

# 树突状细胞与肝癌的免疫逃逸

邱双健

邱双健, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所外科 上海市 200433  
邱双健, 男, 复旦大学附属中山医院、肝癌研究所外科副教授、副主任医师、医学博士。  
国家自然科学基金资助, No. 30200268  
项目负责人: 邱双健, 200433, 上海市医学院路 136 号, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所外科。qiusj68@zshospital.com  
电话: 021-64041990-3058  
收稿日期: 2005-01-11 接受日期: 2005-01-21

## 摘要

肝脏作为免疫特惠器官具有独特的免疫系统, 参与机体局部和整体免疫调节, 对于肝细胞癌的发生与演变具有重要作用。树突状细胞作为机体免疫反应调控的关键细胞, 在肝癌的免疫逃逸中起着非常关键的作用, 深入研究树突状细胞与肝癌的相互作用, 对于阐明肝癌免疫逃逸机制, 探索行之有效的治疗手段具有重要的理论与实践意义。

**关键词:** 树突状细胞; 肝癌; 免疫逃逸

邱双健. 树突状细胞与肝癌的免疫逃逸. 世界华人消化杂志 2005;13(4): 429-431  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/429.asp>

## 0 引言

肿瘤的归宿取决于肿瘤与宿主的相互作用, 二者的互动关系成为近年肿瘤研究的热点与难点<sup>[1-3]</sup>。肿瘤通过分泌各种因子从间质获取血供与营养、逃避宿主免疫攻击, 而宿主微环境则可通过修饰、限制肿瘤的各种生物学特性, 在一定程度上达到控制乃至杀灭肿瘤的目的。临床与动物研究中发现, 荷瘤宿主体内真正的抗癌反应与体外检测到的免疫反应常常关联较少, 提示对体内肿瘤免疫的调控机制、特别是肿瘤微环境的影响了解甚少<sup>[4]</sup>。作为肿瘤微环境研究的重要领域, 免疫微环境的研究日益受到重视。一个较强的免疫微环境可以有效控制肿瘤, 而处于耐受状态的微环境则对肿瘤生长有促进作用。肝脏作为免疫特惠器官具有独特的免疫系统, 参与机体局部和整体免疫调节, 对于肝细胞癌(以下简称肝癌)的发生与演变具有重要作用。深入研究肝脏免疫调节的机制以及如何提高肝癌局部免疫细胞活性、增强对肝癌细胞的特异杀伤能力, 对揭示肝癌的发生与演变机制、提高肝癌疗效具有重要意义。

## 1 肝癌患者的免疫状况

肝癌患者既存在着系统免疫缺陷, 肿瘤局部也存在

抑制抗癌效应发挥的因素。系统免疫缺陷主要表现为以下方面: (1) 抑制性T细胞增加、辅助性T细胞减少。 (2) 自然杀伤细胞数量和活性明显下降。 (3) 白介素-2(IL-2)产生能力低下, 可溶性IL-2受体表达水平明显增高。 (4) 淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)活性降低。 (5) 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素-1(IL-1)水平增高, 在肝癌术后复发的患者尤为明显<sup>[5]</sup>。复旦大学肝癌研究所曾以结核菌素试验来评价肝癌患者的免疫状态, 发现通常小肝癌患者反应强、大肝癌尤其晚期患者常无反应<sup>[6]</sup>。提示肝癌患者通常其机体免疫特别是细胞免疫功能随肿瘤的发展而日趋低下。近来通过比较肝癌、肝硬化患者和健康志愿者外周血DC的免疫表型和功能, 发现肝癌患者存在明显的DC功能缺陷, 这种功能障碍可能在肝癌的发生、发展与转移中具有重要作用<sup>[7-8]</sup>。

关于肝癌局部免疫状况的研究比较少, 有研究表明肝癌患者肝组织中CD83阳性DC数目明显少于肝硬化患者, 在癌结节中甚至检测不到CD83阳性DC的表达<sup>[9]</sup>。通过超声引导经皮肝脏穿刺活检检测病灶局部免疫细胞分布情况, 发现肝癌病灶局部有不同程度免疫细胞浸润, 主要为T淋巴细胞、NK细胞和巨噬细胞, 浸润程度依次为被膜下>癌周组织>癌组织, 提示肝癌组织内免疫活性细胞浸润程度低下<sup>[10-11]</sup>。我们对123例肝癌的研究表明癌结节中树突状细胞浸润多者无瘤生存率较高, 提示DC在激活T细胞、诱导免疫反应中的重要性<sup>[12]</sup>。

## 2 树突状细胞与肝癌的免疫逃逸

树突状细胞是功能最强的专职抗原递呈细胞, 广泛分布于外周淋巴组织, 在机体免疫调节中起重要作用, 决定免疫反应的最终走向是激活免疫还是诱导耐受<sup>[13-16]</sup>。目前对肝脏DC的研究不多, 其在肝脏免疫功能调节中的作用尚不十分明确。肝脏DC位于门脉管道和中央静脉周围, 具有较强的吞噬抗原并移行到淋巴组织的能力<sup>[17-19]</sup>。肝脏DC是具有不同功能的DC组成的异质体, 具有髓系和淋巴系两类来源且主要以不成熟状态的前体细胞存在, 表达MHC I类和II类分子, 但不表达激活T细胞所需的共刺激分子<sup>[19-20]</sup>。肝脏DC对于肝脏免疫反应的调节具有重要意义, 其前体细胞可诱导未受特异抗原刺激的T细胞产生抗原特异的免疫

耐受,而对于T记忆细胞来说,则是强烈的免疫刺激剂<sup>[19, 21]</sup>.体外研究表明,一旦肝脏DC前体细胞受到抗原诱导,同样可以刺激未受抗原致敏的同种异体T细胞增生<sup>[22]</sup>.

肝脏免疫微环境的一个重要特征就是肝脏中持续存在着细菌抗原成分如脂多糖(LPS)等以及各种肝细胞应答这些抗原而合成的递质成分.作为门脉血的生理组成成分,LPS对肝脏免疫微环境的影响归纳如下:(1)诱导枯否细胞产生并保持局部一定浓度的IL-10水平、分泌TNF- $\alpha$ 、上调前列腺素尤其是PG E<sub>2</sub>的分泌<sup>[23-24]</sup>.(2)导致激活T细胞分泌的IFN- $\gamma$ 分泌量减少50%以上<sup>[25]</sup>.由于IL-10为Th2细胞因子,而IFN- $\gamma$ 为Th1细胞因子,Th1细胞因子主要与细胞免疫和肿瘤免疫有关,激发免疫防御反应,而Th2细胞因子则与细胞毒活性的抑制有关,倾向于抑制免疫反应<sup>[26]</sup>.因此正常情况下肝脏处于Th2因子为主的免疫微环境中,这一特点使肝脏常常处于免疫耐受状态.从理论上讲,肝脏免疫微环境的这些特点更有利与肝癌的发生与发展,对肝癌的复发转移起着重要的促进作用.

关于肝癌的免疫逃逸机制目前尚不十分明了,但涉及免疫反应的多环节、多因素、多过程这一点是肯定的.与其他恶性肿瘤类似,包含被动与主动逃逸两方面.免疫相关的主动逃逸机制主要有:(1)分泌具有免疫抑制功能的因子如IL-10、TGF- $\beta$ <sup>[27-28]</sup>;(2)抑制DC的分化和成熟、诱导DC凋亡<sup>[29]</sup>.(3)通过下调CD95(APO-1/Fas)受体的表达或通过表达CD95配体分子杀死T淋巴细胞,从而逃避细胞毒T淋巴细胞的杀伤作用<sup>[29]</sup>.(4)下调IFN- $\gamma$ 受体的表达逃逸宿主的免疫攻击<sup>[30]</sup>.(4)我们分离培养了26例原发性肝癌之肿瘤浸润淋巴细胞,经体外扩增后,大多数为成熟的CD3<sup>+</sup>T细胞<sup>[31]</sup>.这一结果和其他研究提示肝癌可通过多种机制导致局部抗癌免疫反应不能有效进行,使肝癌浸润淋巴细胞常处于无反应状态,从而产生免疫逃逸<sup>[32-34]</sup>.在这些机制中,与DC有关的内容如下:(1)肝癌患者中升高的甲胎蛋白可以引起DC凋亡、使DC分泌的IL-12与TNF- $\alpha$ 明显减少,从而引起DC功能缺失<sup>[35]</sup>.(2)肝癌患者中升高的IL-10可以抑制树突状细胞的产生,引起DC表面HLA-DR、CD80以及CD86等分子表达下降,从而导致DC功能下降<sup>[27]</sup>.(3)我们将小鼠肝癌上清液加入DC培养液中可抑制DC的成熟、T细胞刺激能力亦明显下降,其机制与肿瘤细胞上清液对核转录因子NF- $\kappa$ B的抑制有关<sup>[36]</sup>.(4)我们应用自行建立的高、低转移潜能人肝癌细胞系MHCC LM6、MHCC97L,不转移人肝癌细胞系Hep3B以及正常人肝细胞系Chang liver制备可溶性肿瘤抗原负载DC.于培养后的第10 d(负载后第3 d)制备细胞全蛋白,双

向电泳对比找寻差异蛋白质点并提取后鉴定,Western blot和免疫组织化学进行验证和定位.发现21个蛋白质点出现明显改变,其中已鉴定5个,初步结果提示肝癌可能通过抑制DC的功能导致免疫逃逸(待发表资料).

### 3 重视各种治疗手段对肝癌免疫逃逸的影响

随着肝癌治疗的进步,各种治疗手段如切除、姑息性外科、经肝动脉化疗栓塞治疗、局部治疗以及肝移植等广泛应用于临床.从理论上讲,根治性切除由于彻底切除了所有肿瘤组织,从根本上消除了肝癌对免疫功能的抑制,机体免疫功能常常可恢复正常,因此是目前最有望彻底治愈肝癌的有效手段.其他治疗都不可避免地机体免疫功能带来多为负面效应的影响.以肝癌肝移植为例,由于免疫抑制剂的常规应用,这些药物多对DC的表型与功能有抑制作用,从而对体内可能存在的残余肝癌细胞的生长具有促进作用<sup>[37-40]</sup>,因此在临床实践中必需兼顾肿瘤治疗与尽可能维持机体免疫功能两方面,才能不至于顾此失彼,取得好的疗效.

### 4 展望

作为机体免疫反应调控的关键细胞,树突状细胞在肝癌的免疫逃逸中起着非常关键的作用,深入研究树突状细胞与肝癌的相互作用,对于阐明肝癌免疫逃逸机制,探索行之有效的治疗手段具有重要的理论与实践意义.

### 5 参考文献

- 1 Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature* 2001;411:375-379
- 2 Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001;411:380-384
- 3 Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastases: the "Seed and soil" hypothesis revisited. *Nature Rev Cancer* 2003;3:1-6
- 4 Srivastava PK. Immunotherapy of human cancer: lessons from mice. *Nat Immunol* 2000;1:363-366
- 5 叶胜龙. 肝癌的生物治疗. 汤钊猷, 余业勤. 原发性肝癌(第2版). 上海:上海科学技术出版社, 1999:382-396
- 6 汤钊猷. 肝癌患者的免疫功能测定. 汤钊猷. 汤钊猷临床肝癌治疗学. 上海:上海科技教育出版社, 2001:56-57
- 7 翁永强, 邱双健, 汤钊猷, 刘银坤, 叶胜龙, 樊嘉, 孙瑞霞, 赵燕. 乙肝相关肝癌外周血树突状细胞负载肿瘤抗原前后免疫功能的变化. *中华肝脏病杂志* 2005(印刷中)
- 8 Ninomiya T, Akbar SM, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999;31:323-331
- 9 Chen S, Akbar SM, Tanimoto K, Ninomiya T, Iuchi H, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Absence of CD83-positive mature and activated dendritic cells at cancer nodules from patients with hepatocellular carcinoma: relevance to hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 2000;148:49-57
- 10 董宝玮, 张晶, 梁萍, 于晓玲, 苏莉, 于德江, 纪小龙, 于国. 经皮微波凝固治疗肝癌对患者局部免疫状态的影响. *中华医学杂志* 2000;

- 80:745-748
- 11 张晶, 董宝玮, 梁萍, 于晓玲, 苏莉, 于德江, 纪小龙, 尹之煜. 肝癌患者病灶局部免疫状况研究. *中国肿瘤临床* 2002;29:1-4
- 12 蔡晓燕, 邱双健, 吴志全, 叶胜龙, 樊嘉, 周俭, 汤钊猷. 肝癌局部树突状细胞和记忆T淋巴细胞与预后关系的研究. *中华医学杂志* 2005(待发表)
- 13 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252
- 14 Steinman RM. Dendritic cells. In: Paul WE(Ed). *Fundamental Immunology*(4<sup>th</sup> Ed). Philadelphia Lippincott Raven Publishers 1999:547-573
- 15 Steinman RM. DC-SIGN: A guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000;100:491-494
- 16 Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:351-358
- 17 Lu L, Woo J, Rao AS, Li Y, Watkins SC, Qian S, Starzl TE, Demetris AJ, Thomson AW. Propagation of dendritic cell progenitors from normal mouse liver using granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and their maturational development in the presence of type-1 collagen. *J Exp Med* 1994;179:1823-1834
- 18 Woo J, Lu L, Rao AS, Li Y, Subbotin V, Starzl TE, Thomson AW. Isolation, phenotype, and allostimulatory activity of mouse liver dendritic cells. *Transplantation* 1994;58:484-491
- 19 Thomson AW, Drakes ML, Zahorchak AF, O'Connell PJ, Steptoe RJ, Qian S, Lu L. Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J Leukoc Biol* 1999;66:322-330
- 20 Doherty DG, O'Farrelly C. Dendritic cells: regulators of hepatic immunity or tolerance? *J Hepatol* 2001;34:156-160
- 21 Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2- like cytokine responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000;164:1346-1354
- 22 Abe M, Akbar SMF, Horiike N, Onji M. Induction of cytokine production and proliferation of memory lymphocytes by murine liver cell dendritic progenitors: role of these progenitors as immunogenic antigen-presenting cells in the liver. *J Hepatol* 2001;34:61-67
- 23 Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000;174:21-34
- 24 Knolle PA, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide(LPS) challenge. *J Hepatol* 1995;22:226-229
- 25 Knolle PA, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S, Lohse AW, Gerken G. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 1999;162:1401-1407
- 26 Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793
- 27 Beckebaum S, Zhang X, Chen X, Yu Z, Frilling A, Dworacki G, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G, Cicinnati VR. Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin Cancer Res* 2004;10:7260-7269
- 28 王文清, 邱双健, 吴志全, 樊嘉, 叶胜龙, 李新丰, 叶超平. 肝细胞癌根治性切除术后复发转移与血清转化生长因子- $\beta 1$ 的关系. *中华实验外科杂志* 2005;22:98-100
- 29 Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95(APO-1/Fas)ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996;2:1361-1366
- 30 Nagao M, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Aomatsu Y, Ko S, Tatekawa Y, Ikeda N, Kanokogi H, Urizono Y, Kobayashi T, Shibaji T, Kanamura T, Ogawa S, Nakano H. The impact of interferon gamma receptor expression on the mechanism of escape from host immune surveillance in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;32:491-500
- 31 陈敏, 叶胜龙, 吴志全, 樊嘉, 邱双健, 孙瑞霞, 薛琼, 郑宁, 赵燕, 汤钊猷. 原发性肝癌来源的肿瘤浸润淋巴细胞的生物学特性分析. *中国临床医学* 1999;6:8-11
- 32 Friedl J, Stift A, Paolini P, Roth E, Steger GG, Mader R, Jakesz R, Gnant MF. Tumor antigen pulsed dendritic cells enhance the cytolytic activity of tumor infiltrating lymphocytes in human hepatocellular cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2000;15:477-486
- 33 秦建国, 韩立本, 庞家芳. 原发性肝癌患者浸润淋巴细胞及其功能状态与预后的关系. *中华医学杂志* 1997;77:167-170
- 34 钱其军, 吴孟超, 曲增强, 方石岗, 王华菁, 曹惠芳, 贾随旺, 郭亚军. 人肝癌组织肿瘤浸润淋巴细胞穿孔素、Fas配体表达的研究. *中华病理学杂志* 1998;27:99-101
- 35 Um SH, Mulhall C, Alisa A, Ives AR, Karani J, Williams R, Bertolotti A, Behboudi S. Alpha-fetoprotein impairs APC function and induces their apoptosis. *J Immunol* 2004;173:1772-1778
- 36 邱双健, 叶胜龙, 吴志全, 樊嘉, 汤钊猷. 肝癌细胞上清液对树突状细胞的抑制作用与NF- $\kappa$ B通路有关. *中华肝胆外科杂志* 2004;10:558-561
- 37 Cos J, Villalba T, Parra R, Gallardo D, Bilbao I, Margarit C, Massuet L. FK506 in the maturation of dendritic cells. *Haematologica* 2002;87:679-687
- 38 Chen T, Guo J, Yang M, Han C, Zhang M, Chen W, Liu Q, Wang J, Cao X. Cyclosporin A impairs dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and inhibiting cyclooxygenase-2 expression. *Blood* 2004;103:413-421
- 39 Monti P, Mercalli A, Leone BE, Valerio DC, Allavena P, Piemonti L. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation* 2003;75:137-145
- 40 周海军, 瞿介明, 邱双健, 叶胜龙, 何礼贤. 树突状细胞诱导曲霉菌的Th免疫及皮质类固醇对其影响的研究. *中华结核和呼吸杂志* 2004;27:449-454

# HBx 在原发性肝癌发病中的作用及其生物治疗策略

刘亮明, 罗文, 刘晶美, 张吉翔

刘亮明, 罗文, 刘晶美, 张吉翔, 江西医学院第二附属医院消化内科、江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006  
刘亮明, 男, 1968-02-04 生, 江西瑞金市人, 汉族, 1991 年和 2003 年分别获得医学学士和消化科硕士学位, 从事消化内科的临床和教学工作 10 余年, 在国家级刊物发表学术论文 10 余篇, 参编专著 1 部, 现为副教授、副主任医师、江西医学院博士生, 目前主要研究方向是消化系统肿瘤基因治疗的基础和临床。国家自然科学基金项目, No. 30160032, No. 30360037。  
江西省科委重点项目, No. 200110300101, No. 20041B0300300  
项目负责人: 张吉翔, 330006, 江西省南昌市民德路 1 号, 江西医学院第二附属医院消化内科、江西省分子医学重点实验室: jixiangz@163.net  
电话: 0791-6292706 传真: 0791-6262262  
收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-01-08

## 摘要

HBx 对宿主细胞基因存在着广泛而深刻的影响。虽然其致癌机制仍不很明确, 但其在 HCC 发病中的作用却是肯定的。HBx 能影响肝细胞的生长、转化、迁移和凋亡等重要细胞过程以及 DNA 的修复过程, 并能促进肿瘤新生血管的形成。HBx 的这些重要作用为 HCC 治疗新靶点的选择提供了依据。本文在此基础上, 进一步提出了 HCC 生物学治疗的新策略。

**关键词:** 原发性肝癌; 生物治疗; HBx

刘亮明, 罗文, 刘晶美, 张吉翔. HBx 在原发性肝癌发病中的作用及其生物治疗策略. 世界华人消化杂志 2005;13(4):432-439  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/432.asp>

## 0 引言

HBV 的慢性感染与原发性肝细胞癌 (HCC) 的发生存在密切关系已为众多实验证实。据估计全世界 HBV 携带者达总人口的 6%, 而在病毒流行区, 有 HBV 感染史者已超过总人口的 60%<sup>[1]</sup>。全世界每年新增 HCC 病例超过 400 000, 5 a 生存率小于 3%<sup>[3]</sup>。全球 HCC 病例的 60%, 流行地区该病例的 70% 被认为是由 HBV 引起<sup>[2]</sup>。已知 HBV 的基因组有 4 个开放阅读框 (ORF), 分别编码 HBsAg、HBcAg、DNAP 和 HBx。HBsAg 被认为是影响 HCC 性别差异 (HCC 在男性多发) 的因素<sup>[4]</sup>, 而小分子多肽 HBx 则在 HCC 的形成中起主导作用。转基因鼠实验证实, HBx 的表达 (1) 能干扰正常肝细胞的生长, 使肝癌的发生率至少增加 10 倍<sup>[5]</sup>; (2) 增加了促癌剂致肝癌的形成率<sup>[6]</sup>; (3) 缩短了 HCC 发生的潜伏期<sup>[7]</sup>。人群调查发现, 85% HCC 患者的肝组织中含有特异性的 HBx 蛋白<sup>[8]</sup>。这充分说明 HBx 在 HBV 相关性 HCC 的发生中起重要作用。但 HBx 的致癌机制仍不是十分明确。HBx 对重要的细胞过程如细胞生长、转化和细胞凋亡的影响

仍存在不少争论。然而, HBx 作为一种致癌剂已渐为人们所认同。因为 HBx 除对肝细胞的生长和凋亡通路产生影响外, 也影响到肝肿瘤细胞的迁移能力和新生血管的形成能力, 并对肝细胞 DNA 的修复产生不利影响。随着 HBx 的致肝癌机制的深入研究, 对肝细胞生长、转化起重要作用的关键分子不断被发现, 这为 HCC 的治疗提供了新的靶点, 为肿瘤治疗新药的开发提供了新的威机。

## 1 HBx 在 HCC 发病中的作用

研究表明, HBx 不仅出现于细胞质, 也见于细胞核内。其作用方式并不是直接与 DNA 结合, 而是通过蛋白质-蛋白质作用, 反式激活 (transactivate) 宿主细胞和病毒基因的启动子, 对病毒基因启动子的激活有助于感染的持续和播散。而 HBx 对宿主细胞基因的影响则要广泛而深刻得多。

**1.1 激活细胞癌基因** HBx 可激活众多的细胞癌基因, 如 *c-myc*<sup>[9]</sup>、*Src*<sup>[10]</sup>、*Ras*<sup>[11]</sup> 和 *Rb*<sup>[12]</sup> 等。HBx 对这些癌基因的激活必将对肝细胞的生长、转化产生重要影响。同时, 个别癌基因被激活后, 也将对其下游与细胞生长有密切关系的靶基因产生激活作用, 从而使其生物效应放大。例如, *Src* 酪氨酸激酶被 HBx 激活后, 可进一步影响下列信号和效应分子: (1) 激活 *PI-3K*<sup>[13]</sup>; (2) 激活 *STATs*<sup>[14]</sup>; (3) 激活  $\beta$ -catenin<sup>[15]</sup>; (4) 抑制 *cadherin* 的表达和功能<sup>[16]</sup>。

**1.2 抑制 p53 的表达和功能** HBx 除对癌基因有激活作用外, 还对抑癌基因 p53 产生多环节的抑制作用: (1) 通过蛋白质-蛋白质作用阻断 p53 的功能<sup>[17]</sup>; (2) 强烈抑制 p53 的转录<sup>[18]</sup>; (3) HBx 的羧基端可与 p53 的羧基端结合, 造成 p53 的胞质隐匿 (cytoplasmic sequestration)<sup>[19]</sup>。野生型和裂解变异的 HBx 蛋白均保留有抑制 p53 的能力<sup>[20]</sup>。

p53 被 HBx 抑制后可造成: (1) 肝细胞的损伤 DNA 在 G1 期不经修复直接进入 S 期, 使 DNA 损伤累积增加; (2) HBx 与 p53 的结合抑制了 p53 与 DNA 修复蛋白 XPD、XPB 的结合<sup>[21]</sup>。 (3) 下游靶基因 *PTEN*<sup>[22]</sup>、*p16*<sup>[23]</sup>、*p21<sup>cip1/wap1</sup>*、*Bax* 和 *Fas*<sup>[24]</sup> 等受抑。其中 *p21<sup>cip1/wap1</sup>* 是细胞周期检查点的重要分子, 他能抑制各种 *Cyclin*-CDK 复合物而使细胞停滞于 G1 期。

1.3 激活细胞生存信号级联通路 HBx可对肝细胞内多种信号级联通路产生多环节的刺激影响, 如PI3K-Akt<sup>[25]</sup>、Jak1-STAT<sup>[26]</sup>、SAPK/JNK<sup>[27]</sup>、MAPK<sup>[11]</sup>、Wnt/ $\beta$ -catenin<sup>[15]</sup>等信号通路. 这些通路为HBx激活后又相互影响, 从而组成了一个极其复杂的信号分子网络, 使HBx的促细胞生长、转化效应可以逐级放大, 最终引起HCC的形成(图1).

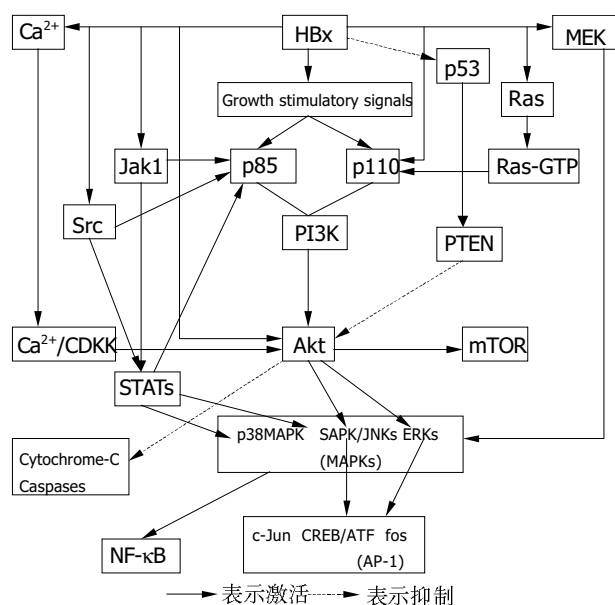


图1 HBx影响的分子信号网络.

该网络中起中心作用的信号通路是PI3K-Akt. 其中, Akt(又名PKB)是网络中最重要的枢纽分子之一. HBx可通过下列途径激活Akt: (1)HBx直接<sup>[25]</sup>或通过激活PI3K的p110亚基<sup>[28]</sup>逐级激活Akt; (2)受HBx激活的Src<sup>[10]</sup>、Ras<sup>[11]</sup>和Jak1-STATs<sup>[26]</sup>通过PI3K激活Akt; (3)HBx对p53的抑制作用, 使得PTEN抑制Akt的能力减弱<sup>[29]</sup>; (4)HBx可作用于线粒体Ca<sup>2+</sup>通道, 引起线粒体Ca<sup>2+</sup>外流和胞质Ca<sup>2+</sup>动员<sup>[30]</sup>. 胞质Ca<sup>2+</sup>的升高通过Ca<sup>2+</sup>/CDKK(calmodulin-dependent kinase kinase)作用方式, 直接使Akt的Thr308磷酸化而激活之<sup>[31]</sup>.

Akt的活化将对下列分子产生重要影响: (1)激活MAPKs<sup>[32-33]</sup>. MAPK家族由ERK1/2、SAPK/JNK和p38MAPK组成. HBx除通过提高MEK的表达来激活MAPKs外, 活化的Akt也对ERK1/2和SAPK/JNK存在重要的刺激作用. MAPKs是肝细胞生存和增生中极其重要的分子, 他起着整合细胞内信号诱导通路的信息, 并将胞质信号与基因表达程序偶联在一起的作用. 其对肝细胞的影响有: (a)加快肝细胞进入S期<sup>[34]</sup>; (b)促进肝细胞转化<sup>[27]</sup>; (c)促进肝癌细胞的转移<sup>[32]</sup>; (d)促进HIF-1 $\alpha$ 的转录<sup>[35]</sup>; (e)激活NF- $\kappa$ B和AP-1<sup>[32]</sup>. (2)激活AP-1<sup>[32-33]</sup>. AP-1家族有c-Jun、fos和CREB/ATF三个成

员. Akt对ERK1/2和SAPK/JNK的激活, 可进一步使AP-1激活. AP-1是重要的转录因子, 他调控着细胞内许多基因的表达, 对细胞间信息的交换、细胞的增生以及原始病理信号的传播都有重要影响. 同时, AP-1还能启动和加速肿瘤的形成, 并促进HCC细胞的迁移和转移能力<sup>[32]</sup>. (3)激活mTOR<sup>[36]</sup>. mTOR是一种丝/苏氨酸激酶, 对细胞内蛋白质的翻译起重要的调控作用. 其活性的增强有助于促进mRNA的翻译. (4)抑制caspase-3、-9的表达和线粒体cytochrome-C的释放, 从而抑制了肝细胞的凋亡<sup>[25, 37-38]</sup>.

1.4 激活NF- $\kappa$ B 在核内, NF- $\kappa$ B作为DNA结合蛋白与相应靶基因的启动子结合, 促进靶基因的转录表达, 从而调控着细胞内许多生物反应过程. 这包括参与细胞周期的调控<sup>[39]</sup>. 乙肝病毒HBx蛋白对NF- $\kappa$ B有明显的激活作用, 他能活化NF- $\kappa$ B家族的所有5个成员, 包括RelA(p65)、c-Rel、p52、p50和p105<sup>[40]</sup>. 另外, HBx还能抑制内源性I- $\kappa$ BmRNA的表达<sup>[41]</sup>, 从而减小I- $\kappa$ B对NF- $\kappa$ B的抑制作用.

NF- $\kappa$ B的活化对肝细胞存在两方面的影响: (1)抑制细胞凋亡, 促进肝细胞存活. NF- $\kappa$ B可抑制下列细胞凋亡通路: (a)Fas杀伤(Fas killing)作用<sup>[41]</sup>; (b)TNF- $\alpha$ 诱导的肝细胞凋亡<sup>[42]</sup>; (c)TGF- $\beta$ 1诱导的肝细胞凋亡<sup>[43]</sup>. 最近的研究提示<sup>[44]</sup>, HBx可通过使肝癌细胞上调TGF- $\beta$ 1及下调 $\alpha$ 2-巨球蛋白的表达而促进TGF- $\beta$ 1的活性. TGF- $\beta$ 1是众所周知的正常肝细胞的凋亡因子, 但TGF- $\beta$ 1在HCC细胞的表达却促进肿瘤细胞自身的增生、转移和侵袭能力<sup>[45]</sup>; (2)促进肝癌细胞的侵袭能力. NF- $\kappa$ B通过激活uPA促进HCC细胞的转移<sup>[46]</sup>.

1.5 促进肿瘤细胞侵袭和转移 肿瘤细胞的侵袭和转移特性与多种因素有关. 其中细胞外基质(ECM)的降解和细胞表面黏附分子的改变是最重要的原因. HBx可以通过下列途径促进HCC细胞的侵袭能力: (1)促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的表达: ECM的降解是肿瘤转移的关键性步骤, 而MMPs在ECM的降解中起重要作用. 实验证实, HBx可使MT1-MMP<sup>[47]</sup>、MMP-2<sup>[48]</sup>和MMP-9<sup>[32]</sup>表达上调, 促进了HCC的侵袭和转移. (2)使尿激酶血纤维蛋白溶解酶原激活物(uPA)表达上调<sup>[46]</sup>: uPA是NF- $\kappa$ B的下游靶基因, 他可降解ECM中的纤维蛋白, 与肿瘤细胞的侵袭和转移能力密切相关. HBx可激活NF- $\kappa$ B而使uPA的表达上调. (3)抑制integrins的表达<sup>[49]</sup>: HBx抑制了integrin  $\alpha$ 5和 $\beta$ 1亚基的表达, 使肝细胞对纤维连结蛋白(fibronectin)的黏附能力降低, 打破了细胞的黏附-去黏附平衡(adhesion-deadhesion balance), 使细胞易于迁移. (4)抑制cadherin的功能<sup>[16]</sup>: cadherin是一种黏附分子. cadherin依赖的黏附有助于防止细胞的迁移和

侵袭表型. 因为肌动蛋白细胞骨架与caderin复合物之间的联系是细胞间维持黏附性的基础. 然而在HBx存在的情况下, 这种联系可被破坏. (5) 诱导CD44的表达: CD44是透明质酸受体, 也是一种黏附分子. 其表达并在细胞表面聚集可引起细胞伪足形成和细胞骨架的重排. Lara-Pezzi *et al*<sup>[50]</sup>的实验证实, HBx诱导了CD44的表达, 从而使HCC细胞的运动能力增强.

**1.6 前凋亡活性** HBx不仅能促进肝细胞生长, 并抑制其凋亡, 而且最近有实验提示HBx还具有细胞前凋亡活性, 即引起肝细胞的凋亡<sup>[51-52]</sup>. Kim *et al*<sup>[53]</sup>研究表明, 全序列HBx的表达增加了细胞对凋亡诱导者TNF- $\alpha$ 和抗-Fas抗体的敏感性, 使细胞内caspase-8和caspase-3水平升高, 同时使c-FLIP的凋亡抑制功能失活. 已证实在病毒复制期间, 病毒全序列基因的转录完成需到达HBx ORF poly(A)信号的下流才能实现, 即第1 789位的UAUAAA模体(motif)处. 但已在染色体整合的DNA通常并不出现全序列的转录. 这使HBx频繁出现3'端区段裂解(truncation). Gao *et al*<sup>[54]</sup>也证实HBV DNA主要以不完整的DNA片段整合入染色体, HBx的整合最重要, 单纯游离而不整合的HBx在HCC患者所占比例很小. Tu *et al*<sup>[55]</sup>的实验表明, 全序列的HBx能抑制ras和myc诱导的病灶形成, 而裂解形式的HBx则使其转化能力增强.

现在认为, HBx的前凋亡活性不仅有利于HBV感染的建立和复制的完成, 而且在HCC的形成和发展中也起重要作用: (1) 引起肝细胞损伤、死亡并诱导肝细胞再生, 最终发展为HCC<sup>[56]</sup>; (2) 对肝细胞的增生产生旁分泌抑制效应<sup>[57]</sup>. 这有利于增生性和凋亡抵抗性细胞的出现; (3) 促进肿瘤细胞的免疫逃逸. HBx可通过使Egr活性增强而显著激活T细胞FasL的启动子, 进一步使含有Fas的T细胞凋亡<sup>[58]</sup>. 除有功能的T细胞凋亡外, HBx抗原的T细胞和B细胞抗原决定簇可频繁出现变异, 从而逃避其免疫攻击<sup>[59]</sup>. 另外, HBx的表达可诱导Nur77的活性<sup>[60]</sup>, 而Nur77在FasL的表达中起重要作用, 这将进一步清除表达Fas的淋巴细胞.

**1.7 抑制了DNA的修复能力** HBx的致癌作用须与环境因素协同, 单纯HBx在肝细胞的表达并不显著增加DNA的变异率(mutation frequency, MF)<sup>[61]</sup>, 但他可使黄曲霉毒素B1 (AFB1)、UV射线和DEN引起的DNA损伤累积. 即HBx抑制了损伤DNA的修复. Madden *et al*<sup>[62]</sup>证实, HBx的表达使肝细胞DNA的总体变异率仅增加24%, 而在AFB1处理后, G/C T/A的转换率升高达将近2倍.

损伤DNA的修复既有不依赖p53的转录偶联修复(transcription-coupled repair)<sup>[63]</sup>, 也有依赖p53的球形(global)核苷切除修复(nucleotide excision repair, NER). 在暴露于UV射线或AFB1的情况下,

HBx对NER的抑制与抑制NER的组份即损伤DNA结合蛋白(damaged DNA-binding protein, DDB)有关. 在核内, DDB的两个亚基DDB1、DDB2组成的复合物结合损伤的DNA, 并进一步激活NER<sup>[64]</sup>. HBx能与DDB1结合, 对损伤DNA修复产生不良影响<sup>[65]</sup>. 直接与DNA修复有关的蛋白质为转录修复因子TF II H.

TF II H中最重要的两个亚基是XPB和XPD. XPB和XPD在NER期间分别有3' -5' 和5' -3' ATP依赖的螺旋酶活性. 这种双向的螺旋酶活性, 在切开损伤的DNA链前具有解开损伤周围DNA双螺旋的作用<sup>[66]</sup>. HBx可抑制XPB和XPD的内源性表达. HBx通过结合转录因子SP1, 减弱了SP1对XPB、XPD启动子的激活作用, 从而引起了XPB、XPD转录下降<sup>[67]</sup>.

**1.8 促进肿瘤新生血管的形成** 肿瘤的发生经历最初快速增长和随后由于氧和营养物质缺乏的缓慢生长阶段. 如果仍得不到氧和营养物质的供应, 肿瘤将趋向死亡. 但在活体内, 这种情况常不会自然发生. 因为肿瘤细胞能通过各种机制适应缺氧的应激(hypoxic stress). 其中最重要的适应机制是肿瘤细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF). 已知VEGF是肿瘤新生血管形成的中心调控者, 他能诱导内皮细胞的增生和迁移, 是肿瘤细胞获得氧和营养物质的基础. 在HCC, HBx可加强肿瘤细胞的这种适应过程. Tao *et al*<sup>[68]</sup>的实验发现, HBx蛋白可激活HCC细胞VEGF的表达.

VEGF受缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor1, HIF-1)的调控. HBx对HIF-1最重要的亚基HIF-1 $\alpha$ 存在多方面的影响: (1) 增强HIF-1 $\alpha$ 蛋白质稳定性以及与CBP/p300的联系, 从而使其对VEGF的作用得以加强<sup>[35]</sup>; (2) 激活MAPK, 促进HIF-1 $\alpha$ 的转录<sup>[35]</sup>; (3) 削弱了von Hippel-Lindau (VHL)对HIF-1 $\alpha$ 的抑制作用<sup>[35]</sup>; (4) 激活PI3K、mTOR, 增强了HIF-1 $\alpha$ 蛋白的稳定性和功能<sup>[69]</sup>.

## 2 治疗策略

**2.1 清除HBx, 消除其对核内基因的反式激活作用** 鉴于HBx对核内基因有着广泛的影响, 且有多方面的致癌活性, 许多研究者期望通过抑制或清除HBx的方式来达到治疗HCC的目的. (1) 过继免疫治疗: 体液免疫对HBx并不起明显的清除作用, 且抗-HBx抗体在HBV相关性HCC患者血清中出现率很低<sup>[70]</sup>. 细胞免疫在病毒HBx蛋白的清除中起主要作用. 但由于HBx抗原决定簇的变异, 自身的T、B细胞往往不能对其起到免疫监视和细胞毒作用. 于是, Chum *et al*<sup>[71]</sup>采用HBx特异性CTLs进行过继免疫治疗. 他们发现, 当HBx52-60氨基酸特异性CTL克隆LC-46细胞被过继注入荷瘤(HBx相关性HCC)裸鼠体内后, 肿瘤逐渐消失. 这充分

说明, HBx 的清除在 HCC 的治疗中的重要性. (2) 核酶的应用: 过继免疫可以清除 HBx 蛋白, 锤头型核酶则可通过其剪切作用破坏 HBx mRNA, 从而减少 HBx 的表达. Kim *et al*<sup>[72]</sup> 设计了两种锤头型核酶 RzA 和 RzB, 他们分别剪切 HBx ORF 靶位点核苷酸 114 和 309. 他们在体外的剪切率分别为 52% 和 75%, 使 HBx mRNA 表达水平分别降低 40% 和 57%. 同时 HBx 的反式激活活性也被显著抑制. Weinberg *et al*<sup>[73]</sup> 也证实核酶表达载体能抑制 HBx mRNA 和功能蛋白的表达, 并抑制了 HBV 的复制. (3) RNA 干扰 (RNAi): RNAi 的目的是通过双链 RNA 来诱导目的基因的沉寂. 近年来已迅速成为阻断基因活性的标准实验技术. 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 由约 20 个碱基对组成, 可使特定的 RNA 降解. siRNA 在 RNA 沉寂中扮演中心角色. Hung *et al*<sup>[74]</sup> 构建了针对 HBx ORF 的小发夹 RNA (shRNA) 表达载体, 这种重组体在 COS-1 细胞中的表达抑制了 HBx 表达, 且呈现剂量依赖的抑制效应, 同时其同源基因的反式激活作用也被阻断.

2.2 阻断网络中的关键分子, 防止肝癌细胞的进一步增生和转移 虽然 HBx 在 HCC 的发生发展中起重要作用, 但单纯清除 HBx 有时并不能达到对 HCC 治疗的目的, 特别是对进展期 HCC, 效果可能不很理想. 因为转化肝细胞的癌变过程一旦启动, 其后续过程并不完全依赖于 HBx 的表达, 而是表现为多种信号级联反应. 在这些级联反应中起关键作用的分子已成为我们治疗 HCC 的靶点. 目前研究的热点是针对靶分子 mTOR 的抑制剂 rapamycin 及其衍生物, 其他关键分子的抑制剂尚处于实验研究阶段.

rapamycin 是一种链霉菌的衍生物, 因其能直接抑制 T、B 淋巴细胞的增生<sup>[75]</sup>, 最初被广泛用于器官移植受者的免疫抑制治疗. 后来发现, rapamycin 可阻断丝/苏氨酸激酶-mTOR 的活性, 对肿瘤细胞的细胞周期进程起抑制作用, 使细胞停滞于 G1 期, 并能诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[76-77]</sup>. 所以近来 rapamycin 已被当作一种前景光明的新抗癌剂<sup>[78]</sup>. 这在 HCC 患者的治疗中显得尤为重要<sup>[79]</sup>, 因为对这种患者, 肝移植是唯一有望治愈肿瘤的方法. 手术后单纯慢性免疫抑制药物的使用, 不仅可能引起 HCC 复发, 而且可能引发其他实体性和血液系恶性病变. 因此, 在解决器官移植后恶性疾病发生和复发方面, rapamycin 有着明显的优势. 然而实际工作中, 大多数肿瘤患者并不适于器官移植, 于是近年合成了无免疫抑制作用的 rapamycin 衍生物 CCI-779. 在临床前动物模型中, mTOR 抑制剂抑制了肿瘤的生长, 并诱导了肿瘤细胞的凋亡<sup>[80]</sup>. 随后的 I 期和 II 期临床试验<sup>[81-82]</sup> 证实 CCI-779 有明显的抗肿瘤活性. Raymond *et al*<sup>[81]</sup> 实验提示 CCI-779 无免

疫抑制效应, 患者有很好的耐受性.

其他的网络分子抑制剂有: PI3K 抑制剂 wortmanin 和 ERK 抑制剂 U0126 能使 HBx 相关性 HCC 细胞 MMP-9 的转录下降, 从而抑制了肿瘤的侵袭能力<sup>[32]</sup>; 胞质  $\text{Ca}^{2+}$  抑制剂 BAPTA-AM 和线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻滞剂 cyclosporine A 可使 Chang 细胞 HBx 诱导的 AP-1 反式激活作用受抑<sup>[30]</sup>; 其他如 SB203580 和 SB202190 可阻断 p38MAPK 活性, PD98059 阻断 MEK 而三羟异黄酮和 herbimycin A 则能抑制酪氨酸激酶的活性. 然而这些抑制剂仍仅限于在实验中作为定点阻断某个信号分子的研究工具. 由于其毒性较大, 并不能用于临床研究. 所以开发针对这些信号分子起抑制作用的低毒化合物是非常必要而且是切实可行的.

2.3 抑制癌基因, 阻止其对下游基因的进一步激活 可通过下列方法来达到抑制癌基因的目的: (1) 使癌基因沉默: 可采用反义基因、siRNA 和显性负变异体等方法沉默癌基因. 如 Wang *et al*<sup>[95]</sup> 应用 myc 反义基因使两个 HCC 细胞系 myc 蛋白的水平减少 95% 和 80%, 软琼脂集落形成能力减少 92% 和 88%, 裸鼠接种后肿瘤形成困难. Hung *et al*<sup>[74]</sup> 利用 siRNA 使 *c-myc* 的表达水平出现剂量依赖的特异性抑制效应, 且能与 HBx 的 siRNA 作用累加; (2) 癌基因产物抑制剂: 该抑制剂有抑制 HCC 细胞进一步增生和诱导细胞凋亡的作用. Shih *et al*<sup>[13]</sup> 证实, Src 家族激酶抑制剂 PP2 和 Csk (c-terminal Src kinase) 能减轻 HBx 介导的 PI3K 活性, 增加细胞对 TGF- $\beta$ 1 诱导凋亡的敏感性.

2.4 导入抑癌基因, 促进肿瘤细胞的凋亡 单纯封闭癌基因有时并不能达到治疗肿瘤的目的, 所以近年加强了抑癌基因治疗肿瘤的研究. 其中研究最多、应用最广的抑癌基因当属 p53. p53 虽然在某些肿瘤特别是肺癌治疗中取得了令人鼓舞的效果, 但对 HCC 的疗效却乏善可陈. 原因之一就是 HCC 患者体内的 HBx 可结合 p53 的羧基端而使之失活. 最近发现的 p53 家族的新成员 p73, 其氨基酸序列与 p53 高度同源, 也能激活 p53 下游靶基因, 如 p21cip1/wap1、PTEN 等, 且其激活作用较 p53 要强烈. p73 的另一个优势就是其羧基端与 p53 不同源<sup>[83]</sup>, 这使得 HBx 不能与 p73 结合而抑制其活性. 因此, 在 HCC 的治疗方面, p73 有更大的优势. 作者所在实验室目前正致力于 p73 的研究, 现已成功克隆出人 p73 全长序列 p73  $\alpha$  亚型, 我们期望其能在 HCC 的治疗中一展身手.

2.5 阻止 NF- $\kappa$ B 的激活, 消除其对细胞凋亡的抑制作用 肿瘤细胞凋亡是抗癌治疗有效反应的主要指标, 对凋亡的抵抗是肿瘤治疗失效的重要机制. 无论是放、化疗、还是抗肿瘤细胞因子如 TNF- $\alpha$  的使用, 均可能激活凋亡抑制因子 NF- $\kappa$ B, 从而引起肿瘤细胞对传统

内科治疗方法失敏感.因此,抑制NF- $\kappa$ B的活性在肿瘤的治疗特别是药物抵抗性肿瘤的治疗中占有重要地位.

下列方法可抑制NF- $\kappa$ B的活性,并可用于HCC的治疗:(1)特异性抑制物I- $\kappa$ B的应用:Wang *et al*<sup>[84]</sup>用腺病毒作载体将I- $\kappa$ B $\alpha$ 导入肿瘤细胞内.由于NF- $\kappa$ B的抑制,使化学抵抗性(chemoresistant)肿瘤变得对凋亡敏感,在应用化疗药CPT-11和TNF- $\alpha$ 后,肿瘤迅速消退;(2)化学合成抑制剂:sulindac能阻断NF- $\kappa$ B通路并增强TNF- $\alpha$ 介导的肿瘤细胞凋亡.Sulindac与TNF- $\alpha$ 的联用可显著地抑制肿瘤的生长<sup>[85]</sup>.pentoxifylline (PTX)和N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)也能抑制NF- $\kappa$ B的活性,虽然其单独应用并不能对HCC的发生和分化过程产生有效影响,但却能显著抑制大鼠HCC的肺转移<sup>[86]</sup>;(3)天然产物:某些天然产物具有化学治疗活性,可抑制NF- $\kappa$ B的作用.这些物质有:apigenin、epigallocatechin-3-gallate、curcumin、inoditol hexaphosphate、PC-SPEs、selenium、zinc、genistein、silibinin和indole-3-carbinol等.其中,silibinin在浓度低至10  $\mu$ mol/L时就能抑制NF- $\kappa$ B的活性<sup>[87]</sup>,经口服后对人肝脏疾病有明显的治疗效应<sup>[88]</sup>,并能减轻裸鼠负荷肿瘤的生长<sup>[89]</sup>.

**2.6 抑制VEGF的分泌及其功能,阻断肿瘤细胞氧和营养物质的补给** HCC是高度恶性的肿瘤,其倍增时间极短.为维持肿瘤细胞极快的生长速率,必须有不断新生的血管为其提供丰富的氧和营养物质.HCC患者VEGF的超高表达为肿瘤新生血管的形成提供了物质基础.研究表明,测定患者血清VEGF的水平能准确预测HCC的侵袭能力和预后<sup>[90]</sup>.所以,抑制HCC细胞VEGF的分泌及其功能,将有重要的现实意义.以往的体内实验提示(1)抗-VEGF抗体<sup>[91]</sup>,(2)显性负变异(dominant negative)VEGF受体的表达<sup>[92]</sup>和(3)反义VEGF基因<sup>[93]</sup>能明显地抑制肿瘤的生长.作者所在实验室曾利用反义寡核苷酸(ASODN)来抑制HCC细胞VEGF的表达,发现与VEGF mRNA帽子部位结合的ASODN抑制效果最好,其次为与翻译起始部位结合的ASODN<sup>[94]</sup>.目前正在进行裸鼠成瘤实验.

**2.7 导入XPB、XPD,促进损伤DNA的修复** 目前我们已经成功克隆了人类XPB和XPD基因,并已转染入HCC细胞,试验结果令人鼓舞.

实际上,肿瘤的形成不可能是由某个基因在短期内完成的,他是一个影响多个基因(包括癌基因和抑癌基因)的多步骤、多环节的慢性变异过程.所以,仅靠封闭某个癌基因或导入某一个抑癌基因,在多数情况下并不能解决根本问题.于是我们开始考虑利用联合基因的方法来治疗HCC.迄今,我们已设计并构建p53, p16和XPB, XPD融合基因,不久将可用于HCC细胞的处理.

### 3 展望

HBx对肝细胞内众多基因存在不同程度的影响.细胞内大多数已知的癌基因均可被HBx激活,而抑癌基因如p53则受到HBx的强烈抑制.按常理推论,HBx应该是强致癌剂.但令人疑惑的是,HBx的致癌活性并不高,其致癌性需要有环境因素的协同才能实现.在这一点上似乎HBx的前凋亡活性在起作用.然而在细胞水平的实验中这种情形并没有发现.由于实验者使用的细胞类型和表达系统的不同,出现的实验结果有时截然相反.即在某些细胞系或表达系统中HBx促进细胞生长,而在另一些细胞系或表达系统中则表现为细胞凋亡作用.因为缺乏研究资料,HBx在活体内特别是人体内的情况目前还不清楚.但我们完全有理由作出猜测,即游离的全长序列HBx的前凋亡活性与整合后变异的HBx的促生长作用可能达到某种平衡状态,使细胞趋于稳定.当这种平衡状态被外界环境或内部因素打破,甚或HBx的前凋亡活性与促生长作用协同之后,可能引起肿瘤形成.目前对HBx相关性HCC生物治疗的研究才刚刚起步,随着HBx致癌机制研究的不断深入,HCC的治疗将会有个重大的突破.我们目前要做的事情是找到一个使治疗真正有效的方法作为切入点,进行深入研究.我们相信对HCC治疗的研究也将会对其他肿瘤的治疗提供信息和借鉴.

### 4 参考文献

- 1 Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999;12: 351-366
- 2 Stuver SO. Towards global control of liver cancer. *Semin Cancer Biol* 1998;8:299-306
- 3 Parkin DM. The global burden of cancer. *Semin Cancer Biol* 1998;8:219-235
- 4 Wang Y, Cui F, Lv Y, Li C, Xu X, Deng C, Wang D, Sun Y, Hu G, Lang C, Yang X. HbsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2004;39:318-324
- 5 Koike K, Moriya K, Lino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, Kurokawa K. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994;19:810-819
- 6 Slagle BL, Lee TH, Median D, Finegold MJ, Butel JS. Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene. *Mol Carcinog* 1996;15:261-269
- 7 Terradillos O, Billet O, Renard CA, Levy R, Molina T, Briand P, Buendia MA. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene* 1997;14:395-404
- 8 Hwang GY, Lin CY, Huang LM, Wang YH, Wang JC, Hsu CT, Yang SS, Wu CC. Detection of the hepatitis B virus X protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Microb* 2003;41:5598-5603
- 9 Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, Marzio ED, Will H, Perricaudet M, Levrero M. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) x protein (pX) transactivate the c-myc protooncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:985-992



- 10 Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 1997;17:6427-6436
- 11 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *PNAS* 1994;91:10350-10354
- 12 Farshid M, Nedjar S, Mitchell F, Biswas R. Effect of hepatitis B virus X protein on the expression of retinoblastoma gene product. *Acta Virol* 1997;41:125-129
- 13 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein activates a survival signaling by linking Src to phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2003;278:31807-31813
- 14 Danial NN, Pernis A, Rothman PB. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science* 1995;269:1875-1877
- 15 Cha MY, Kim CM, Park YM, Ryu WS. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology* 2004;39:1683-1693
- 16 Lara-Pezzi E, Roche S, Andrisani OM, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus HBx protein induces adherens junction disruption in a Src-dependent manner. *Oncogene* 2001;20:3323-3331
- 17 Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu J, Harris CC. Hepatitis B virus x protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *PNAS* 1994;91:2230-2234
- 18 Lee SG, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral x protein. *Oncogene* 2000;19:468-471
- 19 Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, Will H, Harris CC. Hepatitis B virus x protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *PNAS* 1997;94:14707-14712
- 20 Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:3620-3628
- 21 Wang XW, Vermeulen W, Coursen JD, Gibson M, Lupold SE, Forrester K, Xu G, Elmore L, Yeh H, Hoeijmakers JH, Harris CC. The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev* 1996;10:1219-1232
- 22 Chung TW, Lee YC, Ko JH, Kim CH. Hepatitis B virus x protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the function of p53, a transcription activator in liver cells. *Cancer Res* 2003;63:3453-3458
- 23 Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD, Kappel CA, Ngo L, Feitelson MA, Jay G. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat Genet* 1995;9:41-47
- 24 Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, Horijmakers JH, Harris CC. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus x gene. *Cancer Res* 1995;55:6012-6016
- 25 Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001;276:16969-16977
- 26 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998;273:25510-25515
- 27 Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus x protein differentially activates Ras-Raf-MAPK and JNK pathways in x-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:34671-34680
- 28 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus x protein inhibits transforming growth factor- $\beta$ -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000;275:25858-25864
- 29 Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004;22:2954-2963
- 30 Oh JC, Jeong DL, Kim IK, Oh SH. Activation of calcium signaling by hepatitis B virus-X protein in liver cells. *Exp Mol Med* 2003;35:301-309
- 31 Chen BC, Wu WT, Ho FM, Lin WW. Inhibition of interleukin-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa$ B activation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase occurs through Akt activation associated with interleukin-1 receptor-associated kinase phosphorylation and uncoupling of MyD88. *J Biol Chem* 2002;277:24169-24179
- 32 Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathway: involvement of invasive potential. *FASEB J* 2004;18:1123-1125
- 33 Li J, Chen H, Tang MS, Shi X, Amin S, Desai D, Costa M, Huang C. PI-3K and Akt are mediators of AP-1 induction by 5-MCDE in mouse epidermal CI41 cells. *J Cell Biol* 2004;165:77-86
- 34 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B Virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *PNAS* 1995;92:11215-11219
- 35 Yoo YG, Oh SH, Park ES, Cho H, Lee N, Park H, Kim DK, Yu DY, Seong JK, Lee MO. Hepatitis B virus x protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  through activation of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2003;278:39076-39084
- 36 Scheid MP, Woodgett JR. PKB/Akt: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:760-768
- 37 Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome C from mitochondria. *Mol Cell Biol* 1999;19:5800-5810
- 38 Fujita E, Jinbo A, Matuzaki H, Konishi H, Kikkawa U, Momou T. Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:550-555
- 39 胡晓东, 张吉翔. NF- $\kappa$ B 信号转导通路对细胞周期的调控. *细胞生物学杂志* 2004;26:495-498
- 40 Weil R, Sirma H, Giannini C, Kremsdorf D, Bessia C, Dargemont C, Brechot C, Israel A. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus x protein with the NF- $\kappa$ B inhibitor I- $\kappa$ B. *Mol Cell Biol* 1999;19:6345-6354
- 41 Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus x protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cell by inducing NF- $\kappa$ B. *J General Virol* 2001;82:171-182
- 42 Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death. *Science* 1996;274:782-784
- 43 Bellas RE, FitzGerald MJ, Fausto N, Sonenshein GE. Inhibition of NF- $\kappa$ B activity induces apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Pathol* 1997;151: 891-896
- 44 Pan J, Clayton M, Feitelson MA. Hepatitis B virus X antigen promotes transforming growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) activity by up-regulation of TGF- $\beta$ 1 and down-regulation of  $\alpha$ 2-macroglobulin. *J Gen Virol* 2004;85:275-282
- 45 刘亮明, 张吉翔. TGF- $\beta$ 与原发性肝细胞癌. *国外医学. 消化系疾病分册* 2003;23:347-349
- 46 Chan CF, Yau TO, Jin DY, Wong CM, Fan ST, Ng IOL. Evaluation of nuclear factor-kappa B, urokinase-type plasminogen activator, and HBx and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(12 Pt1): 4140-4149
- 47 Lara-Pezzi E, Gomez-Gavero MV, Galvez BG, Mira E, Iniguez MA, Fresno M, Martinez AC, Arroyo AG, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus x protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002;110:1831-1838
- 48 Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997;91:439-442
- 49 Lara-Pezzi E, Majano PL, Yanez-Mo M, Gomez-Genzalo M, Carretero M, Moreno-Otero R, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M. Effect of the hepatitis B virus HBx protein on integrin-mediated adhesion to and migration on extracellular matrix. *J Hepatol* 2001;34:409-415
- 50 Lara-Pezzi E, Serrador JM, Montoyer MC, Zumora D, Yanez-Mo M, Carretero M, Furthmayr H, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein(HBx)induces a

- migratory phenotype in a CD44-dependent manner: possible role of HBx in invasion and metastasis. *Hepatology* 2001;33:1270-1281
- 51 Shintani Y, Yotsuganagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kanegae Y, Kimura S, Saito I, Koike K. Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus x gene mediated by Cre/Lox P recombination system. *J General Virol* 1999;80:3257-3265
  - 52 Kim H, Lee H, Yun Y. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cell. *J Biol Chem* 1998;273:381-385
  - 53 Kim KH, Seong BL. Pro-apoptosis function of HBV x protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003;22:2104-2116
  - 54 Gao FG, Sun WS, Cao YL, Zhang LN, Song J, Li HF, Yan SK. HBx-DNA probe preparation and its application in study of hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1998;4:320-322
  - 55 Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Brechot P, Brechot C, Kremsdorf D. Biological impact of natural cooh-terminal deletions of hepatitis B virus x protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001;61:78003-78010
  - 56 Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989;58:1145-1156
  - 57 Tralhao JG, Roudier J, Morosan S, Giannini C, Tu H, Goulenok C, Carnot F, Zavala F, Joulin V, Kremsdorf D, Brechot C. Paracrine in vivo inhibitory effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on liver cell proliferation: an alternative mechanism of HBx-related pathogenesis. *PNAS* 2002;99:6991-6996
  - 58 Yoo YG, Lee MO. Hepatitis B virus X protein induces expression of Fas ligand gene through enhancing transcriptional activity of early growth response factor. *J Biol Chem* 2004;279:36242-36249
  - 59 Hwang GY, Huang CJ, Lin CY, Wu CC. Dominant mutations of hepatitis B virus variant in hepatoma accumulation in B-cell and T-cell epitopes of the HBx antigen. *Virus Res* 2003;92:157-164
  - 60 Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1162-1168
  - 61 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Hepatitis B virus x protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol* 2001;75:3851-3858
  - 62 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Altered DNA mutation spectrum in aflatoxin B1-treated transgenic mice that express the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 2002;76:11770-11774
  - 63 Prost S, Ford JM, Taylor C, Doig J, Harrison DJ. Hepatitis B virus x protein inhibits p53-dependent DNA repair in primary mouse hepatocytes. *J Biol Chem* 1998;273:33327-33332
  - 64 Wakasugi M, Kawashima A, Morioka H, Linn S, Sancar A, Mori T, Nikaido O, Matsunaga T. DDB accumulates at DNA damage sites immediately after uv irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 2002;277:1637-1640
  - 65 Leupin O, Bontron S, Strubin M. Hepatitis B virus x protein and simian virus 5V protein exhibit similar uv-DDB1 binding properties to mediate distinct activities. *J Virol* 2003;77:6274-6283
  - 66 Marinoni JC, Roy R, Vermeulen W, Miniou P, Lutz Y, Weeda G, Serez T, Gomez DM, Hoeijmakers JHJ, Egly JM. Cloning and characterization of p52, the fifth subunit of the core of the transcription/DNA repair factor TF II H. *EMBO J* 1997;16:1093-1102
  - 67 Jaitovich-Groisman I, Belimane N, Slagle BL, Perez MH, Alpert L, Song DJ, Fotouhi-Ardakani N, Falipeau J, Alaoui-Jamali MA. Transcriptional regulation of the TF II H transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem* 2001;276:14124-14132
  - 68 Tao X, Shen D, Ren H, Zhang X, Zhang D, Ye J, Gu B. Hepatitis B virus X protein activates expression of IGF-IR and VEGF in hepatocellular carcinoma cells. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2000;8:161-163
  - 69 Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002;22:7004-7014
  - 70 Liang XH, Stemler M, Will H, Braun R, Tang ZY, Schroder CH. Low incidence and high titers of antibodies to hepatitis B virus X-protein in sera of Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 1988;25:329-337
  - 71 Chun E, Lee J, Cheong HS, Lee KY. Tumor eradication by hepatitis B virus X antigen-specific CD8+ T cells in xenografted nude mice. *J Immunol* 2003;170:1183-1190
  - 72 Kim YK, Junn E, Park I, Lee Y, Kang C, Ahn JK. Repression of hepatitis B virus X gene expression by hammerhead ribozymes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:759-765
  - 73 Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbutnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 2000;33:142-151
  - 74 Hung L, Kumar V. Specific inhibition of gene expression and transaction functions of hepatitis B virus X protein and c-myc by small interfering RNAs. *FEBS Lett* 2004;560:210-214
  - 75 Sievers TM. New antiproliferative immunosuppressive agents. *J Pharm Pract* 2003;16:401-413
  - 76 Decker T, Hipp S, Ringshausen I, Bogner C, Oelsner M, Schneller F, Peschel C. Rapamycin-induced G1 arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclinE, cyclinA and survivin. *Blood* 2003;101:278-285
  - 77 Dutcher JP. Mammalian target of rapamycin inhibition. *Clin Cancer Res* 2004;10:6382-6387
  - 78 Garber K. Rapamycin's resurrection: a new way to target the cancer cell cycle. *J Natl Cancer Institute* 2001;93:1517-1519
  - 79 Guba M, Lohe F. Transplantation in cancer disease, and tumors in organ transplantation: current aspects and future prospects. *MMW Fortschr Med* 2004;146:32-34
  - 80 Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol Ther* 2003;2:222-232
  - 81 Raymond E, Alexandre J, Faivre S, Vera K, Maternan E, Boni J, Leister C, Korth-Bradley J, Hanauske A, Armand JP. Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2336-2347
  - 82 Atkins MB, Hidago M, Stadler WM, Logan TF, Dutcher JP, Hudes GR, Park Y, Liou SH, Marshall B, Boni JP, Dukart G, Sherman ML. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:909-918
  - 83 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lillias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in enuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-819
  - 84 Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 1999;5:412-417
  - 85 Yasui H, Adachi M, Imai K. Combination of tumor necrosis factor-alpha with sulindac augments its apoptotic potential and suppresses tumor growth of human carcinoma cells in nude mice. *Cancer* 2003;97:1412-1420
  - 86 Futakuchi M, Ogawa K, Tamano S, Takahashi S, Shirai T. Suppression of metastasis by nuclear factor-kappaB inhibits in an in vivo lung metastasis model of chemically induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2004;95:18-24
  - 87 Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. Silibinin inhibits constitutive and TNFalpha-induced activation of NF-kappaB and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells

- to TNFalpha-induced apoptosis. *Oncogene* 2002;21:1759-1767
- 88 Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 2001;61:2035-2063
- 89 Singh RP, Sharma G, Dhanalakshmi S, Agarwal C, Agarwal R. Suppression of advanced human prostate tumor growth in athymic mice by silibinin feeding is associated with reduced cell proliferation, increased apoptosis, and inhibition of angiogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:933-939
- 90 Poon RT, Ng IO, Lau C, Zhu LX, Yu WC, Lo CM, Fan ST, Wong J. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Surg* 2001;233:227-235
- 91 Warren RS, Yuan MR, Matli NA, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995;95:1789-1797
- 92 Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994;367:576-579
- 93 Saleh MS, Stacker SA, Wilks AF. Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res* 1996;56:393-401
- 94 刘亮明, 龚邦东, 张吉翔, 郭柏林, 朱水山, 文艺. 反义基因对肝癌血管内皮生长因子表达的抑制. *中华消化杂志* 2004;24:369-370
- 95 Wang HP, Zhang L, Dandri M, Rogler CE. Antisense downregulation of N-myc1 in Woodchuck hepatoma cells reverses the malignant phenotype. *J Virol* 1998;72:2192-2198

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

### 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版). 本版核心期刊研究, 被列为“2001年国家社会科学基金项目”. 该书定于2004年7月由北京大学出版社出版.

该书已于1992, 1996, 2000年出版过三版, 在社会引起了较大反响. 图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书. 为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 开展了新版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况. 本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种. 本版还加大了专家评审力度, 1873位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊, 分属七大编75个学科类目. 该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书.

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作参加了研究.(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)

# 干扰素对肝星状细胞活化的影响

饶慧瑛, 魏 来

饶慧瑛, 魏来, 北京大学人民医院肝病研究所 北京市 100044  
饶慧瑛, 女, 1978-02-24 生, 江西南城人, 汉族, 主要从事肝纤维化及丙型肝炎的研究。

项目负责人: 饶慧瑛, 100044, 北京市, 北京大学人民医院肝病研究所.  
rao.huiying@163.com  
电话: 010-68314422

收稿日期: 2004-12-31 接受日期: 2005-01-20

## 摘要

干扰素分为两大类:I 型和 II 型.I 型干扰素分为 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\omega$ , II 型干扰素 IFN- $\gamma$ .IFN 结合细胞表面特殊的受体. IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  竞争结合细胞表面相同的受体, 而 IFN- $\gamma$  结合不同的受体, 干扰素的受体本身并无酪氨酸激酶活性, 但也可以激活酪氨酸激酶通路, 将信号有细胞表面而传导至核而影响特异的基因转录等一系列细胞内事件. IFN- $\alpha$  已经显示在各种类型的间质细胞中有抗增生和抗纤维化作用. IFN- $\beta$  可能更容易诱导细胞凋亡, 另外可以减少  $\alpha$ -SMA 表达, 从而减轻肝纤维化. IFN- $\gamma$  是肝纤维化发展中一个关键的调节因子, 通过抑制肝星状细胞的活化, 拮抗 TGF- $\beta$ 1, 诱导胶原酶产生而降低细胞外基质的沉积。

**关键词:** 干扰素; 肝星状细胞; 胶原纤维

饶慧瑛, 魏来. 干扰素对肝星状细胞活化的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13(4):440-442

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/440.asp>

## 0 引言

肝硬化是严重威胁人类生命健康的疾病. 各种病因所致肝硬化的发生发展进程中均伴有明显的肝纤维化, 肝内胶原纤维生成增多, 分布异常. 因此抗肝纤维化的研究成为防治肝硬化、门静脉高压症发病的关键. 病理状态下肝脏过度纤维化的本质一直难以明确. 直到近 10 a 来, 随着肝内各种细胞成分分离培养技术的成熟, 终于证实肝间质中的肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 是肝内胶原纤维的主要来源细胞<sup>[1-3]</sup>. 现已明确, 激活的 HSC 是肝纤维化、门静脉高压症发生发展过程中的关键环节. 本文就干扰素对于肝星状细胞活化的影响进行了总结。

## 1 干扰素的生物学作用

1957 年 Isaacs 和 Lindenmann 首先发现了病毒干扰现象, 即病毒感染的细胞能产生一种细胞因子, 他们作用于其他的细胞后可干扰病毒的复制, 因而得名为

干扰素 (Interferon, IFN). 研究表明干扰素不能直接杀伤病毒, 而是诱导宿主细胞产生数种酶, 干扰病毒的基因转录或病毒蛋白组分的翻译. 干扰素分为两大类: I 型和 II 型. I 型干扰素根据免疫学特性和氨基酸序列分为 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\omega$ , 均对酸稳定, IFN- $\alpha$ 、IFN- $\omega$  由白细胞产生, 而 IFN- $\beta$  主要由成纤维细胞、白细胞等在细菌、病毒、多聚肌苷酸、多聚胞苷酸、核苷酸等刺激物诱导下产生<sup>[1]</sup>. II 型干扰素 IFN- $\gamma$  (也称为免疫干扰素) 为酸敏感型, 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生. I 型或 II 型干扰素的产生决定于刺激信号和被刺激的细胞性质. IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  基因均位于人 9 号染色体和小鼠 4 号染色体, 并连锁在一起. IFN- $\alpha$  基因至少有 20 个, 成串排列在一个区域, 无内含子, IFN- $\alpha$  基因家族已知至少编码 12 种蛋白质, 同一种属 IFN- $\alpha$  不同基因产物其氨基酸同源性  $\geq 80\%$ . IFN- $\alpha$  由 2 个亚族组成, 分别称为 IFN- $\alpha$ 1 和 IFN- $\alpha$ 2, 彼此间有 90% 左右的同源性. 人和小鼠 IFN- $\beta$  基因只有一个, 无内含子, 与 IFN- $\alpha$  基因连锁在一起. 虽然 IFN- $\beta$  与 IFN- $\alpha$  氨基酸组成仅有 26-30% 同源性, 但二者拥有相同的细胞受体和细胞内信号传导途径. IFN- $\alpha$  的生物学作用有一定的种属特异性, IFN- $\beta$  的生物学作用有较强的种属特异性<sup>[4-5]</sup>. 人和小鼠 IFN- $\gamma$  基因分别定位于 12 号和 10 号染色体, 在 DNA 水平上 IFN- $\gamma$  基因与 IFN- $\alpha/\beta$  基因无同源性. 人和小鼠 IFN- $\gamma$  在 DNA 水平上有 65% 左右同源性, 在氨基酸水平的同源性只有 40% 左右. 人 IFN- $\gamma$  成熟分子由 143 个氨基酸组成, 糖蛋白, 以同源双体形式存在, 分子量为 40 kDa, 其生物学作用有严格的种属特异性。

IFN 结合细胞表面特殊的受体. IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  竞争结合细胞表面相同的受体, IFN- $\alpha/\beta$  R 基因定位于 21 号染色体, 受体胞膜外结构属细胞因子受体中干扰素受体家族. IFN- $\alpha/\beta$  受体分布相当广泛, 包括单核细胞、巨噬细胞、多形核白细胞、B 细胞、T 细胞、血小板、上皮细胞、内皮细胞和肿瘤细胞等. IFN- $\alpha$ R 由两个独立的亚单位组成, 即 IFN- $\alpha$ R1、IFN- $\alpha$ R2. IFN- $\alpha$ R2c 多肽可能为受体的主要配体结合成分, 他与几种 IFN- $\alpha$  亚型均有亲和力; 而 IFN- $\alpha$ R1 对于信号转导起重要作用. 而 IFN- $\gamma$  结合不同的受体, 人 IFN- $\gamma$ R 基因定位于第 6 号染色体, 小鼠在第 10 号染色体. IFN- $\gamma$ R 由两条跨

膜链组成, 即 IFN- $\gamma$ R1、IFN- $\gamma$ R2, 其中, IFN- $\gamma$ R1 与 IFN- $\gamma$  配体结合, 而 IFN- $\gamma$ R2 在 IFN- $\gamma$  的信号转导中起重要作用. IFN- $\gamma$  受体广泛表达于造血细胞来源的细胞表面, 包括外周血来源的和骨髓来源的造血祖细胞表面.

干扰素的受体本身并无酪氨酸激酶活性, 但也可以激活酪氨酸激酶通路, 将信号有细胞表面而传导至核而影响特异的基因转录等一系列细胞内事件. 这一类细胞因子受体是通过所谓的 Jak-STAT 途径. 即配基与受体结合后即激活一类酪氨酸激酶, 称为 Jannus 激酶 (Jak). 这类激酶的成员包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 JYK2 等<sup>[6]</sup>. 他们均具有相似的结构, 即在 N 端有 5 个保守区, 在 C 端有 2 个结构域: 类激酶结构域和激酶结构域. 研究表明不同的细胞因子受体的信号经由不同的 JAK 成员所介导. 两型干扰素的信号转导通路类似, 均使用一些共同的信号系统和效应子. I 型干扰素信号转导的主要通路包括 STAT 蛋白的活化并形成复合物转位至细胞核, 与特殊的 DNA 元件结合调节有关基因的转录. 此通路 (Jak-Stat pathway) 显然由 Jak 激酶家族成员调节, 他们与 I 型干扰素受体有结构上的联系. 另外, 许多其他的 Jak 激酶依赖的信号转导通路被激活, 如 IRS-PI 3' 激酶通路和 Crk 家族蛋白. 唯一的 II 型干扰素 IFN- $\gamma$  同样激活多种 Jak 激酶依赖的信号通路, 包括 Stat 和 Crk 通路<sup>[4]</sup>.

## 2 IFN- $\alpha$ 对肝星状细胞活化的影响

IFN- $\alpha$  已经显示在各种类型的间质细胞中有抗增生和抗纤维化作用, 包括 HSC. IFN- $\alpha$  不仅有预防肝纤维化形成的作用, 而且对业已形成的肝纤维化组织有降解作用, 其作用机制可能如下: (1) 抑制 HSC 活化. Inagaki *et al*<sup>[7]</sup> 的研究发现 IFN- $\alpha$  用于治疗慢性丙型肝炎, 无论患者对于治疗是否有病毒学应答, 患者的血清纤维化指标均得到改善, 说明 IFN- $\alpha$  除了抗病毒的作用外, 还有直接的抗纤维化作用. 他们把 IFN- $\alpha$  注射入转有  $\alpha$ 1(I) collagen gene (COL1A2) 的转基因小鼠, 发现能明显抑制 CCL<sub>4</sub> 引起的肝纤维化. 进一步分析发现 IFN- $\alpha$  能抑制 TGF- $\beta$ /Smad3 引起的 COL1A2 复制, 抑制 COL1A2 启动子的活化, 从而抑制肝星状细胞的活化. IFN- $\alpha$  可作为一个 HSC 早期激活阶段的抑制剂而预防肝纤维化形成. 脂质过氧化是肝纤维化研究的热点, 体内研究中证实: 给予抗氧化剂后, 可以降低人类丙型肝炎患者肝中 HSC 的活化, 可以抑制实验性铁超载动物模型中肝纤维的发生和发展. Lu *et al*<sup>[8]</sup> 研究发现 IFN- $\alpha$  降低氧应激, 保护肝星状细胞免于脂质过氧化, 从而抑制 HSC 的活化. Vendemiale *et al*<sup>[9]</sup> 有同样的发现, 他们发现 IFN- $\alpha$  能起到与抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 同样的作用,

通过降低氧应激, 来减少肝纤维化, 而不是通过抗病毒效应实现的. (2) 诱导激活的 HSC 凋亡. 肝纤维化恢复期激活状态的 HSC 减少主要通过凋亡机制, 而不是表型的转化. 凋亡不引起溶酶体等细胞器的破坏, 凋亡细胞在数小时内被周围的细胞所吞噬, 很少引起微环境的炎症反应, 是一种理想的清除活化 HSC 的方式. HSC 的凋亡具有重要意义, 一方面 HSC 数量的减少使 ECM 分泌减少, 更重要的是由活化 HSC 分泌的金属蛋白酶抑制物减少, 促进 ECM 的降解. IFN- $\alpha$  可通过诱导活化的 HSC 凋亡阻断肝纤维化的瀑布式效应, 其作用机制是通过影响凋亡相关基因的表达 (下调 bcl-xL 的表达, 上调 Fas 的表达) 或肝细胞的作用间接促进 HSC 的凋亡, 尚有待进一步研究. 但是 Saile *et al*<sup>[10]</sup> 研究却有不同发现, IFN- $\alpha$  能明显抑制 HSC 的凋亡, 主要是通过活化 Janus kinase 2 (JAK2), 从而抑制 caspase-8 凋亡通路. (3) 增加胶原酶活性, 促进 ECM 降解. 肝内纤维组织的沉积与降解是一个动态平衡过程, 其降解依赖于胶原酶活性, Watanabe *et al*<sup>[11]</sup> 报道 IFN- $\alpha$  可提高基质金属蛋白酶活性, 促进 ECM 降解.

## 3 IFN- $\beta$ 对肝星状细胞活化的影响

Sakaida *et al*<sup>[12]</sup> 发现  $\alpha$ -SMA 在星状细胞的表达与肝纤维化有关, 而 IFN- $\beta$  可以减少这种表达, 从而减轻肝纤维化. Sakaida 观察了 51 个使用 IFN- $\beta$ 、IFN- $\alpha$  治疗的患者, 完全应答 18 人, 部分应答 17 人, 无应答 16 人. IFN 治疗前, 患者肝脏活体组织显示大量的星状细胞表达  $\alpha$ -SMA. 治疗前后, 肝脏纤维化的程度与平滑肌肌动蛋白的表达有明确的相关 ( $r = 0.699$ ,  $P < 0.05$ ). 治疗完全应答组平滑肌肌动蛋白表达明显减少, 血清谷丙转氨酶正常. 有临床报道, 小剂量应用 IFN 副作用轻微, 治疗肝纤维化有一定效果. HCV 所致早期或轻度失代偿肝硬化患者使用 IFN 是有益的, 但在晚期使用效果不佳, 且易加重病情.

诱导细胞凋亡是干扰素发挥作用的主要机制, HIF-1 $\alpha$  是调节凋亡非常重要的因子, 该因子只受 IFN- $\beta$  调控, 所以 IFN- $\beta$  可能更容易诱导细胞凋亡. Jak1 酪氨酸激酶更易在 IFN- $\beta$  作用下产生, IFN- $\beta$  比 IFN- $\alpha$  更易刺激 Stat1 和 Stat2 酪氨酸磷酸化以及 IFN-刺激基因因子 3 (ISGF3) 复合体的产生, 不同的 I 型 IFN 是激活 Jak-Stat 通路的不同物质. IFN- $\beta$  调控更多范围的 ISGs<sup>[13]</sup>.

Shen *et al*<sup>[14]</sup> 研究了 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  和 IFN- $\gamma$  对于大鼠肝脏星状细胞活化的影响, 他们发现 IFN- $\alpha$  对于培养的星状细胞的增生、BrdU (Bromo-2'-deoxyuridine) 融合以及 SMA 的表达无影响, 但是 IFN- $\beta$  能抑制培养的星状细胞的增生以及 BrdU 融合, 能减少

SMA 的表达, 能减少星状细胞的数量, IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  对肝脏星状细胞有不同的生物效应, 考虑可能是 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  通过不同的信号转导通路对星状细胞起作用。

#### 4 IFN- $\gamma$ 对肝星状细胞活化的影响

IFN- $\gamma$  是肝纤维化发展中一个关键的调节因子, 通过抑制肝星状细胞的活化, 拮抗 TGF- $\beta$ 1, 诱导胶原酶产生而降低细胞外基质的沉积. Baroni *et al*<sup>[15]</sup> 动态观察了大鼠在用 DMN、IFN- $\gamma$ 、DMN+IFN- $\gamma$ 、生理盐水处理后肝星状细胞的增生、活化以及各种细胞外基质成分的表达情况, 认为每日给予 IFN- $\gamma$  可以抑制 DMN 诱导的肝纤维化的发展, 其机制是 IFN- $\gamma$  抑制了肝星状细胞在肝损伤发生后的全过程, 包括肝星状细胞在局部的增生、活化和对细胞外基质的合成, 而且持续作用到肝纤维化的后阶段. IFN- $\gamma$  不仅能够抑制胶原纤维进一步形成, 更能有力地促进胶原降解, 这种特性也许是其他细胞因子所不具有的. IFN- $\gamma$  在肝损伤发生后, 不但通过抑制胶原基因的转录、纤维连接蛋白的表达及促进 PGE2 的生成等途径抑制胶原纤维的进一步产生; 而且直接调节和促进胶原酶的表达, 降解过多的细胞外基质, 从而达到缓解肝纤维化的作用. Shibata *et al*<sup>[16]</sup> 发现 IFN- $\gamma$  能明显减少体外培养的肝星状细胞分泌 TGF- $\beta$ 1, 以及减少 I 型胶原、PDGF- $\beta$ R 和  $\alpha$ -SMA 的表达。

IFN- $\gamma$  能诱导星状细胞的凋亡. Saile *et al*<sup>[17]</sup> 研究发现 IFN- $\gamma$  作用于肝星状细胞能下调 HSP70 M 的表达, 诱导星状细胞凋亡. 而 IFN- $\alpha$  能上调 HSP70 M 的表达, IFN- $\gamma$  与 IFN- $\alpha$  一起作用于星状细胞则对其诱导凋亡的作用消失, 对于 CD95、CD95L、bcl-2、bax、bcl-xL、p53、p21WAF1、p27、NFkappaB 等细胞凋亡调节因子的表达没有影响. 当活化的星状细胞转染了 pCMV-HSP70 M, 则 IFN- $\gamma$  的诱导凋亡作用消失。

#### 5 参考文献

- 1 Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001;21:427-436
- 2 Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999;19:397-410
- 3 Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:618-633
- 4 Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jack-STAT pathways and transcriptional activation in responses to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421
- 5 Uze G, Lutfalla G, Morgensen KE. Alpha and beta interferon and their receptor and their friends and relations. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15:3-26
- 6 Dearolf CR. JAKs and STATs in invertebrate model organisms. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1578-1584
- 7 Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fujii M, Yamauchi H, Nakao A, de Crombrughe B, Watanabe T, Okazaki I. Interferon alpha down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2003;38:890-899
- 8 Lu G, Shimizu I, Cui X, Itonaga M, Tamaki K, Fukuno H, Inoue H, Honda H, Ito S. Interferon-alpha enhances biological defense activities against oxidative stress in cultured rat hepatocytes and hepatic stellate cells. *J Med Invest* 2002;49:172-181
- 9 Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, Serviddio G, Valentini AM, Pirrelli M, Altomare E. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;175:130-139
- 10 Saile B, Eisenbach C, El-Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. Antiapoptotic effect of interferon-alpha on hepatic stellate cells(HSC): a novel pathway of IFN-alpha signal transduction via Janus kinase 2(JAK2)and caspase-8. *Eur J Cell Biol* 2003;82:31-41
- 11 Watanabe T, Niioka A, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2001;35:465-473
- 12 Sakaida I, Nagatomi A, Hironaka K, Uchida K, Okita K. Quantitative analysis of liver fibrosis and stellate cell changes in patients with chronic hepatitis C after interferon therapy. *Am J Gastroenterol* 1999;94:489-496
- 13 Platanias LC, Uddin S, Domanski P, Colamonici OR. Differences in interferon alpha and beta signaling. Interferon beta selectively induces the interaction of the alpha and betaL subunits of the type 1 interferon receptor. *J Biol Chem* 1996;271:23630-23633
- 14 Shen H, Zhang M, Minuk GY, Gong Y. Different effects of rat interferon alpha, beta and gamma on rat hepatic stellate cell. *BMC Cell Biol* 2002;3:9-13
- 15 Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, Casini A, Mancini R, Jezequel AM, Benedetti A. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 1996;23:1189-1199
- 16 Shibata N, Watanabe T, Okitsu T, Sakaguchi M, Takesue M, Kunieda T, Omoto K, Yamamoto S, Tanaka N, Kobayashi N. Establishment of an immortalized human hepatic stellate cell line to develop antifibrotic therapies. *Cell Transplant* 2003;12:499-507
- 17 Saile B, Eisenbach C, Dudas J, El-Armouche H, Ramadori G. Interferon-gamma acts proapoptotic on hepatic stellate cells (HSC)and abrogates the antiapoptotic effect of interferon-alpha by an HSP70-dependant pathway. *Eur J Cell Biol* 2004;83:469-476

# 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展

秦环龙, 高志光

秦环龙, 高志光, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233  
国家自然科学基金项目, No. 30271286, 30471687  
秦环龙, 男, 1965-11-13 生, 江苏省张家港人, 汉族, 上海交通大学外科学  
教授, 主任医师, 博士, 硕士生导师, 现为上海交通大学附属第六人民医院副  
院长, 肠外与肠内营养研究室主任, 主要从事胃肠外科及临床营养研究工作。  
项目负责人: 秦环龙, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第  
六人民医院外科, sshosp@public.sta.net.cn  
电话: 021-64942226 传真: 021-64368920  
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-01-20

## 摘要

肠上皮细胞紧密连接是肠上皮细胞间的主要连接方式, 对维持上皮细胞极性及调节肠屏障的通透性发挥着重要的作用。因此, 维持完整的肠上皮结构和功能对于保护肠道屏障功能、防止细菌内毒素及毒性大分子物质进入体内具有重要意义。本文从紧密连接在肠上皮中的生物学功能、分子调控机制及当前研究现状等作综合阐述。

**关键词:** 肠上皮细胞; 紧密连接; 黏膜屏障

秦环龙, 高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展. 世界华人  
消化杂志 2005; 13(4): 443-447  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/443.asp>

## 0 引言

黏膜屏障是肠道最重要的一道屏障, 他由完整的肠上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC)和相邻肠上皮细胞之间的连接构成, 并调控着水和溶质的跨上皮转运(如单糖、氨基酸、核苷酸、维生素及激素等)。相邻上皮细胞间的连接方式有多种, 如紧密连接(tight junction, TJ)、缝隙连接(gap junction, GJ)、黏附连接(adherence junction, AJ)以及桥粒(desmosome)等。而TJ是细胞间最重要的连接方式, 其功能是只允许离子及小分子可溶性物质通过, 而不允许毒性大分子及微生物通过, 这种特殊生理功能在肠道屏障的维护中起着举足轻重的作用。近年来, 对紧密连接蛋白(如Occludin、Claudins、ZO等)的结构研究取得了一定的进展, 但有关这些蛋白的生物学功能及其在肠屏障中如何发挥作用却知之甚少。此外, 由严重创伤、外科感染、脓毒症(尤其是肠源性致病菌如梭状芽孢杆菌、大肠杆菌和脆弱类杆菌等细菌感染)等引起TJ发生变化及所致肠黏膜通透性增高, 细菌、毒素移位而发生肠源性感染的机制也未阐明。这方面的研究为深化肠屏障功能的机制和提升基础科学

理论具有重要意义。同时, 也是临床医师颇为关注得热点问题。

## 1 紧密连接的生物学功能

1.1 紧密连接的分子结构 现已证明有多种蛋白质参与紧密连接的形成, 根据不同作用可将这些蛋白分为结构蛋白(Occludin, Claudin<sup>[1-2]</sup>, JAM等<sup>[3]</sup>)和调节蛋白(如E钙粘素、肌动蛋白、肌球蛋白、Cingulin等<sup>[4]</sup>)。TJ在超薄切片电镜下表现为细胞膜表面不连续的融合点或吻合点。冰冻蚀刻电镜下表现为细胞胞质面的连续的吻合线和胞外膜相应的凹槽, 封闭细胞间隙(屏障功能), 并将细胞顶部与基侧部分开(栅栏功能)。

诸多紧密连接蛋白中, 尤以Occludin及Claudins最为重要。Occludin为一完整的II型跨膜蛋白, 分子量约65 ku<sup>[5]</sup>, 含四个跨膜结构, 在维持和调节紧密连接屏障功能中具有重要作用。冰冻蚀刻电镜显示, Occludin位于紧密连接线上。Furuse *et al*<sup>[1]</sup>研究发现, 用Occludin转染L-纤维母细胞(缺乏TJ)后, 相邻细胞之间可以形成TJ样纤维。Claudins是Occludin之后被发现又一类参与紧密连接的跨膜蛋白, 也含四个跨膜结构。冰冻蚀刻电镜技术显示, Claudins是构成紧密连接线的主要成分<sup>[6]</sup>。Claudins在不同时期和不同的组织其表达也不同。ZOs是一种外周膜蛋白, 其三种异构体(ZO1, ZO2和ZO3)均含有由鸟苷酸激酶样(GUK)结构域、PDZ、Src同源SH3结构、酸性结构域等组成的保守序列, 能够与胞质内的其他蛋白如Occludins蛋白的C末端连接, 而ZO1的C末端则可结合肌动蛋白和应激纤维, 从而将Occludin和肌动蛋白骨架系统连接在一起构成稳定的连接系统<sup>[7-10]</sup>。连接黏附分子(JAM)为免疫球蛋白超家族成员, 因此在结构上与Occludins及Claudins明显不同, 位于上皮细胞紧密连接处, 体外化学趋化实验或体内炎症反应模型均证实JAM能够限制白细胞穿过TJ处, 表明JAM在炎症反应时白细胞的游出中发挥重要作用。肌动蛋白位于上皮细胞顶侧连接复合物下形成显著的环状结构<sup>[11]</sup>, 称为周围连接肌动蛋白, 其中含有相当多的肌球蛋白, 通过肌动蛋白结合蛋白与细胞膜相连, 参与紧密连接的调节。

## 1.2 紧密连接的作用

**1.2.1 选择性屏障** 肠上皮细胞 TJ 作为动态的通透性屏障,具有双重功能:阻止潜在的有害物质或病原体进入机体,同时允许营养物质、离子和水进入体内.临床研究发现,高糖饮食时葡萄糖吸收率并不与葡萄糖转运体的增加成正比.有学者认为,这是由于营养素能够诱导细胞旁路通透性的增加所致. Madara *et al*<sup>[12]</sup>发现,在肠上皮细胞顶部加入超生理剂量的葡萄糖或色氨酸,能够增加上述物质的跨细胞旁路转运并降低跨膜电阻抗(TER).通常情况下,葡萄糖和氨基酸如色氨酸等是通过肠黏膜上皮细胞的  $\text{Na}^+$  偶联转运体而被吸收入细胞的.此时,大量  $\text{Na}^+$  和水进入胞质,胞质中过多的  $\text{Na}^+$  通过更多  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  交换或  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  交换而恢复正常.同时,胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,激活肌球蛋白轻链并使之磷酸化,从而使肌动蛋白环和 TJ 相关的细胞骨架收缩,细胞旁路通透性增加,其结果必然是经细胞旁路吸收的葡萄糖和氨基酸增多.还有研究发现,在病理状态下,紧密连接蛋白可产生收缩现象,并向胞质中移动,细胞孔隙(窗孔)明显扩大,导致大分子物质及毒素、细菌移位,此时肠黏膜就丧失其选择性屏障作用.

**1.2.2 维持栅栏功能** 已知 TJ 由围绕上皮细胞顶端的跨膜蛋白(Occludin、Claudins 等)构成,从而限制了以 TJ 为界的上皮细胞顶侧和基侧膜两部分细胞膜上的脂质自由流动(即栅栏功能).这两部分的主要区别在于脂质和蛋白质的构成不同<sup>[13]</sup>,基侧膜的结构和功能与一般的非上皮细胞相似,而顶侧膜富含鞘糖脂和胆固醇<sup>[14]</sup>,而磷脂相对缺乏,鞘糖脂可通过分子之间的 H 键相互连接,维护肠黏膜的硬度和不可通透性,从而保护机体免受细菌、毒素等有害物质的入侵.研究发现 Occludin 的显性或隐性变异表达均能够破坏上皮细胞的极性及膜脂流动性,表明 Occludin 参与该功能的形成和调控.也有学者认为此结构对维持蛋白极性具有重要作用,但当该结构被破坏后,细胞膜的稳定性即丧失. Ebnet *et al* 认为细胞极性的形成可能与连接黏附分子(JAM)及极性蛋白 PAR-3 有关<sup>[15]</sup>.

**1.3 肠上皮细胞 TJ 的调控** 肠上皮 TJ 一旦发生变异、减少或缺失,IEC 间隙通透性就会增加,细菌、内毒素及大分子物质可通过 TJ 进入体循环.例如某些肠道炎症性疾病如炎症性肠病(IBS),其特征就是 IEC 旁路通透性增高<sup>[16]</sup>,允许肠腔内病原菌及其毒素通过并进入上皮下层,导致炎症肠病的发生.此外,非甾体类消炎药性肠病也被认为是由于细胞旁路对细菌毒素的通透性增高,中性粒细胞渗出进而产生黏膜下炎症<sup>[17]</sup>.另外,Ménétrier 是一种少见的特发性疾

病,表现为累及胃体部的肥厚胃皱襞. Ménétrier 患者的肠黏膜紧密连接的宽度由 7.5 nm 上升到 10.5 nm,其发病原因可能是由于感染或变态反应,紧密连接蛋白丢失或水肿导致紧密连接的持续性开放.目前,有关这些 TJ 的调控机制尚不清楚,但下列这些途径基本形成共识.

**1.3.1 磷脂酶 C 依赖性信号通路** 肠黏膜受到来自外源性刺激如细胞旁路通透性增强剂(PPEs)或内源性刺激,通过 G 蛋白的介导,激活磷脂酶 C(PLC),后者可将磷脂酰肌醇二磷酸分解成二脂酰甘油(DG)和三磷酸肌醇( $\text{IP}_3$ ),进而激活蛋白激酶 C(PKC)同工酶、钙调素依赖性激酶和肌球蛋白轻链激酶(MLCK)并改变其活性,诱导周围连接肌动蛋白-肌球蛋白环的收缩.该环与细胞膜相连,收缩移位后可松弛紧密连接结构从而改变其功能<sup>[18]</sup>.乙醇和中链脂肪酸也可通过上述机制分解周围连接肌动蛋白-肌球蛋白环从而使其移位.

**1.3.2  $\text{Ca}^{2+}$ -E 钙黏素信号途径** E 钙黏素位于细胞间紧密连接下方,其作用依赖于  $\text{Ca}^{2+}$ ,胞外部分形成 5 个结构域,均含  $\text{Ca}^{2+}$  结合部位. E 钙黏素通过  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -链蛋白(catenin)以及黏着斑蛋白(vinculin)、锚蛋白、 $\alpha$  辅肌蛋白与肌动蛋白结合在一起,在维持肠上皮紧密连接屏障功能中发挥重要的作用.研究表明, $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂(如 EDTA)能增加肠上皮细胞紧密连接的通透性,其机制可能是 EDTA 消耗细胞外  $\text{Ca}^{2+}$ ,导致 E 钙黏素所需  $\text{Ca}^{2+}$  减少<sup>[19]</sup>,紧密连接蛋白(Occludin 和 ZO1)分解,细胞旁路通透性增高所致.此外,细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  减少也可激活细胞内肌球蛋白激酶活性,周围连接肌动蛋白和肌球蛋白纤维的向心性收缩,细胞间紧密连接破坏和肠黏膜通透性增加.

**1.3.3 酪氨酸激酶-磷酸酶信号通路** G 蛋白( $\text{G}\alpha_{12}$ )属异三聚体 G 蛋白家族,通过  $\text{SH}_3$  结构域结合到 ZO1,  $\text{G}\alpha_{12}$  活化能增强考克斯班尼犬(MDCK)细胞旁路通透性. Meyer *et al*<sup>[20]</sup> 研究发现,在表达  $\text{G}\alpha_{12}$  活性的 MDCK 细胞,Src 自磷酸化活性增高;同时  $\beta$  链蛋白酪氨酸磷酸化也升高,共聚焦显微镜下显示紧密连接蛋白被破坏、ZO1 和  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATP 酶的正常分布发生改变、细胞极性消失,而肌动蛋白应激纤维增高.酪氨酸激酶抑制剂金雀异黄酮和 Src 特异性抑制剂 PP-2 能逆转上述改变,并可阻止细胞旁路通透性的升高.因此,  $\text{G}\alpha_{12}$  可部分通过 Sac 酪氨酸激酶通路调控上皮细胞的紧密连接.

**1.3.4 Rho GTP 酶途径** Rho GTPases 是一类小分子 G 蛋白酶,分子质量为 20-30 ku,属于 Ras 超家族中的一类,其作用受蛋白激酶的调节. Rho GTPases 是周围连接细胞骨架肌动蛋白和肌球蛋白稳定性的重要调节蛋白,并作为信号分子调节与细胞骨架有关的各



种信号转导途径. 研究发现, Rho 激活后通过肌球蛋白的磷酸化作用使 ZO1 和 Occludin 在紧密连接处沉积, 如抑制其活性后, 则 ZO1 和 Occludin 在紧密连接处定位降低; 从而维持紧密连接的功能. 如果抑制 Rho 活性的同时敲除 ATP, 则在转染细胞内可出现更广泛的紧密连接成分的丢失<sup>[21]</sup>. 对于 Rho 信号通路如何调节紧密连接蛋白成分的磷酸化目前尚不清楚.

**1.4 国内外研究现状** 近年来, 随着电镜技术和分子生物学技术的发展, 对 TJ 的结构和功能研究不断深入 (如 TJ 结构蛋白及其相关基因的筛选验证、细胞、分子水平的调控机制的探讨等), 因此, 对 TJ 及调节蛋白的生物学功能已有一定的认识. Hopkins *et al*<sup>[22]</sup> 将小肠上皮细胞 (T84) 与大肠杆菌细菌毒素坏死因子-1 (CNF-1) 共同孵育 6-8 h, 发现随着 Occludin 的去磷酸化, 该蛋白也从 TJ 移入胞质内, 同时肠上皮细胞 TER 也短暂降低, 肠黏膜通透性增高. 用丝 / 苏氨酸磷酸酶抑制剂也能阻止大肠埃希菌 (EPEC) 诱导的 Occludin 去磷酸化及 TER 的短暂降低, 表明二者均参与 TJ 的调节. Tavelin *et al*<sup>[23]</sup> 研究了含 4-40 个氨基酸的蛋白肽对 Caco-2 细胞 TJ 的作用, 这些蛋白肽来源于 Occludin 第一个胞外环 N 末端的肽能增加 TJ 的通透性. 然而, 这种肽只有在细胞基侧才有作用, 其部分原因是由于顶端肽酶的降解作用以及该肽发生了聚合. Jerrold *et al* 以 Caco-2 IEC 为模型, 并以 Na<sup>+</sup> 葡萄糖转运体 (SGLT1) 转染该细胞, 发现 TER 明显降低, 同时小分子物质如甘露醇吸收增加而大分子物质如菊粉并不增加, 表明 TJ 通透性升高具有选择性. SGLT1 转染后 Caco-2 的 TJ 通透性升高可被 MLCK 抑制剂所抑制, 提示 MLC 磷酸化在 TJ 中具有重要作用. 进一步研究发现, MLC 磷酸化调节 IEC 通透性的机制可能与 Ca<sup>2+</sup> 激活 MLCK 有关, 导致周围连接肌动蛋白基肌球蛋白纤维向心性收缩, ZO1 与 Occludin 分离, 相邻细胞间隙增大<sup>[24]</sup>. 有学者将大肠杆菌毒素 A 与 IEC 共同孵育, 发现其毒素 A 能促进 ZO1 的再分布, 从而导致 TER 降低及 TJ 超微结构的形态学改变, 细胞旁路的通透性升高. 其机制可能与由蛋白激酶  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) 和蛋白激酶  $\beta$  (PKC $\beta$ ) 介导的 IEC 顶侧和基底侧 F-肌动蛋白的重构有关. 而抑制 PKC $\alpha$  和 PKC $\beta$  则能阻止毒素介导的 RhoA 的糖基化作用、ZO1 转位及细胞变圆. 另有学者研究了肠道神经系统 ENS 对 TJ 的作用, 发现黏膜下神经元被激活后, 反映 IEC 旁路通透性的异硫氰酸葡聚糖和菊粉的流量降低, ZO1 表达明显升高, 这些作用可被 TTX 和 VIP 受体拮抗剂所阻滞, 再用 VIP 时又可恢复. 我们采用盲肠造瘘建立腹腔感染大鼠模型, 利用透射电镜对脓毒血症大鼠肠上皮细胞 TJ 研究表明, 感染大鼠肠上皮细胞 Occludin 表达明显减少,

细胞紧密连接不清, 紧密连接变短变宽, 细菌移位率明显升高. 但这些研究均未能深刻阐明其分子机制及基因对 TJ 及蛋白功能的调控, 其调控网络也未涉及.

## 2 当前研究存在的问题

**2.1 调控机制不清** 迄今为止, 已知至少有 16 种蛋白参与 TJ 的调控, 随着研究的深入, 又有新的 TJ 调控蛋白被发现. 这些蛋白的生物学功能以及相互之间的作用如何尚不清楚. 此外, 基因的表达方式错综复杂, 从 mRNA 表达水平并不能预测蛋白表达水平, 蛋白质的动态修饰和加工并非来自基因序列. 因此, 除前述途径外, 是否还存在其他调控途径 (基因调控途径等), 其调控机制和网络如何, 也未完全阐明.

**2.2 研究深度不够** 目前的研究大多采用冰冻蚀刻电镜、免疫组化及分子生物学等技术, 对 TJ 的结构、功能及调控机制的研究尚不够深入. Mankertz *et al*<sup>[25]</sup> 采用基因组 DNA 分子克隆、转染和荧光素酶分析法、电泳迁移转变分析及位点定向突变等技术对 Wntx 信号与 Claudin-2 的交叉对话进行深入的研究, 发现 Wntx 信号可与 LEF/TCF 组成调控网络直接或间接调节 Claudin-2 基因的表达. 随着基因组计划的实现, 相信在某种程度上为认识 TJ 调控的分子机制提供基础. 此外, 近年来, 为学者们所重视的蛋白组学和代谢组学技术为解决上述问题提供了可能, 如采用双相电泳 (2-DE)、新型质谱 (MS) 技术、数据库设置与检索等拟可完整解决 TJ 调控机制问题.

**2.3 临床研究受限** 肠黏膜 TJ 的结构和功能在体外实验和动物模型方面已取得巨大进步, 并为临床应用提供了更为有力的实验依据. 体外实验常用的模型是 Caco-2 细胞模型, Caco-2 细胞来源于人结肠腺癌细胞, 与小肠吸收细胞有许多相似之处, 如微绒毛、细胞间连接、酶及营养物转运体等, 虽然该模型容易采用常规的方法就可对 TJ 的结构和功能进行量化分析, 如 TER 和示踪剂的跨膜转移等. 但由于人体肠道内的环境远较体外复杂, 不仅受到肠腔内多种微生物的影响, 而且收到来自神经、体液、内分泌功能的影响. 另一方面, 人体 IEC 的紧密连接其调控机制也较体外模型复杂的多. 此外, 用于检测肠黏膜通透性得示踪剂如壳聚糖等其生物活性与其毒性很难分开, 以及医学伦理等问题均限制了临床研究的展开.

**2.4 防治针对性不强** 随着肠上皮细胞 TJ 生物学功能研究的深入, 对 TJ 的防治研究也渐受到许多学者的重视, 但大多缺乏针对性. 谷氨酰胺在维持肠上皮细胞屏障功能中具有重要作用已为大多数学者所接受, 但其机制仍不十分清楚. 如肠道或静脉内给予谷氨酰胺, 可维持肠黏膜的完整性及降低异常增高的通透

性, 肠黏膜细菌移位率明显下降. 而肠道内给予谷氨酰胺合成酶抑制剂甲硫氨酸亚砷 (MS) 则可加重肠黏膜的损害. 益生菌 (乳酸杆菌、双歧杆菌等) 促进肠上皮的增生作用已得到大多数学者的共识, 很多研究证实了这方面的作用<sup>[26]</sup>, 一些学者<sup>[27-31]</sup>将人小肠上皮细胞株 (HT29/C1. 19 和 Cao-2) 与经致病性大肠杆菌 (EIEC029:NM) 处理后与原生菌共同孵育, 发现被EIEC感染的小肠上皮细胞 TER 明显下降, 细胞间黏附明显抑制, 细胞骨架丝状裂解, 紧密连接磷酸化; 原生菌组则逆转了这些改变, 维护了细胞骨架和 ZO-1 蛋白及 Occludin 表达, 对表皮生长因子 (EGF) 刺激作用增强. 我们对脓毒症大鼠持续 5 d 肠内灌注一定剂量的乳酸杆菌, 研究表明, 能明显减少外周血内毒素含量, 维护肠道黏膜屏障, 增加回肠和结肠 sIgA 的分泌及上皮细胞紧密连接蛋白 Occludin 表达, 紧密连接超微结构完整, 粪便基因指纹图谱分析显示肠道菌群紊乱程度明显减轻, 但有关深层次的详细机制仍不清楚.

### 3 展望

随着研究的深入, 一些 TJ 相关的蛋白相继被发现, 他们的功能也逐渐被认识. 而更重要的是, 我们不仅要研究 TJ 相关的蛋白分子之间的相互作用, 还要研究这些分子与其功能之间的关系. 如最近研究发现, Occludin 参与调控上皮细胞转化的信号转导, 以及 TJ 相关的转录因子控制原癌基因的表达等, 均表明对肠上皮 TJ 的完整理解必须包含对细胞生长和分化的决定因素的分析. 可以相信, 不久的将来, 随着激光共聚焦显微镜、磁共振波谱技术的发现和应用来检测 TJ 蛋白的分子运动及构象; 如采用基因芯片的寡核苷酸微阵列杂交, 通过扫描荧光信号强度分析各基因组 mRNA 表达量的情况以及高通量、高灵敏度、高分辨率和重复性好的蛋白组学等研究, 希望能较全面地评价 TJ 蛋白在肠上皮细胞受损时的生物学功能变化及各种因素对 TJ 蛋白调控作用的分子机制.

### 4 参考文献

- 1 Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding. *J Cell Biol* 1998;141:1539-1550
- 2 Matsuda M, Kubo A, Furuse M, Tsukita S. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci* 2004;117(pt7):1247-1257
- 3 Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ. New perspective on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* 1999;79:73-98
- 4 Citi S, Denisenko N. Phosphorylation of the tight junction protein cingulin and the effects of protein kinase inhibitors and activators in MDCK epithelial cells. *J Cell Sci* 1995;108(pt8):2917-2926

- 5 Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 1999; 9:268-273
- 6 Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:511-516
- 7 Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* 1988; 333:272-276
- 8 Keon BH, Schafer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* 1996; 134:1003-1018
- 9 Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K, Mori M. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* 1993;120:477-483
- 10 Weber E, Berta G, Tousson A, St John P, Green MW, Gopalakrishnan U, Jilling T, Sorscher EJ, Elton TS, Abrahamson DR. Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells. *J Cell Biol* 1994;125:583-594
- 11 Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998;142:117-127
- 12 Madara JL. Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *Am J Physiol* 1987;253(1pt1):C171-C175
- 13 van Meer G, Simons K. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J* 1986;5:1455-1464
- 14 Hauser H, Howell K, Dawson RM, Bowyer DE. Rabbit small intestinal brush border membrane preparation and lipid composition. *Biochim Biophys Acta* 1980;602:567-577
- 15 Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, Meyer zu Brickwedde MK, Suzuki A, Imhof BA, Vestweber D. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci* 2003;116(pt19):3879-3891
- 16 Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter J. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. *Ann Intern Med* 1986;105:883-885
- 17 Bjarnason I. Intestinal permeability. *Gut* 1994;35(1Suppl): S18-S22
- 18 Yamaguchi Y, Dalle-Molle E, Hardison WG. Vasopressin and A23187 stimulate phosphorylation of myosin light chain-1 in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991;261(2pt1):G312-G319
- 19 Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 1993;120:757-766
- 20 Meyer TN, Hunt J, Schwesinger C, Denker BM.  $G\alpha_{12}$  regulates epithelial cell junctions through Src tyrosine kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C1281-C1293
- 21 Gopalakrishnan S, Raman N, Atkinson SJ, Marrs JA. Rho GTPase signaling regulates tight junction assembly and protects tight junctions during ATP depletion. *Am J Physiol* 1998; 275(3pt1):C798-C809
- 22 Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, Boquet P, Nusrat A. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J Cell Sci* 2003;116(pt4):725-742
- 23 Tavelin S, Hashimoto K, Malkinson J, Lazorova L, Toth I, Artursson P. A new principle for tight junction modulation based on occludin peptides. *Mol Pharmacol* 2003;64:1530-1540

- 24 Rao JN, Li L, Golovina VA, Platoshyn O, Strauch ED, Yuan J X, Wang JY.  $Ca^{2+}$ -RhoA signaling pathway required for polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C993-C1007
- 25 Mankertz J, Hillenbrand B, Tavalali S, Huber O, Fromm M, Schulzke J. Functional crosstalk between Wnt signaling and Cdx-related transcriptional activation in the regulation of the claudin-2 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:1001-1007
- 26 Abbott A. Microbiology: gut reaction. *Nature* 2004;427:284-286
- 27 Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol Immunol* 2003;47:405-409
- 28 Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003; 52:439-451
- 29 Resta-Lenert S, Barrett K E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 2003;52:988-997
- 30 Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277:50959-50965
- 31 Michail S, Abernathy F. *Lactobacillus plantarum* reduces the in vitro secretory response of intestinal epithelial cells to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:350-355

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

### 欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览.

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求. 从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范.

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动.

本书论述缜密、案例丰富. 为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次).

编著: 任胜利, 理学博士, 《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 *Science*, *Nature*, *Scientometrics*, *Learned Publishing*, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 篇. 出版: 科学出版社. 定价: 28 元 + 2 元(邮费). 邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号. 联系人: 刘俐, 程宇. 联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921. 开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483. (国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)

# MSG- 肝再生 - 大鼠再生肝组织基因表达谱分析

李瀚旻, 高翔, 周密思

李瀚旻, 高翔, 周密思, 湖北中医学院附属医院肝病研究所  
湖北省武汉市 430061  
李瀚旻, 男, 1956-05-17 生, 湖北利川市人, 土家族, 1992 年湖北中医学院  
硕士研究生毕业, 2000 年湖北中医学院博士研究生毕业, 副主任医师, 主要从  
事肝再生的基础与临床研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271562  
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2001ABB171  
项目负责人: 李瀚旻, 430061, 湖北省武汉市武昌区花园山 4 号, 湖北中医  
学院附属医院肝病研究所. lihanmin@public.wh.hb.cn  
电话: 027-88929180  
收稿日期: 2004-11-16 接受日期: 2004-12-09

## Gene expression profile of liver regeneration induced by monosodium L-glutamate in rat

Han-Min Li, Xiang Gao, Mi-Si Zhou

Han-Min Li, Xiang Gao, Mi-Si Zhou, Hepatology Research Institute,  
Affiliated Hospital of Hubei Traditional Chinese Medicine College, Wuhan  
430061, Hubei Province, China  
Supported by The Natural Science Foundation of China, No.30271562  
and the Natural Science Foundation of Hubei Province, No.  
2001ABB171  
Correspondence to: Dr. Han-Min Li, Hepatology Research Institute,  
Affiliated Hospital of Hubei Traditional Chinese Medicine College, Wuhan  
430061, Hubei Province, China. lihanmin@public.wh.hb.cn  
Received: 2004-11-16 Accepted: 2004-12-09

## Abstract

**AIM:** By analyzing the gene expression profile in the re-generated liver tissue, to study the molecular mechanism of liver regeneration disturbance induced by monosodium L-glutamate (MSG) in rat.

**METHODS:** Both rats (control group) and MSG-rats (model group) were operated to excise the left and middle lobes of liver (about 68% of all the liver) 6 weeks after birth. The rats were executed at 5th day after operation, and the regenerated liver tissues were frozen by liquid nitrogen. A gene chip with 1176 genes was used to detect the differentially expressed genes in the regenerated liver tissue. mRNAs were extracted from the regenerated liver tissue and <sup>33</sup>P labeled cDNA probes were prepared by RT-PCR. The probes were hybridized with the gene chip. The data were analyzed with Microsoft Access and Excel to determine the differentially expressed genes.

**RESULTS:** In the 1176 examined genes, there were 256 differentially expressed genes in model group in contrast with control group, with 40 genes up-regulated and 216 gene

down-regulated. Among them, there were 10 genes associated with cell receptors, 15 genes associated with transcription, 9 genes associated with cell adhesion receptor, 98 genes associated with metabolism, 9 genes associated with post-translational modification/protein folding, and 11 genes associated with protein turnover.

**CONCLUSION:** The gene expression profile of the MSG-induced liver regeneration is significantly different from partial hepatectomy-induced liver regeneration in rat.

**Key Words:** Liver regeneration; Monosodium L-glutamate; Gene chip

Li HM, Gao X, Zhou MS. Gene expression profile of liver regeneration induced by monosodium L-glutamate in rat. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(4):448-451

## 摘要

**目的:** 通过对 MSG- 肝再生 - 大鼠再生肝组织基因表达谱的分析, 探讨 MSG- 肝再生 - 大鼠肝再生紊乱的分子机制。

**方法:** 正常大鼠和 MSG- 大鼠均于出生后 6 wk 行肝大部切除(约占全肝的 68%), 前者为肝再生 - 大鼠模型(对照组), 后者为 MSG- 肝再生 - 大鼠(模型组)。术后 5 d 处死实验动物, 取再生肝组织液氮冻存。选用 1176 条与细胞分化增生相关的基因表达谱芯片, 提取各组大鼠再生肝组织 mRNA, 进行 RT-PCR 并掺入 <sup>33</sup>P 标记合成 cDNA 探针, 将探针与表达谱芯片杂交以观察再生肝组织基因表达谱的变化, 所得数据用 Microsoft Access、Microsoft Excel 软件处理, 筛选样本之间杂交信号比值有差异表达的基因并分类。

**结果:** 在所检测的 1176 条基因中, 模型组相对于对照组的差异表达基因有 256 条(上调表达 40 条, 下调表达 216 条), 其中有 10 条基因的表达产物与细胞受体相关、有 15 条基因与转录相关、有 9 条基因与细胞黏附受体相关、有 98 条基因与细胞新陈代谢相关、有 9 条基因与翻译后修饰相关、有 11 条基因与蛋白质翻折有关。

**结论:** MSG- 肝再生 - 大鼠再生肝组织的基因表达谱相对于肝再生 - 大鼠模型有显著改变, 细胞分化增生相关的基因表达失调是 MSG- 肝再生 - 大鼠肝再生紊乱的重要分子机制。

**关键词:** 肝再生; MSG; 基因芯片

李瀚旻, 高翔, 周密思. MSG-肝再生-大鼠再生肝组织基因表达谱分析. 世界华人消化杂志 2005;13(4):448-451  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/448.asp>

## 0 引言

MSG-肝再生-大鼠模型的神经-内分泌-免疫网络功能紊乱, 下丘脑-垂体-肾上腺轴功能亢进, 肝再生过程紊乱<sup>[1-5]</sup>. 肝再生过程错综复杂, 与多个基因的表达和调控密切相关, 我们利用基因芯片技术对MSG-肝再生-大鼠再生肝的基因表达谱进行分析, 探讨MSG-肝再生-大鼠肝再生紊乱的分子机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Wistar 新生大鼠, ♂, 由湖北省医学科学院动物实验中心提供; 动物饲料由湖北省医学实验动物中心饲料加工厂提供. 左旋谷氨酸单钠(monosodium L-glutamate, MSG)购自美国Sigma公司. Trizol购自Gibco公司. Oligotex mRNA midi Kit购自Qiagen公司.

