感染相关性慢性胃炎先天性免疫的关系,为阐明*H pylori*感染相关性慢性胃炎的遗传易感性和先天性免疫机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 慢性浅表性胃炎疾病患者115例来源武汉大学中南医院,于2001-12/2003-04经临床、实验室、放射学、内镜及组织学检查综合性诊断,符合悉尼分类标准^[5]。男60例,女55例,平均年龄55.2岁。正常体检者264例,男134例,女130例,平均年龄39.2岁。DNA提取:取3 mL抗凝血,用蛋白酶K(Merck公司)/酚/氯仿法提取基因组DNA。

1.2 方法 TLR4 Asp299Gly基因PCR扩增:PCR引物根据文献[6]设计(PCR(I)primers For *Bsa*B I. F1: 5'-ttagaatgaaggaaacttgaaaag-3'. R1: 5'-ttgtcaacaattaataagtgaata-3'. PCR(II)primers For *Bst*X I. F2: 5'-agcactactagactaccctcgatg-3'. R2: 5'-gttgccatccgaattataagaaaag-3'),由上海生物工程技术有限公司合成。PCR反应体系总体积25 μ L,含灭菌双蒸水18.5 μ L,10 \times

PCR反应缓冲液2.5 μ L,每侧引物各10 pmol, dNTPs(Clontech公司)(10 mmol/L)0.5 μ L, Taq DNA聚合酶(Biostar公司)1 U, DNA模板1 μ L(约40-100 ng)。反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性3 min,接着38个循环,94 $^{\circ}$ C变性45 s,51 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,72 $^{\circ}$ C终末循环5 min,最后置于4 $^{\circ}$ C终止反应。限制性内切酶消化PCR扩增产物:取10 μ L PCR(I)产物,用限制性内切酶*Bsa*B I(MBI公司)0.5 μ L(10 MU/L)于65 $^{\circ}$ C消化酶切4 h,于80 $^{\circ}$ C灭活20 min;取10 μ L PCR(II)产物,用限制性内切酶*Bst*X I(MBI公司)0.5 μ L(10 MU/L)于55 $^{\circ}$ C消化酶切4 h,后于65 $^{\circ}$ C灭活20 min。对消化后的PCR产物片段采用80 g/L的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V, 1.5 h)分离,硝酸银染色分析基因型。所有研究对象均采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),测定*H pylori*-IgG,检测*H pylori*感染,按照说明常规操作,Detect-ELISA试剂盒由香港大学玛利亚医院惠赠。慢性浅表性胃炎疾病患者同时采用胃窦黏膜组织快速尿素酶试验(pH值指示剂法,试纸提供为福建三强生物化工有限公司),检测*H pylori*感染。正常体检者采用¹⁴C-尿素呼气试验,检测*H pylori*感染。检测前所有研究对象均未行抗*H pylori*治疗。诊断*H pylori*感染参照安徽桐城会议通过的共识意见^[7],2项均为阳性诊断*H pylori*感染。

统计学处理 直接判读个体基因型,以 χ^2 检验和精确概率法检验分析病例组和对照组TLR4 Asp299Gly基因型及等位基因分布差异,统计在SPSS 11.0软件包中进行。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4基因Asp299Gly多态性 在中国湖北汉族人群中,TLR4基因Asp299Gly等位基因位点均为野生型A,未见突变型G等位基因,A频率及AA基因型频率均为100%。扩增的PCR(I)产物长139 bp,PCR(II)产物长131 bp。若TLR4基因Asp299Gly多态性位点碱基为A(腺嘌呤,野生型),则PCR(I)产物被内切酶*Bsa*B I酶切后有112 bp和27 bp两个片段;若Asp299Gly多态性位点碱基为G(鸟嘌呤,突变型)时,则PCR(II)产物被内切酶*Bst*X I酶切成108 bp和23 bp。故基因型AA纯合子其PCR(I)产物可为*Bsa*B I酶切为112 bp和27 bp片段,其PCR(II)产物则不能为*Bst*X I切开;基因型GG纯合子其PCR(I)产

■名词解释

Toll样受体(Toll like receptor, TLR)是一类跨膜受体,与I型IL-1受体结构同源,信号传导途径相同,通过识别并结合相应的病原相关模式(PAMP),在免疫应答的诱导和炎症反应中发挥重要作用。TLR4表达于胃肠上皮细胞、DC等多种细胞表面,识别LPS。

■同行评价

疾病发病的遗传学研究是当今临床医学研究的热点,遗传学研究的方法常包括研究参与发病的相关分子基因多态性、以及基因突变等。本文的目的为研究TLR4基因多态性与慢性胃炎幽门螺杆菌感染的相关性,选题较新颖、准确。

物不能被*Bsa*B I 切开,其PCR(II)产物则被*Bst*X I 酶切为108 bp和23 bp片段;基因型AG杂合子其PCR(I)产物可为*Bsa*B I 酶切为112 bp和27 bp片段,PCR(II)产物则被*Bst*X I 酶切为108 bp和23 bp片段。

2.2 TLR4基因Asp299Gly多态性与*H pylori*感染的相关性 慢性胃炎*H pylori*感染率为89.6%,正常对照*H pylori*携带率为61.7%;两组TLR4基因Asp299Gly基因型频率,等位基因频率及携带者频率总体分布无显著性差异,二组TLR4基因Asp299Gly基因型所有个体均为AA纯合子。

3 讨论

研究证明*H pylori*的感染率与社会经济地位是密切相关的,发达国家的感染率是明显低于发展中国家,其成人的感染率<40%,我国人群感染率为20%-80%,在我们的研究中,正常人的*H pylori*感染率是61.7%,与以上的研究结果一致。同时大量研究资料显示:*H pylori*感染率高的地区和国家人群的胃炎的发病率也较高。如发展中国家同发达的欧美国家比较,*H pylori*感染相关胃炎的发病率也高。通过对湖北汉族人群*H pylori*感染的检测,发现胃炎组*H pylori*感染率显著高于对照组($P<0.0001$, $OR = 5.319$, 95% CI: 2.784-10.162)。我们通过PCR限制性片段长度多态性分析的方法,对115例慢性浅表性胃炎患者及264例正常对照者TLR4基因Asp299Gly基因型及等位基因分布进行检测,发现所有样本均为野生型基因型,提示突变基因型在中国湖北汉族人群中少见。

研究发现胃上皮中树突状细胞能通过胃上皮细胞间的紧密连接,到达胃黏液层与*H pylori*接触^[8-9],*H pylori*能够特异地定植于胃黏膜的黏液层下、上皮细胞表面。在活体内胃上皮细胞可以表达TLR^[10]。Bauditz *et al*^[11]对*H pylori*感染相关性胃炎进行研究,发现LPS引起胃黏膜单核细胞分泌大量IL-12,在胃上皮细胞表达的TLRs可以与*H pylori*的LPS相互作用后,通过TLR4/CD14可激活单核巨噬细胞分泌细胞因子^[12],如TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8等,引起胃黏膜的炎症。Su *et al*^[13]发现临床相关的I型*H pylori*和II型*H pylori*感染能激活TLR4基因的表达, Kawahara *et al*^[14]发现I型*H pylori*的脂质A可以激活TLR4途径。我们将慢性胃炎患者按*H pylori*感染分类后,TLR4基因Asp299Gly多态性突变型并不多见,与正常对照组相比无显著差异。我们的研究提示TLR4

基因多态性不影响中国汉族*H pylori*感染相关性慢性浅表性胃炎。

将中国汉族与日本人、英国及德国白种人的TLR4基因的Asp299Gly多态性分布进行了比较,我们发现不同人群中TLR4基因Asp299Gly等位基因频率及基因型频率的分布存在显著性差异。其中中国汉族人与日本人^[6]的分布频率及基因型频率的分布无明显差异性,即均未在所检测的样本中发现TLR4基因Asp299Gly的突变位点,与德国人(5.6%)^[15]、英国人^[16](6.23%)的突变频率存在明显差异。因此,亚洲人该等位基因频率及基因型频率分布较欧洲白种人明显减低,而且TLR4基因Asp299Gly突变基因型并不多见。在中国汉族人群中AA基因型频率(100%)显著高于德国人群(85%)($P<0.0001$, $OR = 99.881$, 95% CI: 5.862-1 701.0)。欧亚人种在TLR4基因Asp299Gly等位基因及基因型频率分布的不同,表明种族差异和遗传背景的不同,可能影响TLR4基因多态性在慢性浅表性胃炎发病的遗传机制中的作用。另外也可能与有CD14协同与TLR4在*H pylori* LPS的抗原呈递和胞内的信号传导中发挥作用有关。TLR4基因多态性在慢性浅表性胃炎疾病的作用,有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 20-26
- 2 Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000; 164: 966-972
- 3 Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274: 10689-10692
- 4 Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191
- 5 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181
- 6 Okayama N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Fujiwara M, Matsubara T, Maekawa T, Hazama S, Oka M, Nohara H, Kayano K, Okita K, Hinoda Y. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the Toll-like receptor-4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 56-58
- 7 Consensus on the management of *Helicobacter Pylori* infection: Tongcheng, Anhui Province, 2003. *Chin J*

- Dig Dis* 2004; 5: 186-188
- 8 Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2: 361-367
- 9 Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 2002; 196: 1079-1090
- 10 Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josephans C, Muller-Hermelink HK, Eck M. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter Pylori* infection. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 521-526
- 11 Bauditz J, Ortner M, Bierbaum M, Niedobitek G, Lochs H, Schreiber S. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter Pylori*. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 316-323
- 12 Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002; 347: 185-192
- 13 Su B, Ceponis PJ, Lebel S, Huynh H, Sherman PM. *Helicobacter Pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2003; 71: 3496-3502
- 14 Kawahara T, Teshima S, Oka A, Sugiyama T, Kishi K, Rokutan K. Type I *Helicobacter Pylori* lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect Immun* 2001; 69: 4382-4389
- 15 Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem* 2002; 48: 1661-1667
- 16 Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarek EB, di Giovine FS, Dower SK, Cannings C, Wilson AG. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001; 184: 640-642

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 •

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项通知如下:

1 征文内容

(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、意外性胆囊癌、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 征稿要求

(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、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(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。E-mail: wushuodong@yahoo.com.cn

