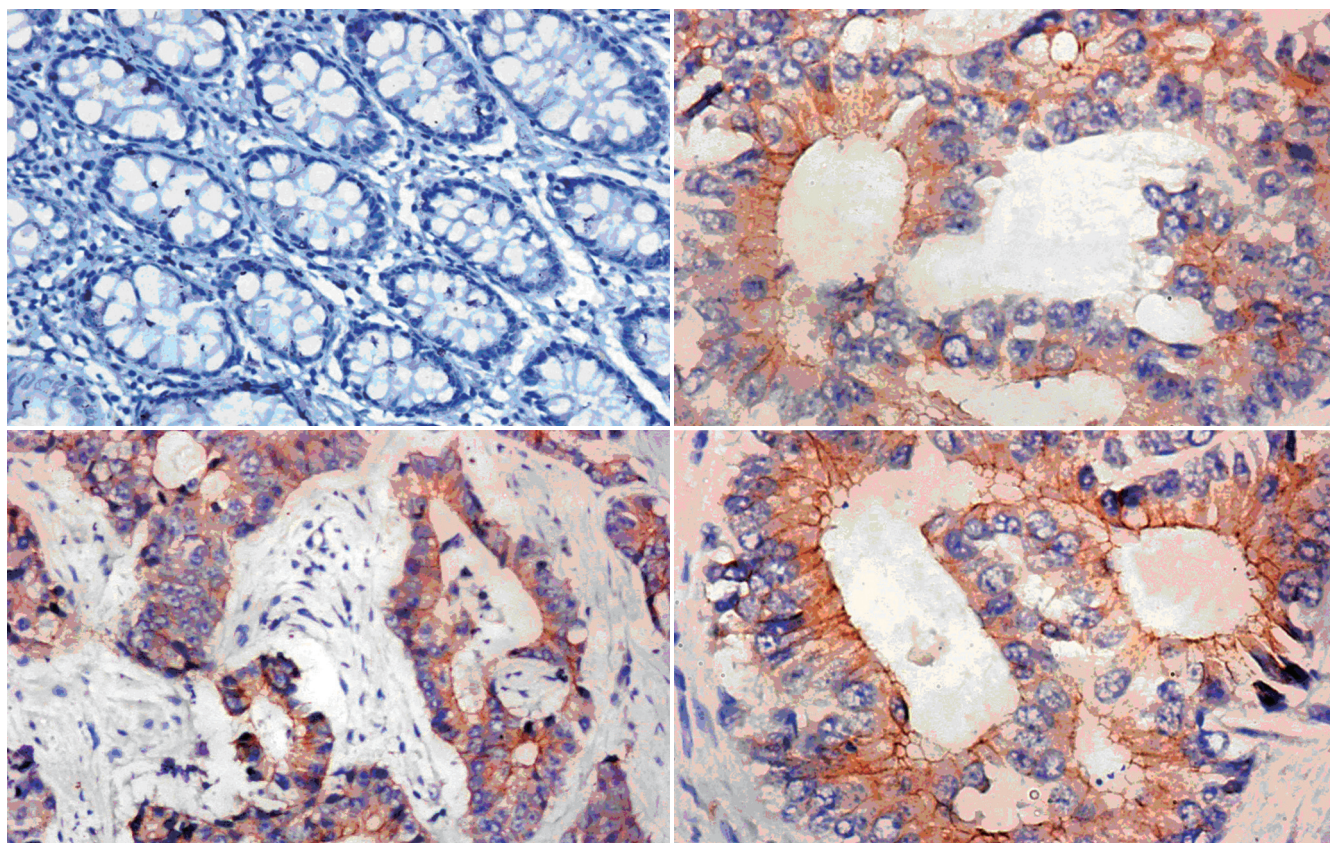


世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 10 月 28 日 第 13 卷 第 20 期 (Volume 13 Number 20)



20 / 2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2003-01-15/2005-12-15

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
樊代明教授
黄象谦教授
黄志强教授
刘耕陶教授
刘锴教授
裘法祖教授
汤钊猷教授
王宝恩教授
危北海教授
吴孟超教授
吴咸中教授
杨春波教授
张金哲教授
张学庸教授
赵东海教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