**1.2 方法** 将实验大鼠分成2组, MSG-肝再生-大鼠(模型组)、肝再生-大鼠(对照组). 模型组大鼠于出生后2, 4, 6, 8, 10 d sc MSG, 每次4 g/kg体重(用生理盐水溶解), 对照组sc等体积生理盐水. 28 d后离乳, 分笼饲养, 光照时间12 h(08:00-20:00), 温度24℃左右, 动物自由饮水摄食. 8 wk实验大鼠在乙醚麻醉下, 按肝标准切除法, 切除肝的左叶和中叶(约占全肝的68%), 然后缝合伤口. 手术均为清洁手术, 均于8:00-12:00进行手术, 避免昼夜节律对肝再生的影响. 动物自由饮水摄食. 手术后5 d处死动物, 取再生肝组织标本液氮冻存待测. 选择1176条与细胞分化增生相关的基因制作cDNA芯片, 所用的1176个靶基因cDNA克隆由中科开瑞生物芯片公司提供. 按常规方法提取实验大鼠再生肝组织Total RNA, 用Oligotex mRNA midi Kit(Qiagen公司)从Total RNA中分离poly+(A)mRNA. 取分离得到的mRNA 1 μg, 加入随机引物(8个碱基)3 μL, 用RNase-free Water定溶至10 μL. 70℃水浴3 min后冰上骤冷, 依次加入M-MLV5×Buffer 6 μL、RNase Inhibitor 1 μL、dNTP (A-)1 μL、dATP 1 μL、M-MLV酶 2 μL、[α-<sup>33</sup>P] dATP 10 μL混匀. 37℃水浴30 min后, 再42℃水浴1.5 h. 水浴结束后加10 mol/L NaOH 1.5 μL, 沸水浴5-7 min, 取出冰上冷却3 min后离心机轻甩. 依次加入冰醋酸0.9 μL、醋酸钠6.5 μL, 混匀后再加入2.5倍体积无水乙醇, 彻底混匀, 冰浴30 min后15 000 g离心10 min. 弃上清, 向沉淀中加入DNase-free水40 μL溶解, 放置待用. 经预杂交与杂交后, 测量膜正面Counts, 根据Counts确定压屏时

间和扫描时间, 用Fujifilm公司BAS-MS 2340磷屏、FLA 3000扫描仪压屏、扫描. 将杂交膜上的信号灰度定量为数值, 消除背景信号对实验信号的干扰, 进行均一化处理以使结果具有可比性. 所得数据利用Microsoft Access、Microsoft Excel软件处理, 从而获得样本之间杂交信号比值(Ratio值)有差异表达(Ratio值大于2为该基因上调表达, Ratio值小于0.5为该基因下调表达)的基因及其分类, 并用散点图体现样本之间的基因表达差异.

## 2 结果

MSG-肝再生-大鼠和肝再生-大鼠再生肝组织的基因芯片的杂交膜图像显著不同(图1, 2), 散点图反映二者之间差异表达基因的分布情况(图3). 在所检测的1176条与细胞分化增生相关的基因中, 模型组相对于对照组的差异表达基因有256条, 其中上调的基因

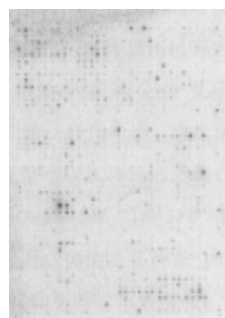


图1 MSG-肝再生-大鼠再生肝组织杂交膜图像.

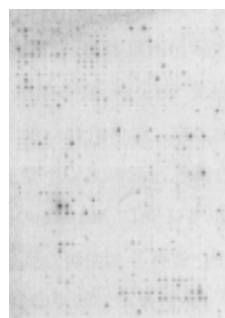


图2 肝再生-大鼠再生肝组织杂交膜图像.

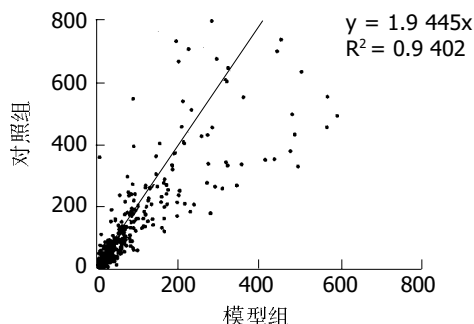


图3 MSG-肝再生-大鼠和肝再生-大鼠再生肝组织差异表达基因散点图分布.

有40条,下调的基因有216条.在上调的40条基因中,有12条基因的表达产物与转录相关;有2条基因与细胞黏附受体相关,分别为基质黏附受体和细胞间黏附受体;有3条基因与细胞新陈代谢相关;有9条基因的表达产物与翻译后修饰、蛋白质折叠相关;有2条基因表达产物与DNA翻译相关,为翻译因子;有2条基因表达产物与RNA加工、翻折和转运相关;有2条基因表达产物与DNA结合、染色质蛋白相关;有8条基因表达产物与细胞受体(含配体)相关;有1条是衔接子和受体相关蛋白基因.从亚细胞定位来看,有11条基因表达产物为质膜蛋白,9条为细胞质蛋白,2条为细胞外隐匿蛋白,3条基因表达产物位于高尔基复合体,15条为核蛋白.在下调的216条基因中,有1条基因的表达产物是细胞表面抗原;有3条基因表达产物与转录相关;有7条基因表达产物是细胞黏附受体;有4条基因表达产物是免疫系统蛋白;有4条基因表达产物为细胞外传输、运载蛋白;有1条基因的表达产物为张力反应蛋白,并与新陈代谢相关;有7条基因的表达产物为膜通道和传输蛋白;有4条基因表达产物为细胞外基质蛋白;有37条基因表达产物为运输、打靶蛋白;有95条基因表达产物与新陈代谢有关;有1条基因表达产物与RNA加工、翻折和转运有关;有2条基因表达产物为细胞信号系统、细胞外联络蛋白;有9条基因表达产物为细胞内传感器/感受器/调制器;有11条基因表达产物与蛋白质翻折有关;有2条基因表达产物为细胞受体;有5条基因表达产物为细胞骨架/动力蛋白.从亚细胞定位来看,有31条基因的表达产物属于质膜蛋白,其中1条基因表达产物尚定位于高尔基复合体及微粒体蛋白;有98条基因表达产物属于细胞质蛋白,其中尚有4条基因定位于质膜蛋白,有2条定位于细胞外隐匿蛋白,有1条定位于高尔基复合体,有1条定位于细胞骨架蛋白,有1条定位于线粒体蛋白,有3条定位于核蛋白,有1条定位于核内体蛋白;有4条基因表达产物定位于内质网,其中有2条尚分别属于质膜蛋白和细胞质蛋白;有18条基因表达产物属于细胞外隐匿蛋白;有6条基因表达产物定位于高尔基复合体,其中尚有1条属于细胞质蛋白;有5条基因表达产物属于细胞骨架蛋白;有3条基因的表达产物属于溶酶体蛋白,其中1条基因还定位于核内体蛋白和质膜蛋白;有19条基因表达产物属于线粒体蛋白,其中2条尚分别定位于细胞质蛋白和过氧化物酶蛋白;有8条基因表达产物属于核蛋白;有5条基因表达产物属于过氧化物酶蛋白;有5条基因表达产物属于微粒体蛋白,其中1条还属于质膜蛋白;有3条基因表达产物属于细胞外基质蛋白;有3条基因的表达产物定位于核膜、核质和核孔.

### 3 讨论

MSG—肝再生—大鼠是神经—内分泌—免疫网络功能紊乱状态下的肝再生模型,肝再生过程严重失调,表现为初期(术后1 d)肝再生较快,中晚期肝再生过程则受到显著抑制,最终在肝再生度、肝细胞分裂指数和肝重/体重比值等方面均不能恢复到正常水平<sup>[1]</sup>.实验表明,MSG—肝再生—大鼠的神经—内分泌—免疫网络功能紊乱可能是其肝再生过程严重失调的重要机制.进一步用电镜、原位末端标记技术和免疫组织化学方法对MSG—肝再生—大鼠下丘脑弓状核神经细胞凋亡状态及凋亡相关基因转化生长因子(transforming growth factor, TGF) $\beta_1$ 的表达进行研究后发现,MSG—肝再生—大鼠弓状核神经细胞凋亡可能是其神经—内分泌—免疫网络功能紊乱的重要机制之一,随着弓状核神经细胞凋亡指数增高,其TGF- $\beta_1$ 表达亦相应增强.提示神经元胞质钙离子过度负荷和TGF- $\beta_1$ 蛋白共同参与了MSG—肝再生—大鼠弓状核神经细胞凋亡的调控<sup>[2-5]</sup>.本结果表明,MSG—肝再生—大鼠再生肝组织基因表达谱的变化规律是与细胞分化增生相关的基因以表达下调为主,在所检测的1176条基因中,差异表达基因有256条,其中下调的基因有216条,上调的基因仅40条,下调表达是上调表达的5倍多.上调表达的基因中,以细胞受体为主,如生长激素释放受体、降钙素受体样受体、白介素9受体、外激素受体、孕酮受体、白血病抑制因子受体、促生长激素神经肽受体、细胞黏附受体等基因.这些受体高表达提示在MSG—肝再生—大鼠再生肝组织中生长激素释放激素(growth hormone releasing hormone, GHRH)、降钙素(calcitonin, CT)、孕酮、促生长激素神经肽等激素及激素样物质分泌可能减少,导致其受体病理性增加,而这些激素及激素样物质分泌减少可导致MSG—肝再生—大鼠肝再生受到抑制.下调表达的基因中,见于一些已知与肝再生相关的基因,如代谢酶(II、III碘甲腺原氨酸、雌激素转磺酶、胰高血糖素、辅酶Q、葡糖激酶、甲状腺过氧化物酶、25-羟基维生素D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -羟化酶等)及LPS诱导的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) $\alpha$ 等基因也表达下调,这些基因表达下调可能是MSG—肝再生—大鼠肝再生受抑制的重要分子机制.

三碘甲腺原氨酸(T<sub>3</sub>)是甲状腺激素的主要活性成分,其主要生理作用为促进机体的生长发育,增加代谢率和耗氧量.研究证明,T<sub>3</sub>为肝细胞的促分裂剂,通过参与肝细胞的增生和凋亡过程,使肝细胞的增生功能增强<sup>[6-7]</sup>.Oren *et al*<sup>[8]</sup>用T<sub>3</sub>注射给肝部分切除后的大鼠,发现可使组蛋白3 mRNA和细胞周期素依赖性激酶-2的表达增加,二者均为肝再生的标志.Knopp *et al*<sup>[9]</sup>还发现大鼠肝部分切除后蛋白S14的

基因表达下降, 而 $T_3$ 作为蛋白S14基因的强诱导剂可使蛋白S14基因的抑制状态逆转。TNF- $\alpha$ 能激活DNA结合蛋白包括核转录因子 $\kappa B$ (NF- $\kappa B$ )、信号转导子激活转录子(STAT)蛋白和CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP), 调节多种肝细胞特异基因转录, 诱导肝细胞基因表达, 增加正向急性期蛋白合成, 抑制负向急性期蛋白, 改变肝细胞与生长有关的基因表达<sup>[10-17]</sup>。Yamada *et al*<sup>[18-19]</sup>研究发现TNF- $\alpha$  I型受体缺乏小鼠肝大部切除后DNA合成严重受损, STAT3及NF- $\kappa B$ 无增加, 但抑制中性粒细胞的激活, 当注入白介素(interleukin, IL)-6后能够纠正TNF- $\alpha$  I型受体的缺陷作用, 表明TNF- $\alpha$ 通过调节IL-6分泌而参与肝再生的过程。IL-6由Kupffer细胞分泌, 由TNF- $\alpha$ 调节其分泌, 是肝细胞急性期反应蛋白合成的主要刺激信号<sup>[20-28]</sup>, PH后血浆IL-6浓度增加, 24 h达高峰, 纯合型IL-6基因缺失小鼠PH后肝细胞DNA合成受到抑制, myc、cyclin D及STAT3活性显著降低, 应用IL-6后能够纠正IL-6基因缺陷引起的负面效应<sup>[29-30]</sup>, 表明IL-6亦是参与早期肝再生信号的细胞因子之一。其中一些上调或下调表达的基因与肝再生关系尚不十分清楚, 尚待进一步研究。

#### 4 参考文献

- 李瀚, 张六通, 梅家俊, 邱幸凡, 王平. 左旋谷氨酰胺-肝再生-大鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2000;8:824-826
- 李瀚, 张六通, 邱幸凡. “肝肾同源于脑”与肝肾本质研究. 中医杂志 2000;41:69-71
- 杨木兰, 李瀚, 梅家俊, 张六通, 邱幸凡. Dig 标记探针原位杂交检测MSG-肝再生-大鼠下丘脑弓状核TGF- $\beta_1$ mRNA. 中国组织化学与细胞化学杂志 2002;11:202-204
- 李瀚, 杨木兰, 梅家俊, 张六通, 邱幸凡. MSG-肝再生-大鼠下丘脑神经细胞凋亡及相关基因TGF- $\beta_1$ 的表达. 中国应用生理学杂志 2003;19:9-11
- Li HM, Yang ML, Mei JJ, Zhang LT, Qiu XF. The effects of Zuogui Pill on expression of TGF- $\alpha$ ,  $\beta$  and its receptor in ARN and regenerative liver of the MSG-regeneration-rat. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004;12:307-308
- Malik R, Mellor N, Selden C, Hodgson H. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology* 2003;37:79-86
- Lotkova H, Rauchova H, Drahota Z. Activation of mitochondrial glycerophosphate cytochrome c reductase in regenerating rat liver by triiodothyronine. *Physiol Res* 2001;50:333-336
- Oren R, Dabeva MD, Karnezis AN, Petkov PM, Rosencrantz R, Sandhu JP, Moss SF, Wang S, Hurston E, Laconi E, Holt PR, Thung SN, Zhu L, Shafritz DA. Role of thyroid hormone in stimulating liver repopulation in the rat by transplanted hepatocytes. *Hepatology* 1999;30:903-913
- Knopp J, Hudecova S. Expression of S14 protein gene in rat liver in response to partial hepatectomy and its regulation with  $T_3$  and sucrose. *J Lipid Mediat Cell Signa* 1995;11:253-260
- Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetkeke NC, Lee DC. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor alpha targeted mice. *Mol Carcinog* 1996;15:183-189
- Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, Taub R. CCAAT enhancer-binding protein  $\beta$  is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 1998;102:996-1007
- Plumpe J, Malek NP, Bock CT, Rakemann T, Manns MP, Trautwein C. NF $\kappa$ B determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *Am J Physiol* 2000;278:G173-G183
- Diehl AM, Yang SQ, Yin M, Lin HZ, Nelson S, Bagby G. Tumor necrosis factor-alpha modulates CCAAT/enhancer binding proteins-DNA binding activities and promotes hepatocyte-specific gene expression during liver regeneration. *Hepatology* 1995;22:252-261
- Scotte M, Masson S, Lyoumi S, Hiron M, Teniere P, Lebreton JP, Daveau M. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat. *Cytokine* 1997;9:859-867
- Takehara T, Hayashi N, Mita E, Kanto T, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Delayed Fas-mediated hepatocyte apoptosis during liver regeneration in mice: hepatoprotective role of TNF alpha. *Hepatology* 1998;27:1643-1651
- Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev* 2000;174:160-171
- Fujita J, Marino MW, Wada H, Jungbluth AA, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, Stapleton PP, Daly JM. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 2001;129:48-54
- Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1441-1446
- Fujita J, Marino MW, Wada H, Jungbluth AA, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, Stapleton PP, Daly JM. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 2001;129:48-54
- Zimmers TA, Pierce RH, McKillop IH, Koniaris LG. Resolving the role of IL-6 in liver regeneration. *Hepatology* 2003;38:1590-1591
- Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest* 2003;112:978-980
- James LP, Lamps LW, McCullough S, Hinson JA. Interleukin 6 and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:857-863
- Kariv R, Enden A, Zvibel I, Rosner G, Brill S, Shafritz DA, Halpern Z, Oren R. Triiodothyronine and interleukin-6(IL-6) induce expression of HGF in an immortalized rat hepatic stellate cell line. *Liver Int* 2003;23:187-193
- Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2003;38:674-682
- Selzner N, Selzner M, Odermatt B, Tian Y, Van Rooijen N, Clavien PA. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology* 2003;124:692-700
- Hui TT, Mizuguchi T, Sugiyama N, Avital I, Rozga J, Demetriou AA. Immediate early genes and p21 regulation in liver of rats with acute hepatic failure. *Am J Surg* 2002;183:457-463
- Aldeguez X, Debonera F, Shaked A, Krasinkas AM, Gelman AE, Que X, Zamir GA, Hiroyasu S, Kovalovich KK, Taub R, Olthoff KM. Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* 2002;35:40-48
- Li W, Liang X, Leu JJ, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R. Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 2001;33:1377-1386
- Rai RM, Yang SQ, McClain C, Karp CL, Klein AS, Diehl AM. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am J Physiol* 1996;270(6pt1):G909-G918
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996;274:1379-1383

# 人胎肝干细胞的体外分离培养与鉴定

毛海洲, 陈耀凯, 王宇明, 张 磊, 刘国栋

毛海洲, 陈耀凯, 王宇明, 张磊, 刘国栋, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

毛海洲, 男, 1968-02-19 生, 河南省遂平县人, 汉族, 1993 年河南医科大学学士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病临床研究, 现在河南省开封市解放军一五五医院消化科工作。

国家自然科学基金项目, No. 30100080; No. 30370391

项目负责人: 陈耀凯, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. yaokaichen@hotmail.com

电话: 023-68754475-8006 传真: 023-65461319

收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-08

## Isolation, culture and identification of human fetal liver stem cells *in vitro*

Hai-Zhou Mao, Yao-Kai Chen, Yu-Ming Wang, Lei Zhang, Guo-Dong Liu

Hai-Zhou Mao, Yao-Kai Chen, Yu-Ming Wang, Lei Zhang, Guo-Dong Liu, Chinese PLA Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30100080, No.30370391

Correspondence to: Dr. Yao-Kai Chen, Chinese PLA Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. yaokaichen@hotmail.com  
Received: 2004-11-23 Accepted: 2004-12-08

## Abstract

**AIM:** To isolate, culture and identify human fetal liver stem cells *in vitro* to lay a foundation for the application of these cells in bioartificial liver support system and hepatocyte transplantation.

**METHODS:** The fetal liver stem cells were isolated from the liver of dead human fetus. The cell suspension was centrifuged at 50 g. The sediment was resuspended with F12 solution, followed by Percoll gradient centrifugation. The cell layer between 50% and 70% of Percoll was collected, washed, centrifuged, resuspended in DMEM (2:1), and incubated. Immunohistochemistry was used to identify the phenotypes of the cultured cells.

**RESULTS:** The primary cells were round or oval, much smaller than hepatocytes with larger nucleus and less plasma. These cells grew prosperously in culture medium. The plasma of the cultured cells was positive for CK19, OV6 and albumin staining. Double staining showed that some cells were positive for both albumin and CK19.

**CONCLUSIONS:** The liver stem cells exist in the human fetal liver and display various differentiation status.

**Key Words:** Liver stem cells; Human fetus; Immunohistochemistry

Mao HZ, Chen YK, Wang YM, Zhang L, Liu GD. Isolation, culture and identification of human fetal liver stem cells *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(4):452-455

## 摘要

**目的:** 对人胎肝干细胞进行体外分离、培养与鉴定, 为在生物人工肝及肝细胞移植方面的应用奠定基础。

**方法:** 取 16-29 周龄死产人胚胎肝脏, 参照本室建立的方法对胎肝干细胞进行分离。所获细胞悬液用 50 g 反复离心, 沉淀物用 F12 培养液悬浮细胞; 将细胞悬液加入 Percoll 液进行梯度离心, 吸取 50% 与 70% Percoll 层之间的细胞层, 用 Hanks 液洗涤两次后离心。将细胞团悬浮于 DMEM/F12(2:1) 培养液中, 接种于塑料培养瓶或六孔培养板中; 在 37 °C 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。采用免疫组织化学法鉴定细胞表型。

**结果:** 原代细胞呈圆形或卵圆形, 体积明显小于肝细胞, 胞核大而胞质少, 核浆比较小, 培养中细胞生长旺盛。培养的细胞胞质 CK19, OV6 及白蛋白染色均呈阳性; 部分细胞胞质同时表达白蛋白和 CK19。

**结论:** 人胚胎肝脏中存在肝干细胞, 这些细胞表现出不同的分化状态。

**关键词:** 肝干细胞; 人胎; 免疫组化

毛海洲, 陈耀凯, 王宇明, 张磊, 刘国栋. 人胎肝干细胞的体外分离培养与鉴定. 世界华人消化杂志 2005;13(4):452-455  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/452.asp>

## 0 引言

理论上, 哺乳动物肝脏应由多分化潜能的肝干细胞演变、分化而来, 对大鼠、小鼠等哺乳动物胎肝的研究已证实这一推断<sup>[1-16]</sup>。然而有关人胚胎肝脏内可能存在的肝干细胞研究甚少, 新近 Malhi *et al*<sup>[17]</sup> 从人胎肝中分离出一种上皮祖/干细胞(epithelial progenitor/stem cells), 具有很强的集落形成能力, 在培养条件下可增生数月, 且细胞分裂达 40 次以上后仍保持正常核型, 在联合免疫缺陷小鼠体内可分化为成熟肝细胞, 可见人胚胎肝脏发育过程中必然



存在肝干细胞的参与. 鉴于对人胎肝干细胞的研究将为其在生物人工肝及细胞移植方面的应用奠定基础, 我们对人胎肝干细胞进行了体外分离、培养与鉴定.

## 1 材料和方法

**1.1 胎肝干细胞分离** 人胚胎肝脏取自16-29周龄死产人胚胎, 胚胎母亲知情并签署知情同意书. 参照本室建立的方法对胎肝干细胞进行分离<sup>[18]</sup>. 用前灌液(无钙镁磷酸缓冲液)灌注人胎肝至灰褐色; 在无菌托盘中用37℃ 0.5 g/L IV型胶原酶继续灌注, 直至肝组织完全软化, 肝包膜下组织液化后行钝性撕碎; 37℃下震荡、消化15 min后, 三层纱布过滤; 所获细胞悬液先用50 r/min反复离心3次, 上清液再用500 r/min进行反复离心3次, 最后将沉淀物用F12培养液悬浮细胞; 将Percoll (Pharmacia) 配成50%, 70%, 90%的梯度离心液, 从离心管底部开始逐层铺加, 细胞悬液置于最上层, 4℃ 12 000 g离心30 min; 小心吸取50%与70% Percoll层之间的细胞层, 用Hanks液洗涤2次后离心.

**1.2 胎肝干细胞培养** 将细胞团悬浮于培养液中, 接种于塑料培养瓶或六孔培养板中, 内置细胞爬片; 在37℃ 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 第2 d换液, 以后隔天换液, 从第2次换液开始加入10 g/L二甲亚砜; 用倒置相差显微镜连续观察并显微摄影记录细胞生长状况. 培养液为DMEM/F12(2:1)和100 mL/L小牛血清或胎牛血清, 含10 mmol/L尼克酰胺(Sigma)、2 mmol/L L-谷氨酰胺(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)、20 mmol/L HEPES(Wako, Tokyo)、20 μg/L表皮生长因子(Sigma)、0.2 mmol/L 酸式二磷酸维生素C(Sigma)、1 mg/L胰岛素、1 × 10<sup>-7</sup> mmol/L地塞米松、100 kU/L青霉素钠及100 kU/L链霉素.

**1.3 胎肝干细胞鉴定** 采用免疫组织化学法鉴定细胞表型. (1) 单染色: 细胞爬片漂洗后以40 g/L多聚甲醛溶液固定15 min, 漂洗后移入含0.2 g/L吐温-20的磷酸盐缓冲液中浸泡2 min; 用200 mL/L正常山羊血清37℃封闭15 min, 然后加第一抗体工作液4℃过夜; 漂洗后移入含0.2 g/L吐温-20的磷酸盐缓冲液中浸泡2 min, 再加生物素标记的第二抗体37℃ 45 min; 加结合过氧化物酶链霉亲和素37℃ 45 min; 加新鲜配制的DAB, 显微镜下观察5-10 min, 棕黄色染色为阳性信号; 以PBS代替第一抗体作为阴性对照. 单克隆抗体: OV6抗体由美国Brown大学Hixson教授惠赠, 白蛋白抗体为丹麦DAKO公司产品, CK19抗体购自北京中山生物技术有限公司. (2) 双染色: Histostain™-DS双染色试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品, 按说明

书进行操作. 将细胞爬片浸入过氧化氢溶液中10 min灭活内源性过氧化物酶; 加200 mL/L正常山羊血清37℃封闭15 min; 加白蛋白抗体(1:100)孵育; 加通用型生物素化第二抗体孵育10 min; 加链霉卵白素-碱磷酸酶, 孵育10 min; 加酶底物色素混合液, 镜下观察结果, 出现暗紫色后终止反应; 加双染色增强试剂, 孵育30 min; 加正常血清封闭30 min; 加CK19(1:100)孵育; 加通用型生物素化第二抗体孵育10 min; 加过氧化物酶标记的链霉卵白素孵育10 min; 加酶底物色素混合液, 镜下观察显猩红色后中止反应; 加封片剂覆盖细胞60℃ 15 min后封片.

## 2 结果

**2.1 胎肝干细胞分离** 获得的原代细胞呈圆形或卵圆形, 体积明显小于肝细胞, 胞核大而胞质少, 核浆比较小, 细胞存活率大于95%. 以2 × 10<sup>5</sup>/L的终密度接种于培养瓶或六孔培养板.

**2.2 胎肝干细胞培养与传代** 培养中细胞生长旺盛, 1-2 h后细胞开始贴壁并伸展, 12 h后细胞增生明显活跃, 细胞体积有所增大, 细胞形态呈不规则多边或多角形, 细胞间隙逐渐缩小. 3-4 d后出现数个边缘清晰、折光率较高的细胞集落, 随着培养天数的增加, 细胞集落逐渐增大. 5-10 d细胞大部分已融合成片, 细胞间隙缩小, 呈铺路石样改变(图1). 培养瓶中的细胞长满后进行传代培养, 一般可传2-4代. 此后内皮样细胞逐渐占据优势, 培养液中漂浮细胞逐渐增多, 培养液中可见黑色颗粒状物质, 最后大部分细胞开始崩解, 与瓶壁脱离.

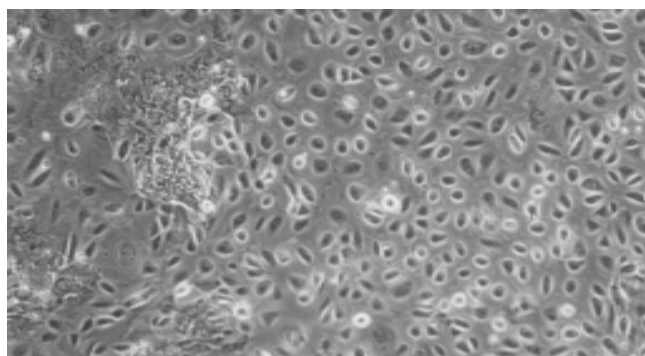


图1 人胎肝干细胞体外培养第9 d, 细胞生长旺盛, 细胞间隙小, 呈铺路石样改变(×100).

**2.3 胎肝干细胞鉴定** 免疫组织化学染色结果显示, 培养的细胞胞质CK19, OV6及白蛋白染色均呈阳性(图2-4); 以白蛋白和CK19进行双染色, 部分细胞胞质中暗紫色与猩红色并存, 表明同时表达白蛋白和CK19; 部分细胞以暗紫色为主, 表明主要表达白蛋白; 另有部分细胞以猩红色为主, 表明主要表达CK19(图5).

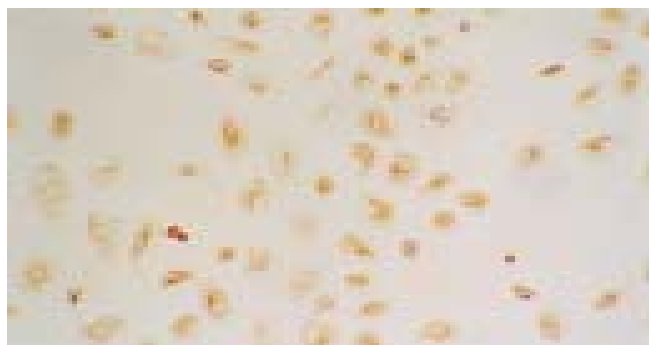


图2 细胞培养第10 d, 细胞胞质CK19染色呈阳性( $\times 200$ ).

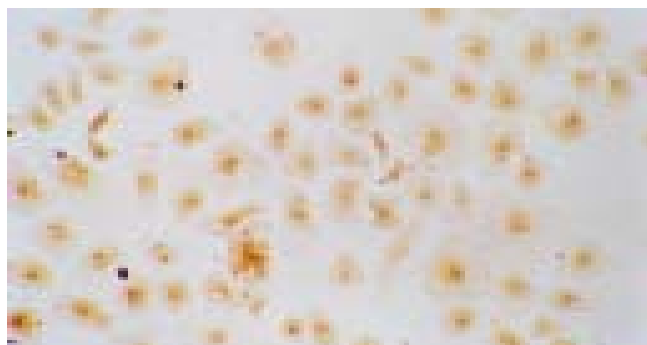


图4 细胞培养第10 d, 细胞胞质白蛋白染色呈阳性( $\times 200$ ).

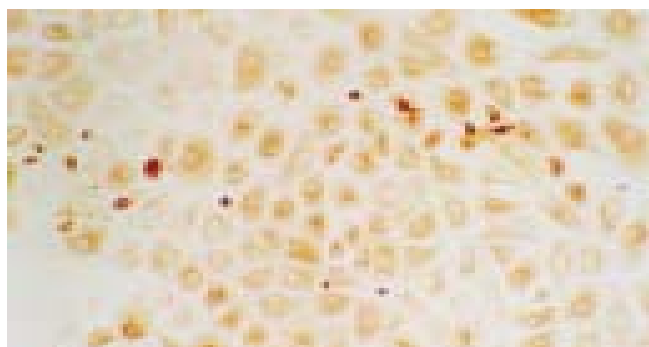


图3 细胞培养第10 d, 细胞胞质OV6染色呈阳性( $\times 200$ ).

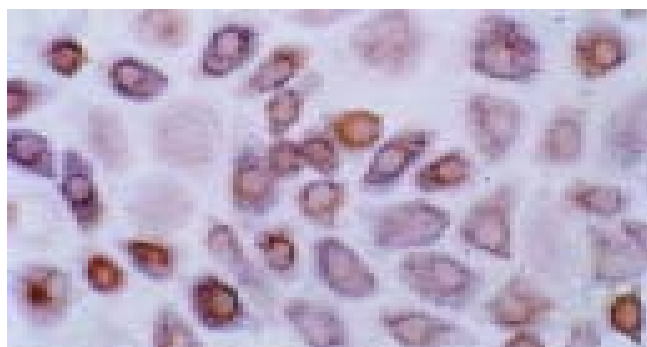


图5 细胞培养第9 d, 细胞胞质CK19和白蛋白双染色呈阳性( $\times 400$ ).

### 3 讨论

有关人胎肝干细胞研究的资料较少, 可供借鉴的经验多来源于动物实验<sup>[19-20]</sup>. Suzuki *et al*<sup>[21]</sup>采用荧光激活细胞分类法从小鼠胎肝中分离到一种增殖能力很强的细胞, 体外培养时可形成较大集落, 体外存活时间亦大为延长, 提示小鼠胎肝中存在高增殖潜能的肝干细胞. Dabeva *et al*<sup>[22]</sup>从胚胎14 d (ED14) Fischer344大鼠分离出胎肝上皮细胞 (fetal liver epithelial cells, FLECs), 经双标记免疫组化/原位杂交法鉴定, 分离出的细胞存在3个亚群: (1)表达AFP及白蛋白, 但不表达CK19; (2)表达CK19但不表达AFP及白蛋白; (3)同时表达AFP、白蛋白及CK19. 作者将FLEC移植到2/3肝切除的正常F344大鼠及惹卓碱 (retrosine) 处理的同基因二肽酶IV (dipeptidyl peptidase IV) 变异F344大鼠 (DPP IV (-)), 两种模型中前者肝细胞增殖能力正常, 而后者肝细胞增殖能力受损. 结果发现, 不同亚群的FLEC在两种模型中的增殖、分化及分布存在极大的差异; 在第1种模型中, 移植后1-2 wk仅肝细胞表型FLEC (表达AFP及白蛋白) 及胆管表型FLEC (表达CK19) 增殖, 而在第2种模型中, 发生增殖的细胞主要是双表型FLEC (表达AFP、白蛋白及CK19); 移植1 mo后, 侵入肝实质的DPP IV (+) 双表型FLEC表现为肝细胞表型并形成新的肝索结构, 而靠近胆管的双表型FLEC则表现为胆管上皮细胞表型并形成新的胆管结构或融入原有胆管; 在未行2/3

肝切除的对照组中, FLEC不发生增殖或分化. 上述结果清楚地显示ED14大鼠胎肝中存在单向分化和双向分化的祖细胞, 他们具有不同的分化增殖能力, 其增殖、分化与受体肝再生的需求及植入细胞所在的位置有关. Haruna *et al*<sup>[23]</sup>研究了人类肝脏发育过程中CK19 (胆管细胞表型) 及HepPar1 (肝细胞表型) 的表达及变化. 结果: CK19和HepPar1是肝原基 (primordium) 中未成熟肝祖细胞最先出现的标志, 在胎龄4 wk时即已出现; 在胎龄8-14 wk期间, 祖细胞持续表达HepPar1及CK19, 但随着肝祖细胞进一步向肝细胞分化, HepPar1表达增加, 而CK19则在胎龄14-16 wk的肝细胞中消失; 随着肝祖细胞进一步向胆管细胞演变, CK19表达增加而HepPar1表达逐渐消失. 以上结果显示人胎肝内存在双向分化的肝祖细胞, 随着其向肝细胞或胆管细胞的分化, 特异性细胞表型亦会发生相应变化.

我们先前在分离大鼠肝卵圆细胞过程中, 根据肝干细胞体积小、质量轻、从本质上属于非实质细胞这一原理, 采用两步法分离大鼠肝卵圆细胞获得较满意的效果<sup>[24]</sup>. 我们再将以上方法应用于人胎肝干细胞的分离, 首先采用50 g离心力将肝实质细胞分离出去, 然后再采用500 g离心力将非实质细胞沉淀, 最后将肝非实质细胞置于Percoll梯度离心分离液中离心, 位于50%与70%的Percoll层之间的细胞层即为胎肝干细胞层. 肝干细胞同时具有肝细胞与胆管细胞

的表型, 我们的结果显示, 部分细胞同时表达白蛋白和CK19的细胞, 结合细胞的形态学特征, 该类细胞属于肝干细胞当无异议. 本结果还显示, 胎肝干细胞的分化状态与分化方向也不尽相同, 表达白蛋白为主的细胞可能属分化接近于成熟肝细胞或具有肝细胞分化倾向者, 而表达CK19为主的细胞可能属分化接近于胆管细胞或具有胆管细胞分化倾向者.

#### 4 参考文献

- 1 Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 2004;72:230-238
- 2 Lee SW, Wang X, Chowdhury NR, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation: state of the art and strategies for overcoming existing hurdles. *Ann Hepatol* 2004;3:48-53
- 3 Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004;83:733-738
- 4 Chen AC, Berhow MA, Tappenden KA, Donovan SM. Genistein inhibits intestinal cell proliferation in piglets. *Pediatr Res* 2005; 57:192-200
- 5 Kim JY, Sawada A, Tokimasa S, Endo H, Ozono K, Hara J, Takihara Y. Defective long-term repopulating ability in hematopoietic stem cells lacking the Polycomb-group gene rae28. *Eur J Haematol* 2004;73:75-84
- 6 Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Liver repopulation by c-Met-positive stem/progenitor cells isolated from the developing rat liver. *Hepatogastroenterology* 2004;51:423-426
- 7 Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* 2004;2:E75
- 8 Jochheim A, Hillemann T, Kania G, Scharf J, Attaran M, Manns MP, Wobus AM, Ott M. Quantitative gene expression profiling reveals a fetal hepatic phenotype of murine ES-derived hepatocytes. *Int J Dev Biol* 2004;48:23-29
- 9 Suskind DL, Muench MO. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin 7/8+ cells express markers for stellate cells. *J Hepatol* 2004;40:261-268
- 10 Khosrotehrani K, Johnson KL, Cha DH, Salomon RN, Bianchi DW. Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA* 2004;292:75-80
- 11 Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, Catana A, Wege H, Wager B, Okita K, Zern MA. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant* 2004;13:197-211
- 12 Sembeil R, Sanhadji K, Vivier G, Chargui J, Touraine JL. Prolonged survival of mouse skin allografts after transplantation of fetal liver cells transduced with hIL-10 gene. *Transpl Immunol* 2004;13:1-8
- 13 Tarasov AI, Petrenko AY, Jones DR. The osmotic characteristics of human fetal liver-derived hematopoietic stem cell candidates. *Cryobiology* 2004;48:333-340
- 14 Fox II, Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4(Suppl 6):7-13
- 15 Honig GR, Li F, Lu SJ, Vida L. Hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32:5-10
- 16 Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:239-245
- 17 Malhi H, Irani AN, Gagandeep S, Gupta S. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. *J Cell Sci* 2002;115:2679-2688
- 18 王宇明, 陈国致, 董家鸿. 分离肝细胞的一种体外灌注法. *中华消化杂志* 1994;14:175
- 19 Miller CL, Lai B. Human and mouse hematopoietic colony-forming cell assays. *Methods Mol Biol* 2004;290:71-90
- 20 Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, Sutko JL, Zanjani ED. Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation* 2004;109:1401-1407
- 21 Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Clonal expansion of hepatic stem/progenitor cells following flow cytometric cell sorting. *Cell Transplant* 2001;10:393-396
- 22 Dabeva MD, Petkov PM, Sandhu J, Oren R, Laconi E, Hurston E, Shafritz DA. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. *Am J Pathol* 2000;156:2017-2031
- 23 Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik MA, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* 1996;23:476-481
- 24 陈耀凯, 王宇明, 李俊刚. 大鼠肝卵圆细胞增生模型的建立与优化. *中华肝脏病杂志* 2002;10:185-188

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 缺血缺氧损伤对肠上皮细胞整合素极性及其细胞凋亡的影响

陈 前, 秦环龙

陈前, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233  
陈前, 男, 1973-06-21, 上海市人, 汉族, 2004 年硕士研究生毕业, 主治医师, 主要从事胃肠外科疾病研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271286  
上海市科委青年科技启明星跟踪计划资助项目, No. 02QMB1406  
项目负责人: 秦环龙, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院外科。  
chenqian2010@sohu.com  
电话: 021-64942226 传真: 021-64368920  
收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-12-09

## Influence of ischemia and anoxia on distribution and polarity of integrin in intestine epithelial cells

Qian Chen, Huan-Long Qin

Qian Chen, Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai JiaoTong University, Shanghai, 200233 China  
Supported by National Science Foundation of China, No. 30271286; and the Fund from the Guiding Star Program of Youth Science and Technology of Shanghai Science committee, No. 02QMB1406  
Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, 200233 Shanghai, China. chenqian2010@sohu.com  
Received: 2004-08-25 Accepted: 2004-12-09

## Abstract

**AIM:** To study the influence of ischemia and anoxia injury on the distribution and polarity of integrin in intestine epithelial cells (IEC).

**METHODS:** IEC ischemia and anoxia injury model was established. The cells were divided into four groups, namely, group A (control group), group B (anoxia group), group C (ischemia group), and group D (ischemia and anoxia group). Cell apoptosis and the polarity and distribution of integrins  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$  were determined by flow cytometry (FCM) and laser scanning confocal microscope (LSCM), respectively.

**RESULTS:** Integrins  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 5$  were expressed exclusively on the basal and lateral surfaces of IECs in group A. After ischemia and anoxia injury, integrins  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 5$  distribution moved from the basolateral to the apical membrane. Cell apoptosis was increased in group B, C and D. Integrin  $\alpha 3$  was not observed in the middle and apical membrane in group C. Integrin  $\beta 2$  distribution was not markedly changed in any group.

**CONCLUSION:** The change in the distribution of integrin is

induced by ischemia and anoxia, which is correlated with IEC apoptosis. IEC apoptosis is more sensitive to the anoxia.

**Key Words:** Ischemia; Anoxia; Integrin; Polarity; Apoptosis; epithelial cells

Chen Q, Qin HL. Influence of ischemia and anoxia on distribution and polarity of integrin in intestine epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):456-459

## 摘要

**目的:** 研究缺血缺氧损伤对肠上皮细胞(IEC)整合素极性及其分布的改变的凋亡机制。

**方法:** 建立缺血缺氧与 IEC 凋亡的实验模型, 实验分组: 对照组(A组), 缺氧组(B组), 缺血组(C组), 缺血缺氧组(D组); 采用流式细胞仪(FCM)检测 IEC 凋亡率, 激光共聚焦显微镜(LSCM)检测 IEC 自基底侧至顶侧 5 个平面的整合素  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$  染色荧光强度并定量。

**结果:** A 组细胞整合素  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 5$  荧光标记主要分布于细胞基底侧, 损伤后 B、C、D 组呈上移趋势, 其分布和极性与细胞凋亡率相一致; 整合素  $\alpha 3$  在 C 组的中间和顶层没有阳性表达。 $\beta 2$  分布较弥散, 无明显变化规律。

**结论:** 缺血缺氧损伤对 IEC 整合素分布改变呈规律性变化, 与 IEC 凋亡密切相关; 对缺氧反应更敏感。

**关键词:** 缺血; 缺氧; 整合素; 极性; 凋亡; 上皮细胞

陈前, 秦环龙. 缺血缺氧损伤对肠上皮细胞整合素极性及其细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(4):456-459  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/456.asp>

## 0 引言

肠上皮细胞是锚着依赖性细胞, 他的存活依靠整合素黏附固定于基质蛋白, 需要整合素与其配体的结合<sup>[1]</sup>. 如果整合素发生改变, IEC 将从其黏附的基质处脱落凋亡, 肠道结构的完整性将遭到破坏. 目前有关 IEC 从基底膜上脱落的机制尚不完全清楚, IEC 损伤时整合素受体分布、极性及含量是否改变, 知之甚少. 我们通过 IEC 体外原代培养, 观察在缺血缺氧条件下 IEC 整合素受体的改变, 以探求肠上皮脱落凋亡的机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 孕 14-18 d 的 SD 大鼠 20 只, 由上海实验

动物中心提供, 清洁级, 质量 300–390 g. DMEM 培养液, 胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司); 胎牛血清 FCS (Hyclone 公司); EGF (SIGMA 公司); 胶原酶 XI 型 (GIBCO 公司); dispase 酶(德国, 宝灵曼公司); 抗体: 羊抗大鼠 integrin ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ) mAb 一抗 (DIACLONE 公司); FITC 标记的兔抗羊的 Ig 二抗 (CALTAG 公司); 凋亡试剂: Aanxin-V/PI 试剂盒 (Sigma 公司); 人工基底膜: matrigel 人工基底膜液 (2 mL, 晶美生物有限公司); 消化酶 A 液: 1.25 g/L 胰蛋白酶、300 mg/L 胶原酶 XI 型、600 mg/L dispase 酶即配即用. 缓冲液 B 液: 50 mL/L 胎牛血清、20 g/L 山梨醇, 调 pH 值至 7.4, 分装, 4℃ 保存. 培养液 C 液: 100 mL/L FCS、20  $\mu$ g/L EGF、1 mmol/L GLN、2.5 mg/L 胰岛素、1 mmol/L 丙酮酸钠、100 mg/L 肝素、100 mg/L 青霉素、50 mg/L 链霉素、甲状腺素、地塞米松加入各药品, 调 pH 值至 7.2, 分装, 4℃ 保存.

## 1.2 方法

1.2.1 胎鼠 IEC 的分离培养 SD 孕鼠, 剖宫取胎鼠及小肠, 纵行剪开肠管, 剪成 1 mm 小块, 加入酶液 A 50 mL, 室温下消化 20 min; 吸取上层液离心, 最后将沉淀悬浮于培养液 C 中, 种植在已涂膜的培养瓶中, 在 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱内培养; 2 d 后首次换液, 弃去含有非贴壁细胞的上清液, 贴壁细胞用 PBS 彻底冲洗. 每 3 d 换以新鲜培养液. 将细胞接种在布膜的玻璃细胞培养瓶中, 待其贴壁后再进行实验; 弃去培养液后, 用 Hanks 液洗细胞 3 次, 用 -20℃ 的冷丙酮固定; 放入酶反应基质液, 孵育 30 min; 加入碱性磷酸酶 (AKP) 试剂, 孵育 45 min; 弃去 AKP 和酶反应基质液, 三蒸水洗 3 次; 苏木精孵育 30 min 后弃去, 三蒸水洗 3 次; 甘油透片后, 倒置光显微镜观察, 红色反应表示阳性.

1.2.2 人工基底膜的建立 取培养瓶, 于实验前滴加 matrigel 人工基底膜液 100  $\mu$ L 后, 置于培养箱中, 培养皿晾干后备用. (1) 模拟缺氧: 标本放入特制的密封仓系统 (三菱瓦司化学株式会社), 配有与其体积相应量的厌氧气体产生剂及指示剂, 封闭密封仓, 厌氧气体产生剂在 20 min 内即可置换密封仓内氧气并释放出相同体积的二氧化碳; 厌氧气体指示剂颜色由粉红变成白色即证实缺氧达到要求 (O<sub>2</sub> 浓度 < 1 mL/L); (2) 模拟缺血: 把正常的培养液换成同体积的无糖含钙的缓冲液 PBS 液 (配方: 117 mmol/L 氯化钠、5.3 mmol/L 氯化钾、1.8 mmol/L 氯化钙、0.8 mmol/L 硫酸镁、26 mmol/L 碳酸氢钠、1 mmol/L 磷酸二氢钠、0.1 mmol/L 酚红), 置于培养箱中; (3) 模拟缺血缺氧: 同时达到 (1) 和 (2) 的要求.

1.2.3 实验分组及检测指标 所有实验组在 IEC 培养 7 d

采样, 分组: A 组, 对照组; B 组, 缺氧组; C 组, 缺血组; D 组, 缺氧缺血组. 上述实验分组在各种病理环境作用 2 h 后, 进行下列指标的检测. (1) 细胞凋亡的检测: 胰酶消化成单个细胞, 悬在 Aanxin V 200  $\mu$ L 中及 PI 200  $\mu$ L 避光冰孵育; 荧光显微镜下观察后, FCM (Beckman 公司) 检测, 488 nm 激发, 515 nm 测定. (2) 整合素分布的改变: 细胞爬片致 40%, 各组按实验设计要求作用 2 h; 加 40 g/L 的多聚甲醛, 常温下固定 30 min; 弃去多聚甲醛, 以 PBS 冲洗 3 次; 0.5 mL 的 1:100 的山羊抗大鼠的整合素 mAb 一抗 37℃ 孵育 1 h; 以 FITT 标记的羊抗兔二抗 (1:100) 0.5 mL 常温避光孵育 1 h; PBS 冲洗 3 次, 甘油封片后, 于激光共聚焦显微镜 (伯乐 Radiance 2 100, 中科院细胞所提供) 下观察; 逐格上移聚焦层面, 测量细胞由基底侧至顶侧染色荧光强度的变化, 随机选取 10 个视野进行统计分析.

**统计学处理** 利用 SPSS 10.0 for Windows 版统计软件进行统计分析, 各组数据采用均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 对各组数据进行  $\chi^2$  检验、*t* 检验. *P* < 0.05 认为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 IEC 凋亡情况 正常细胞自然凋亡率为 35.0  $\pm$  7.2%, 但经缺血缺氧处理后 IEC 凋亡明显增加, 其中最明显的是 D 组 (78.5  $\pm$  10.7%), 比 A 组高出 43.0% (*P* < 0.01), B 组 (67.0  $\pm$  13.1%)、C 组 (46.8  $\pm$  6.3%) 均比 A 组为高 (*P* < 0.01, *P* < 0.05); D、B 组和 C 组相比也有明显的差异 (*P* < 0.01).

2.2 整合素分布的影响 各组 IEC 整合素  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 5$  荧光标记阳性, 且位于细胞膜; A 组荧光分布呈明显的极性, 基底层和近基底层的侧层分布强, 顶层和近顶层的侧层分布弱; B、C、D 组整合素的分布有向顶侧弥漫的倾向, 基底层减少, 顶层有增加趋势. B、C、D 第 1 层的整合素分布均显著低于 A 组 (*P* < 0.01), B、D 的第 4、5 层的整合素分布均显著高于 A 组 (*P* < 0.05) (列出整合素分布趋势曲线图 1 及典型图 2). 各组 IEC 整合素  $\beta 2$  荧光标记较弱, 在细胞膜上的分布较弥散, 极性分布不明显, 无明显规律性改变 (表 1).

表 1 整合素亚型在各层变化

分组	底层(1)	中间(2–4)	顶层(5)
B	$\alpha 3$ , $\alpha 5$ , $\beta 1$ , $\beta 5$	$\alpha 5$ , $\beta 1$ , $\beta 5$	$\alpha 3$ , $\alpha 5$ , $\beta 1$ , $\beta 5$
C	$\alpha 3$ , $\alpha 5$ , $\beta 1$ , $\beta 5$	无	$\alpha 5$ , $\beta 1$ , $\beta 5$
D	$\alpha 3$ , $\alpha 5$ , $\beta 1$ , $\beta 5$	$\alpha 3$ , $\alpha 5$ , $\beta 1$ , $\beta 5$	$\alpha 3$ , $\alpha 5$ , $\beta 1$ , $\beta 5$

与自身组比较, *P* < 0.01 或 *P* < 0.05.

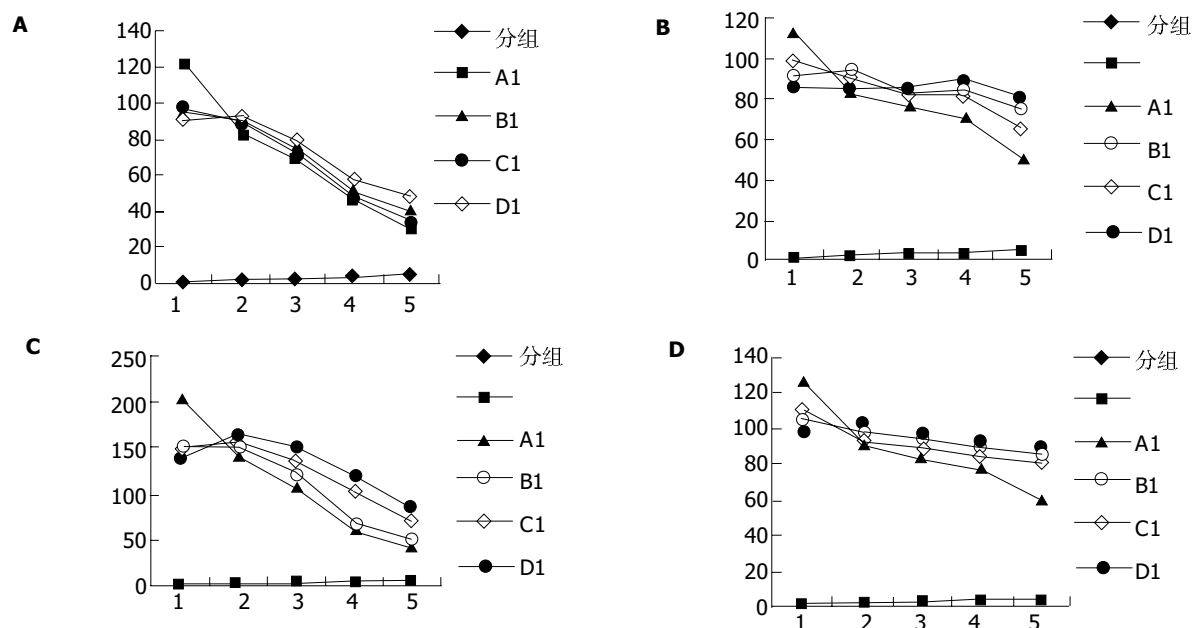


图1 整合素分布趋势曲线. A: 整合素  $\alpha 3$ ; B: 整合素  $\alpha 5$ ; C: 整合素  $\beta 1$ ; D: 整合素  $\beta 5$ . (以细胞底端平面为基准, 以检测平面与细胞底端的相对距离为横坐标, 相应检测平面的荧光强度为纵坐标, 绘制整合素在 IEC 表面不同层面的分布曲线显示, 正常 IEC 整合素主要分布于细胞基底部, 损伤后出现向细胞侧面及顶侧分布的趋势.)

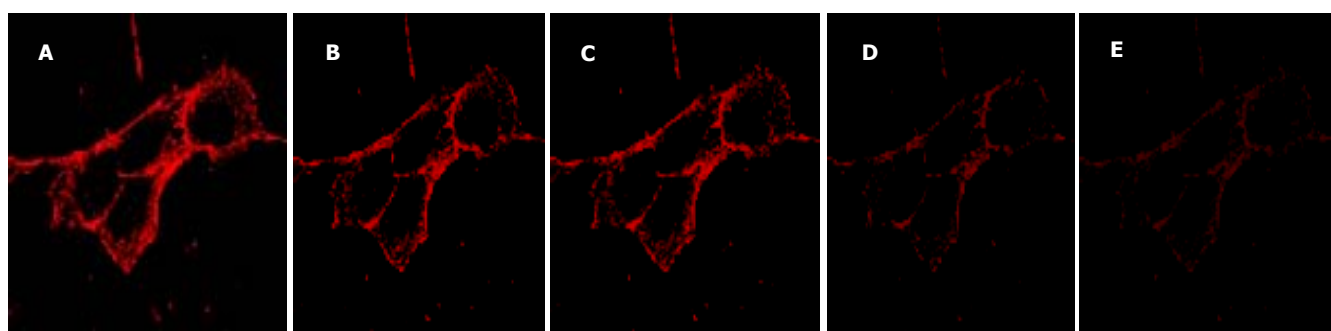


图2 A组整合素  $\beta 1$  LSCM 扫描照片(A-E 分别为底层到顶层)荧光强度逐渐由强变弱.

### 3 讨论

整合素是由  $\alpha$  和  $\beta$  亚单位组成的异二聚体跨膜糖蛋白, 整合素因其  $\alpha$  和  $\beta$  亚单位的不同组合而出现不同的亚型,  $\alpha$  亚基质量在 120–180 ku 之间,  $\beta$  亚基质量 90–110 ku 之间. 整合素主要功能是通过与相应的配体结合介导细胞与基质的黏附、信号传导、个体发育、分化、凋亡等病理生理过程. 同大多数体细胞一样, 在 IEC 表面也分布着多种整合素受体. 与 IEC 表面有关的整合素有  $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ <sup>[2]</sup>. 不同整合素在 IEC 的分布亦有不同, 如  $\alpha 2\beta 1$  分布于隐窝处,  $\alpha 3\beta 1$  分布于绒毛底部,  $\alpha 5\beta 1$  位于隐窝及绒毛的底部,  $\alpha 7\beta 1$  则局限隐窝顶部及绒毛底部, 而  $\alpha 6\beta 4$  则均一地分布于整个 IEC 表面<sup>[3-4]</sup>. 近年来随着研究的深入, 人们发现整合素还与 IEC 的凋亡密切相关<sup>[5]</sup>, 整合素可能是 IEC 黏附于基底膜以维持细胞生存的主要方式, 而且已引起了学者们的关注. 有研究发现 IEC 经整合素  $\alpha 4$  封闭后, 其分化、增生、Bcl-2、

Bcl-X、Bax、Bak 家族基因表达均明显受抑制<sup>[6]</sup>. 如犬经 iv 整合素  $\alpha$ ,  $\beta$  单抗 1.0 mg/kg 持续 2 wk, 可诱导出现消化道出血<sup>[2]</sup>. 还有学者发现, 整合素调控着肠上皮的凋亡,  $\alpha 5\beta 1$  似有抗凋亡作用<sup>[7]</sup>. 最近 Levy *et al*<sup>[8]</sup> 的一项研究发现丁酸 (NaBT) 可以使 Caco-2 细胞表面整合素  $\beta 1$  的表达下降, 导致细胞从基底膜脱落并发生凋亡.

有关整合素在细胞膜上的表达检测, 国内外较为常用的办法是采用免疫组化、免疫荧光等技术, 此二者不能较为精确地反应表达量, 更无法检测极性分布改变、空间结构变化. 近年来已有采用激光共聚焦显微镜 (LSCM) 研究整合素的报道. Gailit *et al*<sup>[9]</sup> 利用 LSCM 观察体外培养的肾小管上皮细胞整合素  $\alpha 3$  呈极性分布, 基底层和近基底层的侧层分布强, 顶层和近顶层的侧层分布弱; 在接受亚致死剂量的氧损伤后, 细胞整合素  $\alpha 3$  的极性分布丧失, 由基底层和近基底层向顶层和近顶层的侧层弥散; 并且导致黏附于

基质的细胞数量减少. Wu *et al*<sup>[6]</sup>在体研究发现, 肾小管上皮细胞正常情况下整合素  $\beta 1$  呈极性分布, 缺血再灌注损伤后, 也向顶侧弥散; Beck *et al*<sup>[2]</sup>发现, 在体的缺血再灌注损伤模型未发现整合素  $\alpha 3$  的顶层的侧层分布. 以上实验结果提示, 缺氧、氧损伤后整合素的极性分布丧失, 是导致上皮细胞黏附性改变的基础; 同时, 也说明了 LSCM 能够很好地观察整合素的三维结构改变.

我们研究发现, IEC 在实验因素刺激下整合素  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 5$  发生了极性和分布的改变, 并与细胞凋亡、脱落密切相关. 其具体表现在, A 组  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 5$  整合素在细胞膜上呈极性分布, 主要位于近基底膜侧; 缺血缺氧后 B, C, D 组有向顶侧弥散的趋势, 各层面的定量均存在差异, 尤以第 1 层和第 5 层改变最为明显 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 整合素极性分布的明显改变趋势由大到小依次是缺血缺氧组、缺氧组、缺血组, 且此三组之间也有差异 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 无论缺血缺氧还是单纯缺血或缺氧损伤与 A 组相比较,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 5$  在底层表达均明显下降, 中间层和顶层均增加表达, 说明有整体从基底向顶层移动的现象. 缺血组  $\alpha 3$  在中间层及顶层没有出现阳性表达, 说明其对缺血损伤可能不敏感. 缺氧组、缺血缺氧组顶层各整合素亚型都发生变化, 并都参与了细胞损伤作用, 说明 IEC 对缺氧尤为敏感.  $\beta 2$  整合素在细胞膜上的分布较均匀, 缺血缺氧后改变不明显; 这可能与整合素  $\beta 2$  功能有关, 或其本身没有直接参

与细胞脱落、凋亡, 只是其他某些亚型在 IEC 凋亡中起着重要调节作用.

#### 4 参考文献

- 1 Stupack DG, Cheresch DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002;115:3729-3738
- 2 Beck R, Nebe B, Guthoff R, Rychly J. Inhibition of lens epithelial cell adhesion by the calcium antagonist Mibefradil correlates with impair integrin distribution and organization of the cytoskeleton. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:452-458
- 3 Goncalves I, Hughan SC, Schoenwaelder SM, Yap CL, Yuan Y, Kachson SP. Integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3-dependent calcium signals regulate platelet-fibrinogen interactions under flow: Involvement of phospholipase C  $\gamma$ 2. *J Biol Chem* 2003;278:34812-34822
- 4 Nebe B, Holzhausen C, Rychly J, Urbaszek W. Impaired mechanisms of leukocyte adhesion in vitro by the calcium channel antagonist mibefradil. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:183-193
- 5 Nebe B, Kunz F, Peters A, Rychly J, Noack T, Beck R. Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242:597-604
- 6 Wu X, Davis GE, Meininger GA, Wilson E, Davis MJ. Regulation of the L-type calcium channel by  $\alpha$ 5  $\beta$ 1 integrin requires signaling between focal adhesion proteins. *J Biol Chem* 2001;276:30285-30292
- 7 Matlin KS, Haus B, Zuk A. Integrins in epithelial cell polarity: using antibody to analyze adhesive function and morphogenesis. *Methods* 2003;30:235-245
- 8 Levy P, Robin H, Bertrand F, Kornprobst M, Capeau J. Butyrate-treated colonic Caco-2 cells exhibit defect integrin-mediated signaling together with increased apoptosis and differentiation. *J Cell Physiol* 2003;197:336-347
- 9 Gailit J, Clarke C, Newman D, Tonnesen MG, Mosesson MW, Clark RA. Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin  $\alpha$ (v) $\beta$ 3. *Exp Cell Res* 1997;232:118-126

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 《世界胃肠病学杂志(英文版)》第二次荣获 我国期刊界的最高政府奖项—国家期刊奖百种重点期刊

**本刊讯** 由中华人民共和国新闻出版总署举办的第三届国家期刊奖评选结果已经揭晓, 由世界胃肠病学杂志社出版的《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊之后, 第二次获得此项殊荣.

第三届国家期刊奖颁奖大会于 2005-02-28 在北京举行. 中共中央宣传部、国家新闻出版总署和国家科技部有关方面负责同志出席了颁奖大会. 新闻出版总署署长暨第三届国家期刊奖评委会主任石宗源同志在颁奖大会上做了“坚持正确导向, 促进期刊繁荣”的重要讲话. 国家期刊奖是经中共中央宣传部批准, 由国家新闻出版总署于 1999 年开始主办的我国期刊界的最高政府奖项, 每两年评选一次, 至今已举办了三届.

第三届国家期刊奖评选活动于 2004-08 开始. 所有参评期刊经过评选工作办公室的参评资格、学术质量、出版规范、编校质量和广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行了认真、严格的评选, 于 2004-12-21 产生初评入围期刊名单, 并在《中国新闻出版报》等新闻媒体上进行了为期一个月的公示, 接受全社会的监督, 最终从推荐参评的 976 种期刊中评出获本届国家期刊奖百种重点期刊科技类期刊 100 种.

获第三届国家期刊奖百种重点期刊的期刊是我国 9000 余种期刊的优秀代表, 反映了我国期刊业近年来坚持正确舆论导向、促进期刊事业繁荣发展所取得的最新成果. (世界胃肠病学杂志社 2005-03-10)



# 诱导型一氧化氮合酶基因启动子在不同细胞系中的转录活性

郭风劲, 成军, 纪冬, 刘妍, 王琳, 张黎颖, 戴久增, 宋方洲

郭风劲, 重庆医科大学生物学教研室, 重庆市 400016  
郭风劲, 成军, 纪冬, 刘妍, 王琳, 张黎颖, 戴久增, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011  
宋方洲, 重庆医科大学分子生物学教研室, 重庆市 400016  
郭风劲, 女, 1972-9-19 生, 重庆市人, 汉族, 1994 年兰州大学细胞生物学学士, 2003 年重庆医科大学临床检验与诊断学博士, 从事多基因病的分子生物学研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30371288  
北京市自然科学基金资助项目, No. 5042024  
国家人事部第 35 批博士后科学基金资助项目, No. 2004035045  
项目负责人: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所。cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540  
收稿日期: 2004-12-13 接受日期: 2004-12-21

## Transcription activation of Inducible Nitric Oxide Synthase gene in different cell lines

Feng-Jin Guo, Jun Cheng, Dong Ji, Yan Liu, Lin Wang, Li-Ying Zhang, Jiu-Zeng Dai, Fang-Zhou Song

Feng-Jin Guo, Department of Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China  
Feng-Jin Guo, Jun Cheng, Dong Ji, Yan Liu, Lin Wang, Li-Ying Zhang, Jiu-Zeng Dai, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China  
Fang-Zhou Song, Department of Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30371288, Beijing Natural Science Foundation No. 5042024; and the 35<sup>th</sup> Postdoctor Science Foundation No. 2004035045  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2004-12-13 Accepted: 2004-12-21

## Abstract

**AIM:** To investigate the transcription activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in different cell lines.

**METHODS:** The coding sequence of iNOS promoter (iNOSp) was amplified by PCR from genomic DNA of human hepatoblastoma cell line HepG<sub>2</sub>, and cloned into pEGM-Teasy vector to yield Teasy-iNOSp. The iNOSp gene was cut from Teasy-iNOSp by *KpnI* and *XhoI*, and then subcloned into pCAT3-Basic to produce a construct named pCAT3-iNOSp. pCAT3-iNOSp was transfected into HepG<sub>2</sub> cell line, SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cell line, NIH-3T3 mouse fibroblast cell line, Ito human lipocyte cell line, and LO<sub>2</sub> human normal liver cell line by FuGENE 6 transfection reagent. Cells transfected with pCAT3-Basic or pCAT3-Promoter were used as negative and positive controls. The activity of CAT, which reflects

the transcription activation of the iNOS gene promoter, was detected by ELISA after 48 hours of transfection.

**RESULTS:** The report vector pCAT3-iNOS was successfully constructed, as confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The activity of CAT was highest in HepG<sub>2</sub> cells transfected with pCAT3-iNOSp, and lowest in Ito cells.

**CONCLUSION:** The iNOS gene promoter can transactivate its downstream genes. Its transcription activity varies in different cell lines.

**Key Words:** iNOS; transcription; PCR; ELISA

Guo FJ, Cheng J, Ji D, Liu Y, Wang L, Zhang LY, Dai JZ, Song FZ. Transcription activation of Inducible Nitric Oxide Synthase gene in different cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):460-463

## 摘要

**目的:** 探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因启动子在不同细胞系中转录活性的差别。

**方法:** 利用生物信息技术确定 iNOS 基因的启动子区域(iNOSp), 聚合酶链反应(PCR)扩增 iNOSp, 克隆至真核报告载体 pCAT3-Basic 中, 构建 pCAT3-iNOSp 报告载体; 以该质粒分别转染正常人肝细胞株 LO<sub>2</sub>, 人肝母细胞瘤细胞系 HepG<sub>2</sub>, 小鼠成纤维细胞 NIH-3T3, 人贮脂细胞(Lipocyte Ito Cell)和肝癌细胞株 SMMC-7721, 用 ELISA 法检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)在不同细胞系中的表达活性。

**结果:** 成功获得 iNOS 基因启动子的正确克隆, 克隆的 iNOS 启动子有顺式激活下游基因活性。pCAT3-iNOSp 瞬时转染 HepG<sub>2</sub> 细胞的 CAT 表达活性最强, 肝贮脂细胞 Ito 中 CAT 表达活性最弱。

**结论:** 不同细胞中 iNOS 启动子的表达活性不同, 其表达活性与细胞类型与细胞状态密切相关。

**关键词:** 诱导型一氧化氮合酶; 转录; 聚合酶链反应; ELISA 法

郭风劲, 成军, 纪冬, 刘妍, 王琳, 张黎颖, 戴久增, 宋方洲. 诱导型一氧化氮合酶基因启动子在不同细胞系中的转录活性. *世界华人消化杂志* 2005;13(4):460-463

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/460.asp>

## 0 引言

一氧化氮(nitric oxide, NO)是细胞内广泛存在的



一种新型生物信号分子, 作为第二信使和神经递质发挥着多种不同的功能, 具有广泛的生物学效应和抗病毒作用, 参与机体的多种生理及病理过程. 近来研究发现, iNOS 基因与病毒性肝炎有密切关系, 肝细胞中 NO 具有保护功能, iNOS 的表达可以作为减少炎症损伤的一个衡量因子. 正常肝细胞中 iNOS 基因表达量极低, 一旦病毒侵入肝细胞后就会诱导肝细胞激活 iNOS 基因并使其表达, 产生大量的 NO, NO 作为细胞内一种活跃的信号分子在其信号传递过程中发挥抗病毒功能<sup>[1-2]</sup>. 我们构建 iNOS 基因启动子的报告载体, 分别导入人肝母细胞瘤细胞系 HepG<sub>2</sub>, 正常人肝细胞株 LO<sub>2</sub>, 小鼠成纤维细胞 NIH-3T3, 人贮脂细胞 Ito 和肝癌细胞株 SMMC-7721 中, 以验证该启动子在不同细胞中的转录活性, 旨在探讨 NO 在不同细胞中的表达机制, 为进一步揭示 NO 在细胞中的信号转导机制奠定基础, 有助于阐明 NO 的广泛生物学效应和抗病毒机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系 HepG<sub>2</sub>, 正常人肝细胞株 LO<sub>2</sub>, 小鼠成纤维细胞 NIH-3T3, 人贮脂细胞 (Ito Cell) 和肝癌细胞株 SMMC-7721 及大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株为本室保存. Tag DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶均购自 Takara 公司. 质粒 DNA 提取试剂盒, 中间载体 pGEM-T easy 及报告质粒 pCAT3-Basic 均购自 Promega 公司; CAT-ELISA 检测试剂盒及质粒 DNA 转染试剂盒购自 Roche 公司. 其他生化试剂购自 Sigma 公司, 玻璃奶纯化试剂盒购自博大公司.

### 1.2 方法

1.2.1 iNOS 启动子的结构分析及 PCR 扩增 根据 GenBank 中 iNOS 以及 iNOS 启动子的基因序列<sup>[3]</sup>, 确定 iNOS 的翻译起始点 (ATG), 选取其上游 -936-21 bp 为目的片段, 设计并由上海博亚公司合成引物, 在上、下游引物的 5'-端分别加上 *Kpn* I/*Xho* I 酶切位点 (划线部分). 上游引物: 5' - GGTACC AAACCCAGTCTCTACCAAAAAC - 3', 下游引物: 5' - CTCGAG TTCGACTCGCTACAAAGTTA TG-3'. 以 HepG<sub>2</sub> 细胞基因组为模板, 进行聚合酶链反应 (PCR) 反应 (PE9600 PCR 仪), 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 1 min, 63℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环 35 次后, 72℃ 保温 10 min. PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 玻璃奶法回收纯化.

1.2.2 pCAT3-iNOSp 的构建 回收产物在 T4 DNA 连接酶的作用下, 与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取在选择平皿 (Amp, X-gal/IPTG) 生长的白色菌落提取质粒, 经酶切 (*Kpn* I/*Xho* I) 鉴定. *Kpn* I/*Xho* I 双酶切重组质粒 pGEM-T-iNOS, 玻璃奶纯化回收酶切产物, 定向克隆至 pCAT3-Basic 载体,

构建成重组质粒 pCAT3-iNOSp, 经酶切及 DNA 测序鉴定 (上海博亚公司). 磁珠法提取质粒以备转染.

1.2.3 pCAT3-iNOSp 的瞬时转染 分别在含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 中培养人肝母细胞瘤细胞系 HepG<sub>2</sub>, 正常人肝细胞株 LO<sub>2</sub>, 小鼠成纤维细胞 NIH-3T3, 人贮脂细胞 Ito 和肝癌细胞株 SMMC-7721, 于 35 mm 平皿中生长至 50-80% 融合时采用脂质体转染法, 具体转染方法参照 FuGENE6 Transfection Reagent 说明书进行, pCAT3-iNOSp 转染剂量为 1  $\mu$ g, 设置 pCAT3-Basic (1  $\mu$ g) 为阴性对照组, pCAT3-promoter (1  $\mu$ g) 为阳性对照组, 转染 24-48 h 后收获细胞, 收集细胞裂解液, 用于 CAT 活性检测以验证所克隆片段的启动子活性, 并比较 pCAT3-iNOS 在不同细胞系中的转录活性, 所有实验严格平行操作.

1.2.4 CAT 含量检测 按照 CAT ELISA 试剂盒说明书进行, 取 1.0  $\mu$ g/L 的 CAT 标准品 (试剂盒提供) 及细胞裂解液 200  $\mu$ L, 加入已包被抗体的 96 孔板中, 37℃ 温育 1 h, 再依次加入第一抗体 (地高辛标记的抗 -CAT)、第二抗体 (耦联有过氧化物酶的地高辛抗体抗 -DIG-POD) 各 200  $\mu$ L, 37℃ 温育 1 h 后, 加入过氧化物酶的底物室温显色 20 min, 用酶标仪检测标本在 415 nm 检测波长, 490 nm 参考波长下的吸光度 *A* 值, 其数值反映细胞提取物中的 CAT 表达水平.

## 2 结果

2.1 pCAT3-iNOSp 重组质粒的构建 利用自行设计的引物成功扩增出 iNOS 基因的启动子序列, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约 957 bp, 与预期片段符合 (图 1). 将扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 双酶切鉴定, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析显示两条带 (3 015 bp 的 pGEM-Teasy 载体和 957 bp 的 iNOS 启动子 DNA 片段), 与预期一致 (图 2). 图 3A 为 pCAT3-iNOSp 质粒结构图. 将双酶切产物与 pCAT3-Basic 载体连接, 双酶切鉴定如图 3B 所示 (4 027 bp 的 pCAT3-Basic 载体和 957 bp 的 iNOSp DNA 片段), DNA 测序结果和 GenBank 中 iNOS 启动子的基因序列完全一致.

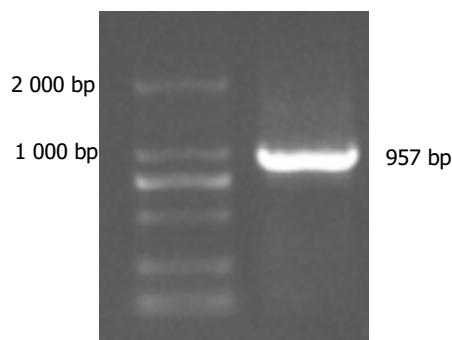


图1 以 HepG<sub>2</sub> 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 iNOS 启动子序列.

**2.2 pCAT3-iNOSp重组质粒的转录活性** 将重组质粒 pCAT3-iNOSp 分别转染人肝母细胞瘤细胞系 HepG<sub>2</sub>, 正常人肝细胞 LO<sub>2</sub>, 贮脂细胞 Lipocyte Ito, 小鼠成纤维细胞 (NIH-3T3), 肝癌细胞株 SMMC-7721, CAT ELISA 检测吸光度, 比较 pCAT3-iNOSp 在这五种不同细胞中的转录活性, 每一组细胞系都设立空载体阴性对照组 pCAT3-Basic 和阳性对照组 pCAT3-promoter, 分别检测重组质粒 pCAT3-iNOSp 在这些细胞系中的表达活性 (表1). 结果 pCAT3-iNOSp 在 HepG<sub>2</sub> 细胞中的转录活性是最强的, 是 pCAT3-Basic 的 4.6 倍, 其次是 SMMC-7721, 在 LO<sub>2</sub>, NIH-3T3, 贮脂细胞中活性低或者没有活性 (图 4).

表1 pCAT3-iNOSp 重组质粒在不同细胞系中的转录活性(4)

细胞类型	pCAT3-Basic	pCAT3-promoter	pCAT3-iNOSp
HepG <sub>2</sub>	0.047	0.198	0.216
LO <sub>2</sub>	0.041	0.187	0.085
SMMC-7721	0.039	0.211	0.107
NIH-3T3	0.053	0.189	0.069
Lipocyte Ito	0.058	0.203	0.057

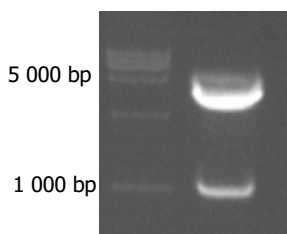


图2 pEGM-Teasy-iNOS-P 双酶切鉴定(Kpn I/Xho I).

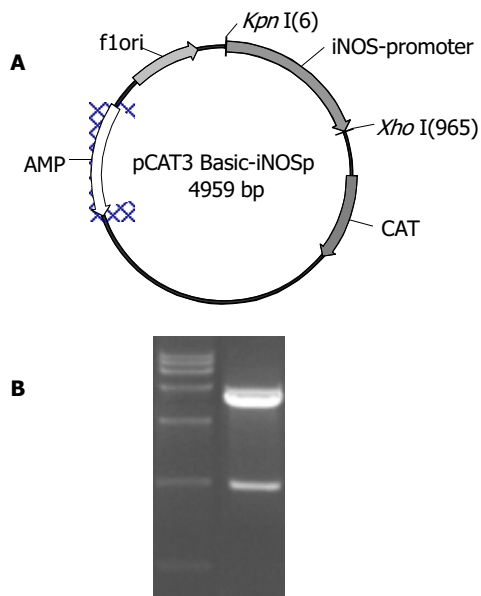


图3 pCAT3-iNOSp 报告载体结构图与双酶切鉴定. A: 结构图; B: 双酶切鉴定(Kpn I/Xho I).

### 3 讨论

一氧化氮是一种结构简单、分子质量小的生物自由基, 参与肝细胞的多项生理功能, 参与各种肝病的病理过程. 肝细胞中 NO 具有保护功能, iNOS 的表达可以作为减少炎症损伤的一个衡量因子. 正常肝细胞中 iNOS 基因表达量极低, 一旦病毒侵入肝细胞后就会诱导肝细胞激活 iNOS 基因并使其表达, 产生大量的 NO, NO 作为细胞内一种活跃的信号分子在其信号传递过程中发挥抗病毒功能<sup>[4-8]</sup>. 我们分别在人肝母细胞瘤细胞系 HepG<sub>2</sub>, 正常人肝细胞株 LO<sub>2</sub>, 小鼠成纤维细胞 NIH-3T3, 人贮脂细胞和肝癌细胞株 SMMC-7721 中导入 pCAT3-iNOSp 报告载体, 旨在探讨不同细胞中 iNOS 基因启动子的表达调控机制, 为进一步揭示细胞中 NO 的信号转导调控机制奠定基础. Geller *et al*<sup>[9-10]</sup> 1993 年采用肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、白介素 1 (IL-1)、干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 和脂多糖 (LPS) 诱导肝细胞表达 iNOS 基因后, 成功克隆并表达了 iNOS 基因, 并进一步采用 Northern blot 技术分析不同因子刺激后 iNOS 基因表达量的变化, 发现单因子 TNF $\alpha$  刺激和 TNF $\alpha$ 、IL-1 双因子共刺激, iNOS 基因表达量高于其他对照组. 他们发现肝细胞 iNOS 有 80% 氨基酸序列与巨噬细胞 iNOS 同源, 与其他 NOS 同工酶一致的是, 肝细胞中 iNOS 也含有 FMN、FAD、NADPH 和 Ca<sup>2+</sup>-CaM 结合位点, 与巨噬细胞 iNOS 和神经型 NOS、内皮细胞型不同的是, 肝细胞 iNOS 必须经过诱导才能表达, 是一种诱导表达的活性形式. 随后, Nunokawa *et al*<sup>[11]</sup> 1994 年分析了心肌细胞 iNOS 基因启动子结构, 指出 iNOS 启动子含有 8 个 IFN- $\gamma$  反应元件和一个血清应答元件 (SRE)、NF-IL6, NF- $\kappa$ B 一致性结合序列, 解释了 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  和内毒素可以诱导激活 iNOS 启动子表达 iNOS 的原因. 1995 年, Rockey *et al*<sup>[12]</sup> 在肝贮脂细胞中也发现 iNOS 基因在用肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、脂多糖 (LPS)、白介素 1 (IL-1)、干扰素  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 等因子刺激后, iNOS mRNA 水平增加, 在刺激 4 h 后达到峰值. 当肝胆管结扎以后造成周围组织肝损伤, 此时会刺激肝贮脂细胞 iNOS 基因的表达, 研究者认为肝

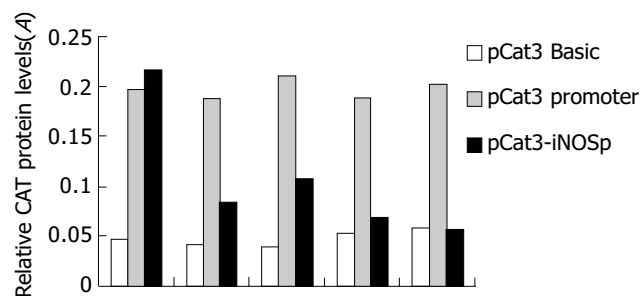


图4 pCAT3-iNOSp 转染不同细胞系 CAT 报告基因分析.

损伤时, 肝贮脂细胞 iNOS 基因会被激活, NO 是肝贮脂细胞一个潜在的调控因子, 可作为肝细胞损伤的一个重要调节因子, 该因子通过细胞自分泌或内分泌机制完成这一调控. Sakitani *et al*<sup>[13]</sup>发现肝细胞中CCAAT增强子结合蛋白 $\beta$ 和核转录因子NF- $\kappa$ B协同调控iNOS基因的表达. 2003年Guo *et al*<sup>[14]</sup>发现肝细胞中iNOS基因有自己特有的转录分子机制, 在人肝细胞iNOS基因启动子区-192 bp有一特异的A-激活域结合位点(AABS)可以特异性连接C/EBP $\beta$ 转录因子, 二者的结合可以介导肝细胞内特异的基因表达, 因此启动子中AABS作用元件是一个介导肝细胞特异iNOS转录活性的顺式作用元件, 这一位点突变会导致肝细胞中iNOS启动子活性丧失, 并会抑制细胞因子诱导的启动子活性. 最近, Kleinert *et al*<sup>[15]</sup>发现, NO调控iNOS的过程是非常复杂的, iNOS表达产物NO具有抗病毒、抗寄生、抗微生物、抗肿瘤和免疫调节效应, 可是一旦在错误的地点、错误的时间诱导其表达, iNOS就会具有多种负面的效应, 因此, NO参与人体的多种生理及病理过程, 具有广泛的病理生理效应. 他还进一步指出iNOS在不同细胞的表达和调控机制是不同的. 通常情况下, 一旦激活核转录因子NF- $\kappa$ B和信号转导激活转录因子STAT-1 $\alpha$ , 就会激活iNOS启动子, 这是iNOS基因表达的一个重要调控步骤, 这一调控属于转录后调控机制. Yu *et al*<sup>[16]</sup>发现STAT3和NF- $\kappa$ B是调节iNOS基因表达的重要转录因子, 在这一调节过程中, STAT3 DNA结合域对于NF- $\kappa$ B p65调控iNOS的转录活性是必需的. 因此, 可以认为细胞在病理状态下会增加iNOS的表达量, 导致NO产量的增多, 发挥其抗病毒效应, 这是细胞的一种自我保护机制;但同时产生的NO又可通过细胞毒作用损伤正常组织, 造成细胞死亡. NO这两种作用的强弱主要取决于NO的浓度和NO的细胞来源, 浓度在一定范围内以及来源于内皮细胞者对组织器官起保护作用, 否则起毒性作用<sup>[17]</sup>.

我们发现人肝母细胞瘤细胞系HepG<sub>2</sub>和肝癌细胞株SMMC-7721中CAT的表达强于3组正常细胞(LO<sub>2</sub>, NIH-3T3, Ito Cell), 说明iNOS基因在HepG<sub>2</sub>和SMMC-7721细胞中的表达强于其他三组正常细胞. 因此, 我们认为不同细胞中iNOS基因启动子的活性是有差别的, 不同细胞中iNOS基因的表达量也是不同的. 至于是否iNOS基因在异常细胞中的表达强于正常细胞, 还需要进一步扩大细胞类型作深入的研究. NO作为一种多功能的信号分子, 在肝细胞内涉及了极其广泛的信号调控过程, 不同的细胞, 由于其细胞内环境的不同, 每一种细胞内差异表达的基因也不同, 这些因素都会影响iNOS基因

的表达, 影响细胞内NO的信号转导过程, 其中具体的机制尚需要进一步进行详细的研究.

#### 4 参考文献

- 1 Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry* 1998; 63:766-781
- 2 Rockey DC, Chung JJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide during hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Physiol* 1997;273(1 Pt 1):G124-130
- 3 Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3491-3495
- 4 Majano PL, Medina J, Zubia I, Sunyer L, Lara-Pezzi E, Maldonado-Rodriguez A, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. *J Hepatol* 2004;40:632-637
- 5 Sheffler LA, Wink DA, Melillo G, Cox GW. Exogenous nitric oxide regulates IFN-gamma plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages. *J Immunol* 1995;155:886-894
- 6 成军. 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:253-257
- 7 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳. 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较. 世界华人消化杂志 2004;12:327-331
- 8 成军, 刘妍, 杨倩, 王建军, 洪源, 王琳. 丙型肝炎病毒蛋白对 Bcl-10 蛋白信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1948-1951
- 9 Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:522-526
- 10 Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994; 269:6765-6772
- 11 Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200:802-827
- 12 Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 1995;95:1199-1206
- 13 Sakitani K, Nishizawa M, Inoue K, Masu Y, Okumura T, Ito S. Synergistic regulation of inducible nitric oxide synthase gene by CCAAT/enhancer-binding protein beta and nuclear factor-kappaB in hepatocytes. *Genes Cells* 1998;3:321-330
- 14 Guo Z, Shao L, Feng X, Reid K, Marderstein E, Nakao A, Geller DA. A critical role for C/EBPbeta binding to the AABS promoter response element in the human iNOS gene. *FASEB J* 2003;17:1718-1720
- 15 Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 2004;500:255-266
- 16 Yu Z, Kone BC. The STAT3 DNA-binding domain mediates interaction with NF-kappaB p65 and inducible nitric oxide synthase transrepression in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:585-591
- 17 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-760

# DHFR-CD双耐药基因增强转基因小鼠对大剂量化疗毒性的抵御能力

路平, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚

路平, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001

赵实诚, 美国纽约 Memorial Sloan-Kettering 癌症中心 10021

路平, 男, 1964-02-13 生, 安徽省萧县人, 汉族. 1998 年中国医科大学博士, 副教授, 主要从事消化道肿瘤的诊治研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30471678

项目负责人: 路平, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京街 155 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科. lupinglp1999@163.com

收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-11-29

## Protection against toxicity of high dose chemotherapy in mice transfected with double-mutant dihydrofolate reductase-cytidine deaminase gene

Ping Lu, Fen Jin, Buo Chen, Fan Yao, Shu-Bao Wang, Jun-Qing Chen, Hui-Mian Xu, Shi-Cheng Zhao

Ping Lu, Fen Jin, Buo Chen, Fan Yao, Shu-Bao Wang, Jun-Qing Chen, Hui-Mian Xu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Shi-Cheng Zhao, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, New York 10021, U.S.A

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471678

Correspondence to: Dr. Ping Lu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjing Beijie, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lupinglp1999@163.com  
Received: 2004-11-12 Accepted: 2004-11-29

## Abstract

**AIM:** To explore the feasibility of transferring dihydrofolate reductase- (DHFR) gene and cytidine deaminase (CD) fusion gene into mouse bone marrow (BM) cells to induce resistance to high dose methotrexate (MTX) and cytosine arabinoside (Ara-C), and to improve the tolerance of myelosuppression following combination chemotherapy.

**METHODS:** Human double-mutant DHFR-CD fusion gene was transferred into mouse BM cells by retroviral vector Granulocyte-macrophage colony-forming unit (CFU-GM) assay was performed for retrovirally infected and drug treated mouse BM cells. DNA was extracted from mouse BM, and the expression of drug resistant genes was examined by PCR.

**RESULTS:** Drug resistant colonies were formed by donor mouse BM cells co-cultured with the retrovirus producing cells, as well as the BM cells from recipient mice transplanted with the fusion gene transfected BM cells (CFU-

GM of donor mice was 14%,  $\chi^2 = 42.55$ ,  $P < 0.01$ ; CFU-GM of recipient mice was 20%,  $\chi^2 = 44.26$ ,  $P < 0.01$ ). The drug resistance to both MTX and Ara-C was also increased in the recipient mice. The survival rate of gene transferred mice was significantly higher compared with the control mice  $\chi^2 = 7.42$ ,  $P < 0.01$ . Expression of the DHFR-CD fusion gene in the transfected mice was confirmed by PCR.

**CONCLUSION:** Double drug resistant genes can be integrated and expressed in mouse bone marrow cells; furthermore, they can increase the drug resistance to MTX and Ara-C.

**Key Words:** Dihydrofolate reductase; Cytidine deaminase; Gene therapy

Lu P, Jin F, Chen B, Yao F, Wang SB, Chen JQ, Xu HM, Zhao SC. Protection against toxicity of high dose chemotherapy in mice transfected with double-mutant dihydrofolate reductase-cytidine deaminase gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):464-467

## 摘要

**目的:** 探讨将人双突变的二氢叶酸还原酶基因(DHFR)和胞苷脱氨酶基因(CD)同时导入小鼠骨髓细胞中, 观察小鼠对大剂量氨甲喋呤(MTX)和阿糖胞苷(Ara-C)的耐受性, 研究骨髓耐受联合化疗的可行性.

**方法:** 以反转录病毒为载体, 将人双突变的二氢叶酸还原酶基因(DHFR)和胞苷脱氨酶基因(CD)通过共培养转染入小鼠骨髓干细胞, 观察共培养后的骨髓细胞及受体小鼠骨髓移植后经药物处理后的骨髓细胞耐 MTX 及 Ara-C CFU-GM 生成情况; 转基因小鼠骨髓细胞提取的 DNA, 用 PCR 检测转基因小鼠骨髓细胞耐药基因的表达; 观察转基因小鼠经大剂量 MTX 和 Ara-C 化疗后血象、体质量及生存率的变化.

**结果:** 骨髓移植前共培养后供体的骨髓细胞和骨髓移植后受体含有耐药基因(SFG-F/S-CD)的骨髓细胞均有耐药克隆的形成(14%, 20%;  $\chi^2$  分别为 42.55, 44.26;  $P < 0.01$ ), 并明显增加了对 MTX 和 Ara-C 的耐受; 与对照组比较含双耐药基因组动物经大剂量化疗后, 生存率明显提高( $\chi^2 = 7.42$ ,  $P < 0.01$ ), 血象逐渐恢复正常; 转基因小鼠骨髓细胞经 PCR 检测, 显示有 F/S-CD 基因条带; 耐药基因转染后小鼠骨髓对 MTX 和 Ara-C 的耐受明显增加.

**结论:** 双耐药基因可以进入小鼠骨髓细胞并且获得共表达, 提高了造血细胞对 MTX 和 Ara-C 的耐药性。

**关键词:** 二氢叶酸还原酶基因; 胞苷脱氨基酶基因; 基因疗法

路平, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚. DHFR-CD 双耐药基因增强转基因小鼠对大剂量化疗毒性的抵御能力. 世界华人消化杂志 2005;13(4):464-467  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/464.asp

## 0 引言

骨髓抑制限制了化疗药物的应用, 使之难以达到治愈或抑制肿瘤生长的剂量. 如何提高骨髓等正常细胞对化疗药物的耐受性, 减少化疗的毒副作用, 成为肿瘤化疗研究的焦点<sup>[1]</sup>. 我们将双突变的人二氢叶酸还原酶基因(dihydrofolate reductase, DHFR)和胞苷脱氨基酶基因(cytidineaminase, CD)同时导入小鼠骨髓细胞中, 观察小鼠对大剂量甲氨喋呤(methotrexate, MTX)和阿糖胞苷(cytosine arabinoside, Ara-C)的耐受性, 结果如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 含耐药基因的反转录病毒载体 SFG-CD(含人突变的胞嘧啶脱氨酶 mCD), SFG-F/S-NeoR(含双突变“Phe22-Ser31”的二氢叶酸还原酶 dmDHFR 和耐新霉素基因 NeoR), SFG-F/S-CD(含双突变的二氢叶酸还原酶 dmDHFR 与胞嘧啶脱氨酶), 转染入病毒产生细胞(amphotropic packaging cell, GP-Am12, 简称 Am12), 分别构成 AM12-SFG-F/S-CD, 简称为 SFG-F/S-CD(图1). 以上载体及细胞系由赵实诚教授提供. BALB/c ♂ 小鼠 8-10 周龄, 行 5-FU 尾静脉注射(150 mg/kg), 该药可杀伤成熟粒细胞而不影响造血祖细胞, 注射 4 d 后取其股骨、胫骨的骨髓细胞  $(2-5) \times 10^7$ , 制成单细胞悬液. 计数骨髓有核细胞总数, 使骨髓有核细胞和转基因之病毒产生细胞按 1:1 的比例, 置于含 200 mL/L 小牛血清和 10 g/L 谷氨酰胺, 100 g/L WEHI 条件培养液中, 分两组(SFG-F/S-CD, Am12)在 37℃ 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下共培养 48 h. 含耐药基因病毒产生细胞系在共培养前 2 h 照射 1.5 Gy. 共培养后收集骨髓细胞, 制成细胞悬液(在 PBS 平衡液中作为骨髓移植及 CFU-GM 培养用). 受体小鼠在骨髓移植前均经 8 Gy 致死量照射, 以完全破坏其自身造血功能, 观察被输入的造血细胞在体内增生及血液的耐药情况. 小鼠根据体质量随机分为两组: A 组转染 SFG-F/S-CD; B 组阴性对照组, 被输入的骨髓细胞仅与 AM12 共培养不含耐药基因. 每只小鼠根据其组别, 在致死量照射后 12 h 尾静脉注射  $2 \times 10^6$  骨髓细胞. 骨髓移植后 4 wk 每只小鼠 ip MTX(20 mg/kg) 和 Ara-C(30 mg/kg) 连续 4 d. 期中及注射后(25 d, 30 d, 35 d, 40 d 及 45 d)观察血

象、体质量及生存率的变化。

**1.2 方法** 为了解造血干细胞同含耐药基因的病毒产生细胞共培养后, 在小鼠体外体内的基因表达和耐药 CFU-GM 生成情况(检测共培养后的骨髓细胞行体外实验, 受体小鼠骨髓移植和药物处理 45 d 后取骨髓细胞行体内实验). 培养分为两组: A 组加 MTX 及 Ara-C, Ara-C 与 MTX 的终浓度分别为 20 nmol/L 及 500 nmol/L; B 组为对照组, 不加药物. 每组共 6 mL 培养液含骨髓细胞  $3 \times 10^6$ , 平分为 3 个平皿进行培养, 培养液为 IMDM, 含 10 g/L 甲基纤维素, 100 mL/L 胎牛血清, 150 g/L WEHI 条件培养液(小鼠造血增生因子), 10 g/L 碳酸氢钠, 10 g/L 丙酮酸钠, 10 g/L 必需与非必需氨基酸, 5 g/L 多种维生素及 10 万单位/L 青链霉素等, 胎牛血清在加入混合培养液前经用 1 mg/L 胸苷酸磷酸酶 37℃ 1 h 处理, 以减少细胞外磷酸腺苷水平以至减少集落本底的产生. 培养皿置含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 37℃ 培养箱 7-10 d 后计数集落, 进行结果分析. 取经基因转染及药物处理后小鼠骨髓细胞, 按饱和氯化钠法提取 DNA. 50 μL 的 PCR 反应体系终浓度为 0.125 mmol/L dNTPs. 两种引物 0.5 μmol/L, 0.05 MU/L Taq DNA 聚合酶, 模板 DNA 150 ng. PCR 扩增条件是: 94℃ 变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 40 循环之后 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物在 0.8 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳, 照像分析. 检测该试验耐药基因 SFG-F/S-CD 的引物序列两端设计为: 5'-ACTTT GAAAGTGACACGTTT-3' 5'-GCCAACTCTCTCATGACTTG C-3' 扩增结果分别为 498 bp.

**统计学处理** 生存分析应用 Log Rank 检验(SPSS10.0 统计软件), 计数资料行  $\chi^2$  检验, 计量资料经 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 小鼠骨髓对 MTX 和 Ara-C 的耐受性** 小鼠注射 MTX 和 Ara-C 后, 转染耐药基因的动物与对照相比, 动物存活率明显提高、体质量、白细胞和血小板恢复较快.

**2.1.1 转染耐药基因后 F/S-CD 组小鼠在大剂量 MTX 和 Ara-C 处理后 45 d 存活率达 67%(4/6), 对照组无存活, 经 Log Rank 检验(SPSS10.0 统计软件)  $\chi^2=7.42$ ,  $P<0.01$ . 小鼠注射 MTX 和 Ara-C 后, 体质量、白细胞和血小板均开始下降, F/S-CD 组小鼠血象、体质量下降幅度较小而恢复较快, 45 d 体质量、白细胞和血小板均恢复正常(图 2-4).**

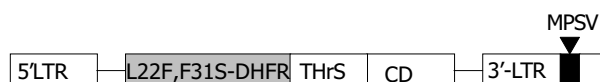


图1 SFG-F/S-CD 反转录病毒载体的构建。

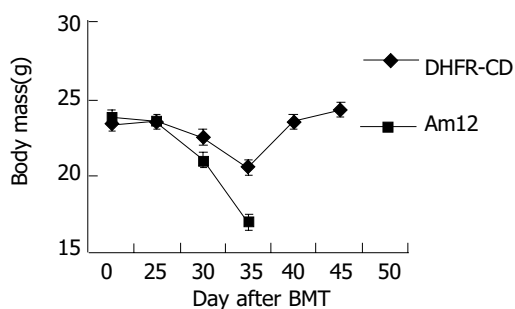


图2 两组动物药物处理后体质量变化情况. 药物处理后 AM12 组与 F/S-CD 组体质量比较: 30 d,  $t = 3.82$ ,  $P < 0.01$ ; 35 d,  $t = 5.92$ ,  $P < 0.001$ .

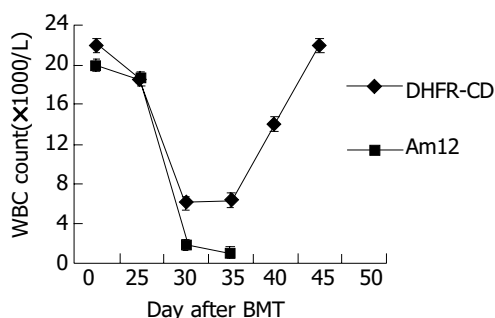


图3 各组动物药物处理后白细胞变化情况. 药物处理后 AM12 组与 F/S-CD 组 WBC 比较: 30 d,  $t = 130.64$ ,  $P < 0.001$ ; 35 d,  $t = 168.56$ ,  $P < 0.001$

2.2 转染基因在小鼠骨髓细胞中的表达 骨髓移植前供体的骨髓细胞和骨髓移植后受体的骨髓细胞含有耐药基因组均有耐药克隆的形成(表1). 骨髓移植前对照组注射终浓度为20 nmol/L和500 nmol/L 的MTX和Ara-C后, 对两种药物的耐药克隆分别为9%和0, 含双耐药基因 F/S-CD 组为56%和22%;若两药同时加入两组耐药克隆分别为0和14%, 说明无耐药基因对两种药物的加入无耐药性, 而具有双耐药基因组则有一定程度的耐受性. 骨髓移植及化疗药物筛选后转染耐药基因组耐药克隆形成略有增加, 对照组分别为7%和0, F/S-CD组为60%和26%;两药同时加入两组耐药克隆分别为0和20%. 转基因小鼠骨髓细胞提取的DNA, 经PCR检测, 显示有F/S-CD基因条带, 说明动物耐药基因转染已得到分子生物学表达(图5).

表1 小鼠骨髓细胞骨髓移植前后耐药克隆形成(CFU-GM)

分组	总克隆数		耐 Ara-C+MTX克隆	
	骨髓移植前	骨髓移植后	骨髓移植前(体外)	骨髓移植后(体内)
AM12	278	230	0	0
F/S-CD	318	281	45(14%) <sup>b</sup>	56(20%) <sup>d</sup>

$\chi^2=42.55$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs AM12;  $\chi^2=44.26$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs AM12.

### 3 讨论

如何提高骨髓造血细胞对化疗的耐受性, 一直是近

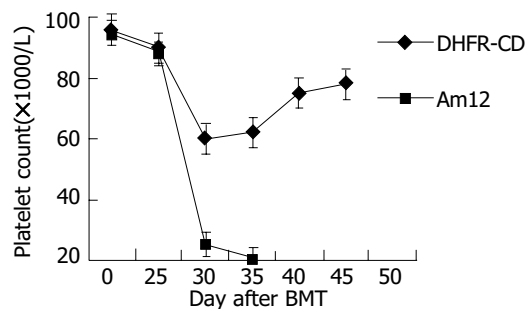


图4 各组动物药物处理后血小板变化情况. 药物处理后 AM12 组与 F/S-CD 组血小板比较: 30 d,  $t = 19.56$ ,  $P < 0.001$ ; 35 d,  $t = 27.71$ ,  $P < 0.001$

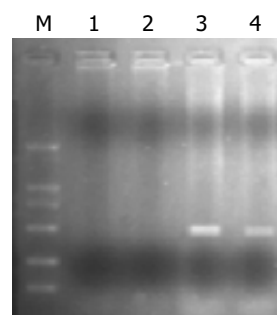


图5 小鼠骨髓细胞 DNA PCR 产物琼脂糖电泳结果. M: Marker DL2000; 1, 2: 对照组; 3, 4: 转染耐药基因 DHFR-CD 组显示 498 bp 条带.

年来人们所关注的焦点. 多药耐药基因(multiple drug resistance, MDR)是人们最早关注的肿瘤药物耐药基因<sup>[2]</sup>. 应用多药耐药基因(MDR1)转染保护骨髓造血细胞的基因治疗项目已进入临床试验阶段. 一些化疗药物耐药基因, 在体外及小鼠研究中证实对正常细胞具有化疗保护作用<sup>[3]</sup>. 理想的耐药基因应具备以下条件<sup>[4]</sup>: (1)提供多种药物耐药而非单一药物; (2)无免疫原性; (3)治疗基因片段较小; (4)该耐药基因耐特异药不宜毒性过大, 如一些学者认为MGMT和ALDH基因作用的烷化剂等化疗药物毒性过大<sup>[5]</sup>; (5)基因转染无突变及癌变产生. 近年来的实验研究证实, 二氢叶酸还原酶基因(dihydrofolate reductase, DHFR)<sup>[6-7]</sup>及胞苷脱氨酶基因(cytidine deaminase, CD)<sup>[8]</sup>基本具备上述条件.

骨髓造血干细胞具有自我更新及定向分化的能力而成为基因治疗的理想靶细胞<sup>[9]</sup>. 耐药基因转导入正常造血干细胞是肿瘤基因治疗的一种策略. 逆转录病毒载体能实现在基因组内插入整合, 而成为造血干细胞基因导入的首选载体. 目前近70%的临床基因治疗试验均由逆转录病毒介导, 本实验用逆转录病毒转染小鼠骨髓细胞耐药克隆达20%.

双耐药基因导入造血干细胞为消除联合化疗导致的骨髓抑制提供了可能性, 较单耐药基因的转导更有意义. 我们用逆转录病毒载体将双耐药基因转导深入到动物实验水平, 进一步研究了dmDHFR-CD耐药基因转染后对小鼠造血功能的保护作用. 结果表明转

基因小鼠骨髓对 MTX 和 Ara-C 的耐受明显增加, 实验组血象逐渐恢复, 而对照组造血则被抑制; 实验组小鼠体质量和生存期明显高于对照组. PCR 分析, 转导后的小鼠骨髓细胞具有双耐药基因表达. 本研究证实逆转病毒载体确能将两个外源耐药基因导入小鼠造血干细胞并同时表达产生药物抗性, 为进一步的耐药基因保护治疗动物实验打下了基础, 为临床超剂量化疗以求最大限度杀伤肿瘤细胞并能多次重复化疗提供了一个较好的动物模型, 可能为提高肿瘤的化疗疗效提供有用的参考资料. 但如何选择更合适或更多的耐药基因联合转导, 耐药基因导入造血干细胞后是否能长期稳定表达, 以及对靶细胞的生理功能有何影响等问题均有待于进一步的研究.

#### 4 参考文献

- 1 Takebe N, Zhao SC, Ural AU, Johnson MR, Banerjee D, Diasio RB, Bertino JR. Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34<sup>+</sup>-enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Ther* 2001;8:966-973
- 2 Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, Gottesman M, Pastan I, Cline A, Nienhuis AW. Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 1992;257:99-103
- 3 Capiaux GM, Budak-Alpdogan T, Takebe N, Mayer-Kuckuk P, Banerjee D, Maley F, Bertino JR. Retroviral transduction of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase fusion gene into murine marrow cells confers resistance to both methotrexate and 5-fluorouracil. *Hum Gene Ther* 2003;14:435-446
- 4 Eliopoulos N, Al-Khaldi A, Beausejour CM, Momparler RL, Momparler LF, Galipeau J. Human cytidine deaminase as an ex vivo drug selectable marker in gene-modified primary bone marrow stromal cells. *Gene Ther* 2002;9:452-462
- 5 Beausejour CM, Eliopoulos N, Momparler L, Le NL, Momparler RL. Selection of drug-resistant transduced cells with cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene. *Cancer Gene Ther* 2001;8:669-676
- 6 Asai S, Miyachi H, Kobayashi H, Takemura Y, Ando Y. Large diversity in transport-mediated methotrexate resistance in human leukemia cell line CCRF-CEM established in a high concentration of leucovorin. *Cancer Sci* 2003;94:210-214
- 7 Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capiaux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R, Bertino JR. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587:164-173
- 8 Sweeney CL, Frandsen JL, Verfaillie CM, McIvor RS. Trimetrexate inhibits progression of the murine 32Dp210 model of chronic myeloid leukemia in animals expressing drug-resistant dihydrofolate reductase. *Cancer Res* 2003;63:1304-1310
- 9 张艳丽, 杨克恭, 陈松森. 造血干细胞基因治疗研究进展. *生命的化学* 2002;22:253-544

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

### 世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

**本刊讯** 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《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, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊, 2003 年度中国百种杰出学术期刊. 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. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1, 15 日出版, 24 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

# 黏附素保守区疫苗防治鼠幽门螺杆菌感染

白 杨, 梁燕玲, 刘秀丽, 施 理, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历

白杨, 梁燕玲, 施理, 王继德, 周殿元, 张亚历, 南方医科大学南方医院  
全军消化病研究所 广东省广州市 510515  
刘秀丽, 张兆山, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071  
白杨, 男, 1973-10-30 生, 山西太原人, 汉族, 2002 年第一军医大学博士研  
究生毕业, 主治医师, 讲师, 主要从事消化系统疾病的基础与临床研究  
国家自然科学基金资助项目, No. 30170890, No. 30270078  
“863” 计划专题资助项目, No. 102-07-03-06  
军队“十五” 医药卫生科研课题资助项目, No. OIMA-132  
项目负责人: 张亚历, 510515, 广东省广州市广州大道北 1838 号, 南方医科  
大学南方医院全军消化病研究所. Baiyang1030@hotmail.com  
电话: 020-61641531  
收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-01-08

## Prevention and treatment of *Helicobacter pylori* infection with adhesin conservatory region vaccine: an animal model study

Yang Bai, Yan-lin Liang, Xiu-Li Liu, Li Shi, Ji-De Wang, Zhao-Shan Zhang, Dian-Yuan Zhou, Ya-Li Zhang

Yang Bai, Yan-Lin Liang, Li Shi, Ji-De Wang, Dian-Yuan Zhou, Ya-Li Zhang, PLA Institute for Digestive Medicine, Nan Fang Hospital, Nan Fang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
Xiu-Li Liu, Zhao-Shan Zhang, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30170890, No. 30270078, State “863” Program of China, No. 102-07-03-06; and the Tenth Five-year Plan for Medical Science Development of the Army, No. OIMA-132  
Correspondence to: Professor Ya-Li Zhang, Chinese PLA Institute for Digestive Medicine, Nan Fang Hospital, Nan Fang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. Baiyang1030@hotmail.com  
Received: 2004-12-10 Accepted: 2005-01-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) adhesin conservatory region vaccine in the prevention and treatment of *H pylori* infection in a mouse model.

**METHODS:** The study was divided into two parts. In the first part, the specific germ free C57BL/6 mice were orally immunized with vaccine (100 µg) plus cholera toxin (CT) (2 µg), vaccine (100 µg), CT(2 µg), or PBS once a week for four weeks. Two weeks after the last immunization, all animals were challenged by live *H pylori*, and were sacrificed 4 weeks after the challenge. In the second part, *H pylori* infected mice were treated in the same way as in the first part. Four weeks after the last treatment, all animals were sacrificed, and the stomach biopsies were collected to detect *H pylori* by the semi-quantitative bacterial culture assay.

**RESULTS:** The prophylactic rate from *H pylori* infection was 61.5% (16/26) in the mice immunized with vaccine plus CT. The eradication rate of the vaccine plus CT group was 38.5% (10/26). No protective or therapeutic effect was observed in all other 3 groups. The *H pylori* colony density in the vaccine plus CT group was significantly lower than those in other three groups in the second part of experiment ( $P<0.05$ ).

**CONCLUSION:** The vaccine consisting of adhesin conservatory region and adjuvant is not only effective in the prevention, but also in the treatment of *H pylori* infection.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Adhesin; Conservatory region; Vaccine

Bai Y, Liang YL, Liu XL, Shi L, Wang JD, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Prevention and treatment of *Helicobacter pylori* infection with adhesin conservatory region vaccine: an animal model study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):468-471

## 摘要

**目的:** 利用人类幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的小鼠模型研究黏附素保守区(AB)疫苗在预防与治疗 *H pylori* 感染的作用。

**方法:** 实验分为预防与治疗两部分. 预防部分把实验动物无特定致病菌 C57BL/6 小白鼠分成 4 组, 分别通过灌胃方法给予 AB(100 µg)加 CT(2 µg)、生理盐水、单纯 AB(100 µg)、单纯 CT(2 µg), 1 次 /wk, 共 4 次. 2 wk 后再用活 *H pylori* 灌胃, 再 4 wk 后处死动物. 治疗部分把已感染 *H pylori* 的小白鼠分成 4 组, 分组与治疗部分同预防部分, 治疗结束后 4 wk 处死动物, 取胃黏膜行半定量细菌培养检查 *H pylori* 情况。

**结果:** 预防实验的保护率分别为 AB 加 CT 61.5%(16/26), 单纯 AB、单纯 CT 和 PBS 保护率均为 0. AB 加 CT 治疗组 *H pylori* 根除率为 38.5%(10/26), 生理盐水组、单纯 AB、单纯 CT 组均无治疗作用. 治疗组未根除 *H pylori* 的小鼠, 疫苗组 *H pylori* 的定植密度明显低于其他 4 组 ( $P<0.05$ ).

**结论:** 由 AB 加免疫佐剂组成的口服疫苗, 不仅有预防 *H pylori* 感染的作用, 同时也有根除已感染的 *H pylori* 的作用. AB 可用于 *H pylori* 疫苗的研制。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 黏附素; 保守区; 疫苗



白杨,梁燕玲,刘秀丽,施理,王继德,张兆山,周殿元,张亚历.黏附素保守区疫苗防治幽门螺杆菌感染.世界华人消化杂志 2005;13(4):468-471  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/468.asp

## 0 引言

我们已构建了幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)黏附素保守区AB的高效原核表达体系<sup>[1-2]</sup>,表达产物经过纯化后已在体外探讨了其安全性、免疫原性和生物活性<sup>[3-4]</sup>.现利用*H. pylori*感染的小鼠模型研究黏附素保守区(AB)疫苗在预防与治疗*H. pylori*感染的作用,为黏附素源*H. pylori*疫苗的研制奠定基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 幽门螺杆菌 ss1 株为本所保存,无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)C57BL/6 雄性小鼠 140 只,4 周龄,12-13 g,饲养条件符合 2 级动物要求.重组黏附素保守区 rAB,快速尿素酶试剂由本所制备;其余试剂为国产分析纯.

1.1.1 *H. pylori* 的培养与鉴定 *H. pylori* 的固体培养:取冷冻保存的 *H. pylori* 菌种一环于固体培养基上连续划线接种,2 h 内置厌氧培养箱,37℃微需氧环境(50 mL/L O<sub>2</sub>, 100 mL/L CO<sub>2</sub>, 850 mL/L N<sub>2</sub>)中培养 72 h,湿度保持 95% 以上.*H. pylori* 的菌落呈圆形,凸起、光滑、灰白色、半透明,直径 0.2-0.8 mm.液体培养:取固体培养基上生长的 *H. pylori* 菌落至布氏肉汤中,抽滤瓶抽气换气 2 次以满足微需氧条件,恒温振荡培养 120 r/min 培养 48-72 h.*H. pylori* 的鉴定包括菌落形态、涂片观察(包括革兰染色观察细菌形态、暗视野观察细菌活力)、尿素酶实验(将自制尿素酶试剂加入含鼠胃组织的 96 孔板各孔中,37℃作用 5 min,当有 *H. pylori* 感染时试剂由黄色变为红色).灌胃用 *H. pylori* 的要求:革兰染色阴性,形态呈 S 形、螺旋形、杆状,暗视野下有活力,不含杂菌,密度约为 10<sup>12</sup>/L.

1.1.2 *H. pylori* 感染小鼠模型的建立 采用文献[5]方法驯化 *H. pylori* ss1 株,分离可在小鼠胃内稳定定植的 *H. pylori* ss1 株,固体培养 2-3 d,菌落经鉴定后用布氏肉汤洗下,调整细菌浓度至 10<sup>12</sup>CFU/L,每只小鼠灌胃 0.5 mL(约 10<sup>12</sup>/L).所有动物灌胃前禁食 12 h,禁水 4 h.灌胃后禁食 2 h.连续 5 次,1 wk 完成.采用胃管法以确保 *H. pylori* 灌入胃内.末次灌胃后 4 wk 随机处死 5 只小鼠,剖腹取胃,沿纵轴将胃切为三部分,一份行快速尿素酶试验,一份置 40 g/L 甲醛固定供组织学检查,一份细菌培养,检查是否感染 *H. pylori*.经尿素酶实验、组织病理学检查(图 1)及细菌培养证实全部感染 *H. pylori*.细菌培养发现

*H. pylori* 的定植密度为 10<sup>5-6</sup>/g.

## 1.2 方法

1.2.1 免疫预防实验 共设 4 组.单价黏附素保守区疫苗组经口喂饲黏附素保守区 100 μg 加 CT2 μg;单纯黏附素保守区组经口喂饲黏附素保守区 100 μg;单纯 CT 组经口喂饲 CT2 μg;PBS 组经口喂饲 PBS 200 μL.免疫前小鼠禁食 12 h,禁水 4 h.每只小鼠先用 30 g/L 的碳酸氢钠 100 μL 灌胃以中和胃酸,10 min 后分别按上述分组灌胃,30 min 后再给小鼠提供水和食物.隔周免疫,加强免疫 3 次,剂量同前.末次接种后 2 wk 按前述方法接种 *H. pylori* SS1.末次接种 *H. pylori* SS1 后 4 wk 处死动物,去除前胃,余胃黏膜行半定量细菌培养法检查.