肝硬化红细胞钠钾ATP酶、钙镁ATP酶及钠钾钙镁改变

王方剑, 刘安立, 曹洁, 卢永宏, 赵青娥, 韩升祥, 蒙玲

■背景资料

肝硬化时机体内环境紊乱并导致病情加重,甚至诱发肝性脑病。肝硬化细胞外液离子紊乱已有较多报道,但对细胞内离子状况的研究报道较少。钾镁主要存在于细胞内,细胞内低钾低镁将导致细胞代谢和生理功能障碍。细胞内外的离子交换受多因素调控。游离态离子水平和离子通道状况为目前研究热点。有关肝硬化时细胞内镁和ATP酶的问题已有少量报道,但多为分离性指标观察。本研究同步观察了钠钾ATP酶、钙镁ATP酶和细胞内外钠钾钙镁改变,发现细胞内低钾低镁和钠钙相对增加,钠钾ATP酶和钙镁ATP酶活性降低为钠钾钙镁细胞内外异常分布的原因之一为主要创新点。其意义在于指导临床关注肝硬化缺钾缺镁的问题,并积极寻找有效治疗方法。

王方剑, 刘安立, 卢永宏, 赵青娥, 韩升祥, 天津解放军第464医院内二科 天津市南开区 300381
曹洁, 天津解放军第464医院特诊科 天津市南开区 300381
蒙玲, 93735部队进修生
通讯作者: 王方剑, 300381, 天津市南开区李七庄, 解放军第464医院内二科. 49269356@51uc.com
电话: 022-23383929
收稿日期: 2005-12-12 接受日期: 2005-12-31

Changes of activities of erythrocyte membrane $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ and concentrations of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} in erythrocytes of patients with liver cirrhosis

Fang-Jian Wang, An-Li Liu, Jie Cao, Yong-Hong Lu, Qing-E Zhao, Sheng-Xiang Han, Ling Meng

Fang-Jian Wang, An-Li Liu, Yong-Hong Lu, Qing-E Zhao, Sheng-Xiang Han, the Second Department of Internal Medicine, the 464th Hospital of Chinese PLA, Tianjin 300381, China

Jie Cao, Department of Ultrasonic Diagnosis, the 464th Hospital of Chinese PLA, Tianjin 300381, China
Ling Meng, Advanced Student from Troop 93735 of Chinese PLA

Correspondence to: Fang-Jian Wang, the Second Department of Internal Medicine, the 464th Hospital of Chinese PLA, Nankai District, Tianjin 300381, China. 49269356@51uc.com

Received: 2005-12-12 Accepted: 2005-12-31

Abstract

AIM: To probe the activity changes of erythrocyte membrane $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (NKA) and $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ (CMA) and their effects on the concentrations of intracellular sodium, potassium, calcium and magnesium in patients with liver cirrhosis.

METHODS: The erythrocyte membrane NKA and CMA activities, and the erythrocyte and serum sodium, potassium, calcium and magnesium (RNa, RK, RCa, RMg; SNa, SK, SCa, SMg) concentrations were measured in 52 patients with decompensated cirrhosis (group A), 36 patients with compensated cirrhosis (group B) and 36 healthy individuals (controls).

RESULTS: Compared with those in control

group, the activities of NKA, CMA and the concentrations of RK and RMg in both group A ($t = 5.92, P < 0.001; t = 7.21, P < 0.001; t = 2.32, P < 0.02; t = 4.79, P < 0.001$) and group B ($t = 3.83, P < 0.001; t = 2.53, P < 0.02; t = 2.03, P < 0.05; t = 3.33, P < 0.002$) were decreased significantly. Compared with those in group B, the activities of NKA and CMA in group A ($t = 2.29, P < 0.05; t = 4.14, P < 0.005$) were decreased significantly. The concentrations of RNa and RCa did not differ between among the three groups. In comparison with those in control group, the concentrations of SNa, SK, SCa and SMg were lowered significantly in group A ($t = 8.25, P < 0.001; t = 5.73, P < 0.001; t = 9.82, P < 0.001; t = 6.15, P < 0.001$); and in comparison with those in group B, the concentrations of SNa, SK, SCa and SMg were also lowered significantly in group A ($t = 6.94, P < 0.001; t = 5.00, P < 0.001; t = 5.57, P < 0.001; t = 5.73, P < 0.001$). The activities of NKA and CMA and the concentrations of RK, RMg, SNa, SK, SCa and SMg were markedly lower in patients at Child C stage than those at Child B stage ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The activities of NKA and CMA and the concentrations of RK, RMg, SNa, SK and SMg were also markedly lower in patients with hepatoencephalopathy than those without hepatoencephalopathy ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). In group A, the activities of NKA and CMA in patients with decreased SMg concentration were lower than those with normal SMg concentration (16.87 ± 3.19 vs $19.04 \pm 3.25; 109.83 \pm 13.51$ vs 120.13 ± 13.27 ; both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The deficiencies of potassium and magnesium exist in the patients with liver cirrhosis, deteriorating with advanced disease condition. The decreased NKA and CMA activities lead to a decrease of intracellular potassium and magnesium and increase of sodium and calcium. Magnesium deficiency is one of the reasons for decreased NKA and CMA activities in advanced cirrhosis.

Key Words: Liver cirrhosis; Erythrocyte; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$; $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$

Wang FJ, Liu AL, Cao J, Lu YH, Zhao QE, Han SX, Meng L. Changes of activities of erythrocyte membrane $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ and concentrations of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} in erythrocytes of patients with liver cirrhosis.

K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase and concentrations of Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ in erythrocytes of patients with liver cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(7):722-726

摘要

目的: 探讨肝硬化时细胞内钠钾钙镁的改变及细胞膜钠钾ATP酶(NKA)、钙镁ATP酶(CMA)活性改变在细胞内钠钾钙镁改变中的作用。

方法: 测定了52例肝硬化失代偿期(实验组A)、36例代偿期(实验组B)患者红细胞及血清钠钾钙镁(RNa、RK、RCa、RMg; SNa、SK、SCa、SMg)含量和NKA和CMA活性。以36名健康人为对照组。

结果: 与对照组比较, 实验组A的NKA、CMA、RK、RMg($t = 5.92, P < 0.001; t = 7.21, P < 0.001; t = 2.32, P < 0.02; t = 4.79, P < 0.001$)和实验组B的NKA、CMA、RK、RMg($t = 3.83, P < 0.001; t = 2.53, P < 0.02; t = 2.03, P < 0.05; t = 3.33, P < 0.002$)均显著降低; 与实验组B比较, 实验组A的NKA、CMA活性($t = 2.29, P < 0.05; t = 4.14, P < 0.005$)显著降低。与对照组比较, 实验组A的SNa、SK、SCa、SMg($t = 8.25, P < 0.001; t = 5.73, P < 0.001; t = 9.82, P < 0.001; t = 6.15, P < 0.001$)显著降低; 与实验组B比较, 实验组A的SNa、SK、SCa、SMg($t = 6.94, P < 0.001; t = 5.00, P < 0.001; t = 5.57, P < 0.001; t = 5.73, P < 0.001$)显著降低。与Child B级组比较, Child C级组的NKA、CMA、RK、RMg、SNa、SK、SCa、SMg($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)显著降低。与非肝性脑病组比较, 肝性脑病组NKA、CMA、RK、RMg、SNa、SK、SMg($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)显著降低。实验组A中, 低SMg者的NKA和CMA显著低于高SMg者(16.87 ± 3.19 vs $19.04 \pm 3.25; 109.83 \pm 13.51$ vs $120.13 \pm 13.27; P$ 均 < 0.05)。

结论: 肝硬化患者存在缺钾缺镁, 且随病情加重而加重, 缺钾缺镁可能为病情加重的原因之一。NKA和CMA活性降低可导致细胞内低钾低镁和钠钙蓄积。缺镁为ATP酶活性在失代偿期进一步降低的原因之一。

关键词: 肝硬化; 红细胞; Na⁺-K⁺-ATP酶; Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶

王方剑, 刘安立, 曹洁, 卢永宏, 赵青娥, 韩升祥, 蒙玲. 肝硬化红细胞钠钾ATP酶、钙镁ATP酶及钠钾钙镁改变. 世界华人消化杂志 2006;14(7):722-726

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/722.asp>

0 引言

肝硬化患者多有血钠钾钙镁降低。慢性进展过程中多种因素^[1]可能导致患者存在缺钾缺镁。钾镁主要存在于细胞内, 细胞内钾镁的降低可较好地反映机体总的钾镁的降低。细胞内钾镁对细胞外钾镁水平和细胞内的代谢具有重要的调节功能。缺钾缺镁势必对机体造成不良影响。肝硬化患者细胞外液钠钾钙镁代谢紊乱已为临床重视。而细胞内钠钾钙镁含量的改变少有报道。了解该病时红细胞内钠钾钙镁的改变, 以及红细胞膜钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性改变及其在细胞内钠钾钙镁改变中的作用具有实际临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 实验组A, 肝硬化失代偿期患者52例, 男33例, 女19例, 年龄平均为 48.3 ± 10.5 岁。实验组B, 肝硬化代偿期患者36例, 男22例, 女14例, 年龄平均为 46.6 ± 9.7 岁。实验组A、B均为病毒性肝炎后性肝硬化, 根据病史、体征、生化和图像资料诊断, 对照组健康人36例, 男24例, 女12例, 年龄平均为 45.9 ± 7.6 岁。采血前1 mo内未使用钙镁制剂、氨基糖甙类抗生素、钙阻滞剂、糖皮质激素和洋地黄类药物。实验组A、B为2003-04/2005-10我院住院患者, 对照组为此期间健康体检者。

1.2 方法 入院次日7时采空腹肘静脉血。NKA和CMA活性的测定采用沈茂星 *et al*^[2]的方法。Na₂EDTA抗凝血1 200 r/min离心10 min, 弃上清及上层白细胞, 氯化胆碱溶液洗涤红细胞3次, 将红细胞1 200 r/min离心10 min, 取0.2 mL红细胞消化处理。未抗凝血1 200 r/min离心10 min, 分离血清。钠钾测定采用火焰分光光度计。钙镁测定采用原子吸收分光光度计。盛血器皿均经200 g/L硝酸浸泡24 h, 18.3 kΩ去离子水冲洗6遍, 干燥备用。同时测定丙氨酸转氨酶(ALT)、血清胆红素(SB)、血清白蛋白(AIB)和凝血酶原时间(PT)。