陈士葆教授
房殿春教授
纪小龙教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
张万岱教授
周学文教授

编委

蔡淦教授
蔡威教授
陈海龙教授
陈红松副研究员
陈家春教授
陈立波副教授
陈仕珠主任医师
陈蔚文教授
陈耀凯副教授
陈祖林副教授
程明亮教授

程英升副主任医师

崔云甫教授

戴冬秋教授

旦增副主任医师

董蕾教授

房静远教授

冯志华副教授

高春芳教授

高毅教授

谷俊朝副教授

郭新宁教授

韩天权教授

韩泽广研究员

郝俊鸣副主任医师

何振娟副主任医师

和水祥副教授

洪天配教授

侯晓华教授

胡以平教授

黄恒青副主任医师

冀振华副主任医师

江学良副主任医师

匡安仁教授

来茂德教授

兰林副教授

劳绍贤教授

冷希圣教授

李伯安教授

李朝品教授

李定国教授

李东辉副研究员

李恩民副教授

李国威教授

李靖副教授

李兰娟教授

李岩教授

李增山副教授

李兆申教授

李宗芳教授

梁萍教授

林菊生教授

林勇讲师

刘军讲师

刘莉讲师

刘连新教授

刘平教授

刘杞教授

刘银坤教授

刘正稳教授

龙致贤教授

卢绮萍主任医师

陆才德教授

吕宾主任医师

吕宁主任医师

吕毅教授

罗和生教授

马春红副教授

茅爱武主任医师

梅林教授

南极星副教授

聂青和副教授

宁琴教授

牛建昭教授

潘林娜教授

潘兴华副主任医师

潘秀珍教授

彭吉润副教授

彭淑牖教授

彭心宇教授

戚中田教授

钱会南副教授

钱建民教授

秦环龙副教授

秦仁义教授

邱赛红研究员

邱双健副教授

任建林副教授

邵成浩讲师

石统东副教授

石雪迎讲师

司富春教授

宋振顺教授

苏鲁主任医师

孙秀发教授

孙志伟副研究员

谭学瑞主任医师

唐承薇教授

屠红副研究员

王吉耀教授

王鲁副主任医师

王明荣教授

王庆国教授

王维教授

王小众教授

王兴鹏教授

王学浩教授

王振军教授

魏来教授

沃健儿副研究员

吴开春教授

吴梧桐教授

吴育连教授

向德兵讲师

邢金良讲师

徐存拴教授

徐德忠教授

徐列明教授

徐小元教授

许洪卫教授

许玲副教授

许文燮教授

严律南教授

杨刚毅副教授

杨建勇教授

杨希山教授

杨旭教导

杨云生教授

姚树坤教授

姚云清副教授

叶胜龙教授

伊力亚尔·夏合丁教授

于聪慧副主任医师

于皆平教授

于颖彦教授

余龙教授

喻荣彬副教授

袁耀宗教授

袁正宏研究员

岳茂兴教授

臧伟进教授

詹林盛研究员

张吉翔教授

张锦生教授

张青云研究员

张学教授

张亚力教授

张宗明教授

赵平讲师

赵新泰研究员

钟鸣研究员

周丁华副教授

周晓东研究员

周智副教授

周总光教授

庄贵华副教授

周士胜教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2005 年 10 月 28 日 第 13 卷 第 20 期 (总第148期)