1.2.2 免疫治疗实验 将前述已鉴定感染 *H. pylori* 的小鼠分成 4 组.分组、治疗剂量与方法同免疫预防实验,1 次/wk,共 4 次.治疗结束后 4 wk 处理动物,取材方法同上.免疫预防和治疗后幽门螺杆菌根除的鉴定采用半定量细菌培养法<sup>[6]</sup>.

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件,行  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为有显著性差异.

## 2 结果

2.1 免疫预防效果 胃组织培养 *H. pylori* 为阴性者定为完全保护.黏附素保守区疫苗组的保护率为 61.5% (16/26),其他 3 组保护率均为 0%,其差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ).

2.2 免疫治疗效果 胃组织培养 *H. pylori* 为阴性者定为根除.黏附素保守区疫苗组根的根除率为 38.50 mL/L,显著高于其他 3 组 (0%, 0%, 0%,  $P < 0.05$ ).未根除 *H. pylori* 的小鼠,我们进行了 *H. pylori* 定植密度的分析,结果发现疫苗治疗组 *H. pylori* 的定植密度明显

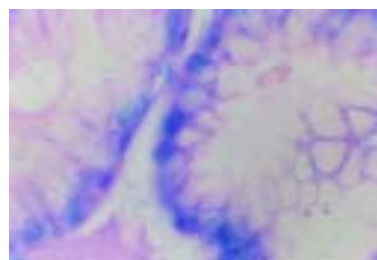


图1 感染 *H. pylori* 小鼠的胃黏膜.

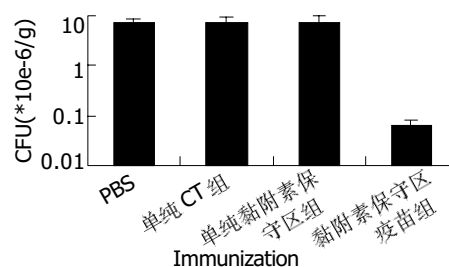


图2 菌落计数法评价免疫治疗后小鼠胃黏膜 *H. pylori* 的定植情况.

低于其他3组(图2),其差异有显著性( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

广泛用于临床根除 *H pylori* 的手段是抗菌治疗有一定的疗效<sup>[7-9]</sup>,但所需的费用是一项沉重的医疗负担.因此,世界各国政府和企业为 *H pylori* 的防治研究,特别是为既有治疗又有预防作用的 *H pylori* 疫苗的研制投入了大量经费.因为谁率先研制出 *H pylori* 疫苗,谁就将抢先占领治疗 *H pylori* 感染所面对的数百亿的市场.除了上述可观的经济效益,还会有预防数以亿计的消化性溃疡、MALT 淋巴瘤及胃腺癌发生所带来的巨大的社会效益.目前国内外已有全菌超声抗原和以尿素酶 B、过氧化氢酶等为主的多种基因重组抗原作为疫苗候选抗原<sup>[10-12]</sup>.但前者由于成分复杂、具有潜在毒副作用而渐遭淘汰;后者尽管大多已被现有资料证明是有效的疫苗抗原,但单独使用作为疫苗是不够的.因此,必须寻找其他有效抗原成分或研制多价疫苗防治 *H pylori* 感染.目前采用的基因重组抗原基本上着眼于阻断 *H pylori* 的毒力因素,而与 *H pylori* 定植密切相关的黏附素评价较少.如从黏附素出发寻找保护性抗原也许是一种有益的尝试.目前文献报道的 *H pylori* 黏附素较多,其中已经证实的有四种<sup>[13-15]</sup>,包括迄今为止唯一明确受体的 *H pylori* 黏附素 BabA,和经体外黏附及其相应抗体的抑制实验证明的黏附素 AlpA、AlpB 和 HopZ;然而这四种黏附素并不是存在于所有菌株中,如 BabA 存在于 CagA 致病岛阳性的菌株中,而且他们在不同的菌株中存在一定程度的变异,因此究竟选取哪种或哪些黏附素一直是困扰我们的问题.我们以前通过对4种黏附素进行同源性分析,发现了保守区,并对其进行克隆、表达、纯化和鉴定.在此基础上,评价了针对 *H pylori* 黏附因素的黏附素保守区构成疫苗的预防和治疗效果.动物实验表明,单价黏附素保守区疫苗的 *H pylori* 的完全保护率和根除率分别为 61.50 mL/L 和 38.50 mL/L,其中治疗组即使未根除的小鼠,其 *H pylori* 定植密度也有明显的降低( $P < 0.05$ ),表明黏附素保守区可用于 *H pylori* 疫苗候选抗原.这一候选抗原的研制既是对寻找针对 *H pylori* 黏附因素有效抗原的探索,又为研制针对 *H pylori* 多种因素的多价疫苗奠定了基础.

在 *H pylori* 保护率和根除率的研究中,我们采用了细菌培养结果作为唯一的评价标准,而不是常用的尿素酶实验和组织病理学检查结果,这也可能是本研究保护率和根除率较其他报道低的缘故.因为在建立 *H pylori* 感染小鼠模型的预实验中,我们发现接种 *H pylori* 1 wk 后的部分小鼠,细菌培养阳

性,而尿素酶实验和组织病理学检测结果阴性.是否细菌培养的敏感性高于尿素酶实验和组织病理学检测呢?张振华 *et al* 发现尿素酶实验形成阳性需要的细菌浓度是细菌培养阳性的 100-1 000 倍;并且由于试剂、技术以及胃内存在着产尿素酶杂菌的原因,与细菌培养相比,其还存在着较高的假阳性.组织病理学检查也存在着上述问题,特别是在 *H pylori* 量较少时,仅凭形态特征与胃内可能出现的成百上千种其他杂菌区别是非常困难的,甚至是不可能的.所以,作者认为,就敏感性与特异性而言,金标准只有一个,就是细菌培养.国外学者也研究了各种评价 *H pylori* 定植方法的敏感性<sup>[16-21]</sup>,结果表明,尿素酶实验和组织学检查显示的9只细菌阴性的免疫小鼠,细菌培养检测均呈阳性.尿素酶试验的敏感性与组织学检测相同,其敏感性大约是每克胃组织  $10^5$  细菌;细菌培养的敏感性高于尿素酶实验和组织病理学检测.因此,我们选用细菌培养作为评价 *H pylori* 定植的唯一标准.我们仅是对 *H pylori* 黏附素源疫苗的初步尝试,未来 *H pylori* 疫苗可能是针对 *H pylori* 多种因素<sup>[22-29]</sup>,包括过氧化氢酶、尿素酶 B 亚单位、黏附素保守区等构成的多价疫苗,有关这方面的研究,我们的实验正在进行中.

### 4 参考文献

- 1 白杨,张亚历,王继德,林焕健,张兆山,周殿元.幽门螺杆菌4种黏附素基因保守区的克隆、序列及其生物信息学分析.第一军医大学学报 2002;22:869-871
- 2 白杨,但汉雷,王继德,张兆山, Odenbreit S, 周殿元, 张亚历.幽门螺杆菌 AlpA 基因中四种黏附素基因保守区的克隆、表达、纯化及鉴定.生物化学与生物物理进展 2002;29:922-926
- 3 白杨,张亚历,王继德,张兆山,周殿元.幽门螺杆菌黏附素基因保守区的克隆及免疫原性研究.中华医学杂志 2003;83:736-739
- 4 白杨,张亚历,陈烨,王继德,周殿元.幽门螺杆菌黏附素保守区蛋白的免疫原性、安全性和黏附作用的体外评价.生物化学与生物物理进展 2003;30:422-426
- 5 Marchetti M, Arico B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. Science 1995;267:1655-1658
- 6 Sutton P, Danon SJ, Walker M, Thompson LJ, Wilson J, Kosaka T, Lee A. Post-immunisation gastritis and *Helicobacter* infection in the mouse: a long term study. Gut 2001;49:467-473
- 7 史彤,刘文忠,萧树东,徐蔚文.上海地区幽门螺杆菌对抗生素耐药率的变迁史彤.中华内科杂志 2000;39:576
- 8 郑松柏,项平,徐富星,顾同进.四种短程三联疗法根除幽门螺杆菌的随机对照临床研究.中华内科杂志 1999;38:117
- 9 梁晓,陆红,刘文忠,徐蔚文,萧树东.3种幽门螺杆菌根除方案和抗生素耐药对其根除率的影响.胃肠病学 2003;8:340-343
- 10 Lin HJ, Xue J, Bai Y, Wang JD, Zhang YL, Zhou DY. Pathogenicity and immune prophylaxis of cag pathogenicity island gene knockout homogenic mutants. World J Gastroenterol 2004;10:3289-3291
- 11 Bai Y, Li LR, Wang JD, Chen Y, Jin JF, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Expression of *Helicobacter pylori* Hsp60 protein and its immunogenicity. World J Gastroenterol 2003;9:2711-2714
- 12 Bai Y, Zhang YL, Jin JF, Wang JD, Zhang ZS, Zhou DY. Recombinant *Helicobacter pylori* catalase. World J Gastroenterol 2003;9:1119-1122

- 13 白杨, 唱韶红, 王继德, 陈烨, 张兆山, 张亚历. 表达幽门螺杆菌黏附素 BabA 重组蛋白菌株的构建及其黏附活性评价. 第一军医大学学报 2003;23:293-295
- 14 白杨, 张亚历, 王继德, 杨云生, 张兆山, 周殿元. 幽门螺杆菌黏附素 AlpA 基因的克隆及高效表达. 第四军医大学学报 2002;23:1490-1492
- 15 Bai Y, Zhang YL, Wang JD, Zhang ZS, Zhou DY. Construction of attenuated *Salmonella typhimurium* Strain expressing *Helicobacter pylori* conservative region of adhesin antigen and its immunogenicity. *World J Gastroenterol* 2004;10:2498-2502
- 16 Graham DY, Kudo M, Reddy R, Opekun AR. Practical rapid, minimally invasive, reliable nonendoscopic method to obtain *Helicobacter pylori* for culture. *Helicobacter* 2005;10:1-3
- 17 Lee A. Animal models for host-pathogen interaction studies. *Br Med Bull* 1998;54:163-173
- 18 Panthel K, Faller G, Haas R. Colonization of C57BL/6J and BALB/c wild-type and knockout mice with *Helicobacter pylori*: effect of vaccination and implications for innate and acquired immunity. *Infect Immun* 2003;71:794-800
- 19 Lucas B, Bumann D, Walduck A, Koesling J, Develioglou L, Meyer TF, Aebischer T. Adoptive transfer of CD4+ T cells specific for subunit A of *Helicobacter pylori* urease reduces *H pylori* stomach colonization in mice in the absence of interleukin-4(IL-4)/IL-13 receptor signaling. *Infect Immun* 2001;69:1714-1721
- 20 Sutton P, Wilson J, Lee A. Further development of the *Helicobacter pylori* mouse vaccination model. *Vaccine* 2000;18:2677-2685
- 21 Del Giudice G, Ghiara P, Rappuoli R. Experimental model of *Helicobacter pylori* infection. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30(Suppl 3):S261-S263
- 22 Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-urease immunoglobulins on *Helicobacter pylori* infection in mongolian gerbils. *Helicobacter* 2005;10:43-52
- 23 Gottwein JM, Blanchard TG, Targoni OS, Eisenberg JC, Zagorski BM, Redline RW, Nedrud JG, Tary-Lehmann M, Lehmann PV, Czinn SJ. Protective anti-*Helicobacter* immunity is induced with aluminum hydroxide or complete Freund's adjuvant by systemic immunization. *J Infect Dis* 2001;184:308-314
- 24 Ozpolat B, Rao XM, Lachman LB, Osato MS, Graham DY. Quantitative and bioluminescent assay to measure efficacy of conventional and DNA vaccinations against *Helicobacter pylori*. *Comb Chem High Throughput Screen* 2000;3:289-302
- 25 林焕建, 王继德, 白杨, 张亚历, 周殿元. 幽门螺杆菌表面抗原免疫保护作用的体外与活体研究. 中国微生态学杂志 2003;15:4-6
- 26 Messina GA, Torriero AA, De Vito IE, Olsina RA, Raba J. Continuous-flow/stopped-flow system using an immunobiosensor for quantification of human serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori*. *Anal Biochem* 2005;337:195-202
- 27 Calvet X. *Helicobacter pylori* eradication treatment in non-ulcerous disease. *Gastroenterol Hepatol* 2005;28:40-46
- 28 Veneri D, Franchini M. Onset of idiopathic thrombocytopenia after *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* 2005;10:95
- 29 Pearce MS, Steele JG, Campbell DI, Thomas JE. Tooth Loss and *Helicobacter pylori* Seropositivity: the Newcastle Thousand Families Cohort Study at Age 49-51 Years. *Helicobacter* 2005;10:90-94

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第一届全球华人消化内镜学术大会征文通知

本刊讯 2005-10-14/2005-10-16将在上海隆重召开由中华消化内镜学会主办、第二军医大学承办的第一届全球华人消化内镜学术大会。大会的官方语言为中文和英文，现将会以征文有关事项通知如下：

### 1 会议内容

有关消化内镜基础和临床应用研究相关内容：包括上消化道内镜、大肠镜、超声内镜、小肠镜、胶囊内镜、ERCP 的诊断与治疗各个领域。

### 2 征文要求

(1)所投论文须为尚未在国内外相关领域杂志刊出或尚未被其他国际或国内学术会议收录的摘要。(2)凡报送的论文要求中英文摘要(中文摘要1000字以内)各一份，英文摘要的格式及具体要求请参考大会论文摘要投稿须知。此外从大会的官方网站 <http://www.csde.org.cn/wcge/> 直接下载论文摘要表。(3)摘要的内容可以电子邮件的形式发至WCGE2005秘书处收；也可以直接邮寄打印稿寄3.5寸软盘。(4)所有被大会接受的论文摘要都将被收入大会论文集。(5)截稿日期：2005-05-31。(6)大会秘书处的联系方式：北京市东四西大街42号中华医学会学术会务部 刘亚君；邮编：100710，电话：010-65251575。

# 小檗碱、吴茱萸碱和靛玉红对人胃癌细胞的作用比较

谭宇蕙, 陈蔚文, 吴映雅, 陈冠林, 李茹柳

谭宇蕙, 吴映雅, 广州中医药大学生化教研室 广东省广州市 510405  
陈蔚文, 陈冠林, 李茹柳, 广州中医药大学脾胃研究所  
广东省广州市 510405

谭宇蕙, 女, 1966-04-22 生, 广东省恩平市人, 汉族, 1991 年中山大学分子生物学硕士毕业, 2002 年广州中医药大学中西医结合专业博士, 副教授, 生化教研室主任, 主要从事中西医结合分子肿瘤学研究。

国家中医药管理局科学技术研究基金资助项目, No. 97Y031

项目负责人: 谭宇蕙, 510405, 广东省广州市机场路 12 号, 广州中医药大学生化教研室. tyuhui@Tom.com

电话: 020-36585454

收稿日期: 2004-11-29 接受日期: 2004-12-28

## Effects of berberine, evodiamine and indirubin on gastric cancer cell

Yu-Hui Tan, Wei-Wen Chen, Ying-Ya Wu, Guan-Lin Chen, Ru-Liu Li

Yu-Hui Tan, Ying-Ya Wu, Biochemistry Department, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Wei-Wen Chen, Guan-Lin Chen, Ru-Liu Li, Piwei Institute, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Supported by the Science and Technique Foundation of State Administration of Traditional Chinese Medicine, No.97Y031

Correspondence to: Yu-Hui Tan, Guangzhou University of TCM, 12 Jichang Road, Guangzhou, 510405, Guangdong Province, China. tyuhui@Tom.com.

Received: 2004-11-29 Accepted: 2004-12-28

## Abstract

**AIM:** To explore the effects of berberine, evodiamine and indirubin, the major constituents of Chinese medicinal herbs Coptis, evodia fruit and natural indigo, respectively, on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cells.

**METHODS:** Human gastric cancer cell line MGC803 was derived from low differentiated mucous adenocarcinoma. Berberine, evodiamine and indirubin were purchased from National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products. Cell viability and apoptosis were determined by trypan blue exclusion assay. Cell cycle distribution and the percentage of apoptosis were determined by flow cytometry. The apoptosis morphology was observed through methyl green and pyronin staining. Nucleosomal DNA fragmentation was assayed by agarose gel electrophoresis.

**RESULTS:** The cell viability was decreasing continuously during 96 h treatment with berberine and evodiamine. At 48 h, the viability was 100% in control group, while the viability in 4 mg/L and 8 mg/L berberine groups were

72.9±6.2% ( $t = 4.67$ ,  $P < 0.01$ ) and 17.4±4.8% ( $t = 15.48$ ,  $P < 0.001$ ), respectively. The viability in 1 mg/L and 5 mg/L groups evodiamine were 37.8±5.7% ( $t = 11.06$ ,  $P < 0.001$ ) and 10.7±11.1% ( $t = 11.35$ ,  $P < 0.001$ ). The inhibition effects were dose- and time-dependent. MGC-803 cells showed typical apoptosis morphology when stained by methyl green and pyronin. High proportion of trypan blue and phenol red excluding apoptotic cells with integrate membrane were observed in the suspending dead cells in berberine and evodiamine groups. At 48 h, the apoptosis cell ratios were 0.3±0.0% in the control group, 65.2±9.5% ( $t = 11.83$ ,  $P < 0.001$ ) in 8 mg/L berberine group, and 58.9±11.4% ( $t = 8.90$ ,  $P < 0.001$ ) in 1 mg/L evodiamine group. No such cells were observed in adriamycin group. Flow cytometry analysis indicated that the apoptotic cell death induced by berberine or evodiamine was accompanied with cell cycle arrest in the G0/G1 or G2 phase, respectively. Both exhibited a sub-diploid apoptotic peak. The percentages of apoptosis were 11.8±1.5 % in control group, 18.9±2.7% ( $t = 3.34$ ,  $P < 0.05$ ) at 48 h, 23.9±3.3 % ( $t = 5.06$ ,  $P < 0.01$ ) at 72 h in 4 mg/L berberine group, and 16.6±1.6 % ( $t = 2.80$ ,  $P < 0.05$ ) at 72 h in 1 mg/L evodiamine group. Agarose gel electrophoresis assay showed that the MGC-803 cell DNA was degraded into large fragments when treated with berberine, and smear fragments when treated with evodiamine and adriamycin. At the given concentration, indirubin had no effect on MGC-803.

**CONCLUSION:** Berberine and evodiamine induce apoptotic cell death of MGC-803 gastric cancer cells. The effects are milder than adriamycin. Indirubin has insignificant effect on MGC-803 in vitro.

**Key Words:** Berberine; Evodiamine; Indirubin; Gastric cancer

Tan YH, Chen WW, Wu YY, Chen GL, Li RL. Effects of berberine, evodiamine and indirubin on gastric cancer cell. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(4):472-476

## 摘要

**目的:** 探讨加味左金丸三种组成中药的主要单体成分小檗碱、吴茱萸碱和靛玉红对人胃癌细胞生长抑制、诱导凋亡和细胞周期的影响。

**方法:** 人胃癌细胞株为低分化黏液腺癌 MGC803 细胞;

小檗碱、吴茱萸碱和靛玉红购自中国药品与生物制品检定所. 苔盼蓝染色细胞计数法测定细胞存活率和凋亡率, 流式细胞技术进行细胞周期、凋亡百分比分析, 甲基绿-派诺宁联合染色法观测凋亡形态, 琼脂糖凝胶电泳分析DNA损伤情况.

**结果:** 96 h内小檗碱、吴茱萸碱各组细胞存活率不断下降, 其中48 h存活率对照组为 $100.0 \pm 7.9\%$ , 小檗碱4 mg/L和8 mg/L组分别为 $72.9 \pm 6.2\%$  ( $t = 4.67$ ,  $P < 0.01$ )和 $17.4 \pm 4.8\%$  ( $t = 15.48$ ,  $P < 0.001$ ), 吴茱萸碱1 mg/L和5 mg/L组分别为 $37.8 \pm 5.7\%$  ( $t = 11.06$ ,  $P < 0.001$ )和 $10.7 \pm 11.1\%$  ( $t = 11.35$ ,  $P < 0.001$ ); 各组均与对照组比较 ( $n = 3$ ); 对生长的抑制作用呈时间、药物浓度依赖性. 甲基绿-派诺宁原位染色, 细胞表现出凋亡特征. 小檗碱与吴茱萸碱组脱落的悬浮死细胞中有较高比例胞膜完整、抗拒苔盼蓝和酚红染色的凋亡细胞, 其中48 h凋亡率对照组为 $0.3 \pm 0.0\%$ , 小檗碱8 mg/L组为 $65.2 \pm 9.5\%$  ( $t = 11.83$ ,  $P < 0.001$ ); 吴茱萸碱1 mg/L组为 $58.9 \pm 11.4\%$  ( $t = 8.90$ ,  $P < 0.001$ ), 而阿霉素组脱落死细胞不能抗拒苔盼蓝和酚红染色. 流式细胞仪检测表明小檗碱与吴茱萸碱组均出现亚二倍体凋亡峰; 细胞周期分别阻滞于G0-G1、G2期; 凋亡百分比与对照组 $11.8 \pm 2.5$ 比较, 小檗碱4 mg/L组48 h为 $18.9 \pm 2.7$  ( $t = 3.34$ ,  $P < 0.05$ ), 72 h为 $23.9 \pm 3.3$  ( $t = 5.06$ ,  $P < 0.01$ ), 吴茱萸碱1 mg/L组72 h为 $16.6 \pm 1.6$  ( $t = 2.80$ ,  $P < 0.05$ ). 琼脂糖凝胶电泳表明, 小檗碱组DNA裂成大片, 吴茱萸碱组和阿霉素组DNA断裂呈涂抹状. 靛玉红各组对细胞生长、凋亡无影响, DNA无损伤.

**结论:** 小檗碱与吴茱萸碱均能诱导人胃癌细胞凋亡, 且作用较阿霉素温和; 靛玉红对胃癌细胞的体外作用不明显.

**关键词:** 小檗碱; 吴茱萸碱; 靛玉红; 胃癌

谭宇慧, 陈蔚文, 吴映雅, 陈冠林, 李苑柳. 小檗碱、吴茱萸碱和靛玉红对人胃癌细胞的作用比较. 世界华人消化杂志 2005;13(4):472-476  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/472.asp

## 0 引言

加味左金丸(连黛片)由黄连、吴茱萸和青黛组成, 临床用于治疗肝胃不和、心下痞痛等. 本方有减少MNNG诱发的大鼠胃癌以及大鼠溃疡胃癌发生率的作用<sup>[1-2]</sup>, 可抑制胃癌模型动物的癌基因 *ras*, *c-erbB2* 过表达<sup>[2]</sup>, 减少MNNG引起的 *ras* 基因甲基化点突变<sup>[3]</sup>, 黄连的主要药效成分小檗碱有诱导人胃癌细胞凋亡的作用<sup>[4]</sup>. 我们用加味左金丸的三种主要药效单体成分小檗碱、吴茱萸碱以及靛玉红(青黛的主要药效成分), 分别在体外作用于人胃癌细胞株MGC803, 并观察药物对细胞的影响. 比较、探讨他们在诱导癌细胞凋亡及对DNA损伤、细胞周期方面的不同药理效应.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胃癌细胞株为低分化黏液腺癌 MGC803 细胞, 由中山医科大学提供; RPMI1640 培养基; 胰蛋白酶、蛋白酶 K、Hepes 调节液、甲基绿、派诺宁、琼脂糖等细胞培养及分子生物学试剂为 Gibco, Sigma, Biowest 等公司的产品; 小檗碱、吴茱萸碱和靛玉红购自中国药品与生物制品检定所. 主要仪器有美国 Biorad 公司的 Gel. Doc 凝胶图像分析仪; Amersham 公司的 DNA/RNA 计算器, Coulter 公司的流式细胞仪等.

**1.2 方法** 配制完全培养液, 接种细胞<sup>[4]</sup>起始密度均为  $5 \times 10^7/L$ ; 用完全培养基在大培养瓶(100 mL)中置 50 mL/L CO<sub>2</sub>、37℃培养 24 h 后, 传代到 15 mL 小瓶中分成 11 组: 吴茱萸碱、靛玉红 500 mg/L 母液分别用超声波振荡处理成微粒直径小于 10 μm 的均匀悬浮液, 光镜下检查未见颗粒体, 用完全培养基把靛玉红稀释为 2, 10, 50 mg/L 3 个剂量组; 把吴茱萸碱稀释为 1, 5, 50 mg/L 3 个剂量组; 小檗碱用稀盐酸溶解后加超纯水配成 100 mg/L 母液, 超滤除菌, 再用完全培养基稀释至 2, 4, 8 mg/L 三个剂量组; 完全培养基为空白对照组; 20 mg/L 阿霉素为阳性对照组. 各组培养基均含等量 Hepes 调节液, Hepes 终浓度均为 15 mmol/L, 使 pH 能稳定在 7.3-7.4; 各组均设 3 个平行样本 ( $n = 3$ ), 培养 24, 48, 72, 96 h 后, 分别收集细胞进行: (1) 形态学观察. 在倒置显微镜下, 用苔盼蓝染色, 进行细胞计数, 测定细胞在不同时间、不同药物及剂量下的存活率(加药组活细胞数/对照组活细胞数×100%); (2) 用甲基绿-派诺宁染色, 观察细胞的凋亡形态<sup>[5]</sup>. (3) 分别离心收集各浓度的不同药物、不同作用时间的脱落细胞, 苔盼蓝染色细胞计数, 并按文献[5-6]方法用琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 损伤情况, 用 Gel. Doc 凝胶图像分析仪观察拍照. (4) 收集经小檗碱、吴茱萸碱作用 48 h, 72 h 后的细胞, 按文献[5-6]方法进行流式细胞仪分析.

**统计学处理** 用 *t* 检验.

## 2 结果

**2.1 细胞形态观察** 靛玉红各剂量组 96 h 内细胞生长密度及细胞形态与空白对照组没有明显差别, 均呈梭形、多角形等, 贴壁牢固, 脱落的悬浮细胞少; 而吴茱萸碱和小檗碱各组随药浓度增加细胞密度逐渐变疏, 细胞变圆、变小, 贴壁松散, 晃动易脱落, 培养液中悬浮细胞随药物浓度的增加而增多.

**2.2 凋亡形态检测** 贴壁细胞用甲基绿-派诺宁原位染色, 吴茱萸碱及小檗碱组在培养 24 h 后, 细胞表现出典型的凋亡染色特征: 核皱缩, 染色质被甲基绿染

成绿色，与派诺宁的红色混合而呈蓝黑色，并凝聚成不规则块状或断裂成碎片，但核膜仍较完整. 细胞质被派诺宁(只染RNA)染成红色，说明RNA大量合成. 高浓度组72 h均观察到部分细胞胞膜已破，细胞质不被派诺宁染色或仅染成浅红色，细胞核膨胀破碎呈绿色，这是坏死细胞的特征，是终末期凋亡细胞崩溃、坏死导致的. 阿霉素组细胞不被派诺宁染色(图1).

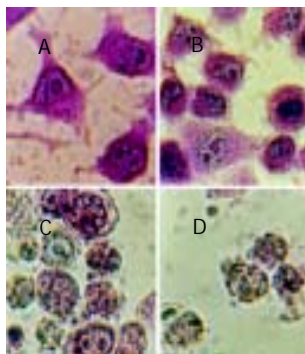


图1 细胞凋亡形态(48 h, 甲基绿-派诺宁染色)×400. A: 空白对照组; B: 小檗碱组(4 mg/L); C: 吴茱萸碱组(5 mg/L); D: 阿霉素(20 mg/L).

2.3 细胞存活率 结果显示阿霉素阳性对照组、小檗碱及吴茱萸碱的多个剂量组均可抑制MGC 803细胞的存活率，在96 h内小檗碱、吴茱萸碱各组 and 阳性对照组细胞存活率不断下降，其中48 h细胞存活率空白对照组为100.0 ± 7.9%;小檗碱4 mg/L和8 mg/L组分别为72.9 ± 6.2%( $t = 4.67$ ,  $P < 0.01$ )和17.4 ± 4.8% ( $t = 15.48$ ,  $P < 0.001$ );吴茱萸碱1 mg/L和5 mg/L组分别为37.8 ± 5.7%( $t = 11.06$ ,  $P < 0.001$ )和10.7 ± 11.1% ( $t = 11.35$ ,  $P < 0.001$ ). 72 h细胞存活率空白对照组为100.0 ± 14.3%;小檗碱4 mg/L和8 mg/L组分别为55.6 ± 6.9% ( $t = 4.84$ ,  $P < 0.01$ )和1.1 ± 0.8% ( $t = 11.96$ ,  $P < 0.001$ );吴茱萸碱1 mg/L和5 mg/L组分别为9.3 ± 2.5% ( $t = 10.82$ ,  $P < 0.001$ )和0.0 ± 0.0% ( $t = 12.11$ ,  $P < 0.001$ ). 吴茱萸碱50 mg/L组、阿霉素阳性对照组24 h已无苔盼蓝拒染的活细胞. 试药各组均与对应时间的空白对照组比较，存活率均有显著下降，而且呈作用时间、药物浓度依赖性(图2). 靛玉红各个浓度组72 h内对细胞存活率无明显

影响，仅50 mg/L组培养96 h后对细胞存活才有一定抑制但差异不明显( $P > 0.05$ ).

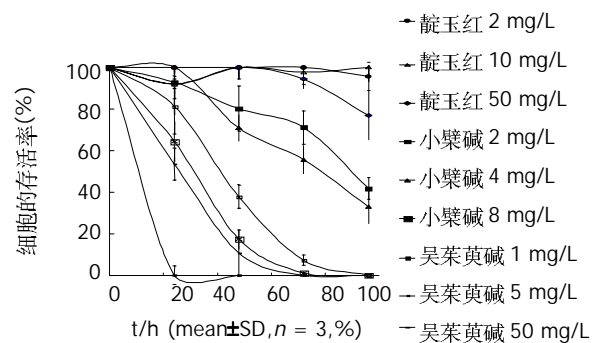


图2 小檗碱、吴茱萸碱、靛玉红对MGC803细胞生长的影响.

2.4 细胞凋亡率 凋亡细胞与坏死细胞比较，胞膜相对较完整，可用苔盼蓝染色计数法对脱落的悬浮细胞计数估测凋亡率，凋亡率等于拒染的脱落死细胞占总细胞(活细胞加脱落细胞之和)百分比. 培养不同时间收集脱落的悬浮细胞观测，阿霉素组基本上被苔盼蓝染色，而且还被培养基中酚红染色. 小檗碱各组脱落的细胞胞膜仍完整，有较高比例抗拒苔盼蓝染色并完全抗拒酚红染色，表现出凋亡的典型特征，其中48 h凋亡率对照组为0.3 ± 0.0%，小檗碱4 mg/L和8 mg/L组分别为16.9 ± 1.6% ( $t = 17.97$ ,  $P < 0.001$ )和65.2 ± 9.5% ( $t = 11.83$ ,  $P < 0.001$ ), 吴茱萸碱1 mg/L和5 mg/L组分别为58.9 ± 11.4% ( $t = 8.90$ ,  $P < 0.001$ )和37.0 ± 7.6% ( $t = 8.36$ ,  $P < 0.001$ );吴茱萸碱组脱落的死细胞先随时间、药浓度的增加而增加，然后随着悬浮细胞较快地崩解，拒染的脱落死细胞数在逐步减少，50 mg/L组48 h细胞几乎已崩解、坏死. 结果表明凋亡率与药物浓度、作用时间有依赖性(表1).

2.5 DNA损伤 DNA凝胶电泳图谱呈现DNA特异损伤的梯状条带，是经典细胞凋亡的标志. 小檗碱作用后，癌细胞的DNA损伤是特异的，断裂成的片段比原染色体DNA短，但分子量依然较大;最初只断裂成大片段，没有断成小片段，没有坏死细胞DNA的拖带涂抹现象，说明DNA仍是在核小体间某些特异位点被切开;随着作用时间增加开始出现小片段，但没有呈清

表1 拒染的脱落细胞占总细胞的百分比(mean ± SD,  $n = 3$ , %)

$\alpha/\text{mgL}^{-1}$		Ber		Evo	
Ber	Evo	24 h	48 h	24 h	48 h
8	50	39.8 ± 13.7 <sup>b</sup>	65.2 ± 9.5 <sup>b</sup>	17.7 ± 5.8 <sup>b</sup>	0
4	5	0	16.9 ± 1.6 <sup>b</sup>	53.2 ± 5.7 <sup>b</sup>	37.0 ± 7.6 <sup>b</sup>
2	1	0	6.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	21.1 ± 4.1 <sup>b</sup>	58.9 ± 11.4 <sup>b</sup>
0	0	0	0.3 ± 0.0		

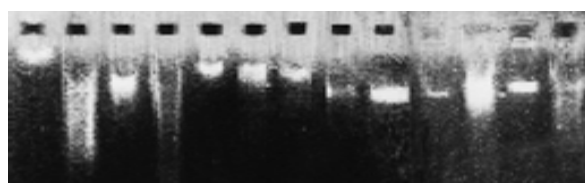
<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组, Ber:小檗碱, Evo:吴茱萸碱.



晰的梯状带, 估计是作用时间较长, 凋亡终末期细胞增多, 所降解的 DNA 碎片干扰的缘故. 吴茱萸碱组 DNA 损伤较明显, 但未呈梯状带而是涂抹状; 靛玉红各组细胞 DNA 与对照组 DNA 分子未见明显差别, 说明 DNA 无明显损伤(图 3).

组号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
浓度	0	20	20	20	2	2	4	4	2	4	2	2	4
(mg/L)													

时间(h)	24	48	24	72	24	48	24	48	60	60	72	60	72
-------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----



组号	14	15	16	17	18	19	20
浓度	0		1	10	5	50	50
(mg/L)							

时间(h)	48		48	48	48	48	48
-------	----	--	----	----	----	----	----

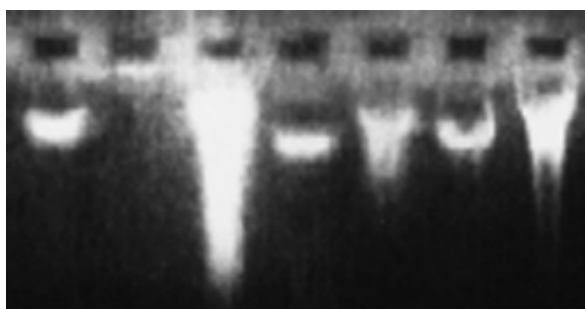


图3 DNA 损伤的琼脂糖电泳分析. 1, 14 空白对照; 2-4 阿霉素; 5-13 小檗碱组; 17, 19 靛玉红; 16, 18, 20 吴茱萸碱组.

2.6 流式细胞仪检测 小檗碱组、吴茱萸碱均出现细胞凋亡的亚二倍体峰, DNA 复制下降; 小檗碱组细胞阻滞于 G0/G1 期, 吴茱萸碱组细胞阻滞于 G2 期. 凋亡百分比与对照组  $11.8 \pm 1.5$  比较, 小檗碱 4 mg/L 组 48 h 为  $18.9 \pm 2.7$  ( $t = 3.34$ ,  $P < 0.05$ ), 72 h 为  $23.9 \pm 3.3$  ( $t = 5.06$ ,  $P < 0.01$ ); 吴茱萸碱 1 mg/L 组 48 h 为  $13.0 \pm 1.7$  ( $t = 0.69$ ,  $P > 0.05$ ), 72 h 为  $16.6 \pm 1.6$  ( $t = 2.80$ ,  $P < 0.05$ ), 检测细胞数目均为 10 000(表 2).

表2 流式细胞仪检测凋亡百分比(mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ , %)

分组	48 h	72 h
对照组	11.8 $\pm$ 1.5	
4 mg/L 小檗碱	18.9 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	23.9 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>
1 mg/L 吴茱萸碱	13.0 $\pm$ 1.7	16.6 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

### 3 讨论

本研究结果表明, 小檗碱和吴茱萸碱对胃癌细胞 MGC803 作用显著, 起效浓度较低, 小檗碱仅 4 mg/L 72 h 的抑制率已达 44.4%, 其作用后细胞凋亡的形态特征明显, DNA 是特异损伤, 切割 DNA 的作用较温和, 表明小檗碱促进细胞死亡的机制是诱导凋亡为主; 吴茱萸碱 5 mg/L 对 MGC803 细胞作用显著, 48 h 抑制率已达 79.7%, DNA 损伤也发生于细胞膜破损之前, 但 DNA 降解未呈典型凋亡的梯状带, 表明吴茱萸碱促进细胞死亡的机制可能既有诱导凋亡也有坏死. 靛玉红已被证明是抗癌药, 但临床多用于白血病的治疗, 体外对单核淋巴细胞增生抑制作用显著<sup>[6-7]</sup>, 其对肿瘤细胞的抑制作用有选择性, 我们观察到靛玉红对胃癌 MGC803 细胞诱导凋亡作用不明显, 对 DNA 无损伤作用. 关于小檗碱体外诱导肿瘤细胞凋亡的药理活性近年有较多的报道<sup>[4, 8-16]</sup>, 进一步的研究发现小檗碱诱导凋亡的机制与抑制拓扑异构酶、细胞周期蛋白 cyclin B1、CDC2 激酶等有关<sup>[17-18, 20]</sup>. Mitani *et al*<sup>[19]</sup> 用小檗碱给小鼠灌胃 14 d 能明显抑制肺癌细胞自发性纵隔淋巴结转移并有剂量依赖关系. 关于吴茱萸碱抗肿瘤活性目前国内外报道较少<sup>[22-31]</sup>, Zhang *et al*<sup>[22-25]</sup> 报道吴茱萸碱能调节 BAX 和 bcl-2 表达, 诱导癌细胞株 HeLa, L929, A357-S2 等的凋亡; 也能启动非 caspase 依赖途径诱导 A357-S2 坏死; Ogasawara *et al*<sup>[26-29]</sup> 报道吴茱萸碱可抑制小鼠 26-L5, LLC, B16-F10 等癌细胞的转移与浸润. 而我们既往的研究也初步证明以黄连、吴茱萸等组成的加味左金丸能阻断 MNG 诱发的大鼠胃癌癌变, 中药治疗在造模 16 wk 开始疗效要比 24 wk 后加中药好得多, 这与 Anis *et al*<sup>[21]</sup> 对小檗碱的报道一致; 加味左金丸含药血清对胃癌细胞的诱导凋亡效应要比吴茱萸碱、小檗碱单独体外作用弱, 是否与血清抑制细胞对小檗碱吸收、而左金丸含吴茱萸量又很低有关? 含吴茱萸量较高的反左金丸能否提高整体水平的抗肿瘤效果? 小檗碱、吴茱萸碱单独作用和配伍作用的分子机制有何不同, 二者是否有协同效应等等有待进一步研究.

### 4 参考文献

- 周本杰, 陈蔚文, 王建华, 匡忠生, 李茹柳, 叶富强, 徐颂芬, 潘怀耿. 加味左金丸对溃疡性胃癌的药效学研究. 中国医药学报 1999;14:68
- 陈蔚文, 李茹柳, 张礼康, 吕有勇, 王建华, 谭宇蕙, 徐勤, 叶富强, 陈冠林, 马伟, 周本杰, 郭淑杰, 杨传标, 徐颂芬, 潘怀耿, 詹峰, 柯杨. 连黛胶囊抗胃癌的药理特性与临床应用. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):34
- 谭宇蕙, 陈蔚文, 周本杰, 李茹柳. 连黛片对大鼠溃疡性胃癌 ras 基因点突变的影响. 中药药理与临床 2001;17:27-28
- 谭宇蕙, 陈冠林, 郭淑杰, 李燕红, 陈蔚文. 小檗碱对人胃癌 MGC803 细胞生长抑制及诱导凋亡的作用. 中国药理学通报 2001;17:40-43
- 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法. 第 1 版. 北京:

- 人民军医出版社, 1996:170-183
- 6 Xiao Z, Hao Y, Liu B, Qian L. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1763-1768
- 7 Knockaert M, Blondel M, Bach S, Leost M, Elbi C, Hager GL, Nagy SR, Han D, Denison M, Ffrench M, Ryan XP, Magiatis P, Polychronopoulos P, Greengard P, Skaltsounis L, Meijer L. Independent actions on cyclin-dependent kinases and aryl hydrocarbon receptor mediate the antiproliferative effects of indirubins. *Oncogene* 2004;23:4400-4412
- 8 Kuo CL, Chou CC, Yung BY. Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Cancer Lett* 1995;93:193-200
- 9 Wang DY, Yeh CC, Lee JH, Hung CF, Chung JG. Berberine inhibited arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression and DNA adduct formation in human malignant astrocytoma (G9T/VGH) and brain glioblastoma multiforms (GBM 8401) cells. *Neurochem Res* 2002;27:883-889
- 10 Lin S, Tsai SC, Lee CC, Wang BW, Liou JY, Shyu KG. Berberine inhibits HIF-1 $\alpha$  expression via enhanced proteolysis. *Mol Pharmacol* 2004;66:612-619
- 11 Lin CC, Ng LT, Hsu FF, Shieh DE, Chiang LC. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:65-69
- 12 Colombo ML, Bugatti C, Mossa A, Pescalli N, Piazzoni L, Pezzoni G, Menta E, Spinelli S, Johnson F, Gupta RC, Dasaradhi L. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. *Farmaco* 2001;56:403-409
- 13 李国英, 杨林西. 小檗碱诱导人胃癌细胞 BGC-823 细胞凋亡. 中国现代医学杂志 2004;14:54-56
- 14 王志红, 林菁. 盐酸小檗碱对 HL-60 细胞增生与分化的影响. 中国药理学通报 2004;20:1305-1308
- 15 姜金丽, 邱全瑛, 林洪生, 祁鑫, 裴迎霞, 何秀娟. 小檗碱对人胃癌细胞增生、细胞周期及 CD44v6 表达的影响. 中国免疫学杂志 2004;20:315-317
- 16 Kang MR, Chung IK. Down-regulation of DNA topoisomerase II $\alpha$  in human colorectal carcinoma cells resistant to a protoberberine alkaloid, berberrubine. *Mol Pharmacol* 2002;61:879-884
- 17 Li XK, Motwani M, Tong W, Bornmann W, Schwartz GK. Huanglian, A chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 2000;58:1287-1293
- 18 Iizuka N, Oka M, Yamamoto K, Tangoku A, Miyamoto K, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Identification of common or distinct genes related to antitumor activities of a medicinal herb and its major component by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer* 2003;107:666-672
- 19 Mitani N, Murakami K, Yamaura T, Ikeda T, Saiki I. Inhibitory effect of berberine on the mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic implantation of Lewis lung carcinoma. *Cancer Lett* 2001;165:35-42
- 20 Jagetia GC, Baliga MS. Effect of *Alstonia scholaris* in enhancing the anticancer activity of berberine in the Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *J Med Food* 2004;7:235-244
- 21 Anis KV, Rajeshkumar NV, Kuttan R. Inhibition of chemical carcinogenesis by berberine in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:763-768
- 22 张莹, 张起辉, 吴立军, 田代真一, 小野寺敏, 池岛乔. 吴茱萸碱诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡过程中非 caspase 调控因素. 中国药理学通报 2004;20:61-64
- 23 Zhang Y, Zhang QH, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Atypical apoptosis in L929 cells induced by evodiamine isolated from *Evodia rutaecarpa*. *J Asian Nat Prod Res* 2004;6:19-27
- 24 Zhang Y, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Intracellular regulation of evodiamine-induced A375-S2 cell death. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1543-1547
- 25 Zhang Y, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:83-89
- 26 Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration. *Biol Pharm Bull* 2001;24:720-703
- 27 Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Inhibitory effects of evodiamine on in vitro invasion and experimental lung metastasis of murine colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2001;24:917-920
- 28 Ogasawara M, Suzuki H. Inhibition by evodiamine of hepatocyte growth factor-induced invasion and migration of tumor cells. *Biol Pharm Bull* 2004;27:578-582
- 29 Ogasawara M, Matsunaga T, Takahashi S, Saiki I, Suzuki H. Anti-invasive and metastatic activities of evodiamine. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1491-1493
- 30 Fei XF, Wang BX, Li TJ, Tashiro S, Minami M, Xing de J, Ikejima T. Evodiamine, a constituent of *Evodiae Fructus*, induces anti-proliferating effects in tumor cells. *Cancer Sci* 2003;94:92-98
- 31 Kan SF, Huang WJ, Lin LC, Wang PS. Inhibitory effects of evodiamine on the growth of human prostate cancer cell line LNCaP. *Int J Cancer* 2004;110:641-651

编辑 潘伯荣 审读 张海宁



# 中药有效成分对甲基硝基亚硝基胍转化的人胃黏膜上皮细胞的毒性作用

石雪迎, 赵凤志, 由江峰, 戴欣, 王洁良, 崔湘琳, 邵宏权

石雪迎, 由江峰, 王洁良, 崔湘琳, 邵宏权, 北京大学医学部病理系  
北京市 100083  
赵凤志, 戴欣, 北京中医药大学东直门医院病理科 北京市 100700  
石雪迎, 女, 1968 年 12 月生, 2000 年北京中医药大学博士, 副教授, 主要从事消化系统疾病病理学研究。  
国家自然科学基金资助课题资助项目, No. 30100249  
项目负责人: 石雪迎, 100083, 北京市, 北京大学医学部病理系. zhsh6812@yahoo.com.cn  
电话: 010-82802561  
收稿日期: 2004-11-15 接受日期: 2004-11-29

## Cytotoxic effects of the main active components from three Chinese herbal medicines on *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine transformed GES-1 cells

Xue-Ying Shi, Feng-Zhi Zhao, Jiang-Feng You, Xin Dai, Jie-Liang Wang, Xiang-Lin Cui, Hong-Quan Shao

Xue-Ying Shi, Jiang-Feng You, Jie-Liang Wang, Xiang-Lin Cui, Hong-Quan Shao, Department of Pathology, Peking University, Health Science Center, Beijing 100083  
Feng-Zhi Zhao, Xin Dai, Department of Pathology, Affiliated Dongzhimen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700  
Supported by National Nature Science Foundation of China, No. 30100249  
Correspondence to: Dr. Xue-Ying Shi, Department of Pathology, Peking University, Health Science Center, Beijing 100083, China. zhsh6812@yahoo.com.cn  
Received: 2004-11-15 Accepted: 2004-11-29

## Abstract

**AIM:** To investigate the cytotoxic effects of *Panax Notogengsing* Saponin (PNS), Astragaloside (AS) and Baicalin (Ba), the main active components from 3 Chinese herbal medicines, on an immortalized human gastric epithelial cell line GES-1 and the *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) transformed GES-1 cells (MC cells).

**METHODS:** GES-1 cells were transformed by  $2 \times 10^{-5}$  mol/L MNNG. The transformed cells were named as MC cells. MC cells were treated with the 3 medicines alone or in different combinations. Cell viability was detected by MTT assay and soft agar colony formation assay, while apoptosis/necrosis were determined by electron microscopy, fluorescence and flow cytometry with annexin V staining.

**RESULTS:** PNS, AS and Ba inhibited the growth of GES-1 and MC cells in a dose and time-dependent manner. The colony formation efficiency in soft agar of MC cells was also decreased after treated with PNS, AS, Ba alone or in combination ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  vs control group). The 3 medicines induced apoptosis and/or necrosis of MC cells time-dependently. These effects were greatly enhanced when two or three of these medicines were used together ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  vs 3 medicines used alone). The most potent combination was PNS+AS+Ba, followed by PNS+AS, AS+Ba and PNS+Ba, in a decreasing order.

**CONCLUSION:** PNS, AS and Ba can inhibit cell growth and induce cell death on MC cells. The cell death is partially caused by cell apoptosis. These effects can be enhanced to different extent by different combinations of these drugs.

**Key Words:** *Panax Notogengsing* Saponin; Astragaloside; Baicalin; *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine; Gastric epithelial cells;

Shi XY, Zhao FZ, You JF, Dai X, Wang JL, Cui XL, Shao HQ. Cytotoxic effects of the main active components from three Chinese herbal medicines on *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine transformed GES-1 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):477-482

## 摘要

**目的:** 明确三种中药有效成分三七皂甙(PNS)、黄芪皂甙(AS)及黄芩甙(Ba)单用或配伍应用对永生化的人胃黏膜上皮细胞 GES-1 以及经过甲基硝基亚硝基胍(MNNG)转化后的 GES-1 细胞(MC 细胞)增生能力的影响。

**方法:** 以 MNNG 转化 GES-1 细胞, 转化后细胞简称 MC 细胞。分别以不同浓度的三七皂甙、黄芪皂甙及黄芩甙处理 GES-1 细胞及 MC 细胞, 四甲基谷氮唑盐(MTT)法及软琼脂集落形成试验检测三种药物单用及配伍对细胞增生活性的影响。Annexin V 及 PI 双染, 流式细胞仪检测三药单用及配伍对 MC 细胞凋亡/坏死的影响; 电镜和 Hoechst33258 及 PI 双染荧光显微镜观察凋亡细胞形态。

**结果:** PNS、AS 及 Ba 对 GES-1 和 MC 细胞的增生活性有明显的抑制作用, 并有随剂量增加作用增强的趋势。三药配伍应用对 2 种细胞的抑制作用增强( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  vs 三药单用组), 还能明显抑制 MC 细胞的软琼

脂集落形成能力( $P<0.05$ 或 $P<0.01$  vs MC 细胞对照组). 三药单用可引起MC细胞凋亡及死亡比例增加并呈一定的时间依赖性, 配伍应用作用强于单独应用( $P<0.05$ 或 $P<0.01$  vs 三药单用组), 增强程度从大至小依次为PNS+AS+Ba>PNS+AS>AS+Ba>PNS+Ba.

**结论:** 三种中药有效成分单用及配伍可显著抑制MC细胞的增生并引起细胞死亡;引起细胞死亡的机制部分是通过诱导凋亡实现的;不同药物配伍应用的增效程度不同.

**关键词:** 三七皂甙; 黄芪皂甙; 黄芩甙; 甲基硝基亚硝基胍; 胃黏膜上皮细胞

石雪迎, 赵凤志, 由江峰, 戴欣, 王洁良, 崔湘琳, 邵宏权. 中药有效成分对甲基硝基亚硝基胍转化的人胃黏膜上皮细胞的毒性作用. 世界华人消化杂志 2005;13(4):477-482

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/477.asp>

## 0 引言

胃癌前病变较常见, 与胃癌发生关系密切. 近年来脾虚、血瘀、热毒病机在胃癌前病变发生中的作用日益受到重视, 益气活血清热法则是针对胃癌前病变关键病机的治疗法则<sup>[1-4]</sup>. 我们观察了黄芪皂甙、三七皂甙及黄芩甙对胃癌前病变细胞增生能力的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM/F12 培养基、标准胎牛血清、新生牛脑垂体提取物、人表皮生长因子、HEPES美国Gibco公司产品. 甲基硝基亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)、胰岛素、转铁蛋白、三碘甲状腺原氨酸、霍乱毒素、磷酸乙醇胺、四甲基谷氮唑盐(MTT)、碘化丙啶(propidine iodide, PI)、Hoechst33258美国Sigma公司产品. Annexin V 凋亡试剂盒北京宝赛试剂公司产品. 其余试剂均为国产分析纯. CO<sub>2</sub>培养箱美国NAPCO-5410型. 酶标仪美国Bio-RAD公司550型. 倒置相差显微镜日本OLYMPUS IMT-2型. FACSscan流式细胞仪美国BD公司. 永生化人胚胃黏膜细胞GES-1由北京市肿瘤研究所遗传室建系并提供. PNS, Ba购自云南植物药业有限公司. AS由北京中医药大学药学院植化室制备. DMEM/F12培养基加青、链霉素各10万U/L, 调pH值至7.4, 22 μm微孔滤膜过滤除菌, 制成基础培养基. 临用前在基础培养基内加入多种微量元素、营养成分及生长因子等<sup>[5]</sup>, 制成完全培养基. GES-1细胞以完全培养基常规培养于含5% CO<sub>2</sub>的培养箱, 达80%融合后, 以1:2或1:3比例传代. 按参考文献方法<sup>[5]</sup>, 以 $2 \times 10^{-5}$  mol/L MNNG转化细胞. 转化后细胞常规培养传至第4代时全部冻存(简称MC细胞), 以后实验均以此细胞与GES-1细胞同时复苏传代后进行.

## 1.2 方法

**1.2.1 中药对GES-1和MC细胞增生的影响** GES-1细胞常规培养达80%融合时, 胰酶消化收集细胞,  $6 \times 10^3$ 个/孔接种于96孔板, 24 h后换不同浓度含药培养基作用24 h, 加入MTT(终浓度80 mg/L)孵育4 h后, 吸净孔内液体, 加入DMSO 150 μL/孔, 避光振荡5 min, 酶标仪595 nm读取A值, 以不加细胞只加完全培养基的阴性对照孔平均值调零. 根据预试验结果确定给药浓度分别为:(1)PNS 20, 50, 100, 200, 300 mg/L;(2)AS 20, 50, 100, 150, 200 mg/L;(3)Ba 10, 25, 50, 75, 100 mg/L. 每组设4个平行孔, 以不含药物的完全培养基培养细胞作为对照组. 抑制率=(对照组A值-给药组A值)/对照组A值×100%.

根据24 h时的剂量-效应曲线求出各药对GES-1细胞的IC<sub>30</sub>及IC<sub>60</sub>浓度, 以各药的IC<sub>30</sub>浓度为配伍实验剂量, MTT法检测3药两两配伍或3药共用对GES-1和MC细胞的增生抑制作用, 并与各药IC<sub>60</sub>浓度的抑制作用进行比较. 细胞接种浓度为 $6 \times 10^3$ 个/孔, 检测时间点为24、48和72 h, 每组设6个平行孔, 每天换液1次.

**1.2.2 中药对MC细胞软琼脂集落形成能力的影响** MC细胞常规消化传代, 接种于25 mL玻璃培养瓶内, 培养24 h后去除未贴壁细胞, 以各药IC<sub>30</sub>浓度单用及配伍作用48 h后, 胰酶消化各组细胞, 收集入离心管低速离心(500 r/min)以去除死亡细胞, 胎盘蓝染色计数活细胞数>95%. 以含3.3 g/L琼脂糖的完全培养基制成细胞悬液, 注入已铺好底层琼脂的6孔培养板中, 每孔1 000个细胞, 每组3孔, CO<sub>2</sub>培养箱培养2 wk后, 镜下观察计数集落形成数. 软琼脂集落形成率=每孔集落数/接种细胞数×100%.

**1.2.3 细胞凋亡检测** MC细胞常规培养达80%融合时按1:3比例传代, 接种于100 mL培养瓶, 24 h后去除未贴壁细胞, 分别加入不同的含药培养基(PNS200 mg/L, AS100 mg/L, Ba30 mg/L单独或配伍应用)作用24 h及48 h后收集细胞进行相关检测, 以常规培养MC细胞作为阴性对照. PI/Hoechst33258双染荧光显微镜观察凋亡细胞形态:实验到期后, 胰酶消化收集细胞及培养上清, PBS洗涤2次, 加入Hoechst33258染液(终浓度10 mg/L)及PI染液(终浓度25 mg/L)37℃孵育15 min, PBS洗涤后滴加细胞悬液于载玻片上, 荧光显微镜观察. 透射电镜观察凋亡细胞形态:实验到期后, 用自制橡胶细胞刮将贴壁细胞刮下, PBS洗涤2次, 将细胞团收集到1.5 mL Eppendorf管内, 40 g/L戊二醛、19 g/L锇酸双固定PBS洗3次, 梯度酒精脱水, 低密度环氧树脂包埋, 超薄切片机切片, 醋酸双氧

铀和枸橼酸铅双重染色, 透射电镜观察. Annexin V/PI 双染, 流式细胞仪检测凋亡细胞比例: 实验到期后, 胰酶消化收集细胞及培养上清, 按试剂盒说明制备细胞, 流式细胞仪检测. Annexin V(+)/PI(-) 细胞为凋亡细胞, Annexin V(+)/PI(-) 及 Annexin V(+)/PI(+) 细胞之和为死亡细胞总数.

**统计学处理** 采用 SPSS11.0 软件进行数据分析, 结果以 mean  $\pm$  SD 表示, 组间均数比较采用 One Way-ANOVA 检验.

## 2 结果

**2.1 中药对 GES-1 和 MC 细胞增生的影响** 在一定剂量范围内, PNS, AS, Ba 单独应用对 GES-1 细胞有不同程度的增生抑制作用, 且随浓度增加抑制作用增强. 各药较高浓度可产生明显的杀伤作用, 引起绝大多数细胞死亡. 以 24h 时的抑制率绘制剂量-效应曲线 (图 1), 粗测各药对 GES-1 细胞的 IC<sub>30</sub> 及 IC<sub>60</sub> 浓度分别约为: PNS 130 和 210 mg/L; AS 90 和 125 mg/L; Ba 25 和 40 mg/L. PNS 130 和 210 mg/L, AS 90 和 125 mg/L, Ba 25 和 40 mg/L 对 GES-1 及 MC 细胞均有明显的抑制作用, 且随浓度增大、作用时间延长抑制作用增强. 两两配伍作用 (PNS 130 mg/L+AS 90 mg/L, PNS 130 mg/L+Ba 25 mg/L 或 AS 90 mg/L +Ba 25 mg/L) 对 2 种细胞的抑制较单独作用明显增强 ( $P<0.01$ ), 且抑制率均不同程度地高于 PNS 210 mg/L, AS 125 mg/L 或 Ba 40 mg/L. 三药共用 (PNS 130 mg/L+AS 90 mg/L+Ba 25 mg/L) 对 2 种细胞的抑制作用较两两配伍更为明显 (表 1, 2).

**2.2 中药对 MC 细胞软琼脂集落形成能力的影响** PNS 130 mg/L, AS 90 mg/L 及 Ba 25 mg/L 处理组细胞软琼脂集落形成率明显下降, 显著低于常规培养的 MC 细胞 ( $P<0.01$ ). PNS 130 mg/L+Ba 25 mg/L 和 AS 90 mg/L+Ba 25 mg/L 处理组仅见 1, 2 个集落形成, PNS

130 mg/L+AS 90 mg/L 和 PNS 130 mg/L+AS 90 mg/L+Ba 25 mg/L 处理组细胞则未见集落形成 (表 3).

**2.3 中药对 MC 细胞凋亡的影响** 阴性对照组荧光显微镜下仅见个别 Hoechst33258 浓染的凋亡细胞及 PI 着染的死亡细胞, 而各药物处理组凋亡及死亡细胞均明显增多, 以三药合用及 PNA+AS 组凋亡及死亡细胞增多最为明显 (图 2). 在透射电镜下阴性对照组细胞呈圆形或卵圆形, 核浆比较大, 部分核膜内陷, 核形状不规则, 核分裂相易见, 胞质内细胞器很少, 细胞表面可见微绒毛, 很难找到凋亡细胞. 不同药物处理组部分细胞表面微绒毛减少, 可见数量不等的、处于不同阶段的凋亡细胞. 凋亡早期细胞染色质沿核膜下聚集, 胞质基质电子密度增高, 细胞器多保持完好, 细胞膜完整; 进而染色质凝集成团块状, 胞质明显空泡化; 最后细胞分散形成凋亡小体. 此外, 各组均可见胞质核明显肿胀、胞膜不完整的死亡细胞. 凋亡及死亡细胞数量三药合用及 PNA+AS 组凋亡及死亡细胞增多最为明显 (图 3). 经三种药物分别处理后, 流式细胞仪检测各处理组 MC 细胞均出现了不同程度的 Annexin V 阳性/PI 阴性的凋亡细胞及死亡细胞比例增多, 且随时间延长作用更明显, 但与对照组比较无明显统计学差异. 三种药物配伍应用则凋亡细胞及

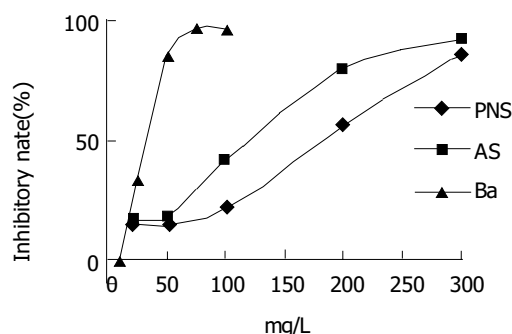


图1 中药 24 h 对 GES-1 细胞抑制作用的剂量-效应曲线.

表1 PNS, AS 及 Ba 对 GES-1 细胞的抑制作用(mean  $\pm$  SD, %)

t/h	PNS 130mg/L	PNS 210mg/L	AS 90mg/L	AS 125mg/L	Ba 25mg/L	Ba 40mg/L	P+A	P+B	A+B	P+A+B
24	31.6 $\pm$ 2.1	59.9 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>	32.3 $\pm$ 6.8	57.2 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>	33.3 $\pm$ 6.6	60.4 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	78.6 $\pm$ 1.6 <sup>abde</sup>	61.3 $\pm$ 1.2 <sup>ac</sup>	71.1 $\pm$ 1.2 <sup>bcef</sup>	83.3 $\pm$ 5.4 <sup>abdef</sup>
48	40.0 $\pm$ 3.4	63.7 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	39.0 $\pm$ 2.1	72.1 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	40.5 $\pm$ 2.6	64.6 $\pm$ 4.9 <sup>c</sup>	85.6 $\pm$ 1.0 <sup>abde</sup>	72.2 $\pm$ 2.6 <sup>acdf</sup>	83.2 $\pm$ 3.2 <sup>bcef</sup>	87.9 $\pm$ 3.6 <sup>abdef</sup>
72	41.5 $\pm$ 1.5	75.9 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	41.6 $\pm$ 1.5	81.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	43.7 $\pm$ 0.7	85.8 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	94.2 $\pm$ 0.2 <sup>abde</sup>	79.4 $\pm$ 1.2 <sup>acdf</sup>	92.3 $\pm$ 0.3 <sup>bcef</sup>	95.6 $\pm$ 0.6 <sup>abdef</sup>

<sup>a</sup> $P<0.01$  vs PNS 130 mg/L; <sup>b</sup> $P<0.01$  vs AS 90 mg/L; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs Ba 25 mg/L; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs PNS 210 mg/L; <sup>e</sup> $P<0.01$  vs AS 125 mg/L; <sup>f</sup> $P<0.01$  vs Ba 40 mg/L.

表2 PNS、AS 及 Ba 对 MC 细胞的抑制作用(mean  $\pm$  SD, %)

t/h	PNS 130mg/L	PNS 210mg/L	AS 90mg/L	AS 125mg/L	Ba 25mg/L	Ba 40mg/L	P+A	P+B	A+B	P+A+B
24	36.9 $\pm$ 1.4	68.0 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	29.0 $\pm$ 3.0	49.5 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	27.9 $\pm$ 1.5	56.5 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	73.4 $\pm$ 0.9 <sup>abde</sup>	67.1 $\pm$ 2.6 <sup>ac</sup>	64.3 $\pm$ 2.4 <sup>bcef</sup>	83.0 $\pm$ 4.5 <sup>abdef</sup>
48	36.0 $\pm$ 2.8	68.5 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	33.6 $\pm$ 4.4	72.8 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	36.1 $\pm$ 3.8	82.8 $\pm$ 7.3 <sup>c</sup>	90.4 $\pm$ 0.4 <sup>abde</sup>	78.7 $\pm$ 1.7 <sup>acdf</sup>	87.3 $\pm$ 0.6 <sup>bcef</sup>	92.7 $\pm$ 2.4 <sup>abdef</sup>
72	36.1 $\pm$ 2.1	81.8 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	50.1 $\pm$ 2.2	83.4 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	56.6 $\pm$ 1.1	88.6 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	94.9 $\pm$ 0.4 <sup>abde</sup>	83.5 $\pm$ 0.3 <sup>acdf</sup>	94.2 $\pm$ 0.1 <sup>bcef</sup>	96.2 $\pm$ 0.8 <sup>abdef</sup>

<sup>a</sup> $P<0.01$  vs PNS 130 mg/L; <sup>b</sup> $P<0.01$  vs AS 90 mg/L; <sup>c</sup> $P<0.01$  vs Ba 25 mg/L; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs PNS 210 mg/L; <sup>e</sup> $P<0.01$  vs AS 125 mg/L; <sup>f</sup> $P<0.01$  vs Ba 40 mg/L; <sup>g</sup> $P<0.05$  vs Ba 40 mg/L.

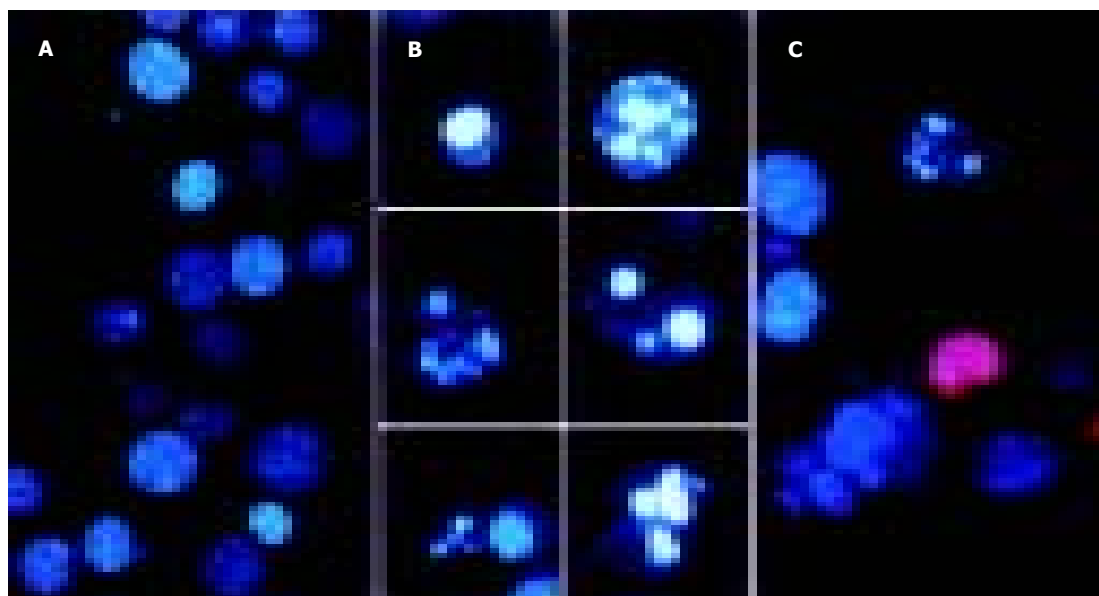


图2 MC细胞Hoechst33258及PI双染A: 对照组细胞核圆整, 染色质分布均匀( $\times 200$ ); B: 处理组染色质浓集成团块或断裂成碎片状的凋亡细胞不同程度增多, 可见处于不同阶段的各种形态的凋亡细胞( $\times 400$ ); C: PI着染的死亡细胞(PNS+AS+Ba组,  $\times 200$ ).

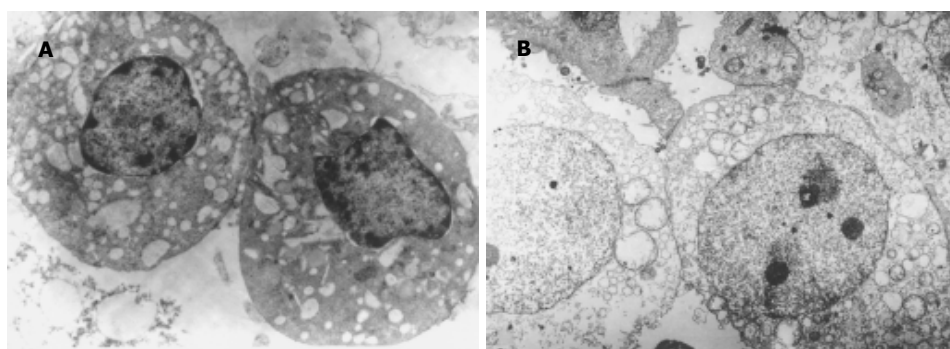


图3 MC细胞PNS+AS组(TEM,  $\times 4000$ )A: 染色质凝集成团块状, 胞质明显空泡化的凋亡细胞; B: 胞质胞核明显肿胀、胞膜不完整的死亡细胞.

死亡细胞比例增多更为显著, 与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 表4).

### 3 讨论

脾虚、血瘀、热毒病机在胃癌前病变发生中的作用日益受到重视, 益气活血清热法成为防治胃癌前病变重要治疗法则之一<sup>[1-4]</sup>. 我们研究了黄芪皂甙、三七皂甙及黄芩甙对不同转化程度的胃黏膜细胞增生能力的影响, 以期从细胞水平部分阐明益气活血清热法治疗胃癌前病变的机制. GES-1细胞系是由原代培养的人胎儿胃黏膜上皮细胞转染了SV-40病毒后获得的永生化细胞系, 对体外研究胃黏膜癌变机制有较大价值<sup>[6]</sup>. MNNG具有较强的致癌性<sup>[7-11]</sup>. 大剂量MNNG使GES-1细胞表型发生一些改变, 如染色体畸变增多、骨架微丝异常、克隆形成率增加, 并获得软琼脂集落形成能力, 但仍不能在裸鼠体内致瘤<sup>[12-13]</sup>, 因此GES-1细胞和MC细胞代表着癌变的不同阶段. 已有研究证实, Ba具有抗突变作用<sup>[14-15]</sup>, 对白血病和前列腺癌细胞具有抑制增生和促进凋亡的作用<sup>[16-21]</sup>, 而Chou *et al*<sup>[22]</sup>认为

Ba对Hep3B细胞没有明显的诱导凋亡作用, 并对由TGF $\beta$ 1诱导的caspase-3激活和凋亡有抑制作用. AS对肿瘤细胞生长的直接影响目前尚未见报道, 仅有研究认为AS能刺激脾细胞活性, 增强PHA或ConA诱导的脾细胞抗瘤活性<sup>[23]</sup>. 本结果首次证明, AS和Ba在一定浓度范围内对GES-1细胞和MC细胞有显著的增生抑制作用, 并且使MC细胞软琼脂集落形成能力降低、细胞的锚着依赖性增强. 有研究表明, PNS中含有的Rg3能抑制前列腺癌细胞增生, 将细胞阻滞于G1期, 继而引起细胞凋亡<sup>[24-25]</sup>. 我们也发现, PNS对GES-1细胞以及经甲基硝基亚硝基胍(MNNG)转化的GES-1细胞有明显的增生抑制和促凋亡作用<sup>[5, 26]</sup>. 具有益气活血清热作用的黄芪、三七和黄芩有可能是通过直接抑制异型增生细胞的过度增生而发挥治疗作用的. 我们还发现, 三种药物有效成分配伍应用对细胞的增生抑制作用增强, 两两配伍作用强于单独应用, 三药共用作用强于两两配伍. 两两配伍中又以PNS与AS合用抑制作用增强最为明显. 推测三种药物有可能通过不同途径抑制细胞增生, 所以联合用药产生协同作

表3 PNS、AS 及 Ba 对 MC 细胞软琼脂集落形成率的影响(mean  $\pm$  SD, %)

分组	对照	PNS 130 mg/L	AS 90 mg/L	Ba 25 mg/L	P+A	P+B	A+B	P+A+B
集落形成率	3.20 $\pm$ 0.66	0.63 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	0.47 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>abc</sup>	0.10 $\pm$ 0.1 <sup>abd</sup>	0.03 $\pm$ 0.06 <sup>acd</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>abcd</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.01 vs MC 对照; <sup>b</sup> $P$ <0.01 vs PNS 130 mg/L; <sup>c</sup> $P$ <0.01 vs AS 90 mg/L; <sup>d</sup> $P$ <0.01 vs Ba 25 mg/L.

表4 流式细胞术检测 PNS、AS 及 Ba 对 MC 细胞凋亡的影响(mean  $\pm$  SD, %)

分组	Apoptotic cells		Dead cells	
	24 h	48 h	24 h	48 h
对照	2.41 $\pm$ 0.41	4.56 $\pm$ 1.59	7.52 $\pm$ 1.50	8.96 $\pm$ 3.09
PNS 200 mg/L	4.30 $\pm$ 1.37	12.69 $\pm$ 5.77	11.88 $\pm$ 4.23	18.71 $\pm$ 4.61 <sup>b</sup>
AS 100 mg/L	4.98 $\pm$ 2.08	9.23 $\pm$ 0.82	12.16 $\pm$ 0.66	16.10 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>
Ba 30 mg/L	8.56 $\pm$ 1.61	13.05 $\pm$ 1.06	20.58 $\pm$ 2.67	25.84 $\pm$ 2.95 <sup>b</sup>
P+A	19.60 $\pm$ 8.31 <sup>b</sup>	38.79 $\pm$ 16.05 <sup>b</sup>	69.54 $\pm$ 6.60 <sup>b</sup>	92.96 $\pm$ 5.44 <sup>b</sup>
P+B	9.49 $\pm$ 3.57	15.98 $\pm$ 6.01	30.41 $\pm$ 3.31 <sup>b</sup>	35.28 $\pm$ 5.16 <sup>b</sup>
A+B	19.07 $\pm$ 11.38 <sup>b</sup>	23.72 $\pm$ 9.97 <sup>a</sup>	50.67 $\pm$ 19.87 <sup>b</sup>	61.69 $\pm$ 5.29 <sup>b</sup>
P+A+B	15.96 $\pm$ 3.92 <sup>b</sup>	40.71 $\pm$ 16.57 <sup>b</sup>	91.74 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	98.42 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.05 vs MC 对照; <sup>b</sup> $P$ <0.01 vs MC 对照.

用的程度有所不同.

磷脂酰丝氨酸外翻分析已经成为检测早期细胞凋亡的常用方法<sup>[27]</sup>. 正常情况下, 磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 位于细胞膜的内侧, 而在细胞凋亡的早期, PS 可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面, 暴露在细胞外环境中<sup>[28]</sup>. 这一变化可被巨噬细胞识别, 从而使凋亡细胞被迅速吞噬<sup>[29-30]</sup>. Annexin-V 是一种  $M_r$  35 000-36 000 的  $Ca^{2+}$  依赖性磷脂结合蛋白, 能与 PS 特异性结合. 以荧光素标记的 Annexin-V 作为荧光探针, 可通过流式细胞仪检测细胞凋亡的发生. 核酸染料 PI 不能透过完整的细胞膜, 但在凋亡中晚期的细胞和死细胞, 由于细胞膜的完整性受到破坏, 使得 PI 能够透过细胞膜着染细胞核. 因此将 Annexin-V 与 PI 联合使用, 就可以将凋亡早期细胞与凋亡晚期细胞和死亡细胞区分开来. 本研究的流式细胞检测结果提示, PNS、AS 及 Ba 对 MC 细胞有一定程度的促凋亡作用, 且随时间延长作用有增强的趋势, 但作用 48 h 时与对照组比较尚无统计学意义, 可能进一步延长作用时间三药的促凋亡效果将更为显著. 与三药单用相比, 三药配伍应用促凋亡效果显著增强, 不同配伍促凋亡效果增强程度与 MTT 实验结果一致, 以 PNS 与 AS 合用作用增强最为明显. 另外, 流式细胞检测结果也显示, 各处理组除了凋亡细胞比例与对照组比较明显增加外, Annexin V 和 PI 同时着染的死亡细胞比例也显著增加, 其中存在两种可能性: (1) 体外试验体系中缺乏体内存在的巨噬

细胞吞噬系统, 所以凋亡细胞的胞膜完整性随时间延长而逐渐丧失, 因而被 PI 着染; (2) 三种药物除了可引起细胞凋亡外, 还有可能直接引起细胞坏死. 根据不同时间凋亡和死亡细胞比例的变化看, 24 h 时各组即有一定比例的死亡细胞出现, 凋亡细胞与死亡细胞比例随药物作用时间延长而同时增加, 缺乏明显的随时间延长凋亡细胞比例下降、死亡细胞比例增加的演变趋势. 同时, 荧光显微镜及电镜观察结果也证实, 各药物处理组既有 Hoechst33258 强染、染色质明显浓集的凋亡细胞存在, 又有 PI 着染、胞质胞核高度肿胀的死亡细胞存在. 因此, 我们认为三种药物及其配伍对 MC 细胞有明显的毒性作用, 其作用机制部分通过诱导凋亡途径实现, 部分则通过直接引起细胞坏死实现.

#### 4 参考文献

- Shi XY, Zhao FZ, Dai X, Ma LS, Dong XY, Fang J. Effect of jianpiyiwei capsule on gastric precancerous lesions in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:608-612
- 王文, 夏天, 张仲海, 王宗仁, 张金洲, 李锋, 李军昌, 行利. 益胃冲剂对胃癌前病变大鼠黏膜上皮细胞 DNA 量及 AgNOR 数的影响. *第四军医大学学报* 2003;24:409-411
- 张运贵, 孙兆田, 姚桂芹, 韩莉, 薛强. 胃复春治疗胃黏膜异型增生临床观察及对 p21<sup>ras</sup> 和 p53 表达的调节作用. *中国中西医结合消化杂志* 2004;12:95-97
- 胡玲, 劳绍贤, 唐纯志, 周福生, 黄志新. 胃癌癌前病变中医证候与凋亡相关癌基因 mRNA 表达的关系. *广州中医药大学学报* 2004;21:81-84
- 石雪迎, 赵凤志, 戴欣, 牛福玲. 三七总皂甙对转化的人胃黏膜上皮细胞增生的抑制作用. *北京中医药大学学报* 2001;24:29-33
- 柯杨, 宁涛, 王冰, 路桂荣, 冯莉雅, 李吉友, 吕有勇, 鄂征. 人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 的建立及其生物学特性. *中华肿瘤杂志* 1994;16:7-9

- 7 Amanuma K, Nakamura T, Aoki Y. MNNG-induced mutations in the adult gill and hepatopancreas and in embryos of rpsL transgenic zebrafish. *Mutat Res* 2004;556:151-161
- 8 di Pietro M, Marra G, Cejka P, Stojic L, Menigatti M, Cattaruzza MS, Jiricny J. Mismatch repair-dependent transcriptome changes in human cells treated with the methylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res* 2003;63:8158-8166
- 9 Corso C, Parry JM. Comparative genomic hybridization analysis of N-methyl-N'-nitrosoguanidine-induced rat gastrointestinal tumors discloses a cytogenetic fingerprint. *Environ Mol Mutagen* 2004;43:20-27
- 10 Yamashita S, Nomoto T, Abe M, Tatematsu M, Sugimura T, Ushijima T. Persistence of gene expression changes in stomach mucosae induced by short-term N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment and their presence in stomach cancers. *Mutat Res* 2004;549:185-193
- 11 Yi ZC, Zhang M, Fu JL, Wang Z, Zhou ZC. Down-regulation of mitotic checkpoint in transformed human embryo lung fibroblasts induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1079-1083
- 12 苏秀兰, 柯杨, 舍英, 宁涛, 王冰, 陆桂荣, 冯丽雅, 刘伟莉. 亚硝酸胺类化合物 MNNG 诱导人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 恶性转化的研究. *内蒙古医学杂志* 1995;15:65-67
- 13 苏秀兰, 宁涛, 柯杨. 化学致癌剂 MNNG 对人胃黏膜上皮细胞骨架作用的研究. *解剖学报* 1995;26:391-393
- 14 Wozniak D, Lamer-Zarawska E, Matkowski A. Antimutagenic and antiradical properties of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis georgi*. *Nahrung* 2004;48:9-12
- 15 Chen X, Nishida H, Konishi T. Baicalin promoted the repair of DNA single strand breakage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured NIH3T3 fibroblasts. *Biol Pharm Bull* 2003;26:282-284
- 16 Miocinovic R, McCabe NP, Keck RW, Jankun J, Hampton JA, Selman SH. In vivo and in vitro effect of baicalin on human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2005;26:241-246
- 17 Franek KJ, Zhou Z, Zhang WD, Chen WY. In vitro studies of baicalin alone or in combination with *Salvia miltiorrhiza* extract as a potential anti-cancer agent. *Int J Oncol* 2005;26:217-224
- 18 Ciesielska E, Gwardys A, Metodiewa D. Anticancer, antiradical and antioxidative actions of novel Antoksyd S and its major components, baicalin and baicalein. *Anticancer Res* 2002;22:2885-2891
- 19 Chen S, Ruan Q, Bedner E, Deptala A, Wang X, Hsieh TC, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Effects of the flavonoid baicalin and its metabolite baicalein on androgen receptor expression, cell cycle progression and apoptosis of prostate cancer cell lines. *Cell Prolif* 2001;34:293-304
- 20 Chan FL, Choi HL, Chen ZY, Chan PS, Huang Y. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett* 2000;160:219-228
- 21 Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol Immunol* 2002;38:781-791
- 22 Chou CC, Pan SL, Teng CM, Guh JH. Pharmacological evaluation of several major ingredients of Chinese herbal medicines in human hepatoma Hep3B cells. *Eur J Pharm Sci* 2003;19:403-412
- 23 张春辉, 王华, 倪启超, 尤其倡, 张天一, 林琳, 顾君一. 黄芪皂甙抗瘤作用的实验研究. *中国临床医学* 2002;9:215-217
- 24 Liu WK, Xu SX, Che CT. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci* 2000;67:1297-1306
- 25 Kim HS, Lee EH, Ko SR, Choi KJ, Park JH, Im DS. Effects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells. *Arch Pharm Res* 2004;27:429-435
- 26 石雪迎, 赵凤志, 戴欣, 池旭生, 牛福玲. 三七总皂甙对甲基硝基亚硝基胍转化的人胃黏膜上皮细胞 GES-1 的促凋亡作用. *中华消化杂志* 2001;21:726-728
- 27 Vermees I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptosis cells using fluorescein labeled annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51
- 28 Plenchette S, Filomenko R, Logette E, Solier S, Buron N, Cathelin S, Solary E. Analyzing markers of apoptosis in vitro. *Methods Mol Biol* 2004;281:313-331
- 29 Fan X, Krahling S, Smith D, Williamson P, Schlegel RA. Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes. *Mol Biol Cell* 2004;15:2863-2872
- 30 Borisenko GG, Matsura T, Liu SX, Tyurin VA, Jianfei J, Serinkan FB, Kagan VE. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells-existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys* 2003;413:41-52

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》、《世界胃肠病学杂志（英文版）》 变更刊期获得批复

本刊讯 山西省新闻出版局于 2005-02-18 及 2005-02-25 发布文件, 分别批准《世界胃肠病学杂志（英文版）》、《世界华人消化杂志》变更刊期。

根据新出报刊[2005]58 号文件, 《世界胃肠病学杂志（英文版）》自 2005-01-01 起改为周刊发行, 每月 7、14、21、28 日出版。

根据晋新出报刊发[2005]15 号文件, 《世界华人消化杂志》自 2005-01-01 起改为半月刊发行, 每月 1、15 日出版。

# EGFR 信号通路影响 Caco-2 细胞黏附和侵袭的分子机制

张晓晶, 张亮, 刘云鹏, 侯科佐, 王舒宝

张晓晶, 张亮, 刘云鹏, 侯科佐, 王舒宝, 中国医科大学第一附属医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001

张晓晶, 女, 1963-02-13 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 医学博士, 副主任医师. 肿瘤外科医生. 主要从事软组织肿瘤研究.

辽宁省科技攻关课题资助项目, No. 2003225007-3

项目负责人: 张晓晶, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学第一附属医院肿瘤外科. zhangxiaojingwu@163.com

电话: 024-24315516-384

收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-11-29

## Molecular mechanism of epidermal growth factor receptor pathway mediated adhesion and invasion of Caco-2 cell line

Xiao-Jing Zhang, Liang Zhang, Yun-Peng Liu, Ke-Zuo Hou, Shu-Bao Wang

Xiao-Jing Zhang, Liang Zhang, Yun-Peng Liu, Ke-Zuo Hou, Shu-Bao Wang, Department of Oncology, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by the Science and Technology Project of Liaoning Province, No. 2003225007-3

Correspondence to: Dr. Xiao-Jing Zhang, Department of Oncology, First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zhangxiaojingwu@163.com

Received: 2004-11-12 Accepted: 2004-11-29

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway on proliferation, adhesion and invasion of Caco-2 cell line and its molecular mechanism.

**METHODS:** Tetrazolium-based colorimetric assay was used to evaluate the effect of EGF, AG1478 or PD98059 on proliferation and growth of cultured human colon carcinoma Caco-2 cells. Matrigel experiment and cell adhesion assay were used to examine the invasiveness of Caco-2 cells. The transcription of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 of Caco-2 cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of P-EGFR protein in Caco-2 cells was determined by Western-blot.

**RESULTS:** Exogenous EGF significantly enhanced the growth and proliferation of Caco-2 cells. The growth ratio was increased by 23.4% at 24 h ( $P < 0.01$ ). AG1478 (20  $\mu\text{mol/L}$ , 48 h) and PD98059 (40  $\mu\text{mol/L}$ , 72 h) inhibited the growth and proliferation of Caco-2 cells in a time-independent

manner, and the growth rates were decreased by 45.7% and 54.6%, respectively ( $P < 0.01$ ). Matrigel experiment showed that EGF increased the adhesion ( $P < 0.05$ ) and invasion ( $P = 0.001$ ) ability of Caco-2 cells *in vitro* at the concentration of 10  $\mu\text{g/L}$ . AG1478 or PD98059 inhibited EGF-induced adhesion and invasion of Caco-2 cells ( $P < 0.01$ ) by blocking the activity of EGFR and ERK1/2. After treatment with EGF the protein of P-EGFR was increased, which was abolished by AG1478. RT-PCR assays revealed that exogenous EGF up-regulated mRNA levels of MMP-2 and MMP-9 and down-regulated mRNA levels of TIMP-1 and TIMP-2. Meanwhile AG1478 and PD98059 reversed the effect of EGF by decreasing the levels of MMP-2, MMP-9 mRNA and increasing the levels of TIMP-1 and TIMP-2 mRNA. The MMP-2 to TIMP-2 ratio and the MMP-9 to TIMP-1 ratio were decreased significantly by AG1478 or PD98059 ( $P < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** In human colon carcinoma, EGFR changes MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 transcription via MAPK signal pathway, which may contribute to the invasiveness and metastasis of Caco-2 cells.

**Key Words:** Epidermal growth factor receptor; Caco-2 cell line; Adhesion; Invasion; Colon carcinoma

Zhang XJ, Zhang L, Liu YP, Hou KZ, Wang SB. Molecular mechanism of epidermal growth factor receptor pathway mediated adhesion and invasion of Caco-2 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):483-488

## 摘要

**目的:** 探讨 EGFR 信号通路对人结肠癌 Caco-2 细胞增生、黏附和侵袭的影响及其分子机制.

**方法:** 应用细胞培养技术培养 Caco-2 细胞;以 MTT 法检测 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞增生和生长的影响;Matrigel 黏附实验、侵袭实验和 RT-PCR 技术检测 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞黏附力、侵袭力和 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 基因转录的影响;Western blot 蛋白免疫印迹法检测 EGF 和 AG1478 对 Caco-2 细胞 P-EGFR 蛋白表达的影响.

**结果:** 外源性 EGF (10  $\mu\text{g/L}$ ) 可明显地促进 Caco-2 细胞的增生和生长, 24 h 细胞生长率提高了 23.4% ( $P < 0.01$ ); 而 AG1478 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 PD98059 (40  $\mu\text{mol/L}$ ) 则明显地

抑制细胞的增生和生长,其抑制作用没有时间效应关系,AG1478最强抑制时间为第48 h,细胞生长率下降了45.7%( $P<0.01$ ),PD98059最强抑制时间为第72 h,细胞生长率下降了54.6%( $P<0.01$ )。Matrigel黏附实验、侵袭实验揭示了,EGF(10  $\mu\text{g/L}$ )提高EGFR活性后能明显地增加Caco-2细胞的体外黏附力( $P<0.05$ )和侵袭力( $P=0.001$ );而且AG1478和PD98059分别阻断EGFR和ERK1/2后能使EGF的促细胞黏附力和侵袭力的作用消失( $P<0.01$ )。RT-PCR测定显示,EGF能增加Caco-2细胞MMP-2, MMP-9 mRNA的表达,同时也能减少TIMP-1和TIMP-2 mRNA的表达;而AG1478和PD98059均能逆转EGF对Caco-2细胞基因的影响,使MMP-2和MMP-9 mRNA的表达下降, TIMP-1和TIMP-2 mRNA的表达上升,结果MMP-2/TIMP-2比值和MMP-9/TIMP-1比值均下降( $P<0.001$ )。

**结论:** EGFR信号可能通过下游MAPK通路传递信息,改变MMP-2, MMP-9, TIMP-1和TIMP-2基因功能,从而有助于结肠癌Caco-2细胞的侵袭与转移。

**关键词:** EGFR; Caco-2细胞; 黏附; 侵袭; 结肠癌

张锐晶, 张亮, 刘云鹏, 候科佐, 王舒宝. EGFR信号通路影响Caco-2细胞黏附和侵袭的分子机制. 世界华人消化杂志 2005;13(4):483-488  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/483.asp>

## 0 引言

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是 $M_r$ 170 000具有酪氨酸蛋白激酶(TK)活性的膜受体,与生长因子(配体)结合后可使其磷酸化激活并将信号传入细胞内,再经胞内多条信号传导通路传至核内调节靶基因的功能。EGFR信号传导通路参与调节绝大多数肿瘤的发生、发展过程<sup>[1]</sup>。结肠癌预后因素复杂,已证实EGFR表达水平与结肠癌转移潜能相关<sup>[2]</sup>,但EGFR信号如何影响结肠癌生物学行为仍不确切,弄清结肠癌转移机制是改善治疗和提高生存率的关键。我们探讨EGFR信号传导通路影响结肠癌Caco-2细胞增生、黏附和侵袭转移的分子机制如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Caco-2细胞株来源于人结肠黏液腺癌,购于中国科学院上海细胞库;EGF购于北京科宇联合干细胞库;EGFR阻断剂AG1478由美国BIOMOL研究实验室提供;p42/p44MAPK阻断剂PD98059购于Promega公司;Matrigel基质胶和8  $\mu\text{m}$ 聚碳酸酯膜分别购于BD和Milipore公司;Boyden Chamber由北大医学部病理系提供;McCoy's 5A无血清培养基和逆转录试剂均为GIBCO公司产品;胰岛素购于上海第一生化制药有限公司;转铁蛋白为Sigma公司产品;P-EGFR小鼠mAb购于

Santa Cruz公司;RT-PCR试剂盒Ver1.1购于Takara公司;引物由大连博瑞得生物技术有限公司合成。

**1.2 方法** Caco-2细胞生长在含100 mL/L FBS, 100 ku/L青霉素和100 mg/L链霉素的高糖DMEM培养液中,37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养,隔日换液,长满瓶时用含0.2 g/L EDTA + 2.5 g/L胰酶消化细胞,按1:2或1:4传代;取对数生长期细胞进行实验。

**1.2.1 MTT法检测细胞增生** 将生长活力良好的细胞以 $4\times 10^3$ /孔接种于96孔板,待细胞在37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养24 h贴壁后换成含4 mg/L转铁蛋白和20 mg/L胰岛素的McCoy's 5A无血清培养基;无血清培养24 h后实验组(1),(2),(3)分别加入EGF 10  $\mu\text{g/L}$ , AG1478 20  $\mu\text{mol/L}$ 和PD98059 40  $\mu\text{mol/L}$ ; (2),(3)组作用1 h后各加EGF 10  $\mu\text{g/L}$ ,对照组加等体积的PBS液,另有培养基无细胞组,每组设9复孔。继续培养24-96 h,检测前4 h加MTT(5 g/L)20  $\mu\text{L}$ ,4 h后弃上清,加DMSO 100  $\mu\text{L}$ ,避光振荡15 min,用全自动酶标仪测570 nm处的吸光度( $A_{570}$ )值,细胞生长率(%) =  $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

**1.2.2 Caco-2细胞黏附实验** 将Caco-2细胞悬液调整为 $1\times 10^8/\text{L}$ ,每孔3 mL分别接种于无菌6孔板中;培养24 h细胞均贴壁,培养液改为含4 mg/L转铁蛋白和20 mg/L胰岛素的McCoy's 5A无血清培养基;饥饿48 h后更换McCoy's 5A培养基并加药。实验组(1)EGF 10  $\mu\text{g/L}$ ,实验组(2)EGF10 $\mu\text{g/L}$ +AG1478 20  $\mu\text{mol/L}$ ,实验组(3)EGF10  $\mu\text{g/L}$ +PD98059 40  $\mu\text{mol/L}$ ,其中AG1478与PD98059均在EGF用药前1 h加药,对照组加等体积PBS,在37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养24 h后分别收集各孔细胞,离心去上清,每组均用无血清培养液调成 $6\times 10^8/\text{L}$ 细胞悬液。取96孔培养板覆以Matrigel胶26  $\mu\text{g}/\text{孔}$ ,4℃过夜,实验前于37℃烤箱中孵育1 h, PBS洗后加入100  $\mu\text{L}$ 预处理癌细胞悬液( $6\times 10^4$ 个/孔),37℃作用90 min;弃上清, PBS及无血清DMEM培养液冲洗,然后按MTT法检测490 nm单波长下各组吸光度( $A_{490}$ )值,计算细胞相对黏附率,相对黏附率(%) =  $(A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$ <sup>[4]</sup>。

**1.2.3 Matrigel体外细胞侵袭实验** 取对数生长期Caco-2细胞用0.2 g/L EDTA+2.5 g/L胰酶消化、培养液洗涤终止消化,再用含100 mL/L FBS培养液配成 $3\times 10^8/\text{L}$ 的细胞悬液待用;取Boyden小室,上下室间用8  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜隔开,下室加200  $\mu\text{L}$  McCoy's 5A无血清培养液,实验组(1),(2),(3)下室分别加EGF10  $\mu\text{g/L}$ , EGF10  $\mu\text{g/L}$ +AG1478 20  $\mu\text{mol/L}$ 和EGF10  $\mu\text{g/L}$ +PD98059 40  $\mu\text{mol/L}$ ,对照组为加入等体积PBS,上室各加200  $\mu\text{L}$ 细胞悬液,37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>孵育箱内作用24 h后取膜,甲醇固定并行HE染



色, 400 倍镜下记数 9 个视野细胞数, 取均值。

**1.2.4 Western blot 检测 P-EGFR 蛋白表达** 将经 EGF10  $\mu\text{g/L}$  和 EGF10  $\mu\text{g/L}$ +AG1478 20  $\mu\text{mol/L}$  处理和未处理的细胞 ( $2 \times 10^{10}/\text{L}$ ) 加细胞裂解液, 冰浴下超声粉碎后裂解 40 min, 离心去除细胞碎片, 测细胞裂解产物的蛋白含量, 取等量蛋白在 120 g/L 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 将蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 经封闭阻断后, 加小鼠抗人 P-EGFR (1:200) mAb, 4℃ 过夜, 碱性磷酸酶标记的马抗小鼠 IgG 抗体 (1:500) 室温孵育 2 h, NBT/BCIP 显色, GDS8000 成像分析仪分析图像。

**1.2.5 RT-PCR 方法检测 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 表达** 收集经 EGF10  $\mu\text{g/L}$ , EGF10  $\mu\text{g/L}$ +AG1478 20  $\mu\text{mol/L}$  和 EGF10  $\mu\text{g/L}$ +PD98059 40  $\mu\text{mol/L}$  处理及未处理的细胞, 采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA, RNA 引物序列 (表 1)。逆转录 (RT) 反应体系 20  $\mu\text{L}$ , 含  $2 \times$  缓冲液 10  $\mu\text{L}$ , dNTP (10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ , RNasin (40 MU/L) 0.5  $\mu\text{L}$ , Oligo (dT) 15 引物 (1 g/L) 1  $\mu\text{L}$ , AMV 逆转录酶 (22 MU/L) 1  $\mu\text{L}$ , RNA 样品 2  $\mu\text{g}$ 。反应条件: 65℃ 1 min, 30℃ 5 min, 迅速升温至 65℃ 再作用 30 min 后, 98℃ 预变性 5 min 灭活 AMV Rtase, 5℃ 5 min。PCR 反应: 在 20  $\mu\text{L}$  RT 反应产物中, 加入 15 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  8  $\mu\text{L}$ ,  $4 \times$  dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 上游引物 1  $\mu\text{L}$ , 95℃ 5 min, 加入 2  $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶 (1 MU/L)。循环条件: 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延长 7 min。取 PCR 产物 10  $\mu\text{L}$ , 经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外灯下观察结果。以各指标和  $\beta$ -action 扩增条带的吸光面积积分值的比值来评定各指标 mRNA 的表达水平, 进行半定量分析。

**统计学处理** 全部数据用 SPSS10.0 软件包进行统计学处理。计量资料用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示; 各组组间比较采用  $t$  检验。  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

表 1 待扩增片段的引物序列和扩增条件

名称	引物序列	扩增片段 长度(bp)	循环 次数
$\beta$ -actin	5' -GATTGCCTCAGGACATTTCTG-3'	690	30
	5' -GATTGCTCAGGACATTTCTG-3'		
MMP-2	5' -TCAACGGTCTCGGAATACA-3'	307	35
	5' -CCACAGTGGACATAGCG-3'		
MMP-9	5' -TCGAACCTTTGACAGCGACAAGAA-3'	215	35
	5' -TCAGGGCGAGGACCATAGAGG-3'		
TIMP-1	5' -CTTCCACAGGTCCCAACCA-3'	285	30
	5' -CAGCCCTGGCTCCCGAGGC-3'		
TIMP-2	5' -AAACGACATTTATGGCAACCCTATC-3'	265	35
	5' -ACAGGAGCCGCTCACTTCTTGATG-3'		

## 2 结果

**2.1 EGF 和 AG1478 对 Caco-2 细胞 EGFR 蛋白表达的影响** Caco-2 细胞为 P-EGFR 蛋白表达细胞, 经外源性 EGF (10  $\mu\text{g/L}$ ) 作用 24 h 后 P-EGFR 蛋白表达明显增加, 而 AG1478 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 能完全阻断外源性 EGF 对 Caco-2 细胞 EGFR 的激活作用, 使 P-EGFR 蛋白表达明显下降 (图 1)。

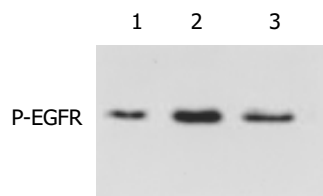


图 1 EGF 和 AG1478 对 Caco-2 细胞 P-EGFR 蛋白表达的影响。1: 对照组; 2: 10  $\mu\text{g/L}$  EGF; 3: 20  $\mu\text{mol/L}$  AG1478。

**2.2 EGFR 活性改变对 Caco-2 细胞增生的影响** 外源性 EGF 10  $\mu\text{g/L}$  促进 Caco-2 细胞生长作用在 24 h 时最强, 细胞生长率提高了 23.4% ( $P < 0.01$ ), 随着作用时间延长至 48 h 时其促进作用略有下降, 但与对照组相比仍维持在一个相对高的生长状态 ( $P < 0.01$ )。AG1478 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 PD98059 (40  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别作用 Caco-2 细胞 1 h 后均能阻断 EGF 的促细胞生长作用, 24 h 时细胞生长受到抑制, 48 h 时 AG1478 的抑制作用达到最强, 细胞生长率下降了 45.7% ( $P < 0.01$ ), 72 h 时 PD98059 的抑制作用达到最强, 细胞生长率下降了 54.6% ( $P < 0.01$ ), 但 AG1478 和 PD98059 的抑制作用不随作用时间的延长而增强 (图 2)。

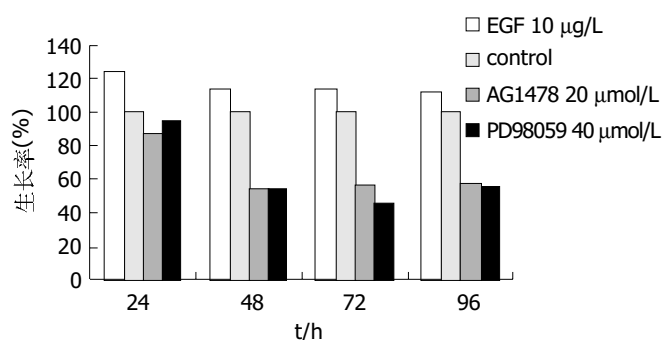


图 2 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞生长的影响。

**2.3 EGFR 活性改变对 Caco-2 细胞黏附力的影响** EGF10  $\mu\text{g/L}$  作用 Caco-2 细胞 24 h 后可明显地增强 Caco-2 细胞对 ECM 的黏附性, 相对黏附性是对照组细胞的  $1.49 \pm 0.13$  倍 ( $P < 0.05$ ); 而 AG1478 20  $\mu\text{mol/L}$  和 PD98059 20  $\mu\text{mol/L}$  分别作用 Caco-2 细胞 1 h 封闭 EGFR 和 MAPK 信号传导通路后, EGF 则不能行使促使 Caco-2 细胞黏附于 ECM 的作用, 相对黏附性分别由  $1.49 \pm 0.13$  降为  $0.98 \pm 0.03$  和  $0.51 \pm 0.01$ , 二组

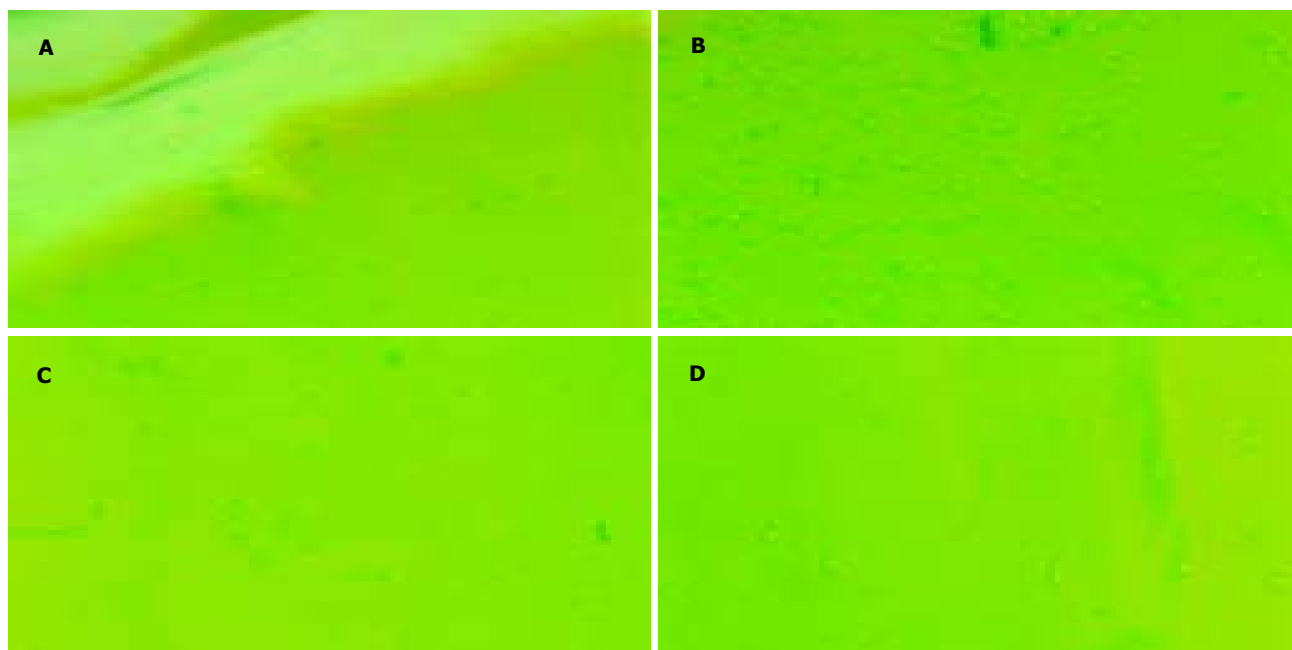


图3 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞黏附性的影响( $\times 100$ ). A: 对照; B: EGF; C: EGF+AG1478; D: EGF+PD98059.

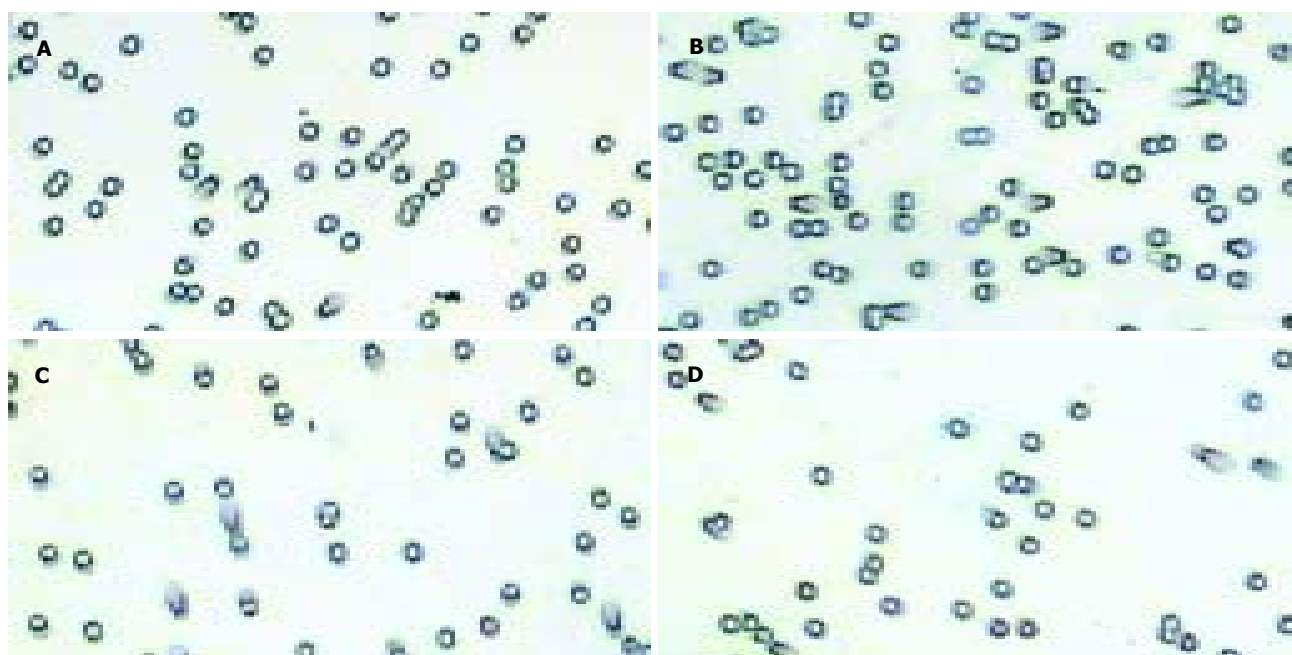


图4 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞侵袭力的影响( $\times 100$ ). A: 对照; B: EGF; C: EGF+AG1478; D: EGF+PD98059.

比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ). EGF处理组的黏附细胞数明显多于未处理组; EGF+AG1478 和 EGF+PD98059 处理组的黏附细胞数均显著低于EGF处理组的细胞数(图3).

**2.4 EGFR 活性改变对 Caco-2 细胞体外侵袭力的影响**  
EGF10  $\mu\text{g/L}$ , AG1478 20  $\mu\text{mol/L}$  和 PD98059 40  $\mu\text{mol/L}$  分别作用Caco-2细胞24 h 后, 检测细胞对Matrigel 体外侵袭力发现, EGF 明显增加Caco-2 细胞的过膜细胞数(过膜细胞数由正常的  $208 \pm 3$  个增至  $241 \pm 5$  个)( $P = 0.001$ ); 而 AG1478 不仅能减少Caco-2 细胞本身的过膜能力(过膜细胞数由正常的  $208 \pm 3$  个减为  $170 \pm 4$

个)( $P < 0.01$ ), 而且也能阻止 EGF 对 Caco-2 细胞侵袭力的调节(过膜细胞数由 EGF 作用的  $241 \pm 5$  个减为  $171 \pm 2$  个)( $P = 0.001$ ); 同样 PD98059 也能阻止 EGF 对 Caco-2 细胞侵袭力的调节(过膜细胞数由 EGF 作用的  $241 \pm 5$  个减为  $164 \pm 6$  个)( $P = 0.001$ ). EGF 处理组 Caco-2 细胞侵袭人工基底膜后, 不仅数目多, 而且表现出形态各异的伪足; 而 AG1478 和 PD98059 处理组的细胞形态较圆, 伪足数目相对较少(图4). 结果表明, EGFR 信号通过 MAPK 通路调节 Caco-2 细胞的侵袭力.

**2.5 EGFR 活性改变对 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 表达的影响** EGF10  $\mu\text{g/L}$ , EGF10  $\mu\text{g/L}$ +

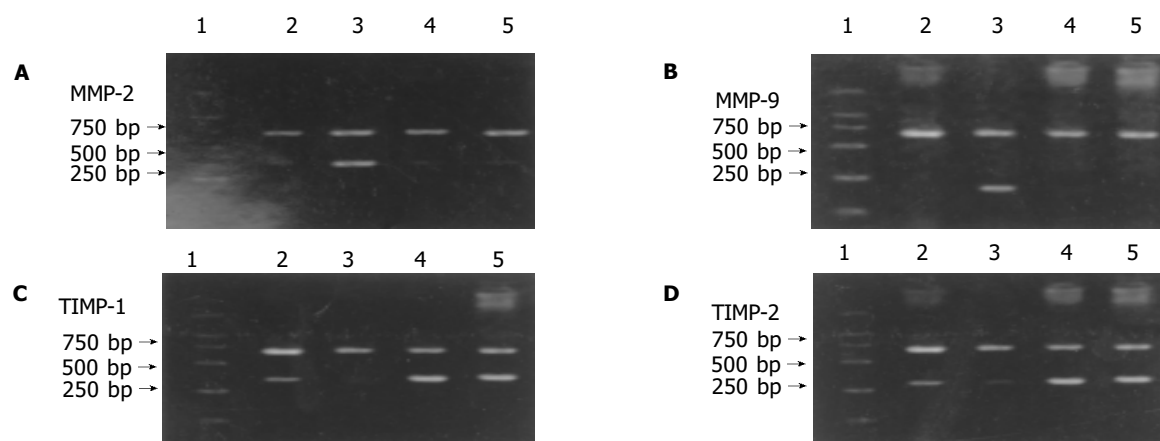


图5 EGF, AG1478 和PD98059 对Caco-2 细胞 MMPs 和TIMPs mRNA 表达的影响. A: MMP-2 mRNA; B: MMP-9 mRNA; C: TIMP-1 mRNA; D: TIMP-2 mRNA. 1: Marker; 2: 对照组; 3: EGF 组; 4: EGF+AG1478 组; 5: EGF+PD98059 组.

AG1478 20  $\mu\text{mol/L}$ 和EGF10  $\mu\text{g/L}$ +PD98059 40  $\mu\text{mol/L}$ 分别作用Caco-2 细胞24 h 后检测MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和TIMP-2 mRNA 表达发现, EGF 使MMP-2 307 bp 和MMP-9 215 bp 分别与 $\beta$ -action 690 bp 扩增带的吸光面积积分比值均高于对照组, 灰度值分别是对照组的2.2 倍和3.3 倍( $P<0.01$ ), 使TIMP-1 285 bp 和TIMP-2 265 bp 分别与 $\beta$ -action 690bp 扩增带的吸光面积积分比值均低于对照组, 灰度值分别减少了36.7%和25.4%且差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 而AG1478和PD98059均可抑制EGF 对Caco-2 细胞的影响, 使MMP-2 mRNA 表达分别减少了63.9%和61.5%( $P<0.001$ ), MMP-9 mRNA 表达分别减少了63.5%和70.8%( $P<0.001$ ), 使TIMP-1 mRNA 表达灰度值分别是EGF 组的2.3 倍和2.7 倍( $P<0.001$ ), TIMP-2 mRNA 表达灰度值分别是EGF 组的1.9 倍和2.4 倍( $P<0.001$ ), 结果MMP-2/TIMP-2 和MMP-9/TIMP-1 的比值明显下降, 差异均有统计学意义( $P<0.001$ ) (图5)。

### 3 讨论

肿瘤的侵袭、转移是一个多步骤、多基因参与的极其复杂的过程. EGFR 在正常组织中几乎不表达, 呈关闭状态; 而在肿瘤组织中呈活跃的开放状态, 而且其表达程度与肿瘤病情进展呈正相关, 说明EGFR 信号通路参与调节肿瘤的病理发展. 表皮样生长因子(如EGF, TGF- $\alpha$  等)能与胞膜上EGFR 结合, 使其磷酸化激活, 再经PI3K/AKT 或MAPK 信号通路将信号传递至核内, 促进或抑制特定靶基因的表达, 调节细胞的增生、黏附、运动、蛋白水解酶的分泌等<sup>[1]</sup>. EGF 和EGFR 信号通路对肿瘤细胞生物学行为的影响是目前的研究热点, 而且对不同来源肿瘤的作用机制并不相同. Pouliot *et al*<sup>[3]</sup>报道EGF 和TGF- $\alpha$  通过EGFR 信号通路能改变结肠癌细胞的增生和生存能力, 而且EGFR 促细胞增生作用的发挥与细胞外基质层蛋白作用的发挥具有协同性; 同时EGF 作用EGFR 后能诱导整合素的表

达, 从而提高结肠癌细胞的黏附、扩散和转移能力. 但EGF 对不同结肠癌细胞株的作用结果有所不同. Sawhney *et al*<sup>[4]</sup>研究证实EGF 并不影响结肠癌HCT116 细胞DNA 的合成, 但能通过上调细胞表面整合素的表达而影响细胞的黏附和运动能力. 由于结肠癌肿瘤组织中EGFR 的表达量与结肠癌病情进展和肝转移事件的发生相一致, 所以EGFR 可作为结肠癌治疗新的靶点. 尽管结肠癌对常规化疗并不敏感, 但通过EGFR 阻断治疗具有抑制EGF 和TGF- 对结肠癌进展的影响, 同时具有诱导细胞凋亡和化疗增敏作用<sup>[1, 5]</sup>. 我们发现EGFR 信号通路的激活与失活能改变结肠癌细胞的生长, 当EGF 激活EGFR 使P-EGFR 蛋白表达增加时Caco-2 细胞的增生能力和生存能力均提高; 当AG1478 阻断EGFR 和PD98059 阻断MAPK 通路后, Caco-2 细胞的生长受到抑制, 从而推测EGF 对高分化结肠癌细胞具有促进生长和提高增生能力的作用, 可能是EGFR 信号通过MAPK 通路传递作用靶基因的结果.