统计学处理 t 检验和相关系数显著性检验。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 肝硬化患者NKA、CMA和红细胞内外钠钾钙镁改变(表1) 实验组A、B的NKA、CMA活性均显著低于对照组($P < 0.01$)。实验组A者亦显著

■ 研发前沿

细胞内外的离子交换受多因素调控。游离态离子水平和离子通道状况为目前研究热点。

■创新盘点

有关肝硬化时细胞内镁和ATP酶的问题已有少量报道,但多为分离性指标观察。本研究同步观察了钠钾ATP酶、钙镁ATP酶和细胞内外钠钾钙镁改变,发现细胞内低钾低镁和钠钙相对增加,钠钾ATP酶和钙镁ATP酶活性降低为钠钾钙镁细胞内外异常分布的原因之一。

表 1 红细胞ATP酶活性与离子含量 (mean ± SD)

项目	对照组 (n = 36)	实验组A (n = 52)	实验组B (n = 36)	P值					
				^a t	^a P	^b t	^b P	^c t	^c P
NKA	21.48 ± 3.87	16.12 ± 4.33	18.12 ± 3.57	5.92	<0.001	3.83	<0.001	2.28	<0.05
CMA	130.72 ± 13.45	108.80 ± 14.40	122.10 ± 15.43	7.21	<0.001	2.53	<0.02	4.14	<0.005
RNa	5.43 ± 2.67	4.82 ± 1.32	4.78 ± 2.74	1.42	>0.05	1.03	>0.05	0.04	>0.05
RK	149.10 ± 19.60	141.20 ± 12.38	143.10 ± 12.60	2.32	<0.02	2.03	<0.05	0.70	>0.05
RCa	0.83 ± 0.11	0.79 ± 0.13	0.82 ± 0.16	1.48	>0.05	0.31	>0.05	0.97	>0.05
RMg	2.39 ± 0.28	2.16 ± 0.17	2.21 ± 0.16	4.79	<0.001	3.33	<0.002	1.38	>0.05
SNa	140.10 ± 3.80	131.10 ± 5.70	138.80 ± 4.12	8.25	<0.001	1.39	>0.05	6.9	<0.001
SK	4.45 ± 0.44	3.67 ± 0.73	4.38 ± 0.53	5.73	<0.001	0.61	>0.05	5.00	<0.001
SCa	2.51 ± 0.31	1.88 ± 0.23	2.27 ± 0.42	9.82	<0.001	1.75	>0.05	5.57	<0.001
SMg	1.24 ± 0.43	0.76 ± 0.30	1.15 ± 0.33	6.15	<0.001	1.00	>0.05	5.73	<0.001

ATP酶活性单位: $\mu\text{molPi} \cdot \text{gHb}^{-1}/12 \text{ h}$, 离子单位: mmol/L ; ^aP、^bP为对照组分别与实验组A、B比较, ^cP为实验组A、B比较。

表 2 失代偿期患者不同Child分级组红细胞ATP酶活性与离子含量 (mean ± SD)

项目	B级 (n = 29)	C级 (n = 23)	t	P
NKA	17.42 ± 3.43	15.32 ± 3.25	2.20	<0.05
CMA	114.28 ± 12.04	106.17 ± 13.23	2.26	<0.05
RNa	5.05 ± 1.08	4.82 ± 1.24	0.70	>0.05
RK	143.43 ± 10.22	135.64 ± 8.46	2.89	<0.01
RCa	0.82 ± 0.10	0.79 ± 0.18	0.76	>0.05
RMg	2.18 ± 0.58	1.80 ± 0.54	2.42	<0.02
SNa	132.12 ± 4.22	129.34 ± 3.53	2.48	<0.02
SK	3.72 ± 0.63	3.32 ± 0.44	2.53	<0.01
SCa	1.97 ± 0.17	1.83 ± 0.22	2.59	<0.02
SMg	0.78 ± 0.17	0.66 ± 0.21	2.26	<0.05

表 3 肝性脑病患者与非肝性脑病患者细胞内外钙镁值 (mean ± SD)

项目	非肝性脑病组 (n = 41)	肝性脑病组 (n = 11)	t	P
NKA	18.38 ± 3.47	15.12 ± 3.05	2.81	<0.01
CMA	119.34 ± 12.63	104.67 ± 14.43	3.29	<0.01
RNa	4.95 ± 1.23	5.32 ± 1.14	0.70	>0.05
RK	145.43 ± 11.42	134.96 ± 10.36	2.73	<0.01
RCa	0.74 ± 0.21	0.75 ± 0.17	0.45	>0.05
RMg	2.31 ± 0.54	1.82 ± 0.62	2.57	<0.02
SNa	133.42 ± 3.82	129.36 ± 3.35	3.19	<0.01
SK	3.84 ± 0.71	3.28 ± 0.42	2.43	<0.05
SCa	2.12 ± 0.24	1.94 ± 0.28	1.44	>0.05
SMg	0.87 ± 0.25	0.62 ± 0.23	2.89	<0.01

低于实验组B者 ($P < 0.05$)。红细胞钠钙三组间无显著差异 ($P > 0.05$)。实验组A、B的红细胞钾镁均显著低于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。实验组A的血钠钾钙镁显著低于对照组和实验组B ($P < 0.01$

表 4 低血镁与非低血镁患者红细胞钠钾ATP酶、钙镁ATP酶 (mean ± SD)

项目	非低血镁组 (n = 16)	低血镁组 (n = 36)	t	P
NKA	19.04 ± 3.25	16.87 ± 3.19	2.23	<0.05
CMA	120.13 ± 13.27	109.83 ± 13.51	2.51	<0.02

或 $P < 0.05$)。

2.2 按Child分级, 不同程度肝硬化失代偿期患者NKA、CMA和红细胞内外钠钾钙镁改变(表2) Child C级组的NKA、CMA活性、红细胞钾镁和血钠钾钙镁均显著低于B级组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。红细胞钠钙两组间无显著差异 ($P > 0.05$)。说明随病情的加重, NKA、CMA活性进一步降低, 缺钾缺镁进一步加重, 而细胞内钠钙相对蓄积。

2.3 失代偿期肝性脑病患者与非肝性脑病患者NKA、CMA和红细胞内外钠钾钙镁改变(表3) 肝性脑病组NKA、CMA、红细胞钾镁、血钠钾钙均显著低于非肝性脑病组 ($P < 0.05$)。红细胞钠钙两组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 失代偿期低血镁与非低血镁患者NKA、CMA改变(表4) 52例失代偿期患者中, SMg低于均值 (< 0.76) 者的NKA活性和CMA活性和SMg均不低于均值者的NKA活性和CMA活性相比均显著降低 ($P < 0.05$)。

2.5 相关性分析 实验组A中, SMg、RMg与血清白蛋白显著正相关 ($r = 0.28, P < 0.05; r = 0.37, P < 0.01$)。SK与SMg、RK与RMg均显著正相关 ($r = 0.31, P < 0.05; r = 0.33, P < 0.02$)。血钠钾钙镁与细胞内钠钾钙镁间无显著相关性。

3 讨论

3.1 肝硬化患者缺钾缺镁 肝硬化失代偿期血钾镁降低已为临床重视. 实验组A的SK和SMg显著低于对照组, 与文献[3-5]报道一致. 钾镁主要存在于细胞内, 细胞内低钾低镁反映出机体缺钾缺镁. 血钾镁常与细胞内钾镁改变不一致, 难以准确反映机体是否缺钾缺镁. Koivisto *et al*^[6]对晚期肝硬化患者进行了镁负荷实验, 发现患者处于缺镁状态. Faa *et al*^[7]对一例56岁Wilson's病肝硬化死亡患者脑组织进行尸检化验, 发现除铜明显增高外, 镁显著降低. Aagaard *et al*^[8-9]发现酒精性肝硬化时肌肉钾镁降低. Chacko *et al*^[10]发现酒精性和病毒性肝硬化时肌肉镁亦降低. 实验组A的RK和RMg显著低于对照组. 综合文献和本实验结果, 说明失代偿期患者存在缺钾缺镁. RK与RMg显著正相关, 体现钾镁的同步性改变. 实验组B的SK和SMg显著高于实验组A, 与对照组无显著差异, 但其RK和RMg仍显著低于对照组, 而与实验组A间无显著差异. 说明代偿期患者也存在缺钾缺镁. 而低血钾主要为失代偿期的急性表现. 细胞内钾镁明显高于细胞外液. 耗能性NKA和CMA的逆浓度差将钾镁转入细胞的“泵”机制是维持细胞内高钾高镁的主要机制. 肝硬化时肝细胞血循环和营养障碍可能导致“泵”机制障碍, 从而导致肝细胞内低钾低镁. 肝脏中镁含量与红细胞相近^[11], 肝硬化时红细胞内低镁可能反映了肝细胞内的低镁. 尚需实际研究证实.

Chacko *et al*^[10]对酒精性和非酒精性肝硬化多因素回归分析显示, 肝性脑病与低钾镁显著且独立相关, 认为低钾镁与肝性脑病有关. 将实验组A进一步分组后显示, Child C级组的SK、SMg、RK、RMg均显著低于B级组. 肝性脑病组的SK、SMg、RK、RMg均显著低于非肝性脑病组. 说明随病情的加重缺钾缺镁进一步加重. 提示在肝性脑病的多种发生机制中, 缺钾缺镁可能起一定作用.

3.2 肝硬化患者细胞内钠钙蓄积 肝硬化失代偿期SNa和SCa降低. 在血钠钙降低的同时, 实验组A、B和对照组间RNa和RCa无显著差异. 将实验组A进一步分组后显示, Child C级组的SNa、SCa均显著低于B级组, 肝性脑病组的SNa显著低于非肝性脑病组, SCa于肝性脑病组亦有降低趋势, 但两组间RNa和RCa无显著差异. 表明细胞内钠钙相对增加, 细胞内钠钙蓄积.