述 评	2405 五羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状 丁健华, 傅传刚, 赵荣华
基础 研究	2409 大蒜素对人胃癌细胞SGC-7901及BGC-823G ₂ /M期的阻滞调节机制 柳星, 马锐, 陈威, 白雪蕾, 袁媛 2413 人CD40 ligand基因真核表达质粒的构建及对人肝癌细胞HepG2的促凋亡作用 徐智, 沈苏南, 钱晓萍, 禹立霞, 刘宝瑞 2420 二乙基亚硝胺所诱导大鼠肝癌表达上调的基因 阙卫兵, 方肇勤, 管冬元, 赵晓珍, 吴中华, 盛学仕, 高必峰 2427 用PCA方法选择HBV DNA多聚酶TP区VH抗体 于俊岩, 兰林, 王宇明 2431 Pol II -ChIP-PE-MS方法的建立及其在SNP功能研究中的应用 晏泽辉, 邓国宏, 王宇明 2437 甜菜碱对酒精性肝损伤大鼠凋亡基因caspase-12表达的影响 张频, 龚作炯 2441 大肠癌组织Ets-1, MMP-1和VEGF的表达及意义 洪玮, 刘南植, 张庆, 李秀梅, 倪志
临 床 研 究	2446 载脂蛋白B基因单核苷酸多态性与非酒精性脂肪性肝病 姚华, 李玉华 2450 原发性胆汁性肝硬化与自身免疫性胆管炎的临床特征和HLA-DRBI等位基因分析 陈嵩, 朱刚剑, 邓国宏, 朱妍
文 献 综 述	2455 幽门螺杆菌代谢组学研究进展 曾浩, 邹全明 2459 Toll样受体及其在病毒性肝炎发病机制中的作用 赵甫涛, 姬新颖, 潘蕾, 贾战生 2464 T辅助细胞亚群与炎症性肠病的关系 崔玉芳, 徐菡, 安小霞, 王子兵 2469 凋亡途径与肿瘤治疗 汤睿, 朱正纲
研 究 快 报	2473 不同胃黏膜疾病胃蛋白酶原C组织原位表达与胃蛋白酶原血清学检测水平的比较 李红梅, 宁佩芳, 袁媛 2476 胃癌细胞PTEN甲基化与其表达的相关性 邓全军, 于皆平, 刘芬, 齐元玲, 刘诗权, 于红刚 2480 潘托拉唑对胃黏膜损伤保护作用及其机制 乐桥良, 张志坚, 林克荣, 王雯 2484 清热化湿法对温病湿热证大鼠肝脏LDL-R mRNA的影响 吕文亮, 高清华, 李华锋 2487 熊胆粉对二甲基亚硝胺诱发大鼠肝纤维化的抑制作用 权明吉, 金仁顺, 朴龙, 朴东明 2490 磷酸化黏着斑激酶在结肠癌中表达及意义 刘启胜, 于红刚, 齐元玲, 曹俊, 罗和生, 于皆平 2494 MMP-2和 MMP-9蛋白在结肠癌中的表达 张明林, 许建明, 梅俏, 鲍峻峻 2497 直肠癌TME术后检测癌组织及直肠系膜内MMP-7的意义 张好刚, 田素礼, 张日平 2500 幽门螺杆菌vacA基因重组表达的包涵体复性及ELISA方法的建立 党双锁, 王宏仓, 贾晓黎, 袁利超, 王宝峰, 张欣, 张正国, 程延安
临 床 经 验	2504 胃黏膜相关淋巴瘤临床与内镜表现特征 鲍柏军, 黄介飞, 周国雄, 肖明兵, 章建国 2506 不同类型胃息肉及胃癌中环氧化酶-2和p16蛋白的表达及相关性 李强, 高善玲, 崔路佳, 李明琦 2509 中药降肝隆联合拉米夫定治疗活动性肝炎90例 文睿, 王坚, 严明 2514 全直肠系膜切除术直肠系膜CD44v6检测47例 宋哲, 田素礼 2517 经内镜治疗急性胆源性胰腺炎临床疗效/费用分析 覃华, 程继华, 侯伟, 李荣香, 赵秋, 刘南植

致 谢	2520 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2408 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知 2412 第一届全国临床营养支持学术会议通知 2419 消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知 2436 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2445 更正与说明专栏 2454 首届北京地坛感染病学术会议 2458 技法与经验 2463 2006年即将召开的国际会议 2468 专家门诊 2472 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2503 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 2516 《世界华人消化杂志》发表文章配发内容通知
封面故事	洪玮, 刘南植, 张庆, 李秀梅, 倪志. 大肠癌组织Ets-1, MMP-1和VEGF的表达及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2441-2445 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2441.asp
国际会议	American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net
<div><div><div>世界华人消化杂志</div><div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div><div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (半月刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2005-10-28 原刊名 新消化病学杂志</div><div>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 管鑫妍 中文编辑 潘伯荣 张海宁 管鑫妍 电子编辑 张敏 张勇 李琪 本期审读 王谨晖</div></div><div><div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</div><div><div>世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.</div><div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</div><div>2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有</div></div></div><div><div>ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</div><div>邮发代号 82-262</div><div>国外代号 M 4481</div><div>国内定价 每期24.00元 全年576.00元</div><div>广告经营许可证 1401004000050</div></div></div>	