一般认为细胞增生活性是肿瘤侵袭、转移的基础和前提, 但侵袭与转移的实现还取决于肿瘤细胞对正常组织的破坏能力. 细胞外基质(ECM)是肿瘤侵袭和转移的天然屏障, 主要成分是胶原、糖蛋白、蛋白多糖和氨基葡聚糖, 以基底膜(BM)和细胞间结缔组织形式存在. ECM 的降解和BM 的破坏是一个关键步骤, 而基质金属蛋白酶[MMPs]及其组织抑制因子(TIMPs)家族是其中关键因素之一. MMPs 与ECM, BM 成分的破坏、降解相关, TIMPs 是MMPs 的特异性抑制因子, 二者的动态平衡维持了ECM, BM 的完整<sup>[6]</sup>. MMP-2 和MMP-9 主要降解IV 型胶原及明胶<sup>[7]</sup>. EGF 具有使乳腺癌和皮肤鳞状细胞癌MMP-2 和MMP-9 基因活性增高, 提高肿瘤细胞侵袭和转移能力的作用<sup>[8-9]</sup>. O-charoenrat *et al*<sup>[10]</sup>发现EGFR 信号通过MAPK 和PI3K/AKT 二条通路增加MMP-9 蛋白表达, 进而提高头颈鳞癌细胞对Matrigel 的侵袭力, 但不改变MMP-2 的基因活性.

我们对低浸润 Caco-2 细胞的 Matrigel 黏附、侵袭、Western blot 和 RT-PCR 测定表明, EGF10  $\mu\text{g/L}$  作用 24 h 激活 EGFR 信号通路后能明显提高 Caco-2 细胞对 Matrigel 的黏附力和穿透基底膜胶原纤维移向下室的体外侵袭力, 使 Caco-2 细胞 P-EGFR 蛋白表达和 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达均升高, 使 TIMP-1 和 TIMP-2 的 mRNA 表达均下降, 说明基质金属蛋白酶具有增加结肠癌细胞异质黏附性和促进转移的作用; 而 EGFR 抑制剂 AG1478 和 MAPK 抑制剂 PD98059 则能阻断 EGF 对细胞黏附力和侵袭力的影响。AG1478 使 Caco-2 细胞 P-EGFR 蛋白表达和 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达均明显下降, 使 TIMP-1 和 TIMP-2 的 mRNA 表达升高, 进而 MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 的比值均明显下降 ( $P < 0.001$ )。结果表明 EGFR 被 EGF 激活后通过 MAPK 信号通路将信号传递至核内, 改变 Caco-2 细胞的基质溶解相关基因 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 的转录水平, 进而提高大肠癌细胞的转移能力。可见 EGFR 信号通路的激活是结肠癌病情进展的关键机制, 可作为理想的治疗靶点。

#### 4 参考文献

- 1 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001;7:2958-2970
- 2 Shen Y, Vogel I, Kalthoff H. Comparative study of metastasis-associated characteristics of tumor cells with different metastatic capacities. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2000;22:201-204
- 3 Pouliot N, Connolly LM, Moritz RL, Simpson RJ, Burgess AW. Colon cancer cells adhesion and spreading on autocrine laminin-10 is mediated by multiple integrin receptors and modulated by EGF receptor stimulation. *Exp Cell Res* 2000;261:360-371
- 4 Sawhney RS, Zhou GH, Humphrey LE, Ghosh P, Kreisberg JJ, Brattain MG. Differences in sensitivity of biological functions mediated by epidermal growth factor receptor activation with respect to endogenous and exogenous ligands. *J Biol Chem* 2002;277:75-86
- 5 Liu B, Fang M, Schmidt M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *Br J Cancer* 2000;82:1991-1999
- 6 范跃祖, 傅锦业, 赵泽明, 陈春球. 去甲斑蝥素对人胆囊癌 GBC-SD 细胞系增生及侵袭的影响. *中华肿瘤杂志* 2004;26:271-274
- 7 郑伟达, 王小众. 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2004;12:428-431
- 8 Menashi S, Serova M, Ma L, Vignot S, Mourah S, Calro F. Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res* 2003;63:7575-7580
- 9 Huang YT, Hwang JJ, Lee LT, Liebow C, Lee PP, Ke FC, Lo TB, Schally AV, Lee MT. Inhibitory effects of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist on basal and epidermal growth factor-induced cell proliferation and metastasis-associated properties in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Int J Cancer* 2002;99:505-513
- 10 O-charoenrat P, Wongkajornsilp A, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 2004;111:174-183

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 肝癌患者肝局部细胞免疫状态与预后的关系

陈 昱, 罗殿中, 冯震博, 郭 芳

陈昱, 罗殿中, 冯震博, 郭芳, 广西医科大学病理教研室 广西壮族自治区南宁市 530021

陈昱, 男, 1977-04-12 生, 湖南省湘潭市人, 瑶族, 2004 年广西医科大学博士, 助教, 住院医师, 主要从事病理教学, 科研以及临床病理诊断工作. 主要从事肝脏疾病的免疫功能状态的研究.

广西自然科学基金资助项目(桂科回), No. 0342021

项目负责人: 罗殿中, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学病理教研室. Dianzhongluo@yahoo.com

电话: 0771-5356534

收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2004-12-28

## Hepatic local cellular immune status and prognosis of hepatocellular carcinoma

Gang Chen, Dian-Zhong Luo, Zhen-Bo Feng, Fang Guo

Gang Chen, Dian-Zhong Luo, Zhen-Bo Feng, Fang Guo, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by Guangxi Science and Technology Department Fund, No. 0342021

Correspondence to: Dian-Zhong Luo, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. dianzhongluo@yahoo.com

Received: 2004-12-07 Accepted: 2004-12-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the local cellular immune status in the tissues of liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC) and its relationship with the prognosis of the patients.

**METHODS:** Surgical specimens from 60 cases of HCC, 62 cases of LC, and 23 normal liver tissues were stained of CD<sub>3</sub>, CD<sub>57</sub>, CD<sub>20</sub>, CD<sub>68</sub> and GrB with streptavidin-horse-radish peroxidase detection system to assess the number and the distribution of hepatic local immunocytes.

**RESULTS:** The numbers of T lymphocytes (60.5±18.9), B lymphocytes (40.3±29.9) and NK cells (6.8±5.1) in the liver of HCC patients were significantly higher than those in the liver of LC patients (53.0±18.7,  $t = 2.21$ ,  $P = 0.029 < 0.05$ ; 21.5±18.2,  $t = 4.19$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ; 4.2±2.9,  $t = 3.53$ ,  $P = 0.001 < 0.01$ , respectively) and normal controls (45.4±11.7,  $t = 3.57$ ,  $P = 0.001 < 0.01$ ; 8.1±5.9,  $t = 7.97$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ; 4.8±2.3,  $t = 2.54$ ,  $P = 0.013 < 0.05$ , respectively); while the number of macrophages (M<sub>φ</sub>) (24.6±13.4) was significantly lower than that in the liver of LC patients (41.0±13.5,  $t = 6.74$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ) and normal controls (40.3±8.9,  $t = 6.17$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ). The numbers of T and B lymphocytes in the liver of LC patients were signifi-

cantly higher than those in normal controls (T cells: 53.0±18.7 vs 45.4±11.7,  $t = 2.23$ ,  $P = 0.029 < 0.05$ ; B cells: 21.5±18.2 vs 8.1±5.9,  $t = 5.14$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ). GrB positive cells in the liver mostly consisted of CD<sub>57</sub> positive cells and a few CD<sub>3</sub> positive cells. The numbers of NK cells, B lymphocytes and GrB positive cells in the cancerous tissues of stages I and II were significantly higher than that of stages III and IV (8.3±5.3 vs 5.3±4.5,  $t = 5.38$ ,  $P = 0.024 < 0.05$ ; 49.1±29.8 vs 31.0±27.5,  $t = 2.44$ ,  $P = 0.018 < 0.05$ ; 6.8±5.3 vs 4.1±3.2,  $t = 2.32$ ,  $P = 0.024 < 0.05$ , respectively). The numbers of T lymphocytes, NK cells, M<sub>φ</sub> and GrB positive cells in HCC with metastasis in 15 months were significantly lower than those without metastasis (53.1±16.0 vs 65.5±21.1,  $t = 2.41$ ,  $P = 0.02 < 0.05$ ; 2.9±3.1 vs 9.4±4.5,  $t = 6.33$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ; 20.9±11.3 vs 30.1±14.4,  $t = 2.62$ ,  $P = 0.012 < 0.05$ ; 2.5±1.6 vs 7.0±4.3,  $t = 5.02$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ , respectively). The numbers of T lymphocytes, NK cells, B lymphocytes and GrB positive cells decreased gradually with the progressing of disease in the HCC patients.

**CONCLUSION:** The numbers of T lymphocytes, NK cells, B lymphocytes, M<sub>φ</sub> and GrB positive cells might be important markers to assess the hepatic local immune status and useful factors to predict the prognosis of HCC patients.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Cellular immunity; Prognosis

Chen G, Luo DZ, Feng ZB, Guo F. Hepatic local cellular immune status and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):489-494

## 摘要

**目的:** 探讨原发性肝细胞癌(HCC)、肝硬化(LC)患者的肝局部细胞免疫状态及与预后的关系。

**方法:** HCC 60 例, LC 62 例, 正常肝组织 23 例, 以免疫组化 SP 法进行 CD<sub>3</sub>, CD<sub>57</sub>, CD<sub>20</sub>, CD<sub>68</sub>, GrB 染色, 对阳性细胞数进行定量分析, 以了解病灶局部免疫细胞的数量和分布情况并与临床资料进行相关分析。

**结果:** HCC 患者肝脏局部组织中的 T 淋巴细胞(60.5±18.9)、B 淋巴细胞(40.3±29.9)和 NK 细胞数量(6.8±5.1)明显多于 LC(分别为 53.0±18.7,  $t = 2.21$ ,  $P = 0.029 < 0.05$ ; 21.5±18.2,  $t = 4.19$ ,  $P = 0.000 < 0.01$ ; 4.2±2.9,  $t = 3.53$ ,  $P = 0.001 < 0.01$ )和正常肝组织(分别为 45.4±11.7,

$t = 3.57, P = 0.001 < 0.01; 8.1 \pm 5.9, t = 7.97, P = 0.000 < 0.01; 4.8 \pm 2.3, t = 2.54, P = 0.013 < 0.05$ ; 而巨噬细胞( $M\phi$ )数量( $24.6 \pm 13.4$ )明显少于LC( $41.0 \pm 13.5, t = 6.74, P = 0.000 < 0.01$ )和正常肝组织( $40.3 \pm 8.9, t = 6.17, P = 0.000 < 0.01$ ). LC组织中T淋巴细胞和B淋巴细胞数量明显多于正常肝组织(分别为 $53.0 \pm 18.7$  vs  $45.4 \pm 11.7, t = 2.23, P = 0.029 < 0.05; 21.5 \pm 18.2$  vs  $8.1 \pm 5.9, t = 5.14, P = 0.000 < 0.01$ ). 在肝脏GrB阳性细胞中, 大部分为CD<sub>57</sub>阳性细胞, 少量为CD<sub>3</sub>阳性细胞. HCC中临床TNM分期I, II期NK细胞, B淋巴细胞, GrB阳性细胞数量高于III, IV期(分别为 $8.3 \pm 5.3$  vs  $5.3 \pm 4.5, t = 5.38, P = 0.024 < 0.05; 49.1 \pm 29.8$  vs  $31.0 \pm 27.5, t = 2.44, P = 0.018 < 0.05; 6.8 \pm 5.3$  vs  $4.1 \pm 3.2, t = 2.32, P = 0.024 < 0.05$ ). 15 mo内有转移复发的癌组织中T淋巴细胞、NK细胞、 $M\phi$ 和GrB阳性细胞计数明显低于无转移复发组(分别为 $53.1 \pm 16.0$  vs  $65.5 \pm 21.1, t = 2.41, P = 0.02 < 0.05; 2.9 \pm 3.1$  vs  $9.4 \pm 4.5, t = 6.33, P = 0.000 < 0.01; 20.9 \pm 11.3$  vs  $30.1 \pm 14.4, t = 2.62, P = 0.012 < 0.05; 2.5 \pm 1.6$  vs  $7.0 \pm 4.3, t = 5.02, P = 0.000 < 0.01$ ). 随着HCC患者的病情恶化, T淋巴细胞、NK细胞、B淋巴细胞、GrB阳性细胞逐渐减少.

**结论:** T淋巴细胞、NK细胞、B淋巴细胞、 $M\phi$ 和GrB阳性细胞是反映机体抗肿瘤特异性细胞免疫状态及判断患者预后的重要指标.

**关键词:** 肝癌; 细胞免疫; 预后

陈罡, 罗殿中, 冯震博, 郭芳. 肝癌患者肝局部细胞免疫状态与预后的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(4):489-494  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/489.asp>

## 0 引言

原发性肝细胞癌(HCC)是我国高发的恶性肿瘤之一, 其发生发展的机制至今尚未十分明了, 据认为与宿主的免疫状态有关. 病灶局部的免疫状态因为取材难, 研究极少<sup>[1]</sup>, 而将免疫状况与患者预后进行对比的研究未见报道. 用免疫组织化学染色法观察了HCC, 肝硬化(LC)组织中CD<sub>3</sub>, CD<sub>57</sub>, CD<sub>20</sub>, CD<sub>68</sub>, GrB的表达, 以此评价局部组织的免疫状态, 并分析他们与HCC分化和预后的关系如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 病理学检查证实HCC标本60例, 男57例, 女3例, 年龄23-73(平均 $46.9 \pm 11.8$ )岁. AFP阳性38例, 阴性22例. 术后均继续给予以化疗为主的综合治疗. HCC按照WHO标准分为高分化(G1级)3例, 中分化(G2级)38例, 低分化(G3级)19例. HCC按国际TNM分期分为: I期3例, II期28例, III期11例, IV期18例. 追踪15 mo, 由病理学和临床决定有转移复发25例,

无转移复发29例, 失访6例. 取材时癌旁组织为距癌结节2 cm以上的肝组织, 其中伴LC46例, 无LC14例. 单纯性LC组62例, 其中男47例, 女15例, 年龄15-74(平均 $43.0 \pm 12.0$ )岁. 正常肝组织23例, 取自肝血管瘤标本中的周围正常肝组织, 男10例, 女13例, 年龄26-67(平均 $44.5 \pm 11.8$ )岁. 免疫组化SP试剂盒, 一抗鼠抗人CD<sub>3</sub>, CD<sub>57</sub>, CD<sub>20</sub>, CD<sub>68</sub>mAb(即用型)均为美国Maxim公司产品, 一抗鼠抗人GrB mAb为北京中杉金桥生物技术公司产品.

**1.2 方法** 每例标本分别进行(1)常规切片HE染色复查诊断; (2)用于免疫组化染色的标本按SP法处理, 光镜观察. 并以已知淋巴结阳性切片为CD<sub>3</sub>, CD<sub>57</sub>, CD<sub>20</sub>, GrB阳性对照, 以正常肝组织切片为CD<sub>68</sub>阳性对照; 以PBS代替一抗为阴性对照. CD<sub>3</sub>, CD<sub>57</sub>, CD<sub>20</sub>以细胞膜及细胞质内出现棕黄色信号为阳性细胞, CD<sub>68</sub>以细胞质内出现棕黄色信号为阳性细胞. GrB以细胞质内出现棕黄色颗粒状信号为阳性细胞. 随机观察至少10个高倍镜(10×40)视野, 算出一个高倍镜视野中细胞平均数.

**统计学处理** 应用SPSS 11.0统计软件对数据进行 $t$ 检验及秩和检验, 以 $P < 0.05$ 判为差异有显著性意义.

## 2 结果

CD<sub>3</sub><sup>+</sup>细胞呈圆或椭圆形. 正常肝组织中, CD<sub>3</sub><sup>+</sup>细胞散在分布于肝小叶的肝窦中, 汇管区稍密集; 单纯性LC中CD<sub>3</sub><sup>+</sup>细胞主要密集分布在增生的纤维组织及汇管区中, 肝细胞间的肝窦中也有少量分布; 癌与癌旁组织中CD<sub>3</sub><sup>+</sup>细胞亦是密集在间质纤维组织中, 部分散布在癌旁的肝窦及癌组织的血窦中. CD<sub>57</sub><sup>+</sup>细胞圆或椭圆, 散在分布于肝小叶、肝窦、肝癌血窦和周围间质中, 没有明显的密集趋势. CD<sub>20</sub><sup>+</sup>细胞呈圆或椭圆形, 每张切片中均有不同程度的分布, 正常肝组织中, 散在分布于汇管区中; 在单纯性LC中主要密集分布在增生的纤维组织及汇管区中, 呈灶状; 癌与癌旁组织中的CD<sub>20</sub><sup>+</sup>细胞亦是呈灶状密集在间质纤维组织中, 部分位于汇管区. 肝细胞间肝窦中偶有单个细胞的分布. CD<sub>68</sub><sup>+</sup>细胞包括肝脏中的Kupffer细胞(KC)和浸润的巨噬细胞( $M\phi$ ). 其中位于非癌组织肝窦和癌组织血窦处, 呈星形或者纺锤形的为KC; 而类圆形或者卵圆形, 胞质较丰富的为浸润的 $M\phi$ , 位于血管中. GrB<sup>+</sup>细胞无密集趋势, 均为散在分布于正常肝窦, 癌组织血窦, 周围增生的纤维组织及汇管区中. 棕黄色阳性颗粒可环绕细胞成圆形或者半圆形. CD<sub>3</sub><sup>+</sup>细胞平均数在癌旁组织最高, 癌组织次之, LC组织第3, 正常肝组织最低, 各组相比差异均有显著性( $P < 0.05$ ); CD<sub>57</sub><sup>+</sup>细胞在各种组织中的计数由高到低为: 癌组织, 癌旁组织, 正常肝组织, LC组织, 其中癌组织中

CD<sub>57</sub><sup>+</sup>细胞数量高于LC和正常肝( $P<0.05$ ), 癌旁CD<sub>57</sub><sup>+</sup>细胞数量高于LC( $P<0.01$ ). CD<sub>20</sub><sup>+</sup>细胞在各组中的数量从高到低分别为: 癌组织、癌旁组织、LC组织、正常肝组织. 除了癌旁组织的CD<sub>20</sub><sup>+</sup>细胞数量与LC相比无显著性差异以外, 其余各组相比均有显著性差异( $P<0.01$ ). CD<sub>68</sub><sup>+</sup>细胞从高到低为: 癌旁组织, LC组织, 正常肝组织, 癌组织, 其中癌旁组织、LC组织, 正常肝组织高于癌组织( $P<0.01$ ), 但癌旁组织, LC组织, 正常肝组织之间没有显著性差异. GrB<sup>+</sup>细胞由高到低为: 癌旁组织、癌组织、正常肝组织、LC组织, 除了正常肝组织与LC组织对比无显著性差异外, 其余各组相比均为有显著性差异( $P<0.05$ , 表1).

2.1 各种细胞与组织学分级, 临床TNM分期的关系  
组织学分级与癌组织中的CD<sub>3</sub><sup>+</sup>细胞、CD<sub>57</sub><sup>+</sup>细胞、CD<sub>20</sub><sup>+</sup>细胞、GrB<sup>+</sup>细胞分布无明显关系; 癌组织中CD<sub>68</sub><sup>+</sup>细胞数量Ⅰ级高于Ⅱ级和Ⅲ级( $P<0.05$ , 表1). 肝癌组织CD<sub>3</sub><sup>+</sup>细胞平均数在肿瘤临床分期的Ⅲ, Ⅳ期高于Ⅰ, Ⅱ期, 癌旁组织Ⅲ, Ⅳ期高于Ⅰ, Ⅱ期, 但差异均无显著意义. 癌组织中CD<sub>57</sub><sup>+</sup>细胞在临床TNM分期Ⅰ, Ⅱ期数量高于Ⅲ, Ⅳ期( $P<0.05$ ); 癌旁组织中Ⅰ, Ⅱ期数量与Ⅲ, Ⅳ期相比无显著性差异. CD<sub>20</sub><sup>+</sup>细胞分

布与临床TNM分期的关系: HCC中Ⅰ, Ⅱ期高于Ⅲ, Ⅳ期( $P<0.05$ ); 在癌旁组织中Ⅰ, Ⅱ期数量高于Ⅲ, Ⅳ期( $P<0.05$ ). 癌组织中和癌旁组织中临床分期与CD<sub>68</sub><sup>+</sup>细胞分布无明显关系. GrB<sup>+</sup>细胞在癌组织中临床TNM分期Ⅰ, Ⅱ期数量高于Ⅲ, Ⅳ期( $P<0.05$ ); 癌旁组织中Ⅰ, Ⅱ期数量与Ⅲ, Ⅳ期相比无显著性差异(表2).

2.2 各种细胞与转移复发的关系  
15 mo内有转移复发的癌组织中随机CD<sub>3</sub><sup>+</sup>计数少于无转移复发组( $P<0.05$ ), 癌旁组织转移组CD<sub>3</sub><sup>+</sup>计数小于无转移组, 但差异无显著性. 癌组织及癌旁组织中15 mo内转移复发组CD<sub>57</sub><sup>+</sup>细胞均明显低于无转移复发组( $P<0.01$ ). HCC中15 mo内转移复发组CD<sub>20</sub><sup>+</sup>细胞的数量小于无转移复发组; 癌旁组织中15 mo内转移复发组小于无转移复发组, 但无显著性差异. 癌组织中15 mo内转移复发组CD<sub>68</sub><sup>+</sup>细胞少于无转移复发组( $P<0.05$ ). 癌旁组织中15 mo内转移复发组CD<sub>68</sub><sup>+</sup>细胞高于无转移复发组, 但无显著性差异. HCC中15 mo内转移复发组GrB<sup>+</sup>细胞明显低于无转移复发组( $P<0.01$ ); 癌旁组织中15 mo内转移复发组GrB<sup>+</sup>细胞亦低于无转移复发组, 但无显著性差异(表2). 而且部分阳性细胞间也有相关性(表3).

表1 不同肝组织中各种阳性细胞的数量(mean±SD, n/HP)

组织	<i>n</i>	CD <sub>3</sub> <sup>+</sup> 细胞	CD <sub>57</sub> <sup>+</sup> 细胞	CD <sub>20</sub> <sup>+</sup> 细胞	CD <sub>68</sub> <sup>+</sup> 细胞	GrB <sup>+</sup> 细胞
HCC	60	60.5 ± 18.9	6.8 ± 5.1	40.3 ± 29.9	24.6 ± 13.4	5.5 ± 4.6
Ⅰ级	3	65.9 ± 19.7	3.7 ± 1.2	36.9 ± 5.7	43.5 ± 5.1	3.8 ± 4.1
Ⅱ级	38	59.9 ± 17.6	7.4 ± 2.4	41.8 ± 31.1	25.4 ± 11.8	5.9 ± 4.8
Ⅲ级	19	61.0 ± 19.1	6.2 ± 2.9	39.0 ± 29.9	20.1 ± 14.6	4.8 ± 4.3
癌旁组织	60	80.2 ± 23.5	6.2 ± 4.1	28.0 ± 27.2	43.5 ± 12.9	6.7 ± 3.9
LC组织	62	53.0 ± 18.7	4.2 ± 2.9	21.5 ± 18.2	41.0 ± 13.5	3.5 ± 2.3
正常肝组织	23	45.4 ± 11.7	4.8 ± 2.3	8.1 ± 5.9	40.3 ± 8.9	3.6 ± 2.4

表2 各种阳性细胞数量与HCC临床TNM分期, 转移复发的关系(mean±SD, n/HP)

临床资料	<i>n</i>	癌中CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	癌旁CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	癌中CD <sub>57</sub> <sup>+</sup>	癌旁CD <sub>57</sub> <sup>+</sup>	癌中CD <sub>20</sub> <sup>+</sup>	癌旁CD <sub>20</sub> <sup>+</sup>	癌中CD <sub>20</sub> <sup>+</sup>	癌旁CD <sub>20</sub> <sup>+</sup>	癌中GrB <sup>+</sup>	癌旁GrB <sup>+</sup>
分期Ⅰ, Ⅱ	31	58.6 ± 15.4	76.2 ± 24.2	8.3 ± 5.3	6.2 ± 4.1	49.1 ± 29.8	35.3 ± 30.6	24.7 ± 14.0	40.5 ± 6.9	6.8 ± 5.3	6.0 ± 3.7
分期Ⅲ, Ⅳ	29	62.5 ± 22.2	84.5 ± 22.3	5.3 ± 4.5	6.3 ± 4.2	31.0 ± 27.5	20.2 ± 20.8	24.5 ± 12.8	46.8 ± 16.6	4.1 ± 3.2	7.4 ± 4.1
有转移复发	25	53.1 ± 16.0	75.7 ± 25.6	2.9 ± 3.1	4.2 ± 2.8	31.4 ± 26.2	22.9 ± 23.4	20.9 ± 11.3	46.6 ± 18.1	2.5 ± 1.6	5.4 ± 4.0
无转移复发	29	65.5 ± 21.1	81.4 ± 23.2	9.4 ± 4.5	7.5 ± 4.5	46.2 ± 32.4	29.9 ± 30.6	30.1 ± 14.4	41.1 ± 5.3	7.0 ± 4.3	7.4 ± 3.6

表3 几种阳性细胞的相关性分析

组织	CD <sub>3</sub> <sup>+</sup> 与GrB <sup>+</sup> 细胞		CD <sub>57</sub> <sup>+</sup> 与GrB <sup>+</sup> 细胞		CD <sub>57</sub> <sup>+</sup> 与CD <sub>68</sub> <sup>+</sup> 细胞	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
HCC	0.318	<0.05	0.673	<0.01	0.344	<0.01
癌旁	0.312	<0.05	0.508	<0.01	-0.091	0.489
LC	0.14	0.279	0.492	<0.01	-0.015	0.907
正常肝	-0.093	0.673	0.742	<0.01	0.013	0.952

### 3 讨论

B细胞是产生抗体的主要细胞<sup>[2-4]</sup>. KC具有吞噬、代谢、产生细胞因子及抗肿瘤免疫等多种功能,在宿主防御机制及维持机体内环境平衡方面有重要作用<sup>[5-9]</sup>. 肝自然杀伤(nature killer, NK)细胞通过以下三个步骤攻击肿瘤或被病毒感染的细胞:(1)识别和黏附靶细胞;(2)激活细胞和实施“致命打击”(lethal hit, 针对靶细胞),包括依赖穿孔素/颗粒酶来传递杀伤因子或通过Fas配体(FasL)诱导表面有Fas表达的靶细胞进入凋亡;(3)溶解靶细胞及靶细胞死亡<sup>[10-12]</sup>. 此外,肝脏NK细胞还能分泌大量的细胞因子,发挥抗肿瘤作用<sup>[13-14]</sup>. 肿瘤局部免疫以特异性的细胞免疫为主导,其效应细胞为活化的CTL和NK细胞,可通过穿孔素/颗粒酶介导的细胞毒途径和FAS/FASL介导的细胞凋亡途径发挥作用<sup>[12, 15-19]</sup>. GrB是介导凋亡的主要效应分子,是颗粒酶家族中最有效的致凋亡成员<sup>[20-22]</sup>,能迅速引起靶DNA断裂. 他们伴随着细胞毒细胞的活化而产生,因而,颗粒酶的表达已经成为细胞毒细胞活化的标志<sup>[11, 23]</sup>,因此GrB<sup>+</sup>细胞密度可直接地反映肿瘤局部免疫状态,较外周血免疫指标能更准确地反映宿主的局部抗肿瘤免疫反应水平. 杀伤细胞识别靶细胞后,排放其特有的杀伤颗粒,诱导靶细胞凋亡<sup>[24-25]</sup>. 本研究也表明在HCC组织和癌旁组织中,GrB<sup>+</sup>细胞和CD3<sup>+</sup>细胞成正相关. 在HCC组织、癌旁组织、LC组织和正常肝组织中,GrB<sup>+</sup>细胞与CD57<sup>+</sup>细胞都成正相关. 正常肝脏内NK细胞约为肝内淋巴细胞总数的35%<sup>[26-27]</sup>,与本实验的血管瘤旁正常肝组织的淋巴细胞构成比例不甚符合. 我们选取的标本为血管瘤旁的肝组织,可能良性肿瘤的免疫状态与完全正常时的状态仍然有偏差. 但作为局部组织特异性细胞免疫状态的观察指标,肝细胞癌中CD3<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>细胞数量明显多于LC组及正常肝组织,GrB的表达数量在癌旁组织中高于HCC,LC和正常肝组织;HCC中的GrB<sup>+</sup>细胞数量也高于LC和正常肝组织. 说明在肿瘤组织中,活化的CTL和NK细胞数量明显的增多,局部细胞免疫状态良好,这可能与肿瘤抗原的刺激有关<sup>[28]</sup>. 癌旁组织中GrB<sup>+</sup>细胞数量高于癌组织可能是因为癌组织中伴有一些坏死,从而影响了GrB的表达. 在HCC组织中,B细胞受抗原或有丝分裂原刺激后,可引起分裂增生,故肝癌组织的B细胞数量明显高于LC组及正常肝组织组. 同时肿瘤中心组织肿瘤细胞抗原性较强,因此肿瘤周围组织B细胞明显低于肿瘤实质组织. 癌组织的M $\phi$ 数量少于正常肝组织、LC组织和癌旁组织,说明M $\phi$ 在免疫功能方面也发挥了重要的作用.LC组织中仅T细胞和B细胞数量明显高于正常肝组织,NK细胞,GrB<sup>+</sup>细胞和M $\phi$ 都无明显差别,提示在局部细胞免疫功能

状态方面二者情况差别不大,其中与缺少肿瘤抗原的刺激关系密切.

在各种组织中,NK细胞数量都明显低于M $\phi$ ,但他们之间有一定的关系. 研究表明,NK前体细胞在肝脏的归巢、分化和活化依赖于肝窦内功能正常KC的存在<sup>[29-30]</sup>. KC分泌的IL-1等细胞因子可作为淋巴细胞趋化因子样作用使肝脏NK细胞向肿瘤局部集中;KC与肝窦内皮细胞相互作用及表达于内皮细胞表面的黏附分子可促进NK前体细胞与内皮细胞间的黏附作用;KC分泌的TNF- $\alpha$ 及IFN- $\beta$ 能促进NK前体细胞的分化和活化. 同时活化的NK细胞还能分泌大量的细胞因子,发挥抗肿瘤作用,调节巨噬细胞的功能. 正如本结果所显示的HCC组织中M $\phi$ 和NK细胞的数量呈线性正相关. 证明M $\phi$ 和NK细胞在抗肿瘤中存在协同作用<sup>[30]</sup>.

组织学分级与HCC和癌旁组织中的T淋巴细胞、NK细胞、B淋巴细胞和GrB<sup>+</sup>细胞分布无明显关系,提示淋巴细胞与肿瘤的分化程度没有明显关系. 随着组织分化程度的降低,HCC中KC细胞数量减少. 但在高分化的HCC组织中,癌组织中的KC数和形态与非癌组织基本相同. 我们认为,可能是因为高分化的HCC组织的正常肝小叶结构仍然大致正常,仍然具有与正常肝窦相类似的血窦结构,能够维持类似于正常肝窦的内环境,故KC的数量和形态与正常肝组织,LC组织和癌旁组织很相似. 同时LC组织和癌旁肝组织结构与正常肝组织相差不大,故他们的KC数量和形态的差别不大. 而随着HCC分化程度的降低,在形态上明显的不同于正常肝组织,破坏了正常肝窦的内环境,影响KC的生存,或许是KC数量减少的原因. 而随着HCC分化程度的降低,纺锤形或者星形的KC减少,呈类圆形或者卵圆形的胞质丰富的阳性细胞增多,这些巨噬细胞可能是KC吞噬了肿瘤细胞,或者是细胞碎片,导致了形态上的变异. 同时这些阳性细胞也可能不是KC,而是游走的M $\phi$ ,但是二者尚不能严格的区分,目前,M $\phi$ 向HCC中游走的机制尚不清楚.HCC中NK细胞和GrB<sup>+</sup>细胞临床TNM分期I,II期数量高于III,IV期. 提示NK细胞和GrB<sup>+</sup>细胞与预后有较强的相关性,可以作为判断HCC患者预后的指标,同时,在HCC的细胞恶性转化过程中,GrB可能有一定的影响,并且在肿瘤的进展过程中发挥作用. 我们推测随着HCC的临床进展,一些对肿瘤免疫敏感的亚克隆已被杀灭,剩余的亚克隆可能对CTL和NK细胞介导的细胞毒攻击有一定的抵抗作用,甚至可耐受凋亡信号的攻击而具有较强的生存能力,而逃逸免疫监视. 这有利于HCC的发生和发展,与通过FAS/FASL介导的免疫逃逸反击的机制相似,可能是肿瘤主动逃逸免疫应答的另一分子机制<sup>[31]</sup>. HCC组织和癌



旁组织中, I, II期B细胞数量均明显高于III, IV期( $P<0.05$ ), 说明随着肿瘤的演进, 机体的体液免疫状态会变差. 早期HCC的肿瘤免疫可能以体液免疫为主, 而晚期则以细胞免疫为主. HCC中15 mo内有转移组的T淋巴细胞、NK细胞、GrB<sup>+</sup>细胞数少均于无转移组( $P<0.01$ ). 说明转移复发组的细胞免疫状态要差于无转移复发组. NK细胞、T淋巴细胞有杀伤肿瘤细胞和抑制肝癌细胞转移的功能, 免疫细胞的减少, 有可能是提示肿瘤转移的一个危险因素. HCC和癌旁组织中15 mo内转移复发组B细胞均小于无转移复发组, 但均无显著性差异, 提示B细胞对HCC转移复发的影响不大, 转移复发的HCC的免疫状态可能主要由细胞免疫决定. 癌组织中15 mo内转移复发组M<sub>0</sub>少于无转移复发组, 有显著性差异, 说明M<sub>0</sub>在转移复发中也有一定的作用<sup>[32]</sup>.

总之, 临床上随着HCC患者的病情恶化, T淋巴细胞、NK细胞、B淋巴细胞、GrB<sup>+</sup>细胞逐渐减少. T淋巴细胞、NK细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞和GrB<sup>+</sup>细胞可成为反映机体抗肿瘤特异性细胞免疫状态及判断患者预后的重要指标.

#### 4 参考文献

- Zhang J, Dong B, Liang P, Yu X, Su L, Yu D, Ji X, Yu G. Significance of changes in local immunity in patients with hepatocellular carcinoma after percutaneous microwave coagulation therapy. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1367-1371
- Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, Liang Y, Bradney A, Oliver JA, Bowen K, Steeber DA, Haas KM, Poe JC, Tedder TF. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol* 2004;16:119-129
- Hong K, Presta LG, Lu Y, Penn A, Adams C, Chuntharapai A, Yang J, Wong WL, Meng YG. Simple quantitative live cell and anti-idiotypic antibody based ELISA for humanized antibody directed to cell surface protein CD20. *J Immunol Methods* 2004;294:189-197
- Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, Ravetch JV, Poe JC, Haas KM, Tedder TF. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 2004;199:1659-1669
- Wyllie S, Seu P, Gao FQ, Gros P, Goss JA. Disruption of the Nramp1(also known as Slc11a1)gene in Kupffer cells attenuates early-phase, warm ischemia-reperfusion injury in the mouse liver. *J Leukoc Biol* 2002;72:885-897
- Ding H, Peng R, Reed E, Li QQ. Effects of Kupffer cell inhibition on liver function and hepatocellular activity in mice. *Int J Mol Med* 2003;12:549-557
- Xidakis C, Kolios G, Valatas V, Notas G, Mouzas I, Kouroumalis E. Effect of octreotide on apoptosis-related proteins in rat Kupffer cells: a possible anti-tumour mechanism. *Anticancer Res* 2004;24:833-841
- Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:16-28
- Gomes LF, Lorente S, Simon-Giavarotti KA, Areco KN, Araujo-Peres C, Videla LA. Tri-iodothyronine differentially induces Kupffer cell ED1/ED2 subpopulations. *Mol Aspects Med* 2004;25:183-190
- Luo D, Vermijlen D, Vanderkerken K, Kuppen PJ, Seynaeve C, Eddouks M, Baekeland M, Wisse E. Involvement of LFA-1 in hepatic NK cell(pit cell)-mediated cytotoxicity and apoptosis of colon carcinoma cells. *J Hepatol* 1999;31:110-116
- Luo DZ, Vermijlen D, Ahishali B, Triantis V, Vanderkerken K, Kuppen PJ, Wisse E. Participation of CD45, NKR-P1A and ANK61 antigen in rat hepatic NK cell(pit cell)mediated target cell cytotoxicity. *World J Gastroenterol* 2000;6:546-552
- Luo D, Vermijlen D, Kuppen PJ, Wisse E. MHC class I expression protects rat colon carcinoma cells from hepatic natural killer cell-mediated apoptosis and cytotoxicity, by blocking the perforin/granzyme pathway. *Comp Hepatol* 2002;1:2
- Vermijlen D, Luo D, Kruhoffer M, Orntoft TF, Kuppen PJ, Wisse E. Is the presence of interleukin-2 receptor alpha in the serum of colorectal liver metastases patients derived from hepatic natural killer cells? *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:291-292
- Vermijlen D, Seynaeve C, Luo D, Kruhoffer M, Eizirik DL, Orntoft TF, Wisse E. High-density oligonucleotide array analysis reveals extensive differences between freshly isolated blood and hepatic natural killer cells. *Eur J Immunol* 2004;34:2529-2540
- Vermijlen D, Luo D, Robaye B, Seynaeve C, Baekeland M, Wisse E. Pit cells(Hepatic natural killer cells)of the rat induce apoptosis in colon carcinoma cells by the perforin/granzyme pathway. *Hepatology* 1999;29:51-56
- Pinkoski MJ, Heibin JA, Barry M, Bleackley RC. Nuclear translocation of granzyme B in target cell apoptosis. *Cell Death Differ* 2000;7:17-24
- Lee JY, Chae DW, Kim SM, Nam ES, Jang MK, Lee JH, Kim HY, Yoo JY. Expression of FasL and perforin/granzyme B mRNA in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004;11:130-135
- Vermijlen D, Luo D, Froelich CJ, Medema JP, Kummer JA, Willems E, Braet F, Wisse E. Pit cells exclusively kill P815 tumor cells by the perforin/granzyme pathway. *Comp Hepatol* 2004;14(3 Suppl 1):58
- Vermijlen D, Luo D, Froelich CJ, Medema JP, Kummer JA, Willems E, Braet F, Wisse E. Hepatic natural killer cells exclusively kill splenic/blood natural killer-resistant tumor cells by the perforin/granzyme pathway. *J Leukoc Biol* 2002;72:668-676
- Wowk ME, Trapani JA. Cytotoxic activity of the lymphocyte toxin granzyme B. *Microbes Infect* 2004;6:752-758
- Luo D, Vanderkerken K, Chen MC, Vermijlen D, Asosingh K, Willems E, Triantis V, Eizirik DL, Kuppen PJ, Wisse E. Rat hepatic natural killer cells(pit cells)express mRNA and protein similar to in vitro interleukin-2 activated spleen natural killer cells. *Cell Immunol* 2001;210:41-48
- Andrade F, Bull HG, Thornberry NA, Ketner GW, Casciola-Rosen LA, Rosen A. Adenovirus L4-100K assembly protein is a granzyme B substrate that potentially inhibits granzyme B-mediated cell death. *Immunity* 2001;14:751-761
- Barry M, Heibin JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, Bleackley RC. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 2000;20:3781-3794
- Vermijlen D, Froelich CJ, Luo D, Suarez-Huerta N, Robaye B, Wisse E. Perforin and granzyme B induce apoptosis in FasL-resistant colon carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:212-217
- Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol* 2001;2:3014
- Lees RK, Ferrero I, MacDonald HR. Tissue-specific segregation of TCRgamma delta+ NKT cells according to phenotype TCR repertoire and activation status:parallels with TCR alphabeta+NKT cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2901-2909
- Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y. Pit cells as liver-associated natural killer cells:morphology and function. *Med Electron Microsc* 2004;37:29-36
- Yakirevich E, Lefel O, Sova Y, Stein A, Cohen O, Izhak OB, Resnick MB. Activated status of tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis in testicular seminoma. *J Pathol* 2002;

- 196:67-75
- 29 Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T, Hiraide H. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer(NK) cells and NK1. 1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 2000;174:35-46
- 30 Luo DZ, Vermijlen D, Ahishali B, Triantis V, Plakoutsi G, Braet F, Vanderkerken K, Wisse E. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. *World J Gastroenterol* 2000;6:1-11
- 31 Sun J, Bird CH, Thia KY, Matthews AY, Trapani JA, Bird PI. Granzyme B encoded by the commonly occurring human RAH allele retains pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 2004;279:16907-16911
- 32 Higashi N, Ishii H, Fujiwara T, Morimoto-Tomita M, Irimura T. Redistribution of fibroblasts and macrophages as micrometastases develop into established liver metastases. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:631-638

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第六届全国胃肠动力学学术研讨会征文通知

**本刊讯** 为提高国内胃肠动力障碍性疾病临床和基础研究水平, 吸取国外最新研究成果, 加强对外交流与合作, 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组定于2005-11月上旬在武汉召开全国第六届胃肠动力学学术会议, 届时将邀请国内外胃肠动力学专家就本学科的基础和临床研究进展作专题演讲, 并进行广泛的学术交流。现将征文有关事项通知如下:

### 1 征文内容

(1)胃肠动力障碍性疾病的基础和临床研究;(2)胃肠功能性疾病的基础和临床研究;(3)胃肠神经系统功能与胃肠动力学基础研究;(4)胃肠动力学检测方法的临床应用。

### 2 征文要求

(1)论文摘要不得超过800字, 电脑打印(附软盘), 格式为: 题目, 作者, 单位, 邮编, 目的, 方法, 结果和结论, 联系电话及E-mail地址;(2)已在全国公开发表的论文不予受理。

### 3 投稿地址

武汉市解放大道1277号协和医院消化科 刘劲松 收(邮编: 430022), 电话: 027-85726381; 2 武汉市丁字桥路100号湖北省医学会 林勇 胡丽萍收(邮编: 430064), 电话: 027-87893467

### 4 截稿日期

2005-07-30

### 5 会议具体地点

另行通知。会议信息, 论文投稿, 表格下载请登陆网站:<http://hubeiyiyuan.go.nease.net>。

中华医学会消化病学分会

消化病学分会胃肠动力学组

# 大鼠胃 Cajal 间质细胞的分离和培养

刘 勇, 齐清会

刘勇, 天津医科大学附属肿瘤医院胃肠肿瘤科 天津市 300060  
齐清会, 大连医科大学附属第一医院普外科 辽宁省大连市 116011  
刘勇, 男, 1975-10-06 生, 天津市人, 汉族, 2004 年天津医科大学博士毕业.  
项目负责人: 刘勇, 300060, 天津市, 天津医科大学附属肿瘤医院胃肠肿瘤科. libra\_ly@163.com  
收稿日期: 2004-12-13 接受日期: 2004-12-21

## Isolation and Culture of Rat Gastric Interstitial Cells of Cajal

Yong Liu, Qing-Hui Qi

Yong Liu, Department of Gastrointestinal Tumor, Cancer Hospital of Tianjin Medical University, 300060, Tianjin, China  
Qing-Hui Qi, Surgery Department, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 116011, Liaoning Province, China.  
Correspondence to: Dr. Yong Liu, Department of Gastrointestinal Tumor, Cancer Hospital of Tianjin Medical University, 300060, Tianjin, China. libra\_ly@163.com  
Received: 2004-12-13 Accepted: 2004-12-21

### Abstract

**AIM:** In order to investigate the pacing mechanism of the interstitial cells of Cajal (ICC), the method for isolation and culture of ICC from the Wistar rat stomach was explored.

**METHODS:** The gastric tissue of Wistar rat was dissected. Collagenase was used to isolate ICC. The cells were suspended in smooth muscle cell medium containing stem cell factor. The medium was changed every other day until the cells were used. The c-Kit antibody was applied to label ICC to distinguish them from smooth muscle cells.

**RESULTS:** ICC in culture maintained the intrinsic characteristics: multiple processes, large nuclei, and intercellular network. Fluorescent staining with c-Kit antibody confirmed that the culture ICC was successful.

**CONCLUSION:** ICC has been isolated by enzyme digestion method from Wistar rat stomach and cultured successfully.

**Key Words:** Wistar rat; Stomach; Interstitial cells of Cajal; Dissociation; Culture

Liu Y, Qi QH. Isolation and Culture of Rat Gastric Interstitial Cells of Cajal. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(4):495-498

### 摘要

**目的:** 探索 Wistar 大鼠胃 Cajal 间质细胞 (ICC) 的分离和培养方法, 为进一步研究其起搏机制提供条件.

**方法:** 取出 Wistar 大鼠的胃组织, 采用胶原酶酶解法分离细胞, 将细胞悬液接种于含干细胞因子的平滑肌细胞培养基中, 进行培养, 隔日换液. 用 c-Kit 特异性抗体标记细胞, 证实细胞类型.

**结果:** 培养后的 ICC 保持其固有特征, 多突起, 核大, 相互之间连接形成网络, c-Kit 抗体荧光染色证实细胞培养成功.

**结论:** 酶解法分离 Wistar 大鼠胃 ICC 并培养成功.

**关键词:** Wistar 大鼠; 胃; Cajal 间质细胞; 分离; 培养

刘勇, 齐清会. 大鼠胃 Cajal 间质细胞的分离和培养. 世界华人消化杂志 2005; 13(4):495-498  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/495.asp>

### 0 引言

Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 作为胃肠运动的起搏细胞, 越来越受到关注, 多种胃肠运动障碍疾病均与之相关. 目前对其起搏机制还缺乏十分明确的认识. 因此, 从细胞学角度进行深入研究, 有助于了解 ICC 的起搏机制及信号传导途径, 有利于更深入地掌握疾病本质, 制定合理有效地防治措施. 目前国外学者只对 Balb/c 小鼠的胃肠 ICC 成功进行了分离和培养, 国内外尚未见对 Wistar 大鼠胃肠道 ICC 进行分离和培养的报道. 我们尝试进行了 Wistar 大鼠胃 ICC 的分离和培养, 并取得成功.

### 1 材料和方法

**1.1 材料** Wistar 大鼠 3-4 月龄, 体质量 160-200 g, 雌雄兼有, 禁食不禁水 48 h, CO<sub>2</sub> 吸入麻醉后, 断颈处死. 腹部正中切口打开腹腔, 自贲门和幽门处离断组织, 取出胃 (包括胃底、胃体和幽门) 置于冷 KRB 液 (Krebs-Ringer bicarbonate solution: (mmol/L) Na<sup>+</sup> 137.4, K<sup>+</sup> 5.9, Ca<sup>2+</sup> 2.5, Mg<sup>2+</sup> 1.2, Cl<sup>-</sup> 134, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 15.5, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1.2, 葡萄糖 11.5, 37.5 ± 0.5 °C, pH 7.3-7.4, 970-30 m/L CO<sub>2</sub> 冒泡) 中. 小心去除系膜, 沿小弯缘剪开胃, 洗净内容物. 将胃组织钉固于蜡板上, 锐性去除黏膜和黏膜下层. 将分离出的肌肉组织剪成约 1-2 mm<sup>3</sup> 小块.

**1.2 方法** 新鲜分离的肌条小块在酶解液中 37 °C 孵育

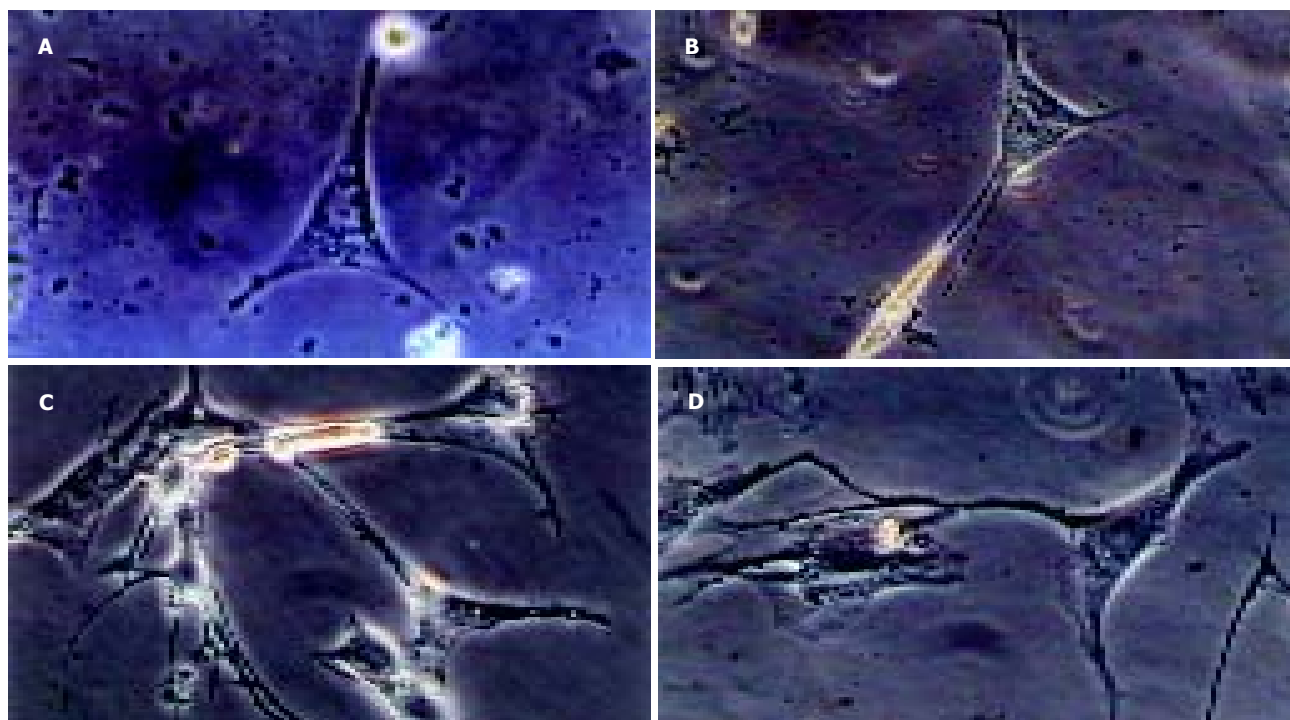


图1 培养后ICC的变化. A: 3 d,  $\times 200$ , 细胞胞体呈三角形, 突起伸展; B: 5 d,  $\times 100$ , 细胞突起伸出, 周围有平滑肌细胞; C: 7 d,  $\times 100$ , 细胞突起向不同方向伸出, 相邻ICC突起间有连接; D: 9 d,  $\times 200$ , 细胞突起向各方向伸出, 有次级突起, 与相邻ICC突起及邻近平滑肌细胞间有连接.

60 min, 轻微搅拌. 酶解液包括: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco 公司, USA), 1.0 g/L II 型胶原酶 (Sigma 公司, USA). 30 min 更换 1 次酶解液, 吸出的上清酶液置于离心管内 4℃ 保存. 消化结束后, 将组织和前面的上清液一同经过 100 目筛网过滤. 收集滤液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入含 200 g/L 胎牛血清 (Hyclone, USA) 的 SMGM (Smooth Muscle Grown Medium, Clonetics, Cambrex Bio Science Walkersville, USA) 5 mL, 吹打沉淀, 使细胞悬浮. 混悬液置于培养瓶中, 37℃ 贴壁 1 h. 再加入 7 mL 含 200 g/L 胎牛血清的 SMGM, 加入 20 g/L 抗菌素 (青霉素 G 钠 200 kU/L, 硫酸链霉素 200 g/L, 两性霉素 B 0.5 g/L)、2 mmol/L 谷氨酰胺、5  $\mu$ g/L SCF (stem cell factor from mouse, Sigma, USA), 吹打均匀, 轻轻吸取出上清, 平均加到带有圆形盖玻片的无菌六孔培养板 (Corning, USA) 中. 在 37℃、50 mL/LCO<sub>2</sub> 培养箱 (Jouan SA, France) 中孵育. 48 h 后, 培养基换为含有 SCF 的 SMGM, 加入 20 g/L 抗菌素和 2 mmol/L 谷氨酰胺. 培养基隔日更换. 取贴壁良好的细胞玻片, 弃去培养基, 用 40 g/L 多聚甲醛 (PBS 稀释) 溶液 4℃ 固定 30 min. 固定后, 标本在 PBS 液 (0.01 mol/L pH 7.4) 中冲洗 45 min (3 $\times$ 15 min). 在含 100 mL/L 山羊血清 (北京中山试剂公司) 的 PBS 液中室温 (21–24℃) 孵育 60 min, 减少非特异性抗体的结合. 标本中加入兔抗大鼠 c-Kit 蛋白多克隆 IgG 抗体 (c-19, Santa Cruz, USA, 1:200, PBS 稀释) 37℃

温箱孵育 1 h, 4℃ 冰箱孵育过夜. 用 PBS 液冲洗 (3 $\times$ 5 min), 加入次级抗体 FITC 结合山羊抗兔 IgG 抗体 (Sigma, USA, 1:50, PBS 稀释) 37℃ 温箱避光孵育 60 min. 阴性对照不加一抗, 只用 PBS, 余操作步骤相同. 将玻片置于 Chamber Slide (Molecular probes, USA) 上, 采用 Olympus 倒置显微镜 (CK40 型, Japan) 和 Bio-Rad Radiance 2000 激光扫描共聚焦显微镜 (USA) 观察结果并采集图像.

## 2 结果

培养 3 d 后, 可分辨出 ICC 形态, 胞体呈三角形, 可见大的细胞核, 核周胞质少, 突起伸展, 与平滑肌有显著不同 (图 1A). 培养 5 d 后, ICC 形态更加清晰, 大的胞核很清楚, 自胞体发出的突起向周围伸长; 相邻的平滑肌细胞呈梭形, 二者从形态上很容易区分 (图 1B). 培养 7 d 后, 相邻 ICC 突起间有连接形成, 部分 ICC 的细胞突起与邻近平滑肌细胞也形成连接 (图 1C). 培养 9 d 后, ICC 细胞突起向各方向伸出, 在初级分支上还可见二级分支, 与相邻 ICC 和平滑肌细胞间形成连接, ICC 突起交织, 形成小的、较为分散的网络 (图 1D). 在共聚焦显微镜下观察, 可见 ICC c-Kit 免疫荧光染色呈阳性 (图 2), 细胞间相互联系, 突起交织, 呈网络状. 同时培养的平滑肌细胞 c-Kit 染色为阴性.

## 3 讨论

ICC 的分离很困难. 他们与许多类型的细胞之间紧密相

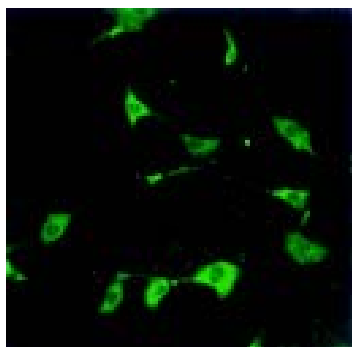


图2 ICC培养9 d后,免疫荧光染色显示c-Kit阳性( $\times 200$ ).

连,如平滑肌细胞和神经纤维束.同时,成年动物的胃肠道ICC包埋在致密的结缔组织基质中,尤其是胶原纤维<sup>[1]</sup>.有关犬结肠、小鼠和豚鼠胃肠道的ICC分离、培养至今已有报道,但对Wistar大鼠胃肠道ICC细胞的分离、培养还未见报道.我们参照Koh *et al*<sup>[2]</sup>方法,适当改进,首次进行大鼠胃ICC的分离和培养.实验只选用II型胶原酶进行酶解,因为胶原酶具有很好的活性,且对细胞损害最小<sup>[3]</sup>.细胞培养2-3 d后ICC的突起伸展出来,胞体呈三角形或梭形,核大而明显,伴少量核周胞质,可与平滑肌细胞明显区分.细胞培养4-5 d,可见ICC的突起明显,向周围的细胞伸展,个别细胞与ICC或平滑肌细胞有接触.细胞培养7 d后,可见ICC相互之间及与平滑肌细胞之间有连接,部分ICC形成小的网络状结构.文献报道<sup>[4-7]</sup>,培养2-3 d即可见到明显ICC网络或细胞团簇,培养ICC的同时也会有平滑肌细胞生长,二者很容易区分.本实验的ICC生长缓慢,平滑肌细胞生长较好,3-5 d即可见成团的平滑肌细胞,其中间或有ICC.研究表明<sup>[8-10]</sup>干细胞因子(stem cell factor, SCF)是ICC生长和发育所必需的,也与c-kit基因表达密切相关.实验中ICC浓度较低,生长缓慢可能是由于培养中加入的干细胞因子(stem cell factor, SCF)是小鼠源性,与实验大鼠有一定的种属差别,导致ICC生长发育缓慢.其次,由于ICC对缺氧十分敏感,我们实验的温箱环境与文献<sup>[2, 11]</sup>不太一致,氧浓度不足可能也是ICC生长发育迟缓的原因之一.

为取得良好的细胞分离和培养结果,实验中应注意:(1)在清洗组织、去除胃黏膜和黏膜下层过程中,避免过度牵拉肌组织,尽可能使用较小的机械性拉力,使获得的ICC数量增加;(2)在混悬细胞时,快速吸取或吹打,且使用的吸管口径偏小,可降低随后培养细胞的成功率;(3)由于ICC的细胞间连接紧密,适宜的酶解浓度可有效使细胞分散,且避免大量细胞因酶浓度过高而破裂;(4)分散细胞尽量采用轻微振荡,避免剧烈操作;(5)酶消化时间应适中,自剪切成肌条小块到最后接种培养的时间尽量缩短;(6)

尽可能选取鼠龄较短的大鼠作为实验对象,细胞生长较快.因为刚酶解后的ICC形态变圆,突起消失,失去了c-Kit免疫活性<sup>[12]</sup>,在细胞悬液内难以与其他细胞区分出来. ICC在培养3-5 d后,具备了典型的细胞形态,有利于在相差显微镜下与平滑肌细胞相区分;且c-Kit免疫活性在培养24 h后恢复,更利于标记和区分<sup>[2]</sup>.在培养细胞团和细胞网络中,为了较好的区分出ICC,特异性免疫标记就更重要.

胃肠道中,c-Kit免疫活性只在ICC中表达<sup>[13]</sup>.目前c-Kit抗体的免疫组化检测,作为一种特异的ICC染色法,用于研究ICC分布、密度、ICC之间和ICC与其他类型细胞的关系及变化<sup>[14-15]</sup>.c-kit基因为原癌基因,位于5号染色体W位点上,编码具有酪氨酸激酶的细胞表面跨膜受体c-Kit,后者对ICC的发育和功能维持至关重要<sup>[15-18]</sup>.根据ICC的特性,我们采用c-Kit抗体标记,进行免疫荧光染色,确定培养细胞的类型.发现c-Kit免疫活性仍为ICC所特有,平滑肌细胞无着色.荧光显微镜下可见ICC细胞突起向各个方向伸展,相互联系,交织成网络状;细胞呈梭形或三角形,核大、核周胞质较少;相差显微镜下可见ICC突起与平滑肌细胞之间也有联系.分离的ICC需2-3 d培养才伸出分支,且ICC在培养条件下有很高的形成网络特性<sup>[2-3]</sup>.ICC之间以及与平滑肌细胞的相互连接是ICC发育的基础,保持这些细胞类型之间的相互作用可维持ICC的正常功能.我们采用的分离和培养方法简便易行,操作并不复杂,所需试剂也易于购置.实验所得ICC细胞形态完整,数量较多,可以进行常规各种细胞学和细胞电生理研究.大鼠胃ICC分离培养的成功有利于今后不断深入研究ICC的起搏机制,发现和阐明各种离子通道和信号传导途径,进一步研究ICC在各种胃肠运动功能障碍疾病中的作用机制和相关药物治疗作用的靶位点. ICC的分离和培养方法日臻完善,对其进行深入研究已成为可能.

#### 4 参考文献

- 1 Fausone-Pellegrini MS. Histogenesis, structure and relationships of interstitial cells of Cajal (ICC): from morphology to functional interpretation. *Eur J Morphol* 1992;30:137-148
- 2 Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J Physiol* 1998;513(Pt1):203-213
- 3 Lee JC, Thuneberg L, Berezin I, Huizinga JD. Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1999;277(2 Pt 1):G409-423
- 4 Torihasi S, Fujimoto T, Trost C, Nakayama S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem* 2002;277:19191-19197
- 5 Kim YC, Koh SD, Sanders KM. Voltage-dependent inward currents of interstitial cells of Cajal from murine colon and small intestine. *J Physiol* 2002;541(Pt 3):797-810

- 6 Kim TW, Koh SD, Ordog T, Ward SM, Sanders KM. Muscarinic regulation of pacemaker frequency in murine gastric interstitial cells of Cajal. *J Physiol* 2003;546(Pt2):415-425
- 7 Zhu Y, Golden CM, Ye J, Wang XY, Akbarali HI, Huizinga JD. ERG K<sup>+</sup> currents regulate pacemaker activity in ICC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1249-1258
- 8 Mikkelsen HB, Malysz J, Huizinga JD, Thuneberg L. Action potential generation, Kit receptor immunohistochemistry and morphology of steel-Dickie(SI/Sld)mutant mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 1998;10:11-26
- 9 Ordog T, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach. *J Physiol* 1999;518(Pt1):257-269
- 10 Rich A, Miller SM, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G. Local presentation of Steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G313-320
- 11 Jun JY, Choi S, Chang IY, Yoon CK, Jeong HG, Kong ID, So I, Kim KW, You HJ. Deoxycholic acid inhibits pacemaker currents by activating ATP-dependent K<sup>+</sup> channels through prostaglandin E2 in interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *Br J Pharmacol* 2004;29:1-10
- 12 Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, Doherty P, Walker RL, Sanders KM, Ward SM, Horowitz B. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C529-359
- 13 Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* 2003;39:137-161
- 14 Vannucchi MG. Receptors in interstitial cells of Cajal: identification and possible physiological roles. *Microsc Res Tech* 1999;47:325-335
- 15 Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jimenez M. Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G255-266
- 16 Wester T, Eriksson L, Olsson Y, Olsen L. Interstitial cells of Cajal in the human fetal small bowel as shown by c-kit immunohistochemistry. *Gut* 1999;44:65-71
- 17 Hirst GD, Ward SM. Interstitial cells: involvement in rhythmicity and neural control of gut smooth muscle. *J Physiol* 2003;550(Pt2):337-346
- 18 Daigo Y, Takayama I, Ponder BA, Caldas C, Ward SM, Sanders KM, Fujino MA. Differential gene expression profile in the small intestines of mice lacking pacemaker interstitial cells of Cajal. *BMC Gastroenterol* 2003;3:17

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2005年全国胃病诊治研讨会征文通知

**本刊讯** 为了推动消化内镜及相关专业对各种胃病的诊断与治疗研究进展,中华医学会消化内镜学分会定于2005-06在大连召开全国胃病诊治研讨会.会议将安排专题报告,论文交流,图像演示及自由讨论等内容.现将征文内容及有关事宜通知如下:

### 1 征文内容

(1)各种胃病的内镜,病理诊断及分类;分型;(2)各种胃病与 *H pylori*;(3)各种胃病与胃肠激素;(4)各种胃病与胃肠动力学;(5)放大内镜对胃良性病变,癌前病变及早期胃癌的诊断应用;超声内镜对胃良性,恶性疾病的诊断应用;(6)各种胃病的药物治疗(胃黏膜保护剂,药物根除 *H pylori*,各种抗酸,抑酸剂,改善胃动力失常药剂及抗癌剂等);(7)内镜下对某些胃炎,溃疡病,早期胃癌的治疗;对各种胃病的诊断与治疗以及其他临床研究与基础研究.

### 2 稿件要求

全文及摘要(摘要800-1000字),均用中文打印(要求有光盘);截稿日期为2005年3月20日.

### 3 投稿地址及联系方式

地址:辽宁省沈阳市和平区砂阳路252号,中华医学会辽宁分会学术会务部(邮编:110015)

联系人:刘敏杰 电话:024-23391410,传真:024-23391410(稿件注明:“全国胃病学术会”)

主办:中华医学会消化内镜学分会

承办:中华医学会辽宁分会

# 睡眠剥夺对胃黏膜血流量及胃黏膜损伤的影响

易军, 宫卫东, 王岭, 凌瑞, 马中

易军, 王岭, 凌瑞, 马中, 中国人民解放军第四军医大学西京医院普外科 陕西省西安市 710032

宫卫东, 中国人民解放军第四军医大学科研部 陕西省西安市 710032  
易军, 男, 1969-03-27 生, 陕西省西安市人, 汉族, 2000 年第四军医大学普外科硕士, 主治医师, 主要从事胃肠道疾病的基础与临床研究。

项目负责人: 易军, 710032, 陕西省西安市长乐西路 15 号, 中国人民解放军第四军医大学附属西京医院普外科, yijun001@163.net  
电话: 029-83373939

收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2005-01-05

## Effects of sleep deprivation on gastric mucosal blood flow and gastric mucosal lesions in rats

Jun Yi, Wei-Dong Gong, Ling Wang, Rui Ling, Zhong Ma

Jun Yi, Ling Wang, Rui Ling, Zhong Ma, Department of General Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Wei-Dong Gong, Administrative Department of Science Research, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jun Yi, Department of General Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. yijun001@163.net

Received: 2004-12-07 Accepted: 2005-01-05

## Abstract

**AIM:** To observe the changes of gastric mucosal blood flow and gastric mucosal lesions in rats after sleep deprivation.

**METHODS:** Sleep deprivation was induced in male Sprague-Dawley rats housed on small platform over water. Control mice were housed either in normal cages or on large platform over water. Laser Doppler blood flow meter was used to measure the gastric mucosal blood flow, and index of gastric mucosal lesions was quantified. The arterial plasma levels of endotoxin (ET) and calcitonin gene related peptide (CGRP) were measured by radioimmunoassay.

**RESULTS:** Compared with control mice in normal cage, on big platform, or the mice on the 1<sup>st</sup> day of sleep deprivation, the gastric mucosal blood flow of mice on the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day of sleep deprivation ( $54.2 \pm 2.5$ ,  $53.7 \pm 3.0$ ,  $48.3 \pm 2.5$  mv, respectively) were significantly lower. The gastric mucosal injury became more and more serious: the injury indices were  $29.8 \pm 3.2$ ,  $3.7 \pm 3.6$  and  $34.8 \pm 3.5$  on the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day of sleep deprivation, respectively. The serum levels of ET were  $123 \pm 28$ ,  $139 \pm 36$  and  $149 \pm$

$38$  ng/L in mice on the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day of sleep deprivation, and the levels of CGRP were  $193 \pm 32$  and  $221 \pm 40$  ng/L in the mice on the 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day of sleep deprivation. All were significantly higher than those in control mice.

**CONCLUSION:** Sleep deprivation can cause the decrease of gastric mucosal blood flow and the gastric mucosal injury, which are accompanied by the elevation of serum ET and CGRP.

**Key Words:** Gastric mucous membrane; Blood flow; Lesion; Sleep deprivation

Yi J, Gong WD, Wang L, Ling R, Ma Z. Effects of sleep deprivation on gastric mucosal blood flow and gastric mucosal lesions in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(4):499-503

## 摘要

**目的:** 探讨睡眠剥夺(SD)对大鼠胃黏膜血流量及胃黏膜损伤的影响。

**方法:** 采用小站台水环境法建立大鼠SD模型, 以正常单独笼养组(CC)和大平台实验对照组(TC)作为对照组, 应用激光多普勒微循环血流计检测胃黏膜血流量, 观察胃黏膜损伤。用放射免疫法(RIA)测定动脉血中内皮素(ET)和降钙素基因相关肽(CGRP)的水平。

**结果:** 在SD3 d、5 d、7 d大鼠胃黏膜血流量与CC组、TC组和SD1d组比较明显下降, 血流量分别为( $54.2 \pm 2.5$ )、( $53.7 \pm 3.0$ )、( $48.3 \pm 2.5$ )mv;大鼠胃黏膜损伤与CC组、TC组和SD1d组比较明显加重, 溃疡指数分别为( $29.8 \pm 3.2$ )、( $33.7 \pm 3.6$ )、( $34.8 \pm 3.5$ )。同时SD3 d、5 d、7 d大鼠血浆中ET和CGRP的水平发生明显改变, 血浆中ET含量分别为( $123 \pm 28$ )ng/L、( $139 \pm 36$ )ng/L、( $149 \pm 38$ )ng/L;SD5 d、7 d, CGRP含量分别为( $193 \pm 32$ )ng/L、( $221 \pm 40$ )ng/L。

**结论:** SD可导致胃黏膜血流量下降及胃黏膜损伤并且伴随着血浆ET和CGRP含量的变化。

**关键词:** 胃黏膜; 血流量; 损伤; 睡眠剥夺

易军, 宫卫东, 王岭, 凌瑞, 马中. 睡眠剥夺对胃黏膜血流量及胃黏膜损伤的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(4):499-503  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/499.asp>



## 0 引言

睡眠剥夺(Sleep Deprivation, SD)作为一种强烈的应激源,对机体可产生生理和心理应激反应,以致造成多方面负面影响<sup>[1-2]</sup>。睡眠不仅具有维持个体生存的功能,还有促进生长发育、易化学习、形成记忆的功能。SD是指由于各种原因引起的睡眠丢失状态,并引起情绪、学习记忆、免疫功能等一系列改变。在生活节奏日益加快的今天,睡眠剥夺发生率明显升高。近20 a来,在国外是心理学家,生理学家以及特殊职业研究者和军事机构的研究热点;国内目前也注意到其重要性,在有关其中枢作用机制的研究有报道。在现代社会生活中,人们面临着紧张的工作环境。睡眠障碍越来越多地受到学者们的关注,目前有关应激(生理性应激、心理性应激)对消化系统功能的影响研究较多,但从事以SD作为应激源对消化系统功能的影响研究不多,尤其是对胃黏膜血流量、胃黏膜损伤及内皮素和降钙素基因相关肽水平的影响研究甚少<sup>[3-4]</sup>。我们通过本实验探讨SD对消化道的作用,为治疗和预防SD对消化功能产生的影响提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 成年,雄性,健康上海产 Sprague-Dawley 大鼠 48 只(第四军医大学实验动物中心提供),体质量(200 ± 20)g。将大鼠随机分为 6 组,每组 8 只:正常单独笼养组(normal cage control, CC);SD 1 d 组;SD 3 d 组;SD 5 d 组;SD 7 d 组;大平台实验对照组(tank control, TC)。采用小站台水环境法<sup>[6]</sup>(flower pot technique)建立大鼠 SD 模型。SD 实验箱为 30 cm×30 cm×40 cm 玻璃水箱,正中直立一直径 6.3 cm,高 8.0 cm 的平台。平台周边注满水,水温保持在 20℃ 左右,水距平台 1.0 cm。大鼠在平台上可自由饮食饮水,若其睡眠,会因肌张力松弛而落入水中警醒。为排除隔离和水环境造成的影响,设立大平台实验对照组,其平台直径为 18.0 cm,大鼠在平台上有一定活动空间,可以睡眠,其他环境与实验组相同。SD 期间持续 40W 日光灯照射,每天更换

箱中的水。对照组单独笼养,自然昼夜光照,饲养条件同 SD 组。实验前,让大鼠熟悉适应环境 1 wk。

### 1.2 方法

1.2.1 胃黏膜血流量检测 应用激光多普勒微循环血流计(LDF-3)测定。剑突下正中切开腹壁,充分暴露胃后,切开胃体前壁约 0.5 cm,将血流仪探头插入切口内,接触胃后壁黏膜,待血流稳定后开始测量,每个部位测 2 次,每次测 1 min,计算 2 次的平均值。

1.2.2 胃黏膜损伤检测 解剖大鼠,将胃从腹腔中取出,沿大弯侧剪开、展平,按照 Guth 标准<sup>[7]</sup>进行,观察记录胃黏膜上点、线条状出血灶的长度并将其打分。病灶长度<1 mm 记 1 分,长度 1-2 mm 记 2 分,2-3 mm 记 3 分,3-4 mm 记 4 分,若病灶长度>4 mm 则分段计分,病灶宽于 2 mm 时分数乘以 2,最后将全胃各病灶分数相加的总和作为动物损伤的溃疡指数(ulcer index, UI)。

1.2.3 ET 和 CGRP 的检测 SD1, 3, 5 d 组分别于睡眠剥夺 1, 3, 5 d, CC 组、TC 组和 SD 7 d 组于睡眠剥夺 7 d 取尾血 4 mL 加入 100 g/L 乙二胺四乙酸钠 30 μL 和 40 000 kU/kg 抑肽酶的试管中,混匀,于 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆, -20℃ 下保存待测定。采用放射免疫法测定血浆中 ET 和 CGRP 含量。ET 及 CGRP 试剂由解放军总医院东亚免疫技术研究所提供,操作程序严格按照说明书进行。

**统计学处理** 采用 SPSS10.0 统计软件处理分析。数据均以 mean ± SD 表示,采用完全随机设计方差分析, LSD 法进行多组间两两均数比较。

## 2 结果

2.1 胃黏膜血流量 SD1d 组胃黏膜血流量与 CC 组和 TC 组相比未见明显差异( $P>0.05$ );SD 3 d 组、SD 5 d 组、7 d 组与 CC 组、TC 组及 SD 1 d 组相比显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ , 表 1)。

2.2 胃黏膜损伤 SD1d 组胃黏膜溃疡指数与 CC 组和 TC 组相比未见明显差异( $P>0.05$ );SD 3 d 组、SD 5 d 组、7 d 组与 CC 组、TC 组及 SD 1 d 组相比显著升

表1 SD大鼠胃黏膜血流量、溃疡指数及ET、CGRP水平的变化( $n=8$ , mean±SD)

Group	GMBF(mV)	UI	ET(ng/L)	CGRP(ng/L)
CC	58.3 ± 2.5	3.6 ± 2.1	103 ± 23	151 ± 26
1 d	57.6 ± 2.7	5.4 ± 2.7	102 ± 26	153 ± 31
3 d	54.2 ± 2.5 <sup>a</sup>	29.8 ± 3.2 <sup>a</sup>	123 ± 28 <sup>b</sup>	166 ± 25
5 d	53.7 ± 3.0 <sup>a</sup>	33.7 ± 3.6 <sup>a</sup>	139 ± 36 <sup>a</sup>	193 ± 32 <sup>b</sup>
7 d	48.3 ± 2.5 <sup>b</sup>	34.8 ± 3.5 <sup>a</sup>	149 ± 38 <sup>a</sup>	221 ± 40 <sup>a</sup>
TC	57.9 ± 2.6	4.3 ± 2.2	104 ± 27	152 ± 33

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs CC, TC, SD 1 d Group.



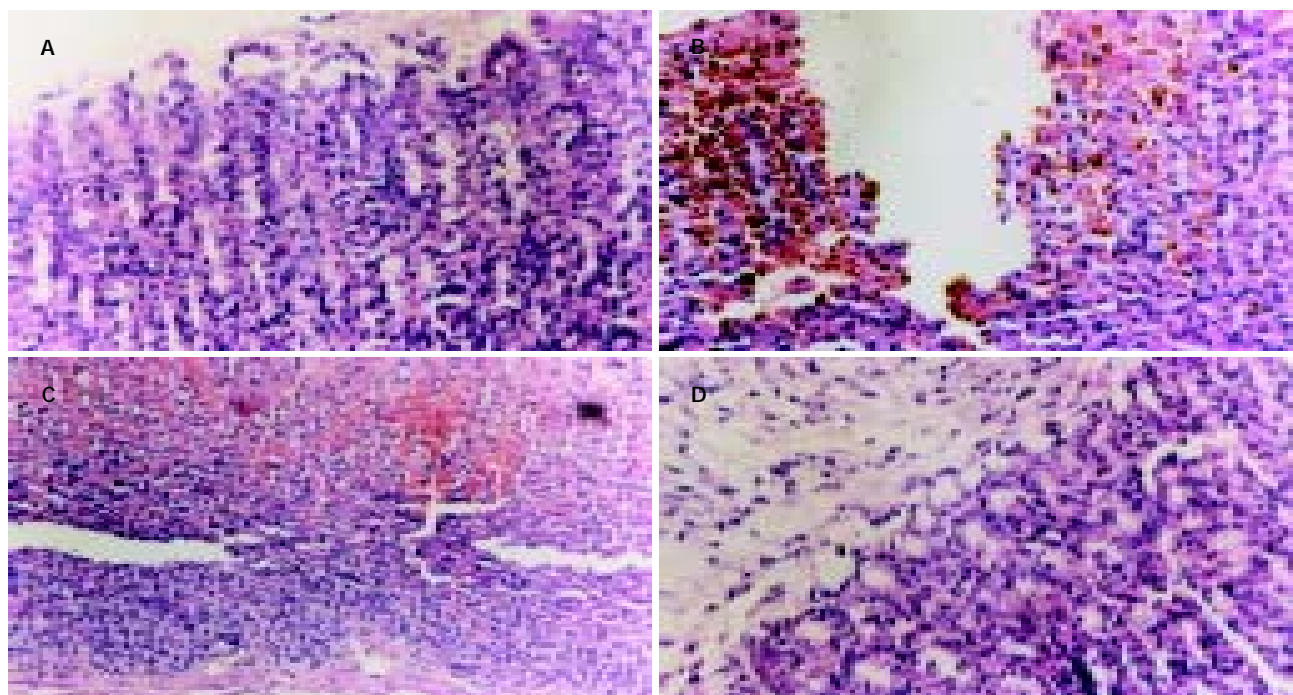


图1 大鼠胃黏膜光镜检查结果(HE). A: 正常单独笼养组,  $\times 400$ ; B: SD 3 d组,  $\times 400$ ; C: SD 5 d组,  $\times 400$ ; D: 大平台实验对照组,  $\times 400$ .

高( $P<0.01$ , 表1). 正常单独笼养组光镜下观察胃:黏膜连续性完整, 组织结构正常, 细胞排列紧密(图1A). SD 3 d组: 黏膜连续性中断、糜烂, 黏膜可见炎细胞浸润, 伴有红细胞渗出, 组织变性坏死轻微(图1B). SD 5 d组: 黏膜连续性中断, 有溃疡形成, 黏膜层可见炎细胞浸润明显, 伴广泛的红细胞渗出及坏死组织(图1C). 大平台实验对照组: 黏膜连续性完整, 未见组织变性和坏死(图1D).

**2.3 ET、CGRP的含量** SD1d组ET水平与CC组和TC组相比未见明显差异( $P>0.05$ ), 但SD 3 d组、SD 5 d组和SD 7 d组与CC组、TC组及SD 1 d组相比明显增高( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.01$ ) (表1); SD 3 d组CGRP含量与CC组和TC组及SD 1 d组相比未见明显差异( $P>0.05$ ), 而SD 5 d组、7 d组CGRP含量与CC组、TC组、SD 1 d组和SD 3 d组相比升高, 且有显著性差异( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ , 表1).

### 3 讨论

睡眠剥夺是心理生理应激的一种<sup>[2]</sup>. 现代化战争昼夜连续作战, 缺少睡眠或睡眠被剥夺引起精神疲劳是经常发生的<sup>[5]</sup>. 目前对睡眠剥夺导致胃黏膜血流量、胃黏膜损伤及ET和CGRP水平改变的研究报道尚少. ET是目前所知的血管内皮细胞最强大的血管活性肽, 具有强烈的收缩血管作用. 全身多种组织器官都有ET的合成分泌<sup>[8-9]</sup>. 生理条件下, 它在调节血管张力和局部组织微循环灌注中起着非常重要的作用<sup>[10-13]</sup>. 而在许多病理情况下, 多种病理应激因素<sup>[14-16]</sup>可刺激机体大量合

成释放ET<sup>[17-19]</sup>, 参与机体的多种病理生理过程<sup>[20-21]</sup>. 降钙素基因相关肽与内皮素相反, 是体内最强的扩血管物质, 广泛分布于神经和心血管系统<sup>[22]</sup>. 已有较多研究证明, 内皮素和降钙素基因相关肽在心脑血管疾病、肾脏疾病、糖尿病等疾病中有重要意义, 有关ET和CGRP参与胃黏膜损伤亦有报道<sup>[23]</sup>, 其中ET有强烈的缩血管和致溃疡作用, 而CGRP则有增加胃黏膜血流和细胞保护作用.

从本实验观察结果来看, 睡眠剥夺使胃黏膜血流量减少, 胃黏膜产生损伤, 而且随着所处应激环境时间的延长, 胃黏膜损伤程度也不断增强, 与应激引起胃黏膜损伤的文献<sup>[8]</sup>报道一致. 近年有研究提示ET与应激性溃疡关系密切, 尤其是出血性损害之间的关系更为密切<sup>[24-25]</sup>, 可能在应激性胃黏膜损伤中起着重要的致病作用<sup>[26-29]</sup>. 在SD实验中, ET在SD 3 d, SD 5 d和SD 7 d明显升高, 且与胃黏膜血流量下降、胃黏膜损伤指数一致, ET水平增高使胃黏膜组织血液灌注减少, 提示显著降低GMBF可能是ET诱发应激性胃黏膜损伤的重要机制之一<sup>[30-31]</sup>. 有报道, 应激反应刺激机体外周血管产生ET增加, 局部ET升高可使血管产生强烈而持久的收缩, 从而加重组织缺血性损伤, 形成恶性循环<sup>[32]</sup>. 另有研究表明ET还可通过收缩血管导致引起组织缺血、缺氧、抑制 $K^+$ -ATP通道, 促进体内脂质过氧化反应<sup>[33-35]</sup>, 引起氧自由基及MDA大量产生<sup>[36-38]</sup>, 二者对组织细胞有较强的攻击损伤作用<sup>[39-42]</sup>. 本实验还显示大鼠血浆中CGRP水平是在SD 5 d和SD 7 d增加, 比ET明显升高晚, 表明CGRP

是一种代偿性. 有作者报道 CGRP 在损伤后的明显上升, 它具有拮抗 ET 的缩血管作用, 但二者在调节黏膜微循环中的作用并不是简单的相反血管活性特征<sup>[21, 37]</sup>.

应激源的不断作用势必对某些脏器的功能产生影响, 导致一些临床症状的发生<sup>[8]</sup>. 从本实验的另一方面我们还可以看到, 睡眠剥夺应激使胃黏膜血流量明显减少, 且胃黏膜血流量减少是胃黏膜损伤的重要机制之一<sup>[38, 43-45]</sup>. 从我们统计的溃疡指数中可以看出, 随着应激时间的延长, 胃黏膜溃疡指数不断增加, 说明胃黏膜损伤的程度不断加大, 由此提示应激对象作用的时间越长, 对应激对象的损伤作用就会更加明显, 因此看来, 应激源对应激对象作用不但对其功能产生影响, 而且器质性病变也再所难免<sup>[8, 46]</sup>.

睡眠障碍因素的不断作用就会导致某些疾病的发生, 所以, 研究睡眠剥夺对消化道功能的影响, 对消除某些睡眠剥夺的因素, 减少某些疾病的发生机会, 或者对消化系统某些疾病的预防和治疗将起到重要作用. 因此, 随着社会竞争程度的不断加强, 睡眠对人体健康和生活质量的影响应当受到人们的足够重视.

#### 4 参考文献

- Papakonstantinou E, Ryan DH, Harris RB. Dietary fish oil does not protect rats exposed to restraint or sleep deprivation stress. *Physiol Behav* 2003;78:759-765
- Edell-Gustafsson UM, Gustavsson G, Yngman Uhlin P. Effects of sleep loss in men and women with insufficient sleep suffering from chronic disease: a model for supportive nursing care. *Int J Nurs Pract* 2003;9:49-59
- Landrigan CP, Rothschild JM, Cronin JW, Kaushal R, Burdick E, Katz JT, Lilly CM, Stone PH, Lockley SW, Bates DW, Czeisler CA. Effect of reducing interns' work hours on serious medical errors in intensive care units. *N Engl J Med* 2004;351:1838-1848
- Nie SN, Qian XM, Wu XH, Yang SY, Tang WJ, Xu BH, Huang F, Lin X, Sun DY, Sun HC, Li ZS. Role of TFF in healing of stress-induced gastric lesions. *World J Gastroenterol* 2003;9:1772-1776
- Lieberman HR, Tharion WJ, Shukitt-Hale B, Speckman KL, Tulley R. Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U. S. Navy SEAL training. Sea-Air-Land. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;164:250-261
- 刘长云, 王海明, 陈坚, 季红光, 周建光. 大鼠睡眠剥夺后行为及下丘脑诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的变化. 第二军医大学学报 2002;23:281-283
- 郝悦, 黄裕新, 王景杰. 心里性应激对大鼠胃排空的影响及胃黏膜的损伤. 第四军医大学学报 2002;23:603-605
- Matsumoto T, Yoshiyama S, Kobayashi T, Kamata K. Mechanisms underlying enhanced contractile response to endothelin-1 in diabetic rat basilar artery. *Peptides* 2004;25:1985-1994
- Paxian M, Keller S, Baveja R, Korneszczyk K, Huynh T, Clemens M. Functional Link Between ETB Receptors and eNOS Maintain Tissue Oxygenation in the Normal Liver. *Microcirculation* 2004;11:437-451
- Wang T, Luo F, Shan R, Zhen Y, Zhao J, Zhang S. Changes of endothelin and calcitonin gene-related peptide during desflurane anesthesia in patients undergoing intracranial aneurysm clipping. *J Neurosurg Anesthesiol* 2004;16:236-239
- Okada Y, Ichikawa M, Ishii K, Hara H. Effects of topically instilled bunazosin hydrochloride and other ocular hypotensive drugs on endothelin-1-induced constriction in rabbit retinal arteries. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48:465-469
- Hikosho S, Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirotsani S, Takeda T, Kashiwase K, Watanabe T, Taniike M, Tsujimoto I, Asahi M, Matsumura Y, Nishida K, Nakajima H, Akira S, Hori M, Otsu K. Pressure overload induces cardiac dysfunction and dilation in signal transducer and activator of transcription 6-deficient mice. *Circulation* 2004;110:2631-2637
- 张文奎, 乔骋, 曾勇. 吸入性损伤患者血浆内皮素-1测定. 标记免疫分析与临床 2002;1:17-19
- Caballero-George C, Vanderheyden PM, Okamoto Y, Masaki T, Mbawambo Z, Apers S, Gupta MP, Pieters L, Vauquelin G, Vlietinck A. Evaluation of bioactive saponins and triterpenoidal aglycons for their binding properties on human endothelin ET(A) and angiotensin AT(1) receptors. *Phytother Res* 2004;18:729-736
- Turner NA, O'regan DJ, Ball SG, Porter KE. Endothelin-1 is an essential co-factor for beta2-adrenergic receptor-induced proliferation of human cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* 2004;576:156-160
- Li L, Roumeliotis N, Sawamura T, Renier G. C-Reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: Relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction. *Circ Res* 2004;95:877-883
- Liu CC, Chen ZC, Cheng BC, Lin MT. Prior Antagonism of endothelin-1A receptors alleviates circulatory shock and cerebral ischemia during rat heatstroke. *A J Pharmacol Sci* 2004;96:177-187
- 张泽伟, 林茹, 李建华, 胡劲, 王旭. 血浆 ET 和 CGRP 对先心病肺动脉高压术后的调控. 浙江大学学报医学版 2003;32:212-214
- 聂时南, 钱晓明, 唐文杰, 李兆申. 应激状态下大鼠胃黏膜适应性细胞保护作用的研究. 中国危重病急救医学 2003;15:222-225
- Goto K. Prospect of endothelin-related drugs. *Nippon Rinsho* 2004;62(Suppl 9):673-681
- 傅华, 杨丽, 刘小青, 胡宏德, 强欧, 黄明慧. CGRP 和 ET-1 在肝纤维化大鼠心肌组织中的表达及意义. 华西医科大学学报 2001;32:200-201
- 褚延魁, 马庆久, 刘维, 鲁建国, 何显力, 杜锡林. ET-1 与梗阻性黄疸冷应激肾损害. 第四军医大学学报 2003;24:2182-2184
- 徐为, 沈士刚. 内皮素-1 与梗阻性黄疸大鼠应激性溃疡关系的研究. 中国普通外科杂志 2003;12:508-510
- Wang Y, Wang DH. Prevention of endothelin-1-induced increases in blood pressure: role of endogenous CGRP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1868-1874
- 刘晓岩, 王银叶, 陈世忠, 李长龄. 实验性心肌缺血时内源性 ET, CGRP 和 NO 水平的变化及心舒平的调节作用. 中国中药杂志 2002;27:534-537
- 傅华, 杨丽, 刘小青, 强欧, 黄明慧. 肝硬化患者外周血中 TGF 和 ET-1 的表达. 华西医科大学学报 2001;32:202-203
- 段义民, 李兆申, 湛先保, 龚燕芳, 屠振兴. 内皮素-1 抗体对应激性胃黏膜损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2003;11:990-993
- Akimoto M, Hashimoto H, Maeda A, Shigemoto M, Yamashita K. Roles of angiogenic factors and endothelin-1 in gastric ulcer healing. *Clin Sci (Lond)* 2002;(Suppl 48):450S-454S
- 董秀云, 周丽雅, 林三仁, 茹炳银, 方敏. 小肠三叶因子保护胃黏膜促进溃疡愈合的实验研究. 北京大学学报 2003;35:639-641
- Kozakai T, Zhao H, Sakate M, Masuo Y, Uchida T, Saida K. Effect of aging on gene expression rates of endothelin-1 and endothelin-2/vasoactive intestinal contractor in ethanol-induced gastric mucosal injury of the mouse. *Clin Sci (Lond)* 2002;103(Suppl 48):455S-458S
- Zhuikova SE, Samonina GE. Homeostasis of the gastric mucosa and blood circulation. 2. Role of ischemia in disruption of the gastric mucosa. *Usp Fiziol Nauk* 2002;33:77-87
- Lazaratos S, Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Goto K, Nakahara A. Oxygen radicals mediate the final exacerbation of endothelin-1-induced gastric ulcer in rat. *Eur J Pharmacol* 2001;413:121-129

- 33 Maity P, Biswas K, Roy S, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer—recent mechanistic update. *Mol Cell Biochem* 2003;253:329-338
- 34 Slomiany BL, Slomiany A. Role of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase cascades in gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *IUBMB Life* 2001;51:315-320
- 35 杨院平, 邓长生, 朱尤庆, 张燕敏, 张可. 吡啶美辛胃损伤中内皮素、一氧化碳、氧自由基的作用及其与胃动力的关系. *临床消化病杂志* 2002;14:69-71
- 36 Matsumoto T, Yoshiyama S, Kobayashi T, Kamata K. Mechanisms underlying enhanced contractile response to endothelin-1 in diabetic rat basilar artery. *Peptides* 2004;25:1985-1994
- 37 Wang XZ, Zhang LJ, Li D, Huang YH, Chen ZX, Li B. Effects of transmitters and interleukin-10 on rat hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *World J Gastroenterol* 2003;9:539-543
- 38 Benigni A, Perico N, Remuzzi G. The potential of endothelin antagonism as a therapeutic approach. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13:1419-1435
- 39 Yokoyama Y, Toth B, Kitchens WC, Schwacha MG, Rue LW. Estradiol's effect on portal response to endothelin-1 after trauma-hemorrhage. *J Surg Res* 2004;121:25-30
- 40 Yokoyama Y, Toth B, Kitchens WC, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. Role of thromboxane in producing portal hypertension following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1293-1299
- 41 Uhlmann D, Armann B, Gaebel G, Ludwig S, Hess J, Pietsch UC, Escher E, Fiedler M, Tannapfel A, Hauss J, Witzigmann H. Endothelin A receptor blockade reduces hepatic ischemia/reperfusion injury after warm ischemia in a pig model. *J Gastrointest Surg* 2003;7:331-339
- 42 黄勇华, 赵志娟, 张微微, 王伟. 鼠脑出血后海马内皮素-1变化与脑出血继发性损伤. *中国临床康复* 2003;7:2140-2141
- 43 庄旭丹, 吕俊华, 杨文忠, 杨美玲. 红丝线提取物对肾性高血压大鼠血压、一氧化氮、内皮素的影响. *中药材* 2003;26:266-269
- 44 Yoshida M, Wakabayashi G, Ishikawa H, Kawachi S, Tanabe M, Otani Y, Shimazu M, Kubota T, Kitajima M. Arteriovenous shunting blood flow is intravitaly observed in the stomach after thermal injury in rats. *Keio J Med* 2002;51:193-200
- 45 Holzer P, Painsipp E. Differential effects of clonidine, dopamine, dobutamine, and dopexamine on basal and acid-stimulated mucosal blood flow in the rat stomach. *Crit Care Med* 2001;29:335-343
- 46 秦明, 黄裕新, 王景杰, 赵保民, 高巍, 王庆莉. 电针对应激大鼠血浆 EGF 和 CGRP 及胃黏膜损伤的影响. *第四军医大学学报* 2001;21:797-799

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2004年度国家自然科学基金重点学术期刊评审揭晓

经专家评审, 国家自然科学基金委员会委务会议审定, 2004 年度共有 31 种学术期刊获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助. 资助期限为两年, 资助强度分别为每年 10 万元和 12 万元, 总经费 696 万元. 为了进一步提高评审工作的科学性、权威性、公正性, 2004 年的评审程序做了相应调整, 以“LJCR 和 CJCR 检索数据的定量测评为主, 辅以函评专家的定性评审意见. 评审结果按学部统计情况为: 数理科学 5 刊, 化学科学 5 刊, 生命科学 9 刊, 地球科学 4 刊, 工程与材料科学 3 刊, 信息科学 2 刊, 管理科学 1 刊, 综合类 2 刊. (详见下表)

序号	期刊名称	序号	期刊名称	序号	期刊名称	序号	期刊名称
1	数学学报(英)	9	中国化学工程学报(英)	17	生物化学与生物物理学报	25	材料科学技术(英)
2	物理学报	10	化学通报	18	中华医学杂志	26	金属学报
3	中国物理快报(英)	11	中国药理学(英)	19	中国中西医结合杂志	27	计算机科学技术学报(英)
4	天体物理学报(英)	12	世界胃肠病学杂志(英)	20	地质学报(英)	28	电子学报
5	力学学报(英)	13	植物学报(英)	21	地球物理学报	29	管理科学学报
6	高等学校化学学报	14	细胞研究(英)	22	地理学报	30	科学通报(英)
7	化学学报	15	作物学报	23	大气科学进展(英)	31	中国科学
8	分析化学	16	中国农业科学	24	稀有金属材料与工程		

国家自然科学基金委员会科学基金杂志社事业发展处 莫京 武长白 2004-11-18(供稿)

## 三羟基异黄酮诱导胃癌原代细胞凋亡的分子机制

周海波, 颜云, 蔡建庭, 杜勤, 陈金明

周海波, 颜云, 蔡建庭, 杜勤, 陈金明, 浙江大学附属二院消化科 浙江省杭州市 310009  
周海波, 男, 1969-11-08 生, 山东省蒙阴县人, 2003 年山东大学医学博士, 主治医师, 主要从事胃癌的研究  
项目负责人: 周海波, 310009, 浙江省杭州市, 浙江大学附属二院消化科. zhouhaibohz@163.com  
电话: 0571-87783564  
收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2004-12-08

### Genistein induces apoptosis in human primary gastric carcinoma cells

Hai-Bo Zhou, Yun Yan, Jian-Ting Cai, Qin Du, Jin-Ming Chen

Hai-Bo Zhou, Yun Yan, Jian-Ting Cai, Qin Du, Jin-Ming Chen, Department of gastroenterology, the Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China  
Correspondence to: Zhou Hai-Bo, Department of gastroenterology, the Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China. zhouhaibohz@163.com  
Received: 2004-11-09 Accepted: 2004-12-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the apoptosis in primary gastric cancer cells induced by genistein, and its relationship with *bcl-2* and *bax*.

**METHODS:** MTT assay was used to determine cell growth inhibition. Transmission electron microscope and TUNEL staining were used to quantitatively and qualitatively detect apoptosis. Immunohistochemistry and RT-PCR were used to detect the expression of apoptosis-regulated genes *bcl-2* and *bax*.

**RESULTS:** Genistein inhibited the growth of primary gastric cancer cells in a dose- and time-dependent manner. Genistein induced primary gastric cancer cells to undergo apoptosis with typically apoptotic characteristics. TUNEL assay showed that the percentage of apoptotic cells was increased gradually along with the time of genistein treatment ( $1.25 \pm 0.30\%$ ,  $4.97 \pm 0.80\%$ ,  $18.44 \pm 1.92\%$ ,  $35.18 \pm 0.35\%$ , and  $43.93 \pm 1.11\%$  at 0, 24, 48, 72 and 96 h after treatment, respectively,  $P < 0.05$ ). The percentage of *bcl-2* protein positive cells was significantly reduced ( $36.34 \pm 0.72\%$ ,  $21.62 \pm 0.08\%$ ,  $10.60 \pm 0.49\%$ ,  $7.21 \pm 0.45\%$ , and  $4.54 \pm 0.36\%$  at 0, 24, 48, 72 and 96 h after treatment, respectively,  $P < 0.01$ ), whereas the percentage of *bax* protein positive cells was markedly increased ( $10.73 \pm 0.57\%$ ,

$20.63 \pm 0.86\%$ ,  $34.3 \pm 0.81\%$ ,  $45.96 \pm 0.42\%$ , and  $58.61 \pm 1.46\%$ , at 0, 24, 48, 72 and 96 h after treatment, respectively,  $P < 0.01$ ). After exposed to  $20 \mu\text{mol/L}$  genistein for 24, 48, 72 and 96 h, *bcl-2* mRNA was decreased, while *bax* mRNA was increased progressively with elongation of genistein treatment time.

**CONCLUSION:** Genistein can induce apoptosis in primary gastric cancer, which may be mediated by down-regulating the apoptosis-regulated gene *bcl-2* and up-regulating the apoptosis-regulated gene *bax*.

**Key Words:** Genistein; Gastric carcinoma; Apoptosis

Zhou HB, Yan Y, Cai JT, Du Q, Chen JM. Genistein induces apoptosis in human primary gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):504-507

### 摘要

**目的:** 探讨三羟基异黄酮诱导胃癌原代细胞发生凋亡的可能性, 揭示该凋亡发生与基因 *bcl-2* 和 *bax* 之间的关系。

**方法:** 在体外实验中, 采用 MTT 比色法测定三羟基异黄酮对胃癌原代细胞的生长抑制率; 以透射电镜和 TUNEL 染色法, 定性、定量地研究三羟基异黄酮与胃癌原代细胞凋亡的关系; 通过免疫组织化学法和 RT-PCR 法检测基因 *bcl-2* 和 *bax* 的表达。

**结果:** 三羟基异黄酮对胃癌原代细胞有明显抑制作用, 随三羟基异黄酮浓度增加和培养时间的延长而增强; 三羟基异黄酮诱导胃癌原代细胞出现凋亡细胞形态; TUNEL 染色法可见, 经三羟基异黄酮处理 24, 48, 72, 96 h 后, 胃癌原代细胞凋亡数明显随时间增加 ( $1.25 \pm 0.30\% \rightarrow 4.97 \pm 0.80\%$ ,  $18.44 \pm 1.92\%$ ,  $35.18 \pm 0.35\%$ ,  $43.93 \pm 1.11\%$ ,  $P < 0.05$ )。免疫组织化学发现经三羟基异黄酮处理 24, 48, 72, 96 h 后, 胃癌原代细胞的 *Bcl-2* 蛋白阳性率减少 ( $36.34 \pm 0.72\% \rightarrow 21.62 \pm 0.08\%$ ,  $10.60 \pm 0.49\%$ ,  $7.21 \pm 0.45\%$ ,  $4.54 \pm 0.36\%$ ,  $P < 0.01$ ), *Bax* 蛋白阳性率增加 ( $10.73 \pm 0.57\% \rightarrow 20.63 \pm 0.86\%$ ,  $34.3 \pm 0.81\%$ ,  $45.96 \pm 0.42\%$ ,  $58.61 \pm 1.46\%$ ,  $P < 0.01$ )。RT-PCR 也发现经三羟基异黄酮处理 24, 48, 72, 96 h 后, 胃癌原代细胞的 *bcl-2* mRNA 条带密度降低, *bax* mRNA 条带密度加强。

**结论:** 三羟基异黄酮可能通过下调 *bcl-2* 的表达和上调 *bax* 的表达而诱导胃癌原代细胞发生凋亡。

**关键词:** 三羟基异黄酮; 胃癌; 凋亡

周海波, 颜云, 蔡建庭, 杜勤, 陈金明. 三羟基异黄酮诱导胃癌原代细胞凋亡的分子机制. 世界华人消化杂志 2005;13(4):504-507  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/504.asp

## 0 引言

Bcl-2家族在细胞凋亡中起重要作用. Bcl-2家族包括一些含同源氨基酸序列的蛋白质, 如抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-x1 及促凋亡蛋白 Bax 和 Bad. 体外实验中, Bcl-2 过度表达抑制细胞凋亡, 而 Bax 过度表达加速细胞凋亡. 三羟基异黄酮是大豆中的主要成分. 三羟基异黄酮在受体结合和细胞培养上表现了雌激素样性质. 最近研究表明三羟基异黄酮还是一种化疗药物. 三羟基异黄酮的抗肿瘤作用可能与诱导细胞凋亡有关, 但其具体作用机制还不清楚. 我们通过透射电镜和TUNEL 染色法研究三羟基异黄酮与胃癌原代细胞凋亡的关系;通过免疫组织化学法和RT-PCR检测凋亡相关基因 *bcl-2* 和 *bax* 的表达, 研究三羟基异黄酮诱导胃癌原代细胞凋亡发生的可能机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 三羟基异黄酮、MTT 购于 Sigma 化学试剂有限公司. 原位凋亡检测试剂盒、Bcl-2 mAb、Bax mAb, 均为中山生物公司产品. 用二甲基亚砜(DMSO)溶解三羟基异黄酮, 以 40  $\mu\text{mol/L}$  浓度冷藏. 工作浓度以细胞培养液稀释. 取手术切除的新鲜胃癌组织标本, 制备单细胞悬液, 调整单细胞悬液至活细胞浓度为  $5 \times 10^8/\text{L}$ . 培养后人工纯化为胃癌细胞.

### 1.2 方法

**1.2.1 MTT 比色法** 将胃癌原代细胞以  $10^5$ /孔接种于 96 孔板, 24 h 后更换培养液, 实验组分别加入含 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$  三羟基异黄酮, 每组设 3 个复孔, 分别培养 24, 48, 72 h 后每孔加入 5 g/L MTT 10  $\mu\text{L}$ , 继续放入培养箱 37℃ 孵育 4 h 后, 小心吸出上清, 加入 DMSO 0.2 mL/孔, 微量振荡器振荡 10 min 后, 在全自动酶标仪读取试验波长 570 nm 的吸光度(A), 计算细胞生长抑制率 = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值)  $\times 100\%$ .

**1.2.2 透射电镜** 20  $\mu\text{mol/L}$  三羟基异黄酮处理的胃癌原代细胞孵育 24 h 后, 胰蛋白酶消化收集, 用 40 g/L 戊二醛固定, Epon 821 浸润, 60℃ 包埋 72 h, 60 nm 超薄切片, 醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色透射电镜观察.

**1.2.3 TUNEL 染色法** 原位细胞凋亡检测试剂盒检测胃癌原代细胞凋亡. 加含 20  $\mu\text{mol/L}$  三羟基异黄酮与细胞共育 24, 48, 72, 96 h. 每个时间组均设 PBS 对照孔. 800 mL/L 酒精固定 24 h, 3 mL/L 过氧化氢溶

液及预冷的蛋白酶 K 处理细胞, 37℃ 湿盒内荧光素 dUTP 标记 1 h, POD 辣根过氧化酶结合, DAB 显色, 苏木素复染. 阴性对照用去掉荧光素 dUTP 标记体系处理标本. 染色后细胞核呈棕褐色的细胞被判为凋亡细胞. 凋亡指数(AI) = (凋亡细胞数  $\div$  总细胞数)  $\times 100\%$ .

**1.2.4 免疫组织化学法** 免疫组织化学法利用卵白素生物素技术. 在 6 孔板上, 20  $\mu\text{mol/L}$  三羟基异黄酮与原代细胞共育 24, 48, 72, 96 h. 设对照孔. 丙酮固定. PBS 洗涤后, 3 mL/L 过氧化氢溶液室温处理 5 min, 与 1:300 抗-Bcl-2 或抗-Bax 4℃ 过夜, PBS 冲洗, 加二抗即生物素标记的抗鼠 IgG 室温孵育 1 h. PBS 冲洗, 加 ABC 复合剂孵育 10 min. DAB 显色 10 min, 苏木素复染, 光学显微镜下观察棕褐色颗粒. 阴性对照用去掉一抗体系处理标本. 阳性率(PR) = (阳性细胞数 / 总细胞数)  $\times 100\%$ .

**1.2.5 RT-PCR 检测基因 *bcl-2* 和 *bax* 的 mRNA 表达** 20  $\mu\text{mol/L}$  三羟基异黄酮与原代细胞共育 24, 48, 72, 96 h. 设对照组. 收集细胞提取总 RNA.  $\beta$ -actin 引物序列为正义链 5' GTGGGCGCCCCAGGCACCA 3', 反义链 5' CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC 3', 扩增片段 500 bp; *bcl-2* 引物序列为正义链 5' GGAAATATGGC GCACGCT 3', 反义链 5' TCACTTGTGGCCAGAT 3', 扩增片段 716 bp; *bax* 引物序列为正义链 5' CCAGCTCTGAGC AGATCAT 3', 反义链 5' TATCAGCCCATCTTCTTCC 3', 扩增片段 508 bp. PCR 反应在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中进行. *bcl-2* 和  $\beta$ -actin 的热循环条件: 94℃ 预变性 7 min, 然后 94℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环后, 72℃ 再延伸 7 min; *bax* 的热循环条件: 94℃ 1 min, 60℃ 45 s, 72℃ 45 s, 35 个循环. 取 PCR 扩增产物 10  $\mu\text{L}$ , 经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 紫外透射分析仪下观察.

**统计学方法** 配对 Student *t* 法.  $P < 0.05$  具有显著性差异.

## 2 结果

**2.1 MTT 比色法** 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$  三羟基异黄酮处理原代细胞 24, 48, 72 h 后, 细胞死亡随三羟基异黄酮浓度增加和培养时间的延长而增加(表1).

表1 三羟基异黄酮处理后胃癌原代细胞的吸光度(mean  $\pm$  SD,  $A_{570}$ )

分组	24 h	48 h	72 h
对照组	0.4 $\pm$ 0.008	0.406 $\pm$ 0.007	0.404 $\pm$ 0.008
5 $\mu\text{mol/L}$	0.361 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.334 $\pm$ 0.012 <sup>b</sup>	0.305 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$	0.325 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.313 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	0.248 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>
20 $\mu\text{mol/L}$	0.308 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	0.249 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.206 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>
40 $\mu\text{mol/L}$	0.265 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.215 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.159 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

2.2 形态变化 经三羟基异黄酮(20  $\mu\text{mol/L}$ )处理24 h后,部分胃癌原代细胞出现凋亡细胞形态,如细胞核染色质致密浓缩、聚集于核膜呈新月形小体、核碎裂(图1-2).

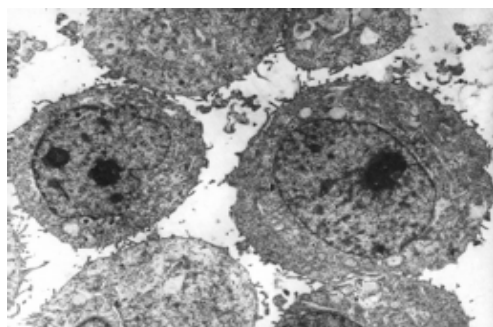


图1 正常胃癌原代细胞的超微结构( $\times 4\ 800$ ).

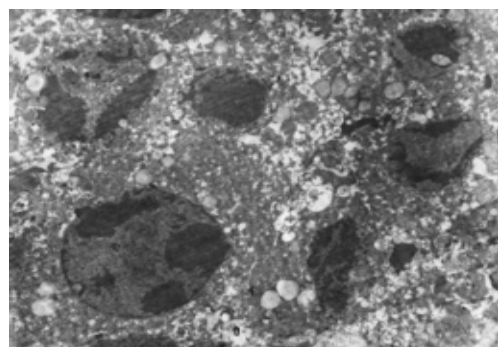


图2 三羟基异黄酮处理后胃癌原代细胞的超微结构( $\times 4\ 800$ ).

2.3 TUNEL染色法 棕褐色染色颗粒定位于细胞核内.经三羟基异黄酮(20  $\mu\text{mol/L}$ )处理24、48、72、96 h后胃癌原代细胞凋亡指数随时间明显增加( $1.25 \pm 0.30\% \rightarrow 4.97 \pm 0.80\%, 18.44 \pm 1.92\%, 35.18 \pm 0.35\%, 43.93 \pm 1.11\%$ ,  $P < 0.05$ ).

2.4 Bcl-2蛋白和Bax蛋白表达 Bcl-2蛋白棕褐色染色颗粒定位于细胞质内,经三羟基异黄酮(20  $\mu\text{mol/L}$ )处理24、48、72、96 h后胃癌原代细胞Bcl-2蛋白阳性率随时间明显减少( $36.34 \pm 0.72\% \rightarrow 21.62 \pm 0.08\%, 10.60 \pm 0.49\%, 7.21 \pm 0.45\%, 4.54 \pm 0.36\%$ ,  $P < 0.01$ ),表明三羟基异黄酮可下调Bcl-2的表达. Bax蛋白棕褐色染色颗粒定位于细胞质内,经三羟基异黄酮(20  $\mu\text{mol/L}$ )处理24、48、72、96 h后胃癌原代细胞Bax蛋白阳性率随时间明显增加( $10.73 \pm 0.57\% \rightarrow 20.63 \pm 0.86\%, 34.3 \pm 0.81\%, 45.96 \pm 0.42\%, 58.61 \pm 1.46\%$ ,  $P < 0.01$ ),表明三羟基异黄酮可上调Bax的表达.

2.5 RT-PCR检测 *bcl-2*和*bax*的mRNA表达 三羟基异黄酮(20  $\mu\text{mol/L}$ )处理24、48、72、96 h后,经RT-PCR检测发现胃癌原代细胞*bcl-2*和*bax*的mRNA表达阳性,并显示*bcl-2* mRNA条带强度随时间的延长而递减, *bax* mRNA条带强度随时间的延长而增

强,表明三羟基异黄酮可下调*bcl-2* mRNA表达,上调*bax* mRNA表达.

### 3 讨论

三羟基异黄酮是大豆中的主要成分,具有一个芳香族A环,环上第2位是氧原子11.5 Å,其分子质量与雌激素类似.三羟基异黄酮在受体结合和细胞培养上表现了雌激素样性质<sup>[1-7]</sup>.三羟基异黄酮可抑制拓扑异构酶、血小板活化因子和表皮生长因子诱导的*c-fos*表达,还可抑制甘油二酯合成和酪氨酸激酶<sup>[8-9]</sup>.三羟基异黄酮可抑制微粒体脂质过氧化和血管生成<sup>[10-11]</sup>.三羟基异黄酮具有抗氧化和诱导多种细胞分化作用<sup>[12]</sup>.最近研究表明,三羟基异黄酮还是一种化疗药物,三羟基异黄酮的抗肿瘤作用可能与诱导细胞凋亡有关<sup>[13-22]</sup>,但其具体作用机制还不清楚.

Bcl-2家族在细胞凋亡中起重要作用. Bcl-2家族包括一些含同源氨基酸序列的蛋白质,如抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-x1及促凋亡蛋白Bax和Bad<sup>[23-26]</sup>. Bax过度表达加速细胞凋亡,而Bcl-2过度表达可抑制*bax*的促凋亡功能<sup>[27-36]</sup>.因此, Bcl-2与Bax的比值是决定细胞是否凋亡的关键因素<sup>[37]</sup>.

在体外实验中,MTT结果表明三羟基异黄酮对胃癌原代细胞有明显的抑制作用,肿瘤细胞的死亡有浓度和时间依赖性. TUNEL染色法表明经20  $\mu\text{mol/L}$ 三羟基异黄酮处理后,胃癌原代细胞凋亡指数随时间明显增加( $P < 0.05$ ).免疫组织化学法发现经20  $\mu\text{mol/L}$ 三羟基异黄酮处理后,胃癌原代细胞Bcl-2蛋白阳性率随时间明显减少( $P < 0.01$ ),胃癌原代细胞Bax蛋白阳性率随时间明显增加( $P < 0.01$ ). RT-PCR发现经20  $\mu\text{mol/L}$ 三羟基异黄酮处理后,胃癌原代细胞的*bcl-2* mRNA条带强度递减;而*bax* mRNA条带强度递增.表明三羟基异黄酮可下调*bcl-2*的表达和上调*bax*的表达,使*bcl-2/bax*比值下降,从而导致胃癌原代细胞凋亡.

我们研究证实,三羟基异黄酮可下调胃癌原代细胞*bcl-2*基因的表达而上调*bax*基因的表达,从而诱导胃癌原代细胞凋亡.有关三羟基异黄酮诱导胃癌原代细胞凋亡的确切机制,有待进一步探讨.