3.3 ATP酶活性改变在缺钾缺镁和细胞内钠钙蓄积的作用 NKA和CMA是调节细胞内外钠钾钙镁正常分布的主要机制之一, 导致其活性的改变的机制是多方面的. Muriel *et al*^[12]研究发现, 实验性肝硬化大鼠的红细胞和肝细胞Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性降低, α -干扰素保护了ATP酶的功能, 并显著降低了实验大鼠的死亡率. Kuralay *et al*^[13]发现, 慢性活动性肝炎及肝硬化患者Na⁺-K⁺-ATP酶降低, 肝组织病理学改变与红细胞生化改变具有良好的相关性. Na⁺-K⁺-ATP酶活性的测定可以作为可信地评价肝纤维化的指标. Kurup *et al*^[14]发现, 慢性肝病时地高辛样物质合成和自由基增高, 红细胞膜Na(+)-K+ATP酶活性和血镁降低. Aagaard *et al*^[8-9]发现酒精性肝硬化肌肉钾镁降低的同时, NKA活性亦降低. 实验组A、B的NKA和CMA活性均显著低于对照组, 实验组A者显著低于实验组B者; Child C级组的NKA和CMA活性显著低于B级组; 肝性脑病组NKA和CMA显著低于非肝性脑病组; 表明, NKA和CMA活性的降低在细胞内低钾低镁和钠钙蓄积的形成中起重要作用. NKA和CMA活性均为镁依赖性, 缺镁时NKA和CMA活性将显著降低^[15]. 实验组B的SMg与对照组无显著差异, 其NKA和CMA活性显著低于对照组, 亦显著低于实验组A. 实验组A中, 低SMg者的NKA活性和CMA活性显著低于SMg不低者, 提示低镁为NKA和CMA活性进一步降低的原因之一.

3.4 临床意义 钾镁主要存在于细胞内, 对细胞内的代谢起重要的调节作用. SMg、RMg与血清白蛋白显著正相关, Child C级组的SK、SMg、RK、RMg均显著低于B级组, 肝性脑病组的SK、SMg、RK、RMg均显著低于非肝性脑病组, 表明缺钾缺镁在病情的加重中起一定作用. 细胞内钾镁亦为细胞外钾镁水平的调节池. 病情加重时的血钾镁降低为急性改变, 细胞内低钾低镁对细胞外钾镁的调节能力降低为该血钾镁降低的原因之一. 对患者积极补充钾镁是必要的, 但如何纠正缺钾缺镁有待研究.

近年来, 钙阻滞剂被用于治疗肝硬化门脉高压. 细胞内钙的相对增高为该治疗方法提供了理论基础. 细胞内钠增高的意义有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Cohen L. Magnesium and liver cirrhosis: a hypoth-

■同行评价

本文研究了肝硬化时细胞钠钾ATP酶、钙镁ATP酶及钠钾钙镁改变, 对于指导临床肝硬化缺钾缺钾的治疗有一定实际意义.

- esis. *Magnesium* 1985; 4: 1-4
- 2 沈茂星, 沈惟堂, 林慈, 章红志. 红细胞(Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATP酶和(Na^{+} - K^{+})-ATP酶活性同步测定法. *上海医学检验杂志* 1990; 5: 211-214
- 3 徐钊, 江正辉. 肝硬化腹水患者钾钠氯及酸碱失衡. *新消化病学杂志* 1996; 4: 375-376
- 4 李卫东, 张明磊, 官彦英. 肝硬化患者血清镁检测及其临床意义. *中国老年学杂志* 2004; 2: 115-116
- 5 严志强. 肝硬化患者血清镁含量变化的临床意义. *广东医学* 1999; 20: 452-453
- 6 Koivisto M, Valta P, Hockerstedt K, Lindgren L. Magnesium depletion in chronic terminal liver cirrhosis. *Clin Transplant* 2002; 16: 325-328
- 7 Faa G, Lisci M, Caria MP, Ambu R, Sciort R, Nurchi VM, Silvagni R, Diaz A, Crisponi G. Brain copper, iron, magnesium, zinc, calcium, sulfur and phosphorus storage in Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2001; 15: 155-160
- 8 Aagaard NK, Andersen H, Vilstrup H, Clausen T, Jakobsen J, Dorup I. Muscle strength, Na,K-pumps, magnesium and potassium in patients with alcoholic liver cirrhosis - relation to spironolactone. *J Intern Med* 2002; 252: 56-63
- 9 Aagaard NK, Andersen H, Vilstrup H, Clausen T, Jakobsen J, Dorup I. Decreased muscle strength and contents of Mg and Na,K-pumps in chronic alcoholics occur independently of liver cirrhosis. *J Intern Med* 2003; 253: 359-366
- 10 Chacko RT, Chacko A. Serum & muscle magnesium in Indians with cirrhosis of liver. *Indian J Med Res* 1997; 106: 469-474
- 11 邵美贞主编. 镁的基础与临床. 第1版. 成都: 四川科学技术出版社, 1996: 72
- 12 Muriel P, Bolanos J, Barral JM, Torres G. Effect of alpha-interferon on erythrocyte and hepatocyte plasma membranes derived from cirrhotic rats. *Pharmacology* 1994; 48: 63-68
- 13 Kuralay F, Tanyalcin T, Kutay F, Yuce G, Ersoz G, Batur Y. Erythrocyte membrane Na^{+} , K^{+} ATP ase activity can be a marker of liver histopathology. *Biochem Mol Biol Int* 1996; 40: 769-777
- 14 Kurup RK, Kurup PA. Hypothalamic digoxin, cerebral chemical dominance, and regulation of gastrointestinal/hepatic function. *Int J Neurosci* 2003; 113: 75-105
- 15 Iseri LT, French JH. Magnesium: Nature's physiologic calcium blocker. *Amer Heart Journal* 1984; 108: 188-193

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 •

技法与经验

《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验. 我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿, 免费刊登彩色照片. 写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法

1.1 原理

1.2 适应证

1.3 器材准备

1.4 步骤

1.5 实例

2 结果

3 讨论

3.1 并发症

3.2 优点和缺点

3.3 经验与技巧

4 参考文献

肠胆反流对胆管胆色素结石形成的影响

金俊哲, 吴硕东, 苏洋, 张振海, 张立魁, 孔静

金俊哲, 吴硕东, 苏洋, 张振海, 张立魁, 孔静, 中国医科大学
附属二院普外二科 辽宁省沈阳市 110004
通讯作者: 吴硕东, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号,
中国医科大学附属二院普外二科. jccccc@sina.com
电话: 024-83955062
收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-21

Influence of duodenal-biliary reflux on formation of bile duct pigment gallstone

Jun-Zhe Jin, Shuo-Dong Wu, Yang Su, Zhen-Hai Zhang,
Li-Kui Zhang, Jing Kong

Jun-Zhe Jin, Shuo-Dong Wu, Yang Su, Zhen-Hai Zhang,
Li-Kui Zhang, Jing Kong, the Second Department
of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of China
Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province,
China

Correspondence to: Shuo-Dong Wu, the Second Department
of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of
China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District,
Shenyang 110004, Liaoning Province,
China. jccccc@sina.com

Received: 2006-02-06 Accepted: 2006-02-21

Abstract

AIM: To investigate the possible action and mechanism of duodenal-biliary reflux in the pathogenesis of bile duct pigment gallstone.

METHODS: Forty-eight patients were divided into three groups: polyp of gallbladder (PG, $n = 10$), cholecystolithiasis (CH, $n = 27$) and calculus of bile duct (CBD, $n = 11$). Bile samples were collected during operation for bacterial culture and endotoxin examination. Forty-one patients received T tube drainage after cholecystectomy and choledochotomy were divided into reflux ($n = 16$) and non-reflux group ($n = 25$) according to radionuclide examination. The activity of biliary amylase, lipase and β -glucuronidase were detected in 26 of the 41 patients.

RESULTS: The positive rate of bacterial culture was 0% in PG group, 0% in CH group and 81.8% in CBD group, and the level of endotoxin in bile was $(0.003 \pm 0.004) \times 10^{-6}$, $(0.01 \pm 0.02) \times 10^{-6}$, and $(10.12 \pm 4.49) \times 10^{-6}$ EU/L the above corresponding group, respectively. Compared

with those in the former two groups, the positive rate and endotoxin level were higher in the latter CBD group ($P < 0.01$). Sixteen patients showed duodenal-biliary reflux (39.02%) among 41 patients. The activities of biliary amylase, lipase and exogenous β -glucuronidase in reflux group was significantly higher than those in non-reflux group (amylase: $79\ 891 \pm 91\ 152$ nkat/L vs 582 ± 928 nkat/L, $P < 0.01$; lipase: $86\ 110 \pm 58\ 255$ nkat/L vs $6\ 124 \pm 7\ 500$ nkat/L, $P < 0.01$; β -glucuronidase: $27\ 789 \pm 13\ 849$ nkat/L vs $15\ 369 \pm 7\ 533$ nkat/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Duodenal-biliary reflux can promote the formation of pigment gallstone through bacteria, endotoxin, amylase, lipase and exogenous β -glucuronidase.

Key Words: Duodenal-biliary reflux; Pigment gallstone; Bacteria; Endotoxin; Amylase; Lipase; β -glucuronidase

Jin JZ, Wu SD, Su Y, Zhang ZH, Zhang LK, Kong J. Influence of duodenal-biliary reflux on formation of bile duct pigment gallstone. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):727-730

摘要

目的: 探讨肠胆反流与胆色素结石形成间的相关性及其可能的作用机制。

方法: 胆囊息肉组($n = 10$), 胆囊结石组($n = 27$)和胆管结石组($n = 11$)患者48例, 术中穿刺获得胆汁标本, 行胆汁细菌培养及内毒素测定。另外, 胆囊切除、胆道探查、T管引流术后患者41例根据核素检查有无肠胆反流分为反流组($n = 16$)及无反流组($n = 25$), 随机选择其中26例, 比较两组患者胆汁淀粉酶、脂肪酶及 β -葡萄糖醛酸酶活性。

结果: 胆囊息肉组、胆囊结石组、胆管结石组细菌培养阳性率分别为0%, 0%, 81.8%; 胆汁内毒素水平分别为 $(0.003 \pm 0.004) \times 10^{-6}$ 、 $(0.01 \pm 0.02) \times 10^{-6}$ 、 $(10.12 \pm 4.49) \times 10^{-6}$ EU/L; 胆管结石组细菌培养阳性率和胆汁内毒素水平明显高于前两组($P < 0.01$)。16/41例患者检

■背景资料

目前多数研究者认为, 胆色素结石的形成与细菌感染有关, 而细菌来源于肠道。但具体途径尚不明确, 或者经过十二指肠乳头逆行入胆道, 或者穿透肠黏膜屏障进入胆道。由于缺乏有效的研究方法, 关于胆石症患者肠胆反流的发生率如何以及肠胆反流促使胆管胆色素结石形成机制的研究, 国内外鲜见报道。

■研发前沿

胆石的形成受机体内外环境和遗传等多因素影响,随着 β -葡萄糖醛酸酶基因的克隆和产物表达成功,胆色素结石形成机制进入了基因领域研究,在此方面我们也同样是刚刚起步,目前还没有突破性进展。

测到十二指肠胆道反流(39.02%),反流组淀粉酶、脂肪酶和外源性 β -葡萄糖醛酸酶显著高于无反流组($79\,891 \pm 91\,152$ nkat/L vs 582 ± 928 nkat/L, $P < 0.01$; $86\,110 \pm 58\,255$ nkat/L vs $6\,124 \pm 7\,500$ nkat/L, $P < 0.01$; $27\,789 \pm 13\,849$ nkat/L vs $15\,369 \pm 7\,533$ nkat/L, $P < 0.01$)。

结论:十二指肠胆道反流可能通过细菌、内毒素、淀粉酶、脂肪酶和外源性 β -葡萄糖醛酸酶活性改变,在胆色素结石的形成中发挥作用。

关键词: 肠胆反流; 胆色素结石; 细菌; 内毒素; 淀粉酶; 脂肪酶; β -葡萄糖醛酸酶

金俊哲, 吴硕东, 苏洋, 张振海, 张立魁, 孔静. 肠胆反流对胆管胆色素结石形成的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(7):727-730

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/727.asp>

0 引言

胆石病在我国常见,尤其欧美等国家少见的肝内外胆管色素类结石病,在我国还占有很高比例。有关胆管色素结石的成因研究在相当长的一段时间内没有取得重大进展,而十二指肠胆道反流在胆管色素结石形成中的作用愈来愈引起人们的重视。我们观察到胆管胆色素结石的形成可能与十二指肠胆道反流存在一定联系。为分析二者间的相关性及可能的内在机制,我们选择临床胆石症患者进一步研究。以十二指肠胆道反流-胆管胆汁中十二指肠内含物增加-胆汁细菌、内毒素及酶学改变-胆色素结石形成作为线索,对胆管色素结石患者胆管胆汁细菌和内毒素进行观察,并以核素判断反流为基础,对胆管色素结石术后T型管引流患者分组,观察胆汁中淀粉酶、脂肪酶、 β -葡萄糖醛酸酶等系列指标,分析肠胆反流与胆管结石成因之间的关系,探讨胆色素结石的形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-05/2006-01,住院治疗患者89例,全部患者无发热及胆系感染表现,血白细胞正常。其中胆囊息肉患者10例,胆囊结石患者27例,胆管色素结石患者11例,胆囊切除、胆道探查、T型管引流术后患者41例,各组间比较差异无显著性($P > 0.05$)。T型管引流患者因为需行胆道镜检查,术后常规保留T型管2 mo左右,平均术后时间62.3(59-66) d。细菌培养原料(法国生物梅里埃公司),鲎试剂及细菌内毒素检查用水(湛

江博康海洋生物制品公司),细菌内毒素标准品(中国药品生物制品检定所),内毒素检测处理剂(天津一瑞化学试剂有限公司),酚酞葡萄糖醛酸(Sigma公司)。

1.2 方法 术中穿刺获得胆囊及胆管胆汁标本,分别行胆汁细菌培养、胆汁内毒素测定。随机选择T型管引流患者26例,根据核素检查肠胆反流,将患者分为反流组及无反流组,分别测定胆汁淀粉酶、脂肪酶及 β -葡萄糖醛酸酶活性。细菌培养采用脱纤维羊血琼脂和中国蓝培养基,细菌鉴定采用全自动细菌鉴定系统。以去热源管收集胆汁标本,每份标本平行做2管,于BET-32B型细菌内毒素测定仪上,采用动态浊度法检测胆汁内毒素。T型管引流患者于检查前禁食1夜,口服1 mL含有185 MBq的 ^{99m}Tc -DTPA(diethylene triamine pentaacetic acid)溶液,以240 mL水漱服,患者立即平卧。经T型引流管收集接下来的2 h胆汁,取20 mL,采用RM905型放射活性检测仪计数放射性活度。如胆汁中可检测到放射性活度,则判定该患者存在十二指肠胆道反流^[1]。以改良Fishman方法,分别在pH 4.6和6.8比色波长550 nm检测内、外源性 β -葡萄糖醛酸酶活性。使用日立7170A全自动生化分析仪测定胆汁淀粉酶和脂肪酶。

统计学处理 使用SPSS 11.5统计软件进行统计,用mean \pm SD表示,分别进行 χ^2 检验、 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

胆管色素结石组11例胆汁培养细菌种类分别为大肠埃希菌5例,产酸克雷伯菌2例,产气肠杆菌1例,阴沟肠杆菌1例,细菌培养阳性率达81.8%,并且都是肠道细菌。而胆囊息肉组和胆囊胆固醇结石组细菌培养全部阴性,二者间有明显差异($P < 0.01$)。胆汁内毒素水平与细菌培养结果一致,胆管色素结石组(10.12 ± 4.49) $\times 10^{-6}$ EU/L明显高于胆囊息肉组(0.003 ± 0.004) $\times 10^{-6}$ EU/L和胆囊胆固醇结石组(0.01 ± 0.02) $\times 10^{-6}$ EU/L($P < 0.01$),说明胆管色素结石与细菌及内毒素有关。口服 ^{99m}Tc -DTPA证实,41例行胆道取石T型管引流术后的患者中有16例检测到十二指肠胆道反流(占39.02%),此16例反流阳性患者的2 h胆汁中得计数为 $0.099\,6 \pm 0.162\,4$ MBq,2 h胆汁引流量 38.5 ± 17.2 mL,其余25例胆汁样品中未检测到放射性活度,2 h胆汁引流量 35.9 ± 20.6 mL。由此将T型管引流患者分为反流组16

■创新盘点

我们使用了核素判定肠胆反流的新方法,以胆道探查、T型管引流术后患者为依托进行分组,并比较胆汁中各有效促成石成分,系统地进行了肠胆反流的发生及其与胆管胆色素结石形成的关系研究。

表 1 胆汁淀粉酶、脂肪酶和 β -葡萄糖醛酸酶活性 (mean \pm SD, nkat/L)

分组	n	淀粉酶	脂肪酶	β -葡萄糖醛酸酶	
				外源性	内源性
反流组	10	79 891 \pm 91 152 ^b	86 110 \pm 58 255 ^b	27 789 \pm 13 849 ^b	1 377 \pm 669
无反流组	16	582 \pm 928	6 124 \pm 7 500	15 369 \pm 7 533	1 217 \pm 584

^b $P < 0.01$ vs 无反流组.

例和无反流组25例. 随机选取反流组10例及无反流组16例测定胆汁淀粉酶、脂肪酶和 β -葡萄糖醛酸酶活性, 两组间性别、年龄分布和引流量比较, 差异无显著性($P > 0.05$). 胆汁淀粉酶、脂肪酶和外源性 β -葡萄糖醛酸酶活性均较无反流组明显增高($P < 0.01$, 表1), 两组间数值相差达几倍至上百倍; 而内源性 β -葡萄糖醛酸酶活性两组间无统计学差异($P > 0.05$).

3 讨论

胆色素结石的形成是一种与细菌感染、胆汁成分代谢异常、胆汁淤滞等多种因素相关的多机制参与的病理过程^[2-4]. 我们再次证实, 胆管色素结石组胆汁中细菌及内毒素远高于胆囊息肉组和胆囊胆固醇结石组, 细菌及内毒素与胆管色素结石具有密切关系. 那么细菌及内毒素的来源就成为问题的焦点, 十二指肠内容物胆道反流和细菌移位^[5]及内毒素吸收入血^[6]是已知的两种原因, 我们倾向于十二指肠胆道反流起更重要作用, 不仅仅是细菌和内毒素, 十二指肠内的其他成分也可能是胆色素结石形成的原因. 有人发现体外成石胆汁中加入十二指肠液, 可以促进结石的形成, 但没有人体实验结果支持. 为了观察二者之间的相关性, 分析其可能的作用机制和地位, 我们选用了临床实验, 对相关指标进行了检测. 肠胆反流是一种非正常现象, 只有在一些病理情况下, 如胆肠吻合术后或Oddi括约肌切开等, 才存在肠胆反流. 而对于正常人及未处理Oddi括约肌的胆石症患者是否存在肠胆反流研究尚少, 且无统一的检查手段, 临床上能确定十二指肠胆道反流的有效方法较少. 我们对胆道取石T管引流术后的患者采用^{99m}Tc-DTPA检测十二指肠胆道反流, 其原理是高分子量的^{99m}Tc-DTPA不能穿透肠道黏膜, 并且不经肝脏排泄. 因此如果在胆汁中测到放射性活度, 则判断存在肠胆反流. 我们发现41例T管引流术后患者中16例存在明显的肠胆反流, 发生率为39.02%. 可见在此类患者中肠胆反流这种异常现象发生

率非常高, 其他研究表明胆总管探查取石及T型管引流术后患者胆总管结石再发率达10.3%左右, 这可能也与十二指肠胆道反流高发生率有关^[7]. 为评价十二指肠胆道反流在胆色素结石形成中的作用, 以此检查为依托将胆汁标本分为反流组和无反流组, 进一步检测其成分区别来判定十二指肠胆道反流在胆色素结石形成中的意义. 结果可见, 反流组胆汁中淀粉酶、脂肪酶含量和外源性 β -葡萄糖醛酸酶明显高于非反流组, 这些现象证实了胆色素结石与十二指肠胆道反流之间具有一定的相关性. 发生肠胆反流时, 十二指肠内容物主要包含有食物、细菌、各种消化酶及激素等进入胆道可能与胆管色素结石形成有关.