### 4 参考文献

- 1 Valachovicova T, Slivova V, Sliva D. Cellular and physiological effects of soy flavonoids. *Mini Rev Med Chem* 2004;4:881-887
- 2 Yu Z, Li W, Liu F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett* 2004;215:159-166
- 3 Aggarwal BB, Takada Y, Oommen OV. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13:1327-1338
- 4 Sarkar FH, Li Y. The role of isoflavones in cancer chemoprevention. *Front Biosci* 2004;9:2714-2724

- 5 Chen AC, Berhow MA, Tappenden KA, Donovan SM. Genistein Inhibits Intestinal Cell Proliferation in Piglets. *Pediatr Res* 2005; 57:192-200
- 6 Gercel-Taylor C, Feitelson AK, Taylor DD. Inhibitory effect of genistein and daidzein on ovarian cancer cell growth. *Anticancer Res* 2004;24:795-800
- 7 Sarkar FH, Li Y. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest* 2003;21:744-757
- 8 Bayazit V. Cytotoxic effects of some animal and vegetable extracts and some chemicals on liver and colon carcinoma and myosarcoma. *Saudi Med J* 2004;25:156-163
- 9 Morris SM, Akerman GS, Warbritton AR, Patton RE, Doerge DR, Ding X, Chen JJ. Effect of dietary genistein on cell replication indices in C57BL6 mice. *Cancer Lett* 2003;195:139-145
- 10 Ye F, Wu J, Dunn T, Yi J, Tong X, Zhang D. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein. *Cancer Lett* 2004;211:39-46
- 11 Sasamura H, Takahashi A, Yuan J, Kitamura H, Masumori N, Miyao N, Itoh N, Tsukamoto T. Antiproliferative and antiangiogenic activities of genistein in human renal cell carcinoma. *Urology* 2004;64:389-393
- 12 Sonee M, Sum T, Wang C, Mukherjee SK. The soy isoflavone, genistein, protects human cortical neuronal cells from oxidative stress. *Neurotoxicology* 2004;25:885-891
- 13 Park OJ. Comparison of estrogen and genistein in their antigenotoxic effects, apoptosis and signal transduction protein expression patterns. *Biofactors* 2004;21:379-382
- 14 Su SJ, Yeh TM, Chuang WJ, Ho CL, Chang KL, Cheng HL, Liu HS, Cheng HL, Hsu PY, Chow NH. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69:307-318
- 15 Yan SX, Ejima Y, Sasaki R, Zheng SS, Demizu Y, Soejima T, Sugimura K. Combination of genistein with ionizing radiation on androgen-independent prostate cancer cells. *Asian J Androl* 2004;6:285-290
- 16 Valachovicova T, Slivova V, Bergman H, Shuherk J, Sliva D. Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kappaB/AP-1-dependent and -independent pathways. *Int J Oncol* 2004;25:1389-1395
- 17 Sergeev IN. Genistein induces Ca<sup>2+</sup>-mediated, calpain/caspase-12 dependent apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ;321:462-467
- 18 Zhou HB, Chen JJ, Wang WX, Cai JT, Du Q. Apoptosis of human primary gastric carcinoma cells induced by genistein. *World J Gastroenterol* 2004;10:1822-1825
- 19 Zeng H, Chen Q, Zhao B. Genistein ameliorates beta-amyloid peptide (25-35)-induced hippocampal neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2004;36:180-188
- 20 Yu Z, Zhang L, Wu D. Genistein induced apoptosis in MCF-7 and T47D cells. *Weisheng Yanjiu* 2003;32:125-127
- 21 Li Y, Mi C. Proliferation inhibition and apoptosis onset in human ovarian carcinoma cell line SKOV3 induced by Genistein. *Ai Zheng* 2003;22:586-591
- 22 Kazi A, Daniel KG, Smith DM, Kumar NB, Dou QP. Inhibition of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein. *Biochem Pharmacol* 2003;66:965-976
- 23 Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 2002; 16:1713-1724
- 24 van der Woude CJ, Jansen PL, Tiebosch AT, Beuving A, Homan M, Kleibeuker JH, Moshage H. Expression of apoptosis-related proteins in Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence: A switch to a more resistant phenotype. *Hum Pathol* 2002;33:686-692
- 25 Panaretakis T, Pokrovskaja K, Shoshan MC, Grander D. Activation of Bak, Bax and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J Biol Chem* 2002;277:44317-44326
- 26 Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Bosch F, Campo E, Montserrat E, Colomer D. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1810-1816
- 27 Matter-Reissmann UB, Forte P, Schneider MK, Filgueira L, Groscurth P, Seebach JD. Xenogeneic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent and not inhibited by Bcl-2 overexpression. *Xenotransplantation* 2002;9:325-337
- 28 Lanzi C, Cassinelli G, Cuccuru G, Supino R, Zucco V, Ferlini C, Scambia G, Zunino F. Cell cycle checkpoint efficiency and cellular response to paclitaxel in prostate cancer cells. *Prostate* 2001;48:254-264
- 29 Mertens HJ, Heineman MJ, Evers JL. The expression of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Ki67 in endometrium of ovulatory menstrual cycles. *Gynecol Obstet Invest* 2002;53:224-230
- 30 Mehta U, Kang BP, Bansal G, Bansal MP. Studies of apoptosis and bcl-2 in experimental atherosclerosis in rabbit and influence of selenium supplementation. *Gen Physiol Biophys* 2002; 21:15-29
- 31 Chang WK, Yang KD, Chuang H, Jan JT, Shaio MF. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. *Clin Immunol* 2002;104:151-160
- 32 Chen GG, Lai PB, Hu X, Lam IK, Chak EC, Chun YS, Lau WY. Negative correlation between the ratio of Bax to Bcl-2 and the size of tumor treated by culture supernatants from Kupffer cells. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:457-464
- 33 Usuda J, Chiu SM, Azizuddin K, Xue LY, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: dependence on Bax. *Photochem Photobiol* 2002;76:217-223
- 34 Sun F, Akazawa S, Sugahara K, Kamihira S, Kawasaki E, Eguchi K, Koji T. Apoptosis in normal rat embryo tissues during early organogenesis: the possible involvement of Bax and Bcl-2. *Arch Histol Cytol* 2002;65:145-157
- 35 Jang M, Shin M, Shin H, Kim KH, Park HJ, Kim EH, Kim CJ. Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via bax-dependent caspase-3 activation. *Eur J Pharmacol* 2002;449:39-45
- 36 Tilli CM, Stavast-Koey AJ, Ramaekers FC, Neumann HA. Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol* 2002;29:79-87
- 37 Pettersson F, Dalglish AG, Bissonnette RP, Colston KW. Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR-gamma and altered expression of Bcl-2/Bax. *Br J Cancer* 2002;87:555-561



# 肝细胞癌组织中 DNA 损伤修复基因 Ape1 表达意义

张沁宏, 肖华亮, 李增鹏, 仲召阳, 何 怡, 卿 毅, 王 东

张沁宏, 肖华亮, 李增鹏, 仲召阳, 王东, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科 重庆市 400042  
何怡, 卿毅, 王东, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心 重庆市 400042  
张沁宏, 男, 1975-10-26 生, 四川省新津县人, 汉族, 1999 年第三军医大学本科毕业, 医师, 主要从事肿瘤病理研究。  
项目负责人: 王东, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心, dongwang64@hotmail.com  
电话: 023-68757706 传真: 023-68757706  
收稿日期: 2004-09-25 接受日期: 2004-10-11

## Expression of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in hepatocellular carcinoma

Qin-Hong Zhang, Hua-Liang Xiao, Zeng-Peng Li, Zhao-Yang Zhong, Yi He, Yi Qing, Dong Wang

Qin-Hong Zhang, Hua-Liang Xiao, Zeng-Peng Li, Zhao-Yang Zhong, Dong Wang, Department of Pathology, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China  
Yi He, Yi Qing, Dong Wang, Cancer Center, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Correspondence to: Dr. Dong Wang, Cancer Center and Department of Pathology, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. dongwang64@hotmail.com  
Received: 2004-09-25 Accepted: 2004-10-11

## Abstract

**AIM:** To explore the expression and clinicopathological relevance of apurinic/aprimidinic endonuclease (Ape1) in hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** Ape1 expression was detected by immunohistochemical S-P method in tissues of normal liver ( $n = 10$ ), hepatocirrhosis ( $n = 40$ ) and HCC ( $n = 103$ ).

**RESULTS:** Three types of Ape1 positive staining were noticed in HCC: nuclear, cytoplasmic and mixed. There were significant more mixed type of Ape1 expression in HCC than in hepatocirrhosis and normal liver (49.5% vs 20%, 0%,  $P < 0.01$ ). The positive degree of Ape1 expression in both nucleus and cytoplasm was significantly higher in HCC than that in hepatocirrhosis and normal liver, and higher in hepatocirrhosis than that in normal liver ( $P < 0.01$ ). The positive expression of Ape1 was correlated with the histological grade of HCC ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Overexpression of Ape1 in neoplastic cells

might be a useful marker in evaluating histological grade of HCC. Ape1 gene may play an important role in tumorigenesis and progression of HCC.

**Key Words:** Apurinic/aprimidinic endonuclease; Hepatocellular carcinoma; Immunohistochemistry

Zhang QH, Xiao HL, Li ZP, Zhong ZY, He Y, Qing Y, Wang D. Expression of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):508-511

## 摘要

**目的:** 探讨脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/aprimidinic endonuclease, Ape1), 又称氧化还原因子(redox factor-1, Ref-1)在肝细胞性肝癌(HCC)的表达特点及其与临床病理因素的关系。

**方法:** 应用免疫组化S-P法分别检测正常肝组织10例、结节性肝硬化组织40例和HCC103例组织中Ape1表达情况。

**结果:** 在HCC组织中Ape1在细胞核、细胞质均可表达, 其中细胞核/细胞质联合表达(49.5%)显著高于结节性肝硬化组(20%)和正常对照组(0%)( $P < 0.01$ )。Ape1细胞核和细胞质阳性分度在正常组、肝硬化组、HCC组之间依次增高, 并与HCC组织学分级有密切关系( $P < 0.01$ 或0.05)。

**结论:** 癌细胞过度表达Ape1蛋白可作为判断肝癌组织学分级的有用指标之一。Ape1基因在HCC的发生、发展中可能具有重要作用。

**关键词:** 脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶; 肝癌; 免疫组化

张沁宏, 肖华亮, 李增鹏, 仲召阳, 何怡, 卿毅, 王东. 肝细胞癌组织中DNA损伤修复基因Ape1表达意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(4):508-511  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/508.asp>

## 0 引言

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一, 研究表明, DNA损伤修复机制与多种肿瘤的发生、发展以及预后有关<sup>[1]</sup>, 而且其中某些重要的因子很可能成为未来治疗肿瘤的靶向分子。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/aprimidinic endonuclease, Ape1), 又称氧化还原因子(redox factor-1, Ref-1)是一个多功能的DNA碱基切除修复途径(base excision repair,





图1 肝细胞肝癌 Ape1 蛋白表达 SP×200. A: 细胞核; B: 细胞质; C: 细胞核/细胞质.

BER)的限速酶,是细胞DNA放射性损伤和烷化剂致伤重要的修复因子<sup>[2]</sup>.通过碱基切除修复机制,Ape1可以修复细胞内大量存在的嘌呤嘧啶缺失位点.这种位点具有细胞毒性及基因毒性,如不能修复,将导致基因突变、染色体微卫星不稳定或细胞凋亡.此外,Ape1还具有氧化还原功能(reduction-oxidation, redox),通过维持细胞内多种转录因子的激活还原态,而参与多种关键的细胞反应,如氧化应激,转录因子调节,细胞周期控制与凋亡.已报道受Ape1调控的转录因子包括p53, HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, Fos/Jun (AP-1), ATF/CREB家族, PAX-8等<sup>[3-4]</sup>. Ape1在多种肿瘤中均可见高表达<sup>[5-7]</sup>,但在HCC组织中表达情况以及其在HCC发生、发展过程中的作用国内外尚未见报道.为此,我们采用免疫组化技术检测了Ape1在103例HCC的表达情况,旨在探讨其与HCC临床病理特征的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院病理科1991-2004年存档,经病理学诊断为HCC的手术切除标本103例.年龄25-77(平均45.5)岁;男93例,女10例,伴肝硬化30例,占29.1%;血清HBsAg阳性81例,占78.6%.术前均无化、放疗.根据国际抗癌联盟(UICC)TNM分类:I期0例,II期38例(36.9%),IIIA期16例(15.5%),IIIB期2例(1.9%),IVA期36例(34.9%),IVB期11例(10.8%).Edmondson及Steiner组织学分级标准:I级5例(4.8%),II级27例(26.2%),III级56例(54.4%),IV级15例(14.6%).另选取结节性肝硬化10例及尸检正常肝组织10例做对照.标本均经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,4  $\mu$ m厚切片.兔抗人Ape1 mAb购自Novus Biologicals公司(Littleton, CO),工作浓度为1:500;S-P免疫组化试剂盒购自北京中山公司.

**1.2 方法** 采用S-P二步法:石蜡切片经二甲苯脱蜡,乙醇梯度水化,30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇室温10 min,行微波抗原修复,800W微波5 min,200W微波10 min;滴加一抗,4℃过夜,二抗50  $\mu$ L 37℃孵育30 min,

DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色,苏木素复染.以PBS代替一抗作阴性对照. Ape1免疫组化阳性信号为棕黄色细小颗粒状,定位于细胞核和/或细胞质.染色结果参照Mark Kelley实验室的标准<sup>[5]</sup>进行肿瘤细胞阳性计分.首先在高倍镜下计数1 000个肿瘤细胞,避开肿瘤边缘及坏死区域,根据阳性瘤细胞数目所占百分比得出细胞核或细胞质标记指数(labeling index, LI),即细胞核或细胞质 LI = 阳性瘤细胞数 / 1 000个瘤细胞 × 100%.分为以下四级计分:I:0分, <10%;II:1分, 11-25%;III:2分, 26-50%;IV:3分, 51%以上.染色强度按瘤细胞着色的深浅计分:0分,阴性;1分,弱阳性;2分,中等阳性;3分,强阳性.将2个分值相加即得出该例标本的免疫组化阳性分度:0-1分为阴性,记为(-);2-4分为弱阳性,记为(+);5分以上为阳性,记为(++).

**统计学处理** 采用SPSS10.0统计软件进行 $\chi^2$ 检验.

## 2 结果

Ape1在HCC组织中,细胞核和/或细胞质均可见表达,其中单纯性细胞核表达48例(占46.6%,图1A),细胞核/细胞质联合表达51例(占49.5%,图1C),单纯性细胞质表达4例(占3.9%,图1B).HCC周围肝硬化组织及单纯性肝硬化组织40例,单纯性细胞核表达25例(62.5%),细胞核/细胞质联合表达8例(20%).Ape1在正常肝脏组织仅在细胞核可见表达,共计4例阳性(40%).Ape1细胞核表达共计77例,占50.3%,这一表达方式在HCC组、肝硬化组及正常对照组相互间两两比较均无显著差异. Ape1细胞核/细胞质联合表达共计59例(占38.6%),在HCC组与肝硬化组中Ape1细胞核/细胞质表达明显高于正常对照组,且HCC组与肝硬化组比较也具有显著差异( $P = 0.000 < 0.01$ ). Ape1细胞质表达仅有4例(占2.6%),样本资料太小,未行 $\chi^2$ 检验,但这一表达方式却只出现于HCC组中,具有提示意义(表1).

Ape1细胞核阳性分度在正常组、肝硬化组、HCC组中呈依次递增趋势,经 $\chi^2$ 检验有显著差异( $P = 0.000$

<0.01). Ape1 细胞质阳性分度在正常组、肝硬化组、HCC 组中同样呈依次递增趋势, 经  $\chi^2$  检验也具有显著差异 ( $P = 0.000 < 0.01$ , 表 2, 图 2). Ape1 表达与年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分级无关. HCC 中血清学检查 HBsAg 阳性患者 Ape1 表达与 HBsAg 阴性患者比较无显著差异. 组织学分级中, III-IV 级 Ape1 细胞核和细胞质阳性分度较 I-II 级均有显著增高. ( $^{\text{核}}P = 0.026 < 0.05$ ;  $^{\text{质}}P = 0.001 < 0.01$ , 表 3).

### 3 讨论

表1 HCC 组织 Ape1 蛋白的定位表达  $n$  (%)

组织类型	$n$	细胞核	细胞质	细胞核/细胞质
正常肝	10	4(40)	0	0
肝硬化	40	25(62.5)	0	8(20)
HCC	103	48(46.6)	4(3.9)	51(49.5)
合计	153	77(50.3)	4(2.6)	59(38.6)

表2 HCC 组织 Ape1 蛋白的定量表达

组织类型	$n$	细胞核			$P$ 值	细胞质			$P$ 值
		-	+	++		-	+	++	
正常肝	10	6	4	0		10	0	0	
肝硬化	40	7	15	18		32	8	0	
HCC	103	4	19	80	<0.01	48	36	19	<0.01

表3 Ape1 蛋白表达与 HCC 临床病理因素的关系

临床病理	$n$	细胞核			细胞质		
		-	+	++	-	+	++
年龄(岁)<45.5	37	2	6	29	15	15	7
$\geq 45.5$	66	2	13	51	33	21	12
男性	93	3	17	73	46	30	18
女性	10	1	2	7	2	6	1
肿瘤大小 (cm)							
单个 $\leq 3$	24	1	7	16	11	7	6
单个 3-5	15	0	4	11	5	3	7
单个 $\geq 5$ , 或 $\geq 2$ 个	64	3	8	53	32	26	6
HBsAg 阳性	81	2	11	68	43	26	12
阴性	22	2	8	12	5	10	7
分期 II 期	38	2	5	31	10	20	8
IIIA 期	16	0	3	13	8	8	0
IIIB 期	2	0	0	2	0	2	0
IVA 期	36	1	8	27	21	6	9
IVB 期	11	1	3	7	9	0	2
分级 I-II 级	32	3	9	20	22	10	0
III-IV 级	71	1	10	60 <sup>a</sup>	26	26	19 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs I-II 级.

人体细胞, 乃至所有生物细胞都存在着 DNA 损伤修复系统, 这是细胞维持自身基因组稳定性最重要的防御和保护机制. 内源和环境的诸多因素, 包括电离辐射、UV 射线、氧自由基、水解以及烷化类化疗药物都可直接损伤 DNA<sup>[8]</sup>. 脱嘌呤/脱嘧啶位点 (AP 位点) 是 DNA 损伤的最主要的形式<sup>[9]</sup>, 在正常生理情况下, 每天每个细胞产生 10-20 000 个脱嘌呤位点和 500 个脱嘧啶位点. AP 位点可阻断 DNA 复制, 引起基因突变或遗传不稳定性, 具有细胞毒和基因毒作用. 已知直接转录、错配修复、核酸切除修复以及碱基切除修复等多种修复途径参与基因损伤的修复. Ape1 是 DNA 碱基切除修复途径的一个起关键作用的限速酶, 能与 AP 位点结合, 通过  $\text{Mg}^{2+}$  依赖的核酸内切酶作用, 水解 AP 位点 5' 端, 形成 3' -OH 端和 5' -脱氧核苷<sup>[10]</sup>, 为下一步碱基切除修复创造了必要条件. 此外, Ape1 还具有氧化还原功能, 他能通过调节转录因子来激活多种肿瘤基因产物的活性, 如 c-Jun, c-Fos, c-Myb 以及 Pax 蛋白<sup>[11-12]</sup>. 在人体骨肉瘤<sup>[5]</sup>、卵

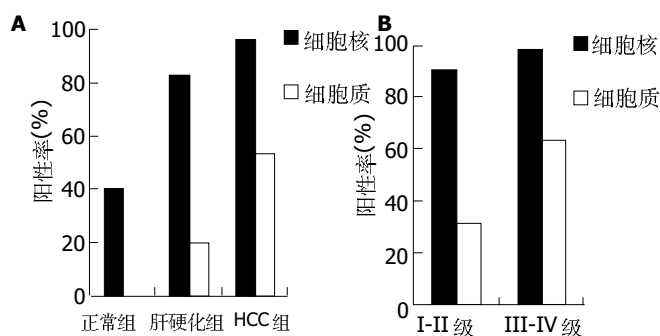


图2 Ape1 蛋白定位表达在三组间及 HCC 组织学分级间的阳性率比较.

巢癌<sup>[13]</sup>等多种肿瘤中都发现Ape1过高表达. 多数研究表明, Ape1 表达定位的改变以及表达强度的变化很可能是细胞表型异常的决定因素.

在正常肝细胞中, Ape1 蛋白可呈弱表达<sup>[2]</sup>, 但在肝癌细胞中尚未见报道. 本结果显示, Ape1 蛋白在 HCC 组织中可呈现 3 种表达方式: 细胞核表达、细胞核 / 细胞质联合表达、细胞质表达. 这种表达方式的多样性与绝大多数蛋白表达的单一性明显不同. 为明确这种表达多样性的意义, 我们将 HCC 组织与肝硬化组织及正常肝组织的 Ape1 表达做了对比, 发现 3 种表达方式中, 单纯性细胞核表达在全部研究对象中最多见 (共占 52.3%), 且在各自组内也是主要的表达方式 (正常组 40%, 肝硬化组 62.5%, HCC 组 46.6%), 但这一表达方式在 3 组间比较并无差异. 而 Ape1 细胞核 / 细胞质联合表达虽然只占 38.6%, 但这种方式在 HCC 组中明显增高, 肝硬化组与正常对照组比较也有显著差异 ( $P < 0.01$ ). 由于 Ape1 细胞质表达方式例数太少 (仅 4 例), 样本资料过小而无法进行统计分析, 但这 4 例全部发生于 HCC 组中, 与其他两组的零发生率形成鲜明对比, 也具有提示意义. 因此, 我们认为 Ape1 蛋白在细胞质内出现表达时具有重要意义.

进一步将 Ape1 细胞核表达和细胞质表达分别进行统计分析. 从 Ape1 免疫组化阳性分度结果上看, 细胞核阳性分度与细胞质的一致, 二者均随着病程进展 (组间比较) 或肿瘤恶性程度 (组织学分级比较) 的增高而增强. 再进一步验证, 对免疫组化阳性分度的四项指标, 即细胞核 LI、细胞质 LI、细胞核染色强度、细胞质染色强度分别进行统计分析, 发现除细胞核 LI 外, 其余三项指标在组间比较及肿瘤组织学分级比较中均有显著差异 ( $P < 0.01$  或  $0.05$ ), 而细胞核 LI 仅在 HCC 组 vs 正常组、肝硬化组 vs 正常组比较中有差异, 而在 HCC 组 vs 肝硬化组及 HCC 组织学分级中无统计学意义. 此外, 我们也根据传统的阳性率统计方

法进行了分析, 发现细胞核阳性率和细胞质阳性率在正常对照组、肝硬化组、HCC 组中均呈递增趋势, 且均存在显著差异 (图 2A). 但细胞核阳性率在 HCC 组织学分级之间无统计学意义, 而细胞质阳性率在 HCC 组织学分级比较中, 随着肿瘤恶性程度的增高而增高 ( $P < 0.01$ , 图 2B). 这一结果与免疫组化阳性分度结果略有不同. 因此我们认为, 在 Ape1 表达分析中, 免疫组化阳性分度统计方法优于阳性率统计方法, 而定位分析比定量分析则更具有病理学意义, 细胞质过度表达 Ape1 蛋白可能作为肝细胞早期癌变的指标之一.

本研究结果提示, 在 HCC 发生、发展过程中 Ape1 蛋白在肝细胞中的表达随着病程进展而增强, 其主要表达方式逐渐由胞核表达向胞质表达过渡, 当细胞质内出现 Ape1 的强表达时可作为恶性生物学行为的标志.

#### 4 参考文献

- Loeb KR, Loeb RA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:379-385
- Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1. *Mutat Res* 2000;461:83-108
- Gaididon C, Moorthy NC, Priors C. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J* 1999;18:5609-5621
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996;271:32253-32259
- Wang D, Luo MH, Kelley M. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: Enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. *Mol Cancer Ther* 2004;3:679-686
- Puglisi F, Barbone F, Tell G. Prognostic role of Ape/Ref-1 subcellular expression in stage I-III breast carcinomas. *Oncol Rep* 2002;9:11-17
- Kakolyris S, Giatromanolaki A, Koukourakis M. Nuclear localization of human AP endonuclease 1 (HAP1/Ref-1) associates with prognosis in early operable non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Pathol* 1999;189:351-357
- Kakolyris S, Kaklamanis L, Engels K. Human AP endonuclease 1 (HAP 1) protein expression in breast cancer correlates with lymph node status and angiogenesis. *Br J Cancer* 1998;77:1169-1173
- Mol CD, Hosfield DJ, Tainer JA. Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat Res* 2000;460:211-229
- Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Rev Biochem* 1994;63:915-948
- Fritz G. Human APE/Ref-1 protein. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:925-929
- Tell G, Scaloni A, Pellizzari L. Redox potential controls the structure and DNA binding activity of the paired domain. *J Biol Chem* 1998;273:25062-25072
- Tanner B, Grimme S, Schiffer I. Nuclear expression of apurinic/apyrimidinic endonuclease increases with progression of ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 2004;92:568-577

# 大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝组织 MMP-13 及 TIMP-1 表达变化与肝纤维化的关系

张 洁, 陈晓宇, 彭延申, 李继强

张洁, 上海第二医科大学附属仁济医院检验科 上海市 200127  
陈晓宇, 彭延申, 李继强, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001  
张洁, 女, 1965-12-06 生, 江苏江阴人, 汉族, 1989 年上海第二医科大学毕业, 主管技师, 主要从事临床生化检验工作。  
上海市自然科学基金资助项目, No. 03ZR14045  
项目负责人: 李继强, 200001, 上海市山东中路 145 号, 上海市消化疾病研究所. liqzh@yahoo.com.cn  
电话: 021-63260930-2001  
收稿日期: 2004-11-18 接受日期: 2004-12-08

## Expression of MMP-13 and TIMP-1 in rat liver with nonalcoholic steatohepatitis

Jie Zhang, Xiao-Yu Chen, Yan-Shen Li, Ji-Qiang Li

Zhang Jie, Department of Clinical Laboratory, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200127, China  
Xiao-Yu Chen, Yan-Shen Li, Ji-Qiang Li, Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Shanghai, No. 03ZR14045  
Correspondence to: Ji-Qiang Li, Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China. liqzh@yahoo.com.cn  
Received: 2004-11-18 Accepted: 2004-12-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the implications of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the development of liver fibrosis in experimental nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

**METHODS:** Sprague-Dawley (S-D) rats were randomly allocated into the normal group and the model group. NASH model was established by feeding rats with fat-rich diet; other rats fed with normal diet were taken as controls. All the rats were sacrificed at the 20<sup>th</sup> and 22<sup>nd</sup> week. The expression levels of MMP-13 and TIMP-1 were assayed by semi-quantitative RT-PCR. Conventional histological examinations of all the rats were performed after HE and Masson staining.

**RESULTS:** At the 20<sup>th</sup> week, hepatic MMP-13 mRNA expression ( $1.14 \pm 0.29$ ) was increased in the model group compared with the normal group ( $0.71 \pm 0.08$ ,  $P < 0.01$ ). TIMP-1 mRNA level was also increased in the model rats, but the difference between the two groups ( $0.73 \pm 0.16$  vs  $0.60 \pm 0.03$ ) was not statistically significant. At the 22<sup>nd</sup> week, MMP-13 mRNA expression was remarkably de-

creased ( $0.84 \pm 0.10$ ), whereas TIMP-1 mRNA expression was significantly increased compared with the control group ( $0.75 \pm 0.12$  vs  $0.60 \pm 0.10$ ,  $P < 0.01$ ). Remarkable steatosis and fibrosis were also revealed by HE and Masson staining.

**CONCLUSION:** Although MMP-13 expression is increased transiently in the early stage of NASH, TIMP-1 expression is enhanced continuously. The latter may inhibit MMP-13-induced collagen degradation, resulting in collagen accumulation in the liver. These data suggest that TIMP-1 plays an important role in the pathogenesis of NASH with liver fibrosis.

**Key Words:** MMP-13; TIMP-1; Nonalcoholic steatohepatitis; RT-PCR; Hepatic fibrosis

Zhang J, Chen XY, Li YS, Li JQ. Expression of MMP-13 and TIMP-1 in rat liver with nonalcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):512-515

## 摘要

**目的:** 观察大鼠非酒精性脂肪肝模型肝组织纤维化形成过程中基质金属蛋白酶-13(MMP-13)和基质金属蛋白酶抑制物-1(TIMP-1)表达的变化, 探讨其在非酒精性脂肪肝纤维化发生发展机制中的意义。

**方法:** SD 大鼠 40 只, 随机分为模型组和对照组, 模型组大鼠通过高脂饮食制备高脂血症性脂肪肝模型, 并在 20 wk、22 wk 分批处死, 采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝组织 MMP-13mRNA 和 TIMP-1 mRNA 的表达, 并与肝脏组织学改变进行对照研究。

**结果:** 模型组肝组织出现明显的脂肪变性及炎症坏死并伴有程度不同的纤维化, 部分大鼠出现早期肝硬化。在 20 wk 肝组织 MMP-13mRNA 表达, 模型组( $1.14 \pm 0.29$ )明显高于正常对照组( $0.71 \pm 0.08$ ), 有显著性差异( $t = 3.71$ ,  $P < 0.01$ )而 TIMP-1mRNA 表达, 模型组( $0.73 \pm 0.16$ )虽高于正常组( $0.60 \pm 0.03$ ), 但差异无显著性。在 22 wk MMP-13mRNA 模型组( $0.84 \pm 0.10$ )表达明显下降, 而 TIMP-1mRNA 模型组( $0.75 \pm 0.12$ )表达则显著高于正常对照组( $0.60 \pm 0.10$ ), ( $t = 3.13$ ,  $P < 0.01$ )。肝组织 HE 和 Masson 染色提示肝脂肪变性和

纤维化改变.

**结论:** 非酒精性脂肪肝炎, 随着纤维化进程 MMP-13mRNA 表达由强到弱, TIMP-1mRNA 表达逐渐增强, 提示其可能参与非酒精性脂肪肝炎纤维化的机制.

**关键词:** 基质金属蛋白酶-13; 基质金属蛋白酶抑制物-1; 非酒精性脂肪性肝炎; 逆转录聚合酶链反应; 肝纤维化

张洁, 陈晓宇, 彭延申, 李继强. 大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝组织 MMP-13 及 TIMP-1 表达变化与肝纤维化的关系. 世界华人消化杂志. 2005;13(4):512-515  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/512.asp

## 0 引言

近年来由于饮食结构和生活方式的改变, 由肥胖, 高脂血症, 糖尿病等所致的非酒精性脂肪肝有不断上升趋势, 非酒精性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 是隐匿性肝硬化的一个重要原因<sup>[1-4]</sup>. 非酒精性脂肪肝纤维化是 I, III型胶原为主的细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 成分过度沉积导致的病理改变, 与胶原生成过多及降解受阻有关<sup>[5-8]</sup>. 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一族依赖 Zn 离子降解 ECM 的水解酶, 基质金属蛋白酶抑制物 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1) 是 MMPs 的抑制剂, MMPs 与 TIMP-1 不平衡表达与肝纤维化密切相关<sup>[9-12]</sup>. 我们观察大鼠 NASH 模型, 运用半定量逆转录聚合酶链反应 (reversal transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 MMP-13 mRNA 和 TIMP-1 mRNA 在非酒精性脂肪肝炎肝组织的表达水平, 探讨他们在非酒精性脂肪肝纤维化发病机制中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SD 大鼠 40 只, ♂, 购自中科院实验动物中心, 质量 140-160 g. Trizol (Invitrogen 公司), M-MLV、RNasin、PCR Marker (Promega 公司), 其他试剂均为国产分析纯. Hema-480DNA 扩增仪 (珠海黑马科技公司), 电泳仪、凝胶成像系统 (上海天能科技公司), 紫外分光光度计 UV1240 (日本岛津公司), 贝克曼 LX20 全自动生化分析仪

**1.2 方法** 动物<sup>[13]</sup> 随机分为 2 组. 对照组 15 只以普通饲料喂养, 模型组 25 只以普通饲料+200 g/kg 猪油+20 g/kg 胆固醇+50 g/kg 蛋黄粉+10 g/kg 胆酸钠. 20 wk 处死 7 只对照组大鼠和 7 只模型组大鼠, 22 wk 处死所有剩余 26 只大鼠, 处死前隔夜禁食, 次日称质量后, 以 2 g/L 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉采血处死, 取肝称肝湿重, 取 0.5 g 肝组织放入 Eppendorf 管中快速冷冻, 而后转入 -70 °C 冰箱保存待测. 其余肝组

织固定于 40 g/L 甲醛溶液中供病理检查. 每只大鼠各取块 2 cm × 1 cm 大小的肝组织常规脱水、包埋和切片, 作 HE 和 Masson 三色 2 种染色, 参照 Brunt 的分级和分期标准<sup>[14]</sup>, 判断大鼠肝脏炎症活动度和肝纤维化程度, 并仔细观察肝脏脂肪变性的程度. 谷丙转氨酶 (ALT), 甘油三酯 (TG), 总胆固醇 (TCh) 等生化指标在贝克曼 LX20 全自动生化分析仪上检测. 取 100 mg 左右肝组织按照 Trizol reagent 说明书提取总 RNA, 紫外分光光度计定量. 逆转录 cDNA 的合成, 按照 Promega 公司说明书操作. 总 RNA 经 RT 反应后, 进行 PCR 扩增, 采用 2 对引物在同一体系中进行 PCR, 其中  $\beta$ -actin 作为内参 (引物序列见表 1). 25  $\mu$ L PCR 体系包括: 1×PCR 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCL, PH 8.5, 50 mmol/L KCL), 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, dNTP 各为 200  $\mu$ mol/L, 目的基因正负链各 10 pmol/L,  $\beta$ -actin 引物各 2.5 pmol/L, RT 产物 3  $\mu$ L, Taq 酶 1 U. MMP-13 反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 40 s, 55°C 40 s, 72°C 90 s, 30 次循环, 72°C 延伸 3 min. TIMP-1 反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 40 s, 55°C 30s, 72°C 60 s, 28 次循环, 72°C 延伸 3 min. 扩增结束后 20 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳, 在紫外灯下观察结果并拍照保存. 利用密度扫描仪对特异性条带进行扫描, 测得其灰度值 A, 与相应的  $\beta$ -actin 灰度之比表示 MMP-13mRNA 和 TIMP-1mRNA 的相对水平.

**统计学处理** 采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, 计量资料用 mean  $\pm$  SD 表示, 组间比较采用 *t* 检验.

## 2 结果

**2.1 不同时期模型组大鼠肝脏病理变化** 于造模的 20 wk, 22 wk 分别处死 7, 18 只模型组大鼠 (其中 1 只因麻醉意外死亡). 随着时间的推移, 大鼠肝细胞脂肪变性加重, 脂肪空泡增大, 炎症程度亦随之加重, 并出现不同程度的肝纤维化, 部分大鼠可见早期肝硬化表现 (表 2, 图 1A-B). 而对照组大鼠肝小叶结构正常, 未见上述变化.

表1 引物序列

名称	引物序列	扩增长度 bp
MMP-13	5' -AGCTTGCCCACTCCCTCGGTCTG-3'	364
	5' -GTCTCGGGATGGATGCTCGTATG-3'	
TIMP-1	5' -TTCGTGGGGACACCAGAAGTC-3'	485
	5' TATCTGGGACCGCAGGGACTG-3'	
$\beta$ -actin	5' -CATTTGCGGTGCACGATGGAG-3'	599
	5' -GCCATCCTGCGTCTGGACCTG-3'	

表2 炎症指数和纤维化指数

T/wk	炎症活动度	纤维化程度	脂肪变性(%)
20	0.86 ± 0.38	1.00 ± 0.58	30-50
22	2.71 ± 1.49	2.47 ± 1.00	30-60

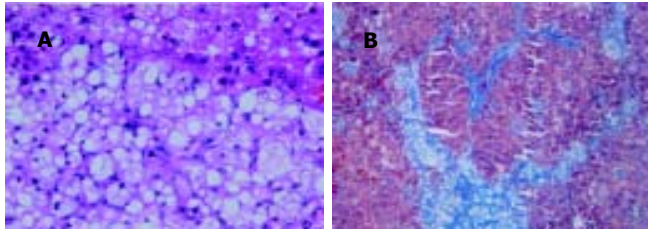
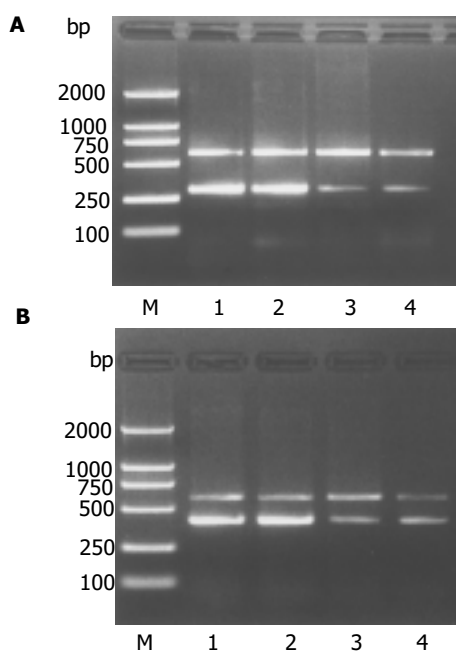


图1 模型组大鼠肝。A: 明显的脂肪变性(HE × 400); B: 纤维组织明显增生, 并形成假小叶(MASSON × 100)。

**2.2 肝指数和血清生化指标** 20 wk和22 wk模型组大鼠肝指数都显著高于对照组, TG在20 wk模型组大鼠与对照组相比差异无显著性, 而在22 wk两组相比就有显著性差异, 20 wk和22 wk模型组大鼠血清TCH都显著高于对照组, 20 wk和22 wk模型组大鼠血清ALT显著高于对照组(表3)。

**2.3 肝组织MMP-13 mRNA和TIMP-1 mRNA** 在高脂饮食20 wk肝脏MMP-13 mRNA表达显著高于对照组, TIMP-1 mRNA表达虽高于正常对照组, 但无显著性差异。在22 wk肝脏MMP-13 mRNA表达仍高于对照组, 但增高的趋势与20 wk相比明显下降, 而TIMP-1 mRNA表达在22 wk则显著升高, 与对照组有显著性差异。高脂饮食组MMP-13/TIMP-1比例随着时间的推移22 wk与20 wk相比显著下降( $P < 0.05$ )(表4, 图2A-B)。

图2 NASH大鼠肝中MMP-13 mRNA和TIMP-1的表达。1, 2 模型组; 3, 4 对照组; M: Marker; 上排为 $\beta$ -actin(599 bp)。A: MMP-13 mRNA; B: TIMP-1 mRNA。

### 3 讨论

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是目前已被公认为原发性肝硬化或非活动性小结性肝硬化的前期病变, NASH的组织学改变与酒精性肝病相似, 肝脂肪变可能是肝纤维化、肝硬化的早期表现。非酒精性脂肪性肝炎时过量的脂肪在肝实质细胞内积累, 导致体内游离脂肪酸(FFA)增多, FFA的细胞毒性可引起线粒体肿胀, 膜渗透性增加, 溶酶体易脆性增加, 也可损害胰岛素信号转导。线粒体内 $\beta$ 氧化增加, 不平衡的氧化磷酸化导致自由基形成<sup>[15]</sup>, 引起肝细胞损害、肝星状细胞(HSC)激活<sup>[16]</sup>, 胶原合成增加, 降解减少, 发展为纤维化<sup>[17-21]</sup>。肝纤维化的发生不仅是由于肝内的细胞外基质(ECM)合成过多, 而且与ECM降解水平密切相关, 在肝内参与ECM降解的主要是一组名为基质金属蛋白酶(MMPs)的酶系, 其特异性抑制物—组织金属蛋白酶抑制因子(TIMPs)可对该酶系活性产生抑制作用。二者与肝内ECM降解密切相关, 在肝纤维化进程中发挥重要作用<sup>[22-24]</sup>。肝内MMPs来源主要是肝星状细胞(HSC)和Kupffer细胞, HSC在早期肝损伤等条件下被激活, 由静态转化为肌成纤维样细胞, 合成MMP-13等参与肝内ECM降解<sup>[25-26]</sup>。而作为MMPs的特异性抑制因子TIMP-1, 当肝星状细胞被激活后, 其表达明显增强。肝脏在急性损伤期已经有肝星状细胞激活, 并有细胞外基质合成增加, 在急性和亚急性肝细胞坏死病程中, 随着胶原大量沉积于纤维间隔内; 基质金属蛋白酶基因表达增强, 并且增加高峰于纤维化中期, 而在纤维化中、晚期基质金属蛋白酶活性逐渐降低。基质金属蛋白酶抑制因子-1在纤维化初期转录增强, 表现出很强对抗基质金属蛋白酶的作用。许多研究认为, 肝纤维化在一定程度上与基质金属蛋白酶抑制因子基因高水平表达有关<sup>[27-29]</sup>。本研究通过高脂饮食建立S-D大鼠NASH模型, 第20 wk组织学检查显示大鼠肝脏有50%发生脂肪变性, 少数汇管区纤维组织轻度增生, 肝MMP-13 mRNA表达显著高于正常对照组, 血清总胆固醇和ALT也显著升高, 说明了持续的高脂饮食造成体内脂质代谢紊乱, 脂质过氧化产物损伤肝细胞造成脂肪性肝炎, 就可激活肝星状细胞, 增加胶原生成, 此时处在肝纤维化早期, HSC和Kupffer细胞合成的MMP-13参与降解ECM, 以对抗纤维化。当造模22 wk模型组大鼠肝脏组织炎症和纤维化明显加重, 肝实质内出现多处点状坏死灶伴中性粒细胞浸润此时肝细胞炎症加剧, 纤维组织明显增生, 部分有假小叶形成趋势。此时肝组织MMP-13 mRNA升高趋势与20 wk相比显著缓解, 而TIMP-1 mRNA表达显著升高。MMP-13/TIMP-1的比率由20 wk的1.51下降到22 wk的1.17。随着脂肪肝程度的加剧, 肝组织MMP-13 mRNA表



表3 各时期2组大鼠肝脏指数与血清生化指标(mean ± SD)

t/wk	分组	n	肝指数	TG(mmol/L)	TCH(mmol/L)	ALT(nkat)
20	正常对照	7	0.024 ± 0.002	0.55 ± 0.20	0.92 ± 0.17	673 ± 196
	高脂饮食	7	0.043 ± 0.013 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.41	2.74 ± 1.79 <sup>a</sup>	1 138 ± 298 <sup>b</sup>
22	正常对照	8	0.024 ± 0.006	0.44 ± 0.18	0.68 ± 0.15	501 ± 85
	高脂饮食	17	0.043 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.24 <sup>b</sup>	3.13 ± 0.71 <sup>b</sup>	2 934 ± 1 788 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 正常对照组.

表4 各时期2组大鼠肝脏 MMP mRNA /TIMP-1 mRNA 表达水平(mean ± SD)

t/wk	分组	n	MMP-13/ β-actin	TIMP-1 /β-actin	MMP-13/ TIMP-1
20	正常对照	7	0.71 ± 0.08	0.60 ± 0.03	
	高脂饮食	7	1.14 ± 0.29 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.20	1.51 ± 0.29
22	正常对照	8	0.73 ± 0.10	0.60 ± 0.10	
	高脂饮食	17	0.84 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.17 ± 0.21

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 正常对照组.

达呈逐渐下降趋势, TIMP-1 mRNA 则相反表现出持续增高, MMP-13 的活性被逐渐增多的 TIMP-1 所抑制, 造成肝损伤后增生的 ECM 成分尤其是 I、III 型胶原降解明显下降而沉积加速, 肝纤维化进程随之加速.

总之, 我们的研究表明, 尽管肝 MMP-13 mRNA 的表达在 NASH 初期很高, 这可能是机体的一种保护机制. 但随着致病因素的持续存在, 肝脂肪变性程度的加剧, 由活化的 HSC 或肝细胞表达 TIMP-1 增高, MMP-13 mRNA 表达水平急剧下降, 其活性被抑制, 肝内 ECM 沉积大于降解, 最终导致肝纤维化, 甚至肝硬化.

#### 4 参考文献

- 曾民德. 重视非酒精性脂肪性肝病的研究. *中华肝病杂志* 2003; 11:69-70
- 曾民德. 对非酒精性脂肪性肝病的再认识. *肝脏* 2003;8:1-4
- Brunt EM. Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2002;6:399-420
- Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24:3-20
- Alcolado R, Arthur MJ, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (Lond)* 1997;92:103-112
- 高春芳, 陆伦根. 纤维化疾病的基础和临床. 第1版, 上海: 上海科学技术出版社, 2004:265-311
- Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepstellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- McCrudden R, Iredale JP. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol* 2000;15:1159-1168
- Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245-G249
- Zhu YK, Wang BE, Shen FJ, Wang AM, Jia JD, Ma H. Dynamic evolution of MMP-13, TIMP-1, type I and III collagen and their interaction in experimental liver fibrosis. *Zhonghua Ganzangbin Zazhi* 2004;12:612-615

- Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix Metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000;113:443-453
- Arthur MJ, Iredale JP, Mann DA. Tissue inhibitors of metalloproteinases: role in liver fibrosis and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:940-943
- Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:89-104
- Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001;21:3-16
- Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001;21:27-41
- Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d808-826
- 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊断标准. *中华肝病杂志* 2003;11:71
- 王家骥. 非酒精性脂肪性肝炎病理病因和发病机制. *中华消化杂志* 2002;22:360-362
- 范建高, 曾民德. 脂肪肝. 第1版, 上海: 复旦大学出版社, 2000: 48-79
- Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001;21:17-26
- 周俊英, 李兵顺, 刘金星. 肝纤维化的发生机制. *河北医科大学学报* 2002;23:50-52
- 周光德, 赵景民. 细胞外基质在肝内的代谢与肝纤维化的形成. *世界华人消化杂志* 2002;10:57-59
- 朱跃科, 王宝恩, 贾继东. 基质金属蛋白酶及其抑制因子与肝纤维化. *临床和实验医学杂志* 2002;1:159-165
- Watanabe T, Niioka M, Hozawa S, Kameyama K, Hayashi T, Arai M, Ishikawa A, Maruyama K, Okazaki I. Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 2000;33:224-235
- Zhu GF, Yu CH, Zhang Y, Li YM. Gene expression of interstitial collagenase MMP-13 progressive phase of rat liver fibrosis induced by ethanol. *Zhonghua Ganzangbin Zazhi* 2003;11:660-662
- 吕晓辉, 谢艳华, 傅宝玉, 刘春荣, 王炳元. 基质金属蛋白酶抑制剂-1 在实验性酒精性肝病中的动态表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:29-33
- Vaillant B, Chiamonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Immunol* 2001;167:7017-7026
- Lee HS, Huang GT, Miao LH, Chiou LL, Chen CH, Sheu JC. Expression of matrix metalloproteinases in spontaneous regression of liver fibrosis. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1114-1117
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):850-860

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# L-[1-<sup>13</sup>C]苯丙氨酸呼气试验与肝脏苯丙氨酸羟化酶活性

严惟力, 蒋义斌, 林祥通, 孙旭, 戎兰, 梁棋, 孙大裕

严惟力, 蒋义斌, 孙旭, 戎兰, 梁棋, 孙大裕, 复旦大学附属华山医院消化内科 上海市 200040

严惟力, 林祥通, 复旦大学附属华山医院核医学科 上海市 200040

严惟力, 男, 1967-06-06 生, 浙江省宁波市人, 医学博士, 2004 年上海第二医科大学附属仁济医院核医学博士后, 副主任医师, 主要从事同位素基础和临床应用研究。

项目负责人: 孙大裕, 200040, 上海市乌鲁木齐中路 12 号, 复旦大学附属华山医院消化内科。sdy385@yahoo.com.cn

电话: 021-62489999-6330

收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2005-01-05

## Correlation between L-[1-<sup>13</sup>C] phenylalanine breath test and activity of phenylalanine hydroxylase

Wei-Li Yan, Yi-Bin Jiang, Xiang-Tong Lin, Xu Sun, Lan Rong, Qi Liang, Da-Yu Sun

Wei-Li Yan, Yi-Bin Jiang, Xu Sun, Lan Rong, Qi Liang, Da-Yu Sun, Department of Gastroenterology, Affiliated Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China

Wei-Li Yan, Xiang-Tong Lin, Department of Nuclear Medicine, Affiliated Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China

Correspondence to: Da-Yu Sun, Department of Gastroenterology, Affiliated Huashan Hospital of Fudan University, 12 Center Wurumuqi Middle Road, Shanghai 200040, China. sdy385@yahoo.com.cn

Received: 2004-12-07 Accepted: 2005-01-05

## Abstract

**AIM:** To investigate the correlation between the result of L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine breath test (PheBT) and the phenylalanine hydroxylase(PAH)activity of the liver in rats.

**METHODS:** PheBT was performed in Prague-Dawley (SD) rats with acute tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) hepatitis ( $n = 10$ ) and control SD rats ( $n = 10$ ). 20mg/kg body weight L-[1-<sup>13</sup>C] phenylalanine (<sup>13</sup>C-phe) was administered via tail vein, and breath samples were taken before administration and at different time within 60 minutes after administration. <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> abundance was measured with isotope ratio mass spectrometer, and <sup>13</sup>C excretion rate constant (PheBT-k) was calculated. The PAH activity in the liver tissues was determined by enzyme-coupled assay.

**RESULTS:** After the intravenous administration of <sup>13</sup>C-phe, <sup>13</sup>C excretion reached the peak in two minutes in most acute hepatitis rats (8/10) and control rats (9/10). The time-course of <sup>13</sup>C excretion had two phases: fast phase and slow phase. PheBT-k of CCl<sub>4</sub> hepatitis rats was significantly

less than that of normal control rats [(2.45±0.25)×10<sup>-2</sup>/min vs (2.98±0.19)×10<sup>-2</sup>/min,  $P < 0.01$ ]. There was no significant difference for <sup>13</sup>C fast phase disposition constant between the two groups [(9.46±3.27)×10<sup>-2</sup>/min vs (10.17±2.10)×10<sup>-2</sup>/min,  $P > 0.05$ ]. However, the peak value of <sup>13</sup>C excretion of acute hepatitis rats was significantly higher than that of controls [(204.33±35.80)% vs (170.65±22.85)% ( $P < 0.05$ )]. The PAH activity of whole liver of hepatitis rats was significantly lower than that of control rats ( $P < 0.01$ ). PheBT-k was highly correlated to the PAH activity of the whole liver ( $r = 0.92$ ,  $P < 0.01$ ) in all rats.

**CONCLUSION:** It is strongly indicated that decreased activity of PAH of the whole liver is the most direct reason for decreased <sup>13</sup>C excretion rate in acute CCl<sub>4</sub> hepatitis rats, and the PheBT-k can be used to quantify the degree of liver injury.

**Key Words:** Phenylalanine; Breath test; Phenylalanine hydroxylase

Yan WL, Jiang YB, Lin XT, Sun X, Rong L, Liang Q, Sun DY. Correlation between L-[1-<sup>13</sup>C] phenylalanine breath test and activity of phenylalanine hydroxylase. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(4):516-520

## 摘要

**目的:** 研究L-[1-<sup>13</sup>C]苯丙氨酸呼气试验(PheBT)结果与大鼠肝脏苯丙氨酸羟化酶(PAH)活性的关系。

**方法:** CCl<sub>4</sub> 诱导急性肝损伤SD大鼠 10 只, 正常对照组 10 只;尾静脉给予 <sup>13</sup>C 标记 L- 苯丙氨酸(<sup>13</sup>C-phe)20 mg/kg, 收集给药前和给药后 60 min 内间断时间点的气样;采用气体同位素比值质谱仪测量气样中 <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 丰度;计算呼气中 <sup>13</sup>C 清除速率常数;采用酶偶联法测量肝脏组织中 PAH 活性。

**结果:** 绝大部分正常(9/10)和CCl<sub>4</sub>急性肝损伤(8/10)大鼠尾静脉给予 <sup>13</sup>C-phe 以后, 呼出气中 <sup>13</sup>C 排除在 2 min 达到峰值;呼出气中 <sup>13</sup>C 排除分为快、慢两个时相;CCl<sub>4</sub> 肝损伤大鼠 PheBT 参数 <sup>13</sup>C 排除速率常数 PheBT-k 显著小于正常对照组( $P = 0.00$ ,  $P < 0.01$ ), 其值分别为 (2.45±0.25)×10<sup>-2</sup>/min 和 (2.98±0.19)×10<sup>-2</sup>/min 而快时相 <sup>13</sup>C 处置常数在肝损伤和正常组大鼠之间没有差异( $P > 0.05$ ), 其值分别为 (9.46±3.27)×10<sup>-2</sup>/min 和 (10.17±2.10)×10<sup>-2</sup>/min; CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤大鼠呼出气中 <sup>13</sup>C 丰度峰值 (204.33±



35.80)%却显著高于正常对照组(170.65±22.85)%( $P=0.04$ ,  $P<0.05$ );急性肝损伤大鼠全肝脏苯丙氨酸羟化酶活性显著低于正常对照组( $P=0.00$ ,  $P<0.01$ );大鼠呼气试验参数PheBT-k与大鼠全肝苯丙氨酸羟化酶总活度高度相关( $r=0.92$ ,  $P=0.00$ ,  $P<0.001$ ).

**结论:** PheBT时全肝PAH总活度降低是急性肝损伤大鼠呼出气中<sup>13</sup>C排除速率下降的最直接原因;呼气试验参数PheBT-k可以定量评价肝脏损伤程度.

**关键词:** 苯丙氨酸; 呼气试验; 苯丙氨酸羟化酶

严性力, 蒋义斌, 林祥通, 孙旭, 戎兰, 梁棋, 孙大裕. L-[1-<sup>13</sup>C]苯丙氨酸呼气试验与肝脏苯丙氨酸羟化酶活性. 世界华人消化杂志 2005;13(4):516-520 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/516.asp>

## 0 引言

<sup>13</sup>C 呼气试验已被应用于营养学、药理学、药物代谢学特别是包括胰腺外分泌功能和肝脏功能不全在内的消化系统疾病诊断研究. L-[1-<sup>13</sup>C]苯丙氨酸呼气试验(PheBT)可检测终末期肝病患者肝脏功能<sup>[1-2]</sup>. 我们的临床研究结果也证实了PheBT的应用价值<sup>[3]</sup>. 近年来, 动物实验也证实PheBT结果能够反映肝段切除大鼠肝脏组织学的改变<sup>[4]</sup>. 由于此前有文献报道肝病患者血浆中苯丙氨酸的清除能力下降, 所以研究者们均假设引起PheBT <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>排除减少的原因是由于肝脏对苯丙氨酸氧化能力的下降, 但是此假设缺乏更直接的实验证据. 我们采用传统的CCl<sub>4</sub>急性肝损伤大鼠模型和自行设计的动物呼气试验模型以及酶—偶联技术测定大鼠肝脏中苯丙氨酸代谢限速酶—苯丙氨酸羟化酶(PAH)的活性, 研究PheBT参数与全肝PAH活性的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康清洁级(SPF)SD种大鼠, ♂, 体重在220-230 g, 由复旦大学实验动物中心提供. 观察1 wk后, 选取体质量在280-290 g左右的大鼠20只, 随机分为两组, 每组10只. 肝损伤模型复制完成后急性肝损伤组大鼠体质量(270.0±4.9)g, 正常对照组大鼠体质量为(271.7±5.2)g; L-[1-<sup>13</sup>C]苯丙氨酸(L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine, <sup>13</sup>C-phe)粉剂, 由ISOTEC公司生产提供(Miamisburg)化学纯度大于99%, <sup>13</sup>C丰度为99%;电热恒温鼠兔两用解剖台由张家港市生物医学仪器厂生产;哈佛683型小动物呼气机由美国Harvard Apparatus Inc制造;AP2003气体同位素比值质谱仪由英国Analytical Precision制造;特制10 mL气体收集瓶由Labco公司生产;Suprafuge 22型高速低温离心机(Heraeus Instruments, German);FA1004型精密电子天平由上海精密科学仪器有限公司天平仪器

厂生产;PT 3100型组织匀浆机由瑞典Kine Matic AG公司生产;PHS-3TC型PH计由上海天达仪器有限公司生产;JY-92II型超声细胞破碎机由宁波新艺科器研究所生产;WFZ-MV-2000型紫外可见分光光度计由上海合利仪器有限公司生产;CS150 GX型超速离心机由日立生产. L-苯丙氨酸(Sigma);6-甲四氢蝶呤、还原型辅酶II(NADH)、二氢蝶呤还原酶和过氧化氢酶均由Sigma公司生产;二巯苏糖醇(DTT)和硫酸镁均购自上海化学试剂公司;Lowry法蛋白测定试剂盒购自申能博彩生物科技公司.

**1.2 方法** SD大鼠禁食8 h后, 第1次给药, 肝损伤组给予600 mL/L CCl<sub>4</sub>, 经口染毒, 灌胃量为2 mL/kg体重, 正常给水, 4 h后第2次给相同剂量的CCl<sub>4</sub>, 正常对照组每次均给予等量的橄榄油. 各组动物再隔夜禁食14 h, 称量体质量后进行呼气试验;大鼠称量体重, 麻醉采用腹腔给予50 g/L戊巴比妥钠, 剂量为50 mg/kg. 将麻醉的大鼠仰卧位固定在电热恒温小动物解剖台上, 颈正中切口, 游离气管, 在游离段上剪一T型小口, 插入套管针套管, 用尼龙线结扎固定, 手术面用生理盐水浸湿的纱布覆盖. 使实验过程中内脏温度保持在37.5±0.5℃. 采用小动物呼气机, 进行机械通气, 给予210 mL/L氧气含量的空气, 出气口通过软管直接通室内大气. 机械通气潮气量为2.5 mL, 通气频率52次/min, 呼-吸时间比1:1. 通气15 min后用专用气样收集瓶采集呼出气体20 s, 作为本底. 尾静脉弹丸给予16 g/L <sup>13</sup>C-phe生理盐水溶液, <sup>13</sup>C-phe剂量为20 mg/kg体重. 即刻开始收集呼出气样和注射完成后1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 min时的28次气样, 气样收集时间每次均为20 s. 应用气体同位素比值质谱仪测定样品中<sup>13</sup>C丰度得到各时相的 $\delta^{13}\text{C}$ 值(‰),  $\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = [({}^{13}\text{C atom}\% / {}^{13}\text{C atom}\%_{\text{std}}) - 1] \times 1000$ , 其中<sup>13</sup>C atom%为样品中<sup>13</sup>C atom/<sup>12</sup>C atom×100%, <sup>13</sup>C atom%<sub>std</sub>为国际标准品PDB(Pee dee Belemnite)中<sup>13</sup>C atom/<sup>12</sup>C atom×100%为0.0112372. 各时相的 $\delta^{13}\text{C}$ 值减去0时相(本底) $\delta^{13}\text{C}$ 值得到该时相<sup>13</sup>C丰度的变化即 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ ,  $\Delta\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = [({}^{13}\text{C atom}\%_{\text{t min}} - {}^{13}\text{C atom}\%_{\text{0 min}}) / {}^{13}\text{C atom}\%_{\text{std}}] \times 1000$ , PheBT呼气试验参数<sup>13</sup>C排除速率常数PheBT-k采用Wensing *et al* (Hepatology 1990;12:13-19)方法求得. 呼气试验结束, 游离颈内动脉主干一段, 结扎远端, 在游离段上切口, 插管放血处死. 血样室温下静置30 min, 1500 r/min离心15 min, 留取血清, 检测ALT、AST、TBA、AKP和TBIL. 放血后立即摘除大鼠肝脏, 用冰冻过的生理盐水冲洗干净, 称量肝脏湿质

量,取肝脏相同部位组织一块,经40 g/L中性甲醛固定,蜡块包埋切片,常规HE染色,光学树脂胶封片.剩余肝脏组织做好标记保存于液氮中备用.

从液氮中取出冻存SD大鼠肝脏,精确称取2 g剪碎,加冻过的3 mmol/L的Tris KCL(0.15 mol/L KCl, pH为7.2)缓冲液10 mL,用组织破碎机匀浆机破碎匀浆,15 000 g冷冻离心10 min,去沉渣,水相再用超声细胞破碎机破碎细胞(破碎时间为10 s,间隔10 s,共10次),15 000 g冷冻离心10 min,水相用滤纸滤去脂肪,超速离心机200 000 g离心30 min,水相分管置-20℃贮存.酶活性测定用WFZ- $\mu$ V-2000型紫外可见分光光度计,波长340 nm,比色杯光径为1 cm,空白管调零,读取0 min和5 min时的吸光度,计算其吸光度的下降度, $A = 5 \text{ min}$ 吸光度-0 min吸光度.样品液50  $\mu$ L,蒸馏水421.3  $\mu$ L,10 mmol/L硫酸酶1.7  $\mu$ L,5 mmol/L L-苯丙氨酸5  $\mu$ L,50 g/L过氧化氢酶10  $\mu$ L,二氢蝶呤还原酶原液5  $\mu$ L.28℃摇匀温育5 min使酶激活,再加入2.5 mmol/L 6-甲四氢蝶呤3.5  $\mu$ L,5 mmol/L NADH 3.5  $\mu$ L,使总体积至500  $\mu$ L.空白管各种液体的上样量与测定管等同,以蒸馏水50  $\mu$ L替代样品液.总蛋白测定按试剂盒使用说明采用Lowry法进行测量.

**统计学处理** 结果用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示.采用SPSS11.0软件进行两样本均数差别的 $t$ 检验和相关性分析.比较呼气试验实验参数和各血液生化检查结果在正常对照组和急性肝损伤模型组间的差异以及呼气实验参数与大鼠肝脏总PAH活度间的相关性. $P < 0.05$ 被认为有统计学意义.

## 2 结果

急性肝损伤组大鼠肝脏的脏器指数(全肝湿质量/体质量%)( $3.28 \pm 0.26$ )%非常显著大于正常组( $4.76 \pm 0.34$ )%( $P < 0.001$ ).

光学显微镜下组织形态学观察:正常大鼠肝脏小叶结构完整清晰,肝脏细胞呈条索状延中央静脉放射排列(图1A);急性肝损伤大鼠肝脏小叶结构破坏,肝小叶呈中央性变性(浊肿、胞质疏松、气球样变)和坏死,变性坏死肝脏细胞延中央静脉呈片状分布在III区(图1B)和带状向外延伸至II(图1C),严重者坏死细胞呈弥漫性分布(达I区)(图1D).

**2.1 肝功能血液生化指标** 正常对照组大鼠ALT  $46.60 \pm 13.95(26-67)$ U/L,AST  $96.20 \pm 25.38(68-146)$ U/L,TBA  $6.64 \pm 4.47(1-15)$  $\mu$ mol/L,AKP  $117.50 \pm 29.76(72-156)$ U/L,TBIL  $1.65 \pm 0.18(1-2.2)$  $\mu$ mol/L;急性肝损伤大鼠血清中ALT、AST、TBA、AKP含量均

明显高于正常对照组( $P = 0.00$ , $P < 0.01$ ),急性肝损伤大鼠血清ALT  $604.30 \pm 216.00(363-1004)$ U/L,AST  $196.60 \pm 88.63(95-387)$ U/L,TBA  $132.50 \pm 102.09(23-368)$  $\mu$ mol/L,AKP  $216.10 \pm 57.35(129-318)$ U/L,TBIL  $10.66 \pm 6.90(4.6-25.4)$  $\mu$ mol/L.

**2.2  $^{13}\text{C}$ 排除时相曲线** 正常和肝损伤大鼠尾静脉弹丸给予 $^{13}\text{C}$ -Phe后30 s内就能在动物呼气机排气口收集到代谢后产生的 $^{13}\text{CO}_2$ ,其浓度很快升高,绝大多数大鼠(正常组为9/10,肝损伤组为8/10)在注射后2 min时呼出气中 $^{13}\text{C}$ 达到峰值,随后缓慢下降,所有大鼠60 min内的 $^{13}\text{C}$ 排除时相曲线呈尖锐平滑的单峰,正常对照组大鼠 $^{13}\text{C}$ 排除峰值为( $170.65 \pm 22.85$ )%,急性肝损伤组为( $204.33 \pm 35.80$ )%,二者之间差异有显著性( $P = 0.04$ , $P < 0.05$ ,图2),急性肝损伤组峰值大于正常对照组(表1).

**2.3 PheBT试验参数** 正常和急性肝损伤大鼠 $^{13}\text{C}$ 排除时相曲线显示,静脉给予20 mg/kg L-[1- $^{13}\text{C}$ ]苯丙氨酸, $^{13}\text{C}$ 排除均分为快、慢两个时相,正常对照组大鼠快处置常数为( $10.17 \pm 2.10$ ) $\times 10^{-2}$ /min,慢处置常数(即文献报道之 $^{13}\text{C}$ 排除速率常数)为( $2.98 \pm 0.19$ ) $\times 10^{-2}$ /min;急性肝损伤组大鼠快(时相)处置常数为( $9.46 \pm 3.27$ ) $\times 10^{-2}$ /min, $^{13}\text{C}$ 排除速率常数PheBT-k为( $2.45 \pm 0.25$ ) $\times 10^{-2}$ /min.两组之间 $^{13}\text{C}$ 快处置常数差异无显著性( $P > 0.05$ ),PheBT-k差异非常显著( $P = 0.00$ , $P < 0.01$ ,表1).

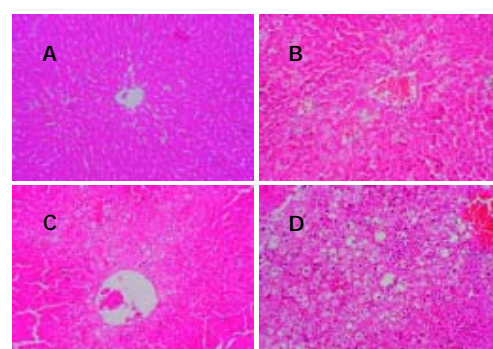


图1 大鼠肝脏组织HE染色结果( $\times 200$ ). A: 正常; B-D:急性肝损伤.

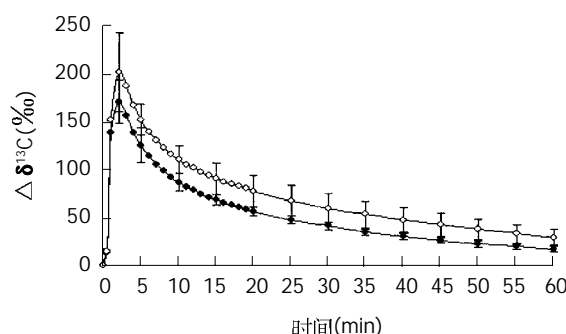
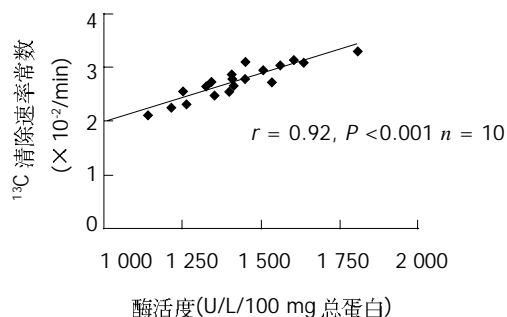


图2 PheBT  $^{13}\text{C}$ 排除时相曲线. ● - 正常对照组  $n = 10$ ; ○ -  $\text{CCl}_4$ 急性肝损伤组  $n = 10$ .

表1 CCl<sub>4</sub>急性肝损伤大鼠和正常对照组各项检测指标的对比(mean±SD)

指标	急性肝损伤组( <i>n</i> = 10)	正常对照组( <i>n</i> = 10)	<i>P</i> 值
<sup>13</sup> C 排除峰值 (%)	204.33 ± 35.80 (133.27–265.19)	170.65 ± 22.85 (135.02–207.32)	<0.05
<sup>13</sup> C 快处置常数 (× 10 <sup>-2</sup> /min)	9.46 ± 3.27 (2.26–13.15)	10.17 ± 2.10 (7.74–13.10)	>0.05
<sup>13</sup> C 排除速率常数 PheBT- <i>k</i> (× 10 <sup>-2</sup> /min)	2.45 ± 0.25 (2.03–2.79)	2.98 ± 0.19 (2.74–3.29)	<0.01
全肝 PAH 总活度 (U/L/100 mg 总蛋白)	1281.59 ± 131.22 (1025.49–1447.75)	1523.21 ± 136.28 (1339.00–1805.50)	<0.01

图3 全肝苯丙氨酸羟化酶总活度与<sup>13</sup>C排除速率常数Phe-*k*的相关性

2.4 PheBT参数PheBT-*k*与全肝脏PAH总活度的关系 急性肝损伤组大鼠全肝PAH总活度(1281.59 ± 131.22) U/L/100 mg总蛋白非常显著地低于正常组(1523.21 ± 136.28) U/L/100 mg总蛋白( $P = 0.00 < 0.01$ , 表1), 呈( $r = 0.92$ ,  $P = 0.00 < 0.01$ , 图3)

### 3 讨论

肝脏在氨基酸代谢和蛋白质合成中起到重要的调节作用, 血浆氨基酸清除与肝脏能量产生和肝性脑病患者生存率相关, 氨基酸血浆清除率能够反映肝细胞功能以及肝脏功能储备, 预测外科手术干预的预后, 但是该项检查实验室操作复杂耗时, 没有得到广泛的临床应用。

苯丙氨酸是人体8种必需氨基酸之一, 摄入后主要在肝脏代谢分解. 采用口服PheBT检测慢性肝病患者肝细胞质功能和全肝脏功能储备, 结果发现, 呼气试验参数降低, 其降低程度与部分血液肝功能生化指标以及ICG检查结果存在不同程度的相关性, 故此认为慢性肝病患者苯丙氨酸氧化分解能力减低<sup>[1, 5-6]</sup>. 最近, Ishii *et al*发现<sup>[7]</sup>, PheBT能够反映肝病患者肝脏的病理学改变; 动物实验也证实, PheBT参数能反映肝段切除术后大鼠肝脏组织病理和形态学改变<sup>[4]</sup>, 由此, 研究者们认为, 肝病患者<sup>13</sup>C-PheBT参数的改变是源自于肝脏苯丙氨酸氧化功能的降低, 但是此结论缺乏进一步的直接实验证据. 2001年Ito *et al*<sup>[8]</sup>采用氨基半乳糖急性肝衰竭大鼠模型证实PheBT三项参数与大鼠全肝苯丙氨酸羟化酶总活度相关, 即给药后2 min  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ 值( $r = 0.917$ )、3 min  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ ( $r = 0.831$ )以及给药后10 min内 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ 的AUC

值( $r = 0.824$ ). 由于上述实验采用的是大鼠急性肝功能衰竭模型, 造成动物肝脏细胞大量坏死而致肝功能衰竭, 但是此模型并不对大部分的临床轻度肝功能损伤病例具有普遍的指导意义, 所以, 我们采用CCl<sub>4</sub>急性肝损伤大鼠模型来研究肝脏PAH活性的改变与<sup>13</sup>C-PheBT参数的关系。

在PheBT后, 我们采用酶偶联法测量每只大鼠肝脏组织匀浆中PAH活性发现, CCl<sub>4</sub>急性肝损伤大鼠肝脏PAH活度显著低于正常对照组( $P = 0.00 < 0.01$ ), 并且, 试验参数PheBT-*k*与全肝PAH总活度高度正相关( $r = 0.92$ ,  $P = 0.00 < 0.01$ ), 这一结果揭示, 对于CCl<sub>4</sub>急性肝损伤动物, 呼气试验<sup>13</sup>C排除速率下降是由于肝脏苯丙氨酸氧化能力的下降。

在L-[1-<sup>13</sup>C]苯丙氨酸氧化分解最终产生<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>过程中除了PAH参与外, 还有酪氨酸转氨酶和4-羟苯丙酮酸氧化酶参与反应, 不可否认这两个酶的活力的改变可能也会影响呼气试验时<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>产出, 但是由于全肝PAH活度与PheBT-*k*高度相关, 因此我们认为肝脏PAH总活度降低是影响PheBT时<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>产出的最为重要的原因. 当然, 其他原因如血液中内源性的苯丙氨酸浓度也可能影响PheBT的结果, 肝病患者血浆中苯丙氨酸浓度增加, 然而, 在急性肝损伤动物模型中并未发现血浆苯丙氨酸浓度改变<sup>[8]</sup>.

分析正常对照和CCl<sub>4</sub>急性肝损伤大鼠PheBT呼气试验参数显示, <sup>13</sup>C排除峰值在二者之间存在显著差异, 急性肝损伤大鼠峰值显著高于正常大鼠, 这与Ito *et al*<sup>[8]</sup>的观察结果不同, 我们认为这应该反映出急性肝损伤后, 大鼠血流动力学的改变. 根据药物代谢动力学原理快处置常数主要由分布过程来决定, 慢处置常数主要由消除过程来决定, 药物的半衰期由慢处置常数(清除速率常数)决定. 终末期肝病患者和GalN急性肝功能衰竭模型动物呼气试验<sup>13</sup>C排除减少, 我们的动物实验结果虽然没有发现模型大鼠呼出气中<sup>13</sup>C排除减少(甚至发现可能是由于血流动力学改变的影响, 在实验观察60 min期间内大鼠排除<sup>13</sup>C略有增加), 但<sup>13</sup>C排除速率却较正常大鼠显著降低, 并且<sup>13</sup>C排除速率常数PheBT-*k*与大鼠全肝PAH总活度高度相关. 这说明, PheBT不仅对严重肝病后的肝脏功能损害具有诊断价值, 而且选择适当的试验参数也能从

酶分子学水平上反映轻度肝损害时的功能状况;同时研究结果还显示,我们自行设计的以呼气机为基本辅助设备的动物呼气试验模型具有安全、方便、有效可靠的特点,经过适当方式调整后可以在今后应用于其他呼气试验基础和临床研究.

#### 4 参考文献

- 1 Burke PA, Stack JA, Wagner D, Lewis DW, Jenkins RL, Forse RA. L-[1-<sup>13</sup>C] Phenylalanine oxidation as a measure of hepatocyte functional capacity in end-stage liver disease. *Am J Surg* 1997;173:270-273
- 2 Ishii Y, Suzuki S, Kohno T, Aoki M, Goto I, Kohno T, Ito A, Asai S. Patients with severe liver cirrhosis followed up by L-[1-<sup>13</sup>C] phenylalanine breath test. *J Gastroenterol* 2003;38:1086-1090
- 3 严惟力, 孙大裕, 林祥通, 蒋义斌, 孙旭, 卢洪洲, 刘兴党, 林海. L-[1-<sup>13</sup>C]苯丙氨酸呼气试验定量检测肝功能研究. *核技术* 2003; 26:362-366
- 4 Ishii Y, Asai S, Kohno T, Ito A, Iwai S, Ishikawa K. Recovery of liver function in two-third partial hepatectomized rats evaluated by L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine breath test. *Surgery* 2002;132:849-856
- 5 Kobayashi T, Kubota K, Imamura H, Hasegawa K, Inoue Y, Takayama T, Makuuchi M. Hepatic phenylalanine metabolism measured by the [<sup>13</sup>C]phenylalanine breath test. *Eur J Clin Invest* 2001;31:356-361
- 6 Ishii T, Furube M, Hirano S, Takatori K, Iida K, Kajiwara M. Evaluation of <sup>13</sup>C-phenylalanine and <sup>13</sup>C-tyrosine breath tests for the measurement of hepatocyte functional capacity in patients with liver cirrhosis. *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 2001; 49:1507-1511
- 7 Ishii Y, Suzuki S, Kohno T, Aoki M, Kohno T, Ito A, Takayama T, Asai S. L-[1-<sup>13</sup>C] phenylalanine breath test reflects histological changes in the liver. *J Surg Res* 2003;114:120-125
- 8 Ito A, Kohno T, Hosoi I, Ohshima J, Ishii Y, Asai S, Ishikawa K, Shibata K. High correlation between results of the [1-<sup>13</sup>C]-phenylalanine breath test and phenylalanine hydroxylase(EC 1. 14. 16. 1)activity of the liver in rats. *Digestion* 2001;63:130-138

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界华人消化杂志获得2003年度百种中国杰出学术期刊

**本刊讯** 期刊的学术质量是一个综合指标,1999年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系,该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中。综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标,如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等,对期刊分学科进行综合打分。通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定,今年中国科学技术信息研究所评出了第三届中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志 荣获2003年度百种中国杰出学术期刊称号。(世界胃肠病学杂志 2005-02-17)

## 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告:2003年度 世界华人消化杂志 影响因子2.924, WJG 影响因子2.633

**本刊讯** 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告:2003年度世界华人消化杂志总被引频次5249,影响因子2.924,即年指标0.529,他引总引比0.37,引用刊数260,扩散因子5.0,被引半衰期3.06,国际论文比0.01,地区分布数25,机构分布数191,基金和资助论文比例0.31。

2003年度 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 总被引频次1908,影响因子2.633,即年指标0.276,他引总引比0.02,引用刊数26,扩散因子1.5,被引半衰期2.36,地区分布数22,机构分布数279,基金和资助论文比例0.53,国际论文比0.13。(世界胃肠病学杂志 2005-02-17)

# 大鼠肝肺综合征模型的研究

王新国, 韩德五, 张慧英

王新国, 韩德五, 张慧英, 山西医科大学肝病研究所  
山西省太原市 030001

王新国, 男, 1973-01-12 生, 山东省临沭县人, 汉族, 2002 年山西医科大学  
硕士生, 主要从事肝肺综合征研究。

项目负责人: 韩德五, 030001, 山西省太原市新建南路 86 号, 山西医科大学  
肝病研究所. smuhan@public.ty.sx.cn

电话: 0351-4690082 传真: 0351-4690865

收稿日期: 2004-12-08 接受日期: 2004-12-16

## A rat model of hepatopulmonary syndrome

Xin-Guo Wang, De-Wu Han, Hui-Ying Zhang

Xin-Guo Wang, De-Wu Han, Hui-Ying Zhang, Institute of Hepatology,  
Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Correspondence to: De-Wu Han, Institute of Hepatology, Shanxi Medi-  
cal University, 86 Xinjian South Road, Taiyuan 030001, Shanxi Province,  
China. smuhan@public.ty.sx.cn

Received: 2004-12-08 Accepted: 2004-12-16

## Abstract

**AIM:** To establish an animal model of hepatopulmonary syndrome.

**METHODS:** Twenty Wistar rats were randomly divided into two groups: control group and model group. The rats in control group were fed with regular food and those in model group with food consisting of corn flour, cholesterol (5% w/w) and alcohol (300 mL/L). The model rats were then administered with 400 mL/L CCl<sub>4</sub> (diluted by corn oil, 3 mL/kg) subcutaneously every four days. All rats were killed at the end of the eighth week. Plasma ALT and AST, liver hydroxyproline and blood oxygen of the abdominal aorta were measured. The ratio of brain-over-lung <sup>99m</sup>Tc-polymerized albumin radioactivity was calculated. Right liver and lung lobe were fixed in 40 g/L phosphate buffered formaldehyde before HE and VG staining were performed.

**RESULTS:** The animal model of hepatopulmonary syndrome was successfully established. Typical characteristics of cirrhosis was observed in the liver. Arterial blood oxygen content was decreased. Alveolar-arterial oxygen partial pressure difference (AaDO<sub>2</sub>) was increased. Pulmonary blood vessels were expanded markedly.

**CONCLUSION:** The animal cirrhotic model induced by compound factors is ideal for the study of hepatopulmonary syndrome.

**Key Words:** Hepatopulmonary syndrome; Animal model

Wang XG, Han DW, Zhang HY. A rat model of hepatopulmonary syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):521-523

## 摘要

**目的:** 建立实验性肝肺综合征动物模型。

**方法:** Wistar ♂ 大鼠 20 只随机分成正常组和模型组;正常组给予正常饲料和自来水, 模型组以掺入胆固醇的玉米面作饲料, 胆固醇占饲料重量的 5%(前 2 wk 的每千克饲料中含有 200 g 猪油), 以 300 mL/L 酒精作为其唯一饮料。在实验第 1 d 脊背 sc 5 mL/kg 四氯化碳原液, 以后每隔 3 d sc 400 mL/L 四氯化碳(用玉米油稀释), 按 3 mL/kg 给予。于 8 wk 末处死动物, 腹主动脉取血, 右肝和右肺用 40 g/L 多聚甲醛固定;左肝 950 mL/L 酒精固定。检测 ALT, AST;测定肝脏羟脯氨酸, 用氯胺 T 法;肝脏 HE、VG 染色;肺 HE 染色;腹主动脉血氧检测;尾静脉注射 <sup>99m</sup>锝-多聚白蛋白肺脑放射活性扫描。

**结果:** 肝硬化形成, 肺泡-动脉氧分压差增大, 血氧含量降低, 肺血管明显扩张。

**结论:** 复合因素造成的模型能够作为肝肺综合征的实验动物模型。

**关键词:** 肝肺综合征; 动物模型

王新国, 韩德五, 张慧英. 大鼠肝肺综合征模型的研究. 世界华人消化杂志 2005;13(4):521-523

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/521.asp>

## 0 引言

肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)是由于慢性肝病或门脉高压引起的肺内血管异常扩张、气体交换障碍和动脉血氧分压降低;可概括为肝病-肺血管扩张-低氧血症三联征<sup>[1]</sup>。在肝脏晚期患者中, 肝肺综合征发病率为 13-47%<sup>[2]</sup>, Krowka<sup>[3]</sup>发现 HPS 的最常见原因是肝硬化, 多见于晚期肝硬化。由于临床上发现 HPS 时, 肝脏及其他脏器功能均已严重受损, 药物治疗 HPS 效果不好, 通过肝移植来改善低氧血症现在已成为研究的热点。当前国内外研究肝肺综合征的

动物模型多采用慢性胆总管结扎(common bile duct ligation, CBDL)复制而成. 此种方法复制的模型在病因学上来说原因较单一, 操作上具有创伤性. 我们对利用复合因素复制的肝硬化模型能否作为肝肺综合征发病机制研究的试验模型作如下研究.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Wistar ♂大鼠20只, 质量230-250 g, 由山西医科大学动物中心提供. 四氯化碳(分析纯, 天津市科赛欧科技有限公司)、玉米油、胆固醇(生物试剂, 天津市化学试剂公司分公司)、玉米面、猪油、300 mL/L酒精.

**1.2 方法** 大鼠随机分成正常组和模型组; 正常组给予正常饲料和自来水, 模型组给予掺入胆固醇的玉米面作饲料, 胆固醇占饲料重量的5%(前2 wk的每千克饲料中含有200 g猪油), 以300 mL/L酒精作为其唯一饮料. 在实验第1 d脊背sc 5 mL/kg四氯化碳原液, 以后每隔3 d sc 400 mL/L四氯化碳(用玉米油稀释), 按3 mL/kg给予. 于8 wk末处死动物, 无菌腹主动脉取血, 右肝和右肺用40 g/L多聚甲醛固定; 左肝950 mL/L酒精固定. 检测ALT, AST; 测定肝脏羟脯氨酸, 用氯胺T法; 肝脏HE、VG染色; 肺HE染色; 腹主动脉血氧检测; 尾静脉注射<sup>99m</sup>钼-多聚白蛋白肺脑放射活性扫描.

**统计学处理** SPSS10.0软件, 方差分析t检验.

## 2 结果

实验过程中除2只正常鼠丢失外, 其余大鼠活动灵敏, 反应敏捷, 毛发光滑, 大便黑硬, 小便淡黄. 模型组2只分别在1 wk和3 wk死亡, 尸检发现肝脏大片坏死出血, 其余动物在整个过程中, 毛发蓬松, 毛发浅黄, 发质脆; 精神萎靡, 整日蜷缩, 食欲不振; 呼吸浅数, 大便黄较正常软, 小便少黄. 8 wk时动物形体消瘦, 步态不稳. 模型组ALT( $1402 \pm 219$  vs  $621 \pm 116$  nkat/L,  $t = 3.141$ ,  $P < 0.01$ ), AST( $3104 \pm 531$  vs  $1145 \pm 223$  nkat/L,  $t = 2.934$ ,  $P < 0.01$ )明显高于正常组, 均有显著意义, 提示有肝功损伤.

**2.1 羟脯氨酸测定结果** 模型组羟脯氨酸含量明显高于正常组; 提示肝脏胶原纤维含量明显增加, 肝纤维化肝硬化程度较重(表1).

**2.2 腹主动脉血氧分压** 模型组动物动脉血氧分压和二氧化碳分压较正常组无明显差异, 但肺泡-动脉血氧分压差增加(表1).

**2.3 <sup>99m</sup>钼尾静脉注射肺脑放射扫描比率** <sup>99m</sup>钼-多聚白蛋白是大分子物质, 其直径大于正常的毛细血管腔, 当其流经毛细血管时被毛细血管扣留. 正常组大鼠在尾静脉注射<sup>99m</sup>钼-多聚白蛋白后, 放射区域主要聚集在肺, 大脑与其他组织中未见有放射性物质. 模型组动物的肺组织中放射性物质的含量很少, 而大脑中含量明显增加, 这说明肺血管明显扩张. 根据放射强度来推断肺血管扩张程度及分流程度(表1).

**2.4 肝肺形态学改变** 肝脏体积缩小、白陶土色, 有些可见咖啡色区域, 表面有米粒大小不等的颗粒(图1). 光镜下肝细胞空泡样改变, 肝纤维化增生明显, 假小叶形成. VG染色显示: 胶原纤维主要分布在汇管区. 肺体积增大, 充血水肿. HE染色显示肺外带肺泡腔减小, 肺间隔增宽, 肺间隔细胞数增多, 以巨噬细胞为主, 毛细血管增多(图2).



图1 肝脏的大体形态: 表面大小不等小米粒状结节, 边缘变锐.

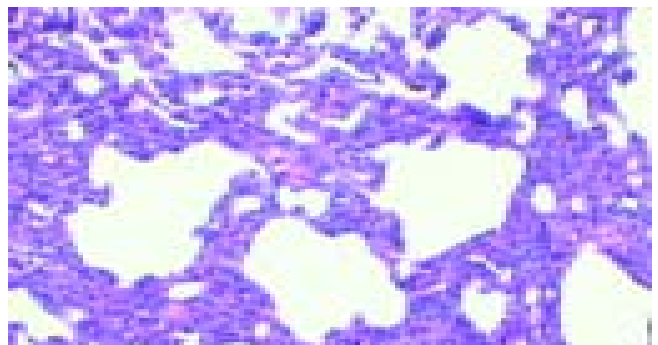


图2 肺间隔增宽, 肺泡腔减小, 毛细血管扩张, 伴有部分肺不张(HE×100)

表1 模型鼠 PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>cont, AaDO<sub>2</sub>, Hypo, 肺脑放射活性比率比较 (mean±SD, n = 8)

分组	PaO <sub>2</sub> (kPa)	PaCO <sub>2</sub> (kPa)	O <sub>2</sub> cont(mL/L)	AaDO <sub>2</sub> (kPa)	Hypo(mg/g)	肺脑放射强度比(%)
正常	12.62±1.82	4.52±0.56	204±3.2	0.45±0.16	0.602±0.07	1.4±0.2
模型	11.83±3.79	3.83±0.74	198±11 <sup>a</sup>	1.31±0.28 <sup>a</sup>	2.079±0.09 <sup>b</sup>	2.9±1.4 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 正常.

### 3 讨论

HPS实际上是基础肝病-肺血管扩张-动脉血氧化合功能障碍构成的三联征,但目前对肝肺综合征的诊断尚缺乏统一标准。Rodriguez-Roisin *et al*<sup>[4]</sup>提出4条诊断标准:(1)有慢性肝病或严重肝病存在,伴有或无严重肝功能不全;(2)无原发性心肺疾病,胸片正常或有间质结节状阴影;(3)肺气体交换异常,有或无低氧血症,但肺泡-动脉氧梯度增大,超过2.0 kPa;(4)肺内放射核素标记物或二维超声心动图提示肺内血管异常扩张。张宏博 *et al*<sup>[5]</sup>观察<sup>99m</sup>锝-多聚白蛋白动态肺灌注扫描在肝肺综合征早期改变,发现<sup>99m</sup>锝-多聚白蛋白动态肺灌注是反映HPS早期的较敏感的监测指标。我们发现,8 wk后模型组动物100%形成肝硬化,腹主动脉血氧含量低,肺泡-动脉氧梯度增加,尾静脉注射<sup>99m</sup>锝-多聚白蛋白肺脑放射扫描结果提示肺血管扩张。同时,此模型肝脏病理改变典型,肺部的改变与倪醒之 *et al*<sup>[6]</sup>用四氯化碳诱导门脉高压所复制动物模型和Schraufnagel *et al*<sup>[7]</sup>胆总管结扎造成的胆汁性肝硬化所伴有的肺毛细血管以及巨噬细胞增多等病理改变大体一致。按照Fallon *et al*<sup>[8]</sup>和Abrams *et al*<sup>[9]</sup>诊断程序,我们认为,此模型可以作为肝肺综合征动物模型。

一个理想的动物模型条件是:与人类疾病特征相似,病变有一定的发展过程,形成率高,死亡率低,重复性好,造模简便易行<sup>[10]</sup>。复合因素造成的肝硬化模型自1972年建立以来,经过多年实践证实,肝硬化形成率高,重复性好,肝脏病理阶段性变化分明<sup>[11]</sup>;与目前比较通用的慢性胆总管结扎造模(CBDL)相比,用复合因素造模具有以下特点:(1)从临床肝硬化形成的病因来看,复合因素导致肝脏病变更贴近临床,CBDL则是单纯胆总管结扎,造成胆

汁淤积性肝硬化;(2)复合因素是利用四氯化碳慢性中毒,低蛋白和胆碱等营养因素致成肝细胞坏死-脂肪变-肝纤维化-肝硬化,符合肝硬化的发生发展各阶段;(3)复合因素所致模型可以应用于多种因素引起的肝硬化及肝硬化基础上出现的肝肺综合征的发病机制研究;(4)从死亡率来看,复合因素死亡率低,CCBDL则较高<sup>[12]</sup>。根据倪醒之 *et al*<sup>[6]</sup>对CCl<sub>4</sub>是否在肝肺综合征的形成过程中对肺组织有损坏作用研究,我们排除了低氧血症是由CCl<sub>4</sub>对肺损伤造成的。因此,本实验应用复合因素所致的肝硬化模型是研究肝肺综合征较为理想的动物模型。

### 4 参考文献

- 1 Krowka MJ. Hepatopulmonary syndromes. *Gut* 2000;46:1-4
- 2 Hopkins WE, Waggoner AD, Barzilai B. Frequency and significance of intrapulmonary right-to-left shunting in end-stage hepatic disease. *Am J Cardiol* 1992;70:516-519
- 3 Krowka MJ. Clinical management of hepatopulmonary syndrome. *Semin Liver Dis* 1993;13:414-422
- 4 Rodriguez-Roisin R, Agusti A, Roca J. The hepatopulmonary syndrome: new name, old complexities. *Thorax* 1992;47:879-902
- 5 张宏博, 柏长青, 汪静, 韩国宏, 郭学刚, 周新民, 吴开春, 丁杰, 樊代明. <sup>99m</sup>锝-多聚白蛋白动态肺灌注扫描在肝肺综合征早期诊断中的意义. *中华肝脏病杂志* 2001;9:331-333
- 6 倪醒之, 吴志勇, 陈治平, 卞耀麟. 门静脉高压症大鼠肺组织结构变化与低氧血症的关系. *中华普通外科杂志* 2001;16:400-403
- 7 Schraufnagel DE, Patel KR. Sphincters in pulmonary veins. An anatomic study in rats. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:721-726
- 8 Fallon MB, Abrams GA. Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. *Hepatology* 2000;32:859-865
- 9 Abrams G, Nanda N, Dubovsky EV, Krowka MJ, Fallon MB. Use of macroaggregated albumin lung perfusion scan to diagnose hepatopulmonary syndrome: a new approach. *Gastroenterology* 1998;114:305-310
- 10 孙敬方. 动物实验方法学. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 462-463
- 11 韩德五, 马学惠, 赵元昌. 肝硬化动物模型的研究. *山西医药杂志* 1979;4:1-6
- 12 马学惠. 肝纤维化动物模型的造模方法. *中华肝脏病杂志* 1996; 4:58-61

编辑 潘伯荣 审读 张海宁



# IRIS $^{13}\text{C}$ -美沙西汀呼气试验和 ICG 试验对肝硬化肝功能评估比较

姚洪森, 刘 蕾, 姚希贤, 王天轶

姚洪森, 武警河北总队机关门诊部 河北省石家庄市 050051  
刘蕾, 姚希贤, 河北医科大学附属医院第二医院消化科  
河北省石家庄市 050000  
王天轶, 白求恩国际和平医院急诊科 河北省石家庄市 050082  
姚洪森, 男, 1959-05-01 生, 河北省石家庄市人, 汉族, 1993 年安徽医科大学毕业, 副主任医师, 门诊部主任, 主要从事消化内科专业研究。  
河北省卫生厅资助项目, No. 2003131  
项目负责人: 姚希贤, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学附属医院消化科. yaohixian@163.com  
电话: 0311-7814356  
收稿日期: 2005-01-24 接受日期: 2005-02-06

## Comparison of clinical value of IRIS $^{13}\text{C}$ -methacetin breath test and ICG test in assessment of liver function in cirrhosis

Hong-Sen Yao, Lei Liu, Xi-Xian Yao, Tian-Yi Wang

Hong-Sen Yao, Outpatient of HeBei Provincial corps, China People's Armed Police Forces, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China  
Lei Liu, Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China  
Tian-Yi Wang, Department of Emergency, Bethun International Peace Hospital, shijiazhuang 050082, Hebei Province, China  
Supported by the Fund from Health Department of HeBei Province, No. 2003131  
Correspondence to: Dr. Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. yaohixian@163.com  
Received: 2005-01-24 Accepted: 2005-02-06

## Abstract

**AIM:** To compare the clinical value of  $^{13}\text{C}$ -methacetin breath test and ICG test in the assessment of liver function in patients with cirrhosis.

**METHODS:** Fifty-nine patients with liver cirrhosis received  $^{13}\text{C}$ -methacetin breath test after an overnight fast. Breath samples were taken before and at different time within 120 min after administration.  $^{13}\text{CO}_2$  enrichment was measured by infrared isotope spectrometry (IRIS). The  $^{13}\text{CO}_2$  maximum excretive rate before 40 min ( $\text{mv}_{\text{max}40}$ ),  $^{13}\text{CO}_2$  cumulative excretion at 40 min ( $\text{cum}_{40}$ ) and  $^{13}\text{CO}_2$  cumulative excretion at 120 min ( $\text{cum}_{120}$ ) were determined. Plasma retention rate of indocyanine green at 15 min ( $\text{R}_{15\text{ICG}}$ ) was also measured.

**RESULTS:**  $^{13}\text{C}$   $\text{mv}_{\text{max}40}$ ,  $\text{cum}_{40}$  and  $\text{cum}_{120}$  were significantly different between the cirrhosis patients with different Child-

Pugh grades (A, B, C). ( $\text{mv}_{\text{max}40}$  A-B, B-C and A-C: 2.80, 4.82 and 10.38;  $\text{cum}_{40}$  A-B, B-C and A-C: 3.85, 3.39 and 8.64;  $\text{cum}_{120}$  A-B, B-C and A-C: 4.52, 3.75 and 12.36,  $P < 0.01$ ). The differences of  $\text{R}_{15\text{ICG}}$  of patients with different Child-Pugh grades were also significant (A-B and B-C: -4.72, -1.27,  $P < 0.01$ ) except between Child-Pugh B and C group (A-C: -5.85,  $P > 0.05$ ).  $^{13}\text{C}$   $\text{mv}_{\text{max}40}$ ,  $\text{cum}_{40}$ ,  $\text{cum}_{120}$  and  $\text{R}_{15\text{ICG}}$  significantly correlated with Child-Pugh classification score ( $r = -0.562, -0.614, -0.716$  and  $0.555$ ,  $P < 0.001$ ). For the evaluation of liver function in patients with cirrhosis, the consistence of  $^{13}\text{C}$ -methacetin breath test with Child-Pugh classification ( $\text{Kappa}$ : 0.69,  $P < 0.05$ ) was better than that of ICG test ( $\text{Kappa}$ : 0.47,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** ICG test is a good quantitative method for the evaluation of the liver function in cirrhosis.  $^{13}\text{C}$ -methacetin breath test can be used to measure immediate hepatocyte injure and liver functional reserve. It is more sensitive than ICG test in the evaluation of liver function in cirrhosis, especially in uncompensated patients.

**Key Words:**  $^{13}\text{C}$ -methacetin breath test; ICG test; Liver cirrhosis; Liver function

Yao HS, Liu L, Yao XX, Wang TY. Comparison of clinical value of IRIS  $^{13}\text{C}$ -methacetin breath test and ICG test in assessment of liver function in cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(4):524-527

## 摘要

**目的:** 比较  $^{13}\text{C}$ -美沙西汀呼气试验与吲哚菁绿(ICG)试验评估肝硬化患者肝功能状况的临床价值。

**方法:** 肝硬化患者 59 例, 隔夜空腹进行  $^{13}\text{C}$ -美沙西汀呼气试验, 通过红外线同位素能谱分析仪(IRIS)检测服药前、后 120 min 内各个时间点呼气中  $^{13}\text{CO}_2$  的含量, 得出  $\text{mv}_{\text{max}40}$ (40 min 前的  $^{13}\text{CO}_2$  代谢速率峰值),  $\text{cum}_{40}$ (40 min 的  $^{13}\text{CO}_2$  累积呼出丰度)和  $\text{cum}_{120}$ (120 min 的  $^{13}\text{CO}_2$  累积呼出丰度), 同时进行 ICG 试验测定 15 min 的血清 ICG 滞留率( $\text{R}_{15\text{ICG}}$ )。

**结果:**  $^{13}\text{C}$ -美沙西汀呼气试验的  $\text{mv}_{\text{max}40}$ ,  $\text{cum}_{40}$  和  $\text{cum}_{120}$  值在肝硬化各组之间差异具有显著性( $\text{mv}_{\text{max}40}$  A-B, B-C 和 A-C 间  $t$  值分别为 2.80, 4.82 和 10.38;  $\text{cum}_{40}$  各组间  $t$  值分别为 3.85, 3.39 和 8.64;  $\text{cum}_{120}$  各组间  $t$  值分



别为 4.52, 3.75 和 12.36,  $P<0.01$ );  $R_{15\text{ ICG}}$  测定值在肝硬化 A, B 与 A, C 组间差异具有显著性( $t$  值分别为 -4.72 和 -1.27,  $P<0.01$ ), B, C 组间差异无显著性( $t$  值为 -5.85,  $P>0.05$ ). <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验的  $mv_{\max 40}$ ,  $cum_{40}$  和  $cum_{120}$  值和  $R_{15\text{ ICG}}$  测定值与 Child-Pugh 肝功能分级评分均呈显著相关( $r$  值分别为 -0.562, -0.614, -0.716 和 0.555,  $P<0.001$ ). <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与 Child-Pugh 肝功能分级在判定肝硬化患者肝功能状况上的一致性( $Kappa = 0.69$ ,  $P<0.05$ )优于 ICG 试验( $Kappa = 0.47$ ,  $P<0.05$ ).

**结论:** ICG 试验为评估肝硬化肝功能状况的较好定量检测方法;<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验是反映肝细胞损害情况和储备功能的良好肝功能试验, 对肝硬化尤其失代偿患者较之 ICG 试验更为灵敏.

**关键词:** <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验; ICG 试验; 肝硬化; 肝功能

姚洪森, 刘蕾, 姚希贤, 王天铁. IRIS <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验和 ICG 试验对肝硬化肝功能评估比较. 世界华人消化杂志. 2005;13(4):524-527  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/524.asp

## 0 引言

肝脏具有合成、代谢、转运及排泄等多种功能, 检测方法多达 700 余种, 但肝功能检测项目欠灵敏, 有时不能特异地反映肝脏损伤情况和肝脏储备功能. 定量肝功能检测吲哚氰绿 (ICG) 试验, 虽能反映肝脏储备功能, 但易受血清胆红素升高的影响<sup>[1-2]</sup>. 稳定性同位素 <sup>13</sup>C 标记底物进行的呼气试验, 作为新近发展的一种安全、简便、特异、定量的肝功能检测方法已应用于临床<sup>[3-15]</sup>. 为此, 我们对 59 例肝硬化患者进行 <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验检测肝功能并与 ICG 试验进行对照研究, 旨在探明其评估肝硬化肝功能状况的临床价值.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝硬化患者 59 例(病毒性肝炎性 55 例, 酒精性 1 例, 胆汁淤积性 1 例, 原因不明 2 例), 男 45 例, 女 14 例, 年龄 20-74 ( $50.4 \pm 13.7$ ) 岁, 肝硬化诊断标准均符合 2000-09 西安-中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的病毒性肝炎防治方案中肝硬化诊断标准<sup>[16]</sup>. 均无慢性胃病及

胃切除手术史, 无糖尿病胃轻瘫史, 无口服促动力药、重度吸烟及饮酒史. 受试前 1 d 保持日常饮食. <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验所用 IRIS 及 <sup>13</sup>C-methacetin 胶囊均由德国瓦格纳公司提供, 并配有专用呼气袋和电脑软件; ICG 试验所用试剂由辽阳市第三制药厂生产.

### 1.2 方法

**1.2.1 <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验** 隔夜空腹 12 h 后先收集零时呼出气一次(约 100 mL), 以茶水送服 <sup>13</sup>C-美沙西汀胶囊 75 mg 后, 再于安静坐位状态下, 分别收集 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 min 呼出气共 10 个呼气样本. IRIS 自动对样品进行检测并标明其 DOB 值、代谢速率值(Dose/h)、累积丰度值(cum. Dose)、CO<sub>2</sub> 浓度值等各项指标. 记录 3 个主要指标: 40 min 前代谢速率峰值( $mv_{\max 40}$ )、40 min CO<sub>2</sub> 累积呼出丰度( $cum_{40}$ )和 120 min CO<sub>2</sub> 累积呼出丰度( $cum_{120}$ ).

**1.2.2 ICG 试验** 清晨空腹, 一侧肘静脉抽血 3 mL 作为对照, 后将稀释好的 ICG 快速注入, 15 min 后另一侧肘静脉取血 3 mL 送检, 测定 15 min 的血清 ICG 滞留率( $R_{15\text{ ICG}}$ ). 所有肝病患者均进行肝功能和凝血酶原时间测定并 Child-Pugh 肝功能分级.

**统计学处理** 所有计量资料以均数 ± 标准差 ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) 表示. 统计分析用 SPSS 10.0 电脑软件处理各项检测结果, 统计方法为方差分析和相关分析. 计数资料用  $\chi^2$  检验和一致性检验.  $P<0.05$  即认为有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验**  $mv_{\max 40}$ ,  $cum_{40}$  和  $cum_{120}$  值在 Child-Pugh A, B, C 组间的差异具有显著性( $P<0.01$ ), 即呼气试验参数值随肝硬化病情严重度增加而显著降低(表 1);  $R_{15\text{ ICG}}$  测定值随 Child-Pugh 分级增高而升高(A 级:  $15.5 \pm 10.0\%$ , B 级:  $30.8 \pm 12.0\%$ , C 级:  $35.9 \pm 9.8\%$ ); A, B 组及 A, C 组之间差异具有显著性( $P<0.01$ ), B, C 组之间差异无显著性( $P>0.05$ ). 此外, <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验的三项数值及  $R_{15\text{ ICG}}$  测定值与 Child-Pugh 肝功能分级评分均呈显著相关( $r$  值分别为 -0.562, -0.614, -0.716 和 0.555,  $P<0.001$ ).

**2.2 <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与 ICG 试验对比** 将呼气试

表 1 肝硬化 <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验和  $R_{15\text{ ICG}}$  测定值的比较( $\text{mean} \pm \text{SD}$ , %)

分组	<i>n</i>	$mv_{\max 40}$	$cum_{40}$	$cum_{120}$	$R_{15\text{ ICG}}$
Child A	25	$13.9 \pm 8.6$	$6.0 \pm 3.3$	$19.6 \pm 6.0$	$15.5 \pm 10.0$
Child B	21	$8.3 \pm 3.6^b$	$2.9 \pm 1.8^b$	$12.2 \pm 4.9^b$	$30.8 \pm 12.0^b$
Child C	13	$3.3 \pm 1.6$	$1.2 \pm 0.7$	$6.4 \pm 3.3$	$35.8 \pm 9.8$

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs Child A.

验的3项数值按照公式计算  $MV_{\max 40}$  ( $mV_{\max 40}/27$ ),  $CUM_{40}$  ( $cum_{40}/12$ ) 和  $CUM_{120}$  ( $cum_{40}/28$ ), 3个数值归入以下范围的某一分级, 肝功能则归类在该级水平: 0.8-1.0 为正常, 0.5-0.8 为病理性肝损伤或纤维化, 0.25-0.5 为A级, 0.15-0.25 为B级, <0.15 为C级; ICG 试验以  $R_{15\text{ ICG}}$  值<5% 为正常, 6-15% 为A级, 15-25% 为B级, >25% 为C级进行量化分级. 以Child-Pugh 肝功能分级作为评价肝硬化肝功能状况的金标准<sup>[17]</sup>, 两种检测方法对肝硬化肝功能的判定与Child-Pugh 肝功能分级有关系(将<sup>13</sup>C所示病理性肝损伤者, ICG 试验正常者归入A级组)(表2), 可见<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与Child-Pugh 肝功能分级相对应的A, B及C级的符合率分别为88.0%(22/25), 66.7%(14/21)和84.6%(11/13); ICG试验分别为80.0%(20/25), 52.4%(12/21)和61.5%(8/13), 一致性检验, 发现<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与Child-Pugh 肝功能分级相对应的A, B及C级间的一致性( $Kappa$ 值为0.69,  $P<0.05$ )优于ICG 试验( $Kappa$ 值为0.47,  $P<0.05$ ).

表2 ICG 试验和<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与肝功能分级的关系

		Child-Pugh肝功能分级			合计
		A级	B级	C级	
ICG 试验	A级	20	4	1	25
	B级	6	12	3	21
	C级	1	4	8	13
	合计	27	20	12	59
<sup>13</sup> C-MBT	A级	22	3	0	25
	B级	4	14	3	21
	C级	0	2	11	13
	合计	26	19	14	59

### 3 讨论

ICG是一种合成的三碳花青色素, 无毒性. 定量的ICG进入血内后迅速与ALB结合, 经肝细胞摄取后不经代谢而直接经胆道排入肠道, 由于其不经肾脏排泄且无肝肠循环, 因之受肝外影响甚小, 能直接反映肝脏功能储备情况. ICG 试验由Wheeler用于肝功能检查, 目前认为ICG是反映肝脏储备功能的良好指标, 但本检测易受血清胆红素升高影响<sup>[2, 18]</sup>. 肝脏的生物转化功能主要在肝细胞微粒体内完成, <sup>13</sup>C-美沙西汀吸收入血后在肝细胞的微粒体内由加单氧酶系对其进行O-位脱甲基反应, 产生甲醛, 并继续氧化为<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>经肺排出体外. 呼气中<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>产生速率以及最终生成量反映肝细胞加单氧酶系的活力. 因此, <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验通过检测加单氧酶系活力能在酶与蛋白分子水平反映肝细胞损害情况和储备功能.

肝脏具有合成、代谢、转运及排泄等多种功

能, 10多年来尚少能真实反映临床与肝脏病理状况灵敏、简便肝功能试验. ICG试验为对肝硬化肝脏储备功能定量评估的有效方法<sup>[1-2]</sup>, <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验能即时反映肝细胞损害情况和储备功能<sup>[19-25]</sup>, 究竟二者孰优孰劣? 有报道<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验似乎并不比ICG试验敏感<sup>[26]</sup>, 为了评估<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验对肝硬化肝功能状况的灵敏性, 探明<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验和ICG试验对肝功能检测的价值, 我们以Child-Pugh肝功能分级作为判定肝硬化患者肝功能状况的金标准<sup>[17]</sup>, 对<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与ICG试验进行了对照研究. 本研究对59例肝硬化患者同步进行<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验和ICG试验发现: (1)<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验的3项指标  $mV_{\max 40}$ ,  $cum_{40}$  和  $cum_{120}$  值在Child-Pugh A、B、C级肝硬化组间依次降低且差异具有显著性( $mV_{\max 40}$  分别为  $13.9 \pm 8.6\%$ ,  $8.3 \pm 3.6\%$  与  $3.3 \pm 1.6\%$ ;  $cum_{40}$  分别为  $6.0 \pm 3.3\%$ ,  $2.9 \pm 1.8\%$  与  $1.2 \pm 0.7\%$ ;  $cum_{120}$  分别为  $19.6 \pm 6.0\%$ ,  $12.2 \pm 4.9\%$  与  $6.4 \pm 3.3\%$ ,  $P$ 值均小于0.01), 与Child-Pugh 肝功能评分呈显著负相关( $r$ 值分别为-0.562, -0.614与-0.716,  $P<0.001$ ). 由于  $mV_{\max 40}$  和  $cum_{40}$  主要反映肝脏的储备功能,  $cum_{120}$  主要反映肝脏的代偿功能, 因此3项数值在肝硬化各组间的显著性差异以及及与Child-Pugh肝功能评分的显著相关性表明<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验能准确评估不同肝功能分级肝硬化患者肝脏储备功能和代偿状况. (2)肝硬化患者ICG试验的  $R_{15\text{ ICG}}$ 测定值随Child-Pugh肝功能损伤加重依次升高(分别是  $15.5 \pm 10.0\%$ ,  $30.8 \pm 12.0\%$  与  $35.9 \pm 9.8\%$ ), Child-Pugh A、B与A、C级肝硬化组间差异具有显著性( $P<0.01$ ), 表明ICG试验对早期肝硬化肝储备功能的评估有良好价值, B、C组之间差异无显著性( $P>0.05$ ), 表明本检测对中期尤对晚期肝功能状况评估受到限制, 可能与B、C级肝硬化患者多有血清胆红素升高影响检测有关. 因此, 对比<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与ICG试验在判定肝硬化患者的肝功能状况上, 25例Child-Pugh肝功能A级患者中<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验22例与Child-Pugh分级相符合, 符合率为88.0%(22/25); 21例Child-Pugh B级患者中有14例符合, 符合率为66.7%(14/21); 13例Child-Pugh C级患者中11例符合, 符合率为84.6%(11/13), 表明<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与Child-Pugh分级具有良好一致性( $Kappa$ 值为0.69,  $P<0.05$ ), 本检测能有效地对肝功能状况进行评估. 分析ICG试验与Child-Pugh肝功能分级相对应A、B及C级的符合率分别为80.0%(20/25), 57.1%(12/21)和61.5%(8/13), 较之<sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验虽低, 但仍具有较高一致性( $Kappa$ 值为0.47,  $P<0.05$ ), 表明ICG试验仍不失为一种评估肝硬化肝

功能状况的较好定量检测方法, 尤对不伴黄疸者可能更有价值. 上述结果表明 <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与 Child-Pugh 肝功能分级的一致性好于 ICG 试验 (<sup>13</sup>C *Kappa* 值 = 0.69 > ICG *Kappa* 值 = 0.47), 尤对肝功能 C 级者本试验与 Child-Pugh 肝功能分级符合率 (84.6%) 明显高于 ICG 试验 (61.5%), 表明 <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验对肝硬化尤对失代偿患者的肝功能评价可能比 ICG 试验更为灵敏. 因此, <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验与 ICG 试验均能有效对肝硬化患者的肝功能进行评估, <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验能更为有效地对肝细胞储备和代偿功能进行量化评估, 因此本试验作为一种无创性肝功能检测手段用于评价肝硬化患者的肝功能状况具有较高临床价值和良好应用前景.