我们认为, 十二指肠胆道反流造成胆管结石的一个重要因素是细菌. 本胆管色素结石组细菌培养的阳性率为81.8%, 并证实胆汁中细菌以肠道细菌为主. 细菌进入胆道后引起胆管结石的原因有许多学说, 1966年Maki首先提出 β -葡萄糖醛酸酶水解胆汁中的结合胆红素, 生成非结合胆红素和葡萄糖醛酸, 非结合胆红素又与胆汁中的钙离子结合, 生成不溶性的胆红素钙^[8]. 而大多数细菌都能产生 β -葡萄糖醛酸酶, 促使胆石形成^[4]. 本反流组外源性 β -葡萄糖醛酸酶远高于非反流组, 而外源性 β -葡萄糖醛酸酶主要是细菌产生的. 多数细菌还能产生磷脂酶, 降解卵磷脂成为软脂酸, 形成软脂酸钙沉淀, 同时由于胆汁中卵磷脂减少, 胆红素溶解度降低, 也可促进游离胆红素与钙结合发生沉淀, 细菌磷脂酶对磷脂的降解, 也会降低胆汁中胆固醇的溶解度促进成核^[9]. 细菌还可以产生多糖蛋白质复合物, 这种阴离子糖蛋白使细菌易于黏附到异物表面形成微小菌落, 促使胆色素沉淀和凝聚^[10]. 细菌产生的自由基是胆红素钙形成的触发因子, 使胆红素与钙形成沉淀的条件溶解度常数变小, 促使胆色素沉淀, 自由基还通过糖蛋白的作用促进成石^[11]. 除了上述原因引起结石形成以外, 细菌还可以产生内毒素, 肠道内毒素也可反流

■应用要点

由于胆管胆色素结石的形成与肠胆反流有密切关系, 因此Oddi括约肌作为防止肠胆反流发生的阀门, 他的功能状态值得注意, 临床上也可以给予相应的处理来治疗和预防胆管胆色素结石, 如调控Oddi括约肌的药物等, 并需重新评价Oddi括约肌切开、成型以及胆肠吻合的效果和作用.

■名词解释

肠胆反流就是十二指肠液的胆道反流,也有人称之为肠胆逆流或胆肠返流。肠胆反流是一种非正常现象,只有在一些病理情况下,如胆肠吻合术后或Oddi括约肌切开等,才存在肠胆反流。

进入胆道,内毒素除了本身的疏水核心与胆汁微胶粒相互作用成核,作为结石的成核因子以外,还可能通过细胞毒效应或其他机制激活肝脏细胞、胆道上皮细胞或胆汁中的白细胞,释放内源性 β -葡萄糖醛酸酶,参与结石形成^[12]。本反流组胆汁淀粉酶和脂肪酶升高,主要有2种可能:一是富含胰酶的十二指肠液反流入胆道,二是存在胰胆管合流异常,胰液反流入胆汁^[13-14]。因此胆道反流可被认为是此结果的主要原因。胰脂肪酶是消化脂肪的主要消化酶,在胆汁中适宜的pH环境下胆盐激活胰脂肪酶,可分解甘油三酯为脂肪酸、甘油一酯和甘油^[15]。胰酶中还有胆固醇酯水解酶及磷脂酶A₂,分别水解胆固醇酯和卵磷脂,前者生成胆固醇和脂肪酸,后者生成溶血卵磷脂和脂肪酸。而脂肪酸与钙离子结合成脂肪酸钙盐,可行成结石核心^[16]。脂肪酸还与胆固醇竞争胆盐及卵磷脂的结合位点,促使胆固醇溶解度降低形成结晶。这些可能都与胆管色素结石形成有关。除了细菌、内毒素及各种酶,十二指肠内食物也可能通过反流进入胆道。反流入胆道的食物,作为胆道异物起到结石的成核作用,胆汁中的黏蛋白、胆红素钙、细菌及其他物质会围绕此核心聚集,形成结石。

基于以上结果,我们推测十二指肠胆道反流可能通过细菌、内毒素、各种酶导致胆汁内、外源性的 β -葡萄糖醛酸酶活性改变,从而在胆色素结石的形成环节中发挥作用。作为防止十二指肠液反流的Oddi括约肌,其功能状态与肠胆反流的发生存在密切的关系。人类Oddi括约肌解剖结构上与猫类相似,其特点是收缩时不能排泄胆汁,胆汁仅在收缩间期排至十二指肠。研究显示猫类及负鼠的Oddi括约肌即使在十二指肠压高达45 cm H₂O时仍能排泄胆汁而无肠胆反流发生^[17],可见功能正常的Oddi括约肌是防止肠胆反流发生的重要条件。而当Oddi括约肌功能运动不良时,便失去了对胆汁排泄所起的单向阀门作用,不能阻止十二指肠内容物逆流至胆管内,成为结石形成的重要原因。这些证据提示十二指肠胆道反流在胆管色素结石的形成中起着重要作用,而Oddi括约肌异常则可能是根源所在,这有待于进一步研究证实。

4 参考文献

- 1 Sun SL, Wu SD, Zhang XB. Oral (99m)Tc-DTPA simultaneous determination of duodenobiliary reflux and intestinal permeability in patients

- after choledocholithotomy plus T-tube drainage. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 593-596
- 2 Swidsinski A, Lee SP. The role of bacteria in gallstone pathogenesis. *Front Biosci* 2001; 6: E93-E103
- 3 Jayanthi V, Anand L, Ashok L, Srinivasan V. Dietary factors in pathogenesis of gallstone disease in southern India-a hospital-based case-control study. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 97-99
- 4 Stewart L, Oesterle AL, Erdan I, Griffiss JM, Way LW. Pathogenesis of pigment gallstones in Western societies: the central role of bacteria. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 891-903
- 5 Choudhry MA, Rana SN, Kavanaugh MJ, Kovacs EJ, Gamelli RL, Sayeed MM. Impaired intestinal immunity and barrier function: a cause for enhanced bacterial translocation in alcohol intoxication and burn injury. *Alcohol* 2004; 33: 199-208
- 6 Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Patsoukis N, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopu CD. Evidence for intestinal oxidative stress in obstructive jaundice-induced gut barrier dysfunction in rats. *Acta Physiol Scand* 2004; 180: 177-185
- 7 Hwang JH, Yoon YB, Kim YT, Cheon JH, Jeong JB. Risk factors for recurrent cholangitis after initial hepatolithiasis treatment. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 364-367
- 8 Rege RV. The role of biliary calcium in gallstone pathogenesis. *Front Biosci* 2002; 7: e315-e325
- 9 Sunami Y, Tazuma S, Chayama K. Is a role of phospholipase A(2) in cholesterol gallstone formation phospholipid species-dependent? *Biochim Biophys Acta* 2001; 1532: 51-59
- 10 Stewart L, Ponce R, Oesterle AL, Griffiss JM, Way LW. Pigment gallstone pathogenesis: slime production by biliary bacteria is more important than beta-glucuronidase production. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 547-553
- 11 Liu XT, Hu J. Relationship between bilirubin free radical and formation of pigment gallstone. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 413-417
- 12 Vitetta L, Best SP, Sali A. Single and multiple cholesterol gallstones and the influence of bacteria. *Med Hypotheses* 2000; 55: 502-506
- 13 Tashiro S, Imaizumi T, Ohkawa H, Okada A, Katoh T, Kawaharada Y, Shimada H, Takamatsu H, Miyake H, Todani T. Pancreaticobiliary maljunction: retrospective and nationwide survey in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 345-351
- 14 Kamisawa T, Amemiya K, Tu Y, Egawa N, Sakaki N, Tsuruta K, Okamoto A, Munakata A. Clinical significance of a long common channel. *Pancreatology* 2002; 2: 122-128
- 15 Wang DQ, Zhang L, Wang HH. High cholesterol absorption efficiency and rapid biliary secretion of chylomicron remnant cholesterol enhance cholelithogenesis in gallstone-susceptible mice. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1733: 90-99
- 16 Konikoff FM, Gilat T. Effects of fatty acid bile acid conjugates (FABACs) on biliary lithogenesis: Ppotential consequences for non-surgical treatment of gallstones. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5: 171-175
- 17 Calabuig R, Weems WA, Moody FG. Choledochoduodenal flow: effect of the sphincter of Oddi in opossums and cats. *Gastroenterology* 1990; 99: 1641-1646

■同行评价

文章有较好的科学性、创新性和可读性,有一定的学术意义。

采用内科综合治疗方法抢救暴发性肝豆状核变性1例

何纲, 杨旭

何纲, 中南大学湘雅二医院肝病中心研究生, 湖南省长沙市 410011

杨旭, 中南大学湘雅二医院肝病中心 湖南省长沙市 410011

通讯作者: 杨旭, 410011, 湖南省长沙市人民中路86号, 中南大学湘雅二医学院肝病中心. yangxu@vip.163.com

电话: 0731-5292105

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-13

摘要

患者, 男, 13岁, 血红蛋白41 g/L, 铜蓝蛋白190 mg/L, K-F环(+), 尿铜8 067 μg/24 h, 凝血酶原时间(PT) 25.8 s, 总胆红素722.6 μmol/L, 诊断为暴发性肝豆状核变性并重度溶血。采用青霉胺、血浆置换、糖皮质激素和输血等内科综合治疗, 39 d后患者明显好转出院。

关键词: 肝豆状核变性; 暴发; 血浆置换; 青霉胺

何纲, 杨旭. 采用内科综合治疗方法抢救暴发性肝豆状核变性1例. 世界华人消化杂志 2006;14(7):731-732

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/731.asp>

0 引言

肝豆状核变性(Wilson Disease, WD)是常染色体隐性遗传性铜代谢障碍性疾病。暴发性肝豆状核变性临床少见, 病情凶险, 早期诊断困难, 如不进行肝移植, 死亡率几乎为100%^[1]。我们最近采用血浆置换、糖皮质激素和青霉胺等内科综合治疗方法, 成功抢救1例暴发性肝豆状核变性患者, 现报道如下。

1 病例报告

患者, 男, 13岁, 学生, 汉族, 湖南人。因乏力, 纳差1 mo, 发热、腹痛、皮肤黄染进行性加深4 d, 于2005-06-19急诊入院, 住院号554733。患者1 mo前无明显诱因出现乏力、纳差, 但无厌油及腹胀。入院4 d前突发畏寒、发热, 全腹疼痛, 为阵发性绞痛, 呕吐4-5次, 呕吐物为胃内容物, 无血块及咖啡色液体, 无腹泻。并出现皮肤巩膜黄染, 进行性加深, 小便浓茶样。患者既往体质一般, 否认“肝炎”等传染病史, 家族中无类似病史, 父母非近亲结婚。入院体查: 体

温36.5℃、脉搏80次/min、呼吸20次/min、BP 13.97 kPa/6.65 kPa、体质量36 kg。营养发育正常, 神清合作, 自动体位, 急性重病容, 重度贫血貌, 深度黄疸, 无肝掌、蜘蛛痣, 无出血点及皮疹。心肺无明显异常。腹平坦, 上腹部有压痛及反跳痛, 肝脾肋下未扪及, 移动性浊音阴性。双下肢无水肿。门诊血常规: 白细胞 $15.7 \times 10^9/L$, 血红蛋白41 g/L, 红细胞 $1.1 \times 10^{12}/L$, 血小板 $216 \times 10^9/L$, 中性粒细胞比值70.7%, 淋巴细胞比值13.1%; 尿常规: 尿蛋白(+), 尿糖500 mg/L, 尿胆红素60 mg/L; 肝功能: 谷丙转氨酶340 nkat/L, 谷草转氨酶1 451.9 nkat/L, 白蛋白 26.3 g/L, 球蛋白 29 g/L, 总胆红素722.6 μmol/L, 直接胆红素506.6 μmol/L。入院诊断: (1)重度贫血; (2)黄疸查因: 溶血性黄疸?