#### 4 参考文献

- 姚希贤. 临床消化病学. 第1版. 天津: 天津科学技术出版社, 1995: 113-187
- 王宝恩, 张定凤. 现代肝脏病学. 第1版. 北京: 北京科学技术出版社, 2003:182-217
- Ishii T, Furube M, Hirano S, Takatori K, Iida K, Kajiwaru M. Evaluation of <sup>13</sup>C-phenylalanine and <sup>13</sup>C-tyrosine breath tests for the measurement of hepatocyte functional capacity in patients with liver cirrhosis. *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 2001; 49:1507-1511
- Kobayashi T, Kubota K, Imamura H, Hasegawa K, Inoue Y, Takayama T, Makuuchi M. Hepatic phenylalanine metabolism measured by the [<sup>13</sup>C] phenylalanine breath test. *Eur J Clin Invest* 2001;31:356-361
- Saadeh S, Behrens PW, Parsi MA, Carey WD, Connor JT, Grealis M, Barnes DS. The utility of the <sup>13</sup>C-galactose breath test as a measure of liver function. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:995-1002
- Park GJ, Katelaris PH, Jones DB, Seow F, Le Couteur DG, Ngu MC. Validity of the <sup>13</sup>C-caffeine breath test as a noninvasive, quantitative test of liver function. *Hepatology* 2003;18:995-1002
- Ishii Y, Suzuki S, Kohno T, Aoki M, Kohno T, Ito A, Takayama T, Asai S. L-[1-<sup>13</sup>C] phenylalanine breath test reflects histological changes in the liver. *J Surg Res* 2003;114:120-125
- Parra D, Gonzalez A, Garcia-villarreal L, Martinez JA. Methodological characterization of 2-keto[1-<sup>13</sup>C]-isocaproate breath test to measure in vivo human mitochondrial function: application in alcoholic liver disease assessment. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:1293-1298
- Di Campli C, Angelini G, Armuzzi A, Nardo B, Zocco MA, Candelli M, Santoliquido A, Cavallari A, Bernardi M, Gasbarrini A. Quantitative evaluation of liver function by the methionine and aminopyrine breath tests in the early stages of liver transplantation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15: 727-732
- Ishii Y, Asai S, Kohon T, Ito A, Iwai S, Ishikawa K. Recovery of liver function in two third partial hepatectomized rats evaluated by L-[1-<sup>13</sup>C] phenylalanine breath test. *Surgery* 2002; 132:849-856
- Caubet MS, Laplante A, Caille J, Brazier JL. [<sup>13</sup>C] aminopyrine and [<sup>13</sup>C] caffeine breath test: influence of gender, cigarette smoking and oral contraceptives intake. *Isotopes Environ Health Stud* 2002;38:71-77
- Ishii Y, Ishikawa K, Asai S. Evaluation of liver function with <sup>13</sup>C-labelled amino acid using hepatectomized rat model. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2002;120:101-106
- Giannini E, Fasoli A, Chiarbonello B, Malfatti F, Romagnoli P, Botta F, Testa E, Polegato S, Fumagalli A, Testa R. <sup>13</sup>C-aminopyrine breath test to evaluate severity of disease in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:717-725
- Armuzzi A, Marroccia S, Zocco AM, de Lorenzo A, Grieco A, Tondi P, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Non-invasive assessment of human hepatic mitochondrial function through the <sup>13</sup>C-methionine breath test. *Scand J Gastroenterol* 2000;35: 650-653
- Mana F, George B, Reynaert H, Ham HR, Urbain D. Evaluation of the <sup>13</sup>C-aminopyrine breath test using non-dispersive infrared spectrometry. *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:328-330
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 吴邦富, 林丽莉, 胡品津. 胰高糖素负荷试验的血糖  $P_{-B}$  值用于评价肝硬化患者肝功能状况的价值. 中华肝脏病杂志 2003;11:186-189
- Merkel C, Bolognesi M, Finucci GF, Angeli P, Caregaro L, Rondana M, Gatta A. Indocyanine green intrinsic hepatic clearance as a prognostic index of survival in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1989;9:16-22
- Klatt S, Taut C, Mayer D, Adler G, Beckh K. Evaluation of the <sup>13</sup>C-methacetin breath test for quantitative liver function testing. *Z Gastroenterol* 1997;35:609-614
- Pfaffenbach B, Gotze O, Szymanski C, Hagemann D, Adamek RJ. The <sup>13</sup>C-methacetin breath test for quantitative nondispersive infrared spectrometer in liver cirrhosis. *Dtsch Med Wochenschr* 1998;123:1467-1471
- Adamek RJ, Goetze O, Boedeker C. <sup>13</sup>C-methacetin breath test: isotope selective nondispersive infrared spectrometry in comparison to isotope ratio mass spectrometry in volunteers and patients with liver cirrhosis. *Z Gastroenterol* 1999;37:1139-1143
- Lara Baruque S, Razquin M, Jimenez I, Vazquez A, Gisbert JP, Pajares JM. <sup>13</sup>C-phenylalanine and <sup>13</sup>C-methacetin breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in chronic liver disease. *Dig Liver Dis* 2000;32:226-232
- Petrolati A, Festi D, De Berardinis G, Colaiocco-Ferrante L, Di Paolo D, Tisone G, Angelico M. <sup>13</sup>C-methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18: 785-790
- Ciccocioppo R, Candelli M, Di Francesco D, Ciocca F, Taglieri G, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Study of liver function in healthy elderly subjects using the <sup>13</sup>C-methacetin breath test. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:271-277
- Festi D, Capodicasa S, Sandri L, Colaiocco-Ferrante L, Staniscia T, Vitacolonna E, Vestito A, Simoni P, Mazzella G, Portincasa P, Roda E, Colecchia A. Measurement of hepatic functional mass by means of <sup>13</sup>C-methacetin and <sup>13</sup>C-phenylalanine breath tests in chronic liver disease: comparison with Child-Pugh score and serum bile acid levels. *World J Gastroenterol* 2005;11:142-148
- 唐振铎, 邱以永, 夏宗勤, 胡雅儿, 黄腾昌, 张乃立, 鲁一红, 李晶. <sup>13</sup>C-美沙西汀呼气试验对肝病的诊断价值. 中华内科杂志 1986; 25:722-724

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

## 针对端粒酶蛋白催化亚单位的肿瘤免疫治疗研究

陈 陵, 杨仕明, 蔡永国, 房殿春, 李晶晶, 罗元辉

陈陵, 杨仕明, 蔡永国, 房殿春, 李晶晶, 罗元辉, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038  
国家自然科学基金资助项目, No. 30470797  
项目负责人: 杨仕明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心, shimingyang@yahoo.com  
电话: 023-68754124 传真: 023-68754124  
收稿日期: 2004-12-22 接受日期: 2005-01-08

### 摘要

端粒酶蛋白催化亚单位(hTERT) 相对分子质量  $M_r$  127 000, 包含 1 132 个氨基酸, 其基因位于 5 号染色体短臂的最末端(5p15.33), 在 90% 以上的人类肿瘤中高表达, 而正常成熟组织中则基本没有表达, 可作为广谱的抗肿瘤治疗分子靶点.DC 是已知体内激活静息 T 细胞功能最强的专职抗原递呈细胞, 经 DC 递呈 hTERT 抗原表位信息后, CTL 能识别从 hTERT 提取的多肽表位, 并在体外杀伤多种组织来源的 hTERT 阳性的肿瘤细胞.因此 hTERT 是迄今发现的一个最具应用前景的肿瘤广谱相关抗原, 针对 hTERT 的肿瘤免疫基因治疗有可能成为肿瘤免疫治疗的又一研究热点.

陈陵, 杨仕明, 蔡永国, 房殿春, 李晶晶, 罗元辉. 针对端粒酶蛋白催化亚单位的肿瘤免疫治疗研究. 世界华人消化杂志 2005;13(4):528-533

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/528.asp>

### 0 引言

端粒(telomere)是存在于染色体末端的一种特殊结构, 人和其他脊椎动物的端粒 DNA 均为  $(5' - \text{TTAGGG} - 3')_n$ , 大小 5-20 kb<sup>[1]</sup>. 每次细胞有丝分裂后, 端粒都会缩短, 缩短到一定程度后细胞就不可避免的发生衰老死亡<sup>[2]</sup>. 因此, 能无限分裂增生的细胞必定有延长其端粒的能力, 这一能力正是通过端粒酶来实现<sup>[3]</sup>. 现已发现约 90%<sup>[2, 4-5]</sup> 人类恶性肿瘤细胞内表达端粒酶, 而正常人体, 除造血干细胞、生殖细胞等分裂旺盛的细胞表达端粒酶, 其余多为阴性<sup>[6]</sup>, 这使得端粒酶有可能成为广谱抗肿瘤治疗靶点<sup>[7-8]</sup>. 杨仕明 *et al* 发现<sup>[9-12]</sup>, 在胃癌、肠癌及肝癌, 端粒酶的三个亚单位中 TP1 及 hTR 在癌细胞内高表达, 在癌旁正常组织内也有或多或少的表达; hTERT 则仅在癌细胞内高表达, 在癌旁正常组织内极少表达, 且 hTERT 的表达水平与肿瘤的恶性程度成正相关. 转染 hTERT cDNA 到端粒酶阴性的原代培养细胞内后, 可检测到端粒酶表达<sup>[13-16]</sup>. 这表明端粒酶活性主要由 hTERT 的表达来调节<sup>[17]</sup>. 因而, 在端粒酶的三个亚单位中, 最适合作为抗肿瘤免疫治疗靶点的是端粒酶蛋白催化亚单位(human telomerase catalytic subunit, 或 human telomerase reverse transcriptase, hTERT)<sup>[18-21]</sup>. hTERT 的表达水平与端粒酶活性有良好的相关性<sup>[22]</sup>, 直接以 hTERT 为靶点比以端粒酶为靶点能取得更

好的抗肿瘤效果, 且由于 hTERT 特异性更强, 其副作用更少<sup>[12, 23]</sup>. 目前已有大量实验证实, 以 hTERT 为靶点的抗肿瘤免疫治疗对相当广泛的肿瘤细胞均有足够强度的杀伤作用, 如肝胚细胞瘤<sup>[24-25]</sup>、肝细胞癌<sup>[26-29]</sup>、结直肠癌<sup>[30]</sup>、胃癌<sup>[31-32]</sup>、肺癌<sup>[33-34]</sup>、卵巢癌<sup>[35]</sup>、乳腺癌<sup>[36]</sup>、肾癌<sup>[37]</sup>、前列腺癌<sup>[38-39]</sup>、膀胱癌<sup>[40]</sup>、白血病<sup>[41-43]</sup>、多发性骨髓瘤<sup>[44]</sup>、黑色素瘤<sup>[45]</sup>、甲状腺癌<sup>[46]</sup>等. 以 hTERT 为靶点的抗肿瘤治疗正吸引着越来越多科研人员的兴趣.

### 1 hTERT 的结构、功能及其调节

hTERT 编码基因是由 Meyerson *et al*<sup>[47]</sup> 和 Nakamura *et al*<sup>[48]</sup> 两个研究小组于 1997 年分别在不同的实验室几乎同时克隆出来, 分别命名为 hEST2 和 hTERT. hTERT 编码的蛋白相对分子质量  $M_r$  127 000, 包含 1 132 个氨基酸, 有 7 个逆转录酶的基序(motif)和 1 个端粒酶特异的基序, 因此他归于逆转录酶家族中的一员. 其基因位于 5 号染色体短臂的最末端(5p15.33)<sup>[49]</sup>, 为一单拷贝基因, 长度为 40 kb, 目前在人类基因组中未发现其他相关基因. hTERT 仅表达于肿瘤及部分癌前病变组织中, 而正常或肿瘤旁组织几乎全为阴性. 作为端粒酶的限速成分, 在转录水平对端粒酶活性起主要调控作用. hTERT 基因导入原本不能或只能有限传代的原代培养细胞, 如毛细血管内皮细胞<sup>[13]</sup>、淋巴管内皮细胞<sup>[50]</sup>、脐带内皮细胞<sup>[51]</sup>、肾近端小管上皮细胞<sup>[52]</sup>、肝内皮细胞<sup>[53]</sup>、结肠隐窝细胞<sup>[14]</sup>、乳房上皮和基质细胞<sup>[15]</sup>、骨关节炎成纤维细胞样滑膜细胞<sup>[54]</sup>、牙乳头、牙髓、牙周膜、牙龈成纤维细胞<sup>[55]</sup>、包皮纤维母细胞<sup>[56]</sup>、人胚胎成纤维细胞<sup>[16]</sup>等, 可诱导这些细胞永生生化从而进一步建立细胞系, 或明显延长其寿命<sup>[57]</sup>. 而人胚神经祖细胞(hNPC)在转染 hTERT 后则出现恶性表型<sup>[58]</sup>, 如失去正常二倍体核型, 接触抑制消失, 不附壁也可生长, 可在裸鼠体内形成神经母细胞瘤样肿瘤等.

hTERT 基因的调节机制到目前为止所知甚少. 已认识的几个能上调 hTERT 基因表达的因子有: Sp1, Ap-2; 同时也发现一些抑制其表达的因子, 如 MZF-2, Wnt-1, p53<sup>[59-61]</sup>. p21 与 E2F 可能介导了 p53 对 hTERT 的抑制作用<sup>[62]</sup>. 癌蛋白 c-myc 在 hTERT 启动子上有潜在结合位点<sup>[61]</sup>, 可能上调 hTERT 基因表达. 但 Kirkpatrick *et al*<sup>[63]</sup> 发现, 人乳腺癌 c-myc mRNA 水平与端粒酶活性并无关系, c-myc 能否上调 hTERT 基因表达有待进一步研究. 晚近发现, 孤儿受体 COUP-TFII 能与 hTERT 启动子特异作用,

抑制hTERT的表达<sup>[64-65]</sup>.而TEIF(transcriptional elements-interacting factor)<sup>[66]</sup>与EWS/ETS癌蛋白<sup>[67-68]</sup>通过与hTERT启动子结合,上调hTERT mRNA,激活端粒酶活性.此外,Wang *et al*<sup>[69]</sup>发现,在端粒酶阴性的细胞内曲古抑菌素A抑制组蛋白去乙酰化酶后,可导致hTERT基因在染色质相应功能区的开放及hTERT的转录,这提示组蛋白去乙酰化酶可能在染色质水平负向调节hTERT的表达.Banik *et al*<sup>[70]</sup>发现,PinX1在体内可通过结合到已装配的hTERT/hTR复合体而抑制端粒酶活性.核因子kappaB(nuclear factor kappaB, NF-kappaB)被发现可能起激活hTERT的作用<sup>[71-72]</sup>.Zhong *et al*<sup>[73]</sup>发现,在成釉细胞瘤,端粒酶的活性与pRb的低表达和E2F-1的高表达有关,并在G(1)末期可被细胞周期素E上调.1,25二羟维生素D3也可下调端粒酶活性<sup>[35]</sup>.Guilleret *et al*<sup>[74]</sup>还发现,端粒酶阳性的细胞内CpG岛的高度甲基化是端粒酶表达的一个必要条件.

## 2 hTERT是迄今最为理想的肿瘤相关抗原

最初的肿瘤免疫治疗试验结果令人失望.这些试验表明大多数动物肿瘤模型没有免疫原性<sup>[75]</sup>,这使肿瘤免疫治疗失去前提.随后又发现,肿瘤缺少免疫原性的原因并不是因为肿瘤没有表达抗原,而是因为这些肿瘤抗原不能有效的激活免疫系统产生免疫应答反应<sup>[76]</sup>.接着,多种人和鼠的肿瘤相关抗原陆续被发现.有效的抗肿瘤免疫治疗要求肿瘤相关抗原必须是肿瘤特异的,但是很多正常组织也有肿瘤相关抗原表达.更明确地说,有效的抗肿瘤免疫治疗要求肿瘤相关抗原必须能产生肿瘤排斥反应,不但要求是肿瘤特异的,而且还要能作为杀伤肿瘤细胞的靶点,临床上产生显著的肿瘤消退的疗效.理想的肿瘤抗原应该符合:(1)表达于绝大多数肿瘤从而可广泛地应用;(2)表达仅限于肿瘤以避免自身免疫反应;(3)不表达于成熟组织以避免免疫耐受;(4)在肿瘤的发生发展过程中具有不可替代的作用,以免抗原变异缺失;(5)能诱导足够强度的免疫反应并导致肿瘤消退;(6)同时包含MHC I和MHC II表位,从而可诱导CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞反应<sup>[77]</sup>.

hTERT是目前所知最符合以上各项条件的肿瘤相关抗原.90%的肿瘤细胞表达hTERT,同时大于75%的人群是HLA-A2,A3或A24限制性,且hTERT极少表达在正常组织中,因此,hTERT作为疫苗可适用于多种肿瘤的治疗,是一种广谱肿瘤疫苗.肿瘤细胞以MHC-I限制性方式递呈hTERT的抗原肽,这可作为对此抗原肽特异的CTL识别靶点进而杀伤肿瘤细胞<sup>[78]</sup>.某些肿瘤细胞通过下调肿瘤细胞表面抗原逃避免疫监视,但如果为逃避免疫监视而下调hTERT的表达,将使肿瘤细胞内端粒酶的活性下降甚至消失,这本身就足以抑制肿瘤生长,进而直接引起肿瘤细胞死亡<sup>[79-80]</sup>.hTERT特异的CTL可能来源于原始T细胞库,用hTERT抗原可以明显诱导其生成,这一点与其他肿瘤抗原如黑色素瘤相关抗原<sup>[80]</sup>完全不同(后者在其肿瘤患者血液中能明显检出),如此在很大程度上就减

少了免疫不应答或免疫耐受的可能性.Titu *et al*<sup>[30]</sup>征集了37例结直肠癌患者及12名健康对照,用干扰素-gamma ELISPOT法(interferon gamma ELISPOT assay)分别检测每例应征者体内T细胞能否识别HLA-A2限制性的hTERT的2个表位、HLA-A2限制性的CEA表位及流感病毒A基质蛋白.结果发现,有7例(19%)患者的CTL能识别至少1个hTERT表位,其中2例(5%)能识别2个表位;4例(11%)患者能识别CEA表位,且识别与肿瘤分期无关.而正常对照无1例能识别hTERT或CEA表位.2组对流感病毒A基质蛋白的识别率无显著差异.这有力证明了虽然hTERT也表达于极少数正常组织,但hTERT特异的T细胞库并未被完全清除,肿瘤患者体内存在着能够识别hTERT表位的CTL.来自于人和鼠的证据都表明细胞毒性T细胞(CTL)能够以HLA限制性的方式识别从hTERT提取的抗原肽并杀伤不同组织来源的hTERT阳性肿瘤细胞<sup>[36]</sup>.因此,有充分理由相信,hTERT很可能是一理想的肿瘤相关抗原.

## 3 以hTERT为靶点的抗肿瘤免疫基因治疗

研究者以hTERT蛋白或其表位多肽加免疫佐剂,直接免疫机体,结果发现很难诱导足够强的免疫效应<sup>[81]</sup>.这可能是因为hTERT蛋白无法被有效地呈递,因而不能刺激机体产生免疫应答.树突状细胞(dendritic cell, DC)的发现及其功能的阐明为解决hTERT免疫原性太弱提供了一条途径.DC是已知体内激活静息T细胞功能最强的专职抗原递呈细胞.DC高水平表达MHC I类和II类分子,这些分子在肿瘤免疫治疗中起着关键性的作用.DC必须活化后才能诱导免疫反应,这可以通过使用载体蛋白,佐剂,细胞因子或基因工程病毒来实现.围绕DC建立起旨在增强机体特异性抗肿瘤免疫能力一系列策略,已成为肿瘤生物治疗的最新进展<sup>[82-83]</sup>.利用DC将hTERT表位信息递呈给T淋巴细胞,从而诱导机体产生hTERT特异的、MHC-I限制性的、广谱的抗肿瘤效应,已成为以hTERT为靶点的抗肿瘤免疫基因治疗的最新进展.

3.1 hTERT基因修饰DC Frolkis *et al*<sup>[84]</sup>发现,源于人单核细胞的DC表达端粒酶TP1及hTR组分,但不表达hTERT,因而没有端粒酶活性.通过用脂质体介导转导hTERT质粒DNA到DC内,或通过克隆有hTERT基因的E1-,E3-区缺失腺病毒载体转染DC后,DC内端粒酶活性恢复.这些hTERT基因修饰的DC可诱导CTL反应.hTERT特异的CTL可杀伤不同组织来源的、hTERT阳性的肿瘤细胞系,但对hTERT阴性则无杀伤能力.为进一步检测这些CTL对hTERT的特异性,通过腺病毒转染技术,hTERT基因被转染到这些hTERT阴性的肿瘤细胞.发现虽然部分抗原特异性是针对腺病毒表位,但主要的CTL是针对源自端粒酶的抗原.因此,hTERT基因有可能作为疫苗来诱导肿瘤患者的特异T-细胞介导的肿瘤免疫反应.此外,作者还认为hTERT基因修饰的DC(hTERT/DC)内端粒酶活性和/或端粒酶表达,预示了基于hTERT/DC的

肿瘤疫苗的良好应用前景. Saeboe-Larssen *et al*<sup>[85]</sup>采用方波电穿孔的方法将体外合成的 hTERT mRNA 转入 DC 瞬间表达, 转染后 DC 内端粒酶呈强阳性, 同样能诱导针对 hTERT 的特异性 CTL 反应. 体内 hTERT 基因修饰的 DC 诱导特异性 CTL 抗肿瘤反应的产生及其维持的过程中, CD4<sup>+</sup> T 辅助细胞也起着关键性的作用. 有效的肿瘤疫苗要求能够同时诱导针对肿瘤相关抗原的 CTL 及 CD4<sup>+</sup>T 细胞效应. Su *et al*<sup>[86]</sup>将编码 hTERT/ 溶酶体相关膜蛋白 (LAMP-1) 的嵌合 mRNA 转染 DC, 发现可加强 hTERT 特异 CD4<sup>+</sup>T 细胞的激活. 进而认为 DC 转染嵌合 hTERT/LAMP-1 mRNA 有助于产生 hTERT 抗原特异的 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 这些 hTERT 抗原特异的 CD4<sup>+</sup>T 细胞对体内产生和维持特异 CTL 抗肿瘤效应是必要的. Nair *et al*<sup>[87]</sup>进一步做了动物体内试验. 他们将大鼠 TERT (mTERT) mRNA 转染的 DC 免疫大鼠, 结果激活的 CTL 可有效的杀伤鼠黑色素瘤及胸腺瘤细胞, 并抑制另外三种遗传背景不同的无关肿瘤的生长. 鼠正常组织也广泛表达端粒酶, 理论上应该产生较强的免疫耐受, 然而, Nair *et al* 将 mTERT mRNA 转入树突状细胞后很容易引起鼠体内 mTERT 特异的 CTL 反应. 这些结果表明, 体内肿瘤形成过程中, 肿瘤相关抗原 hTERT 特异的 T 细胞既没完全消除, 也没有产生不可逆的耐受. 通过 DC 介导, hTERT 特异的 T 细胞可以被诱导参与肿瘤的免疫治疗. DC 内端粒酶活性是否阳性似乎还应进一步确认, Ping *et al*<sup>[88]</sup>的研究表明成熟 DC 具有端粒酶活性. Ping *et al* 体外用 GM-CSF 与 IL-4 诱导骨髓细胞分化为成熟 DC 的过程中, 发现其端粒酶活性明显升高. 用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激小鼠脾 DC, 发现脾 DC 成熟后端粒酶活性更高. 显然, 以 DC 介导的、hTERT 为靶点的肿瘤免疫治疗的机制尚需更深入的研究.

3.2 hTERT 抗原表位多肽冲击 DC 利用 DC 激活机体抗癌免疫反应的途径, 除可通过 hTERT 基因修饰外, 也可应用肿瘤抗原 MHC-I 类多肽冲击树突状细胞, 其靶向性更好, 且肿瘤抗原浓度更高, 可产生冲击致敏的效应, 促进 T 细胞有效激活. Vonderheide *et al*<sup>[89]</sup>成功提取了第一个 hTERT 抗原表位肽 I540 (ILAKFLHWL), 位于 hTERT 第一个逆转录功能区氨基酸约 70 个氨基酸处, 是一 MHC-

I 类分子等位基因 HLA-A2 (HLA-A\*0201) 限制的九肽. HLA-A2 是最常见的 HLA 基因型, 约 50% 的白种人、亚洲人和西班牙人及 33% 的非洲人和美洲人具有这种表型. 实验表明<sup>[90]</sup>, I540 能与 HLA-A2 分子紧密结合, 并诱导约 70% 以上的 HLA-A2 (+) 个体产生 CTL. 产生的 CTL 在体外能以 I540 特异的、MHC 限制的方式杀伤多种 hTERT (+) 细胞系肿瘤 (癌、黑色素瘤、骨髓瘤、肉瘤) 及原发性肿瘤细胞 (淋巴瘤、急性白血病)<sup>[91]</sup>. 对端粒酶阴性的细胞如肉瘤细胞株 U20S, 只有将 hTERT 全长 DNA 转化细胞使之变成 hTERT+ 细胞后才表现出靶细胞杀伤作用, 而用单克隆抗体封闭 HLA-A2 后, hTERT 转化的 U20S 被特异性 CTL 溶解作用消失, 进一步证明 CTL 作用是 HLA-A2 限制、hTERT 特异的. 在这一发现的鼓励下, Vonderheide *et al*<sup>[78]</sup>进一步进行了 I 期临床试验. 他们从肿瘤患者血液分离、诱导出 DC, 与 HLA-A2 限制性的 hTERT I540 多肽加锁眼形血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 共同孵育后接种到患者体内, 结果 7 例肿瘤患者中有 4 例在体内检测到 hTERT 特异的 T 淋巴细胞, 并能以 MHC 限制性的方式杀伤肿瘤细胞. 尽管少数正常体细胞端粒酶阳性, 试验中并未观察到显著的毒副作用. 有 1 例患者肿瘤部分消退. 这表明针对 hTERT 的肿瘤免疫基因治疗具有广阔的前景. 自 I540 发现以来, 其他几个 hTERT 的 CTL 识别表位也被发现, 是受限于其他几个 HLA-A 的等位基因 (表 1). 可以看出, 肿瘤细胞递呈 hTERT 抗原因 HLA 类型不同其抗原肽序列不同, 即使是同一 HLA-A 类型, hTERT 抗原肽也不完全一样. K973 (KLFGVLR LK) 紧密结合到 HLA-A3, 能激活特异性 CTL 细胞以 MHC 限制性方式杀伤来源多种组织的 hTERT (+) 的肿瘤细胞<sup>[92]</sup>. HLA-A3 表达于 15-25% 的患者, 这使针对 hTERT 的肿瘤免疫治疗的应用范围进一步扩大到 60% 以上的患者. Arai *et al*<sup>[93]</sup>从 hTERT 氨基酸序列设计的两个肽段 (VYAETKHFL 和 VYGFVRACL) 能刺激机体产生具有 hTERT 特异性、受 HLA-A24 限制的 CD8 (+) CTL 克隆. 这些 CTL 能以 HLA-A24 限制性方式杀伤白血病细胞. HLA-A24 (HLA-A\*2402) 等位基因在日本人中最常见 (>60%), 在具有欧洲血统的人群中约为 20%. 这些结果表明, 来源于 hTERT 的抗原肽介导的肿瘤免疫治疗方法应用于全世界大部分的人群将是可行的. 由于有

表1 源于hTERT的T淋巴细胞表位

表位	氨基酸序列	HLA 限制性单元	MHC 类别
I 540 <sup>[89]</sup>	ILAKFLHWL	HLA-A2	MHC-I
R572 <sup>[69]</sup>	RLFFYRKSV	HLA-A2	MHC-I
D988 <sup>[69]</sup>	DLQVNSLQTV	HLA-A2	MHC-I
K973 <sup>[92]</sup>	KLFGVLR LK	HLA-A3	MHC-I
V324 <sup>[93]</sup>	VYAETKHFL	HLA-A24	MHC-I
V461 <sup>[93]</sup>	VYGFVRACL	HLA-A24	MHC-I
hTERT(766) <sup>[94]</sup>	LTDLQPYMRQFVAHL	HLA-DR4, DR11, and DR15	MHC-II
hTERT(672) <sup>[94-95]</sup>	RPGLLGASVLGLDDI	HLA-DR1, DR7, and DR15	MHC-II

效的肿瘤免疫要求能够同时诱导针对肿瘤相关抗原的CTL及CD4<sup>+</sup>T细胞效应,寻找hTERT的MHC-II抗原多肽也在同时进行.Schroers *et al*<sup>[94]</sup>鉴定了2个hTERT的MHC-II抗原多肽:hTERT(766)(LTDLQPYMRQFVAHL)及hTERT(672)(RPGLLGASVLGLDDI<sup>[95]</sup>).

**3.3 针对端粒酶的肿瘤免疫基因治疗的安全性** 传统抗肿瘤药物(如化疗药物)毒性大小主要与药物剂量有关,而以hTERT为靶点的肿瘤免疫治疗药物的毒性则主要与对自身抗原的免疫反应有关.因此,针对hTERT的免疫治疗是否会导致hTERT阳性的少数正常细胞的自身免疫反应成为令人担心的问题.人体大多数分化成熟的器官如心、肺、肝、肾、脑等缺乏可检测的端粒酶活性,不会受到hTERT特异的CTL的杀伤.而正常造血干细胞、激活的淋巴细胞、基底角化细胞、性腺细胞和某些上皮细胞可以检测到端粒酶活性或hTERT mRNA表达<sup>[6]</sup>,理论上,针对hTERT的免疫对这些组织细胞会有一些的影响,但体内实验观察到的这种影响很小甚至没有.如hTERT特异的CTL能溶解端粒酶阳性的肿瘤细胞,而对自身的端粒酶同样阳性的造血干细胞没有影响<sup>[78, 92]</sup>.鼠体内实验直接证明<sup>[87]</sup>,转入了鼠TERT mRNA的树突细胞激发的TERT特异性CTL反应可以抑制鼠移植瘤的生长,但对端粒酶阳性的造血组织、肝脏等没有引起自身免疫反应,小鼠存活良好.Dana-Farber癌症研究所Vonderheid *et al*<sup>[91]</sup>对7名进展期癌症患者反复接种了体外以hTERT I540抗原肽辅以锁眼形血蓝蛋白佐剂共同培养的自身DC共计32次.结果只有1例出现2度毒性反应(短暂乏力),无1例出现骨髓毒性反应.就目前的体内实验而言,针对端粒酶的免疫基因治疗是非常安全的.这可能是由于在检测TERT表达水平时,基本上都是通过检测TERT mRNA水平,而TERT mRNA水平不能完全代表其蛋白表达水平.即使能准确测量TERT蛋白水平,也不能就此反映肽/MHC结合和递呈水平.Swiggers *et al*的研究也表明,hTERT mRNA和hTERT的表达水平并不能调节端粒酶的活性,起调节作用的可能是hTERT转录后的修饰.因此,端粒酶阳性的正常组织免受TERT特异的CTL攻击可能与这些组织hTERT蛋白表达水平较低或无效递呈hTERT多肽有关.

目前有少数实验结果表明hTERT在肿瘤治疗中可能并无重要作用,如Boon *et al*<sup>[76]</sup>用hTERT:540-548加免疫佐剂免疫患者后,在外周血内可检测到hTERT:540-548特异的T细胞,但这些T细胞不能杀伤肿瘤细胞,患者在临床上也无任何客观改善,但目前大多数学者对hTERT在肿瘤治疗中的作用仍持肯定态度.需要进一步明确的是:hTERT能否在人体内成功激发抗肿瘤免疫反应,并在临床上见到效果?对于极少数,但非常关键(生殖细胞和造血干细胞)的表达hTERT的正常组织,未受到CTL的免疫攻击的机制是什么?如果hTERT阳性的正常体细胞能逃避特异CTL的免疫攻击,其机制是否会为肿瘤细胞所获得?约10%的肿瘤无端粒酶活性,如高度微卫星不稳(high

microsatellite instability, MSI-H)的卵巢癌<sup>[22]</sup>就先天存在一种不依赖端粒酶的端粒延长机制(ALT, alternative lengthening of telomerase),在治疗过程中,这类肿瘤细胞在选择压力下是否可能变得对端粒酶抑制剂耐受,而获得ALT机制?总之,对hTERT的免疫学分析以及一系列体外和动物实验表明,他是一个潜在的广谱抗肿瘤免疫治疗的重要靶点.针对该靶点的临床人体内抗肿瘤免疫治疗试验已经开始,如果针对hTERT的肿瘤免疫反应能安全有效的激活并取得显著临床疗效,基于hTERT的肿瘤免疫基因治疗以及肿瘤免疫预防将得到广泛地应用.

#### 4 参考文献

- 1 Baykal A, Rosen D, Zhou C, Liu J, Sahin AA. Telomerase in breast cancer: a critical evaluation. *Adv Anat Pathol* 2004;11:262-268
- 2 杨仕明, 房殿春, 杨金亮, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. 反义hTERT转染对SGC-7901胃癌细胞株形态学的影响. *第三军医大学学报* 2001;23:1034-1036
- 3 Janknecht R. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* 2004;564:9-13
- 4 Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? *Oncogene* 2002; 21:688-697
- 5 Purev E, Soprano DR, Soprano KJ. Effect of all-trans retinoic acid on telomerase activity in ovarian cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2004;23:309-316
- 6 Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002;21:564-579
- 7 Parkinson EK. Telomerase as a novel and potentially selective target for cancer chemotherapy. *Ann Med* 2003;35:466-475
- 8 Ide T. Telomere and telomerase as targets for anti-cancer drugs. *Nippon Rinsho* 2004;62:1271-1276
- 9 Yang SM, Fang DC, Luo YH, Lu R, Battle PD, Liu WW. Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:876-882
- 10 房殿春, 罗元辉, 杨仕明, 鲁荣, 门荣甫, 刘为纹. 大肠癌组织端粒酶活性的检测及其意义. *中华内科杂志* 1998;37:742-744
- 11 房殿春, 罗元辉, 杨仕明, 鲁荣, 刘为纹. 原发性肝癌端粒酶活性的检测及临床意义. *免疫学杂志* 1997;13:193-195
- 12 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 杨金亮, 刘为纹. 不同病变胃黏膜端粒酶活性及其亚单位的检测. *癌症* 2001;20:23-27
- 13 Shao R, Guo X. Human microvascular endothelial cells immortalized with human telomerase catalytic protein: a model for the study of *in vitro* angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:788-794
- 14 Zhu YL, Zhong X, Zheng S. Conditionally immortalized human colorectal crypt cell line. *Zhejiang Daxue Xuebao Yixueban* 2004; 33:379-384
- 15 Gudjonsson T, Villadsen R, Ronnov-Jessen L, Petersen OW. Immortalization protocols used in cell culture models of human breast morphogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2004;61: 2523-2534
- 16 梁光萍, 罗向东, 杨宗城. 端粒酶催化亚单位基因转染对人胚胎成纤维细胞表型及寿命的影响. *中国临床康复* 2002;6:3672-3673
- 17 Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A, Ohnuma N, Yokoyama T. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 2004;91:972-979
- 18 Onoda N, Ogisawa K, Ishikawa T, Takenaka C, Tahara H, Inaba M, Takashima T, Hirakawa K. Telomerase activation and expression of its catalytic subunits in benign and malignant tumors of the parathyroid. *Surg Today* 2004;34:389-393

- 19 Boltze C, Schneider-Stock R, Roessner A, Quednow C, Hoang-Vu C. Function of HSP90 and p23 in the telomerase complex of thyroid tumors. *Pathol Res Pract* 2003;199:573-579
- 20 Novakovic S, Hocevar M, Zgajnar J, Besic N, Stegel V. Detection of telomerase RNA in the plasma of patients with breast cancer, malignant melanoma or thyroid cancer. *Oncol Rep* 2004;11:245-252
- 21 Zhou JH, Zhang HM, Chen Q, Han DD, Pei F, Zhang LS, Yang DT. Relationship between telomerase activity and its subunit expression and inhibitory effect of antisense hTR on pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1808-1814
- 22 Landen CN, Klingelutz A, Coffin JE, Sorosky JJ, Sood AK. Genomic instability is associated with lack of telomerase activation in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2004;3 [Epub ahead of print]
- 23 Liu Y, Snow BE, Hande MP, Yeung D, Erdmann NJ, Wakeham A, Itie A, Siderovski DP, Lansdorp PM, Robinson MO, Harrington L. The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function *in vivo*. *Curr Biol* 2000;10:1459-1462
- 24 Liu L, Li CR, Sun LB, Wang GB, Wang B. Effects of antisense human telomerase reverse-transcript protein subunit(hTERT) gene on biological characteristics of hepatoblastoma cell line *in vitro*. *Zhonghua Erke Zazhi* 2004;42:481-485
- 25 Brandt S, Heller H, Schuster KD, Grote J. The tamoxifen-induced suppression of telomerase activity in the human hepatoblastoma cell line HepG2: a result of post-translational regulation. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:120-128
- 26 Song DP, Lin JS, Fu GL, Sun XM, Kong XJ, Li PY, Ma X. Hammerhead ribozyme against human telomerase catalytic subunit (hTERT) induced apoptosis of liver cancer cells. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004;12:616-619
- 27 杨仕明, 房殿春, 杨金亮, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. hTERT 反义基因转染对肝癌细胞端粒酶亚单位及细胞周期的影响. *第三军医大学学报* 2003;25:2193-2195
- 28 Zheng SJ, Xia Y, Ren H, Zhong S, Yang Y, Tao P, Wang SQ. The anti-cancer effect of siRNA targeting human telomerase reverse transcriptase in SMMC-7721 cells. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004;12:530-533
- 29 Zhang PH, Tu ZG, Yang MQ, Huang WF, Zou L, Zhou YL. Experimental research of targeting hTERT gene inhibited in hepatocellular carcinoma therapy by RNA interference. *Ai Zheng* 2004;23:619-625
- 30 Titu LV, Loveday RL, Madden LA, Cawkwell L, Monson JR, Greenman J. Cytotoxic T-cell immunity against telomerase reverse transcriptase in colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 2004;12:871-876
- 31 Yang SM, Fang DC, Yang JL, Liang GP, Lu R, Luo YH, Liu WW. Effect of antisense human telomerase RNA on malignant phenotypes of gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1144-1152
- 32 杨仕明, 房殿春, 杨金亮, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. hTERT 反义基因对胃癌细胞端粒酶及凋亡相关基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:149-152
- 33 Zhan ZL, Li C, Sun H. Preliminary research on the effect of antisense oligodeoxynucleotides of tankyrase 1 on tumor growth following intratumoral injection in mice. *Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi* 2004;27:604-607
- 34 Wu ZQ, Guo QL, You QD, Zhao L, Gu HY. Gambogic acid inhibits proliferation of human lung carcinoma SPC-A1 cells *in vivo* and *in vitro* and represses telomerase activity and telomerase reverse transcriptase mRNA expression in the cells. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1769-1774
- 35 Jiang F, Bao J, Li P, Nicosia SV, Bai W. Induction of ovarian cancer cell apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 through the down regulation of telomerase. *J Biol Chem* 2004;279:53213-53221
- 36 Amarnath SM, Dyer CE, Ramesh A, Iwuagwu O, Drew PJ, Greenman J. In vitro quantification of the cytotoxic T lymphocyte response against human telomerase reverse transcriptase in breast cancer. *Int J Oncol* 2004;25:211-217
- 37 Sievers E, Albers P, Schmidt-Wolf IG, Marten A. Telomerase pulsed dendritic cells for immunotherapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 2004;171:114-119
- 38 Biroccio A, Leonetti C. Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:407-421
- 39 Iczkowski KA, Huang W, Mazzucchelli R, Pantazis CG, Stevens GR, Montironi R. Androgen ablation therapy for prostate carcinoma suppresses the immunoreactive telomerase subunit hTERT. *Cancer* 2004;100:294-299
- 40 Kraemer K, Fuessel S, Kotzsch M, Ning S, Schmidt U, Wirth MP, Meye A. Chemosensitization of bladder cancer cell lines by human telomerase reverse transcriptase antisense treatment. *J Urol* 2004;172(5 Pt 1):2023-2028
- 41 Sun LB, Li CR, Wen JM, Wang GB, Zhang M, Yang J, Li RX. Antisense hTERT inhibits gene expression and functional activity of telomerase in leukemia cell lines. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2004;33:454-457
- 42 Liu L, Berletch JB, Green JG, Pate MS, Andrews LG, Tollefsbol TO. Telomerase inhibition by retinoids precedes cytodifferentiation of leukemia cells and may contribute to terminal differentiation. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1003-1009
- 43 Liu JJ, Wu XY, Peng J, Pan XL, Lu HL. Antiproliferation effects of oridonin on HL-60 cells. *Ann Hematol* 2004;83:691-695
- 44 Guo ZX, Jin J. Effect of arsenic trioxide on telomerase and telomerase reverse transcriptase in KM3 cell line. *Zhongguo Shiyaxue Yexue Zazhi* 2004;12:346-349
- 45 Verra NC, Jorritsma A, Weijer K, Ruizendaal JJ, Voordouw A, Weder P, Hooijberg E, Schumacher TN, Haanen JB, Spits H, Luiten RM. Human telomerase reverse transcriptase-transduced human cytotoxic T cells suppress the growth of human melanoma in immunodeficient mice. *Cancer Res* 2004;64:2153-2161
- 46 Zeiger MA, Meeker AK. Telomerase as drug and drug target for the treatment of thyroid cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2004;4:253-256
- 47 Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997;90:785-795
- 48 Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 1997;277:955-959
- 49 Shay JW, Wright WE. Implications of mapping the human telomerase gene (hTERT) as the most distal gene on chromosome 5p. *Neoplasia* 2000;2:195-196
- 50 Nisato RE, Harrison JA, Buser R, Orci L, Rinsch C, Montesano R, Dupraz P, Pepper MS. Generation and characterization of telomerase-transfected human lymphatic endothelial cells with an extended life span. *Am J Pathol* 2004;165:11-24
- 51 Dai XM, Li LJ, Wen YM, Wang CM, Liu H, Liu K, Li SF. Studies on the transfection of umbilical endothelia with catalytic subunit of telomerase. *Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi* 2004;22:373-375
- 52 Kowolik CM, Liang S, Yu Y, Yee JK. Cre-mediated reversible immortalization of human renal proximal tubular epithelial cells. *Oncogene* 2004;23:5950-5957
- 53 Matsumura T, Takesue M, Westerman KA, Okitsu T, Sakaguchi M, Fukazawa T, Totsugawa T, Noguchi H, Yamamoto S, Stolz DB, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N. Establishment of an immortalized human-liver endothelial cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation* 2004;77:1357-1365
- 54 Sun Y, Firestein GS, Wenger L, Huang CY, Cheung HS. Telomerase-transduced osteoarthritic fibroblast-like synoviocyte cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:1287-1292
- 55 Kamata N, Fujimoto R, Tomonari M, Taki M, Nagayama M, Yasumoto S. Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase. *J Oral Pathol Med* 2004;33:417-423
- 56 Kampinga HH, Van Waarde-Verhagen MA, Van Assen-Bolt AJ, Nieuwenhuis B, Rodemann HP, Prowse KR, Linskens MH. Reconstitution of active telomerase in primary human foreskin fibroblasts: effects on proliferative characteristics and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 2004;80:377-388
- 57 Taylor LM, James A, Schuller CE, Brce J, Lock RB, Mackenzie



- KL. Inactivation of p16INK4a, with retention of pRB and p53/p21cip1 function, in human MRC5 fibroblasts that overcome a telomere-independent crisis during immortalization. *J Biol Chem* 2004;279:43634-43645
- 58 Wang Y, Bai Y, Li X, Hu Q, Lin C, Xiao Z, Liu Y, Xu J, Shen L, Li L. Fetal human neural progenitors can be the target for tumor transformation. *Neuroreport* 2004;15:1907-1912
- 59 Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2001;269:1-12
- 60 Mauro LJ, Foster DN. Regulators of telomerase activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:521-524
- 61 Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J, Nabholz M. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* 2002;21:541-552
- 62 Shats I, Milyavsky M, Tang X, Stambolsky P, Erez N, Brosh R, Kogan I, Braunstein I, Tzukerman M, Ginsberg D, Rotter V. p53-dependent down-regulation of telomerase is mediated by p21waf1. *J Biol Chem* 2004;279:50976-50985
- 63 Kirkpatrick KL, Newbold RF, Mokbel K. There is no correlation between c-Myc mRNA expression and telomerase activity in human breast cancer. *Int Semin Surg Oncol* 2004;1:2
- 64 Wang Q, Bai Z, Li X, Hou L, Zhang B. The evidences of human orphan receptor COUP-TFII inhibiting telomerase activity through decreasing hTERT transcription. *Cancer Lett* 2004;214:81-90
- 65 Wang Q, Bai ZL, Xuan L, Hou L, Zhang B. Inhibitory role of transcription factor COUP-TFII in expression of hTERT in HeLa cells. *Chin Med Sci J* 2004;19:157-163
- 66 Tang Z, Zhao Y, Mei F, Yang S, Li X, Lv J, Hou L, Zhang B. Molecular cloning and characterization of a human gene involved in transcriptional regulation of hTERT. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:1324-1332
- 67 Shindoh M, Higashino F, Kohgo T. E1AF, an ets-oncogene family transcription factor. *Cancer Lett* 2004;216:1-8
- 68 Fuchs B, Inwards C, Scully SP, Janknecht R. hTERT is highly expressed in Ewing's sarcoma and activated by EWS-ETS oncoproteins. *Clin Orthop* 2004;426:64-68
- 69 Wang S, Zhu J. The hTERT gene is embedded in a nuclease-resistant chromatin domain. *J Biol Chem* 2004;279:55401-55410
- 70 Banik SS, Counter CM. Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR. *J Biol Chem* 2004;279:51745-51748
- 71 Wang W, Luo HS, Yu BP. Expression of NF-kappaB and human telomerase reverse transcriptase in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2004;10:177-181
- 72 Sinha-Datta U, Horikawa I, Michishita E, Datta A, Sigler-Nicot JC, Brown M, Kazanji M, Barrett JC, Nicot C. Transcriptional activation of hTERT through the NF-kappaB pathway in HTLV-I-transformed cells. *Blood* 2004;104:2523-2531
- 73 Zhong M, Wang J, Zhang B, Hou L, Yue YL, Li ZJ. Expression of pRb and E2F-1 and telomerase activity in ameloblastoma. *Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi* 2004;39:406-409
- 74 Guilleret I, Benhattar J. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:1037-1043
- 75 Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *Br J Cancer* 1976;33:241-259
- 76 Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994;12:337-365
- 77 Schultze JL, Maecker B, von Bergwelt-Baildon MS, Anderson KS, Vonderheide RH. Tumour immunotherapy: new tools, new treatment modalities and new T-cell antigens. *Vox Sang* 2001;80:81-89
- 78 Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004;10:828-839
- 79 Herbert B, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, Corey DR. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14276-14281
- 80 Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* 1999;13:2388-2399
- 81 Parkhurst MR, Riley JP, Igarashi T, Li Y, Robbins PF, Rosenberg SA. Immunization of patients with the hTERT: 540-548 peptide induces peptide-reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase. *Clin Cancer Res* 2004;10:4688-4698
- 82 Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001;106:263-266
- 83 Engleman EG. Dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Semin Oncol* 2003;30(3suppl8):23-29
- 84 Frolkis M, Fischer MB, Wang Z, Lebkowski JS, Chiu CP, Majumdar AS. Dendritic cells reconstituted with human telomerase gene induce potent cytotoxic T-cell response against different types of tumors. *Cancer Gene Ther* 2003;10:239-249
- 85 Saeboe-Larssen S, Fossberg E, Gaudernack G. mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). *J Immunol Methods* 2002;259:191-203
- 86 Su Z, Vieweg J, Weizer AZ, Dahm P, Yancey D, Turaga V, Higgins J, Boczkowski D, Gilboa E, Dannull J. Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product. *Cancer Res* 2002;62:5041-5048
- 87 Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, Majumdar A, Naoe M, Lebkowski JS, Vieweg J, Gilboa E. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med* 2000;6:1011-1017
- 88 Ping L, Asai A, Okada A, Isobe K, Nakajima H. Dramatic increase of telomerase activity during dendritic cell differentiation and maturation. *J Leukoc Biol* 2003;74:270-276
- 89 Vonderheide RH, Schultze JL, Anderson KS, Maecker B, Butler MO, Xia Z, Kuroda MJ, von Bergwelt-Baildon MS, Bedor MM, Hoar KM, Schnipper DR, Brooks MW, Letvin NL, Stephans KF, Wucherpfennig KW, Hahn WC, Nadler LM. Equivalent induction of telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes from tumor-bearing patients and healthy individuals. *Cancer Res* 2001;61:8366-8370
- 90 Ayyoub M, Migliaccio M, Guillaume P, Lienard D, Cerottini JC, Romero P, Levy F, Speiser DE, Valmori D. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur J Immunol* 2001;31:2642-2651
- 91 Vonderheide RH. Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene* 2002;21:674-679
- 92 Vonderheide RH, Anderson KS, Hahn WC, Butler MO, Schultze JL, Nadler LM. Characterization of HLA-A3- restricted cytotoxic T lymphocytes reactive against the widely expressed tumor antigen telomerase. *Clin Cancer Res* 2001;7:3343-3348
- 93 Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S. Identification of human telomerase reverse transcriptase-derived peptides that induce HLA-A24-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2001;97:2903-2907
- 94 Schroers R, Shen L, Rollins L, Rooney CM, Slawin K, Sonderstrup G, Huang XF, Chen SY. Human telomerase reverse transcriptase-specific T-helper responses induced by promiscuous major histocompatibility complex class II-restricted epitopes. *Clin Cancer Res* 2003;9:4743-4755
- 95 Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang J, Chen SY. Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+ T-helper cells. *Cancer Res* 2002;62:2600-2605

## 大肠癌发病的相关因素

王双双, 关景明, 范玉晶

王双双, 关景明, 范玉晶, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科  
黑龙江省哈尔滨市 150086  
省科技厅攻关项目, No. GB01C12403  
项目负责人: 关景明, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院 消化内科.  
电话: 0451-86605143  
收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-01-13

### 摘要

大肠癌是常见的恶性肿瘤, 其发生是多种因素共同作用的结果. 本文从遗传、良性疾病、饮食、环境、体育锻炼等多个方面, 阐述了与大肠癌发病相关的因素, 为大肠癌的防治提供理论依据.

王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素. 世界华人消化杂志 2005; 13(4):534-536

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/534.asp>

### 0 引言

大肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 在我国占恶性肿瘤的第四位<sup>[1]</sup>. 近几年在我国特别是大城市有上升趋势. 研究大肠癌发病的相关因素对于预防和早期诊治大肠癌是迫切的. 目前研究表明, 大肠癌的发生发展是多因素共同作用的结果, 包括遗传、疾病、环境、饮食等因素.

### 1 遗传因素

约20%左右的大肠癌归因危险度与遗传背景有关, 其中包括遗传性非息肉病性大肠癌家系(hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)和家族性腺瘤性息肉病家系(familia adenomatous polyposis, FAP)<sup>[2]</sup>.

1.1 遗传性非息肉病性大肠癌(HNPCC) 1895年被Warthin's发现, 原称为癌症家族综合征(cancer family syndrome). HNPCC是一种外显率为70-80%的常染色体显性遗传病<sup>[3]</sup>, 占所有大肠癌的2-7%<sup>[4]</sup>. 本病具有特殊的临床特点和分子生物学特性. 临床以发病年龄早、一般小于50岁<sup>[5]</sup>、原发癌多见、肿瘤部位以右半结肠为主、可同时或异时发生多个大肠肿瘤<sup>[6]</sup>. 其发病与几种错配修复基因(mismatch repair gene, MMR)的种系突变有关. MMR是广泛存在于原核及真核生物内高度保守的看家基因. 其功能是纠正DNA复制过程中的核苷酸碱基错配, 以及可能出现的小片段插入或缺失, 从而维持DNA的稳定, 即遗传的稳定性<sup>[7]</sup>, 而错配修复基因突变的表型特征为肿瘤细胞中出现微卫星DNA不稳定(microsatellite instability MSI)<sup>[8-9]</sup>. 国外研究表明, MSI在HNPCC中阳性率高达70-90%<sup>[10]</sup>. MMR缺陷细胞修复错配碱基的功能降

低或缺失, 导致MSI形成, 产生与MSI相关的基因组不稳定性, 患者肿瘤易感性增加. 目前发现的MMR有hMLH<sub>1</sub>, hMSH<sub>2</sub>, hMSH<sub>6</sub>, hPMS<sub>1</sub>, hPMS<sub>2</sub>和hMSH<sub>3</sub><sup>[11]</sup>. HNPCC家族中最易检测的突变为hMSH<sub>2</sub>和hMLH<sub>1</sub>的种系突变, 其突变检出率为40-70%, 其中hMSH<sub>2</sub>占27-54%<sup>[12-14]</sup>. hMSH<sub>2</sub>及hMLH<sub>1</sub>突变在不同的民族和地区, 其阳性率不同, 欧美hMSH<sub>2</sub>突变的检出率高于hMLH<sub>1</sub>, 而亚洲人hMLH<sub>1</sub>突变多见<sup>[15-16]</sup>. 1990年国际HNPCC协作组制订了Amsterdam诊断标准<sup>[13]</sup>. 1995年Park *et al*对小家系诊断提出了可疑HNPCC(sHNPCC)概念, 证实HNPCC和sHNPCC有相似的遗传学背景. 1998年相应修改了Amsterdam诊断标准<sup>[17]</sup>. (1)大肠癌和(或)子宫内膜癌的家族聚集;(2)胃、卵巢、输尿管和肾盂、脑、小肠、肝胆道、皮肤的恶性肿瘤是HNPCC的相关肿瘤;(3)肿瘤发病年龄早;(4)常见多发性肿瘤;(5)大肠癌特征:多位于近端结肠(70%), 常见多发性大肠癌(35%), 预后较好, 病理类型多见黏液腺癌和低分化癌, 肿瘤边缘常有明显的淋巴细胞浸润和淋巴样细胞(lymphoid)聚集现象;(6)大肠腺瘤特征:数目较少, 通常只有几个, 绒毛成分多, 异型增生明显, 侵袭性强, 大都在2-3 a内发生癌变(一般腺瘤通常需要8-10 a);(7)大部分肿瘤表现为微卫星不稳定MSI;(8)免疫组织化学染色发现hMLH<sub>1</sub>, hMSH<sub>2</sub>, hMSH<sub>6</sub>蛋白低或不表达;(9)有hMSH<sub>2</sub>, hMLH<sub>1</sub>, hMSH<sub>6</sub>, hPMS<sub>1</sub>, hPMS<sub>2</sub>的种系突变.

1.2 家族性多发性大肠腺瘤病(FAP) FAP通常指大肠腺瘤数超过100只以上者(不足100只为多发性腺瘤, 与遗传因素无明显关系), 一般在100-1 000只之间<sup>[18]</sup>. FAP是一种常染色体显性遗传病, 位于5q<sup>21</sup>的APC基因种系突变是其发生的分子遗传学基础<sup>[19]</sup>.

有人认为, 由于遗传因素, 婴儿在胚胎时期上皮细胞即有易感性, 进入青春期后, 这种细胞即迅速增长, 而生成息肉;也有人认为因肠壁有先天性缺损或慢性刺激而引起息肉<sup>[20]</sup>. 由于APC基因变异构成一种新的基因特性, 能引起细胞免疫反应的改变, 从而易形成癌肿. 同时, FAP患者大肠黏膜对某些致癌物质的敏感性增高. 另外, 此病大肠黏膜上形成的腺瘤数目很多, 因此发生癌变的几率也就大. 由于APC基因突变位点不同, 临床表型也不完全相同<sup>[21]</sup>. 主要的特点为:(1)息肉数目多, 可有成百, 数千只不等.(2)息肉大小不一, 形态各异, 最常见于直肠和乙状结肠.(3)可伴有多种大肠病变.(4)癌变年龄比较低, 一般在30-40岁之间. 文献报道最早的16岁<sup>[22]</sup>. (5)癌变率高, 其发生率为34.6-82.8%. 有人

认为癌变率为100%, 绝大多数患者在45岁以前死于息肉癌变。(6)文献报道仅20%的病例无家族史<sup>[23]</sup>。

## 2 良性疾病癌变

**2.1 腺瘤** 1974年Morson提出大肠腺瘤→大肠癌序贯学说, 认为大多数大肠癌起源于大肠腺瘤<sup>[24]</sup>。目前腺瘤—腺癌学说已被广泛接受。有些学者认为大肠癌的演变过程是正常上皮→腺瘤→腺瘤伴不典型增生→腺瘤癌变→腺癌<sup>[25]</sup>, 因此认为腺瘤是癌形成的一个阶段。从腺瘤发展到癌一般经历5-10 a或更长, 大肠癌的形成具有较为明确的阶段性<sup>[26]</sup>。杂和性缺失的分子致癌途径是APC基因突变导致小腺瘤的形成, 多发生于左半结肠部位。小腺瘤到明显腺瘤的过渡激活了k-ras基因, 继之基因调控发生障碍, 使抑癌基因失去活性, 在多基因转换过程中DCC基因丢失, 最后在染色体17p的p53基因缺失或突变, 癌基因活性增强, 产生癌前期变化。简而言之, 在腺瘤致癌过程中, APC基因→k-ras基因→DCC基因→p53基因分阶段参与了整个癌变过程<sup>[27]</sup>。

大肠腺瘤的癌变率受多种因素的影响。(1)直径:<1 cm癌变率为1%, 1-2 cm为5%, >2 cm为20%, 有报道高达30%<sup>[28]</sup>。(2)数目:单个癌变率为29%, 3个为50%, 6个为80%。(3)病理类型:管状癌变率为4.8%, 混合性为2.5%, 绒毛状腺瘤40.7%<sup>[29]</sup>, 有报道绒毛状腺瘤癌变率高达56.76%<sup>[28]</sup>。(4)性别:女性癌变率为22%, 男性为13%。(5)年龄:<30岁癌变率为5%, >30岁为15%。有报道>60岁癌变率为69.6%<sup>[30]</sup>。(6)蒂:息肉有蒂癌变率低, 广基可达75%<sup>[31]</sup>。(7)不典型增生级别:轻度癌变率为7.8%, 重度为45.5%<sup>[32]</sup>。(8)部位:左半结肠癌变率为97%, 其中直肠为45%, 乙状结肠为52%。(9)表面性状:表面有糜烂、溃疡、充血, 癌变率高<sup>[33]</sup>。

**2.2 溃疡性结肠炎** 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称非特异性溃疡性大肠炎, 是一种原因不明的直肠和结肠炎症性疾病。病变主要限于大肠黏膜与黏膜下层, 具有难治性、易复发、有癌变倾向等特点<sup>[34]</sup>。据有关资料报道, UC患者部分细胞代谢异常与癌前改变的发生有一定的关系, 认为比较密切的有杯状细胞黏液的改变, 细胞内DNA、RNA代谢的异常等<sup>[35]</sup>。目前多数学者认同正常上皮→平坦型异型增生→UC相关性结直肠癌的发展过程, 其中p53, k-ras, 18q, TGF- $\beta$ , APC等参与了整个过程<sup>[36]</sup>。

UC癌变率与以下因素有关<sup>[37]</sup>:(1)病变范围:UC的病变范围越大, 癌变率越高。(2)疾病持续时间:UC的病程越长癌变率越高。(3)临床分型:慢性持续型的癌变率高于其他三型。(4)息肉:UC易伴有假性息肉, 癌变率会增高。合并溃疡性结肠炎的结肠癌的特征:(1)患者年龄偏轻;(2)具多发性倾向;(3)病变表现平坦, 肉眼病理分型复杂;(4)病变多呈境界不明了;(5)右侧(升)结肠发病比例占多数;(6)可并发育异常;(7)多属低分子腺癌及黏液形成癌<sup>[39]</sup>。

## 3 饮食、环境和其他因素

多数学者认为, 大肠癌发病率的升高与人们生活水平的提高、饮食条件的改善有关。高脂肪饮食, 特别是含有饱和脂肪酸的饮食可刺激胆汁分泌, 增加大肠中胆汁酸与中性固醇的浓度, 改变大肠菌群的组成, 使厌氧菌增加, 需氧菌减少。经细菌的作用, 可使胆汁酸生成3-甲基胆蒽等致癌物。如果肠壁长期被上述致癌物刺激, 就可形成大肠癌<sup>[38]</sup>;另外, 膳食中缺少富含纤维素食品, 就会使大肠中宿便时间延长, 肠道中有毒物质长期积累, 可使致癌物浓度增高, 因此发生大肠癌的机会也大大增加<sup>[39]</sup>。有研究表明常食用腌鱼、腌肉及油炸食品与大肠癌的发病有重要联系, 这很可能是与腌制食品中含有致癌的亚硝胺类化合物和高蛋白食物经油炸后产生的有明显致癌、致突变作用的热裂解产物—杂环胺类有关。膳食纤维(DF)的摄入减少也是大肠癌发病的危险因素之一。所谓膳食纤维是指植物中那些不被小肠中消化酶水解而直接进入大肠的成分, 因为DF可黏附结肠中食物残渣的某些有害成分, 如氨、胆盐等, 使其在肠腔内浓度降低, 而且通过增加粪便量使这些物质稀释, 因而有利于降低上皮细胞的癌变率。研究表明DF的摄入量与癌症的发病率呈负相关, 同时也认为, 食物中微量元素Se、Zn、Fe等在体内具有清除自由基、抗脂质氧化、保护生物膜及调节多种酶活性的作用, 与大肠癌的发病密切相关<sup>[40]</sup>。

曾昭华 *et al*<sup>[41]</sup>研究结果表明, 大肠癌的发病率与土壤环境中的元素含量高低存在着一定的内在联系。通过食物链作用的结果, 大肠癌的发生和发展与土壤环境中的化学元素确实有明显的相关性。居住在砷、钒、铈、铊、铀、镭元素含量低的地区的人群, 大肠癌的发病率和死亡率就高;反之, 大肠癌的发病率和死亡率则低。

姚璇 *et al*<sup>[42]</sup>认为, 体育锻炼缺乏也是大肠癌发病的危险因素, 因为体力活动刺激肠蠕动, 从而减少膳食、内源性分泌物(胆酸)及致癌物在结肠中的滞留时间。

汪洋辉 *et al*<sup>[43]</sup>对大肠癌高发区浙江嘉善县结肠癌危险因素研究结果表明, 在大肠癌的发生中, 社会心理因素作用不可忽视。生活中的负性事件, 如亲人去世、家庭不和、工作失意、人际关系紧张等, 易造成精神压抑。长期精神压抑、不适应环境、不能自我调节的不良情绪、焦虑和应激反应强等所谓C型行为模式被认为是癌症的易感行为模式。精神压抑是嘉善县结肠癌最强的危险因素, 不良情绪亦为中等强度的结肠癌危险因素。

总之, 大肠癌的发生是多种因素共同作用的结果, 所以我们要从多个方面来预防大肠癌。例如:多食新鲜的蔬菜、水果、粗粮, 控制脂肪的摄入量;适当的体育锻炼;保持愉快的心情;积极治疗良性病变;加强对高危人群的普查等。相信随着对大肠癌发病机制的深入研究, 以及人们自身防护意识的不断提高, 将会极大地降低大肠癌的发病率。

## 4 参考文献

- 1 谭颖, 姚宇亮, 林连捷, 郑长青. 大肠癌的基因治疗. 世界华人消化杂志 2004;12:1451-1454

- 2 刘希永, 蔡善荣. 代谢基因多态与大肠癌遗传易感性. 国外医学肿瘤学分册 2000;27:61
- 3 Cunningham C, Dunlop MG. Molecular genetic basis of colorectal cancer susceptibility. *Br J Surg* 1996;83:321-329
- 4 Muller A, Fishel R. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome(HNPCC). *Cancer Invest* 2002;20:102-109
- 5 盛剑秋, 李世荣, 牧虹. 遗传性非息肉性大肠癌的临床表型分析. 世界华人消化杂志 2002;10:104-105
- 6 罗定存, 倪耀忠, 莫善兢, 陶崇苇, 陈哲京. 遗传性非息肉性大肠癌的临床分析. 中华普通外科杂志 2003;18:594-596
- 7 Terdiman JP, Conrad PG, Sleisenger MH. Genetic testing in hereditary colorectal cancer: indications and procedures. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2344-2356
- 8 Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:801-818
- 9 Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:735-740
- 10 Kullmann F, Bocker T, Scholmerich J, Ruschoff J. Microsatellite instability-a new aspects in genetics and molecular biology of hereditary nonpolyposis and sporadic colorectal tumors. *Z Gastroenterol* 1996;34:813-822
- 11 Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Hofstra RM, van der Zee AG, Buys CH, Kleibeuker JH. Clinical definition of hereditary non-polyposis colorectal cancer: a search for the impossible? *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001;234:61-67
- 12 Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuker JH, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Meijers-Heijboer EH, Bertario L, Varesco L, Bisgaard ML, Mohr J, Fodde R, Khan PM. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996;110:1020-1027
- 13 Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-425
- 14 Planck M, Koul A, Fernebro E, Borg A, Kristoffersson U, Olsson H, Wenngren E, Mangell P, Nilbert M. hMLH1, hMSH2 and hMSH6 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer families from southern Sweden. *Int J Cancer* 1999;83:197-202
- 15 Yuan Y, Zheng S. Mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Natl Med J China* 1999;79:346-348
- 16 Han HJ, Yuan Y, Ku JL, Oh JH, Won YJ, Kang KJ, Kim KY, Kim S, Kim CY, Kim JP, Oh NG, Lee KH, Choe KJ, Nakamura Y, Park JG. Germline mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in Korean hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1317-1319
- 17 郑树. 大肠癌与遗传易感性. 实用肿瘤杂志 2001;16:364-365
- 18 孙孟红. 家族性多发性息肉症腺瘤的早期分子生物学变化—单个腺体微解剖分析. 中国癌症杂志 2000;10:7
- 19 李世荣, 盛剑秋. 遗传性大肠癌综合征的分子遗传学与临床. 中国医药导刊 2003;5:107
- 20 唐亚琴. 家族性大肠腺瘤息肉肉2例报道. 中国厂矿医学 2001;14:512
- 21 吕愈敏. 大肠癌癌前病变研究进展. 新医学 2003;34:405
- 22 刘剑, 郑树, 冯懿正, 余海, 杨工, 蔡心涵, 于月波, 黄学峰, 耿礼义. 家族性腺瘤性息肉病登记与家系调查初步报道. 中国肿瘤临床 1997;24:756
- 23 师英强, 蔡宏, 莫善兢, 傅红, 杜春燕. 大肠家族性腺瘤性息肉病癌变的治疗. 外科理论与实践 2003;8:193
- 24 Morson BC. The evolution of colorectal carcinoma. *Clin Radiol* 1984;35:425-431
- 25 Zhang SQ. Screening and prevention of colorectal cancer in Haining County. *Dis Colon Rectum* 1985;28:300-304
- 26 王赫, 刘士良, 李岩. 散发性大肠癌中 hMSH2 基因突变的意义. 世界华人消化杂志 2002;10:469-471
- 27 师英强. 大肠癌基因表达与临床应用. 肿瘤研究与临床 2001;13:75
- 28 张宁, 孙利平, 李岩. 大肠息肉 256 例的内镜诊治及病理形态学特点. 山西医科大学学报 2003;34:103
- 29 Kapsoritakis AN, Potamianos SP, Koukourakis MI, Tzardi M, Mouzas IA, Roussomoustakaki M, Alexandrakis G, Kouroumalis EA. Diminutive polyps of large bowel should be an early target for endoscopic treatment. *Dig Liver Dis* 2002;34:137-140
- 30 言红健, 鲁素彩, 田自力, 郭雅卿. 大肠腺瘤 1083 例临床分析. 河北职工医学院学报 2001;18:13
- 31 谢春松, 王小莹. 大肠息肉 264 例临床与内镜治疗分析. 国际医药卫生导报 2004;10:93
- 32 郭志义, 李平, 胡纲, 何祥飞, 张旭. 大肠腺瘤恶变的相关因素探讨. 中国普通外科杂志 2004;13:279-281
- 33 刘舒颖, 王菊岩. 大肠息肉癌变的内镜诊断及病理分析. 广东医学院学报 2003;21:33-35
- 34 徐甦, 朱惠芳. 中西医结合疗法治疗中重度溃疡性结肠炎 49 例观察. 现代中西医结合杂志 2004;13:884-885
- 35 马高峰, 刘江, 张相安. 溃疡性结肠炎与大肠癌的关系. 中原医刊 2001;28:10-11
- 36 李君. 溃疡性结肠炎相关性结直肠癌发生过程中有关的基因改变. 国外医学遗传学分册 2000;23:255-258
- 37 田原, 利行. 炎症性肠疾病与结肠癌. 日本医学介绍 2003;24:221
- 38 陈婕, 李君, 徐三平, 宋军. 湖北地区结直肠癌与生活习性的相关性研究. 世界华人消化杂志 2002;10:105-107
- 39 张宗岐. 大肠癌的饮食治疗和预防. 家庭中医药 2003;11:20
- 40 张俊. 大肠癌患者膳食中微量元素调查与分析. 微量元素与健康研究 2000;17:25-26
- 41 曾昭华, 曾雪萍. 中国大肠癌与土壤环境中元素的相关性研究. 浙江地质 2001;17:56-57
- 42 Yao X, Nie SF, Wei SB, Zhu GB, Wang RR, Zheng X. A case-control study on risk factors of large bowel cancer in Wuhan. *Chin J Dis Control Prev* 2001;5:118-120
- 43 汪祥辉, 雷通海, 马新源, 吕桂泉, 何兆毅, 姚开颜, 李其龙, 陈康. 大肠癌高发区居民结肠癌危险因素研究. 中华肿瘤杂志 2001;23:481-482

编辑 张海宁

## 干扰素所致的抑郁症及其治疗

王霞, 陈玉龙, 房静远

王霞, 房静远, 上海第二医科大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001  
陈玉龙, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052  
项目负责人: 房静远, 200001, 上海市, 上海第二医科大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所. jingyuanfang@yahoo.com  
电话: 021-63200874  
收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-01-08

### 摘要

干扰素(interferon, IFN)被广泛地用于肿瘤和病毒感染治疗, 其针对慢性病毒性肝炎的应用, 为不少患者带来了希望. 但其副反应较多且常见, 特别是以抑郁症为主的精神异常, 常影响着患者的依从性和治疗效果. 该症的发生与 IFN 对神经生化病理的影响有密切关系. 作者试图对 IFN 引起抑郁症的现状及其发病机制的研究加以阐述, 以引起医护人员、患者及其家属的警觉与重视. 并提出, 观察与监测患者病情变化, 辅以心理精神支持和应用抗抑郁药物治疗是对大多数患者的适宜选择.

王霞, 陈玉龙, 房静远. 干扰素所致的抑郁症及其治疗. 世界华人消化杂志 2005;13(4):537-540  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/537.asp>

### 0 引言

干扰素是病毒感染后由白细胞产生的细胞因子, 参与免疫系统调节, 并具有抑制细胞增生和抗病毒的双重作用, 是机体的保护性蛋白<sup>[1]</sup>. 外源性干扰素(包括 IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ )就是根据此机制应用于临床多种疾病的治疗, IFN- $\alpha$  广泛地用于肿瘤(黑色素瘤和骨髓异常增生等)和慢性病毒感染(HIV、丙肝和乙肝等), IFN- $\beta$  是治疗多发性硬化病(MS)标准药物, IFN- $\gamma$  则可用于肉芽肿病和皮肤损伤. IFN 可引起治疗效果以外的副反应: 如寒战、发热、肌痛等流感样症状, 也可引起乏力、失眠、易激惹、食欲减低、自杀意念等抑郁症状. IFN 引起的抑郁症是很常见的, 且影响治疗效果, 有时需要停药, 或需联合应用抗精神药物<sup>[2]</sup>. 本文对 IFN 引起抑郁症的研究作一综述, 并对其发生率、临床特点、影响因素、可能存在的生化机制和治疗策略等方面加以阐述.

### 1 干扰素引起抑郁症的发病率和临床现状

干扰素引起的抑郁症状, 又称药物性抑郁症, 与典型的抑郁症(major depression disorder)相似, 主要有抑郁心境、易激惹、情感依赖、激越、乏力、淡漠、无愉快感、食欲不振、精神运动迟缓、睡眠障碍、记忆力减退、注意力不能集中、性欲降低等. 这些非特异症状在动物模型中称为“病态行为(sickness behavior)”<sup>[3]</sup>.

IFN- $\alpha$  主要用于病毒性肝炎和肿瘤, 由于研究对象和精神评估标准的不同, IFN- $\alpha$  引起的抑郁症发生率各报道有一定差异(0-44%)<sup>[1]</sup>, 近年虽然长效干扰素(pegylated IFN- $\alpha$ )的使用可提高疗效, 但抑郁症的发病率仍大于 20%. Kraus *et al*<sup>[4]</sup> 将 104 例丙肝患者分为治疗组( $n = 80$ )和对照组( $n = 20$ ), 治疗组给予 IFN- $\alpha$  3-5 MU, 3 次/wk, 和/或拉咪呋定 1 000-1 200 mg/d, 对照组未给予 IFN- $\alpha$ , 采用医院焦虑抑郁量表(hospital anxiety and depression scale, HAD)和 SCL-90 量表评估精神状态, 结果表明抑郁、焦虑及敌视等抑郁症状明显高于治疗前和对照组( $P < 0.001$ ), IFN 治疗组抑郁症的发病率为 57.7%, 对照组的发病率为 8.3%. 单用拉咪呋定治疗病毒性肝炎无明显的神经毒副反应, 拉咪呋定联合 IFN 治疗并不增加 IFN 诱导抑郁症的发生率, 也不加重抑郁症状<sup>[25]</sup>. Casassus *et al* 对 40 例肥大细胞瘤给予 IFN- $\alpha$  治疗 6 mo 有 35% 的患者出现抑郁、失眠等神经障碍, 并且在 IFN- $\alpha$  治疗结束后部分患者仍出现抑郁症状<sup>[5]</sup>. IFN- $\alpha$  治疗慢性丙肝和肾小细胞癌的过程中或停药后有患者自杀的个案报道, 自杀倾向的发病少见且与 IFN- $\alpha$  治疗无明显相关性. IFN- $\beta$  是多发性硬化病(MS)治疗的标准药物, Patten *et al*<sup>[6]</sup> 对 267 例 MS 患者采用 CES-D 量表评估 IFN- $\beta$  引起抑郁症的发病情况, IFN- $\beta$  治疗组发病率为 15.6%, 而对照组 0%. 这里也有不同观点, 如一大样本(365 例)的临床观察显示, IFN- $\beta$  和安慰剂治疗 MS 患者抑郁症的发病率无显著性差异. Riddeil *et al*<sup>[7]</sup> 对 84 例 HIV 患者给予 IFN- $\gamma$  预防机会感染, 观察 48 wk 结果提示 IFN- $\gamma$  可引起乏力、肌痛、抑郁等, 但患者的生活质量和 KPI 量表评分与安慰剂组无显著性差异.

IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  是炎性细胞因子的前体因子, 具有与 IFN- $\alpha$  相似的激活免疫特性, 相关报道较少, 与抑郁症无明显关系<sup>[14]</sup>. IFN- $\alpha$  引起抑郁症是很常见的, 一般在治疗的 2-15 wk 出现典型的症状, 其发病率在 20-40%. 患者治疗前精神症状的评分的高低是 IFN 引发抑郁症的主要危险因素, 神经精神方面副反应还与 IFN 的剂量和疗程有关, 而与年龄、性别、药物滥用史的关系不明显<sup>[8]</sup>. 故而医护人员在使用 IFN 前应先对患者进行抑郁评分, 并密切观察其精神变化, 提高警惕.

### 2 干扰素引起抑郁症的发病机制

动物模型试验已证明, 外源性 IFN 的注入可引起脑组织内神经递质变化及性格行为的改变. IFN 可影响 5-羟色胺

(serotonin)能神经系统、下丘脑—垂体—肾上腺轴(HPA)、下丘脑—垂体—甲状腺轴(HPT)神经内分泌系统、以及细胞因子网络的平衡,从而导致认知功能和性格的变化,这种变化与抑郁症的病理机制具有一致性<sup>[1]</sup>. IFN引起的抑郁症是多因素的综合作用,具体机制仍不是很清楚. 目前的研究证实5-羟色胺起重要作用,炎症细胞因子IL- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 可直接或间接地激活吲哚胺-2,3-二氧化酶(indolamine 2,3-dioxygenase, IDO),促进5-羟色胺的前体物—色氨酸的代谢,从而降低5-羟色胺的浓度,IFN对5-羟色胺的降低作用是抑郁症的生化原因所在,给予5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)可有效改善抑郁症状<sup>[9-10, 14]</sup>. 躯体化症状的变化也与5-羟色胺的耗尽、色氨酸的降低有关. Capuron *et al*<sup>[9]</sup>对16例肿瘤患者分别于IFN治疗前、治疗后1 wk、1 mo末检测血中色氨酸的浓度,采用MADRS和HAMA量表评分,发现色氨酸浓度在治疗后显著低于治疗前,抑郁症的严重程度与5-羟色胺浓度的降低呈正相关. Gleason *et al*<sup>[10]</sup>对IFN引起抑郁症的丙肝患者给予SSRIs—西肽普兰26.67 mg/d,西肽普兰可抑制5-羟色胺的再摄取,投药2 wk后患者5-羟色胺水平升高,且抑郁症状有所缓解. 鸦片类拮抗剂可降低IFN对小鼠的神经精神的反应, Valentine *et al*<sup>[11]</sup>采用naltrexone(鸦片拮抗剂)对9例IFN- $\alpha$ 引起的抑郁症初步试验观察到5例患者的认知功能提高.

除了5-羟色胺能和鸦片系统,还有一些神经递质的改变与IFN引起的神经内分泌变化和抑郁性躯体症状有关. IFN可引起健康自愿者血清中去甲肾上腺素(NE)和皮质激素水平的升高,同时肾上腺素及其受体降低,这与抑郁症存在NE系统失调的机制具有一致性. IFN等细胞因子可通过HPA和HPT轴调节脑神经内分泌系统,已证实HPA在抑郁症患者体内活性增强,对14例接受IFN- $\alpha$ 治疗的恶性黑色素瘤研究中发现,促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质激素升高水平显著高于未发生抑郁症的患者<sup>[12]</sup>. 甲状腺功能低下患者与IFN引起的抑郁症患者都有乏力、精神迟缓等症状, Loftis *et al*<sup>[13]</sup>报道IFN可以起甲状腺功能失调,进一步研究证明,IFN、5-羟色胺能神经和HPT系统由多种负反馈机制直接或间接的作用于甲状腺细胞,并诱导其产生其他细胞因子,共同调节甲状腺功能.

外源性IFN可打破细胞因子的网络平衡, Taylor *et al*<sup>[14]</sup>发现IFN可激活细胞间信号传导通路,并调控IL-1, 2, 6, 8, IFN- $\gamma$ 等细胞因子的表达,位于四肢的IFN及其受体可引起与情绪反应有关的行为. Bonaccorso *et al*<sup>[15]</sup>对慢性丙肝患者给予IFN治疗,2-4 wk检测到IL-6、IL-8水平升高,且患者的抑郁、焦虑症状评分也随之升高,故而认为IFN与细胞因子及信号传导的相互作用与抑郁症的发生有关. IFN对脑组织生物物质的影响与抑郁症发病的生化机制具有一致性,推测IFN引起的抑郁症不仅与5-羟色胺、去甲肾上腺素、肾上腺素、鸦片类神经递质的变化有关,而且与神经内分泌系

统和细胞因子系统的变化有关,近年研究表明:IDO酶可降低或清除5-羟色胺,这在IFN引起的抑郁症中起重要作用<sup>[14]</sup>.

### 3 IFN引起的抑郁症的治疗

3.1 治疗策略 目前对IFN引起的抑郁症多采用减少药物剂量和停药的方法,以避免神经精神副反应的发生,这往往达不到预期的治疗效果,甚至一部分患者不能及时得以治疗. 近年的研究表明:采用标准化量表评测患者的精神变化,辅以心理支持必要时联合抗抑郁药治疗,才是使用IFN治疗的适宜选择. 动物实验表明,对外源性细胞因子(如IFN)诱导的“病态行为模型”给予三环类抗抑郁药—丙咪嗪,可减轻IFN引起的无快感、厌食、活动减少等行为方面的副反应. Sammut *et al*<sup>[16]</sup>对IFN- $\alpha$ 诱导的厌食动物模型,根据蔗糖消耗量来评定其抑郁症的严重程度,给予盐酸氟西汀或去甲丙咪嗪干预15 d后可提高食欲. 另一试验对IFN诱导运动减少的小鼠模型,给予鸦片类受体拮抗剂(naloxone),被动游泳试验可观察到小鼠运动较对照组明显增加. 最近, DeLa Garaza *et al*<sup>[17]</sup>发现非甾体类药物(NSAID)—diclofenac可提高大鼠海马回多巴胺和前额叶5-羟色胺的含量,从而可预防或减轻IFN- $\alpha$ 引起的抑郁. 对IFN诱导的抑郁症动物模型的成功治疗,激起了学者对人体抗抑郁治疗IFN神经副作用的研究,主要是一些个案报道和小样本观察. 最早由Levenson *et al*<sup>[18]</sup>报道抗抑郁药—氟西汀可成功治疗IFN引起的抑郁,随后Schramm *et al*<sup>[19]</sup>对10例IFN- $\alpha$ 引起抑郁的丙肝患者进行系列研究,给予舍曲林联合治疗,抑郁症状可迅速缓解且无需减少或中断IFN的用量. Kraus *et al*<sup>[4]</sup>对接受IFN- $\alpha$ 治疗的121例患者进行序列研究,其中14例出现抑郁症状,给予帕罗西汀治疗4 wk,抑郁评分显著降低,78.6%的抑郁患者可按计划完成IFN- $\alpha$ 治疗. 进一步的临床研究, Loftis *et al*<sup>[20]</sup>和Hauser *et al*<sup>[21]</sup>分别对39例丙肝观察:发现85%(11/13)患者对抗抑郁药有反应,治疗末应答率(ETR)和病毒持续应答率(SVR)与对照组比较分别为61.5%/26.9%和38.5%/11.5%. 这些实验结果一致表明,抗抑郁治疗可显著缓解抑郁症状,提高治疗反应性. Dieperink *et al*<sup>[22]</sup>对42例丙肝患者给予IFN和拉咪呋定联合治疗,其中48%的患者在治疗前无抑郁症状,但也给予SSRIs预防性治疗,可显著降低抑郁症的发生,除1例患者外均完成了6 mo的干扰素治疗. Musselman *et al*<sup>[23]</sup>在使用IFN- $\alpha$ 治疗40例黑色素瘤之前2 wk,采用双盲对照实验给予抗抑郁药帕罗西汀或安慰剂,经BDI量表评分结果示:治疗组抑郁症的发生率和严重程度显著低于对照组,因抑郁症停药的人数治疗组占5%,而对照组占35%. 抗抑郁药是多发性硬化症(MS)患者并发抑郁症的常规药物. 为探讨抑郁症与IFN- $\beta$ 治疗MS的关系, Feinstein *et al*<sup>[24]</sup>对42例采用SCID量表评测IFN- $\beta$ 对神经精神的影响,治疗前21.4%的患者有抑郁症,联合应用抗抑郁药在随后

的 3 mo, 6 mo, 12 mo 抑郁症的患病率分别为 17.5%, 11.4%, 6.3%。这些研究提示, IFN 引起的抑郁症一般出现在 IFN 治疗的 2-12 wk, 预防性给予抗抑郁药具有保护作用。抗抑郁药, 尤其是 SSRI 可缓解或逆转 IFN 引起的抑郁症, 从而保证 IFN 抗病毒治疗的顺利进行, 使抗病毒治疗保持较高的和持续的应答率。但何时才是抗抑郁治疗的最佳时期, 是 IFN 治疗过程中出现抑郁症之后, 还是 IFN 治疗之前给予小剂量的抗抑郁药预防? 哪一种成本一效益性最好, 还需进一步大样本的临床观察。非药物的治疗报道较少, 体育锻炼和心理精神支持, 以及认知行为(CBT)可在一定程度上缓解抑郁症状, 及早诊断抑郁症并给予药物治疗可显著缓解症状, 提高治疗效果。

3.2 抗抑郁药物的选择 色氨酸的耗尽和 5-羟色胺的降低是 IFN 引起的抑郁症的主要病原机制, 目前常用的抗抑郁药是 5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), 有文献报道西酞普兰、舍曲林、帕罗西汀、氟西汀在临床治疗 IFN 所引起的抑郁症中取得了良好疗效, 且后二者可预防 IFN 引起的抑郁症, 然而, 并不是所有的抑郁症状对 SSRI 的治疗反应都一致。Capuron *et al*<sup>[9]</sup>对 40 例接受干扰素治疗的黑色素瘤患者随机给予帕罗西汀或安慰剂, 帕罗西汀组的抑郁症状出现较安慰剂组出现的迟, 对改善抑郁、焦虑、认知障碍和慢性疼痛的作用明显优于对厌食、乏力的缓解作用。SSRI 有着较高的安全性和耐受性, 但也有文献报道 SSRI 可引起血小板减少, 增加病毒性肝炎患者或肝功能异常的患者的出血倾向, 这点值得注意。

其他类抗抑郁药也有一定的疗效, 如 Bupropion 是去甲肾上腺素(NE)和多巴胺的再摄取抑制剂, 可减轻 IFN 相关的乏力、精神运动迟缓、认知功能障碍, 还可缓解戒烟症状。由于 IFN 可诱发癫痫, Bupropion 有协同 IFN 诱发癫痫的危险性。Mirtazapine 可增加 5-羟色胺能和 NE 能神经递质的作用, 起效快, 具有抗组胺活性和较强的镇静作用, 可提高食欲有助睡眠, 适于厌食失眠的患者, 极少数会出现粒细胞减少。Venlafaxine(万拉法新)是 5-羟色胺和 NE 的再摄取抑制剂, 是起效最快的抗抑郁药, 副作用于 SSRI 类似, 有升高血压的危险。Nefazodone 是 5-羟色胺再摄取抑制剂及其受体拮抗剂, 具有抗抑郁和焦虑的双重作用, 有引起急性肝功能衰竭的报道。三环类抗抑郁药和单胺氧化酶抑制剂(MAOIs)有抗胆碱能作用和复杂的药物相互作用, 不再是抗抑郁/焦虑的一线药物。中枢神经兴奋药如哌醋甲酯和右旋苯乙丙胺起效时间在数日至 1 wk 内, 可用于治疗难治性抑郁症和精神病, 有诱发高血压、心动过速和肝性脑病的危险。

总之, 干扰素广泛地应用于临床, 取得了一定疗效, 对神经精神方面的毒副影响尤其是抑郁症是很常见的, 发病率为 20-30%, 这严重影响治疗效果和生活质量。外源性 IFN 可降低体内 5-羟色胺水平, 并影响神经内分泌系统和细胞因子的平衡, 这与抑郁症的病理生理机制一致,

给予 SSRI 抗抑郁药可预防并缓解抑郁症状。除了治疗前的精神因素会影响抑郁症的发生, 患者的抑郁病史、滥用药物史、饮酒、年龄与之无明显相关性。IFN 引起抑郁的具体机制不很清楚, 大样本的临床观察研究尚少, 仍需进一步证实其发病机制并提供适宜的治疗方案。建议 IFN 治疗前及治疗过程中对所有患者进行心理评估, 尤其在治疗的 2-15 wk, 以便及时进行抗抑郁治疗。

#### 4 参考文献

- Katze MG, He Y, Gale M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:675-687
- Schaefer M, Schwaiger M, Pich M, Lieb K, Heinz A. Neurotransmitter changes by interferon-alpha and therapeutic implications. *Pharmacopsychiatry* 2003;36(Suppl):S203-206
- Kwant A, Sakic B. Behavioral effects of infection with interferon-gamma adeno-vector. *Behav Brain Res* 2004;151:73-82
- Kraus MR, Schafer A, Faller H, Csef H, Scheurlen M. Psychiatric symptoms in patients with chronic hepatitis C receiving interferon alfa-2b therapy. *J Clin Psychiatry* 2003;64:708-714
- Casassus P, Simon J, Gallais V, Beaudry P, Eclache V, Laroche L, Lortholary P, Raphael M, Guillemin L, Lortholary P. Treatment of adult systemic mastocytosis with interferon-alpha: results of a multicentre phase II trial on 20 patients. *Br J Haematol* 2002;119:1090-1097
- Patten SB, Metz LM. Spectrims study group. Interferon beta1a and depression in secondary progressive MS: data from the Spectrims trial. *Neurology* 2002;59:744-746
- Riddell LA, Pinching AJ, Hill S, Ng TT, Arbe E, Lapham GP, Ash S, Hillman R. A phase III study of recombinant human interferon gamma to prevent opportunistic infections in advanced HIV disease. *Aids Res Hum Retroviruses* 2001;17:789-797
- Lang JP, Meyer N, Doffoel M. Benefits of a preventive psychiatric accompany -ment in patients Hepatitis C Virus seropositive (HCV): prospective study concerning 39 patients. *Encephale* 2003;29:362-365
- Capuron L, Ravaud A, Neveu PJ, Miller AH, Mase M, Dantzer R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Mol Psychiatry* 2002;7:468-473
- Gleason OC, Yates WR, Philipsen MA, Isbell MD, Pollock BG. Plasma levels of citalopram in depressed patients with hepatitis C. *Psychosomatics* 2004;45:29-33
- Valentine AD, Meyers CA, Talpaz M. Treatment of neurotoxic side effects of interferon-alpha with naltrexone. *Cancer Invest* 1995;13:561-566
- Capuron L, Raison CL, Musselman DL, Lawson DH, Nemeroff CB, Miller AH. Association of exaggerated HPA axis response to the initial injection of interferon-alpha with development of depression during interferon-alpha therapy. *Am J Psychiatry* 2003;160:1342-1345
- Loftis JM, Wall JM, Linardatos E, Benvenga S, Hauser P. A quantitative assessment of depression and thyroid dysfunction secondary to interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C. *J Endocrinol Invest* 2004;27:RC16-20
- Taylor JL, Grossberg SE. The effects of interferon-alpha on the production and action of other cytokines. *Semin Oncol* 1998;25:23-29
- Bonaccorso S, Puzella A, Marino V, Pasquini M, Biondi M, Artini M, Algerighi C, Levrero M, Egyed B, Bosmans E, Meltzer HY, Mase M. Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an inter-correlated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive, anxiety symptoms. *Psychiatry Res* 2001;105:45-55
- Sammur S, Bethus I, Goodall G, Muscat R. Antidepressant reversal of interferon-alpha-induced anhedonia. *Physiol Behav* 2002;75:765-772



- 17 De La Garza R, Asnis GM. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium attenuates IFN-alpha induced alterations to monoamine turnover in prefrontal cortex and hippocampus. *Brain Res* 2003;977:70-79
- 18 Levenson JL, Fallon HJ. Fluoxetine treatment of depression caused by interferon- alpha. *Am J Gastroenterol* 1993;88:760-761
- 19 Schramm TM, Lawford BR, Macdonald GA, Cooksley W. Sertraline treatment of interferon-alfa-induced depressive disorder. *Med J Aust* 2000;173:359-361
- 20 Loftis JM, Socherman RE, Howell CD, Whitehead AJ, Hill YA, Dominitz JA, Hauser P. Association of interferon-alpha- induced depression and improved treatment response in patients with hepatitis C. *Neurosci Lett* 2004;365:87-91
- 21 Hauser P, Khosla J, Aurora H, Laurin J, Kling MA, Hill J, Gulati M, Thornton AJ, Schultz RL, Valentine AD, Meyers CA, Howell CD. A prospective study of the incidence and open-label treatment of interferon-induced major depressive disorder in patients with hepatitis C. *Mol Psychiatry* 2002;7:942-947
- 22 Dieperink E, Ho SB, Thuras P, Willenbring ML. A prospective study of neuro- psychiatric symptoms associated with interferon-alpha-2b and ribavirin therapy for patients with chronic hepatitis C. *Psychosomatics* 2003;44:104-112
- 23 Musselman DL, Lawson DH, Gumnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS, Grenier K, Nemeroff CB, Miller AH. Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Engl J Med* 2001;344:961-966
- 24 Feinstein A, O'Connor P, Feinstein K. Multiple sclerosis, interferon beta-1b and depression, A prospective investigation. *J Neurol* 2002;249:815-820
- 25 Maddrey W. Safety of combination interferon alfa-2b/ribavirin therapy in chronic hepatitis C relapsed and treatment naïve patients. *Semin Liver Dis* 1999;19:67-75

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2005年第四次全国幽门螺杆菌学术会议征文通知

**本刊讯** 由中华医学会消化病学分会主办, 湖南省医学会、湖南省医学会消化病学专业委员会承办的第四次全国幽门螺杆菌学术会议定于2005-10月中旬在湖南省长沙市召开, 现将征文通知如下:

### 1 内容

文章内容包括: 幽门螺杆菌流行病学及其他传播途径、幽门螺杆菌的致病机理及其分子机制、幽门螺杆菌相关性疾病的研究、幽门螺杆菌与胃肠道外疾病、幽门螺杆菌与胃癌的研究进展、幽门螺杆菌诊治进展、幽门螺杆菌耐药研究进展。

### 2 论文寄送地址

湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院消化科 袁伟健教授 收; 邮编: 410008. 电话: 0731-4327106, 4327282. 请在信封上注明“全国幽门螺杆菌会议征文”。

## 第十届全国肝癌学术会议征文通知

**本刊讯** 为交流各地肝癌临床和基础研究进展, 进一步提高肝癌的诊疗水平, 中国抗癌协会专业委员会将于2005-09-21/2005-09-23在江西省南昌市举办第十届全国肝癌学术会议, 现将征文范围及要求公布如下:

### 1 征文范围及要求

肝癌相关的病因、流行病学、基础及临床研究论文, 不接纳已发表的论文和综述. 征文应包括全文及500字以内的论文摘要(包括目的、方法、结果、结论), 并加盖负责单位认可的公章。

### 2 论文寄送地址

上海市医学院路136号, 复旦大学肝癌研究所 任正刚 收, 邮编: 200032. 欢迎通过E-mail投稿, E-mail: renzg@zshospital.com 或 zgren@zshospital.net.

# 肠易激综合征患者结肠5-HT的分布特点

姜敏, 凌立平, 傅宝玉

姜敏, 凌立平, 傅宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科  
辽宁省沈阳市 110001

项目负责人: 姜敏, 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. jiang-min@163.com

电话: 024-23256666-6199

收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-11-29

## 摘要

**目的:** 探讨肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者结肠黏膜嗜铬细胞(EC)的分布特点。

**方法:** 符合RomeII诊断标准的IBS患者53例, 腹泻型27例, 便秘型14例, 腹泻与便秘交替型12例; 活动性溃疡性结肠炎(UC)患者5例作为对照。正常对照组12名。组织切片采用免疫组化的方法, 用兔抗人5-HT多克隆抗体, 计数一定范围内EC数量进行定量分析。

**结果:** 直肠-乙状结肠交界部EC明显多于回盲部( $P<0.05$ )。IBS患者直肠-乙状结肠交界部EC明显高于正常对照组( $P<0.05$ ), 其中腹泻型IBS患者EC明显增加( $P<0.01$ )。在活动性溃疡性结肠炎患者, 直肠-乙状结肠交界部可见到EC增加, 但与正常对照组相比较没有统计学意义。

**结论:** IBS患者, 尤其是以腹泻为主的IBS患者, 直肠-乙状结肠交界部EC明显增加。

姜敏, 凌立平, 傅宝玉. 肠易激综合征患者结肠5-HT的分布特点. 世界华人消化杂志 2005;13(4):541-543

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/541.asp>

## 0 引言

IBS是一种与胃肠道动力、神经内分泌以及感觉有关的复杂的疾病。5-HT是调节消化道功能的一种重要的神经递质。在IBS的发病机制研究中已经受到广泛的重视。然而, 还不清楚肠道5-HT系统的改变是否与IBS的病理生理有关。本实验的目的在于探讨IBS患者肠道嗜铬细胞EC的分布, IBS患者较正常对照组是否在分布上、数量上存在差异, 各种不同类型IBS患者EC在分布以及数量上有什么不同, 以探讨5-HT在IBS发病机制以及与IBS的临床症状是否相关。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 符合Rome II诊断标准的IBS患者53例, 男15例, 女38例, 年龄26-65(平均41)岁。其中腹泻型27例; 便秘型14例; 腹泻与便秘交替型12例。发病初期有肠道感染者11例。正常对照组为健康志愿者12名, 男5名, 女7名, 年龄25-58(平均42)岁。活动性溃疡性结肠炎患者

5例, 男2例, 女3例, 年龄范围为25-48(平均37)岁。

**1.2 方法** 均接受结肠镜检查。分别于回盲部距离回盲瓣开口远端3 cm处、距离肛门10 cm直肠-乙状结肠交界处取活检立即放入40 g/L甲醛固定液中, 固定后的标本制成石蜡切片。首先进行HE染色, 判断组织学是否正常, 进一步根据浆细胞、淋巴细胞、嗜酸细胞、中性粒细胞以及在急性炎症时巨噬细胞的浸润程度, 将炎症分为轻、中、重度。EC染色采用兔抗人5-HT多克隆抗体(北京中山生物技术有限公司), 5-HT的染色按S-P免疫组化染色步骤进行。含有5-HT的EC染成黄色, 连续观察5个互不重叠的视野。观察的范围为黏膜层和黏膜下层。放大倍数为10×40倍。取每视野的平均细胞数。

**统计学处理** 所有数据用mean ± SD表示, 各组间采用t检验进行统计学分析。

## 2 结果

光镜下回盲部EC数量均很少(图1), 而直肠-乙状结肠交界部EC分布很多(图2)。在回盲部各组之间EC数量上没有明显差异。在直肠-乙状结肠交界部IBS组与正常对照组相比, EC数明显增加有统计学意义( $P<0.05$  表1)。

活动型溃疡性结肠炎组炎症越明显EC的数量越多, 平均EC数多于正常对照组, 但没有统计学意义。在IBS患者, 腹泻型IBS组直肠-乙状结肠交界部EC明显增加, 与正常对照组相比较有显著差异( $P<0.01$ , 图2)。

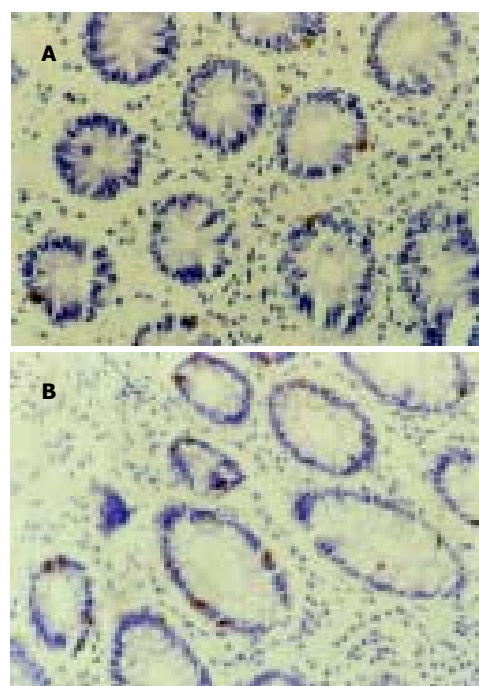
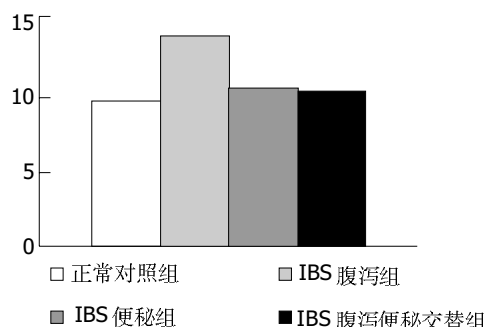


图1 S-P免疫组化染色结果。A: 回盲部EC较少; B: 直-乙状结肠交界部EC较多。S-P×400。

表1 IBS 患者 EC 的数量

分组	回盲部	直 - 乙状结肠交界部
IBS 组	4.49 ± 1.66	16.20 ± 2.28 <sup>a</sup>
UC 组	4.07 ± 0.84	11.00 ± 3.63
正常对照组	4.89 ± 1.64	8.92 ± 4.76

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常对照组.图2 各组 IBS 患者直 - 乙状结肠 EC 数量的比较腹泻组与正常对照组相比较 EC 数量明显增加( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

5-HT 调节肠道的动力<sup>[1-2]</sup>和电解质的转运<sup>[3]</sup>. 外周神经系统的 5-HT 几乎全部由位于胃肠腺腔基底部的 EC 产生、贮存和再摄取<sup>[4]</sup>. 发生于 EC 类癌通常由于分泌过多的 5-HT, 使肠道转运加速和餐后肠道的兴奋性增加而导致临床出现腹泻症状<sup>[5]</sup>. 最近在人类和动物的研究发现, 肠黏膜受刺激使肠道产生蠕动, 反射性的引起 5-HT 的释放, 作用于位于肠黏膜上皮内的 5-HT 受体而起作用<sup>[6-7]</sup>. 另外, 一些临床研究提示, 投与选择性的 5-HT<sub>3</sub> 受体拮抗剂可以使肠道的传输功能减慢, 这种情况不仅出现在健康人, 也可以出现在以腹泻为主的 IBS 患者<sup>[8-9]</sup>. 这些研究结果提示在人类 5-HT 具有调节胃肠动力及改变排便习惯的作用. 我们的研究表明, 在包括 IBS 组和正常对照组所有的实验对象, EC 在肠道的分布特点是, 直肠 - 乙状结肠交界部较回盲部明显增多. 这一研究结果与 Miwa *et al*<sup>[10]</sup>通过高效液相色谱的方法检测到由盲肠到直肠各段肠黏膜组织内 5-HT 的含量逐渐增高, Zhao *et al*<sup>[11]</sup>通过组织化学的方法检测结肠黏膜 EC 的分布, 发现右半结肠较左半结肠 EC 数量明显增加等实验结果相一致. 我们的研究还发现, IBS 组与正常对照组相比较, 虽然回盲部 EC 数量有所增加, 但缺乏统计学意义, 而 IBS 组直肠 - 乙状结肠交界部 EC 细胞明显高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ). El-Salhy *et al*<sup>[12]</sup>也发现在慢传输型便秘患者结肠黏膜的 5-HT 活性细胞高于正常对照组. Koyama *et al*<sup>[13]</sup>认为, EC 如同肠道的机械化学感受器, 当肠道内压力增高, EC 释放 5-HT, 感觉神经传递信息到肌间神经丛促成肠道的蠕动. 已经确定在 IBS 患者存在肠动力异常, 5-HT 可能是 IBS 的病理生理基础. 当然, 导致 IBS 发生的病理生理过程是十分复杂的, 5-HT 只是其中的一个重要因素. 5-HT 在人体内有多种亚型存在, 各种亚型的受体分布广范, 各自的作用机

制尚不十分清楚. 有学者认为 5-HT 在外周神经系统有镇痛作用, 例如使用 5-HT<sub>4</sub> 受体拮抗剂能减轻内脏和皮肤的痛觉<sup>[14]</sup>. 也有学者发现, 服用 5-HT<sub>3</sub> 受体拮抗剂后会使疼痛的阈值明显升高<sup>[15]</sup>. 这些研究都提示 5-HT 参与机体不同类型的伤害性刺激所介导的痛觉反应. 5-HT<sub>4</sub> 受体兴奋后, 在肠道可以促进肠上皮腺体的分泌, 增加肠腔内液体的容量, 导致腹泻和排便次数增加. 最近的研究, 用选择性的 5-HT<sub>3</sub> 受体拮抗剂可以抑制感觉神经的兴奋性, 减慢腹泻型 IBS 患者的肠道传输速度, 从而改善临床症状<sup>[16-17]</sup>. 总之, 5-HT 在 IBS 的发病过程中扮演着重要角色, 对 5-HT 的深入研究可以进一步揭示 IBS 的发病机制, 同时也对 IBS 的预防和治疗有重要意义.

### 4 参考文献

- 1 Foxx-Orenstein AE, Kuemmerle JF, Grider JR. Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea pig intestine. *Gastroenterology* 1996;111:1281-1290
- 2 Appel S, Kumle A, Meier R. Clinical pharmacodynamics of SDZ HTF919: a new 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist, in a model of slow colonic transit. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:546-555
- 3 Sidhu M, Cooke HJ. Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am J Physiol* 1995;269(3 Pt 1):G346-G351
- 4 Furness JB, Costa M. Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: their projection in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 1982;7:341-349
- 5 von der Ohe MR, Camilleri M, Kvols LK, Thomforde GM. Motor dysfunction of the small bowel and colon in patients with the carcinoid syndrome and diarrhea. *N Engl J Med* 1993;329:1073-1078
- 6 Crowell MD. The role of serotonin in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Am J Manag Care* 2001;7(8 Suppl): S252-260
- 7 Grider JR, Kuemmerle JF, Jin JG. 5-HT released by mucosal stimuli initiates peristalsis by activating 5-HT<sub>4</sub>/5-HT<sub>1p</sub> receptors on sensory CGRP neurons. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1):G778-G782
- 8 Steadman CJ, Talley NJ, Phillips SF, Zinsmeister AR. Selective 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonism with ondansetron as treatment for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1992;67:732-738
- 9 Prior A, Read NW. Reduction of rectal sensitivity and postprandial motility by granisetron, a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1993;7:175-180
- 10 Miwa J, Echizen H, Masueda K, Umeda N. Patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome (IBS) may have elevated serotonin concentrations in colonic mucosa as compared with diarrhea-predominant patients and subjects with normal bowel habits. *Digestion* 2001;63:188-194
- 11 Zhao R, Baig MK, Wexner SD, Chen W, Singh JJ, Noguera JJ, Woodhouse S. Enterochromaffin and serotonin cells are abnormal for patients with colonic inertia. *Dis Colon Rectum* 2000;43:858-863
- 12 El-Salhy M, Norrgard O, Spinnell S. Abnormal colonic endocrine cells in patients with chronic idiopathic slow-transit constipation. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:1007-1011
- 13 Koyama E, Minegishi A, Ishizaki T. Simultaneous determination of four monoamine metabolites and serotonin in cerebrospinal fluid by 'high-performance' liquid chromatography with electrochemical detection: Application for patients with Alzheimer's disease. *Clin Chem* 1988;34:680-684
- 14 Espejo EF, Gil E. Antagonism of peripheral 5-HT<sub>4</sub> receptors

- reduces visceral and cutaneous pain in mice, and induces visceral analgesia after simultaneous inactivation of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Brain Res* 1998;788:20-24
- 15 Kozlowski CM, Green A, Grundy D, Boissonade FM, Bountra C. The 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist alosetron inhibits the colorectal distention induced depressor response and spinal c-fos expression in the anesthetised rat. *Gut* 2000;46:474-480
- 16 Delvaux M, Louvel D, Mamet JP, Campos-Oriola R, Frexinos J. Effect of alosetron on responses to colonic distension in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:849-855
- 17 Viramonts BE, Camilleri M, McKinzie S, Pardi DS, Burton D, Thomforde GM. Gender related differences in slowing colonic transit by a 5-HT<sub>3</sub> antagonist in subjects with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2001;92:2671-2676

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## ntPCR-RFLP 检测 HBV 阿德福韦耐药变异-rtN236T 变异

闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴钊

闫杰, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴钊, 北京地坛医院五病区 北京市 100011  
冯鑫, 宋淑静, 北京地坛医院病毒研究室 北京市 100011  
王磊, 山东大学医学院济南市传染病医院四病区 山东省济南市 250021  
首都医学发展科研基金, No. 2002-3046  
山东省卫生厅计划项目, No. 2001CA1CAA11  
项目负责人: 闫杰, 100011, 北京市安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院五病区. jieyan@bnn.cn  
电话: 010-64211031-2330 传真: 010-64281540  
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-11-29

### 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-rtN236T 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(rt236N)PCR 产物中含有 DraI 酶切位点(5' TTTAAA3'), 而变异株(rt236T)无此限制性酶切位点。同时 PCR 扩增 2 份已行 HBV RT 区基因测序证实未出现 rtN236T 变异的慢性乙型肝炎患者血清及自行构建的对照质粒, 扩增产物经 DraI 酶切, 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析。

**结果:** 所建立的 ntPCR-RFLP 方法灵敏度高, 可以检测到 10<sup>6</sup>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:** ntPCR-RFLP 方法灵敏、特异、简便、实用, 适用于 ADV 耐药变异的临床监测工作。

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(4):543-545  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/543.asp>

### 0 引言

阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)是由美国 Gilead Science 公司开发的新型核苷类抗乙型肝炎病毒(hepatitis B, virus HBV)药物, 已在国外进行了 II、III 期临床试验<sup>[1-2]</sup>, 并已获美国 FDA 批准上市<sup>[3]</sup>. 我国药品监督管理局于 2000-12 批准该药在中国进行临床试验, 目前, I 期临床试验已结束, II 期临床试验也已在 2002-12 正式启动. 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<sup>[1-2, 4]</sup>. 但随之出现 ADV 耐药变异株为 HBV rtN236T 变异<sup>[5-6]</sup>. 为此, 我们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)的快速检测方法, 以便对该耐药变异进行监测, 指导临床合理用药。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 两份慢性乙型肝炎患者血清取自北京地坛医院就诊患者, 为拉米夫定治疗前保留血清(标本号 216, 393). 其 HBV RT 区基因序列已采用 PCR 产物直接测序方法进行检测, 结果表明未出现 rtN236T 变异(测序结果已提交至 GenBank, accession number: AY762898、AY762900). 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

- reduces visceral and cutaneous pain in mice, and induces visceral analgesia after simultaneous inactivation of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Brain Res* 1998;788:20-24
- 15 Kozlowski CM, Green A, Grundy D, Boissonade FM, Bountra C. The 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist alosetron inhibits the colorectal distention induced depressor response and spinal c-fos expression in the anesthetised rat. *Gut* 2000;46:474-480
- 16 Delvaux M, Louvel D, Mamet JP, Campos-Oriola R, Frexinos J. Effect of alosetron on responses to colonic distension in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:849-855
- 17 Viramonts BE, Camilleri M, McKinzie S, Pardi DS, Burton D, Thomforde GM. Gender related differences in slowing colonic transit by a 5-HT<sub>3</sub> antagonist in subjects with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2001;92:2671-2676

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## ntPCR-RFLP 检测 HBV 阿德福韦耐药变异-rtN236T 变异

闫杰, 冯鑫, 王磊, 宋淑静, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴钊

闫杰, 谢雯, 欧蔚妮, 李蕴钊, 北京地坛医院五病区 北京市 100011  
冯鑫, 宋淑静, 北京地坛医院病毒研究室 北京市 100011  
王磊, 山东大学医学院济南市传染病医院四病区 山东省济南市 250021  
首都医学发展科研基金, No. 2002-3046  
山东省卫生厅计划项目, No. 2001CA1CAA11  
项目负责人: 闫杰, 100011, 北京市安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院五病区. jieyan@bnn.cn  
电话: 010-64211031-2330 传真: 010-64281540  
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-11-29

### 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-rtN236T 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(rt236N)PCR 产物中含有 DraI 酶切位点(5' TTTAAA3'), 而变异株(rt236T)无此限制性酶切位点。同时 PCR 扩增 2 份已行 HBV RT 区基因测序证实未出现 rtN236T 变异的慢性乙型肝炎患者血清及自行构建的对照质粒, 扩增产物经 DraI 酶切, 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析。

**结果:** 所建立的 ntPCR-RFLP 方法灵敏度高, 可以检测到 10<sup>6</sup> 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:** ntPCR-RFLP 方法灵敏、特异、简便、实用, 适用于 ADV 耐药变异的临床监测工作。

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(4):543-545  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/543.asp>

### 0 引言

阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)是由美国 Gilead Science 公司开发的新型核苷类抗乙型肝炎病毒(hepatitis B, virus HBV)药物, 已在国外进行了 II、III 期临床试验<sup>[1-2]</sup>, 并已获美国 FDA 批准上市<sup>[3]</sup>. 我国药品监督管理局于 2000-12 批准该药在中国进行临床试验, 目前, I 期临床试验已结束, II 期临床试验也已在 2002-12 正式启动. 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<sup>[1-2, 4]</sup>. 但随之出现 ADV 耐药变异株为 HBV rtN236T 变异<sup>[5-6]</sup>. 为此, 我们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)的快速检测方法, 以便对该耐药变异进行监测, 指导临床合理用药。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 两份慢性乙型肝炎患者血清取自北京地坛医院就诊患者, 为拉米夫定治疗前保留血清(标本号 216, 393). 其 HBV RT 区基因序列已采用 PCR 产物直接测序方法进行检测, 结果表明未出现 rtN236T 变异(测序结果已提交至 GenBank, accession number: AY762898、AY762900). 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  $\mu$ L, 13 000  $g$  离心 10 min, 弃上清, 室温干燥后加入双蒸水 20  $\mu$ L 溶解,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存.

**1.2 方法** rtN236T 变异是由于 HBV 基因组第 836 碱基由腺嘌呤 (A) 突变为胞嘧啶 (C), 从而导致 HBV 聚合酶 D 区 rt236 氨基酸由天冬酰胺 (asparagine, N) 变异为苏氨酸 (threonine, T) (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: ADVup1, ADVlow); 旨在使野生株 (rt236N) PCR 产物中含有 *Dra*I 酶切位点 (5' TTTAAA3'), 而变异株 (rt236T) 无此限制性酶切位点 (图 1, 表 1). 以血清提取物为模板进行 PCR 扩增, 野生型对照质粒以 ADVup1 和 ADVlow 为引物, 变异型以 ADVup2 和 ADVlow 为引物, 从而将碱基突变引入变异型对照质粒 (表 1). 将 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. PCR 鉴定阳性克隆后, LB 培养液中培养并提取质粒, 应用双脱氧末端终止法进行序列测定 (由北京三博远志生物技术公司完成). 巢式 PCR 反应 30  $\mu$ L PCR 反应体系含 Taq 酶 1U,  $10\times$  扩增缓冲液 3  $\mu$ L, 25 mol/L dNTP 0.12  $\mu$ L、50  $\mu$ mol/L 引物 0.12  $\mu$ L; 第一轮 PCR 模板为血清提取物 6  $\mu$ L, 引物为 P1, P2; 第二轮 PCR 模板为第一轮 PCR 产物 3  $\mu$ L, 引物为 ADVup1, ADVlow. 两轮 PCR 循环温度条件均为  $94^{\circ}\text{C}$  3 min,  $94^{\circ}\text{C}$  10 s,  $53^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 30 循环,  $72^{\circ}\text{C}$  7 min. 对照质粒 1:50 稀释后按上述步骤进行第二轮 PCR. 取第二轮 PCR 产物 8  $\mu$ L, 以 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后于紫外灯下观察结果, 于 304 bp 处出现荧光条带者为阳性. 限制性内切酶酶切 10  $\mu$ L 酶切反应体系内含第二轮 PCR 产物 8.5  $\mu$ L, *Dra*I 10U, 酶切缓冲液 1.5  $\mu$ L, 于  $37^{\circ}\text{C}$  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 19 bp, 故电泳速度稍快, 将标本同对照质粒相比较即可判定是否变异.

rt aa seq 229-	L	S	L	G	I	H	L	N	P
Nt seq 814-	<u>TTG</u>	<u>TCT</u>	<u>TTG</u>	<u>GGT</u>	<u>ATA</u>	<u>CAT</u>	<u>TTA</u>	<u>AAC</u>	<u>CCT</u>
	ADVup1 primer								
	H	L	M	P					
(wild) rt236N	CAT	TTA	AAC	CCT					
	Dir I site								
	H	L	T	P					
(mutant)rt236T	CAT	TTA	ACC	CCT					
	no Dra I site								

图 1 PCR-RFLP 检测 rtN236T 变异的设计.

表 1 PCR 引物序列

引物	nt	序列
P1	105-122	5' CCTCACCCATATCGTCAA3'
P2	1255-1238	5' CCTCACCCATATCGTCAA3'
ADVup1	815-835	5' TGTCTTTGGGTATACATTAA3'
ADMow	1103-1118	5' AAGGCCTTGTAAGTTG3'
ADVup2	815-838	5' TGTCTTTGGGTATACATTAAACCC3'

## 2 结果

对照质粒序列测定结果与预期结果一致, 表明对照质粒构建成功 (图 2). 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  $10^6$  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, 为 304 bp (图 3), 且 PCR 产物克隆 (即野生型对照质粒) 测序结果与此前所测得的 HBV RT 区基因序列之间的核苷酸同源性为 97.5%, 表明该巢式 PCR 反应具有高度特异性. RFLP 分析 *Dra*I 酶切后电泳结果显示, 两血清标本与野生型对照质粒的巢式 PCR 产物均被完全酶切, 而变异型对照质粒未被酶切 (图 4); 该结果与 DNA 序列测定结果一致.

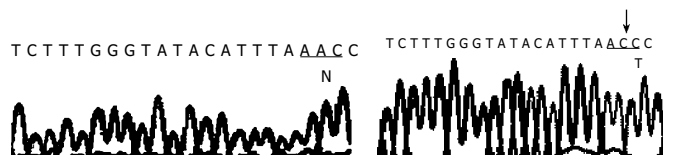


图 2 对照质粒测序结果. W: 野生型对照质粒; A: 野生型对照质粒 (nt: AAC, aa: N); B: 变异型对照质粒 (nt: ACC, aa: T).

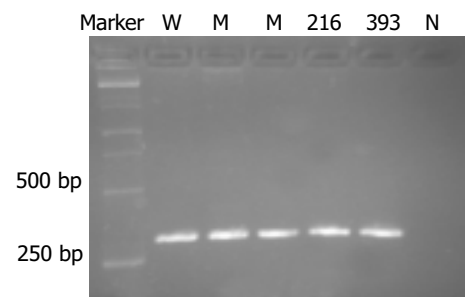


图 3 PCR 产物电泳结果. W: 野生型对照质粒; M: 变异型对照质粒; 216、393: 血清标本; N: 空白对照; DGL2000 DNA Marker.

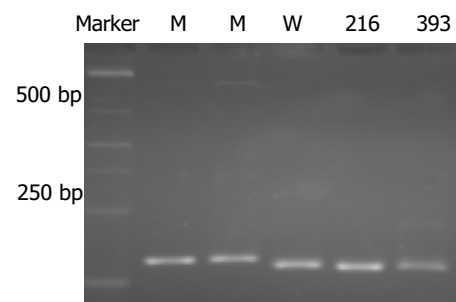


图 4 *Dra*I 酶切产物电泳结果. M: 变异型对照质粒; 216、393: 血清标本; N: 空白对照; DGL2000 DNA Marker.

## 3 讨论

时至今日慢性 HBV 感染仍是一个全球性的难题, 全世界约有 3.5 亿人感染, 与之相关的年死亡人数约为 1 200 000<sup>[7]</sup>. 因此针对 HBV 的抗病毒治疗受到广泛重视. 随着对 HBV 聚合酶的结构和功能的深入认识, 一些有效抑制 HBV DNA 复制的核苷类药物 (如: 拉米夫定、ADV) 逐步成为抗 HBV

治疗的新选择<sup>[8-9]</sup>。由于HBV聚合酶如同其他逆转录病毒的逆转录酶一样具有较高的错配倾向且缺乏校对能力,因此随着感染的持续病毒准种逐年增多<sup>[10-11]</sup>。在核苷类药物的选择压力下,耐药变异株将逐渐增多,最终替代野生株成为优势株,从而导致临床耐药现象的出现。多个研究中心相继报道rtN236T变异与ADV耐药有关,并在体外实验中证实该变异可显著降低HBV对ADV的敏感性<sup>[5-6, 12-13]</sup>。

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,为此亟待建立一种简便、快速的rtN236T变异检测方法<sup>[14]</sup>。

基于ntPCR-RFLP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<sup>[15-18]</sup>;因此我们再次选择该技术用以构建rtN236T变异检测方法。为提高PCR扩增效率,在引物设计时选择我国常见基因型-B型和C型<sup>[19-22]</sup>为模板。为降低成本和方便操作,在RFLP分析过程中选用30 g/L琼脂糖凝胶电泳,而未使用分辨率高但价格较贵、操作繁琐的聚丙烯酰胺凝胶电泳。该方法更符合我国现状且经济、简便、实用,以便在国内推广,建立全国性的完善的ADV耐药监测体系。

#### 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 438 Study Group. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e 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 437 Study Group. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003;348:808-816
- 3 黄世杰. FDA 批准阿德福韦治疗乙型肝炎. 国外医学. 药学分册 2003;30:63
- 4 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; Behalf of the Adefovir Dipivoxil Study 435 International Investigators Group. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology* 2003;38:1419-1427
- 5 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
- 6 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
- 7 Lok AS. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002;346:1682-1683
- 8 De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 2004;30:115-133
- 9 Humphries JC, Dixon JS. Antivirals for the treatment of chronic hepatitis B: current and future options. *Intervirology* 2003;46:413-420
- 10 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 11 Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702-707
- 12 Bartholomeusz A, Tehan BG, Chalmers DK. Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations. *Antivir Ther* 2004;9:149-160
- 13 Yadav V, Chu CK. Molecular mechanisms of adefovir sensitivity and resistance in HBV polymerase mutants: a molecular dynamics study. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:4313-4317
- 14 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
- 15 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
- 16 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
- 17 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
- 18 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 a随访结果. 中华传染病杂志 2004;22:204-206
- 19 许军, 王齐欣, 范春蕾, 蒋栋, 李若冰, 丛旭, 费然, 陈红松, 魏来, 王宇. 中国南北两城市乙型肝炎病毒基因型与血清型的构成差异. 中华实验和临床病毒学杂志 2003;17:327-329
- 20 杨洁, 戴琳, 郭亚兵, 杨守昌, 王燕军, 骆抗先. 应用多重PCR法对广东地区HBV进行基因型(A-F)分型. 第一军医大学学报 2002;22:707-709
- 21 葛宪民, 李丹亚, 方钟燎, 黄果勇, 江世强, 潘海东, 杜岩, 王超英, 丁欣, 沟上雅史. 广西乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2003;17:174-179
- 22 宋淑静, 何忠平, 庄辉, 闫杰, 董庆鸣. 中国北方5城市慢性乙型肝炎患者的基因型. 中国公共卫生 2004;20:166-167

编辑 潘伯荣 审读 张海宁



# 外周血恶性肿瘤相关物质群诊断食管癌的价值

王军业, 戴淑琴, 戎铁华, 龙浩, 陈巧伦, 王春梅

王军业, 戎铁华, 龙浩, 王春梅, 中山大学肿瘤防治中心胸科  
广东省广州市 510060  
戴淑琴, 陈巧伦, 中山大学肿瘤防治中心检验科 广东省广州市 510060  
国家科技攻关计划课题, No. 2001BA703B05  
广东省自然科学基金项目, No. 04300288  
项目负责人: 戴淑琴, 510060, 广东省广州市东风东路651号, 中山大学肿瘤防治中心. dsqin@yeah.net  
电话: 020-88288096 传真: 020-87343438  
收稿日期: 2004-09-23 接受日期: 2004-11-04

## 摘要

**目的:** 系统评估初诊食管癌患者恶性肿瘤相关物质 TSGF 检测的价值.

**方法:** 检测健康人 400 例, 食管癌患者 148 例, 利用化学比色法检测恶性肿瘤相关物质群(TSGF)的表达;同时用微粒子酶免疫分析(MEIA)技术与双抗体夹心法分别检测 CEA, SCC-Ag.

**结果:** 食管癌患者 TSGF 表达( $66.0 \pm 40.3$ )明显高于健康人( $53.6 \pm 8.0$ )( $P = 0.000$ ), 灵敏度 0.404, 特异度 0.940, Youden 指数 0.539, Roc 曲线下面积为 0.761. 食管癌患者 TSGF 阳性率(37.2%)明显高于 CEA(12.4%)、SCC(13.7%), 差异显著( $P = 0.000$ ); TSGF 与 CEA, SCC 间相关无统计学意义( $P > 0.05$ ). 食管癌患者 TSGF 阳性率明显高于 CEA + SCC 联合检测的阳性率(27.70%,  $P = 0.036$ ); 而 TSGF 与 TSGF + CEA, TSGF + SCC 联合检测的阳性率相近( $P > 0.05$ ); 3 种指标联合检测的阳性率(52.0%)明显优于单纯检测 TSGF ( $P = 0.027$ ). 与肿瘤部位、肿瘤长度、T 分期、N 分期、临床分期、病理类型和分化程度无明显相关性( $P > 0.05$ ).

**结论:** TSGF 对食管癌患者具有一定的辨别价值, 对食管癌筛查和早期诊断有一定的应用价值;联合检测 CEA, SCC 可提高检测效率.

王军业, 戴淑琴, 戎铁华, 龙浩, 陈巧伦, 王春梅. 外周血恶性肿瘤相关物质群诊断食管癌的价值. 世界华人消化杂志 2005;13(4):546-547  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/546.asp>

## 0 引言

恶性肿瘤相关物质(tumor supplied group of factors, TSGF)是我国首个获国家批准上市的第一类癌症体外标记物, 国外还未见此类报道. 是有恶性肿瘤细胞产生的一种特殊物质, 在肿瘤形成早期即明显增高, 并随肿瘤组织的生长不断释放入血并达到一定浓度, 能促进肿瘤形成、生长、扩散. 具有高度特异性和敏感性<sup>[1-2]</sup>, 近年来在国内多家医院已经采用, 但应用于食管癌方面的研究尚少, 效果评价未统一, 存在争议, 而且有关报道的文献不多, 难以系统评估在食管癌诊断中的应用价值. 我们采用大样本系统评估其在食管癌中活性表达的意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2001-10/2003-01 中山大学肿瘤医院初治食管癌手术病例 148 例. 均经病理学确诊, 无严重心、肝、肾、肺等重要脏器疾病, 未曾接受放化疗, 无合并感染和严重创伤. 男 112 例, 女 36 例, 年龄 35-81 (平均 58 岁), 胸上段 19 例, 胸中段 84 例, 胸下段 45 例, 肿瘤长度  $< 3$  cm 31 例,  $\geq 3$  cm  $< 6$  cm 88 例,  $\geq 6$  cm 29 例, T<sub>1</sub> 12 例, T<sub>2</sub> 29, T<sub>3</sub> 90, T<sub>4</sub> 17, N<sub>0</sub> 70, N<sub>1</sub> 78, 临床分期 I 10, II<sub>A</sub> 54, II<sub>B</sub> 11, III 61, IV 12, 鳞癌 123, 腺癌 25, 组织分化程度 I 级 35, II 68, III 45. 选取同期本院健康医务人员 400 名作正常人对照.

**1.2 方法** 采用福建新大陆生物技术有限公司生产的 TSGF 试剂盒. 批准号: 国药试字(2000)D-15. 用化学比色法测定. 抽静脉血 2 mL, 离心取血清备用, 按试剂盒说明书进行测定, 严格规范操作, 待测血清 40  $\mu$ L 加入盛有 1.0 mL 试剂的反应管中, 置沸水浴锅中 15 min, 迅速取出并置低于 25℃ 室温冷水冷却 5 min, 在 470 nm 波长处比色测定吸光度, 查标准曲线, 求出相应的 TSGF 含量(ku/mL). 参考数值: TSGF 水平  $> 64$  ku/mL 为阳性. SCC 检测仪器为 IMX-全自动快速免疫分析仪. 实验方法是微粒子酶免疫分析(MEIA)技术. IMx SCC 试剂、定标液和质控液购自 Abbott 公司. 参考数值: 95% 的健康人的 SCC 抗原低于 1.5  $\mu$ g/L. CEA 的测定仪器为罗氏电化发光全自动免疫分析仪 Elecsys2010. CEA 试剂盒购自 Roche 试剂公司(德国). 实验方法选用双抗体夹心法. 参考数值: 95% 健康人 CEA  $\leq 5.0$   $\mu$ g/L.

**统计学处理** 使用 SPSS11.0 For Windows 统计软件. 评估食管癌患者与健康人 TSGF 活性的差异采用  $\chi^2$  检验; 食管癌患者 TSGF 活性的效率选用灵敏度、特异度、Youden 指数、ROC 曲线下面积; 食管癌患者 TSGF 活性表达与 CEA、SCC 的差异采用  $\chi^2$  检验、双变量相关分析; TSGF 活性与临床资料的差异分别采用双变量相关分析.

## 2 结果

**2.1 外周血 TSGF 的表达** 食管癌患者阳性率 37.2%, 灵敏度 0.404, 特异度 0.940, Youden 指数 0.539, ROC 曲线下面积 0.761. 显示健康人与食管癌患者之间 TSGF 含量有显著差异, 食管癌患者其外周血 TSGF 的阳性率明显高于健康人( $53.6 \pm 8.0$  vs  $66.0 \pm 40.3$ ,  $P < 0.001$ ).

**2.2 TSGF 表达与 CEA, SCC 比较** 食管癌患者外周血 TSGF 阳性率明显优于 CEA, SCC 的阳性率, 差异显著(37.2% vs 12.4%, 13.7%,  $P = 0.000$ ); 食管癌患者外周血 TSGF 与 CEA、SCC 间相关无统计学意义( $P > 0.05$ ).

**2.3 TSGF, CEA, SCC 联合检测的价值** 食管癌患者,

TSGF 阳性率明显优于 CEA+SCC 联合检测的阳性率 (37.2% vs 27.7%,  $P = 0.036$ ); 而与 TSGF+CEA (46.0%)、TSGF+SCC (46.6%) 联合检测的阳性率相近 ( $P > 0.05$ ); 3 种指标联合检测的阳性率 (52.0%) 明显优于单纯检测外周血 TSGF ( $P = 0.027$ ).

2.4 与临床资料的关系 食管癌 TSGF 与部位、肿瘤长度、TN 分期、临床分期、病理分化程度之间行相关分析, 相关无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). Pearson 相关系数分别为 0.088, 0.102, 0.042, 0.726, -0.036 和 0.002.

### 3 讨论

食管癌早期诊断是根治和获得长期生存最有效的方法. 寻找敏感、特异的食管癌诊断指标是当前研究的一个重要课题. TSGF 是由恶性肿瘤细胞产生的一种特殊物质, 国内报道其在恶性肿瘤中的敏感性为 63.9–87.0%<sup>[3–7]</sup>, 因此, 经专家鉴定 TSGF 可作为恶性肿瘤早期诊断的生物学性质标记物. 其在食管癌中的敏感性为 46.2–87.5%<sup>[8–12]</sup>, 但关于食管癌方面的文献少, 且病例数少, 难以系统评估该指标在食管癌诊断中的价值. 我们选用 148 例未经治疗的食管癌患者, 选取同期本院健康医务人员 400 名体检作正常对照. 结果 148 例食管癌患者 TSGF 均值明显高于健康人, 差异有显著性 ( $P = 0.000$ ), 阳性率 37.2%, 灵敏度 0.404, 特异度 0.940, Youden 指数 0.539, Roc 曲线下面积为 0.761 ( $> 0.5$  但  $< 1.0$ ). 经大样本系统评估, 外周血 TSGF 检测对食管癌患者具有一定的辨别价值, 在食管癌高危人群中进行 TSGF 检测, 对食管癌的筛查和早期诊断有一定价值, 为其用于食管癌的诊断与监测提供了理论依据.

癌胚抗原 (CEA) 在成人胃肠、肺、乳腺等腺癌组织中均有表达. 鳞状上皮细胞癌相关抗原 (SCC-Ag) 对肿瘤诊断、疗效观察、复发监测和预后判断等均有实用价值. 这两种标志物在食管癌中的敏感性分别为 CEA 11.4–17.0%, SCC 26.8–50.0%<sup>[13–15]</sup>. 本组 148 例食管癌中, 其敏感性分别为 CEA 12.40%, SCC 13.70%, 远低于 TSGF 值 37.2% 的敏感性 ( $P = 0.000$ ). SCC、CEA 与 TSGF 值间无明显相关性 ( $P > 0.05$ ). 单纯检测 TSGF 优于 CEA+SCC (37.2% 与 27.7%,  $P = 0.036$ ). 从而进一步说明 TSGF 检测在食管癌患者中具有更高的诊断效率, 明显优于 CEA 与 SCC. TSGF 联合 CEA 检测能进一步提高诊断效率.

敏感、特异的肿瘤标记物多与肿瘤的分期与病理分化程度密切相关, 因此可以进行病情的监测与预后评估. 多位学者报道 TSGF 值与肿瘤 T 分期、N 分期、临床分期、病理分化程度等相关<sup>[4, 7]</sup>. 我们证实食管癌 TSGF 值与以上因素均无明显相关性 ( $P > 0.05$ ), 相关无统计意义. 说明 TSGF 在食管癌中有一定的应用局限性, 并非为一个完美的肿瘤标记物.

### 4 参考文献

- 1 Baccala AA, Zhong H, Clift SM, Nelson WG, Marshall FF, Passe TJ, Gambill NB, Simons JW. Serum Vascular endothelial growth factor is a candidate biomarker of metastatic tumor response to ex vivo gene therapy of renal cell cancer. *Urology* 1998;51:327-332
- 2 Mineta H, Miura K, Ogino T, Takebayashi S, Misawa K, Ueda Y, Suzuki I, Dictor M, Borg A, Wennerberg J. Prognostic value of Vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 2000; 83:775-781
- 3 杨晓飞, 何明鑫, 安邦全, 罗勇, 黄小兵. 恶性肿瘤特异性生长因子在消化系统恶性肿瘤诊断中的价值. *贵州医药* 2001;25:116-118
- 4 周馨竹, 闻洪丽, 姜长杰, 吴国新. 血清中肿瘤特异生长因子检测的临床应用. *齐齐哈尔医学院学报* 2002;23:747-748
- 5 张杰, 李红梅, 亢国英. 血清恶性肿瘤特异性生长因子测定及其临床应用. *中国肿瘤* 2002;11:545-546
- 6 李小亮, 孙达春. 血清肿瘤标志物检测对恶性肿瘤诊断及监测的临床意义. *肿瘤研究与临床* 2002;14:162-164
- 7 王璐, 浦春, 叶晓兵, 程静. 恶性肿瘤患者血清 TSGF 测定及其临床意义. *中国肿瘤临床与康复* 2001;8:4-5
- 8 梁伊仁, 万德森, 陈功, 卢震海, 李幼娟, 林月好, 池沛冬. 恶性肿瘤相关物质群 (TSGF) 的测定及临床应用评价. *癌症* 2002;21:1251-1253
- 9 黄昭穗, 陈志忠, 刘开渊, 黄春红, 欧阳万青, 黄海溶. 恶性肿瘤特异性生长因子检测在肿瘤诊断中的应用. *福建医药杂志* 2001;23:45-46
- 10 杨春莺, 汤冰, 吴立坚, 谢志淳. TSGF 对恶性肿瘤诊断与治疗检测的意义探讨. *福建医药杂志* 2001;23:112-113
- 11 高杨, 刘延红, 夏洪印, 何维敬, 张兰. 食管癌血清肿瘤标志物诊断价值的研究. *山东医药* 2001;41:5-7
- 12 刘云, 钱同胜. TSGF 在胃癌与食管癌诊断中的应用. *镇江医学院学报* 2000;10:722-723
- 13 Brockmann JG, St Nottberg H, Glodny B, Sprakel B, Senninger N. Analysis of serum CYFRA 21-1 concentrations in patients with esophageal cancer. *Anticancer Res* 2000;20:4899-4904
- 14 Mealy K, Feely J, Reid I, McSweeney J, Walsh T, Hennessy TP. Tumour marker detection in oesophageal carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 1996;22:505-507
- 15 Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T. Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000;89:1677-1683

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞增生及 DNA 合成的影响

安家泽, 董宏林, 窦科峰

安家泽, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科  
陕西省西安市 710032  
董宏林, 山西医科大学第二医院肝胆外科 山西省太原市 030001  
项目负责人: 安家泽, 710032, 陕西省西安市长乐西路17号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科. anchen@fmmu.edu.cn  
电话: 029-83375259  
收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-01-08

## 摘要

**目的:** 探讨抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞的抑制作用。

**方法:** 利用脂质体介导法将真核表达载体 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 基因导入肝癌细胞株 HHCC 细胞中, 经 G418 筛选获得稳定表达的细胞克隆, 用 MTT、<sup>3</sup>H-TdR 掺入法和克隆形成实验观察抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞增生及 DNA 合成的影响, 电子显微镜技术探讨过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 抑制肝癌细胞生长的可能机制。

**结果:** 抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞增生及 DNA 合成均有明显抑制作用, 抑制率达 56% ( $P < 0.01$  vs 转染空载体组), 电镜结果显示肝癌细胞发生凋亡。

**结论:** 抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 可能通过诱导肝癌细胞凋亡抑制肝癌细胞生长。

安家泽, 董宏林, 窦科峰. 抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞增生及 DNA 合成的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(4):548-550  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/548.asp>

## 0 引言

p27<sup>Kip1</sup> 是在转化生长因子 (TGF- $\beta$ ) 处理的生长抑制细胞及接触生长抑制的细胞株中, 发现的一种相对分子质量 ( $M_r$ ) 为 27 000 的耐热细胞周期抑制蛋白<sup>[1]</sup>. p27<sup>Kip1</sup> 作为一种调控细胞周期的枢纽蛋白, 可以多种方式调节肿瘤细胞的增生或凋亡. 近年研究发现, p27<sup>Kip1</sup> 基因及其产物对于细胞的生长有着极其重要的调控作用, 是一种潜在的抑癌基因, 因此他的抗癌机制成为生物医学领域重要的研究课题. 我们研究采用体外细胞培养法, 结合细胞转染、MTT、<sup>3</sup>H-TdR 掺入法和克隆形成实验、电子显微镜等研究 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌细胞株 HHCC 细胞增生的抑制作用及其可能的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞 HHCC 为第四军医大学病理教研室张传山博士惠赠. 插有正向 p27<sup>Kip1</sup> cDNA 的 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 真核表达载体、pcDNA3.1/Myc-His(+)-C 空载体、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本教研室保存. LipofectAM

INE-2000 转染试剂盒和 G418, 为美国 Gibco 公司产品. 带 myc 标签抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗为北京中山公司产品. <sup>3</sup>H-TdR 购于中国原子能研究院

## 1.2 方法

**1.2.1 基因转染和细胞克隆筛选** 用脂质体将 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 转染 HHCC 细胞, 并设转染空载体和不转染的 HHCC 细胞做对照. 48 h 后换用含 G418 (600 mg/L) 的 RPMI1640 培养液继续培养. 约 14 d 左右未转染的细胞对照全部死亡, 待转染的细胞大多数死亡时, 收集 G418 抗性的细胞克隆, 扩大培养。

**1.2.2 Western blot 检测 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白** 配制 6% 的浓缩胶和 12% 的分离胶, 按 Bio-Rad 公司蛋白电泳系统的说明书进行 SDS-PAGE. 电泳后再电转印于硝酸纤维素膜上, 加一抗于 37℃ 孵育 30 min, 缓冲液冲洗; 再加辣根过氧化物酶标记的二抗于 37℃ 孵育 30 min, 以化学发光法显色拍照。

**1.2.3 转染细胞的克隆化** 将 G418 抗性的克隆消化并用培养液吹散, 准确计数后, 系列稀释至每 mL 含有 10 个细胞, 加入到 96 孔培养板中 (100  $\mu$ L/孔), 6 d 后, 观察并计数单克隆细胞孔, 取单克隆孔细胞用 Western blot 检测 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达. 连续多次克隆化, 直至所有的单克隆孔都出现 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白染色阳性。

**1.2.4 MTT 试验** 取生长状态良好的对数生长期细胞, 常规消化、计数及测定细胞活力, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 调整细胞浓度为  $3 \times 10^7$ /L, 按 200  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板, 于 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 分别设置组 I: 空白对照; 组 II: 转 pcDNA3.1/Myc-His(+)-C 空载体; 组 III: 转 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 真核表达载体; 每组设置 24 个复孔, 每天检测 1 次, 每次 3 个复孔, 连续测量 8 d, 每孔测量前 4 h 加 MTT 20  $\mu$ L/孔 (5 g/L), 继续培养后弃去培养基, 加二甲亚砜 100  $\mu$ L/孔, 微型震荡器震荡 15 min, 在 490 nm 波长下用酶联免疫仪测定  $A_{490nm}$  值。

**1.2.5 <sup>3</sup>H-TdR 掺入实验** 取对数生长期的肝癌细胞, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 调整细胞浓度为  $2.5 \times 10^7$ /L, 按 200  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板, 于 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 60 h, 每孔加入 18.5 kBq (20  $\mu$ L) <sup>3</sup>H-TdR, 分别设置组 I: 空白对照; 组 II: 转 pcDNA3.1/Myc-His(+)-C 空载体; 组 III: 转 pcDNA3.1/Myc-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 真核表达载体; 每组设置 3 个复孔, 继续培养 12 h 吸去培养基, 胰酶消化细胞, 用 ZT-III 型多孔细胞样品收集器收集细胞于 999 型纤维膜上, 红外线烤干加闪烁液, 于 Beckman LS-6500 液闪计数仪上计数。

**1.2.6 软琼脂克隆形成实验** 将p27<sup>Kip1</sup> 转染组、空载体转染组和未转染组细胞以每组 600 个细胞接种于 60 mm 含底层 5 g/L 琼脂糖和顶层 3 g/L 琼脂糖的软琼脂中;37℃ 培养箱中培养 14 d;倒置显微镜下观察克隆形成情况. 计算克隆形成率.

$$\text{软琼脂克隆形成率} = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组克隆数} - \text{实验组克隆数}}{\text{对照组克隆数}} \times 100\%$$

**1.2.7 电子显微镜方法检测凋亡** 常规方法将p27<sup>Kip1</sup> 转染组、空载体转染组和未转染组细胞制成电镜标本, 用透射电镜观察.

**统计学处理** 采用第四军医大学统计学教研室开发的 SPLM 医用统计软件包进行方差分析.

## 2 结果

**2.1 HHCC 细胞的 G-418 筛选** 未转染的 HHCC 细胞在含 G-418 的培养液中 8 d 内全部离壁死亡, 转染 pcDNA3.1/MyC-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 组 14 d 时细胞绝大部分死亡, 但可见散在生长的 G-418 抗性细胞克隆. Western blot 结果显示转染 pcDNA3.1/MyC-His(+)-p27<sup>Kip1</sup> 的 HHCC 细胞在分子量质为 27.0 ku 附近有 1 条明显的阳性带, 而转染 pcDNA3.1/MyC-His(+)-C 空载体和未转染的 HHCC 细胞未见阳性条带 (图 1).

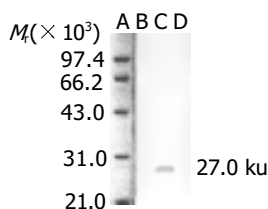


图1 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达的 Western blot 检测. A: Protein marker; B: HHCC cells; C: HHCC cells transfected by pcDNA3.1/MyC-His(+)-p27<sup>Kip1</sup>; D: Non-transfected cells.

**2.2 MTT 实验结果** pcDNA3.1-p27 明显抑制 HHCC 增生 ( $P < 0.01$  vs pcDNA3.1), 而 pcDNA3.1 与空白对照组 (blank control) 相比无差异 ( $P > 0.05$ ) (图 2).

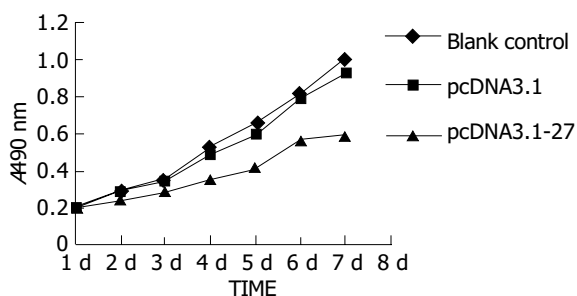


图2 pcDNA3.1-p27 对 HHCC 增生的影响.

**2.3 <sup>3</sup>H-TdR 实验结果** PcDNA3.1-P27 对 DNA 合成 ( $P < 0.01$  vs pcDNA3.1) 有明显抑制作用, Blank control 与 pcDNA3.1 相比无差异 ( $P > 0.01$ ) (图 3).

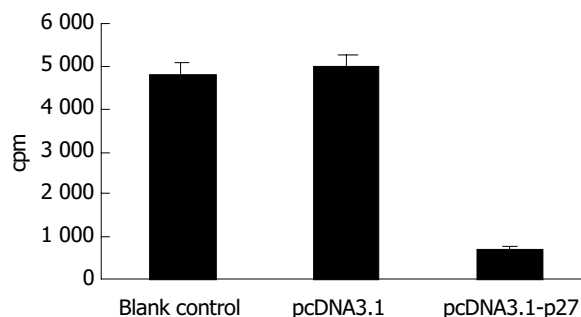


图3 PcDNA3.1-P27 对 HHCC DNA 合成的影响.

**2.4 p27<sup>Kip1</sup> 对 HHCC 细胞增生的影响 (表 1)** 软琼脂克隆形成试验显示, 过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 能够抑制 HHCC 细胞的生长. 各实验组与对照组之间相比有显著性差异 ( $P < 0.01$ , 表 1).

表1 过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 对 HHCC 细胞的抑制率 (%)

细胞类型	克隆数	克隆形成率 (%)	抑制率 (%)
未转染组	25 ± 3.3	8.33	
转染空载体组	23 ± 2.6	7.67	8.00
转染 p27 <sup>Kip1</sup> 组	11 ± 1.2	3.67 <sup>b</sup>	56.00 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs 转染空载体组.

**2.5 p27<sup>Kip1</sup> 对 HHCC 细胞凋亡的影响** 正常的肝癌细胞 (HHCC) 表面可见许多小的绒毛突起, 胞核为椭圆形, 位于细胞中部, 核膜双层结构清晰可见, 胞质内可见到的细胞器为线粒体、内质网和溶酶体等. 转染 p27<sup>Kip1</sup> 基因组的 HHCC 细胞可见部分肝癌细胞体积明显缩小, 胞核固缩, 染色质致密, 并边集于细胞核周边. 细胞膜表面微绒毛消失, 胞质中有空泡形成, 是细胞凋亡的形态学改变 (图 4).

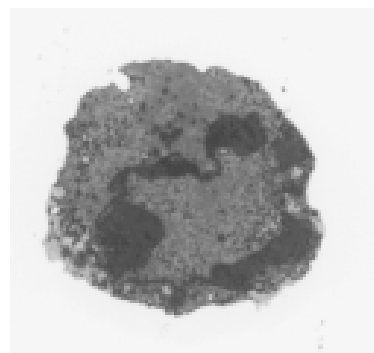


图4 肝癌细胞凋亡的形态学改变.

## 3 讨论

肿瘤的恶性增生是肿瘤细胞的永生化和细胞分裂的失控, 而细胞周期调节蛋白在正常细胞的生长和肿瘤的发生发展

中起着重要的调控作用. p27<sup>Kip1</sup> 作为细胞周期抑制蛋白的成员之一, 对肿瘤细胞的增生有一定的影响<sup>[2]</sup>. 为研究过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 对肝癌的抑制作用, 我们采用基因转染的方法建立了过表达 p27<sup>Kip1</sup> 的肝癌细胞模型. 经 Western Blot 检测表明, 最终克隆出来的转染细胞可 100% 表达 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白, 成功地建立了过表达 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白的肝癌细胞株.

细胞周期素依赖性激酶(CDKs)是细胞周期进展的主要调节因子, 因此也是肿瘤抑制性治疗的重要候选者. CDKs 能够使 Rb 基因及其相关蛋白磷酸化, 反过来又受到细胞周期素(cyclin)的水平、磷酸化和细胞周期素依赖性激酶抑制剂(CKIs)的控制<sup>[3]</sup>. 目前已经发现两大类 CKIs, 一类是 INK4(CDK4 的抑制剂)家族, 成员有 P16, P15, P18 和 P19, 他们是 cyclinD1 与 CDK4 或 CDK6 形成的复合物的抑制剂; 另一类是 P21 家族, 包括 P21, P27 和 P57, 他们是控制 G1/S 转换的 CDK 的抑制剂<sup>[4-5]</sup>.

P27 通过与各种 cyclin-CDK 复合物相互作用, 从而抑制他们的活性, 获得对细胞周期的调控. 生理状态下, P27 主要是通过 cyclinE-CDK2 复合物的相互作用, 从而调节细胞从 G1 后期到 S 期. 目前认为 P27 是 TGF- $\beta$ 、cAMP 及其他细胞外因子诱导细胞生长停滞的主要递质<sup>[7]</sup>. 在正常情况下, p27<sup>Kip1</sup> 在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期时表达增高, 当细胞进入 S 期时则表达下降. 虽然 p27<sup>Kip1</sup> 能广泛抑制各种周期蛋白和周期抑制蛋白(CDK)的活性, 但主要抑制细胞周期蛋白 E-CDK2 和细胞周期蛋白 D-CDK4 等 G<sub>1</sub> 期激酶复合物, 使细胞不能通过 G<sub>1</sub> 期<sup>[6]</sup>. 细胞凋亡多数发生于细胞周期的 G<sub>1</sub> 期、G<sub>1</sub> 晚期或 S 期<sup>[8-9]</sup>, 因此在 G<sub>1</sub> 晚期表达的蛋白如 p27<sup>Kip1</sup> 和 p21<sup>Cip1</sup> 无疑会参与凋亡的进程. 我们以体外培养的人肝癌细胞系为靶细胞, 以抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 为目的基因, 将构建的 pcDNA3.1/Myc-His(+)-C-p27<sup>Kip1</sup> 真核表达质粒体外转染 HHCC, 用 MTT、<sup>3</sup>H-TdR 和

克隆形成实验观察到抑癌基因 p27<sup>Kip1</sup> 对 HHCC 增生及其 DNA 合成均有明显抑制作用, 抑制率约为 56%. 通过电子显微镜发现过表达的 p27<sup>Kip1</sup> 能够诱导 HHCC 细胞凋亡, 即对细胞凋亡有促进作用, 从而抑制肿瘤细胞的生长. 关于 p27<sup>Kip1</sup> 抑制肝癌细胞生长的机制还有待于进一步的探讨.

#### 4 参考文献

- 1 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994;78:59-66
- 2 Favrot M, Coll JL, Louis N, Negoescu A. Cell death and cancer: Replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy. *Gene Ther* 1998;5:728-739
- 3 Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 2002;1:103-110
- 4 Nath N, Wang S, Betts V, Knudsen E, Chellappan S. Apoptotic and mitogenic stimuli inactivate Rb by differential utilization of p38 and cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 2003;22:5986-5994
- 5 Bryja V, Pachernik J, Faldikova L, Krejci P, Pogue R, Nevrliva I, Dvorak P, Hampl A. The role of p27(Kip1) in maintaining the levels of D-type cyclins in vivo. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1691:105-116
- 6 Shimizu T, Takahashi N, Tachibana K, Takeda K. Complex regulation of CDK2 and G1 arrest during neuronal differentiation of human prostatic cancer TSU-Prl cells by staurosporine. *Anticancer Res* 2001;21:893-898
- 7 Kim TY, Kim WI, Smith RE, Kay ED. Role of p27(Kip1) in cAMP- and TGF-beta2-mediated antiproliferation in rabbit corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3142-3149
- 8 de Koning JP, Soede-Bobok AA, Ward AC, Schelen AM, Antonissen C, van Leeuwen D, Lowenberg B, Touw IP. STAT3-mediated differentiation and survival of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene* 2000; 19:3290-3298
- 9 Alisi A, Leoni S, Piacentani A, Conti Devirgiliis L. Retinoic acid modulates the cell-cycle in fetal rat hepatocytes and HepG2 cells by regulating cyclin-cdk activities. *Liver Int* 2003; 23:179-186

编辑 张海宁

# 幽门螺杆菌感染对胃癌及其癌前病变组织中胃泌素和CCK-B receptor表达的影响

唐卓斌, 唐海燕, 刘为纹

唐卓斌, 中国人民解放军254医院消化科, 天津市 300142

唐海燕, 广东省东莞市厚街医院中医科, 广东省东莞市 523945

刘为纹, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心  
重庆市 400038

项目负责人: 唐卓斌, 300142, 天津市河北区五马路160号, 中国人民解放军254医院消化科, tzbin@163.com

电话: 022-84683114

收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-01-13

## 摘要

**目的:** 分析幽门螺杆菌(*H pylori*)感染对胃黏膜癌变过程中胃泌素及受体CCK-BR基因转录和蛋白表达的影响, 探讨*H pylori*在胃癌发生中的作用。

**方法:** 采用快速尿素酶试验、Giemsa染色及Warthin-Starry银染色检测*H pylori*, 应用免疫组织化学和RT-PCR技术检测萎缩性胃炎51例, 18例肠上皮化生18例, 异型增生15例和胃癌组织37例中的胃泌素及受体CCK-BR蛋白和mRNA表达情况。

**结果:** 胃泌素mRNA和蛋白在*H pylori*阳性的萎缩性胃炎中的表达显著低于*H pylori*阴性的萎缩性胃炎( $0.32 \pm 0.09$  vs  $0.51 \pm 0.12$ ,  $26.79 \pm 3.61$  vs  $32.80 \pm 2.24$ ,  $P < 0.01$ ), CCK-BR mRNA在*H pylori*阳性的萎缩性胃炎、肠化生、异型增生及胃癌中的表达与*H pylori*阴性组比较无明显变化。

**结论:** *H pylori*感染可以抑制萎缩性胃炎组织中的胃泌素mRNA和蛋白表达, 这可能是*H pylori*感染导致慢性胃炎的重要机制之一。*H pylori*感染在胃癌发生过程中, 主要作用于胃癌发生的早期阶段—萎缩性胃炎, 可能起着启动因子的作用。

唐卓斌, 唐海燕, 刘为纹. 幽门螺杆菌感染对胃癌及其癌前病变组织中胃泌素和CCK-B receptor表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(4):551-552  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/551.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)已被列为I类致癌因子<sup>[1]</sup>, 是慢性胃炎、胃癌的主要病因, 但其确切的致病机制尚不完全清楚。胃癌的发生与胃泌素(gastrin)和cholecystokinin-B receptor(CCK-BR)基因有关<sup>[2-3]</sup>。*H pylori*感染对胃黏膜癌变过程中胃泌素及CCK-BR表达影响的研究少见<sup>[4]</sup>。为此, 我们采用免疫组织化学染色及RT-PCR方法研究*H pylori*感染对胃黏膜癌变过程中胃泌素及其受体CCK-BR基因转录和蛋白表达的影响, 并分析其在胃癌发生过程中的意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1998/1999年胃镜活检标本及胃癌手术切除新鲜标本共121例, 含慢性萎缩性胃炎51例, 肠上皮化生18例, 异型增生15例, 胃癌37例。胃镜活检标本均取自胃窦部, 手术标本取自于行胃大部切除根治术的胃癌患者。胃癌患者在手术前均未接受化疗或免疫治疗。所有标本均经HE染色病理诊断证实。兔抗人胃泌素多克隆抗体为美国Santa Cruz公司产品, 即用型免疫组化试剂盒(Kit 9709)为迈新公司产品。总RNA提取试剂盒(Tripure™ Isolation Reagent)为德国Boehringer Mannheim(B.M)公司产品, RT-PCR检测试剂盒(Access RT-PCR system, A1250)为美国Promega公司产品, DNA marker 为上海华美公司产品, 胃泌素引物序列: F:5' CAGCGACTATGTGTGTATGT 3' R:5' TTCTTGACGGGTCTGCCAC 3' 产物长度221 bp。CCK-BR引物序列: F:5' CTCTCGCGAGCTCTACTTAG 3' R:5' ACGATCACCAGCAACATTCG 3' 产物长度294 bp。看家基因(GAPDH)引物序列: F:5' CCACCATGGCAAATTCATGGCA 3' R:5' TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAC 3' 产物长度598 bp。所有引物均由上海Sangon公司合成, PAGE纯化。

**1.2 方法** 所有病例均进行快速尿素酶试验、Giemsa染色及Warthin-Starry银染色。尿素酶试验均阳性, Giemsa染色和Warthin-Starry银染色两项中至少一项阳性者判为*H pylori*感染阳性; 三项检查均为阴性者判为*H pylori*感染阴性。免疫组化染色采用SP法, 染色程序按SP法操作常规进行。抗体以1:50稀释。最后常规DAB显色, 苏木素复染、脱水、透明、封固。以PBS代替一抗为阴性对照, 用已知gastrin蛋白阳性的正常胃组织为阳性对照。光镜下观察5个以上高倍视野, 计数500个细胞中gastrin染色阳性细胞数, 结果以均数±标准差(mean ± SD)表示。胃组织总RNA抽提严格按照试剂盒说明书进行, 并行甲醛变性胶电泳, DU640紫外分光光度仪测A值, 以确定完整性及其含量。反应体系如下: 5 × Buffer 5 μL, MgSO<sub>4</sub> 1 μL, dNTP 0.5 μL, Primer mix 1.5 μL, AMV 0.5 μL, Tf1 0.5 μL, 模板RNA 1 μL, 加灭菌水至终体积25 μL。在PCR扩增仪(Perkin Elmer 480)上48℃ 45 min将RNA逆转录成cDNA, 然后94℃预变性2 min, 均扩增35个循环, 反应条件为94℃变性30 s, 58℃退火40 s, 68℃延伸1 min, 最后68℃延伸7 min。取目的基因5 μL和各自相应的GAPDH的PCR产物5 μL在15 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳。电泳结果经Gel Doc 100型成像仪输入电脑, 应用

表1 *H pylori*感染对胃癌前病变及胃癌组织中 gastrin 和 CCK-BR 表达的影响

分组	<i>H pylori</i> (-)		<i>H pylori</i> (+)		<i>H pylori</i> (-)		<i>H pylori</i> (+)		<i>H pylori</i> (-)		<i>H pylori</i> (+)	
	<i>n</i>	Gastrin 蛋白	<i>n</i>	Gastrin 蛋白	<i>n</i>	Gastrin mRNA	<i>n</i>	Gastrin mRNA	<i>n</i>	CCK-BR mRNA	<i>n</i>	CCK-BR mRNA
萎缩性胃炎	10	32.80 ± 2.24	41	26.79 ± 3.61 <sup>b</sup>	10	32.80 ± 2.24	41	26.79 ± 3.61 <sup>b</sup>	10	32.80 ± 2.24	41	26.79 ± 3.61
肠化生	7	24.00 ± 2.50	11	25.20 ± 2.20	7	24.00 ± 2.50	11	25.20 ± 2.20	7	24.00 ± 2.50	11	25.20 ± 2.20
异型增生	6	21.50 ± 2.00	9	20.22 ± 2.47	6	21.50 ± 2.00	9	20.22 ± 2.47	6	21.50 ± 2.00	9	20.22 ± 2.47
胃癌	14	39.21 ± 2.96	23	40.90 ± 3.05	14	39.21 ± 2.96	23	40.90 ± 3.05	14	39.21 ± 2.96	23	40.90 ± 3.05

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs *H pylori* (-).

四星 SX-100 图像分析软件(上海四星生物技术实业有限公司产品), 对条带进行吸光度峰值下面积积分, 各个目的基因与其相应的 GAPDH 积分之比, 即为该目的基因 mRNA 相对水平。

**统计学处理** 所有数据均采用 SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验. *P* < 0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

在 51 例萎缩性胃炎组织中, *H pylori* 阳性 41 例, *H pylori* 阴性 10 例, *H pylori* 感染率为 80.4%. 18 例肠化生组织中, *H pylori* 阳性 11 例, *H pylori* 阴性 7 例, *H pylori* 感染率为 61.1%. 15 例异型增生组织中, *H pylori* 阳性 9 例, *H pylori* 阴性 6 例, *H pylori* 感染率为 60.0%. 37 例胃癌组织中, *H pylori* 阳性 23 例, *H pylori* 阴性 14 例, *H pylori* 感染率为 62.2%. 萎缩性胃炎、肠化生、异型增生和胃癌组织中 *H pylori* 感染率均无显著性差异. 胃泌素蛋白阳性反应物质呈棕黄色, 位于细胞内. 胃泌素基因在不同胃黏膜病变中有不同程度的表达. *H pylori* 阳性组萎缩性胃炎组织中的 gastrin mRNA 和蛋白表达显著低于 *H pylori* 阴性组 (*P* < 0.01), *H pylori* 阳性组肠化生、异型增生和胃癌组织中的 gastrin mRNA 和蛋白表达与 *H pylori* 阴性组比较均无显著性差异(表 1). CCK-BR mRNA 在 *H pylori* 阳性的萎缩性胃炎、肠化生、异型增生及胃癌组织中的表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化(表 1)。

## 3 讨论

在胃黏膜癌变过程中, *H pylori* 的毒素和有毒性作用的酶以及 *H pylori* 诱导的黏膜炎症反应均能造成胃黏膜屏障的损伤, 使胃上皮细胞的不稳定性增加, 从而增加患胃癌的危险性<sup>[5-6]</sup>. 但 *H pylori* 致胃癌的确切发病机制尚不完全清楚. 胃癌的发生与 gastrin 和 CCK-BR 基因有关<sup>[2-3]</sup>. *H pylori* 感染是否通过影响 gastrin 及其受体 CCK-BR 基因的表达参与胃癌的发生和发展尚不清楚. 因此, 我们对胃癌前病变及胃癌组织中 *H pylori* 感染与 gastrin 及其受体 CCK-BR 基因的关系进行了研究. 研究发现 gastrin mRNA 和蛋白在 *H pylori* 阳性的萎缩性胃炎中的

表达显著低于 *H pylori* 阴性组. 而 gastrin mRNA 和蛋白在 *H pylori* 阳性的肠化生、异型增生和胃癌中的表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化. CCK-BR mRNA 在 *H pylori* 阳性的胃癌前病变和胃癌组织中的表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化. 这种变化规律表明, *H pylori* 只在胃黏膜癌变的早期阶段 - 萎缩性胃炎, 抑制 gastrin mRNA 和蛋白表达, 而对胃黏膜癌变过程中的胃泌素受体 CCK-BR mRNA 表达无明显作用. *H pylori* 感染可能通过抑制 gastrin mRNA 和蛋白表达, 使 gastrin 对胃黏膜和壁细胞的营养作用减弱, 从而导致腺体萎缩加重, 泌酸功能下降, 形成恶性循环, 从而增加胃癌发生的危险性. Kuipers *et al*<sup>[7]</sup> 发现长期的 *H pylori* 感染会导致萎缩和肠化生的发生, 即肠化生和黏膜萎缩病变以在 *H pylori* 阳性者多见, 提示 *H pylori* 感染在胃癌发生的早、中期起着促使黏膜固有腺体萎缩、上皮肠化, 继而发生上皮异型增生的启动作用. 这与我们的研究结果基本一致。

我们的研究表明 *H pylori* 感染可以抑制萎缩性胃炎组织中的胃泌素 mRNA 和蛋白表达, 这可能是 *H pylori* 感染导致慢性胃炎的重要机制之一. *H pylori* 感染在胃癌发生过程中, 主要作用于胃癌发生的早期阶段 - 萎缩性胃炎, 可能起着启动因子的作用。

## 4 参考文献

- Kuipers EJ, Meuwissen SG. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996;218:103-105
- Okada N, Kubota A, Imamura T, Suwa H, Kawaguchi Y, Ohshio G, Seino Y, Imamura M. Evaluation of cholecystokinin, gastrin, CCK-A receptor, and CCK-B/gastrin receptor gene expressions in gastric cancer. *Cancer Lett* 1996;106:257-262
- 唐卓斌, 刘为纹. 胃黏膜癌变过程中胃泌素、生长抑素蛋白表达及其意义. *中华消化杂志* 2001;21:693-694
- Konturek PC, Hartwich A, Zuchowicz M, Labza H, Pierzchalski P, Karczewska E, Bielanski W, Hahn EG, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenases in gastric cancer. *J Physiol Pharmacol* 2000;51(4 Pt 1):737-749
- 胡伏莲, 周殿元, 贾博琦. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 1997:48-51
- 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃癌及其胃癌前病变中细胞凋亡与细胞增生间关系的研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:649-651
- Kuipers EJ, Uytendaele AM, Pena AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HP, Meuwissen SG. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 1995;345:1525-1528



## 健胃愈疡片保护大鼠胃黏膜促进胃溃疡愈合的作用

王成文, 董秀云, 林三仁

王成文, 董秀云, 林三仁, 北京大学第三医院消化科 北京市 100083  
项目负责人: 王成文, 100083, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院消化科.

收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-01-13

### 摘要

**目的:** 研究中药方剂健胃愈疡片对大鼠胃黏膜的保护和促进胃溃疡愈合的作用, 同时研究作用的机制.

**方法:** 采用乙醇、阿斯匹林及幽门结扎诱发大鼠胃黏膜损伤, 药物剂量为 400 mg/kg/d, 给药 3 d, 2 次/d; 第 4 d 处死动物, 检查损伤指数, 测定氧自由基的代谢产物 MDA 和胃酸排除量. 用 500 mL/L 的醋酸涂抹胃部浆膜面产生胃溃疡, 药物剂量同上, 给药 11 d, 2 次/d, 12 d 麻醉下测定 GMBL, 然后结扎幽门, 3 h 后, 处死动物, 取胃液测定胃酸排除量, 检查溃疡面积, 测定胃黏膜一氧化氮含量及胃黏膜黏液糖蛋白代表产物氨基己糖的浓度.

**结果:** 健胃愈疡片和硫糖铝有抵抗乙醇、阿斯匹林和幽门结扎诱发的胃黏膜损伤作用, 和对照组比较均有明显的差异. 抵抗乙醇诱发的损伤: 损伤指数对照组为  $56.7 \pm 3.6$ , 健胃愈疡片组为  $38.8 \pm 6.7$  ( $P < 0.05$ ), MDA 含量对照组为  $7.1 \pm 2.2$   $\mu\text{mol/g}$ , 健胃愈疡片组为  $4.5 \pm 3.2$   $\mu\text{mol/g}$  ( $P < 0.05$ ). 减少阿斯匹林诱发的损伤, 损伤指数对照组为  $13.61 \pm 1.2$ , 健胃愈疡片组为  $4.48 \pm 1.5$  ( $P < 0.01$ ). 抵抗幽门结扎诱发的损伤, 损伤指数对照组为  $9.7 \pm 2.3$ , 健胃愈疡片组为  $4.4 \pm 0.5$  ( $P < 0.05$ ), 胃液分泌减少, 对照组 4 h 为  $6.3 \pm 0.9$  mL, 健胃愈疡片组为  $4.5 \pm 0.2$  mL ( $P < 0.05$ ), 4 h 总酸排除量减少, 对照组为  $1.0 \pm 1.2$  mol, 健胃愈疡片组为  $0.5 \pm 0.1$  mol ( $P < 0.05$ ). 氨基己糖含量增加, 对照组为  $12.6 \pm 6.5$  mg/g, 健胃愈疡片组为  $21.7 \pm 7.1$  mg/g ( $P < 0.05$ ). 健胃愈疡片促进胃溃疡愈合, 溃疡面积对照组为  $6.8 \pm 2.9$   $\text{mm}^2$ , 健胃愈疡片组为  $4.1 \pm 2.5$   $\text{mm}^2$  ( $P < 0.05$ ), GMBL 增加, 对照组为  $322.2 \pm 54$  mL/min/kg, 健胃愈疡片组为  $411.2 \pm 58$  mL/min/kg ( $P < 0.05$ ), 3 h 胃酸排除量, 对照组为  $44.2 \pm 13.0$  mol, 健胃愈疡片组  $31.2 \pm 15.7$  mol ( $P < 0.05$ ). 氨基己糖含量明显增加, 对照组为  $15.4 \pm 7.2$  mg/g, 健胃愈疡片组为  $20.8 \pm 9.7$  mg/g ( $P < 0.05$ ), NO 的含量增加, 对照组为  $0.8 \pm 0.02$   $\mu\text{mol/L}$ , 健胃愈疡片组为  $0.7 \pm 0.03$   $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.05$ ).

**结论:** 健胃愈疡片有抵抗损伤促进溃疡愈合的作用, 其作用机制是减少氧自由基的产生, 抑制胃酸, 增加 GMBL、胃黏膜黏液糖蛋白和 NO 的含量.

### 0 引言

健胃愈疡片是中药方剂, 有促进胃溃疡愈合的作用<sup>[1]</sup>, 但对胃黏膜是否有保护作用尚未得到证明, 我们观察健胃愈疡片是否对胃黏膜有保护作用, 并观察研究健胃愈疡片促进胃溃疡愈合保护胃黏膜作用的机制.

### 1 材料和方法

**1.1 材料 仪器、试剂和药物:** 健胃愈疡片(处方: 柴胡, 党参, 白芍, 延胡索, 白及, 珍珠层粉, 青黛和甘草)为湖南九芝堂股份有限公司提供, 氨基己糖(Hexosamine Hex)标准品为日本和光纯药工业株式会社生产, 激光多普勒血流仪(Laser Doppler Flowmetry)为 SWEDEN 生产, 分光光度计为上海仪器厂生产. 动物:  $\delta$  Wistar 大鼠, 体重 180-240 g 为北京维多利亚公司提供.

#### 1.2 方法

**1.2.1 胃黏膜的保护** 无水乙醇诱发的胃黏膜损伤的保护作用, 动物分为 3 组: (1) 对照组: 生理盐水 2 mL + 无水乙醇 1 mL; (2) 健胃愈疡片组(人用量的 5 倍即每天 400 mg/kg) + 无水乙醇 1 mL; (3) 硫糖铝(人用量的 5 倍即每天 335 mg/kg) + 无水乙醇 1 mL. 用蒸流水溶解药物, 经口给生理盐水或药物, 2 次/d, 2 mL/次, 给 3 d, 第 4 d, 实验前 1 h 再给药 1 次, 1 h 后经口给无水乙醇 1 mL, 给无水乙醇 1 h 后处死动物, 依 GUTH 的方法计算损伤指数<sup>[2]</sup>, 然后将胃黏膜置于液氮中速冻或 -70℃ 冰箱保存. 丙二醛(MDA)含量测定, 以四乙氧基丙烷为标准品, 测定胃黏膜匀浆液中脂质过氧化产物 MDA 的含量<sup>[3]</sup>. 阿斯匹林诱发的胃黏膜损伤的保护作用, 动物分组和给药方法药物剂量同乙醇组, 实验当天上午给药 1 次, 1 h 后 ip 阿斯匹林(日本制) 80 mg/kg, 2 h 后处死动物, 用 GUTH 方法检查胃黏膜损伤指数. 幽门结扎诱发的胃黏膜损伤的保护作用动物分组药物剂量和给药方法同乙醇组. 实验当天上午给药 1 次, 1 h 后在乙醚麻醉下结扎幽门, 4 h 后, 处死动物, 取胃, 收集胃液, 测定酸度及总酸排除量, 并依 GUTH 方法计算胃黏膜损伤指数. 一部分胃组织放在低温下或液氮中保存, 从另一部分取胃黏膜, 用比色法测定胃黏膜的氨基己糖含量<sup>[4]</sup>.

**1.2.2 促进溃疡愈合作用** 慢性实验动物模型的制备: 用 50% 醋酸接触胃浆膜面, 停留 1 min 的办法制备溃疡模型<sup>[5]</sup>, 手术 2 d, 将动物随机分为 3 组, 健胃愈疡片的剂量为每天 400 mg/kg, 对照组给生理盐水, 给药 11 d, 2 次/d, 给药 11 d 后, 动物禁食过夜, 第 12 d, 在乙醚麻醉下测定 GMBF, 测定之后, 结扎幽门, 3 h 后脱颈处死, 取胃收集胃液, 测定胃酸排除量, 将胃展平, 测量溃疡面积

(长×宽),以 $\text{mm}^2$ 表示.胃组织放在低温下或液氮中保存.待测溃疡周围组织的氨基己糖和NO.氨基己糖和NO用比色法测定<sup>[4]</sup>.

**统计学处理** 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,组间差导的比较,采用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著意义.

## 2 结果

**2.1 胃黏膜的保护作用** 经口灌入乙醇1 h后,生理盐水对照组( $n = 7$ )大鼠胃黏膜严重损伤,损伤指数为 $56.7 \pm 3.8 \text{ mm}$ ,健胃愈疡片组( $n = 7$ )损伤指数为 $38.8 \pm 6.7 \text{ mm}$ ,和对照组比有明差异( $P < 0.05$ ),硫糖铝组( $n = 7$ )为 $12.4 \pm 6.9 \text{ mm}$ ( $P < 0.01$ ),健胃愈疡片和硫糖铝有保护胃黏膜抵抗乙醇损伤的作用.对脂质过氧化的作用,生理盐水+乙醇对照组MDA含量为 $7.1 \pm 2.2 \mu\text{mol/g}$ 蛋白,健胃愈疡片+乙醇组,MDA含量为 $4.5 \pm 3.2 \mu\text{mol/g}$ 蛋白,两组MDA含量有明显差异( $P < 0.05$ ).硫糖铝+乙醇组,MDA含量 $3.1 \pm 2.3 \mu\text{mol/g}$ 蛋白,和对照组比也有明显差异( $P < 0.01$ ).ip 阿斯匹林2 h后,对照组( $n = 7$ )溃疡损伤指数为 $13.6 \pm 1.2$ ,健胃愈疡片组为 $4.4 \pm 1.5$ ,和对照组比有明显差异( $P < 0.01$ ),硫糖铝组( $n = 7$ )损伤指数为 $3.3 \pm 1.7$ ,和对照组比有明显差异( $P < 0.01$ ).幽门结扎4 h后,对照组胃黏膜损伤指数为 $9.7 \pm 2.3$ .健胃愈疡片组为 $4.4 \pm 0.5$ ,给药组溃疡指数明显小于对照组.健胃愈疡片抑制胃液胃酸的分泌,对照组4 h胃液量为 $6.3 \pm 0.9 \text{ mL}$ ,健胃愈疡片组 $4.4 \text{ mL}$ ,两组有明显差异( $P < 0.05$ ),4 h时总酸排除量实验组和对照组比也有差异,对照组为 $0.97 \pm 1.2 \text{ mol}$ ,健胃愈疡片组 $0.45 \pm 0.1 \text{ mol}$ ( $P < 0.05$ ).健胃愈疡片促进胃黏膜分泌黏液糖蛋白,氨基己糖含量,对照组为 $12.6 \pm 6.5 \text{ mg/g}$ ,健胃愈疡片组为 $21.7 \pm 7.1 \text{ mg/g}$ ( $P < 0.01$ ).

**2.2 健胃愈疡片促进溃疡愈合** 对照组的溃疡面积明显大于用药组的溃疡面积,对照组( $n = 8$ ) $6.8 \pm 2.9 \text{ mm}^2$ ,愈疡片组( $n = 8$ ) $4.1 \pm 2.5 \text{ mm}^2$ .健胃愈疡片增加GMBF,对照组平均是 $322 \pm 54 \text{ mL/min} \cdot \text{kg}$ ,健胃愈疡片组是 $411 \pm 58 \text{ mL/min} \cdot \text{kg}$ ,和对照组比较有明显差异( $P < 0.05$ ).3 h胃酸排除量,对照组为 $44.2 \pm 13.0 \text{ mol}$ ,健胃愈疡片组为 $31.2 \pm 15.7 \text{ mol}$ .健胃愈疡片组明显少于对照组( $P < 0.01$ ).氨基己糖含量,对照组为 $15.4 \pm 7.2 \text{ mg/g}$ ,健胃愈疡片组为 $20.8 \pm 9.7 \text{ mg/g}$ ,明显高于对照组( $P < 0.05$ ).健胃愈疡片增加胃黏膜NO的含量,对照组 $0.67 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ ,愈疡片组 $0.70 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$ .和对照组比较有明显差异( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

消化性溃疡的发病是由于胃和十二指肠黏膜攻击因子和保

护因子平衡失调,损伤胃黏膜的因素有很多,如化学因素、物理因素、精神因素等;攻击因子中以胃酸胃蛋白酶为主,还有氧自由基、幽门螺杆菌.保护因子有黏膜屏障如细胞更新率,黏液屏障如黏液分泌量、胃黏膜血流量,内源性的前列腺素(PG),胃肠激素如表皮生长因子(EGF),P物质等<sup>[6]</sup>.NO是体内重要的调节物质<sup>[7-8]</sup>.中医理论认为消化性溃疡属胃痛、嘈杂范畴,脾气虚弱.

健胃愈疡片对胃溃疡和胃炎有很好的疗效,溃疡愈合率大约达到70%,改善胃溃疡和胃炎的临床症状大约达到90%<sup>[1]</sup>,其作用机制:从中医理论分析健胃愈疡片,有补气健脾、疏肝理气、抑肝平木、活血化瘀、缓急止痛和泄热制酸等功能.从西医理论研究已证明,健胃愈疡片增加P物质和内啡素,减少细胞凋亡.我们研究发现健胃愈疡片有保护胃黏膜促进胃溃疡愈合的作用.健胃愈疡片促进胃溃疡愈合,其机制是抑制胃酸分泌,增加胃黏膜血流量、增加黏液糖蛋白的分泌,增加NO含量.健胃愈疡片又有保护胃黏膜,抵抗乙醇、阿斯匹林、幽门结扎诱发的胃黏膜损伤,而且能减少乙醇引起的氧自由基的产生,使胃黏膜MDA含量减少.另外,他也能增加胃黏膜PG的合成,因为该药抵抗阿斯匹林引起的胃黏膜损伤,阿斯匹林抑制PG的形成<sup>[2]</sup>.健胃愈疡片还能抑制幽门结扎大鼠的胃酸和胃黏液糖蛋白的分泌.

我们研究过,中药利胃复胶囊(其组成三七,枯矾等)保护胃黏膜,对胃肠有解痉的作用.离体研究发现该药可抑制幽门螺杆菌的生长<sup>[9]</sup>.因此在治疗消化系统疾病中,中药有很大的发展空间.我们应发展祖国医学,利用现代的方法研究中药的作用并探讨作用机制.

## 4 参考文献

- 1 李家邦,金益强,陈国林,赵玉秋,潘其民.健胃愈疡片治疗消化性溃疡的临床研究.中西医结合杂志 1991;11:141-143
- 2 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesion in the Rat-cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76:88-93
- 3 Ligumsky M, Sestieri M, Okon E, Ginsburg I. Antioxidants inhibit ethanol-induced gastric injury in the rat - role of manganese, glycine and carotene. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30:854-860
- 4 董秀云,森治树,林三仁.洛赛克促进溃疡愈合机制的研究.中华消化杂志 1999;19:12-14
- 5 周衍淑,赵轶千,王雨若.生理学方法与技术.第2集.北京:北京科学出版社, 1984:307-311
- 6 郑芝田.消化性溃疡病.北京:人民卫生出版社, 1998:325-350
- 7 Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-1205
- 8 Mhlp S, Paula LH, Oliveira RB, Cunha FQ. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1(TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase(iNOS) deficient mice. *Gut* 2004;53:791-796
- 9 任俊杰,侯家玉,董秀云,李名沁,赵凤志,张燕平,董华,易凡,吴红梅.利胃复胶囊治疗溃疡病的临床及实验研究.中国中西医结合脾胃杂志 1997;5:151-156

# 塞来昔布对胃癌细胞生长的抑制作用

夏敏, 郭继中, 严洁, 唐建英

夏敏, 郭继中, 严洁, 唐建英, 无锡市第一人民医院消化内科  
江苏省无锡市 214000  
项目负责人: 夏敏, 214000, 江苏省无锡市第一人民医院消化内科.  
收稿日期: 2004-12-22 接受日期: 2005-01-20

## 摘要

**目的:** 观察特异性 COX-2 抑制剂塞来昔布对体外培养的 SGC7901 胃癌细胞生长及环氧化酶活性的作用。

**方法:** 采用 MTT 比色法观察不同浓度的塞来昔布对 COX-2 高表达的人胃癌细胞 SGC7901 生长的影响, 免疫细胞化学方法检测 COX-2 蛋白的表达; 同时用相差显微镜动态观察细胞形态及生长方式的改变。

**结果:** 塞来昔布 25  $\mu\text{mol/L}$  对 SGC7901 细胞生长无抑制作用, 作用 72 h 后细胞存活率为 80.0%; 50–100  $\mu\text{mol/L}$  的塞来昔布与 SGC7901 细胞相互作用 24 h 细胞存活率分别为 88.5%, 80.7%, 42.3%, 48 h 细胞存活率分别为 79.8%, 60.2%, 40.1%, 72 h 细胞存活率分别为 58.6%, 37.8%, 21.2%。塞来昔布同时减少 COX-2 蛋白表达; 当浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  的塞来昔布与胃癌 SGC7901 细胞作用后, COX-2 表达明显下降, 并呈剂量依赖关系。

**结论:** 塞来昔布能抑制 SGC7901 胃癌细胞株的生长及 COX-2 蛋白表达。

夏敏, 郭继中, 严洁, 唐建英. 塞来昔布对胃癌细胞生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005; 13(4): 555–556  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/555.asp>

## 0 引言

COX-2 表达增加可见于人类多种肿瘤, COX-2 受抑可抑制几种动物肿瘤模型肿瘤的生长<sup>[1]</sup>, COX-2 表达增加提示患者的预后较差<sup>[2]</sup>, 因此 COX-2 成为肿瘤化学预防的靶目标。胃癌是我国常见的消化道恶性肿瘤, 进展期胃癌的疗效不尽人意, 对胃癌的防治是目前研究的热点, 研究发现胃癌及不典型增生患者 COX-2 mRNA 及蛋白的表达增加<sup>[3–4]</sup>, 而塞来昔布对胃癌的防治作用国内报道较少, 我们探讨塞来昔布抗人胃癌细胞株 SGC7901 细胞增生作用机制如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** RPMI1640 培养基, 小牛血清购自 Gibco 公司; MTT, DMSO 购自 Sigma 公司; 塞来昔布由普强苏州制药有限公司提供; 山羊抗人 COX-2 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 人胃癌细胞系 SGC7901 购自中科院上海细胞所。

**1.2 方法** 取对数生长期的细胞以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接

种于 96 孔培养基中, 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h, 分别加入以 DMSO 溶解的不同浓度的塞来昔布 (25, 50, 75, 100  $\mu\text{mol/L}$ ), 并设含相同浓度 DMSO 的空白对照, 继续培养 24 h 和 48 h, 每孔加 MTT (5 g/L) 20  $\mu\text{L}$ , 作用 4 h 后加 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 震荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 酶联免疫检测仪测其吸光度, 计算细胞存活率 (%) = 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值  $\times$  100%。另将细胞悬液接种在 24 孔板内预先处理的玻片上, 继续培养 24 h 后加入不同浓度的塞来昔布, 设溶剂 DMSO 为对照组, 培养 72 h 后取出玻片, PBS 清洗后乙醇固定, 采用常规 SP 法测 COX-2 蛋白。另相差显微镜下动态观察 SGC7901 细胞经不同浓度塞来昔布处理后细胞在大小、形态及生长方式上的改变。

## 2 结果

塞来昔布处理组 SGC7901 细胞形态体积略大, 呈圆形或多边形, 核浆比例少, 异型性降低, 细胞呈单层生长, 在长至 100% 汇合后恢复接触抑制和密度抑制, 在用药后 3 d 100  $\mu\text{mol/L}$  处理组大部分细胞老化、死亡; 而对照组 SGC7901 细胞大小形态不一, 能叠加成堆生长, 丧失接触抑制和密度抑制的特性。塞来昔布 25  $\mu\text{mol/L}$  对 SGC7901 细胞生长无抑制作用, 作用 72 h 后细胞存活率为 80.0%, 50–100  $\mu\text{mol/L}$  的塞来昔布与 SGC7901 细胞相互作用后, 24 h 细胞存活率分别为 88.5%, 80.7%, 42.3%; 48 h 细胞存活率分别为 79.8%, 60.2%, 40.1%; 72 h 细胞存活率分别为 58.6%, 37.8%, 21.2%。随着药物浓度的增加及作用时间的延长, 细胞存活率逐渐下降, 呈时间剂量依赖性关系。免疫细胞化学染色显示, 胃癌 SGC7901 细胞有 COX-2 蛋白的表达 (图 1A)。当浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  的塞来昔布与胃癌 SGC7901 细胞作用后, COX-2 表达明显下降, 塞来昔布浓度越高, 其抑制 COX-2 表达的作用越明显 (图 1B)。

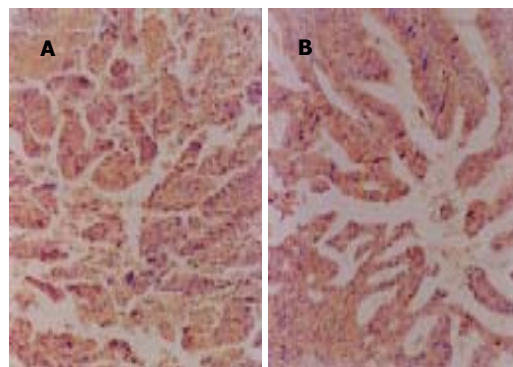


图1 COX-2 在不同组细胞中的表达. A: 对照; B: 50  $\mu\text{mol/L}$  塞来昔布.

### 3 讨论

胃癌组织中COX-2表达增加,而正常胃黏膜组织未有COX-2蛋白表达, Lim *et al*<sup>[5]</sup>发现COX-2过度表达尚见于肠腺化生和腺瘤等癌前状态,认为COX-2可能在胃癌形成的早期事件中起作用,与肿瘤的血管生成<sup>[6]</sup>及淋巴结转移有关。塞来昔布是第一个COX-2特异性抑制剂,在由化学性诱导剂所致的多发肠肿瘤的鼠模型中,塞来昔布可抑制71%肠肿瘤的发生;在偶氮甲烷所致的鼠大肠癌模型中,塞来昔布可使大肠癌的发生率和数量分别减少93%和97%,并抑制结肠异常腺管灶的形成<sup>[7]</sup>。塞来昔布通过激活NF- $\kappa$ B或抑制蛋白激酶B(PKB)/AKT的激活促进体外培育的结肠癌株凋亡而抑制细胞增生<sup>[8]</sup>,而他的抗肿瘤增生效应尚未在胃癌中证实, Saukkonen *et al*<sup>[9]</sup>研究发现在三叶肽生长因子-1缺乏鼠腺瘤模型中,COX-2表达增加,使用塞来昔布可减小腺瘤的大小,其作用机制可能通过炎症和促溃疡形成作用扰乱腺瘤的完整性<sup>[10]</sup>。我们用MTT方法证实塞来昔布呈时间、剂量依赖性方式抑制人胃癌细胞SGC7901增生,相差显微镜发现塞来昔布处理组SGC7901细胞异型性降低,细胞呈单层生长,在长至100%汇合后恢复接触抑制和密度抑制,在用药第3 d后100  $\mu$ m o l / L处理组大部分细胞老化、死亡;而对照组SGC7901细胞大小形态不一,能叠加成堆生长,丧失接触抑制和密度抑制的特性,因此塞来昔布可抑制人胃癌细胞的增生。塞来昔布可通过多种途径抑制肿瘤的生长,免疫细胞化学发现SGC-7901胃癌细胞株有较高水平的COX-2表达,经塞来昔布作用后癌细胞株COX-2的表达水平明显降低,故塞来昔布抑制胃癌细胞生长可能是通过抑制COX-2的表达,进而抑制前列腺素的合成而实现。前列腺素可诱导免疫抑制<sup>[11]</sup>,抑制COX-2可加重食物抗原诱导的大鼠炎症性肠病模型的肠黏膜损害,故前列腺素可防止免疫介导的胃肠道损伤,其机制是通过改变淋巴细胞和巨噬细胞IL-10, IL-12的释放<sup>[11]</sup>及抑制T细胞和自然杀伤细胞的活性导致免疫抑制。因此,应用环氧化酶抑制剂塞来昔布可减低肿瘤引起的免疫抑制作用。另外, Uefuji *et al*<sup>[6]</sup>证实了微血管密度与COX-2表达强度的关系,COX-2通过诱导血管内皮生长因子和转化生长因子 $\beta$ 、刺激内皮细胞移行和管腔形成促进血管生成。在一项对大鼠血管增生模型的研究中,观察到塞来昔布可抑制体内成纤维

细胞生长因子诱导的促角膜新生血管的形成<sup>[12]</sup>,因此塞来昔布也可抑制肿瘤血管的增生。

### 4 参考文献

- Gupta RA, DuBois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:11-21
- Buskens CJ, VanRees BP, Sivula A, Reitsma JB, Haglund C, Bosma PJ, Offerhaus GJ, Van Lanschot JJ, Ristimaki A. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in patients with adenocarcinoma of the esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1800-1807
- Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, Vilkkilä S, Harkonen M, Mecklin JP, Sipponen P, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1923-1931
- van Rees BP, Saukkonen K, Ristimäki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drilenburg P, Offerhaus GJ. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol* 2002;196:171-179
- Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, Kim HS, Nam DK, Lee KB, Kim HC. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:519-525
- Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and in angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:135-138
- Jacoby RF, Cole CE, Tutsch K, Newton MA, Kelloff G, Hawk ET, Lubet RA. Chemopreventive efficacy of combined piroxicam and difluoromethylornithine treatment of APC mutant Min mouse adenomas, and selective toxicity against APC mutant embryos. *Cancer Res* 2000;60:1864-1870
- Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001;15:2742-2744
- Saukkonen K, Rintahaka J, Sivula A, Buskens CJ, Van Rees BP, Rio MC, Haglund C, Van Lanschot JJ, Offerhaus GJ, Ristimäki A. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis. *APMIS* 2003;111:915-925
- Saukkonen K, Tomasetto C, Narko K, Rio MC, Ristimäki A. Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in gastric adenomas of trefoil factor 1-deficient mice. *Cancer Res* 2003;63:3032-3036
- Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 2000;164:361-370
- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000;60:1306-1311

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 胃淋巴瘤组织 Survivin 表达与幽门螺杆菌感染的关系

揭旭日, 夏冰

揭旭日, 广西右江民族医学院第一附属医院工作 广西省百色市 533000  
夏冰, 武汉大学中南医院内科, 消化系疾病研究中心, 武汉大学医学院  
过敏与免疫相关疾病重点实验室 湖北省武汉市 430071

项目负责人: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院内科, bingxia2004@yahoo.com.cn  
电话: 027-67812985-2985  
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-16

## 摘要

**目的:** 探讨 Survivin 基因在胃淋巴瘤中的表达及其与幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的关系。

**方法:** 用免疫组化法检测 30 例胃淋巴瘤和 30 例正常胃组织 Survivin 的表达, 同时用碱性品红染色法检测 30 例胃淋巴瘤及 30 例对照组 *H pylori* 感染情况。

**结果:** 30 例胃淋巴瘤中 14 例 Survivin 表达阳性, 而正常胃组织均无表达(46.67% vs 0%,  $P = 0.0002$ )。Survivin 表达与淋巴瘤分化程度、淋巴结转移及预后相关。胃淋巴瘤组织中 *H pylori* 阳性检出率 11 例, 正常胃组织 7 例(36.7% vs 23.33%,  $P = 0.26$ )。胃 MALT 型淋巴瘤 Survivin 阳性表达与 *H pylori* 感染有显著相关性( $r = 0.644$ ,  $P = 0.04$ )。

**结论:** Survivin 基因在胃淋巴瘤中表达上调, 而且与分化程度、淋巴结转移及预后有关。*H pylori* 感染与胃 MALT 型淋巴瘤和 Survivin 表达有关。

揭旭日, 夏冰. 胃淋巴瘤组织 Survivin 表达与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(4):557-559  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/557.asp>

## 0 引言

Survivin 是 1997 年由 Ambrosini *et al*<sup>[1]</sup> 用效应细胞蛋白酶受体 cDNA 在人类基因库的杂交筛选中分离出来的, 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族的新成员。胃淋巴瘤是淋巴结外恶性淋巴瘤较多见的一类淋巴瘤, 以往报道胃 MALT 淋巴瘤与幽门螺杆菌(*H pylori*)感染相关<sup>[2]</sup>, 但并未明确。我们采用免疫组化法检测 30 例胃淋巴瘤组织 Survivin 表达, 并通过检测 *H pylori* 感染情况, 探讨 Survivin 基因在胃淋巴瘤发病机制中的作用以及与 *H pylori* 感染的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集胃淋巴瘤 30 例, 均为 1998/2003 年右江民族医学院第一附属医院及第二附属医院病理科存档蜡块, 男性 19 例, 女性 11 例, 年龄 38-72 岁, 平均年龄 58 岁, 所有病例诊断前均未治疗。参照欧洲血液病理学会关于原发性胃肠道淋巴瘤的分类标准<sup>[2]</sup> 分类, 并

行白细胞共同抗原(LCA)、CD45RO、CD20、CD3 免疫组化染色, 30 例胃淋巴瘤均为 B 细胞性淋巴瘤, 其中低度恶性胃淋巴瘤 16 例(胃黏膜相关淋巴样组织型(MALT 型)低度恶性淋巴瘤 11 例, 中心细胞性淋巴瘤 2 例, 套细胞性淋巴瘤 3 例), 高度恶性胃淋巴瘤 14 例(MALT 型高度恶性淋巴瘤 7 例, 间变性大细胞性淋巴瘤 4 例, 免疫母细胞性淋巴瘤 3 例)。按照胃肠道恶性淋巴瘤临床分期标准<sup>[2]</sup>, 30 例胃淋巴瘤分期: I 期 12 例, II 期 5 例, III 期 7 例, IV 期 6 例。本组实验中有淋巴结转移者 18 例, 无淋巴结转移者 12 例。此外, 取 30 例胃非恶性肿瘤的正常胃黏膜组织作为对照组。标本均经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组化方法检测 Survivin 表达** Elivision 试剂盒购自福州迈新公司, 第一抗体为兔抗人 Survivin 多克隆抗体。主要实验步骤:切片、脱蜡、水化后, 高温高压修复 1 次, 时间 90 s, 滴加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消除切片中过氧化物酶对自身阳性的干扰, 滴加一抗, 37℃ 水浴 1 h, 滴加二抗, 37℃ 水浴 30 min, DAB 显色, 苏木精复染, 低度酒精脱水, 干燥, 二甲苯透明封固。用已知的乳腺癌切片作为阳性对照, 用 PBS 替代一抗作为阴性对照。

**1.2.2 碱性品红染色法检测 *H pylori*** 主要实验步骤:切片、脱蜡、水化后, 将切片置入 0.25% 碱性品红液 5 min, 蒸馏水冲洗 1 次, 95% mL/L 乙醇脱水, 最后二甲苯透明和中性树脂胶封固。

**1.2.3 结果判定** 由病理科医师负责结果判定。Survivin 阳性染色在胞质或胞核均有表达, 其中主要在胞质中表达, 为淡黄至黄棕色颗粒。Survivin 染色结果按阳性细胞所占百分率分为:阳性率<10%, 为阴性(-);10-24%, 为弱阳性(+);25-50%, 为阳性(++);>50%, 为强阳性(+++)。用碱性品红染色法检测出的 *H pylori* 呈红色, 凡胃组织切片中找到 *H pylori*, 则认为 *H pylori* 检测阳性。

**统计学处理** 运用 SPSS11.5 统计软件进行数据处理, 率的比较用  $\chi^2$  检验或精确概率法检验, 等级相关分析用 Spearman 方法检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 Survivin 表达** 30 例胃淋巴瘤中, 14 例 Survivin 表达阳性(图 1), 30 例正常对照标本均无阳性表达(46.7% vs 0%,  $P = 0.0002 < 0.01$ ,  $A = 36.03$ , 95% CI:1.995-650.56)。低度恶性组 Survivin 表达 2 例, 而高度恶性组中表达 12 例(12.5% vs 85.71%,  $P = 0.0008 < 0.01$ ,  $A = 42$ , 95%CI:5.112-345.103)。临床分期:III+VI 期 13 例, Survivin 表达阳性 10 例;

I + II期 17例, Survivin 表达阳性 4例, III + VI期与 I + II期患者阳性率差异有显著性 ( $76.9\% \text{ vs } 25.5\%$ ,  $P = 0.009 < 0.01$ ,  $A = 10.833$ , 95% CI: 1.96–59.83). 淋巴结转移情况: 有淋巴结转移者 18例, Survivin 表达阳性 12例; 无淋巴结转移者 12例, Survivin 表达阳性 2例 ( $66.7\% \text{ vs } 16.67\%$ ,  $P = 0.011 < 0.05$ ,  $A = 10$ , 95% CI: 1.641–60.921). 胃 MALT 淋巴瘤组与非 MALT 淋巴瘤组 Survivin 表达无显著性差别 ( $38.89\% \text{ vs } 58.33\%$ ,  $P = 0.457$ ).

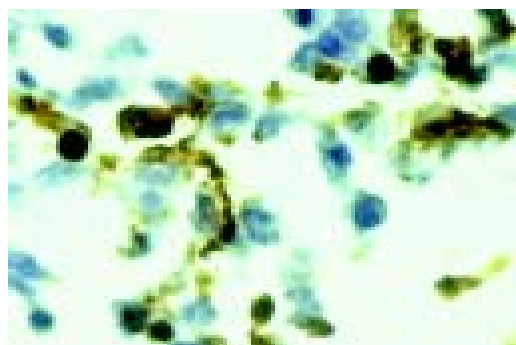


图1 胃淋巴瘤 Survivin 表达, Elivision  $\times 400$ .

**2.2 *H pylori* 检测** 30例胃淋巴瘤中 *H pylori* 检测阳性 (图2) 共 11例, 对照组阳性 7例, 两组对比差异无显著性 ( $36.7\% \text{ vs } 23.33\%$ ,  $P = 0.26$ ,  $A = 1.902$ , 95% CI: 0.617–5.863). 胃 MALT 淋巴瘤组 18例, *H pylori* 检出 10例; 非 MALT 淋巴瘤组 12例, *H pylori* 检出 1例, 两组 *H pylori* 感染率对比有显著性差别 ( $55.6\% \text{ vs } 8.3\%$ ,  $P = 0.018 < 0.05$ ,  $A = 13.75$ , 95% CI: 1.45–130.24).

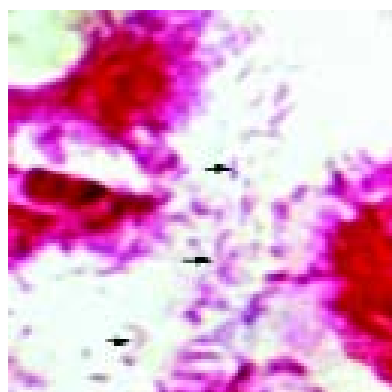


图2 胃淋巴瘤 *H pylori* 感染 (箭头指向为 *H pylori*), 碱性品红染色  $\times 400$ .

**2.3 Survivin 表达与 *H pylori* 的关系** 30例胃淋巴瘤同时出现 Survivin 表达及 *H pylori* 感染者 8例 (其中 MALT 型占有 7例), 同时阴性者 13例, 胃淋巴瘤 Survivin 表达与 *H pylori* 感染有显著相关性 ( $r = 0.404$ ,  $P = 0.027 < 0.05$ ). 胃 MALT 淋巴瘤同时出现 Survivin 表达及 *H pylori* 感染者 7例, 非胃 MALT 淋巴瘤同时出现者只有 1例, 胃 MALT 型淋巴瘤 Survivin 阳性表达与 *H pylori* 感染有显著相关性 ( $r = 0.691$ ,  $P = 0.001 < 0.01$ ).

### 3 讨论

人体细胞凋亡抑制蛋白 (human inhibitor of apoptosis protein, hIAP) 是抑制细胞凋亡的重要成分, 其作用大于 Bcl-2 家族<sup>[3]</sup>, 在肿瘤的发病机制中起重要作用. Survivin 是 hIAP 家族的新成员, 由 42 个氨基酸构成, 含有一个 N 末端的杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列区. 近来认为 Survivin 基因的抗凋亡功能在于直接抑制了半胱氨酸蛋白酶 caspase-3 和 caspase-7 的活性. Survivin 只是在胚胎组织中表达, 成人分化组织则表达下降或不表达. 在人体各种肿瘤中, Survivin 在肿瘤的阳性表达率为 34.5–92%, 而且 Survivin 阳性表达已提示肿瘤预后不良<sup>[4–8]</sup>. 我们的研究发现, 胃 B 细胞淋巴瘤组织中 Survivin 基因表达阳性率为 46.67%, 而正常胃黏膜组织中未见表达, 说明 Survivin 基因在胃淋巴瘤组织中表达上调, 这与 Ambrosini *et al*<sup>[1]</sup>, Li *et al*<sup>[9]</sup> 对淋巴瘤 Survivin 阳性表达率的检测结果一致. 本实验 Survivin 的表达上调提示 Survivin 基因可能通过抑制胃淋巴瘤细胞凋亡, 对胃淋巴瘤的发生发展起重要作用. 此外, 我们的实验显示高度恶性胃淋巴瘤 Survivin 基因表达明显高于低度恶性胃淋巴瘤, 这一结果与 Mazur *et al*<sup>[10]</sup> 一致, 同时 Survivin 基因表达与胃淋巴瘤组织的分化程度、临床分期及淋巴结转移有明显相关性, 说明 Survivin 基因的表达预示胃淋巴瘤有较高的侵袭性和预后不良. 因此, 检测 Survivin 基因表达对胃淋巴瘤的临床分型以及预后判断具有一定的价值.

我们检测胃淋巴瘤组织 *H pylori* 感染率, 30例胃淋巴瘤的总检出率为 36.67%, 其中 MALT 型占 55.56%, 这与许良中<sup>[2]</sup>的研究试验结果 (58%) 相接近, 而胃 MALT 型淋巴瘤组与非 MALT 型组 *H pylori* 感染率对比, 差异有显著性, 这一结果与 Yin *et al*<sup>[11]</sup> 报道的相符, 说明 *H pylori* 感染与胃 MALT 型淋巴瘤的发生、发展有密切联系, 此结果为指导胃 MALT 型淋巴瘤抗 *H pylori* 治疗提供了一定的理论依据. 我们的研究还发现, 胃 MALT 型淋巴瘤 Survivin 的表达与 *H pylori* 感染呈显著相关, 提示 *H pylori* 感染除了在胃 MALT 型淋巴瘤的发病可能起到促进的作用以外, 同时也可能进一步抑制了胃淋巴瘤细胞的凋亡过程. Mera<sup>[12]</sup> 的研究发现, 凡 Survivin 表达阳性且 *H pylori* 检测阳性的胃 MALT 型患者, 给予 *H pylori* 根治性治疗以后, 胃淋巴瘤并未获得满意的治疗效果, 而 Survivin 阴性但 *H pylori* 阳性的胃 MALT 型淋巴瘤, 单纯给予 *H pylori* 根治性治疗后取得满意的疗效, 说明 *H pylori* 感染也可能只是 MALT 型胃淋巴瘤的诱因或启动因素, Survivin 表达及其通路对胃淋巴瘤的发生与发展起到重要作用. 我们的研究显示正常组无 Survivin 表达, 但 *H pylori* 感染率达 23.33%, 进一步提示 Survivin 与淋巴瘤有密切关系, 而 *H pylori* 仅是伴随关系, 对肿瘤起到促进作用. 我们还发现, 非 MALT 型胃淋巴瘤与 *H pylori* 感染的关系不大, 这与目前国内外的报道的结果一致 (Burkitt 淋巴瘤除外<sup>[13–15]</sup>). 总



之, 我们的研究提示 Survivin 在胃淋巴瘤组织表达上调, 而且与分化程度、淋巴结转移及预后有关. 胃 MALT 淋巴瘤 Survivin 表达与组织 *H pylori* 感染有关, 其作用尚待进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-921
- 2 许良中. 现代恶性淋巴瘤病理学. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社. 2002:204-208
- 3 LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-3259
- 4 Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000;96:1921-1925
- 5 Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, Mitsui A, Nishiwaki T, Moriyama S, Kudo J, Fujii Y. Expression of Survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 2001;95:92-95
- 6 Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000;46:645-650
- 7 Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ. Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, Survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2001;8:305-310
- 8 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of Survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134
- 9 Li HL, Sun BZ, Feng Q, Shang ZC. Expression of Survivin and caspase-3 in non-Hodgkin's lymphoma and their clinical significance. *Ai Zheng* 2004;23:40-43
- 10 Mazur G, Halon A, Wrobel T, Urbaniak J, Kuliczowski K, Wozniak M. Survivin expression in lymph nodes, affected by lymphoma and reactive hyperplasia. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004;49(Suppl 1):76-78
- 11 Yin HF, Li T, Zhang Y. Proliferation and apoptosis in primary gastrointestinal B-cell non-hodgkin's lymphoma and its association with *Helicobacter Pylori*. *Beijing Daxue Xuebao* 2004;36:348-352
- 12 Mera K. Anti-apoptosis gene "Survivin" in gastric MALT lymphoma patients (pts): Correlation with therapeutic response after eradication for *Helicobacter pylori* (*H pylori*). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:865
- 13 Ziarkiewicz-Wroblewska B, Gornicka B, Suleiman W, Koperski L, Muszniski J, Ehrmann-Josko A, Wasiutynski A. Sporadic Burkitt's lymphoma (BL) with stomach involvement associated with *Helicobacter pylori* infection-case report and literature review. *Wiad Lek* 2004;57:183-187
- 14 Shannon C, Vickers C, Field A, Ward R. Burkitt's lymphoma associated with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:99-103
- 15 Moschovi M, Menegas D, Stefanaki K, Constantinidou CV, Tzortzatou-Stathopoulou F. Primary gastric Burkitt lymphoma in childhood: associated with *Helicobacter pylori*? *Med Pediatr Oncol* 2003;41:444-447

编辑 张海宁



## PCNA和VEGF在肝细胞肝癌中的表达意义

李立人, 施公胜, 孙超

李立人, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001  
施公胜, 孙超, 南通大学附属医院病理科 江苏省南通市 226001  
项目负责人: 李立人, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科, larry017@163.com  
电话: 0513-5052233 传真: 0513-5519820  
收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-17

### 摘要

**目的:** 探讨PCNA基因蛋白和VEGF在肝细胞肝癌发生和发展中的作用。

**方法:** 应用免疫组化S-P法检测了PCNA基因蛋白和VEGF在100例肝细胞肝癌中的表达情况, 并分析了其与肝细胞肝癌临床病理指标的关系。

**结果:** PCNA基因蛋白和VEGF在肝细胞肝癌中的表达明显高于正常肝组织, 差异显著(91.0% vs 14.3%及81.0% vs 23.8%,  $P<0.05$ ). PCNA基因蛋白和VEGF在肝细胞肝癌中的表达与组织分化程度、年龄等临床病理指标无明显相关性; 而VEGF与静脉内小癌栓形成有相关性( $r = 11.05$ ,  $P<0.05$ ).

**结论:** PCNA和VEGF对肝细胞肝癌的诊断、治疗和预后判断有积极意义。

李立人, 施公胜, 孙超. PCNA和VEGF在肝细胞肝癌中的表达意义. 世界华人消化杂志 2005;13(4):560-561  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/560.asp>

### 0 引言

增生细胞核抗原(PCNA)基因的表达及血管内皮生长因子(VEGF)与多种肿瘤的恶性程度、浸润、转移密切相关<sup>[1-2]</sup>. 为了探讨PCNA和VEGF在肝细胞肝癌中的表达情况及其与恶性行为之间的关系, 我们应用免疫组化S-P方法检测了100例肝细胞肝癌以及手术中切除的部分非肿瘤肝组织中PCNA基因蛋白的表达情况和VEGF的表达情况. 目的在于进一步探明其在肝细胞肝癌发生、发展中的作用, 为肝细胞肝癌的诊断、治疗以及预后判断提供依据。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 1994/2001年手术切除肝细胞肝癌标本100例; 非肿瘤肝标本100例, 为肝细胞肝癌癌肿切除时距肿瘤边缘0.4 cm以上, 病理证实无肝细胞肝癌累及的组织, 其中79例为结节性肝硬化, 21例为正常肝组织. 肝细胞肝癌中高分化36例, 中分化44例, 低分化20例. 静脉内有微小癌栓54例. 年龄37-78岁(平均60岁). 50岁以下37例; 50岁以上63例. 标本以40 g/L甲醛液固定, 常规石蜡包埋存档. PCNA和VEGF单克隆抗体和SP试剂盒购自福

迈新生物技术公司。

**1.2 方法** 石蜡4  $\mu\text{m}$ 连续切片. 每例用TBS代替第一抗体作阴性对照, 用已知PCNA和VEGF阳性的组织作阳性对照. 分别作HE染色及SP免疫组化染色, SP染色法按照SP试剂盒说明书进行. PCNA阳性者为细胞核有棕黄色颗粒. VEGF阳性者为细胞质和细胞膜有棕黄色颗粒. 阳性细胞半定量标准: 高倍镜下, 每张切片上、下、左、右及中5个高倍镜视野, “-”无阳性反应, “+”阳性细胞数1-20%, “++”阳性细胞数21-50%, “+++”阳性细胞数>50%.

**统计学处理** 采用 $\chi^2$ 检验。

### 2 结果

PCNA在胞核呈现片状或散在分布, 在肝细胞肝癌、肝硬化组织和正常肝组织中的表达率分别为91.0%, 40.5%和14.3%. 肝细胞肝癌和肝硬化组织之间、肝细胞肝癌和正常肝组织之间均有显著差异( $P<0.05$ ). PCNA表达与组织分化, 静脉内小癌栓形成, 年龄等指标无相关性( $P>0.05$ ). VEGF在细胞质和细胞膜呈局灶性的分布. 他在肝细胞肝癌、肝硬化组织、正常肝组织中的表达率分别为81.0%, 36.7%和23.8%, 肝细胞肝癌和肝硬化组织之间、肝细胞肝癌和正常肝组织之间均有显著差异( $P<0.05$ ). VEGF表达与组织分化, 年龄等指标无相关性( $P>0.05$ ), 而与静脉内小癌栓形成有相关性( $r = 11.05$ ,  $P<0.05$ , 表1).

表1 VEGF的表达与肝细胞肝癌的临床、病理指标间的关系

VEGF	组织分化			静脉内癌栓		年龄	
	I	II	III	-	+	<50	>50
-	6	8	5	15	4	7	12
+	7	11	6	9	16	12	13
++	13	16	3	11	13	9	15
+++	10	9	6	11	21	9	23
合计(n)	36	44	20	46	54	37	63
阳性(%)	83.3	81.8	75.0	67.4	92.6	81.1	81.0

### 3 讨论

PCNA是反映细胞增生状态的一个重要指标<sup>[3]</sup>. PCNA在增生的肿瘤细胞中有表达, 研究发现当细胞进入G1和S期时都伴有不同程度的PCNA表达, 尤其是在S期, PCNA的表达比较高, 所以Landberg *et al*<sup>[4]</sup>认为PCNA蛋白是细胞增生周期S期的特异性标记, 他在胞核呈现片状或散在分布. 本结果显示, PCNA基因蛋白在肝细胞肝癌中表达阳性率(91.0%)显著高于结节性肝硬化组织(40.5%,  $P<0.05$ )和正常肝组织(14.3%,  $P<0.05$ ). 提示PCNA基

因蛋白的表达与肝脏肿瘤的恶性行为有关,但PCNA与肝细胞肝癌的组织分化程度、年龄、静脉内小癌栓形成等临床病理指标无显著相关性.这说明,尽管PCNA蛋白的表达程度与肿瘤的增生程度成正比,提示肿瘤的存在,但尚不能把PCNA基因蛋白的表达与癌肿的分化程度,静脉内小癌栓形成等因素相联系.

肿瘤的发生、发展和转归在很大程度上和依赖于血管的形成.多种实体肿瘤或细胞均有血管内皮生长因子(VEGF)蛋白高表达<sup>[6]</sup>,VEGF主要分布在血管内皮细胞,其表达水平与肿瘤中血管化程度相关.Brown *et al*<sup>[6]</sup>用免疫组化和原位杂交技术分析21例消化系统原发癌,所有恶性上皮均明显表达VEGF mRNA及其蛋白,与肿瘤坏死区紧密连接的癌细胞中表达更加显著,肿瘤血管内VEGF染色阳性,肿瘤以外的组织没有表达.这表明,VEGF在消化系统肿瘤内血管形成中有一定作用.本结果显示,VEGF在肝细胞肝癌中表达阳性率(81.0%)显著高于结节性肝硬化组织(36.7%,  $P<0.05$ )和正常肝组织(23.8%,  $P<0.05$ ).本研究还提示VEGF的表达与肝细胞肝癌组织分化程度,年龄等临床病理指标无显著相关性,这说明,尽管VEGF的表达与肿瘤的恶性行为有关,但是尚不能在VEGF的表达与临床病理指标间建立必然的联系,至于VEGF和表达与肝细胞肝癌的静脉内微小癌栓之间存在的相关性是否与患者的预后有某种联系,则需要进一步积累

随访资料.

由于PCNA和VEGF往往在同一病例中有共同表达,二者的表达有一定和互补性.结合本次实验中所作的统计分析,我们认为,联合检测PCNA基因蛋白和VEGF可以对肝脏肿瘤患者的病变性质判断有一定的价值.

#### 4 参考文献

- 1 Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993;53:4754-4756
- 2 Mayer B, Jauch KW, Gunthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993;342:1019-1022
- 3 Scheumman GF, Hoang-Vu C, Cetin Y, Gimm O, Behrends J, von Wasielewski R, Georgii A, Birchmeier W, von Zur Muhlen A, Dralle H. Clinical significance of E-cadherin as a prognostic marker in thyroidcarcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2168-2172
- 4 Landberg G, Roos G. Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res* 1991;51:4570-4574
- 5 卞修武, 史景泉. 血管内皮生长因子及其受体在肿瘤血管生成中的作用及抗血管生成研究进展. *中华病理学杂志* 1997;26:248-250
- 6 Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993;53:4727-4735

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 肠易激综合征内脏感知异常与临床症状的相关性

姜 敏, 汤 浩, 刘峥艳, 张义侠, 傅宝玉

姜敏, 汤浩, 刘峥艳, 张义侠, 傅宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

项目负责人: 姜敏, 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. jiang-min@163.com

电话: 024-23256666-6199

收稿日期: 2004-12-08 接受日期: 2004-12-28

### 摘要

**目的:** 探讨肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者内脏感知异常与临床腹部症状的相关性.

**方法:** 用问卷调查的方式对符合RomeII诊断标准的腹泻、便秘、腹泻与便秘交替三种亚型的IBS患者与内脏感知异常有关的腹部症状进行调查分析;部分患者接受了直肠气囊容

积初始阈值和紧迫感阈值的测定.

**结果:** 腹痛是IBS患者内脏感知异常的主要临床表现;与正常对照组比较, IBS患者直肠容积的初始阈值和紧迫感阈值明显降低(腹泻型IBS组初始感觉阈值  $33 \pm 2.02$  vs  $56 \pm 4.04$  mL, 紧迫感阈值  $86 \pm 4.53$  vs  $135 \pm 3.55$  mL,  $P<0.01$ ;便秘型和腹泻便秘交替型IBS组初始感觉阈值分别为  $42 \pm 3.69$  vs  $56 \pm 4.04$ ,  $38 \pm 3.56$  vs  $56 \pm 4.04$  mL, 紧迫感阈值分别为  $96 \pm 3.45$  vs  $135 \pm 3.55$  mL,  $102 \pm 4.78$  vs  $135 \pm 3.55$  mL,  $P<0.05$ ), 以腹痛为主和以非腹痛为主的IBS患者相比, 以腹痛为主的IBS患者的初始阈值和紧迫感阈值明显降低(初始感觉阈值  $26 \pm 2.29$  vs  $42 \pm 3.34$  mL,  $P<0.05$ , 紧迫感阈

值  $68 \pm 4.20$  vs  $94 \pm 4.37$  mL,  $P < 0.01$ ).

**结论:** 腹痛是内脏感知异常最主要的临床表现, 内脏神经敏感性增加即内脏感知异常是 IBS 的主要发病机制.

姜敏, 汤浩, 刘峰艳, 张义侠, 傅宝玉. 肠易激综合征内脏感知异常与临床症状的相关性. 世界华人消化杂志 2005;13(4):561-564  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/561.asp>

## 0 引言

内脏感知异常目前被认为是 IBS 的一个重要的发病机制<sup>[1]</sup>. 大便习惯的改变是 IBS 最基本的临床表现, 而腹部疼痛也作为他的主要临床症状存在于大多数就诊的患者, 还有相当的一部分患者存在着腹痛以外的腹胀或其他的腹部不适症状、直肠排便不净等感知异常. 这些症状虽然不影响患者的生命, 但是影响患者的生活质量. 许多患者可能会认为这些症状是某种严重疾病的一个警告信号, 而导致就医. 我们对最近 2 a 来在中国医科大学附属第一医院消化内科就诊的 352 例符合 Rome II 诊断标准的 IBS 患者进行问卷调查, 其中部分患者接受了以直肠水囊扩张作为伤害性刺激的下消化道功能检测, 通过内脏感知异常与临床症状相关性的研究进一步探讨 IBS 的发病机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我们对 2001-08/2003-02 就诊于中国医科大学附属第一医院消化内科的 352 例符合 Rome II 诊断标准的患者, 通过各种必要的临床检查, 并在除外器质性疾病的基础上, 对他们进行了问卷调查. 调查表内容(表 1).

入选的 352 例 IBS 患者中男性为 118 例, 女性为 234 例、平均年龄为  $42 \pm 6$  岁. 根据患者的答卷, 我们将 IBS 的患者进一步分为腹泻组、便秘组和腹泻便秘交替组. 在所有 352 例患者中有 76 例患者, 其中男性为 26 例, 女性为 50 例接受了以直肠水囊扩张作为伤害性刺激的下消

表1 肠易激综合症患者问卷

编号:			
姓名:	性别:	年龄:	职业:
籍贯:	住址:	联系方式:	
发病时间:		每年持续时间:	
发病因素: 感染因素;精神神经因素;饮食因素;气候因素;其他因素.			
主要症状:(1)大便性状及次数:正常、干便、成型软便、不成型便、糊状便、水样便、黏液便;(2)腹痛:(a)疼痛部位:全腹、脐周、上腹部(左、右)、下腹部(左、右);(b)疼痛性质:持续疼痛、间断疼痛、剧痛、隐痛、胀痛、压痛、排便前痛便后缓解、排便前痛排便后不缓;			
(3)腹部不适:腹胀、排气增多、肠鸣亢进、窜气感、排便不尽感、其他;			
(4)睡眠:好、不好;(5)体重减轻:有(明显减轻、不明显减轻)、无;(6)对日常生活和工作的影响:有(严重影响、轻微影响)、无.			
影响症状的因素:加重因素、减轻因素、是否患有其他疾病、在此之前有无就医、常用药物、腹部手术病史.			

化道检测, 同时以 30 名健康志愿者为正常对照组, 其中男性为 11 名, 女性为 19 名;平均年龄为  $39 \pm 5$  岁.

**1.2 方法** 检测仪器为瑞典 CTD-Synectics Medical 公司生产的 Syectics Visceral Stimulator 全消化道检测仪. 所有实验对象在接受下消化道检测当天, 晨起空腹状态, 肛门内注入两支开塞露, 排便后进行. 实验对象采用左侧屈膝卧位, 肛门指诊后, 将前端带有气囊的导管插入肛门, 当导管进入肛门 10 cm 时用胶布将导管固定. 通过向囊内注入 30℃ 温水, 分别测量初始感受和达到排便紧迫感时的水囊容积.

**统计学处理** 计量资料用 mean  $\pm$  SD 表示, 配对资料采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示有显著性差异.

## 2 结果

根据问卷调查, 腹泻组患者为 183 例占 52%, 便秘组患者为 70 例占 20%, 腹泻和便秘交替出现者为 99 例占 28%. IBS 各组患者与内脏感知有关的临床症状腹部疼痛、胀气等(表 2).

352 名患者中有 76 例接受直肠水囊扩张刺激试验, 其中有腹泻型患者 18 例(24%)、便秘型患者 30 例(40%)、腹泻和便秘交替型患者 28 例(36%). 各组 IBS 患者以及正常对照组直肠水囊容积试验结果如表 3. 腹泻组与正常对照组无论初始阈值还是紧迫感阈值都存在非常显著的差异( $P < 0.01$ ), 而便秘组和腹泻与便秘交替组与正常对照组存在显著差异( $P < 0.05$ ). IBS 三组各组间比较无显著性差异. 76 名患者中有 40 名(53%)患者是以疼痛作为主要临床症状, 36 名(47%)患者是以除腹痛以外的其他内脏感觉异常为主要症状. 与以非腹痛为主的内脏感知异常组相

表2 IBS 各组患者与内脏感知有关的临床症状

内脏感觉症状	腹泻组 <i>n</i> = 183 % ( <i>n</i> )	便秘组 <i>n</i> = 70 % ( <i>n</i> )	腹泻与便秘交替组 <i>n</i> = 99 % ( <i>n</i> )	总计 <i>n</i> = 352 % ( <i>n</i> )
腹部疼痛	68%(124)	54%(37)	62%(61)	63%(222) <sup>a</sup>
腹部胀气	40% (73)	42%(30)	37%(37)	40%(140)
排气过多	35% (65)	23%(16)	31%(31)	32%(112)
排便不净	32% (58)	26%(18)	27%(27)	29%(103)
直肠胀满	24% (44)	31%(22)	20%(20)	24% (66)

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 其他各组.

表3 IBS 各组患者直肠感知检测结果

组别	人数( <i>n</i> )	初始感觉(mL)	紧迫感(mL)
正常对照组	30	$56 \pm 44.04$	$135 \pm 3.55$
实腹泻型	18	$33 \pm 2.20^b$	$86 \pm 4.53^b$
验便秘型	30	$42 \pm 3.69^a$	$96 \pm 3.45^a$
组腹泻便秘交替型	28	$38 \pm 3.56^a$	$102 \pm 4.78^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常对照组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组.

比,以腹痛为主的 IBS 患者组内脏反应阈值降低,其中初始感觉存在显著差异( $P<0.05$ ),紧迫感阈值存在非常显著( $P<0.01$ ).腹痛为主和以非腹痛的其他内脏感知异常为主的 IBS 患者直肠敏感性的检测结果(表4).

表4 腹痛为主和非腹痛为主 IBS 直肠感知检测结果

组别	人数(n)	初始感觉(mL)	紧迫感(mL)
腹痛为主 IBS 组			
腹痛为主 IBS 组	40	26 ± 2.29 <sup>a</sup>	68 ± 4.20 <sup>b</sup>
非腹痛为主 IBS 组	36	42 ± 3.34	94 ± 4.37

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 非腹痛为主 IBS 组, <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 非腹痛为主 IBS 组.

### 3 讨论

IBS 是以内脏感知异常(例如腹部疼痛、胀满或胀气等感觉)和排便习惯改变为特征的一组临床综合征<sup>[2-5]</sup>. IBS 因为缺少可靠的客观诊断指标,其诊断主要是建立在症状学基础之上.对不同人群调查表明,IBS 患者普遍存在不同程度的腹部疼痛和腹痛以外的腹胀、直肠胀满感、排气过多和排便不净等与内脏感知异常相关的症状<sup>[6-10]</sup>.这些症状中尤其是腹痛出现的部位和严重程度与胃和肠道有较密切的关系,而且这些症状的发生常常伴随有一定的心理因素存在<sup>[11]</sup>.目前在世界上广泛采用 Rome II 诊断标准,尽管在这个诊断标准中腹痛和腹部不适没有明显的差别,但是腹痛常被用来评价 IBS 的严重程度,也常用于临床干预后的治疗效果的评价.

IBS 的发病因素不是一个单一的因素,是在一定的病理生理基础上(包括记忆的唤醒、感知异常)的多因素组成的<sup>[12-14]</sup>.许多学者已经发现以气囊扩张作为伤害性刺激,可以导致 IBS 患者直-乙状结肠感知异常,而在健康的正常对照者却不产生同样的反应<sup>[15-18]</sup>.重复的由摄食引起的乙状结肠收缩的延长或者心理刺激同样也能导致 IBS 患者直-乙状结肠感知的异常,使直-乙状结肠产生收缩反应.反复的直-乙状结肠的刺激可以增强黏膜机械性感器的敏感性,使其感知时间延长并使其运动增强<sup>[19]</sup>.我们已经通过动物实验证实反复的直-乙状结肠的刺激可以增强内脏神经的敏感性<sup>[20]</sup>.

以往的直肠伤害性刺激都采用气囊扩张的方法<sup>[22-26]</sup>,但是我们经过反复的试验,发现气囊扩张法由于气囊的弹性回缩作用,不能够准确的反映直肠壁真正承受的压力.水囊容积法则能比较客观的反映因直肠内的容积不同由此对直肠壁所产生的不同压力.

此项研究表明,无论是 IBS 的哪一种类型,除大便习惯的改变以外,其共同的特点是都存在着内脏传入神经的高敏感状态.临床表现为腹痛、腹部胀气、排气过多、排便不净感以及直肠胀满感等与内脏感觉异常相关的症状,而且,在很大程度上各组症状相互重叠,除腹痛与其他各组症状相比较具有统计学意义外( $P<0.05$ ),其他各组症状的发生率在统计学上没有明显的差异.这使

我们有理由认为内脏神经的高敏感状态是 IBS 的共同的临床特征,他作为 IBS 的诊断指标是可靠的.我们发现,在所有的与内脏感知异常有关的症状中,腹痛是内脏神经敏感性增高的一个突出的临床表现.在就诊的患者中有相当部分的人把疼痛作为一种危险疾病的信号.因为有相当多的患者存在疼痛的症状以及对疼痛症状的过分强调,疼痛也往往用来评定 IBS 的程度.近年来投入临床使用的匹维溴胺、奥替溴胺等药物,都是通过阻断钙离子通道,而抑制结肠平滑肌的收缩达到预防和缓解腹痛的作用<sup>[26-27]</sup>.内脏神经敏感性的增高是 IBS 患者许多临床症状产生的基础,如何降低 IBS 患者的内脏神经敏感性,可能成为新的治疗药物的主要治疗目标.