入院第2天在裂隙灯下查K-F环阳性, 铜蓝蛋白190 mg/L, 血清铜19.5 μmol/L, 24 h尿铜8 067 μg, 凝血酶原时间25.8 s, 碱性磷酸酶9.3 u/L, 抗-HBs(+), 确诊为暴发性肝豆状核变性并发溶血。立即给予青霉胺0.125 g, tid, 强的松30 mg, qd, 输浓缩红细胞、白蛋白、血浆等, 2006-06-22血浆置换一次。经上述治疗, 患者病情迅速好转, 1 wk后强的松减量, 每5 d减5 mg, 第25天青霉胺加至0.25 g, tid, 第39天带药出院, 出院前复查血常规: 白细胞 $6.0 \times 10^9/L$, 血红蛋白113 g/L, 红细胞 $3.5 \times 10^{12}/L$; 肝功能: 谷丙转氨酶76.2, 白蛋白41.4 g/L, 球蛋白33.3 g/L, 总胆红素126.2 μmol/L。出院后复诊2次, 病情已明显好转。目前继续驱铜治疗。

2 讨论

WD基因定位于13q14.3, 编码铜转运P型-ATP酶(ATP7B)^[2]。如果WD基因出现突变, 导致ATP7B功能障碍, 胆汁排铜减少, 过量的铜在体内蓄积即可发病。WD临床表现复杂^[3], 暴发性WD是WD中一种较为少见而极为严重的类型^[4], 其可能的机制有: (1)血中游离铜增加, 直接毒害细胞膜, 破坏线粒体, 引起氧自由基介导的肝损害;

(2)铜在肝细胞溶酶体内沉积,损伤溶酶体膜,使水解酶进入胞质,致细胞变性死亡;(3)WD病患者体内过量的铜可诱导Fas/FasL活化,使肝细胞大量凋亡。溶血机制为肝细胞大量坏死,大量游离铜从肝细胞大量释放,破坏红细胞膜的稳定性引起急性溶血。本例突然起病,迅速出现肝功能衰竭,急性溶血,K-F环阳性,铜蓝蛋白降低,尿铜极度增加,并排除了其他病毒性肝炎,符合暴发性WD的诊断标准^[5]。暴发性WD预后极差,如不进行肝移植病死率几乎为100%。本例入院后迅速得到正确诊断,因无肝移植的条件,所以立即采取驱铜、糖皮质激素、血浆置换和补充浓缩红细胞和新鲜血浆等综合治疗的方法,患者病情迅速好转。血浆置换可以快速降低血清铜,青霉胺可以持续地清除血清铜,糖皮质激素可以减轻肝脏的炎症及溶血,这些可能是抢救成功的主要原因。本例抢救经验说明,如能早期

诊断,迅速采取驱铜、血浆置换等综合治疗措施,至少对部分暴发性WD是有效的。

3 参考文献

- 1 Stampfl DA, Munoz SJ, Moritz MJ, Rubin R, Armenti VT, Jarrell BE, Maddrey WC. Heterotopic liver transplantation for fulminant Wilson's disease. *Gastroenterology* 1990; 99: 1834-1836
- 2 Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993; 5: 327-337
- 3 Willson RA, Hartleb M. Fulminant Wilsonian hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 1309-1310
- 4 Degenhardt S, Blomhard G, Heffer H, Kreuzpaintner G, Lindemann W, Lobeck H, Schnaith E, Stremmel W, Grabensee B. A hemolytic crisis with liver failure as the first manifestation of Wilson's disease. *Dtsch Med Wochenschr* 1994; 119: 1421-1426
- 5 McCullough AJ, Fleming CR, Thistle JL, Baldus WP, Ludwig J, McCall JT, Dickson ER. Diagnosis of Wilson's disease presenting as fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1983; 84: 161-167

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 •

第八届中西医结合实验医学研讨会

本刊讯 第八届中西医结合实验医学研讨会将于2006-10在南京举行,现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-08-31截稿

2 联系方式

南京中山东路305号南京军区总医院 齐名;邮编:210002;电话: 025-52926620

• 消息 •

第十五次全国中西医结合肝病学术会议

本刊讯 第十五次全国中西医结合肝病学术会议将于2006-09在天津举行,现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-06-15截稿

2 联系方式

上海中医药大学 胡义扬; 邮编: 201203

食用葵花籽致恶心、腹痛等严重过敏反应1例

田蕾, 尹悦玲

田蕾, 尹悦玲, 武警总医院皮肤科过敏门诊 北京市 100039
通讯作者: 田蕾, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 武警总医院皮肤科过敏门诊. tianleipf@sina.com
电话: 010-88276531
收稿日期: 2006-01-20 接受日期: 2006-02-08

摘要

本文报道1例罕见葵花籽严重过敏病例, 根据患者的临床表现, 采用Pharmacia CAP System荧光酶联免疫法进行特异性IgE检查, 结果: 葵花籽特异性IgE为强阳性而确诊, 表明进食葵花籽可引起个别患者的严重过敏反应而使生命受到威胁, 值得临床医生提高警惕。

关键词: 葵花籽; 严重过敏反应

田蕾, 尹悦玲. 食用葵花籽致恶心、腹痛等严重过敏反应1例. 世界华人消化杂志 2006;14(7):733
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/733.asp>

0 引言

进食葵花籽后引起严重过敏病例在临床罕见, 采用Pharmacia CAP System荧光酶联免疫法进行葵花籽血清特异性IgE检测确诊少见报道, 现将我们所见食用葵花籽致严重过敏反应1例报道如下。

1 病例报告

患者, 女, 13岁。因食入葵花籽后恶心、风团20 min伴神志不清5 min急诊收住。患者入院前1 h食用葵花籽约50 g, 不久自觉口腔发痒, 十几分钟后皮肤出现大小不等的风团, 伴瘙痒, 随后感到恶心、腹痛、心慌、头晕、呼吸困难。既往有急性荨麻疹病史。查体: 患者神志不清, 面色苍白, 体温35.0℃, 脉搏120次/min, 呼吸26次/min, 血压测不出, 口唇肿胀, 全身皮肤可见大小不等的风团, 鲜红色, 部分融合成片。考虑: 严

重过敏反应。治疗: 立即皮下注射1 g/L肾上腺素0.5 mL, 吸氧, 静滴琥珀酸氢化可的松150 mg, 肌肉注射非那根25 mg等药, 症状逐渐缓解, 生命体征恢复正常, 继续使用皮质激素、口服抗组胺药, 恶心、腹痛、皮疹等症状数天后消失。特异性诊断试验: 采用Pharmacia CAP System荧光酶联免疫法进行葵花籽血清特异性IgE检测, 结果III级, 表明葵花籽是引起患者临床表现的过敏源, 最后诊断为: 葵花籽致严重过敏反应。嘱今后严格避免再进食。

2 讨论

资料报道, 我国正常人群中食物过敏的发生率在0.3%-3.7%^[1], 其中严重食物过敏并不少见, 最易引起食物过敏的有坚果等八类食物, 引起的过敏反应具有发病突然, 症状快速加重的特点, 如抢救不及时会有生命危险。葵花籽在我们日常生活中是男女老少极喜欢的休闲零食, 目前已报道^[2-3]进食葵花籽致过敏的病例有荨麻疹、口腔变态反应综合征等, 但像本文患者的严重过敏少见。目前, 食物过敏的诊断主要依靠病史、皮肤试验、食物特异性IgE(sIgE)检测和食物激发试验来确诊, 其中食物sIgE检测因安全、不受抗组胺药的影响, 特别适用于严重过敏反应严重者。鉴于本文患者出现了严重过敏反应, 故我们选择了葵花籽血清特异性IgE检测, 结果证实了葵花籽是引起该患者临床表现的过敏源, 提示临床医生对此要提高警惕。

3 参考文献

- 1 周裕成, 胡光荣, 高晓方, 李波. 食物过敏症108例诊断分析. 中华微生物学和免疫学杂志 2001; 21: 101-102
- 2 雷承意. 食霉变葵花籽引起荨麻疹1例. 皮肤病与性病 1994; 3: 68
- 3 Palma-Carlos AG, Palma-Carlos ML, Tengarrinha F. Allergy to sunflower seeds. *Allerg Immunol (Paris)* 2005; 37: 183-186

■背景资料

我国正常人群中食物过敏的发生率在0.3%-3.7%, 最易引起食物过敏的有坚果等八类食物, 本文报道1例罕见葵花籽严重过敏病例, 葵花籽特异性IgE强阳性而确诊, 表明进食葵花籽可引起个别患者的严重过敏反应而使生命受到威胁, 值得临床医生提高警惕。

电编 张敏 编辑 张海宁

Gardner综合征诊治1例

顾国利, 王石林, 周晓武

同行评价

Gardner综合征临床上较少见, 但癌变率高, 且具有家族遗传性。就诊时患者症状往往已较重, 临床治疗也较为困难。本文中患者治疗后恢复较好, 排便功能基本正常, 生活质量得到提高。治疗经验值得临床医师借鉴。

顾国利, 王石林, 周晓武, 空军总医院普外科 北京市 100036
通讯作者: 顾国利, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 空军总医院普外科. kzggl@163.com
电话: 010-68410099-6302
收稿日期: 2006-02-12 接受日期: 2006-03-03