### 4 参考文献

- 1 Menz H, Naliboff B, Munakata J, Niazi N, Mayer EA. Altered rectal perception is biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995;109:40-50
- 2 Drossman DA, Creed FH, Olden KW, Svedlund J, Toner BB, Whitehead WE. Psychosocial aspects of the functional gastrointestinal disorders. *Gut* 1999;45 Suppl 2:II25-30
- 3 Thompson WG, Irvine EJ, Pare P, Ferrazzi S, Rance L. Functional gastrointestinal disorders in Canada: first population-based survey using Rome II criteria with suggestions for improving the questionnaire. *Dig Dis Sci* 2002;47:225-235
- 4 Di Lorenzo C, Youssef NN, Sigurdsson L, Scharff L, Griffiths J, Wald A. Visceral hyperalgesia in children with functional abdominal pain. *J Pediatr* 2001;139:838-843
- 5 Bouin M, Meunier P, Riberdy-Poitras P. Pain hypersensitivity in patients with functional gastrointestinal disorders: a gastrointestinal-specific defect or a general systemic condition? *Dig Dis Sci* 2001;46:2542-2548
- 6 Drewes AM, Petersen P, Rossel P, Gao C, Hansen JB, Arendt-Nielsen L. Sensitivity and distensibility of the rectum and sigmoid colon in patients with irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:827-832
- 7 Van Ginkel R, Voskuil WP, Benninga MA, Taminiau JA, Boeckxstaens GE. Alterations in rectal sensitivity and motility in childhood irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2001;120:31-38
- 8 Simren M, Abrahamsson H, Bjornsson ES. An exaggerated sensory component of the gastrocolonic response in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2001;48:20-27
- 9 Bouin M, Ploured V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganier M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002;122:1771-1777
- 10 Poitras P, Riberdy Poitras M, Plourde V, Boivin M, Verrier P. Evolution of visceral sensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2002;47:914-920
- 11 Drossman DA. Do psychosocial factors define symptom severity and patient status in irritable bowel syndrome? *Am J Med* 1999;107:41-50
- 12 张东伟, 陈锡美, 邹颂海. 胃动素和胆囊收缩素与肠易激综合征的关系. *同济大学学报(医学版)* 2001;22:50-51
- 13 杨云生, 张万岱, 潘德寿, 周殿元, 宋于刚. 肠易激综合征血浆及乙状结肠黏膜中 CCK 及 SP 的含量. *新消化病学杂志* 1997;5:437-438
- 14 Gibbs-Gallag N, Palsson OS, Levy RL, Meyer K, Drossman DA, Whitehead WE. Selective call of gastrointestinal-sensation word: evidence for a cognitive-behavioral contribution to irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1133-1138
- 15 Chang L, Munakata J, Mayer EA, Schulson MJ, Johnson TD, Bernstein CN, Saba L, Naliboff B, Anton PA, Matin K. Percep-

- tual responses in patients with inflammatory and function bowel disease. *Gut* 2000;50:497-505
- 16 Wang L, Fang X, Pan G. Intestinal infection and irritable bowel syndrome. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002;41:90-93
- 17 Bradesi S, Eutamene H, Gracia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats. *Neurogastroenterol Motil* 2002;14:75-82
- 18 Monnikes H, Tabbe JJ, Hildebrande M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, Klapp B, Wiedeemann B, Heymann-Monnikes I. Role of stress functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis* 2002;19:201-211
- 19 Azpiroz F. Dimensions of gut dysfunction in irritable bowel syndrome: altered sensory function. *Can J Gastroenterol* 1999; 13 Suppl A:12A-14A
- 20 姜敏, 张义侠, 傅宝玉, 姜若兰. 大鼠结肠对理化刺激的内脏神经的敏感性. *世界华人消化杂志* 2002;11:1278-1281
- 21 Camilleri M, Coulie B, Tack JK. Viscer hypersensitivity: facts, speculations, and challenges. *Gut* 2001;48:125-131
- 22 Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology* 2000; 119:1276-1285
- 23 肖玉斌, 刘玉兰, 赵利莉. 腹泻型、便秘型肠易激综合征和功能性便秘患者的直肠感觉阈值比较. *世界华人消化杂志* 2002;11: 1291-1294
- 24 张义侠, 刘峰艳, 吕淼, 傅宝玉. 慢性便秘的分型和肛门直肠测压表现. *中华消化杂志* 2001;21:488-490
- 25 詹丽杏, 邹多武, 许国铭. 功能性便秘和便秘型肠易激综合征的结肠传输试验及直肠感觉阈值比较研究. *中华消化内科杂志* 2002;22:19-21
- 26 Wittmann T, Feher A, Rosztoczy A. Effectiveness of pinaverium bromide therapy on colonic motility disorders in irritable bowel syndrome. *Orv Hetil* 1999; 140: 469-473
- 27 詹丽杏, 李兆申, 邹多武, 许国铭, 尹宁. 匹维溴铵治疗肠易激综合征的临床疗效及改变内脏敏感性研究. *中华消化杂志* 2002; 22: 477-480

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

### 1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

### 2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

### 3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. *癌症* 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选; 运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR) 方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达; 并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5) 的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34) 的鼻咽癌活检组织检测到有 EST(N31985) 表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 结论: 染色体 3p21 区域 EST (N31985) 在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (*世界胃肠病学杂志* 2004-06-15)

# 胃腺癌细胞株 SGC7901 中 Fas 及 FasL 的基因转录与表达

齐明, 周世庆, 汪素文, 真岩波, 张淑红

齐明, 周世庆, 汪素文, 真岩波, 张淑红, 山东大学临床医学院, 济南市  
中心医院消化内科 山东省济南市 250013

项目负责人: 周世庆, 250013, 山东省济南市解放路 105 号, 济南市中心医院  
消化内科

电话: 0531-5695061

收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-22

## 摘要

**目的:** 探讨胃腺癌细胞株 SGC7901 中 Fas 及 FasL 基因转录与表达情况, 为胃癌与 Fas 及 FasL 基因的相关研究提供帮助。

**方法:** 利用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测胃腺癌细胞株 SGC7901 中 Fas 及 FasL 基因 mRNA 转录情况。采用免疫细胞化学染色鉴定胃腺癌细胞株 SGC7901 中 Fas 及 FasL 基因有无蛋白表达及其表达程度。

**结果:** 从提取的胃癌细胞总 RNA 中分别扩增出 Fas 及 FasL 的 DNA 片段, 免疫细胞化学染色亦显示胃腺癌细胞株 SGC7901 中存在 Fas 及 FasL 蛋白表达产物。

**结论:** 中国人胃腺癌细胞株 SGC7901 中存在 Fas 及 FasL 基因的 mRNA 转录及蛋白的表达。

齐明, 周世庆, 汪素文, 真岩波, 张淑红. 胃腺癌细胞株 SGC7901 中 Fas 及 FasL 的基因转录与表达. 世界华人消化杂志 2005;13(4):565-566  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/565.asp>

## 0 引言

Fas 又称 Apo1 或 CD95, FasL (Fas Ligand, Fas 配体) 又称 CD95L。目前的研究认为, FasL 是死亡因子, Fas 则是他的受体, 当一个细胞的 FasL 与另一细胞的 Fas 结合时, 可以导致表达 Fas 的细胞凋亡。国外已有研究表明<sup>[1, 7]</sup>, 胃癌组织中存在 Fas 和 FasL 的表达。已知胃腺癌细胞株 SGC7901 为国内研究胃癌常用的细胞株, 为此, 我们利用此株作为研究对象, 对其内 Fas 和 FasL 的基因转录和蛋白表达进行了检测。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胃癌细胞株 SGC7901 细胞由山东省医科院提供, 在 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 温度 37℃ 条件下, 生长在含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中。待细胞贴壁长满后, 收集细胞悬液以满足不同需要。

### 1.2 方法

**1.2.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Fas、FasL mRNA 的表达** 取生长良好的 SGC7901 细胞 5×10<sup>6</sup>, 以 Trizol 试剂(美国 GIBCO 公司)提取总 RNA, 以紫外分光光度计检验纯度并定量, 在 4 g/L 甲醛变性凝胶上电泳

验证 RNA 完整。RT-PCR 采用一步法试剂盒(日本 KaTaRa 公司), 按厂家推荐步骤进行。实验中以 β-actin 为内参照, 对样品模板用量标准化。引物设计: β-actin 上游: 5' ATCATGTTTGAGACCTTCAACA 3', 下游: 5' CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 3'; Fas 上游: 5' CATGGCTTAGAAGTGGAAAT 3', 下游: 5' ATTTATTGCCACTGTTTCAGG 3'; FasL 上游: 5' ATGTTTCAGCTCTTCCACCTACAGA 3; 下游: 5' AGAGAGAGCTCAGATACGTTGAC 3'。RT-PCR 循环条件: 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 充分延伸 7 min。基因扩增产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 以 Fluor-S 多功能成像系统(美国 BIO-RAD 公司)扫描拍照。

**1.2.2 免疫细胞化学染色** 取生长良好的 SGC7901 细胞进行免疫细胞化学染色, 采用爬片的方法制备细胞标本, 方法简介如下: 标本用 PBS 洗去培养基, 细胞经冷丙酮固定 10 min(室温)后, 按免疫细胞化学染色试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司)说明步骤完成免疫细胞化学染色。一抗为兔抗人纯化抗体(1:500), 37℃ 孵育 1 h, 滴加二抗生物素化山羊抗兔 IgG(1:100) 37℃ 20 min, 以 PBS 替代一抗作为阴性对照。空白对照和替代对照均显示阴性的前提下, 以在细胞膜、胞质内出现棕黄色物且染色强度高于空白对照背景者为阳性。数 3 个以上高倍镜视野, 细胞数大于 500 个, 计算阳性率。

## 2 结果

**2.1 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳条带分析显示,** 胃癌细胞株 SGC-7901 细胞总 RNA 中分别扩出 339 bp 和 499 bp 大小的产物, 与引物设计的预期扩增片段大小一致, 提示胃癌细胞株 SGC7901 细胞中有 Fas、FasL 基因 mRNA 的表达(图 1)。

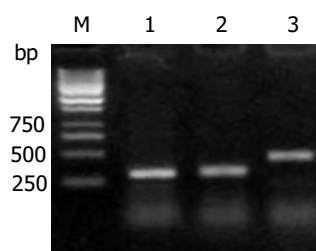


图1 胃癌细胞株 SGC7901 细胞中 Fas、FasL 基因 mRNA 的表达。M: DNA Marker; 1: β-actin; 2: Fas; 3: FasL。

**2.2 免疫组织化学染色显示胃癌细胞株 SGC7901 细胞中有 Fas、FasL 蛋白的表达,** 两种蛋白主要分布在细胞质中, 呈棕黄色(图 2), 其阳性表达率分别为 42.8% 和 74.3%。

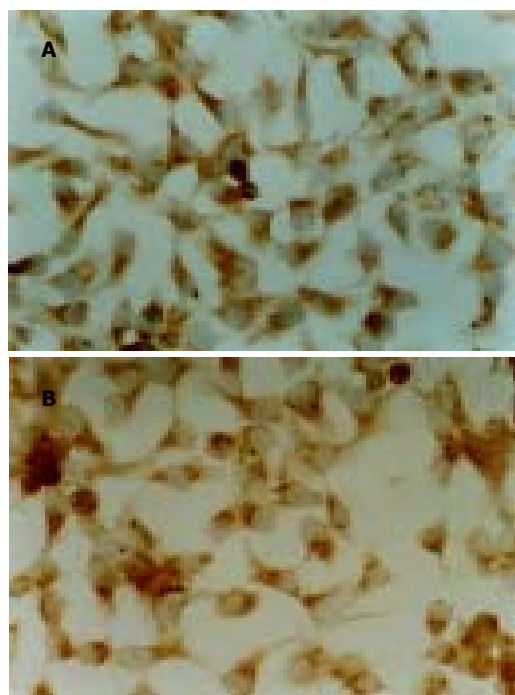


图2 胃癌细胞株SGC7901细胞染色. A: Fas; B: FasL.

### 3 讨论

Fas 为 I 型跨膜蛋白, 属肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 及神经生长因子受体 (NGFR) 家族成员, Fas 广泛存在于多种类型的细胞膜上; FasL 为 II 型跨膜糖蛋白, 属 TNF 家族成员, FasL 主要表达于活性 T 淋巴细胞<sup>[2]</sup>、NK 细胞及 LAK 细胞等免疫细胞的细胞膜上, 此外在免疫豁免组织 (脑、睾丸、眼) 的细胞膜上也有 FasL 的天然表达<sup>[3]</sup>. FasL 是一种细胞凋亡因子, 为 Fas 的配体, 当其与细胞表面的 Fas 结合后可激活细胞内凋亡信号, 引起 Fas 阳性细胞的凋亡<sup>[4]</sup>.

活性 T 细胞及 NK 细胞通过利用 Fas/FasL 系统介导的细胞凋亡作用, 清除体内的病毒感染细胞、异体移植物、衰老的单核细胞、中性粒细胞以及部分激活的 T、B 细胞来发挥细胞免疫、维持免疫平衡及调节免疫反应等重要作用. 在免疫豁免组织中, 由于这些组织的细胞膜上 FasL 表达, 可导致邻近的活性 T 淋巴细胞凋亡, 使这些部位免受炎症侵害, 从而起到免疫豁免作用. 由此可见, 通过 Fas/FasL 系统介导 Fas 阳性的细胞凋亡不仅可由活性 T 细胞引起, 而且表达 FasL 的细胞同样可以引起 Fas 阳性的活性 T 细胞凋亡, 以达到免疫下调作用. 研究发现, 许多恶性肿瘤细胞膜上 Fas 表达明显下调, 而 FasL 表达增高<sup>[5]</sup>, 这与免疫豁免组织中表现一致, 认为这些恶性肿瘤在机体内类似于免疫豁免组织, 使机体对肿瘤的免疫作用下调, 从

而逃避了机体对肿瘤细胞的免疫清除. 亦有学者认为在肿瘤的免疫逃避过程中起关键性作用的是 FasL 表达增高而不是 Fas 表达下调<sup>[2, 5]</sup>.

胃癌细胞株 SGC7901 是国内学者利用国人胃癌组织自行建株的细胞系, 也是国内研究胃癌病因及治疗中最常用的人胃腺癌细胞株<sup>[6]</sup>, 确定其有无 Fas 和 FasL 的基因转录和蛋白的表达, 将对利用 Fas 和 FasL 基因进行胃癌的治疗等相关研究提供极大帮助. Li *et al*<sup>[7]</sup> 研究发现, Fas 蛋白在胃癌组织中的表达为 19.0%, 在正常胃黏膜中为 64.2%; FasL 蛋白在胃癌组织中的表达为 63.8%, 在正常胃黏膜中为 45.3%. 我们通过 RT-PCR 和免疫细胞化学染色对 SGC7901 细胞株中 Fas 和 FasL 基因表达情况进行了检测, 发现此种细胞株均存在 Fas 和 FasL 基因的 mRNA 转录及较强的蛋白表达, 结果与 Li *et al* 的结果相符. 本研究不仅为以后科研人员利用这种胃癌细胞株进行 Fas 和 FasL 基因的相关研究提供了极大的方便, 同时也提示中国人胃腺癌细胞也存在 Fas 和 FasL 基因的表达, 且 FasL 的表达明显高于 Fas 的表达. 提示在胃癌的发生、发展过程中存在免疫逃逸机制, 上调 Fas 的表达或阻断 FasL 的表达, 将有助于对胃癌的治疗.

### 4 参考文献

- 1 Martin JH, Potthoff A, Ledig S, Cornberg M, Jandl O, Manns MP, Kubicka S, Flemming P, Athmann C, Beil W, Wagner S. Effect of *H pylori* on the expression of TRAIL, FasL and their receptor subtypes in human gastric epithelial cells and their role in apoptosis. *Helicobacter* 2004;9:371-386
- 2 Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschoep J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274:1363-1366
- 3 Medvedev AE, Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Egeberg K, Lynch DH, Sundan A, Espevik T. Regulation of Fas and Fas ligand expression in NK cell by cytokine and the involvement of Fas-ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine* 1997;9:394-404
- 4 Dechant MJ, Fellenberg J, Scheuerpflug CG, Ewerbeck V, Debatin KM. Mutation analysis of the apoptotic "death-receptors" and the adaptors TRADD and FADD/MORT-1 in osteosarcoma tumor samples and osteosarcoma cell lines. *Int J Cancer* 2004;109:661-667
- 5 Cui H, Sherr DH, el-Khatib M, Matsui K, Panka DJ, Marshak-Rothstein A, Ju ST. Regulation of T-cell death genes: selective inhibition of FasL but not Fas mediated function. *Cell Immunol* 1996;167:276-284
- 6 富志民, 刘亚伦, 唐国基. 人体胃癌细胞株 SGC7901 培养及其特性. *肿瘤临床* 1984;3:57-60
- 7 Li Z, Wang Z, Zhao Z, Zhang Y, Ke Y. Expression of Fas, FasL and IFN-gamma in gastric cancer. *Beijing Daxue Xuebao* 2003; 35:386-389



## HSP90 $\alpha$ 蛋白在人结肠癌中的表达

李海军, 戴 洁, 张林西, 金春亭, 李玉珍

李海军, 张林西, 金春亭, 李玉珍, 河北北方学院病理学教研室 河北省  
张家口市 075029

戴洁, 首都医科大学教务处 北京市 100054

河北省科技攻关计划项目, No. 00276162D

河北省自然科学基金课题, No. 301427

项目负责人: 戴洁, 100054, 北京右安门外西头条 10 号, 首都医科大学教  
务处: sydaijie@cpums.edu.cn

电话: 010-63051169

收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2004-11-25

### 摘要

**目的:** 探讨 HSP90 $\alpha$  在我国结肠癌中的表达特点, 为应用 HSP90 $\alpha$  抑制剂治疗结肠癌提供依据。

**方法:** 应用免疫组化 SP 方法对 88 例人结肠癌组织中 HSP90 $\alpha$  的表达进行检测。

**结果:** HSP90 $\alpha$  在结肠癌细胞质表达, 胞质被染成深浅不一的棕黄色。HSP90 $\alpha$  表达在不同 Dukes 分期阳性率差异显著 ( $P < 0.01$ )。其在 Dukes B 期及 C 期的阳性率分别为 47.17%、80.0%。HSP90 $\alpha$  表达分别与患者性别、年龄、癌发部位、癌细胞分化程度及浸润深度等无显著相关性 ( $P > 0.05$ )。

**结论:** HSP90 $\alpha$  的表达与结肠癌的浸润进展密切相关, HSP90 $\alpha$  抑制剂可用于结肠癌的辅助治疗。

李海军, 戴洁, 张林西, 金春亭, 李玉珍. HSP90 $\alpha$  蛋白在人结肠癌中的表达.  
世界华人消化杂志 2005;13(4):567-569

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/567.asp>

### 0 引言

结肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 其发生机制目前仍不清楚。随着对结肠癌研究的深入, 目前已发现多种基因表达异常与其形成有密切关系, 可能是多种基因突变的结果。近年来, 热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 与肿瘤的关系是研究的热点之一。已有研究表明, HSP90 $\alpha$  表达异常与消化道系统恶性肿瘤<sup>[1-4]</sup>、肺癌<sup>[5-6]</sup>及乳腺癌<sup>[7-9]</sup>等有关。而较少有对结肠癌中 HSP90 $\alpha$  表达状况的研究。我们应用免疫组化 SP 方法对 88 例结肠癌组织中 HSP90 $\alpha$  的表达进行检测, 探讨其与临床病理特征的关系, 为结肠癌的临床治疗及深入研究提供重要资料。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集河北北方学院附属第一医院 1999-06/2003-07 间结肠癌手术切除标本 88 例。其中男性 54 例, 女性 34 例, 平均年龄 54.8 岁。≥ 60 岁 51 例, < 60 岁 37 例。左半结肠癌 63 例, 右半结肠癌 25 例。高分化腺癌 41 例, 中分化腺癌 36 例, 低分化腺癌 11 例。浅肌层 8 例, 深肌

层 34 例, 浆膜层 46 例。Dukes A 期 0 例, B 期 53 例, C 期 35 例。所有病例均无同时患其他恶性肿瘤。患者手术前均未经放疗或化疗。HSP90 $\alpha$  抗体为兔抗人多克隆抗体, 美国 Santa Cruz 公司产品。SP 免疫组织化学染色试剂盒及 DAB 显色剂购自北京中山生物技术有限公司。

**1.2 方法** 手术切除结肠癌标本及时取材, 常规切取癌组织, 同时对区域淋巴结进行取材。标本经 40 g/L 中性甲醛溶液固定, 梯度酒精脱水、石蜡包埋, 每个检测蜡块进行连续切片 6-8 张, 厚度为 5  $\mu$ m。每例取一张做 HE 染色常规病理组织检查, 进行病理学诊断及分类, 剩余行免疫组化染色。切片用医用微波炉进行抗原修复, 按说明书进行免疫组化染色, DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水、透明及中性树胶封片。每批实验均设有已知阳性切片对照及 PBS 替代 I 抗的阴性对照。阳性对照片充分显色后终止显色。光镜下观察, 细胞质被染成大小不等、深浅不一的棕黄色颗粒的为阳性细胞。癌组织间质不着色。每张切片随机观察 6-8 个高倍视野, 阳性细胞数超过 5% 时即确定为染色阳性病例。染色结果判定参照 1996 年全国免疫组织化学技术与诊断标准化专题研讨会意见, 将染色结果分为: 阴性 (-), < 5% 的细胞着色; 弱阳性 (+), 细胞质或膜内有 5-24% 的细胞着色, 为浅黄色颗粒; 阳性 (++), 25-50% 的细胞着色, 为黄色颗粒; 强阳性 (+++), > 50% 的细胞着色, 为棕黄色颗粒。

**统计学处理** 实验资料应用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析, HSP90 $\alpha$  阳性率的比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  认为差异具有显著性。

### 2 结果

HSP90 $\alpha$  蛋白在结肠癌中的表达主要表现为癌细胞胞质呈棕黄色颗粒状 (图 1), 其表达的阳性率为 60.23% (53/88)。HSP90 $\alpha$  阳性表达分别与患者性别、年龄、癌发部位、分化程度及浸润深度无显著相关性 ( $P > 0.05$ )。但是其表达随浸润深度的增加有逐渐增高趋势。HSP90 $\alpha$  的表达与 Dukes 分期有关 (表 1)。HSP90 $\alpha$  在 Dukes B 期阳性率为 47.17%; Dukes C 期的阳性率为 80%, 组间差异具有显著性 ( $P < 0.01$ )。

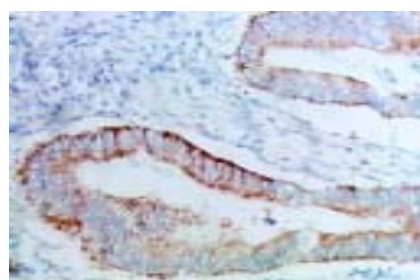


图 1 HSP90 $\alpha$  蛋白在结肠癌中的表达 (+++).



表1 HSP90 $\alpha$  蛋白在结肠癌中的表达

临床病理特征		n	HSP90 $\alpha$ 表达	
			阳性例数(%)	P
性别	男	54	32(59.26)	0.815
	女	34	21(61.76)	
年龄	$\geq 60$	51	33(64.71)	0.314
	$<60$	37	20(54.05)	
部位	左半结肠	63	39(61.90)	0.610
	右半结肠	25	14(56.00)	
分化程度	高分化	41	25(60.98)	0.590
	中分化	36	20(55.56)	
	低分化	11	8(72.73)	
浸润深度	浅肌层	8	3(37.50)	0.328
	深肌层	34	20(58.82)	
	浆膜层	46	30(65.22)	
Dukes 分期	A	0	0	0.002
	B	53	25(47.17)	
	C	35	28(80.00)	

### 3 讨论

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是指细胞在应激原特别是环境高温诱导下所生成的一组高度保守性蛋白质,这一现象被称为热休克应答(heat shock response, HSR). HSP 的生成是普遍存在于从细菌直至人类的整个生物界的一种现象.一般根据其同源程度以及分子量的大小可分为HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、小分子HSP及泛素等几个家族. HSP 在进化过程中具有高度保守性,说明他们具有普遍存在的重要生理功能.其主要是通过应激状态下生成保护细胞生命活动必需的蛋白质以维持细胞的生存. HSP 通常与具有不同功能的多种蛋白质在细胞中形成复合体,并通过复合体的形成或者解离而参与有关蛋白的折叠、亚基的组成、细胞内运输以及蛋白质降解等过程,以调节靶蛋白的活性和功能,但又不参与靶蛋白的组成.因此, HSP 又被认为是一种“分子伴侣(molecular chaperone)”或“伴侣蛋白”<sup>[10]</sup>.

近年研究发现, HSP 与肿瘤的发生、发展以及肿瘤患者的预后等都有密切关系.但不同家族的HSP及同一家族内HSP的不同成员在肿瘤发生中各自所起的作用尚有待进一步研究.目前,在众多HSP中对HSP70研究较多.一些学者报道<sup>[11-12]</sup>, HSP70 在一些肿瘤组织中表达增加.但关于HSP90与肿瘤的关系特别是与结肠癌的关系的研究报道较少. HSP90 以是否含有丰富的谷氨酰胺片段而分为HSP90 $\alpha$ 和HSP90 $\beta$ 两类. HSP90 多以 $\alpha$ - $\alpha$ 和 $\beta$ - $\beta$ 同源二聚体形式存在.在胰腺癌中, HSP90 $\alpha$ 呈选择性高表达<sup>[3]</sup>.在本研究中,我们应用免疫组化方法,对HSP90 $\alpha$ 在结肠癌细胞中的表达进行了研究. HSP90 $\alpha$ 在结肠癌组织中表达的阳性率为60.23%(53/88),提示其可能与结肠癌的形成及发展有关.

HSP90 $\alpha$  可通过调节细胞周期而促进细胞增生<sup>[12-13]</sup>. 本研究中, HSP90 $\alpha$  在结肠癌组织中的表达分别与患者性别、年龄、癌的发生部位、分化程度及浸润深度无显著相关性( $P>0.05$ ).但 HSP90 $\alpha$  的表达随癌细胞浸润深度的增加阳性率有增高趋势.我们还发现, HSP90 $\alpha$  表达与Dukes 分期密切相关.随Dukes 分期的增高, HSP90 $\alpha$  表达阳性率明显增高. Dukes B 期为47.17%, Dukes C 期为80%.说明结肠癌的浸润进展及转移与 HSP90 $\alpha$  表达显著相关. HSP90 $\alpha$  表达阳性率愈高,患者病期可能愈晚,可能已经发生了淋巴结转移,提示患者预后较差.有研究认为<sup>[11, 13-14]</sup>, HSP 可能是判断患者预后的标志物. HSP90 在乳腺癌中高表达往往预示着预后较差<sup>[12]</sup>.

研究发现, HSP90 $\alpha$  可能是新的抗癌药物治疗恶性肿瘤的新的分子靶点<sup>[15-17]</sup>.目前, HSP90 抑制剂如17AAG已经进入I 期临床试验<sup>[17-18]</sup>,针对HSP90 分子靶点的对不同肿瘤的研究正在进行中<sup>[19-22]</sup>.不久的将来HSP90 抑制剂用来治疗结肠癌等恶性肿瘤将成为现实.因此,对恶性肿瘤中HSP90 表达水平的检测就显得尤为重要.

总之,机体在应答各种环境压力刺激时所产生的HSP对机体具有保护作用. HSP90 $\alpha$  与肿瘤的关系尤其是在结肠癌的发生、预后评估和抗肿瘤治疗等方面的具体作用及机制有待更深入的研究.

### 4 参考文献

- Liu XL, Xiao B, Yu ZC, Guo JC, Zhao QC, Xu L, Shi YQ, Fan DM. Down-regulation of Hsp90 could change cell cycle distribution and increase drug sensitivity of tumor cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:199-208
- Zuo DS, Dai J, Bo AH, Fan J, Xiao XY. Significance of expression of heat shock protein90alpha in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2616-2618
- Ogata M, Naito Z, Tanaka S, Moriyama Y, Asano G. Overexpression and localization of heat shock proteins mRNA in pancreatic carcinoma. *J Nippon Med Sch* 2000;67:177-185
- Schueler G, Paolini P, Friedl J, Stift A, Dubsky P, Bachleitner-Hofmann T, Jakesz R, Gnant M. Heat treatment of hepatocellular carcinoma cells: increased levels of heat shock proteins 70 and 90 correlate with cellular necrosis. *Anticancer Res* 2001; 21:295-300
- Zhong L, Peng X, Hidalgo GE, Doherty DE, Stromberg AJ, Hirschowitz EA. Antibodies to HSP70 and HSP90 in serum in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Detect Prev* 2003; 27:285-290
- Luo LY, Herrera I, Soosaipillai A, Diamandis EP. Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library. *Br J Cancer* 2002;87:339-343
- Beliakoff J, Whitesell L. Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2004;15:651-662
- Beliakoff J, Bagatell R, Paine-Murrieta G, Taylor CW, Lykkesfeldt AE, Whitesell L. Hormone-refractory breast cancer remains sensitive to the antitumor activity of heat shock protein 90 inhibitors. *Clin Cancer Res* 2003;9:4961-4971
- Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res* 2003;63:2139-2144
- Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33-45
- Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Davaris PS, Panoussopoulos

- D, Nakopoulou L, Kittas C, Golematis BC. Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression. Prognostic implications in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1995;38:739-745
- 12 Yano M, Naito Z, Tanaka S, Asano G. Expression and roles of heat shock proteins in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:908-915
- 13 Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:570-574
- 14 Hettinga JV, Lemstra W, Meijer C, Los G, de Vries EG, Konings AW, Kampinga HH. Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and -resistant human tumor cells. *Int J Cancer* 1996;67:800-807
- 15 Solit DB, Scher HI, Rosen N. Hsp90 as a therapeutic target in prostate cancer. *Semin Oncol* 2003;30:709-716
- 16 Banerji U, Judson I, Workman P. The clinical applications of heat shock protein inhibitors in cancer - present and future. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3:385-390
- 17 Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 2003;425:407-410
- 18 Burger AM, Fiebig HH, Stinson SF, Sausville EA. 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin activity in human melanoma models. *Anticancer Drugs* 2004;15:377-387
- 19 Vasilevskaya IA, Rakitina TV, O'Dwyer PJ. Quantitative effects on c-Jun N-terminal protein kinase signaling determine synergistic interaction of cisplatin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in colon cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 2004;65:235-243
- 20 Braga-Basaria M, Hardy E, Gottfried R, Burman KD, Saji M, Ringel MD. 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin activity against thyroid cancer cell lines correlates with heat shock protein 90 levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2982-2988
- 21 Bisht KS, Bradbury CM, Mattson D, Kaushal A, Sowers A, Markovina S, Ortiz KL, Sieck LK, Isaacs JS, Brechbiel MW, Mitchell JB, Neckers LM, Gius D. Geldanamycin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiate the in vitro and in vivo radiation response of cervical tumor cells via the heat shock protein 90-mediated intracellular signaling and cytotoxicity. *Cancer Res* 2003;63:8984-8995
- 22 Enmon R, Yang WH, Ballangrud AM, Solit DB, Heller G, Rosen N, Scher HI, Sgouros G. Combination treatment with 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin and acute irradiation produces supra-additive growth suppression in human prostate carcinoma spheroids. *Cancer Res* 2003;63:8393-8399

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2005北京协和国际消化疾病论坛征文通知

本刊讯 “北京协和国际消化疾病论坛”由北京协和医院主办，中华医学会北京分会、中华医学会继续教育部、中国医学论坛报、《中国卫生人才》、中国全科医学杂志社协办，现定于2005-10-20/2005-10-23在北京召开。会议将邀请国内外众多此领域具有较深造诣的知名专家参会作专题报告及内镜操作表演。国家继续教育委员会将授予与会人员I类继续教育学分8分。论坛期间还将举办药品及器械展览活动。

### 1 会议具体安排

地点：中国·北京京都信苑饭店（五星级）（暂定）。会务费：2005-08-15前付费¥800元；2005-08-15后（含）付费¥900元。付款方式：Bank Remittance（汇款），开户行：中国建设银行北京广安门直航，户名：北京世纪安德广告有限公司，账号：11001042200053000033。地址：北京市丰台区方城园一区17号楼A座1603室（组委会），邮编：100078。电话：010-58075131、58075132、58075088、58075099，传真：010-58075138，电子信箱：puiddf@163.com。请在汇款时务必表明款项的用途为：2005北京协和国际消化疾病论坛会务费，2005北京协和国际消化疾病论坛秘书处 2005-1。

### 2 会议议题

会议的议题包括：（1）消化系统疾病的发病机制、诊断和治疗的研究进展；（2）消化系统肿瘤的发病机制、治疗及预防的进展；（3）消化系统内镜的应用现状及操作表演；（4）肝病及肝癌的研究进展；（5）消化系统疾病的外科治疗及研究现状。

### 3 其他事项

截稿日期：2005-07-15。大会秘书处联系人：李景南，北京协和医院消化内科 100730。电话：010-65295017，电子信箱：ljndr@yahoo.com。大会组委会联系人：王双、白雪。

## 中药方剂治疗早期急性重症胰腺炎68例

张 顺, 申 杰, 相亭海, 邱发波, 郭卫东, 张 斌, 吴力群

张顺, 申杰, 相亭海, 邱发波, 郭卫东, 张斌, 吴力群, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科 山东省青岛市 266003

项目负责人: 张顺, 266003, 山东省青岛市市南区江苏路19号, 青岛大学医学院附属医院, zhangshun@medmail.com.cn

电话: 0532-2911369

收稿日期: 2004-10-15 接受日期: 2004-11-04

### 摘要

**目的:** 探讨中药方剂在急性重症胰腺炎早期应用的临床治疗效果。

**方法:** 急性重症胰腺炎120例, 分为单纯非手术治疗组(对照组)和加用中药方剂治疗组(治疗组)。回顾性分析两组治疗后腹痛、腹胀、排便排气、生化指标的变化; 并发症发生率、死亡率、治愈率; 住院天数。

**结果:** 治疗组腹痛、腹胀消失快; 排便排气恢复快, 与对照组比较有显著性差异( $P<0.01$ ); 治疗组生化指标的恢复时间缩短( $P<0.01$ ); 缩短住院时间, 与对照组比较有显著性差异( $P<0.01$ ); 并发症发生率和死亡率无差异。

**结论:** 中药方剂在急性重症胰腺炎早期有效。

张顺, 申杰, 相亭海, 邱发波, 郭卫东, 张斌, 吴力群. 中药方剂治疗早期急性重症胰腺炎68例. 世界华人消化杂志 2005;13(4):570-571  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/570.asp>

### 0 引言

急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis SAP)是普外科临床常见的急腹症, 其并发症多, 死亡率高, 疗程长. 费用高. 随着对其发病机制的逐步深入了解, 近几年临床采用了个体化治疗方案, 使急性重症胰腺炎的疗效有了显著提高. 现将我科近10 a用中药方剂对急性重症胰腺炎的个体化治疗效果总结如下。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 1993-2003年急性重症胰腺炎住院采用非手术治疗患者120例, 男75例, 女44例; 年龄25-76岁(平均为53.3)岁. 根据患者入院时是否加用中药方剂, 将患者分为非手术治疗组52例(对照组); 加用中药方剂治疗组68例(治疗组). 中药方剂主由大黄9克、芒硝15克、厚朴30克、丹皮9克、柴胡15克、黄芪9克、姜下9克、竹茹9克、乌贼骨30克组成. 每方剂取药液约200 mL, 冷却至温热备用。

**1.2 方法** 对照组严密监护下采用: (1) 禁食、胃肠减压; (2) 补充血容量、纠正水电解质酸碱平衡紊乱; (3) 抑制胰液分泌, 应用生长抑素; (4) 静脉应用抗生素预防感染;

(5) 外科营养支持治疗; (6) 胰外器官损伤的对症治疗, 如纠正低氧血症、保护肾功能等. 治疗组在应用上述治疗方法同时, 给中药方剂100-200 mL经胃管中注入或口服. 注药后监听肠鸣音变化, 肠鸣音变弱过程中, 随时注入中药方剂100-200 mL, 维持肠鸣音, 直至患者排便排气. 观察两组患者临床腹痛、腹胀缓解时间; 恢复排便排气时间; 住院天数; 血、尿淀粉酶, 白细胞计数及乳酸脱氢酶恢复时间; 治愈率; 并发症发生率、死亡率。

**统计学处理** 计量资料以均值 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 经分析两组中的腹痛, 腹胀, 恢复排气排便, 住院天数及血淀粉酶等数据方差不齐且非正态分布, 采用秩和检验; 尿淀粉酶, 白细胞计数及乳酸脱氢酶等数据呈正态分布且方差齐, 采用 $t$ 检验; 对治愈率、并发症及死亡的比较采用 $\chi^2$ 检验. 统计分析在SPSS 10.0软件进行,  $P<0.05$ 为有统计学显著性差异。

### 2 结果

治疗组与对照组相比较, 腹痛、腹胀时间, 恢复排气排便时间能明显缩短, 缩短住院时间, 能快速改善症状, 均有显著的统计学意义(表1). 血清乳酸脱氢酶(LDH)、血、尿淀粉酶, 白细胞计数显著改善, 均有显著的统计学意义(表2)。

治疗组的68例中有52例治愈, 治愈率为76.5%, 显著高于对照组的57.7%. 并发症发生率的差别则无显著性(13/68 vs 17/52,  $\chi^2$ 检验). 治疗组中13例并发症包括: 胰腺假性囊肿6例, ARDS 2例, 胰性脑病1例, 胰周脓肿4例; 对照组中17例并发症包括: 胰腺假性囊肿11例, ARDS 1例, 胰性脑病2例, 胰周脓肿3例。

表1 两组急性重症胰腺炎患者临床症状缓解天数比较(mean  $\pm$  SD)

组别	例数(n)	腹痛	腹胀	恢复排气排便	住院天数
治疗组	68	3.7 $\pm$ 2.6	4.1 $\pm$ 2.4	3.3 $\pm$ 1.7	18.1 $\pm$ 4.8
对照组	52	5.8 $\pm$ 4.0	5.2 $\pm$ 3.2	4.9 $\pm$ 2.5	22.2 $\pm$ 9.1

$P<0.01$ , 治疗组 vs 对照组.

表2 两组急性胰腺炎患者临床检验指标的恢复天数比较(mean  $\pm$  SD)

组别	例数(n)	血淀粉酶	尿淀粉酶	白细胞计数	乳酸脱氢酶
治疗组	68	4.9 $\pm$ 2.4	6.4 $\pm$ 2.3	6.3 $\pm$ 2.1	4.8 $\pm$ 1.8
对照组	52	6.7 $\pm$ 2.5	8.4 $\pm$ 2.7	9.5 $\pm$ 2.1	7.2 $\pm$ 3.4

$P<0.01$ , 治疗组 vs 对照组.

### 3 讨论

我们在急性胰腺炎患者入院后立即以临床表现, RANSON 指标和腹部CT评估, 符合重症胰腺炎, 排除胆石引起的急性梗阻性化脓性胆管炎后, 即刻采用非手术治疗, 治疗组加用SS-1中药方剂(胃管注入或口服), 刺激肠鸣音出现并维持至排便排气。我们观察到患者排便排气后, 腹痛、腹胀明显缓解好转, 全身情况好转; 临床相关实验室指标逐渐恢复正常; 与对照组比较, 治愈率有明显的差异, 但并发症和死亡发生率则无明显差异, 可能有两方面的原因: (1)所观察的并发症和死亡病例数较少有关; (2)急性重症胰腺炎一旦发生多器官功能衰竭, 任何治疗方法疗效都差。中药方剂在非手术综合治疗的前提下, 对急性重症胰腺炎的疗效显著优于对照组, 其机制有以下几个方面: 中药方剂中的大黄、芒硝等能通过刺激胃肠道黏膜和肌层间的局部神经-内分泌网络恢复肠道平滑肌的运动。大黄素能与平滑肌肌球蛋白结合而表现胆碱能的作用, 他能抑制ATP酶的活性, 抑制 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 从肠腔转运至细胞, 使水分滞留在肠腔, 从而刺激肠道, 使其推进性蠕动增加而利于排便<sup>[1]</sup>。我们观察到重症胰腺炎患者腹胀明显、肠鸣音减弱或消失, 证明胃肠道处于麻痹状态下。经胃管注入中药方剂后即能听到肠鸣音, 一段时间后消失。继续注入中药方剂肠鸣音仍能恢复; 如持续间断注入可维持肠鸣音持续存在直至出现排便排气。说明胃肠道在接触中药时出现局部平滑肌运动, 而非腹腔神经丛调控的生理性运动。胃肠运动的出现和排便排气的恢复, 能多方面改善局部和全身的病理生理变化: 改善胃肠道麻痹性梗阻, 降低胃肠道内压, 进而预防腹腔高压或腹腔间隔综合征的发生, 预防并改善呼吸功能不全、肾脏缺血; 增加回心血容量<sup>[2]</sup>; 排便排气能将肠道内大量富含细胞因子和炎性递质的液体排出体外, 减少吸收, 能预防和减轻全身炎症反应综合征的发生; 肠道内压和腹腔内压降低, 能改善肠壁血运, 纠正氧代谢障碍, 防治肠壁淤血水肿, 维持肠黏膜屏障完整, 防止细菌易位和内毒素吸收。动物急性重症胰腺炎模型上发现, 发病后72 h内在门、腔静脉血和大小肠系膜淋巴结, 肺胰组织等部位找到大量易位细菌。考虑为肠源性细菌易位<sup>[3]</sup>。实验证实肠道膜菌群紊乱, 肠杆菌计数明显增多, 而双歧杆菌和乳酸杆菌明显

减少<sup>[4]</sup>。肠黏膜的组织结构, 发现肠黏膜细胞间紧密连接开放, 通透性增加; 肠黏膜上皮细胞凋亡增加; 黏膜内PH值降低, 导致肠黏膜屏障破坏<sup>[5-7]</sup>。上述菌群失调和黏膜完整性的破坏导致了重症急性胰腺炎的细菌易位和内毒素血症。肠道内富含有害细胞因子液体的排出, 减少了对肠道黏膜层中肥大细胞的刺激和激活, 减少了大量细胞因子的释放<sup>[8]</sup>。现代药理研究表明, 大黄所含的大黄素、大黄酸和芦荟大黄素等具有广谱抗菌的作用<sup>[9]</sup>。中药方剂经局部神经-内分泌肠运动到达结肠, 抑制致病菌过度生长和产生内毒素, 恢复正常肠道内菌群, 同时大黄还能维持肠黏膜屏障<sup>[10]</sup>。大黄素等药物能降低血液的浓聚黏稠状态; 可能通过抑制二十碳烯酸类异常代谢, 降低血小板活化因子(PAF)、血栓素A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)、前列腺素I<sub>2</sub>(PGI<sub>2</sub>)、内皮素(ET)的血浓度, 改善胰腺微循环<sup>[11]</sup>。在大鼠急性胰腺炎模型上观察到大黄素治疗后损伤的胰腺细胞中凋亡调控基因Bax mRNA显著升高, 诱导胰腺细胞凋亡, 减轻胰腺组织的炎症反应, 使胰腺组织形态基本恢复正常<sup>[12]</sup>。

### 4 参考文献

- 1 杨纯正. 大黄的生物活性及其有效成分. 国外医学. 中医中药分册 1986;8:27-30
- 2 Gecelter G, Fahoum B, Gardezi S, Schein M. Abdominal compartment syndrome in severe acute pancreatitis: an indication for a decompressing laparotomy. *Dig Surg* 2002;19:402-405
- 3 屠伟峰, 黎介寿, 朱维铭, 李珍大, 邵海峰, 肖光夏, 黎鳌. 猪急性重症胰腺炎与肠源性细菌/内毒素易位. 中国胃肠外科杂志 1998;1:22-25
- 4 葛萍, 卓越, 武荣国, 韩桂华, 郭公新, 孔心涓, 孙钰清. 急性重症胰腺炎肠道菌群变化研究. 黑龙江医药科学 1999;22:23
- 5 尚占民, 王宝恩, 张淑文. 急性重症胰腺炎大鼠肠黏膜超微结构的改变. 中国急救医学 2001;21:445-447
- 6 尚占民, 王宝恩, 张淑文. 急性重症胰腺炎大鼠肠黏膜内pH及氧代谢的改变. 中国危重病急救医学 2001;13:226-228
- 7 尚占民, 王宝恩, 张淑文. 细胞凋亡在急性重症胰腺炎肠道黏膜屏障功能障碍中的意义. 中国危重病急救医学 2000;12:394-396
- 8 张敏敏, 李兆申. 肥大细胞在急性胰腺炎发病过程的作用. 国外医学·消化系疾病分册 2003;23:300-302
- 9 曾庆良, 谢义明, 邹焰. 中西医结合“攻下”与手术治疗急性重症胰腺炎40例临床分析. 遵义医学院学报 1996;19:74-76
- 10 王海波, 关凤林. 清胰汤防治急性重症胰腺炎大鼠结肠黏膜损害实验研究. 中华中西医杂志 2002;3:1358-1359
- 11 吴建新, 徐家裕, 袁耀宗. 大黄素与善得定对重症胰腺炎胰缺血的影响及机制. 中国中西医结合杂志 1997;17:356-359
- 12 潘亮, 袁耀宗, 章永平, 乔敏敏, 翟祖康. 大黄素诱导急性胰腺炎胰腺细胞凋亡机制的实验研究. 胰腺病学 2002;2:214-217

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 手助腹腔镜治疗复杂胆结石5例

魏琪, 沈来根, 郑和鸣

魏琪, 沈来根, 郑和鸣, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院普外科  
浙江省杭州市 310016  
项目负责人: 魏琪, 310016, 浙江省杭州市庆春东路3号, 浙江大学医学院  
附属邵逸夫医院普外科. weiqi@hzcn.com  
电话: 0571-86437761 传真: 0571-86044817  
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-08

## 摘要

**目的:** 探讨术中遇有复杂胆结石(Mirizzi综合征, MS和拟似MS)中转应用手助腹腔镜手术(hand assisted laparoscopic surgery, HALS)以取代开腹手术的可行性。

**方法:** 施行腹腔镜胆囊切除术(LC) 232例, MS和拟似MS患者5例。如分离至胆囊颈部后Calot三角解剖仍不清, 中转HALS未使用手助器以取代开腹手术。

**结果:** MS I型3例, 拟似MS 2例中转HALS的原因是: Calot三角解剖不清或异常以及腹腔镜下难以完成的特殊操作挤压取出胆囊颈部或变异胆囊管内的嵌顿结石。手术时间115-190 min, 中位手术时间165 min; 手辅助手术时间65-100 min, 中位手辅助时间75 min。术后住院3-5 d, 中位术后住院4 d。除1例切口轻度感染, 术后均恢复顺利。

**结论:** 应用手助腹腔镜技术治疗MS I型和拟似MS是安全、可行的。我们的初步结果表明HALS降低了腹腔镜手术的难度, 可以作为复杂胆结石中转开腹时的一个选择。

魏琪, 沈来根, 郑和鸣. 手助腹腔镜治疗复杂胆结石5例. 世界华人消化杂志 2005;13(4):572-574  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/572.asp>

## 0 引言

Mirizzi综合征(Mirizzi syndrome, MS)是慢性胆囊炎、胆囊结石的少见并发症, 系胆囊颈或胆囊管结石压迫或合并炎症引起肝总管梗阻。尽管已有腹腔镜成功治疗MS的报道<sup>[1-4]</sup>, 然而腹腔镜下处理MS由于其自身的局限性, 可能有较高的并发症和转开腹率<sup>[5-6]</sup>。我们报道术中遇有MS和拟似MS, 中转手助腹腔镜手术(hand assisted laparoscopic surgery, HALS)以取代开腹手术的可行性。拟似MS定义为胆囊颈部结石嵌顿并短胆囊管致Calot三角解剖不清而不伴黄疸。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003-6/2003-12施行腹腔镜胆囊切除术(LC) 232例, 其中MS和拟似MS的患者5例。根据McSherry分型, MS I型3例, 拟似MS 2例。

**1.2 方法** 手术操作、置入Trocar的方法与一般腹腔镜

手术相同, 经脐部切口置入腹腔镜。如决定中转HALS, 即做一右肋缘下斜切口(6.0-6.5 cm)。切口的大小应适合术者手的置入。通常术者左手置入辅助操作, 切口的上下端用布巾钳夹紧。切开的腹壁肌层应略小; 重新建立气腹, 如果仍有漏气在术者手腕周围用纱布条塞紧以防止漏气。手插入的位置不宜靠近术野, 否则腹腔镜的视野和器械的操作可能会受到妨碍。主操作孔位于左肋缘下以便有足够的操作空间(图1), 术者和助手或扶镜者站立于患者左侧。术中疑似MS或者Calot三角结构不清, 我们首先尝试自胆囊底部解剖分离。如解剖分离至胆囊颈部Calot三角解剖仍不清, 中转HALS以取代开腹手术。手术遵循的原则与开腹手术类似, 部分或者大部切除胆囊后缝合或者套扎关闭。直接穿刺胆总管或经胆囊管术中胆道造影(IOC), 以明确胆道解剖并确认无胆管结石。患者均在肝下间隙放置负压引流。

## 2 结果

男4例, 女1例, 年龄33-68(平均52)岁。患者均有反复右上腹痛, 3例MS患者均有黄疸及肝功能异常, 1例有胰腺炎伴黄疸病史。2例拟似MS患者表现为亚急性胆囊炎。5例患者的术前检查如下: 3例MS患者B超胆囊萎缩伴结石, 肝内胆管或肝总管扩张, 结合MRCP(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)(图2)

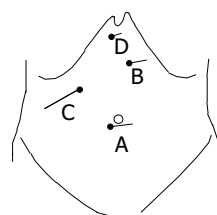


图1 Trocar和辅助手的位置。A: 腹腔镜; B: 主操作孔; C: 辅助手置入; D: 辅助操作孔。

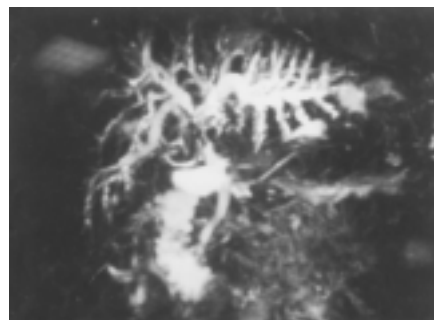


图2 术前MRCP显示Mirizzi综合征特征1颗大结石压迫肝总管、肝内胆管扩张(病例4)。

表1 5例患者临床资料和手术结果

患者	年龄 (year)	性别	胆红素 (mmol/L)	ALP (nkat/L)	AST (nkat/L)	中转HALS原因	手术方法	手术时间 (min)	手助手术 时间 (min)	术后住院 (d)	临床诊断
1	33	M	0.48	5618	1134	胆囊颈部嵌顿结石	胆囊次全切除	165	75	4	MS I型
2	63	M	0.06	1184	986	Calot三角不清FFD出血	胆囊全切除	165	70	3	拟似MS
3	43	M	0.05	1384	500	Calot三角不清GB积液	胆囊部分切除	115	65	4	拟似MS
4	51	M	0.35	3517	1167	Calot三角消失GB挛缩	胆囊部分切除	180	100	5	MS I型
5	68	F	0.28	4618	5835	Calot三角粘连胆囊管嵌顿结石	胆囊次全切除	190	90	4	MS I型

M: 男性, F: 女性, FFD: 逆行胆囊分离; GB: 胆囊.

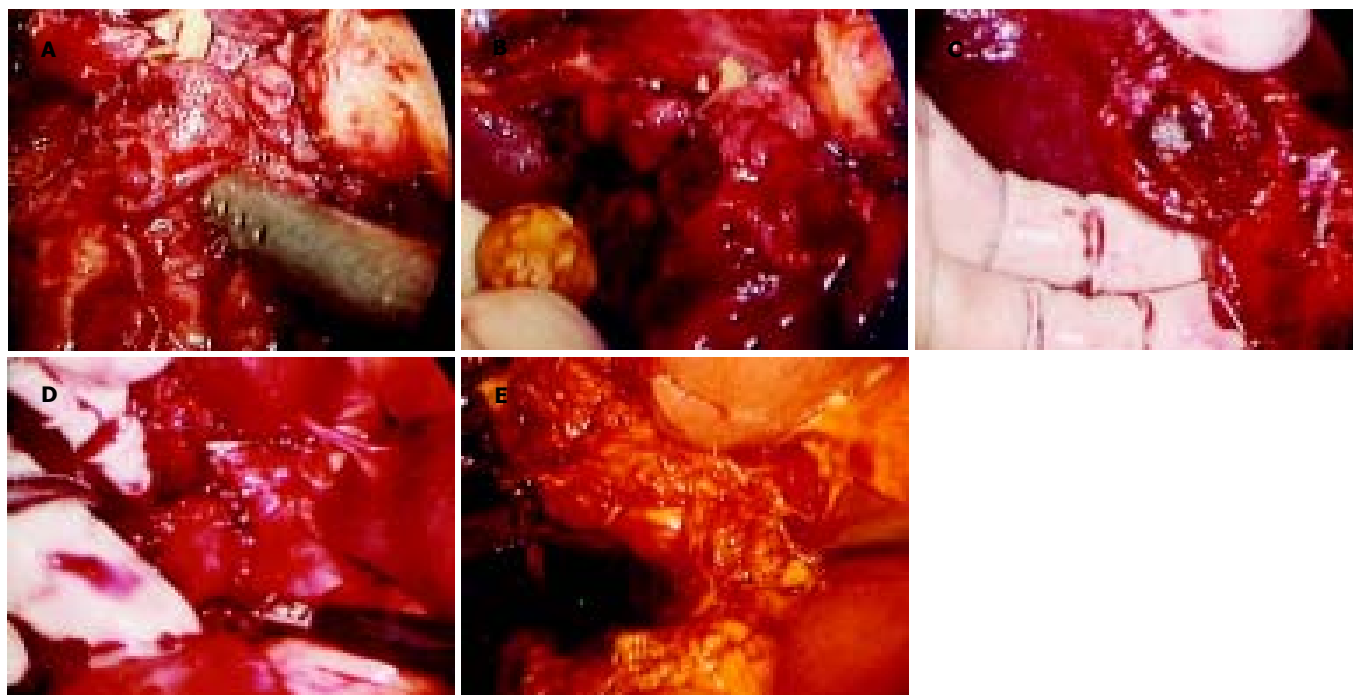


图3 中转HALS的原因. A: 1颗1.0 cm 结石嵌顿于胆囊颈管与肝总管融合部腹腔镜下无法取出; B: 腹腔内辅助手有助于挤压取出结石; C: 1颗2.5 cm 结石压迫肝总管; D: 辅助手辨认、分离解剖不清的Calot三角; E: 胆囊重度炎症伴颈部结石致Calot三角解剖不清似Mirizzi综合征.

和CT(computed tomography, CT)检查MS的诊断初步确立. 2例拟似MS B超均显示胆囊肿大合并胆囊颈部结石. 中转HALS的原因和手术方法(表1). 病例1胆囊萎缩胆囊内多发结石胆囊大部切除后, 一颗1 cm 结石嵌顿于胆囊颈管部, 并与肝总管融合, 腹腔镜下无法取出(图3A, B). 病例4术中证实为胆囊挛缩胆囊内一颗2.5 cm 结石压迫肝总管、Calot三角消失(图3C, D). 病例5 Calot三角致密粘连, 胆囊管一颗0.8 cm 结石嵌顿无法取出. 病例4和病例5均在手助下行术中胆道造影. 病例2胆囊颈部一颗2.5 cm 结石, 病例3胆囊颈部0.5 cm 和0.8 cm 二颗结石, 并且胆囊均明显炎症肿大. 中转HALS的原因为Calot三角解剖结构不清(图3E), 同时分别因为胆囊底部分离时出血和胆囊积液(表1). 2例患者均使用12 mm Lapro-Clip 闭合短的胆囊管, 病理报告为急性化脓性胆囊炎. 手助下牵引肝脏、胆囊, 进行分离, 鉴别胆管以及控制出血更加方便、快捷. 手术时间115–190(中位165)min; 手助手术时间65–100(中位75)min. 术后住院

3–5(中位4)d(表1). 术中出血约50–100(中位80)mL. 术后仅有2例患者需要注射一次75 mg 度冷丁. 术后第1 d即鼓励患者进食、早期活动. 除1例患者切口轻度感染, 术后均恢复顺利. 3例MS患者术后7–21 d肝功能恢复至正常范围. 随访15–36(中位25)wk, 患者均无症状复发.

### 3 讨论

Mirizzi综合征(MS)在同期胆道手术中的发生率为0.7–1.4%<sup>[2]</sup>, 我们一组腹腔镜胆囊切除术中为1.3%(3/232). 然而3例患者均为MS I型, 可能是LC时代患者早期接受手术的结果. Csendes *et al*<sup>[7]</sup>认为MS I型和胆囊胆管瘘为同一疾病的不同阶段. 短胆囊管或胆囊管缺失可能增加MS的发生率, 拟似MS或者MS I型在LC术中更常见<sup>[8]</sup>.

尽管有腹腔镜治疗MS的成功报道<sup>[1–4]</sup>, 然而腹腔镜下处理MS对外科医生的经验、技术是一个挑战而且十分耗时, 可能增加术中和术后并发症, 报道的病例转开腹率累计高达68%<sup>[5–6]</sup>. MS和拟似MS患者存在的异常解剖如

胆囊挛缩或胆囊肿大以及颈部嵌顿结石, 其中的一个或二个因素常导致抓持或牵引胆囊、肝脏困难, 因而增加腹腔镜手术的难度<sup>[9]</sup>. 而腹腔镜下胆囊底部逆行分离术式, 尤其是在分离有重度急性炎症的胆囊时, 肝脏的牵引和出血控制仍然是该术式的限制性因素<sup>[10]</sup>. 我们中转 HALS 的主要原因是分离至胆囊颈部, 甚至胆囊部分或大部切除后 Calot 三角解剖仍不清或解剖异常以及严重粘连(表 1), 因为腹腔镜下继续分离解剖不清的 Calot 三角将有胆管损伤的潜在危险和难以控制的出血. 由于解剖不清需要中转开腹, HALS 可以考虑作为一个技术辅助<sup>[10-13]</sup>. 手的触觉感恢复, 与使用腹腔镜器械相比在辅助手的牵引、显露下, 可以进行便捷的钝性或锐性分离操作而不必担心损伤脏器. 同样使用手指分离、指压止血简便而快速, 手的触诊便于鉴别关键结构如胆管和血管, 因而误伤的机会就会降低<sup>[6, 12-14]</sup>. 另一个中转 HALS 的重要原因是腹腔镜下难以进行而通过手辅助可以完成的特殊操作如病例 1 和病例 5 术中使用辅助手挤压取出胆囊颈管部或变异胆囊管内的嵌顿结石(表 1). 需要关注的鉴别胆囊癌或胆管癌, 手的触觉有助于辨认组织特征<sup>[11]</sup>.

HALS 技术的应用有助于确认解剖结构, 进行分离、牵引以及控制出血的操作从而达到缩短手术时间的目的<sup>[6, 12-15]</sup>. 在我们的初步实践中, 中位手术时间是 165 min, 中位助手手术时间 75 min, 及时决定中转 HALS 可望减少手术时间. 对不用手助器术时气体泄漏问题, 尽管一定程度上手的活动受到限制, 但是保持小切口的密闭防止漏气并不困难. 借助“布巾钳”闭合维持气腹是可行的. 尽管 5 例中 2 例有气体泄漏, 但是术中气腹压力通常维持在 1.33-1.60 kPa. 在小切口上放置手助器占据了较多的空间; 手助器经肋缘下斜切口放置靠近肋缘和外侧腹壁, 有气体泄漏可能<sup>[13]</sup>. 此外, 手助器大约需要 5 000 RMB 圆使手术费用增加. 时间长而复杂的手术中, HALS 技术的缺点是辅助手疲劳. 5 例手术中 2 例出现手疲劳, 均为手辅助时间较长(表 1). 术者可抽出手休息数分钟以缓解疲劳. 遵循器械放置成三角的原则, 将手作为器械可以使术时手疲劳减少<sup>[12-13]</sup>.

另外, 有小切口直视胆道手术的报道<sup>[16]</sup>, 主要存在的问题是需要一套专用的特殊器械, 并且手术野的显露有限, 尤其在复杂、困难的胆道手术时, 手术操作难度大, 可能较易损伤重要脏器. 而手助腹腔镜技术的优

势是术野呈“帐篷状”比较宽大、清晰(尽管有手的占位和遮挡), 可以进行细致的操作. 我们的初步经验显示 HALS 技术可以作为复杂胆结石中转开腹时的一个选择.

#### 4 参考文献

- 1 Targarona EM, Andrade E, Balague C, Ardid J, Trias M. Mirizzi's syndrome. Diagnostic and therapeutic controversies in the laparoscopic era. *Surg Endosc* 1997;11:842-845
- 2 Kok KY, Goh PY, Ngoi SS. Management of Mirizzi's syndrome in the laparoscopic era. *Surg Endosc* 1998;12:1242-1244
- 3 Bagia JS, North L, Hunt DR. Mirizzi syndrome: an extra hazard for laparoscopic surgery. *ANZ J Surg* 2001;71:394-397
- 4 Yeh CN, Jan YY, Chen MF. Laparoscopic treatment for Mirizzi syndrome. *Surg Endosc* 2003;17:1573-1578
- 5 Contini S, Dalla Valle R, Zinicola R, Botta GC. Undiagnosed Mirizzi's syndrome: a word of caution for laparoscopic surgeons-a report of three cases and review of the literature. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 1999;9:197-203
- 6 Memon MA, Fitzgibbons RJ Jr. Hand-assisted laparoscopic surgery (HALS): a useful technique for complex laparoscopic abdominal procedures. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 1998;8:143-150
- 7 Csendes A, Diaz JC, Burdiles P, Maluenda F, Nava O. Mirizzi syndrome and cholecystobiliary fistula: a unifying classification. *Br J Surg* 1989;76:1139-1143
- 8 Dorrance HR, Lingam MK, Hair A, Oien K, O'Dwyer PJ. Acquired abnormalities of the biliary tract from chronic gallstone disease. *J Am Coll Surg* 1999;189:269-273
- 9 Strasberg SM, Eagon CJ, Drebin JA. The "hidden cystic duct" syndrome and the infundibular technique of laparoscopic cholecystectomy-the danger of the false infundibulum. *J Am Coll Surg* 2000;191:661-667
- 10 Mahmud S, Masaud M, Canna K, Nassar AH. Fundus-first laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc* 2002;16:581-584
- 11 Wolf JS Jr, Moon TD, Nakada SY. Hand assisted laparoscopic nephrectomy: comparison to standard laparoscopic nephrectomy. *J Urol* 1998;160:22-27
- 12 Targarona EM, Gracia E, Rodriguez M, Cerdan G, Balague C, Garriga J, Trias M. Hand-assisted laparoscopic surgery. *Arch Surg* 2003;138:133-141
- 13 Litwin DE, Darzi A, Jakimowicz J, Kelly JJ, Arvidsson A, Hansen P, Callery MP, Denis R, Fowler DL, Medich DS, O'Reilly MJ, Atlas H, Himpens JM, Swanstrom LL, Arous EJ, Pattyn P, Yood SM, Ricciardi R, Sandor A, Meyers WC. Hand-assisted laparoscopic surgery (HALS) with the HandPort system: initial experience with 68 patients. *Ann Surg* 2000;231:715-723
- 14 Seifman BD, Wolf JS Jr. Technical advances in laparoscopy: hand assistance, retractors, and the pneumodissector. *J Endourol* 2000;14:921-928
- 15 范应方, 黄宗海, 方驰华. 手助腹腔镜结直肠癌根治术. *世界华人消化杂志* 2004;12:2922-2923
- 16 姜伟青, 周建刚, 储军. 直视微创胆道手术 52 例. *世界华人消化杂志* 2003;11:1848-1850

编辑 潘伯荣 审读 张海宁



# 兰索拉唑对十二指肠溃疡愈合、幽门螺杆菌清除和生长的作用

黄雪彪, 董秀云, 周丽雅, 成红燕

黄雪彪, 董秀云, 周丽雅, 北京大学第三医院消化科 北京市 100083  
成红燕, 徐州第四医院 江苏省徐州市 221009  
项目负责人: 董秀云, 100083 北京市, 北京大学第三医院消化科. hdlhxb@si  
na.com  
电话: 010-62017691-2527 传真: 010-62017700  
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-18

## 摘要

**目的:** 观察兰索拉唑对十二指肠溃疡愈合及幽门螺杆菌(*H pylori*)的清除作用, 并比较兰索拉唑、奥美拉唑及泰胃美对离体培养的 *H pylori* 生长的作用。

**方法:** 经胃镜检查, 确诊为 *H pylori* 阳性的十二指肠溃疡患者65例, 给予兰索拉唑30 mg/次, 1次/d, 服药1 mo, 溃疡愈合后, 改为15 mg/次, 1次/d, 维持治疗3 mo. 服药1 mo及维持治疗3 mo, 复查胃镜了解十二指肠溃疡的愈合情况, 胃黏膜组织学W-S染色检查 *H pylori*. 取培养好的CAPMN66 *H pylori* 标准菌株, 涂入不同药物浓度的培养皿内, 在37℃微氧环境下培养3-5 d, 确定兰索拉唑、奥美拉唑和泰胃美的最小抑菌浓度(MIC)。

**结果:** 兰索拉唑治疗1 mo后, 十二指肠溃疡愈合率为93.3% (56/60), 胃酸和胃蛋白酶分泌减少, 与治疗前比较有明显差异( $107.5 \pm 11.2$  mEq/L vs  $43.3 \pm 3.2$  mEq/L,  $P < 0.05$  和  $910.8 \pm 194.3$  mg/L vs  $488.2 \pm 265.0$  mg/L,  $P < 0.01$ ). 兰索拉唑治疗后 *H pylori* 检出率下降, 治疗前胃窦部 *H pylori* 检出率为96%, 治疗1 mo后为64%, 36%的患者胃窦部 *H pylori* 已清除, 胃底部 *H pylori* 检出率在治疗前后变化不大. 给药1 mo和3 mo后, 胃窦部 *H pylori* 的感染程度明显减轻, 清除的比例明显增加, 治疗前为3%, 治疗后1 mo为36%, 3 mo为22%, 胃底部 *H pylori* 的感染程度也减轻. 兰索拉唑和奥美拉唑抑制离体培养的 *H pylori* 生长, 兰索拉唑MIC为12.5 mg/L, 奥美拉唑是50 mg/L, 泰胃美MIC > 1600 mg/L。

**结论:** 兰索拉唑促进 *H pylori* 阳性的十二指肠溃疡愈合, 抑制胃酸和胃蛋白酶分泌, 而且能清除 *H pylori*, 对胃窦部的作用更明显. 兰索拉唑和奥美拉唑抑制离体培养的 *H pylori* 的生长, 前者作用强于后者. 未观察到泰胃美有抑制 *H pylori* 生长的作用。

黄雪彪, 董秀云, 周丽雅, 成红燕. 兰索拉唑对十二指肠溃疡愈合、幽门螺杆菌清除和生长的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(4):575-577  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/575.asp>

## 0 引言

根除幽门螺杆菌(*H pylori*)的标准三联疗法包括抑制胃酸的药物如质子泵抑制剂奥美拉唑或兰索拉唑, 加上二

种抗菌素, 也有用H<sub>2</sub>受体阻断剂如法莫替丁, 加上二种抗菌素, 或替硝唑加1种抗菌素. 已有药敏实验报道, 菌株不同对抗生素的敏感性不同, 同一菌株对不同的抗生素敏感性也不同<sup>[1-3]</sup>, 故如何用药非常重要. 用抑酸药的目的是提高抗菌素的敏感性, 如青霉素类的药物在pH接近7时杀菌效果良好, 但质子泵抑制剂还有抗 *H pylori* 的作用<sup>[1]</sup>. 我们观察了兰索拉唑对 *H pylori* 阳性的十二指肠溃疡的愈合及对 *H pylori* 生长的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 经胃镜诊断为十二指肠溃疡活动期的患者共65例, 年龄18-70岁, 平均  $42.40 \pm 14.41$  岁, 快速尿素酶反应均为阳性, 全部患者无胃穿孔, 无严重胃出血等并发症, 无心肝肾功能障碍, 无妊娠及哺乳期妇女, 无肿瘤病史. 入选前1 mo内停用一切抗溃疡药, 但临时止痛用的抗胆碱能药物除外。

*H pylori* 标准菌株购于中国预防医学科学院流行病学微生物研究所, 批号CAPMN66。

**1.2 方法** 所有入选的患者均给予兰索拉唑口服, 30 mg/次, 1次/d, 共服4 wk. 为防止溃疡复发, 在溃疡愈合后, 改为15 mg/次, 1次/d, 维持治疗3 mo. 治疗前及治疗后1 mo及3 mo, 均由有经验的医师做胃镜, 取活检, 并自胃黏液池吸取胃液, 检查胃液pH值, 用中和法测定酸度, 用比色法测定胃蛋白酶浓度. 按统一标准对溃疡形态进行分期. 取活检的部位是距幽门2-3 cm处, 取窦小弯组织2块, 大弯处1块, 胃体小弯1块, 其中胃窦1块, 做快速尿素酶试验(RUT), 其余3块做病理学检查及W-S染色检查 *H pylori*, 依细菌量的多少, 将 *H pylori* 感染程度分为4级: 0级(-)全片未见 *H pylori*; 一级(+), 胃黏膜表面或胃小凹都能见到稀疏散在的 *H pylori*; 二级(++), 胃黏膜表面及多数胃小凹内见到散在的 *H pylori*, 有的地方成群; 三级(+++), 多数胃小凹内可见密集成堆的 *H pylori*. 药物最小抑菌浓度(MIC)的测定: 参照Lwahi *et al* <sup>[4]</sup>的方法, 用固相培养. 先用二甲基亚砜溶液溶解药物, 其浓度为10 g/L, 兰索拉唑和奥美拉唑用蒸馏水稀释成100 mg/L, 再倍比稀释, 然后用微孔滤过膜滤过除菌, 取药液1 mL, 放入直径8 cm的圆形消毒的培养皿内, 每个培养皿内放入高压消毒的改良Skirrow培养基10 mL, 仔细地摇匀后, 用接种环挑起细菌放入生理盐水中, 使菌株浓度达到  $15 \times 10^{11}$  CFU/L, 用标准比度管比较的方法, 确定细菌的浓度后, 再用接种环挑起细菌放入平皿内, 将平皿放入培养罐内, 抽气后再充含6 mL/L氧的混合气体, 放入培养

表1 兰索拉唑对溃疡愈合、胃酸分泌和 *H pylori* 清除的作用

	<i>n</i>	溃疡愈合率(%)	胃液总酸度(mEq/L)	胃蛋白酶(mg/L)	尿素酶阳性率(%)	组织 <i>H pylori</i> 检出率(%)	
						胃窦	胃体
治疗前	60		107.5 ± 11.2	910.8 ± 194.3	100	96	95
治疗后		0	0	0	0	0	0
1 mo	56	93	43.3 ± 3.2 <sup>a</sup>	488.2 ± 265.0 <sup>b</sup>	38	63	89
3 mo	54		61.6 ± 10.7 <sup>b</sup>	580.1 ± 198.6 <sup>b</sup>	85	77	81

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

表2 兰索拉唑对胃窦、胃底部部 *H pylori* 感染程度的影响

		<i>H pylori</i> 感染程度(级别)			
		0	1	2	3
胃窦	治疗前	3	24	46	27
	治疗后	0	0	0	0
	1 mo	36	34	18	12
	3 mo	22	20	34	22
胃底部	治疗前	4	66	15	15
	治疗后	0	0	0	0
	1 mo	3	49	25	23
	3 mo	10	39	45	6

表内数字为 *H pylori* 感染程度的百分数(%).

箱内, 温度在 37℃ 左右, 培养 3-5 d, 观察 *H pylori* 生长情况, 肉眼观察 *H pylori* 为半透明灰白色小隆起, 显微镜下观察, 直径 0.5-20 mm, 边缘整齐, Gram 染色阳性, 呈弧形或海鸥形, 找出无细菌生长的最小的抑菌浓度 (MIC). 泰胃美的稀释方法: 取 6.25 mL 的蒸馏水放入 10 g/L 浓度的药液中, 其浓度为 1 600 mg/L, 再倍比稀释, 以下过程同兰索拉唑和奥美拉唑.

**统计学处理** 比较治疗前后胃酸和胃蛋白酶分泌浓度的差异用 *t* 检验.

## 2 结果

**2.1 兰索拉唑促进 *H pylori* 阳性的溃疡愈合, 抑制胃酸和胃蛋白酶的分泌** 治疗 1mo 后十二指肠溃疡的愈合率为 93.3% (56/60), 胃酸与胃蛋白酶的浓度和治疗前比较有明显差异 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ) (表 1). 兰索拉唑能清除 *H pylori*, 特别是对胃窦部的作用更明显, *H pylori* 的感染程度减轻, 服药后 *H pylori* 阳性检出率下降, 数量减少, 尿素酶阳性检出率治疗后也下降 (表 1). 用维持剂量治疗 3 mo 后, 胃窦部快速尿素酶阳性率和组织 *H pylori* 检出率仍低于治疗前, 但和治疗 1 mo 时比较 *H pylori* 检出率明显增加 (表 1). 胃底部部的 *H pylori* 阳性检出率下降. 给药 1 mo 和 3 mo 后, 胃窦部 *H pylori* 的感染程度明显减轻, *H pylori* 被清除的比例明显增加, 治疗前为 3%, 治疗后 1 mo 为 36%, 3 mo 为 22%, 重

度感染的比例减少, 治疗前 4 级感染率为 27%, 治疗后 1 mo 为 12. % (表 2). 有 8 例患者经过兰索拉唑治疗 3 mo 后胃黏膜内未检查到 *H pylori*.

**2.2 质子泵抑制剂有抑制 *H pylori* 生长的作用** 兰索拉唑作用强于奥美拉唑, 兰索拉唑的 MIC 为 12.50 mg/L, 而奥美拉唑的 MIC 为 50 mg/L. 泰胃美的 MIC > 1 600 mg/L (表 3).

表3 兰索拉唑、奥美拉唑和泰胃美对 *H pylori* 生长的作用

药物	浓度 (mg/L)	<i>H pylori</i> 菌落生长状况
兰索拉唑	3.13	++
	6.25	+
	12.50	0
奥美拉唑	12.50	++
	25.00	+
	50.00	0
泰胃美	400.0	+++
	800.0	+++
	1 600.0	+++

## 3 讨论

我们通过临床观察研究证明, 口服 30 mg/d 兰索拉唑 4 wk, 溃疡愈合率达到 90% 以上, 和文献 [4-5] 报道的结果相同, 溃疡愈合的机制是抑制胃酸和胃蛋白酶的分泌, 我们再一次证明无酸无溃疡的理论. *H pylori* 和胃炎、消化性溃疡的产生复发和胃癌的发生有密切的关系 [6], 我们观察到, 虽然 *H pylori* 感染存在, 但胃酸和胃蛋白酶分泌受到抑制溃疡就能愈合, 故认为无 *H pylori* 无溃疡的理论不能成立.

Kuipers *et al* 观察到长期用奥美拉唑治疗反流性食管炎患者, 治疗 12 mo, 有 1/3 的患者 *H pylori* 被根除 [11], 我们观察到, 大约 10% 的患者, 组织学 W-S 染色未检查到 *H pylori*, 尿素酶又是阴性, *H pylori* 被根除. 我们发现, 兰索拉唑使胃窦部 *H pylori* 的阴性比率增加 30% 以上, 这可能是该类药物促进十二指肠溃疡愈合作用的机制之一, 同时胃底部部 *H pylori* 感染率也有所下降, 但变化不大. 从另一方面看, 前期研究已发现, 胃窦部血流量略高于胃体部 [7], 是否胃窦部血流丰富, 所以达到胃窦部药物多, 杀菌的作用强于胃体

部,有待于进一步证实.抑酸药是否对 *H pylori* 有直接作用,有人报道,抑制胃酸从而使 *H pylori* 在胃内分布发生变化,相关性胃炎加重<sup>[8-9]</sup>,1991年 Laghi *et al* 也发现兰索拉唑有抗 *H pylori* 的作用<sup>[1]</sup>,但对其机制了解不多,只知道他能改变 *H pylori* 的形态,影响 *H pylori* 的活力,后来有人报道质子泵抑制剂能抑制 *H pylori* 的ATP酶活性<sup>[2]</sup>.本文的工作在一定程度上支持了这一论点.通过离体培养,我们发现H<sub>2</sub>受体阻断剂泰胃美没有抑制 *H pylori* 生长的作用,而兰索拉唑和奥美拉唑有抑制 *H pylori* 生长的作用,可能是后者抑制 *H pylori* 的ATP酶活性,也可能通过其他的机制.药物抑菌或杀菌的作用机制是多方面的,也比较复杂,有待于继续研究.

总之,根据我们的结果,每天给患者服用兰索拉唑15 mg维持量时,胃窦 *H pylori* 感染程度有恢复的倾向,其阳性检出率分别为治疗1 mo时63%,3 mo时77%,说明小剂量的兰索拉唑抑制 *H pylori* 的作用弱,这个结果和Marshall的结果一致<sup>[10]</sup>,提示停药后溃疡可能复发.Kuipers *et al* 观察到长期用少量奥美拉唑治疗反流性食管炎<sup>[11]</sup>,未发现不良反应.所以我们推测当溃疡愈合后,如果用半治疗剂量的兰索拉唑或奥美拉唑维持治疗3 mo或6 mo,溃疡的复发率一定减少,但还需要大量临床实验来验证.

#### 4 参考文献

- 1 Iwahi T, Satoh H, Nakao M, Iwasaki T, Yamazaki T, Kubo K, Tamura T, Imada A. Lansoprazole, a novel benzimidazole proton pump inhibitor, and its related compounds have selective activity against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:490-496
- 2 Mauch F, Bode G, Malfertheiner P. Identification and characterization of an ATPase system of *Helicobacter pylori* and the effect of proton pump inhibitors. *Am J Gastroenterol* 1993;88: 1801-1802
- 3 Pavicic MJ, Namavar F, Verboom T, van Winkelhoff AJ, De Graaff J. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to several antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1184-1186
- 4 Hawkey CJ, Long RG, Bardhan KD, Wormsley KG, Cochran KM, Christian J, Moules IK. Improved symptom relief and duodenal ulcer healing with lansoprazole, a new proton pump inhibitor, compared with ranitidine. *Gut* 1993;34:1458-1462
- 5 McColl KE. *Helicobacter pylori* infection and long term proton pump inhibitor therapy. *Gut* 2004;53:5-7
- 6 Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HP, Meuwissen SG. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 1995;345:1525-1528
- 7 董秀云, 森治树. 辣椒煎液对胃黏膜血流量的影响和细胞保护作用. *中华消化杂志* 1989;9:335-337
- 8 Logan RPH, Walker MM, Misiewicz JJ, Gummett PA, Karim QN, Baron JH. Changes in the intragastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole. *Gut* 1995;36:12-16
- 9 Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, Hazenberg HJ, Bloemena E, Lindeman J, Klinkenberg-Knol EC, Meuwissen SG. Increase of *Helicobacter pylori*-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1401-1406
- 10 Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, Murray R, Blincow ED, Blackburn SJ, Phillips M, Waters TE, Sanderson CR. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* 1988;2:1437-1442
- 11 Kuipers EJ, Nelis GF, Klinkenberg-Knol EC, Snel P, Goldfain D, Kolkman JJ, Festen HP, Dent J, Zeitoun P, Havu N, Lamm M, Walan A. Cure of *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux oesophagitis treated with long term omeprazole reverses gastritis without exacerbation of reflux disease: results of a randomised controlled trial. *Gut* 2004;53:12-20

编辑 张海宁

# 幽门螺杆菌感染对初发脑梗死的影响

刘海峰, 姚林, 段和力

刘海峰, 华北煤炭医学院预防医学系, 唐山市卫生防疫站

河北省唐山市 063000

姚林, 华北煤炭医学院预防医学系 河北省唐山市 063000

段和力, 河北省开滦集团有限责任公司医院 河北省唐山市 063000

项目负责人: 刘海峰, 063000, 河北省唐山市, 华北煤炭医学院预防医学系, 唐山市卫生防疫站.

电话: 0315-2214766

收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2004-12-21

## 摘要

**目的:** 研究幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染与初发脑梗死的关系, 为脑梗死的预防和治疗提供理论依据.

**方法:** 采用1:1病例对照研究, 临床采集初发脑梗死病例和非脑梗死患者各92例, 用酶联免疫吸附法(ELISA)检测*H pylori*特异性抗体IgG(*H pylori*-IgG), 再按结果将所有观察对象分为*H pylori*阳性组和*H pylori*阴性组;同时检测血清白介素-6(IL-6), 白介素-8(IL-8), C-反应蛋白(CRP)等炎症指标的浓度.

**结果:** 脑梗死组*H pylori*阳性率(83.7%)与对照组*H pylori*阳性率(54.3%)比较, 二者之间差异有显著性( $\chi^2 = 18.5$ ,  $P < 0.01$ ). *H pylori*阳性组血清IL-6, IL-8和CRP浓度均高于*H pylori*阴性组, 差异均有显著性( $P < 0.01$ ).

**结论:** *H pylori*阳性率与初发脑梗死发病有关, *H pylori*感染者血清IL-6、IL-8, CRP的水平增高.

刘海峰, 姚林, 段和力. 幽门螺杆菌感染对初发脑梗死的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(4):578-579

http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/578.asp

## 0 引言

*H pylori*是一种寄生在人类胃黏膜上皮细胞表面的螺旋形或弧形革兰阴性菌. 是慢性胃炎和消化性溃疡的主要致病因子, 是胃癌的一类致癌因子. *H pylori*感染是一种慢性, 持续性感染, 可通过炎症免疫反应, 毒素释放, 细胞因子增多, 引起局部和远处损害. 近来, 临床研究结果表明*H pylori*感染与脑梗死存在相关性<sup>[1-5]</sup>. 我们以*H pylori*-IgG为*H pylori*感染的标志物, 观察*H pylori*感染与初发脑梗死以及IL-6, IL-8, CRP等细胞因子和炎症指标的关系, 并探讨*H pylori*感染可能影响脑梗死发病的致病机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 初发脑梗死病例为发病后1 wk内住院患者, 经头部CT检查证实, 同时选择非脑梗死的神经内科和消化内科住院患者92例作为对照组. 按性别、年龄、民族、

职业、吸烟史、饮酒史、高血压病、冠心病、糖尿病病史对脑梗死组和对照组进行了匹配. 病例组和对照组均为男51例, 女41例, 年龄53-85岁. 脑梗死组与对照组排除了既往有脑梗死、脑出血、蛛网膜下腔出血、心房纤颤、心肌梗死等病史者, 以及曾行正规杀灭*H pylori*治疗和连续服铋剂或对*H pylori*有杀灭作用的抗生素超过1 mo的服药史的患者. *H pylori*-IgG ELISA试剂盒(>15 U/mL为阳性), 为美国Diagnostic Systems Laboratories公司生产, 特异度98.4%, 灵敏度95.8%. IL-6, IL-8试剂盒为法国Diacclone Research公司生产.

**1.2 方法** 作为临床流行病学调查和研究, 我们根据研究目的和现有条件, 只选择了血清学试验(ELISA)作为*H pylori*感染的指标<sup>[6]</sup>. *H pylori*-IgG, IL-6, IL-8的检测按试剂盒说明书的要求进行, 用生化自动分析仪检测血清CRP.

**统计学处理** 应用6.12版SAS软件包进行分析. 计数资料用 $\chi^2$ 检验; 计量资料用均数±标准差mean±SD表示; 两组之间均数比较用*t*检验.

## 2 结果

脑梗死组*H pylori*阳性率(83.7%)高于对照组(54.3%), 差异有显著性( $\chi^2 = 18.5$ ,  $P < 0.01$ ,  $A = 4.31$ , 95%CI, 2.2-8.6), *H pylori*阳性组的IL-6, IL-8, CRP水平高于*H pylori*阴性组, 差异有显著性( $P < 0.01$ , 表1), 脑梗死*H pylori*<sup>-</sup>和脑梗死*H pylori*<sup>+</sup>两组的IL-6, IL-8, CRP浓度也有差别( $P < 0.01$ , 表1)

表1 *H pylori*阳性组与阴性组IL-6, IL-8, CRP浓度的比较(mean±SD)

分组	<i>n</i>	IL-6(ng/L)	IL-8(ng/L)	CRP(mg/L)
<i>H pylori</i> 阴性	57	11.4±6.6	43.5±19.8	5.8±3.8
<i>H pylori</i> 阳性	127	34.5±29.2 <sup>b</sup>	100.7±68.5 <sup>b</sup>	12.0±8.1 <sup>b</sup>
脑梗死 <i>H pylori</i> <sup>-</sup>	15	14.0±10.5	47.9±15.8	3.7±3.4
脑梗死 <i>H pylori</i> <sup>+</sup>	77	44.2±31.8 <sup>b</sup>	123.9±74.3 <sup>b</sup>	13.4±9.1 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , *H pylori* vs 阴性组.

## 3 讨论

Markus et al<sup>[1]</sup>发现脑梗死患者中58.5%为阳性, 对照中44.5%为阳性, 二者比较有显著性差异( $P = 0.001$ ,  $A = 1.78$ , 95%CI 1.14-2.77). 在校正了脑梗死的其他危险因素性别、年龄、社会地位、糖尿病病史、吸烟史、高血压病史后差异仍有显著性( $P = 0.04$ ,  $A = 1.63$ , 95%CI 1.02-2.06). 我们发现脑梗死组*H pylori*阳性

率明显高于对照组,说明 *H. pylori* 感染与脑梗死发病有关。*H. pylori* 阳性组血清 IL-6, IL-8, CRP 浓度高于 *H. pylori* 阴性组,结果提示 *H. pylori* 感染可使血清 IL-6, IL-8, CRP 的水平增高。有报道脑梗死急性期患者血清 IL-6, IL-8 水平增高<sup>[7]</sup>。本次研究均衡了脑梗死因素后,仍发现 *H. pylori* 感染可使血清 IL-6, IL-8, CRP 的水平增高,即脑梗死 *H. pylori*<sup>+</sup> 组血清 IL-6, IL-8, CRP 浓度高于脑梗死 *H. pylori*<sup>-</sup> 组,差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。陈一 *et al*<sup>[8]</sup> 研究结果也说明 *H. pylori* 感染可使血清 IL-6, IL-8, CRP 的水平增高。他们采用 ELISA 法,检测 35 例 *H. pylori* 阳性患儿血清 IL-6, IL-8 水平,并与 *H. pylori* 阴性组 31 例作对照。结果显示 *H. pylori* 阳性组 IL-6, IL-8 水平高于 *H. pylori* 阴性组,差异有显著性, ( $P < 0.001$ )。

作为非侵入性细菌, *H. pylori* 虽然仅定植于胃黏膜,但是他可以引起全身的免疫反应。CRP 与炎症过程密切相关, *H. pylori* 感染者血清 CRP 水平升高, CRP 与脂蛋白结合,由经典途径激活补体系统,产生 C<sub>5</sub>b<sub>9</sub>,造成内膜损伤;单核细胞、粒细胞均含有 CRP 受体, CRP 的大量产生,可经其受体活化,直接或间接造成血管损伤,此过程可诱导动脉粥样硬化的发生<sup>[9]</sup>。另有报道颈动脉硬化患者及恢复期脑梗死患者外周血 IL-6 等细胞因子含量较对照者高,但较急性期脑梗死患者低,而颈动脉粥样硬化患者与恢复期脑梗死患者比较则无显著性差异。提示这些细胞因子增高不仅是急性期脑缺血性损伤的反应,他们在脑梗死的前期病变—颈动脉粥样硬化中就有异常增高<sup>[10]</sup>。有研究表明, *H. pylori* 脂多糖引发单核细胞释放大量促使中性粒细胞聚集的 C-X-C 化学因子(如 IL-8 等)<sup>[11]</sup>, IL-8 又称中性粒细胞激活蛋白 1 (NAP-1),主要的生物学活性是吸引和激活中性粒细胞,这些作用可导致机体的炎症反应,他不仅趋化激活中性粒细胞和 T 淋巴细胞,还刺激平滑肌细胞增生、迁移,诱导单核细胞趋化、黏附于血管内皮,在动脉粥样硬化的形成发展中起重要作用<sup>[12]</sup>。

动脉粥样硬化是脑梗死发生的病理基础, *H. pylori* 感染诱导炎症递质和细胞因子释放,这些细胞因子如 IL-1, IL-6, IL-8 及 TNF 等,相互作用,加重全身炎症反应程度,激活血管内皮细胞、使纤维蛋白原激活抑制剂、组织因子表达增加、影响脂类代谢、还刺激平滑肌细胞增生、迁移、诱导单核细胞趋化、黏附于血管内皮,从而使凝血功能亢进、血液黏稠度增加、血管内皮功能的损伤及功能紊乱,加速了动脉粥样硬化的发生,使脑梗死的发生危险性增高。这可能是 *H. pylori* 影响脑梗死发病,尤其是影响动脉粥样硬化性脑梗死发病的机制之一。

#### 4 参考文献

- 1 Markus HS, Mendall MA. *Helicobacter pylori* infection: a risk factor for ischaemic cerebrovascular disease and carotid atheroma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:104-107
- 2 Whincup PH, Mendall MA, Perry IJ, Strachan DP, Walker M. Prospective relations between *Helicobacter pylori* infection, coronary heart disease, and stroke in middle aged men. *Heart* 1996;75:568-572
- 3 Manuel M, Stefan K, Johann W, Georg W, Xu QB. Infections, Immunity, and Atherosclerosis. *Circulation* 2000;102:833-839
- 4 李娟, 马廉兰, 廖跃光. 幽门螺杆菌感染与脑血栓形成的病例对照研究. 赣南医学院学报 2002;22:221-222
- 5 刘信荣, 段和力, 周波, 王燕玲, 黄燕冰, 崔艳, 刘海峰. 幽门螺杆菌感染与初发脑梗死相关性初探. 中国综合临床 2003;19:614-615
- 6 张万岱. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. 中华医学杂志 2000;80:394-395
- 7 王左生, 卢宏, 王喜英, 王建平, 方树友. 急性脑梗死患者血清 IL-8、IL-6 水平的研究. 中国神经免疫学和神经病学杂志 2002;9:46-48
- 8 陈一, 阎晓莉, 李华, 拜康利. 幽门螺杆菌感染患儿血清 IL-6、IL-8、IL-10 水平变化. 临床儿科杂志 2003;21:163-165
- 9 刘瑞霞, 张诏. 感染与动脉粥样硬化性疾病. 中华老年心脑血管病杂志 2003;5:206
- 10 易兴阳, 袁光固, 余昌明, 周东. 脑梗死及颈动脉粥样硬化患者外周血 IL-1、IL-6 和 TNF 水平研究. 中国神经免疫学和神经病学杂志 1998;5:144-146
- 11 纪开宇, 胡伏莲. 幽门螺杆菌与细胞因子研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:503-508
- 12 李天星. 细胞免疫与细胞因子及检测方法. 第二版. 北京: 军事医学科学出版社, 2001:118-164

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 干扰素 $\alpha/\beta$ 受体慢性乙型肝炎肝组织的免疫组化定位

樊和斌, 郭亚兵, 吴爱华, 朱幼芙, 蒋永芳, 侯金林

樊和斌, 郭亚兵, 吴爱华, 朱幼芙, 蒋永芳, 侯金林, 广州南方医院感染内科 广东省广州市 510515  
项目负责人: 樊和斌, 510515, 广东省广州市, 广州南方医院感染内科  
收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-09-19

## 摘要

**目的:** IFN $\alpha/\beta$ R 在慢性乙型肝炎患者肝脏组织内的免疫组化定位及其对干扰素应答的预测作用。

**方法:** 应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法, 对 40 例慢性乙型肝炎患者肝脏组织内 IFN $\alpha/\beta$ R 的分布特点进行了观察。

**结果:** IFN $\alpha/\beta$ R 在慢性乙型肝炎患者肝脏组织肝细胞膜和胞质内均有不同程度的表达, 其中 2 例患者血管内也有分布。

**结论:** 慢性乙型肝炎患者肝组织内非溶性的 IFN $\alpha/\beta$ R 的表达量可能系 IFN $\alpha$  干扰素应答率更为有效的预测指标。

樊和斌, 郭亚兵, 吴爱华, 朱幼芙, 蒋永芳, 侯金林. 干扰素 $\alpha/\beta$ 受体慢性乙型肝炎肝组织的免疫组化定位. 世界华人消化杂志 2005;13(4):580-581  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/580.asp>

## 0 引言

IFN $\alpha$  是一种重要的抗病毒药物, 他的作用机制之一是与细胞表面干扰素 IFN $\alpha/\beta$ R 结合, 通过 JAK-STAT 信号转导途径产生多种抗病毒蛋白. 由于受体的表达具有异质性, 因此临床上表现为对干扰素疗效不同. 以前研究显示慢性肝炎患者肝脏组织内 IFN $\alpha/\beta$ R 的表达量可以预测 IFN $\alpha$  的疗效<sup>[1]</sup>, 我们探讨慢性乙型肝炎患者肝脏组织内 IFN $\alpha/\beta$ R 的免疫组化定位及其临床意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝脏组织 40 例来自本院的慢性乙型肝炎患者(诊断标准符合 2000 年第 10 次全国传染病与寄生虫病学会联合修定的病毒性肝炎防治方案<sup>[1]</sup>, 并经肝脏病理证实), 行肝脏穿刺取的组织, 去除表面血迹, 经 40 g/L 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 3  $\mu$ m 厚切片。

**1.2 方法** 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法按试剂盒的说明操作: 石蜡切片脱蜡至水, 用过氧化物酶封闭试剂封闭内源性过氧化物酶 5 min; 在枸橼酸钠盐缓冲液中进行微波抗原热修复 3 min; 磷酸盐缓冲液(PBS)连续洗 3 次, 每次 5 min; 将切片标本置于湿盒内加 10 mL/L 正常兔血清, 室温下放置 15 min; 弃去多余血清, 加入抗生物素蛋白封闭试剂, 室温下放置 15 min. PBS 洗后小心

的擦掉多余 PBS 加入生物素蛋白封闭试剂室温下孵育 15 min. PBS 漂洗后加入分别滴加一抗 1:1000 (兔抗人 alpha/beta chain 2 受体多克隆抗体, 为美国 R&D 公司产品), 4℃冰箱过夜; PBS 连续洗 3 次, 每次 5 min; 滴加二抗(生物素标记羊抗兔, 美国 R&D 公司产品), 37℃水浴 60 min; PBS 连续洗 3 次, 每次 5 min; 滴加酶标底物(辣根酶标记链霉菌亲和素, 美国 R&D 公司产品), 37℃水浴 30 min; PBS 连续洗 3 次, 每次 2 min; DAB 显色, 苏木素复染, 逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂封片. 阴性对照采用 PBS 代替一抗. 用低倍和高倍镜观察切片, 阳性细胞为镜下组织细胞结构清晰, 细胞质内有棕黄色颗粒沉着, 染色明显高于背景。

## 2 结果

患者肝细胞质及细胞膜均有不同程度 IFN $\alpha/\beta$ R 的表达(图 1A-C), 其中仅有两例患者血管内有表达(图 1D)。

## 3 讨论

人的干扰素受体(hINFR)分为两型,  $\alpha$ ,  $\beta$  共用 I 型受体(IFN $\alpha/\beta$ R), IFN $\gamma$  为 II 型受体, 其中 IFN $\alpha/\beta$ R 有两个已知的亚单位<sup>[2-3]</sup>. Lutfalla *et al* 报道 IFN $\alpha/\beta$ R-2 有三种不同的形式: 可溶性 IFNR-2a, 短 IFNR-2b 及长 IFNR-2c, 并证实是同一基因不同剪接方式的产物<sup>[4]</sup>. IFNR-2b 与 IFNR-2c 在胞外及跨膜区相同, 胞内除开始 15 个氨基酸后就完全不同。

随着干扰素作用机制的阐明, 干扰素已成为目前慢

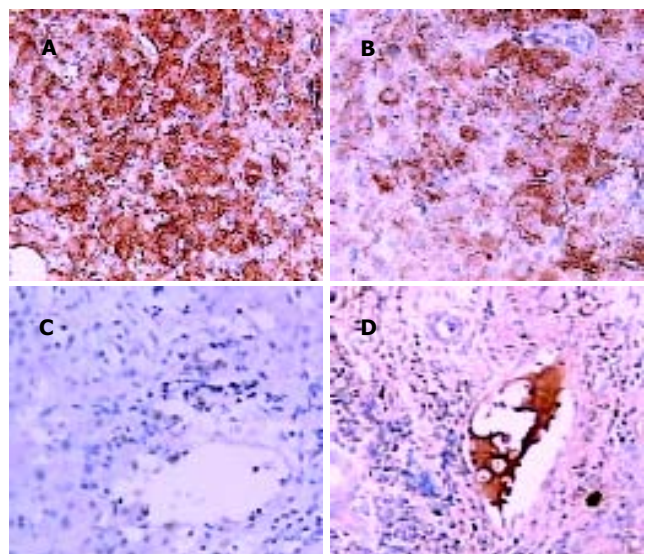


图 1 慢性乙型肝炎肝组织的表达, SP $\times$ 400. A: 胞质、胞膜强阳性; B: 胞质、胞膜阳性; C: 胞质、胞膜弱阳性; D: 血管内。

性病毒性肝炎治疗的主要药物,但其严重的副作用及较低的持续应答率限制了进一步的广泛应用,IFN $\alpha$ / $\beta$ R 对干扰素应答的预测作用的研究也逐步开展。Morita *et al*发现慢性丙型肝炎患者肝组织内干扰素受体的表达量(mRNA)与干扰素的持续应答率有关<sup>[5]</sup>。Fujiwara *et al*比较免疫组化和竞争性聚合酶链反应测量 I 型干扰素受体在肝组织内表达量与干扰素的应答的关系,发现受体的蛋白质水平比 RNA 水平更有意义<sup>[6]</sup>。结合本实验的研究结果,我们认为慢性肝炎患者肝组织内有非溶性的(胞膜及胞质),又有可溶性的(血浆内)IFN $\alpha$ / $\beta$ R 表达,而可溶性的是抑制干扰素抗病毒活性,因此非溶性 IFN $\alpha$ / $\beta$ R 可能系预测干扰素疗效更为有效的指标。此外我们还发现,IFN $\alpha$ / $\beta$ R 在 40 例慢性乙型肝炎患者肝组织的肝细胞质及胞膜均有不同程度的表达,而仅有 2 例患者血管内发现有表达,可能与标本的处理过程中丢失有关。Pekki *et al*用一种新的冷冻与蒸气固定方法可以提高可溶性蛋白免疫组化的检出率。

#### 4 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 2000 年西安. 中华传染病杂志 2000;19:56
- 2 Uzé G, Lutfalla G, Gresser I. Genetic transfer of a functional human interferon  $\alpha$  receptor into mouse cells: cloning and express of its cDNA. *Cell* 1990;60:225-234
- 3 Novick D, Cohen B, Rubinsiein M. The human interferon alpha/beta receptor characterization and molecular cloning. *Cell* 1994;77:391-400
- 4 Lutfalla G, Holland SJ, Cinato E, Monneron D, Reboul J, Rogers NC, Smith JM, Stark GR, Gardiner K, Mogensen KE. Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *EMBO J* 1995;14:5100-5108
- 5 Morita K, Tanaka K, Salto S. Expression of Interferon receptor genes in the liver as a predictor of Interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1999;58:359-365
- 6 Fujiwara D, Hino K, Yamaguchi Y, Ren F, Satoh Y, Korenaga M, Okuda M, Okita K. Hepatic expression of type I interferon receptor for predicting response to interferon therapy in chronic hepatitis C patients: a comparison of immunohistochemical method vs. competitive polymerase chain reaction assay. *Hepatol Res* 2003;25:377-384

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

#### • 消息 •

### 影响因子记录中国期刊进步足迹

《科学时报》2004-06-24 报道: 美国科学信息研究所的《期刊影响因子 - 网络版》(The Journal Citation Reports on the Web) 6 月 18 日公布了 2003 年度 5907 种来源期刊的影响因子。中国期刊影响因子较 2002 年再创新高。

2003 年 SCI 网络版收录中国学术期刊 76 种, 2003 年 JCR 网络版公布的是前两年在收的 70 种中国期刊(含中国机构主办由外国出版商代为出版的期刊)的影响因子。经统计, 70 种期刊的影响因子总值为 39.718, 平均值为 0.567; 若按收录期刊 76 种计算平均值为 0.523。

中国学术期刊年年都有进步。就整体而言, 中国在 1999 年以前未曾有过影响因子达到 1 的期刊, 2000 年仅有 1 种期刊影响因子刚好为 1, 2001 年有 2 种期刊影响因子超过 1, 2002 年则有 6 种期刊影响因子超过 1, 而 2003 年共有 11 种期刊影响因子超过 1。

从收录期刊数和影响因子平均值来看, 1997 年~2003 年收录中国期刊总数分别为 36 种, 45 种, 57 种, 63 种, 66 种, 70 种和 76 种; 有影响因子的期刊分别为 21 种, 32 种, 37 种, 48 种, 60 种, 64 种和 70 种。按收录期刊总数计算影响因子平均值, 7 年分别为: 0.125; 0.159; 0.178; 0.240; 0.351; 0.422 和 0.523, 若仅按有影响因子的期刊数计算平均影响因子, 则这 7 年分别为: 0.214; 0.224; 0.274; 0.313; 0.386; 0.452 和 0.567。

从各年度中国期刊影响因子最高值看, 1997 年~2003 年分别是: 0.513(《中国科学: B 辑》); 0.818(《高能物理与核物理》); 0.839(《生物医学与环境科学》); 1.000(《地质学报》); 2.102(《细胞研究》); 2.532(《世界胃肠病学杂志》); 3.318(《世界胃肠病学杂志》)。这几串单向变化的数字已清晰记录了中国期刊整体进步的足迹。

近两年连续排在中国期刊影响因子第一位的《世界胃肠病学杂志》(World Journal of Gastroenterology), 自 1998 年开始被 SCI 收录。JCR 2000 年度报告中, 该刊影响因子为 0.993, 2001 年为 1.445。在这两年也均是中国期刊中影响因子较高者。该刊在 SCI 中归属“胃肠病学与肝脏病学”(Gastroenterology & Hepatology)类目, 此类目 2001 年和 2003 年都是收录 47 种专业期刊, 该刊影响因子在这两年中分别排在此类目第 27 位、第 11 位, 可谓后起之秀。

中国期刊影响因子提高较快有以下原因: 一是国家对科研投入大幅增长, 科研创新条件改善, 使高水平科研成果不断增多, 从而投送到国内期刊上发表的高质量研究成果相应增加, 期刊质量得以提高。二是经过各方面的努力, 我国期刊编辑规范化程度和国际化程度有一定提高。三是 SCI 近年新增入选中国期刊较多, 中国期刊的增多开始产生了一定的“协同效应”。四是部分期刊实现了印刷版、电子版并存发行的发展态势, 提高了期刊的显示度和可获得性。五是不少期刊出版周期有所缩短, 增强了时效性。六是中国期刊原有指标基数较低, 在低指标基础上提高指标相对容易。

《世界胃肠病学杂志》等刊影响因子快速提升, 除上述原因外, 该刊编辑部的开放意识和网络技术帮了大忙。该刊在中国学术期刊中不仅建设了比较理想的期刊网站, 还率先加入了美国国立医学图书馆(National Library of Medicine, NLM)的 PubMed 系统, 通过 PubMed 系统为读者提供 1998 年以来的全文免费查阅和下载。随后又加入了 Free Medical Journals 免费查阅网站和 Directory of Open Access Journals 免费查阅网站, 利用这些重要的期刊免费开放平台, 广泛向全世界开放, 让全世界同行不仅能检索到, 还能免费下载使用其全文。编辑部紧跟时代步伐的开放意识、利用网络技术的能力和服务作者、服务读者的精神, 为作者投稿、读者查阅下载极大地提供了方便, 同时也赢得了期刊声誉、期刊显示度和利用率的明显提高。

中国学术期刊进步很大, 但相比国际名刊还有不小差距。如 2003 年 JCR 中影响因子最高值为 52.280; 6907 种来源期刊的平均影响因子值为 1.592。显然中国期刊的发展仍是任重道远。国家科技部、自然科学基金委员会、中国科学院等科技管理部门和学术机构应继续支持中国学术期刊; 各学科院士、学术带头人要积极关心中国学术期刊, 为之献计献策, 将自己高水平科研成果更多地投送到国内期刊上发表, 使中国学术期刊获得进一步发展, 取得更好的成效。



## 原发性胃恶性淋巴瘤诊治36例

温文鸿, 巴明臣, 卿三华, 李国新, 闻英

温文鸿, 广东省东莞市谢岗医院普通外科 广东省东莞市 523590  
巴明臣, 卿三华, 李国新, 闻英, 第一军医大学南方医院普通外科  
广东省广州市 510515

项目负责人: 温文鸿, 523590, 广东省东莞市谢岗医院普通外科.

E-mail: venny2002@21cn.com

电话: 0769-7765116

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-12-08

### 摘要

**目的:** 探讨原发性胃恶性淋巴瘤的误诊原因、诊断方法和治疗体会。

**方法:** 对我院1993-10/2003-10收治的36例原发性胃恶性淋巴瘤患者临床资料进行回顾性分析。

**结果:** 本组患者多以上腹部不适或黑便为临床表现。术前明确诊断17例(47%), 均为胃镜下确诊。术前误诊19例(53%), 其中误诊为胃癌13例(36%)、胃巨大溃疡6例(17%)。32例患者进行了正规手术治疗, 4例患者进行姑息性手术。病理类型均为非何杰金氏淋巴瘤, 其中B淋巴细胞性31例, T淋巴细胞性3例, 浆样细胞性1例, T、B双淋巴细胞性1例。34例术后进行了1-8次辅助性CHOP化疗, 总有效率93.4%。31例获得随访, 5a生存率为64%。

**结论:** 原发性胃恶性淋巴瘤临床表现缺乏特征性, 易于误诊。胃镜活检是诊断价值的方法。手术方式与胃癌相似, 但一般不进行淋巴结清扫, 术后化疗是重要的辅助性治疗措施, 病理类型是判断预后的重要指标。

温文鸿, 巴明臣, 卿三华, 李国新, 闻英. 原发性胃恶性淋巴瘤诊治36例. 世界华人消化杂志 2005;13(5):582-583

http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/582.asp

### 0 引言

原发性胃恶性淋巴瘤(primary gastric malignant lymphoma, PGML)占胃恶性肿瘤的2-5%, 其病史及临床表现与胃癌、胃溃疡相似, 胃镜下活检常出现假阴性, 临床误诊率甚高<sup>[1]</sup>. 我们就本院1993-10/2003-10收治的36例患者的临床资料进行回顾性分析, 总结原发性胃恶性淋巴瘤的误诊原因及有效诊治方法。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 本组36例患者均符合Dawson提出的PGML诊断标准, 其中男14例, 女22例, 年龄14-69岁, 中位年龄48.6岁, 病程1-10 a. 临床表现以上腹部隐痛不适为主29例, 以黑便为主4例、急性呕血1例、急性幽门梗阻1例;上腹部异物感1例. 其中6例患者有恶病质表现。

### 1.2 方法

**1.2.1 诊断** 36例患者术前均进行过1次以上胃镜检查, 最多1例患者曾行胃镜检查10次、术前确诊17例(47%), 均为胃镜下确诊;19例(53%)术前误诊, 其中误诊为胃癌13例(36%)、误诊为胃巨大溃疡6例(17%). 手术探查见: 肿瘤大小3 cm×4 cm×5 cm至4 cm×10 cm×16 cm, 肿瘤直径<5 cm 9例, 5-10 cm 13例, >10 cm 14例;36例患者均有第一站淋巴结肿大, 27例有第二站淋巴结肿大, 9例有第三站淋巴结肿大. 淋巴结直径0.8-3 cm, 多质地松软, 易于从大网膜剥离。

**1.2.2 手术** 本组患者行全胃切除11例, 胃大部切除30例, 手术切除率86%(31/36). 余4例患者因病程较晚, 患者一般状况甚差, 仅行局部活检、胃空肠吻合术. 术后病理检查证实为原发性非何杰金氏淋巴瘤, 免疫组化分型为B淋巴细胞性淋巴瘤31例, T淋巴细胞性淋巴瘤3例, 浆样细胞淋巴瘤1例, T、B双淋巴细胞性1例。

### 2 结果

本组36例患者中, 院内死亡2例(5.5%), 1例因就诊较晚死于恶病质, 1例死于手术并发症. 34例术后进行了1-8次辅助性CHOP化疗, 总有效率93.4%. 33例获得随访, 随访率97%. 随访3 mo-10 a, 死亡5例, 分别为B淋巴细胞性淋巴瘤1例, T淋巴细胞性3例, 浆样细胞性1例, T、B双淋巴细胞性1例. 1例术后1 a死于肺部感染, 4例术后1-5 a内死于肿瘤复发、腹腔内广泛转移并肠梗阻;存活5 a以上21例, T淋巴细胞性淋巴瘤无1例存活3 a以上. 本组随访患者进行正规治疗的5 a生存率64%。

### 3 讨论

PGML是指原发于胃壁内淋巴滤泡的恶性肿瘤, 可伴有胃引流区域的淋巴结转移, 临床少见, 临床常早期表现为上腹部疼痛、黑便等, 但缺乏特异性, 易于误诊为胃癌、胃溃疡等疾患, 术前诊断较困难, 临床误诊率高, 其疗效与预后也与其他胃恶性肿瘤不同<sup>[2]</sup>. 1961年Dawson提出了PGML诊断标准, 排除了全身恶性淋巴瘤累及胃及其周围淋巴结浸润和PGML累及肝脾的患者, 为国内外学者广为接受。

PGML常见的胃镜下表现为胃腔内巨大隆起性黏膜下肿块, 或表现为表浅的溃疡, 同时伴有胃壁的增厚、僵硬, 由于PGML起源于黏膜下层, 组织学活检和病理诊断的有一定的困难<sup>[3]</sup>. 随着内镜及免疫组化技术的发展, 胃镜下多次、多点活检及包括黏膜下层在内的大块胃黏膜圈套活检普遍应用临床, PGML诊断的准确性已有显著



提高. 超声胃镜不仅可相当准确地判断原发性胃淋巴瘤的浸润深度, 同时可了解胃周淋巴结的转移情况, 且胃淋巴瘤特殊的超声透壁回声形态有助同其他胃肿瘤相鉴别<sup>[4]</sup>. 因受条件所限, 本组患者均未进行超声胃镜检查, 术前误诊率较国内外文献报道明显为高. 上消化道钡餐对PGML的诊断准确率较低(15-20%), 且缺乏特异性, 但上消化道钡餐检查可了解肿瘤对胃壁的浸润范围, 给手术方式的选择提供有价值的参考资料<sup>[5]</sup>. CT检查可了解PGML患者肿块大小、部位及与周围脏器关系, 判断浸润深度和淋巴结转移情况, 且可发现腹腔内其他转移病灶, 提供有价值的手术参考信息, 为手术方式的选择提供依据. 因此, 我们对术前确诊及高度怀疑PGML的患者常规进行上消化道钡餐及CT检查, 获得了较高的手术切除率及较为满意的临床疗效.

早期诊断及治疗的PGML患者预后远较胃癌为佳, 长期诊断胃癌或可疑胃癌而活检阴性的患者应考虑PGML存在的可能. PGML肿瘤细胞呈黏膜下浸润, 普通胃镜活检取得黏膜下层病变组织困难, 病理科医师对本病认识不足, 仅满足于对活检材料的良恶性区别, 易误诊为没有腺结构的未分化癌. 临床医师过分依赖消化道钡餐、胃镜辅助检查, 致本病误诊率甚高. 本组患者术前均进行过1次以上胃镜检查, 但误诊为胃癌13例(36%)、误诊为胃巨大溃疡6例(17%), 由此可见一般. 我们认为, 胃镜检查遇以下情况时应考虑淋巴瘤的诊断: (1) 肿瘤质地柔软; (2) 黏膜水肿, 皱襞粗大, 黏膜皱襞不向中心集中而围绕在肿块周围; (3) 有黏膜下肿块征象; (4) 病变呈多灶性、多形性. 胃镜活检对本病确诊率各家认识不一, 本组经胃镜活检确诊17例(47%), 确诊率较低. 根据我们的经验: 对怀疑PGML的患者胃镜下活检时需咬取组织至黏膜下方可提高早期诊断率; 对巨大型溃疡边缘隆起之病灶, 取材不应选最隆起处, 该部位水肿明显, 伴浆、原细胞稀疏浸润, 而应选则较平坦之稍隆起部位处取检, 其下多充满浸润的肿瘤细胞. 取检组织块应在5块以上, 如能结合刷检, 则阳性率更高. PGML患者行胃镜下活检时应深取、多取, 必要时行免疫组织化学检查, 以区别未分化癌、慢性炎症及溃疡病.

PGML的治疗与全身恶性淋巴瘤患者需进行以全身化疗为主的治疗原则不同, 而与其他胃恶性肿瘤治疗原则相似, 采用以手术切除为主的综合治疗, 积极切除原发病灶, 以便术后达到满意的化疗效果<sup>[6]</sup>. 胃壁手术切除范围与胃癌相似, 切除范围应根据病变大小部位及大体形态而定, 一般不需进行淋巴结清扫. 由于PGML常在黏膜下沿其长轴浸润扩散, 周围界限不如胃癌明显, 多中心病变多见, 因此, 术中应打开胃腔检查有无多发病变, 注意切缘肿瘤残留, 一般两端切线距肿瘤边缘不应少于5 cm, 有条件应行术中冰冻切片检查, 以确定切缘, 避免肿瘤残留. 部分PGML患者术前检查认为瘤体较大, 病情较晚, 病变侵及周围脏器, 但手术证实多为非浸润性粘连, 手术操作一

般较胃癌便利. PGML是全身性疾病的局部病变, 全胃切除术并不能改善患者的长期存活率, 且严重影响了患者的生活质量, 术中应尽可能多的保留正常胃组织, 遗憾的是, 我们在手术操作中多采用胃癌的手术切除术式, 本组患者全胃切除术达30%(11/36), 较胃癌明显增加. PGML是全身性疾病, 胃壁内的病灶只是首先累及之处, 复发常在原发灶外, 术后辅助化疗应作为常规, 本组患者34例术后辅以1-8疗程CHOP方案化疗, 效果满意.

PGML预后与其病理类型、浸润范围、有无转移、切除是否彻底及术后是否行化疗、放疗有关. 病理及免疫组化分型是较为关键因素, 文献报道, T细胞淋巴瘤病程进展、临床表现、并发症发生率及预后均较B细胞淋巴瘤为差<sup>[6]</sup>, 虽然本组病例随访资料不全, 但本组3例T淋巴细胞性及1例T、B双淋巴细胞性PGML患者均于随访3 a内死亡, 其死亡比率远大于B细胞淋巴瘤患者, 与文献报道一致. 文献报道低度恶性B细胞胃淋巴瘤的增生依赖于幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染后T细胞的激活, 在正规抗*H. pylori*治疗后, 有50-70%的患者可出现完全的消退. 正规的抗*H. pylori*治疗不仅对接受放化疗的患者非常有效, 同样也是手术切除后的综合治疗之一, 遗憾的是我们未认识到抗*H. pylori*治疗的重要性, 本组无1例进行正规的抗*H. pylori*治疗.

总之, 原发性胃恶性淋巴瘤临床表现缺乏特征性, 易于误诊. 胃镜活检特别是超声胃镜下活检最有诊断价值. 胃壁手术切除范围与胃癌相似, 一般不需进行淋巴结清扫, 术后化疗是重要的淋巴细胞性治疗措施, 病理类型是判断预后的重要指标.

#### 4 参考文献

- 1 高金亭, 姚飏, 田文, 肖西平. 李荣原发性胃恶性淋巴瘤诊治分析. 腹部外科 2001;14:34-35
- 2 毕小刚, 杨建民, 王振华, 李向红. 原发性胃恶性淋巴瘤18例临床分析. 中国内镜杂志 2001;19:93-94
- 3 Nakamura S, Matsumoto T, Iida M, Yao T, Tsuneyoshi M. Primary gastrointestinal lymphoma in Japan: a clinicopathologic analysis of 455 patients with special reference to its time trends. *Cancer* 2003;97:2462-2473
- 4 Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Greiner A. Diagnostic accuracy of EUS in the local staging of primary gastric lymphoma: results of a prospective, multicenter study comparing EUS with histopathologic stage. *Gastrointest Endosc* 2002;56:696-700
- 5 张红宾, 杨孟华. 原发性胃恶性淋巴瘤的X线与内镜诊断. 中华消化内镜杂志 2002;19:33-34
- 6 Takahashi I, Maehara Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Oshiro T, Baba H, Kohnoe S, Okamura T, Uike N, Matsusaka T, Kume K, Sugimachi K. Role of surgery in the patients with stage I and II primary gastric lymphoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50:877-882
- 7 Seydel J, Ullrich A, Bender R, Fischbach W, Blettner M. *Helicobacter pylori* and carcinogenesis of gastric B-cell lymphomas. *Int J Cancer* 2003;104:646-649
- 8 Caletti G, Togliani T, Fusaroli P, Sabattini E, Khodadadian E, Gamberi B, Gobbi M, Pileri S. Consecutive regression of concurrent laryngeal and gastric MALT lymphoma after anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Gastroenterology* 2003;124:537-543

## 致谢世界华人消化杂志审稿人

本期文章审稿中(包括退稿),审稿人精心的审稿,为提高世界华人消化杂志的质量而贡献了力量.编辑和投稿作者,非常感谢顾问、编委和审稿人的帮助.

陈红松 副研究员

北京大学肝病研究所

陈孝平 教授

华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科中心

董蕾 教授

西安交通大学第二医院消化内科

侯晓华 教授

武汉华中科技大学同济医学院协和医院消化内科

黎介寿 教授

南京军区南京总医院全军普外研究所

李东辉 副研究员

厦门大学生命科学学院抗癌研究中心

李增山 讲师

中国人民解放军第四军医大学病理教研室

李兆申 教授

中国人民解放军上海第二军医大学附属长海医院消化内科

陆才德 教授

宁波大学医学院附属李惠利医院普外科

吕毅 教授

西安交通大学第一医院普通外科

罗和生 教授

武汉大学人民医院消化内科

梅林 教授

北京大学医学部生理学与病理生理学系

潘秀珍 教授

福建省立医院消化内科

彭淑牖 教授

浙江医科大学附属第二医院外科研究所

戚中田 教授

中国人民解放军第二军医大学微生物教研室

秦环龙 副教授

上海交通大学附属第六人民医院

秦仁义 教授

华中科技大学同济医学院附属同济医院外科

石雪迎 讲师

北京大学医学部病理学系

司富春 教授

河南中医学院分子生物学实验室

孙志伟 副研究员

军事医学科学院生物工程研究所

唐承薇 教授

四川大学华西医院

王学浩 教授

南京医科大学第一附属医院

魏来 教授

北京大学人民医院肝病研究所

吴梧桐 教授

中国药科大学生物制药学院

向德兵 讲师

中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所  
病理科

徐辉 副教授

中国人民解放军第三军医大学预防复合伤研究所

徐克成 教授

深圳市养和医疗中心

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院

许洪卫 教授

上海同济大学附属铁路医院普通外科

严律南 教授

华西医科大学附属第一医院

钟进义 教授

青岛大学医学院营养与食品卫生教研室

周晓东 研究员

广州中山大学附属第二医院

周总光 教授

四川大学华西医院普外科三科