摘要

结直肠息肉病合并胃息肉的女性Gardner综合征患者1例, 对其先后实施了全结直肠切除、回肠袢肛管吻合、回肠造口术, 造口回肠还纳术, 胃镜下息肉电切除术。患者最终避免了回肠造口, 能自控排便, 恢复正常生活。

关键词: Gardner综合征; 诊断; 治疗

顾国利, 王石林, 周晓武. Gardner综合征诊治1例. 世界华人消化杂志 2006;14(7):734-735
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/734.asp>

0 引言

Gardner综合征是由APC突变所致的结直肠息肉病合并结肠外病变的常染色体遗传病, 20-40岁女性多见。我们成功收治1例, 现报道如下。

1 病例报告

患者, 女, 23岁, 因进食后恶心、呕吐伴腹泻1 mo在他院内镜检查发现胃底部多发无蒂息肉, 血常规示Hb 68 g/L, 骨穿示缺铁性贫血。于2005-07-22以胃结肠息肉病伴贫血收入院。体格检查: 体质量40 kg, 贫血貌, 口唇及皮褶处无色素沉着, 甲状腺不大, 未见骨瘤及体表囊肿, 肛门指诊可及直肠内多发质韧息肉。小肠镜(经肛门)示: 大小不等息肉遍布整个结直肠黏膜, 息肉表面黏膜糜烂溃疡(图1); 小肠未见息肉。活检示: 腺瘤样息肉伴不典型增生。胃镜示(图2): 胃底部多发无蒂息肉, 表面黏膜正常; 胃窦、十二指肠未见息肉; 活检示: 腺瘤样息肉。明确诊断为Gardner综合征。于2005-08-02行全结直肠切除、回肠J袢储器肛管吻合术。因肠系膜短、吻合口有张力, 行中段回肠暂时性造瘘。术后经铁剂治疗后患者Hb升至100 g/L。回肠肛管吻合

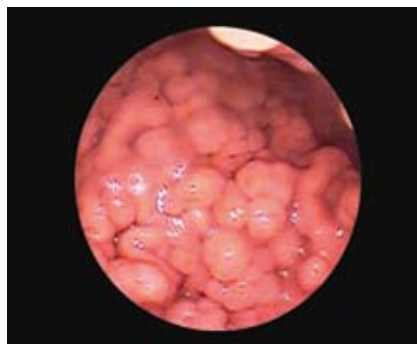


图1 小肠镜(经肛门)示: 大小不等息肉遍布整个结肠和直肠黏膜, 息肉表面黏膜糜烂溃疡。



图2 胃镜示: 胃底部多发无蒂息肉, 直径2-7 mm, 表面黏膜正常。

处愈合好, 肛门控便感觉尚可。1 mo后返院行肠管造影示: 肠管通畅, 肠袢有储便功能。行造口还纳术。术后患者大便成形, 每日排便3次, 控便能力好。2006-01-14再次返院, 体质量46 kg, Hb 120 g/L。行胃镜下息肉圈套电切除术, 一次性电除息肉50个。现患者日常生活工作正常。

2 讨论

Gardner综合征是由结肠腺瘤样息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)基因突变所致的结直肠息肉病合并结肠外病变的常染色体遗传病。以20-40岁女性多见。目前认为其是家族性腺瘤样病(FAP)的亚型^[1]。临床上, 凡结直肠息肉病合并骨瘤、皮肤囊性疾病、(硬)纤维瘤、胃十二指肠息肉、甲状腺乳头状癌、肾上腺瘤、牙齿异

常、先天性视网膜色素上皮肥厚等一种或几种者,即可诊断本病。本病伴发的胃息肉多位于胃底,多呈基底腺。本例即是如此。

目前认为结直肠切除、回肠祥储器肛管吻合是最理想术式。其可切除所有大肠黏膜,并保留接近正常的肠功能和性功能,避免了造口,并发症较低,患者生活质量明显提高。研究发现,全结肠切除后存在“小肠结肠化”的病理生理过程,末段回肠可重吸收水分。因此手术时应尽可能保留末段回肠以促使大便成形,利于控便。为保证回肠祥肛管吻合口的愈合,暂时性的回肠造口是必要的^[2]。造口还纳前可行肠管造影了解储器的储便情况。本例患者虽分次手术,但最终避免了造口,排便功能基本正常,达到了最佳的预期效果。

研究发现,胃息肉的恶变趋势不大^[3],且本病的主要死因是壶腹周围癌、肠系膜硬纤维瘤及手术并发症^[2]。因此,对结肠外病变的激进治疗可能无法延长患者生命,反而增加风险、降

低患者生活质量。故对伴发的胃息肉以内镜下治疗和定期复查为宜。发现恶变倾向时再行手术。

本病约有1/4患者无家族史,而家庭小型化也使其遗传表现不甚明显。临床上往往易忽视那些无明显家族史或以结肠外病变为主要表现者,而造成误诊、漏诊。家族中一旦有确诊本病者,应对其12岁以上成员作结肠镜筛选并定期复查;同时配合针对性的肠外检查,如胃镜、颅骨和牙齿X线、甲状腺超声、眼底检查等。APC突变检测有助于筛选病例和免除可疑者的心理负担及内镜检查的身心痛,但目前检测结果不稳定,临床尚未广泛应用。

3 参考文献

- 1 张铁锋. 家族性腺瘤性息肉病的病因学及诊治进展. 中国现代普通外科进展 2000; 3: 5-7
- 2 武希润, 王玲, 郭文栋. Gardner综合征临床分析. 中华内科杂志 2001; 40: 630-631
- 3 刘复生, 王奇璐, 果红. 胃肠道息肉病的临床病理特点. 癌症进展杂志 2003; 1: 165-172

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 •

更正与说明专栏

本刊讯《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道,特设“更正与说明”固定专栏,包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目,不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明,而且针对文章的学术水平等进行讨论。在此,我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》,给更正与说明栏目投稿。投稿者凭文章的编号,可免费注册(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>)使用中国生物医学基金论文摘要库3年。中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要。这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大计划项目基金资助,内容丰富、数据准确,体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向,可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供思路。(世界胃肠病学杂志社2006-03-08)。

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, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000(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Ar(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 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, $56.4 \pm 0.5 \text{ d}$. $3.56 \pm 0.27 \text{ pg/ml}$ 应为 $3.56 \pm 0.27 \text{ ng/L}$, $131.6 \pm 0.4 \text{ mmol/L}$, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa, RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改

为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 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 $1 \times 10^{-3} \text{ g}$ 与 $5 \times 10^{-7} \text{ g}$ 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% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英文大写F; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写r; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写n; (7)概率用英文斜体大写P. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^aP<0.05, ^bP<0.01(P>0.05不注). 如同一表中另有一套P值, 则^cP<0.05, ^dP<0.01; 第三套为^eP<0.05, ^fP<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

《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 ± 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 ± 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm, 其SD/3=0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$, 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, 太原消化病防治中心。wcjd@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. wcjd@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:^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注).如同一表中另有一套 P 值,则^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;第3套为^e $P<0.05$,^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方.表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐.“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等.表图勿与正文内容重复.表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达.黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片.彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,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;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^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准,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
<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 改版后的世界华人消化杂志的排版、栏目设置、图片印刷质量、浏览中的相关信息介绍(小字体)等均很好. 建议: (1)封面刊病理图片没什么作用和效果, 应设计一个类似“WJG”的、有自己特色的固定封面; (2)增加临床(经验及研究)栏目的内容; (3)可考虑开辟特殊病例讨论栏目. (季国忠 主任医师, 南京医科大学第二附属医院消化科)

1.2 世界华人消化杂志2006无论从编委会、编辑格式、栏目和内容等方面皆令人耳目一新. 首先, 世界华人消化杂志新一届(2006-01-01/2008-12-31)编委会成立, 有仍在医疗教学一线的国内顶级中西医领域内著作等身的从事胃肠病基础与临床的院士和著名专家;

又有大量来自全国著名高校、三级综合性医院具有博士、硕士学位的论著丰硕的中青年杰出人才加盟, 我们相信在著名杂志战略和编辑专家马连生和潘伯荣教授为首的带领, 在全国胃肠病学界精英的共同努力下, 必将创造杂志新的辉煌. 其次, 论文编辑格式取得较大的突破. 通过格式调整, 使作者、读者、审稿人等在论文的交流上获得新的方式; 明显增加论文阅读的信息量; 重点突出了背景资料、研发前沿、创新盘点、应用要点、相关报道、名词解释、同行评价等创新注解, 至今尚未在其他学术杂志出现, 为学术杂志编辑开创新河. 最后, 在目次上又出新招. 通过专家门诊可以系列介绍作者的工作, 让读者或患者可以了解专家的研究的精华和临床特长, 从学术杂志角度, 打开沟通医患之门, 为全社会共同解决“看病难, 看病贵”提供一条捷径. (程英升 副教授, 上海交通大学附属第六人民医院放射科、上海交通大学影像医学研究所)

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, 对他们的批评和建议我们一定虚心接受. 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!

潘秀珍 教授

福建省立医院消化研究室

张绪清 副教授

第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

程英升 副教授

上海交通大学附属第六人民医院放射科

董蕾 教授

西安交通大学第二附属医院消化内科

傅春彬 主任医师

吉化集团公司总医院一院消化内科

刘正稳 教授

西安交通大学第一医院

向德兵 讲师

中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心

姚树坤 教授

河北医科大学第四医院消化内科

李增山 副教授

第四军医大学病理教研室

白爱平 主治医师

中山大学附属第一医院消化内科

施瑞华 教授

南京医科大学第一附属医院消化科

叶胜龙

上海复旦大学中山医院 复旦大学肝癌研究所

崔云甫 教授

哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

李延青 教授

山东大学齐鲁医院消化科

聂青和 副教授

第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心、传染病科

秦成勇 教授

山东省立医院

范志宁 主任医师

南京医科大学第二附属医院内镜中心

赵平 副教授

第二军医大学微生物学教研室

张宗明 教授

清华大学第一附属医院消化医学中心

李延青 教授

山东大学齐鲁医院消化科

杨希山 教授

广东省广州市大道北云景花园 云枫苑 6-1001

白文元 教授

河北医科大学第二医院

唐文富 主治医师

四川大学华西医院中西医结合科