World Chinese Journal of Digestology

October 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 20

EDITORIAL

Current status of hydroxytryptamine in functional gastric intestinal diseases

Ding JH, Fu CG, Zhao RH 2405

BASIC RESEARCH

Inhibition of Allicin on G₂/M phase of human gastric cell line SGC-7901 and BGC-823

Liu X, Ma R, Chen W, Bai XL, Yuan Y 2409

Construction and expression of a eukaryotic expression plasmid containing human CD40 ligand in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and its effect on apoptosis

Xu Z, Shen SN, Qian XP, Yu LX, Liu BR 2413

Up-regulated genes in diethylnitrosamine-induced liver cancer in rats

Kan WB, Fang ZQ, Guan DY, Zhao XZ, Wu ZH, Sheng XS, Gao BF 2420

Isolation of the variable fragments of heavy chain against the terminal protein region of hepatitis B virus polymerase with protein fragment complementation assay

Yu JY, Lan L, Wang YM 2427

Construction of RNA polymerase II-Chromatin immunoprecipitation-primer extension-mass spectrum and its application in function research of single nucleotide polymorphism

Yan ZH, Deng GH, Wang YM 2431

Effects of betaine on expression of caspase-12 in ethanol-induced liver injury in rats

Zhang P, Gong ZJ 2437

Expression of E26 transformation-specific-1, matrix metalloproteinases-1 and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma

Hong W, Liu NZ, Zhang Q, Li XM, Ni Z 2441

CLINICAL RESEARCH

Relationship between single nucleotide polymorphism of apolipoprotein B gene and nonalcoholic fatty liver diseases

Yao H, Li YH 2446

Clinical pathology and HLA-DRB1 allele associations of primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis in Han Chinese

Chen S, Zhu GJ, Deng GH, Zhu Y 2450

REVIEW

Progress in research of *Helicobacter pylori* metabonomics

Zeng H, Zou QM 2455

Toll-like receptor and its effect in pathogenesis of viral hepatitis

Zhao FT, Ji XY, Pan L, Jia ZS 2459

Relationship between T-helper-cell subgroups and inflammatory intestinal diseases

Cui YF, Xu H, An XX, Wang ZB 2464

Way of apoptosis and tumor treatment

Tang R, Zhu ZG 2469

BRIEF REPORT

In situ expression and serum level of pepsinogen C in different gastric mucosa diseases

Li HM, Ning PF, Yuan Y 2473

Relationship between PTEN methylation and its mRNA expression in human gastric cancer cells *in vitro*

Deng QJ, Yu JP, Liu F, Qi YL, Liu SQ, Yu HG 2476

Protective effect of pantoprazole on gastric mucosal lesions in rats and its mechanism

Le QL, Zhang ZJ, Lin KR, Wang W 2480

Effect of *Qingre Huashi* recipe on liver low density lipoprotein-receptor mRNA in rats with epidemic febrile disease of dampness-heat syndrome

Lv WL, Gao QH, Li HF 2484

Inhibitory effects of bear bile powder on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Quan MJ, Jin RS, Piao L, Piao DM 2487

Expression and significance of phosphorylated focal adhesion kinase in colon carcinoma

Liu QS, Yu HG, Qi YL, Cao J, Luo HS, Yu JP 2490

Expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 protein in colonic carcinoma

Zhang ML, Xu JM, Mei Q, Bao JJ 2494

Significance of detection for matrix metalloproteinase-7 in rectal cancer tissues and mesorectum after total mesorectal excision

Zhang HG, Tian SL, Zhang RP 2497

Renaturation of *Helicobacter pylori* vacA gene recombined expressive inclusion body and construction of ELISA method

Dang SS, Wang HC, Jia XL, Yuan LC, Wang BF, Zhang X, Zhang-ZG, Cheng YA 2500

CLINICAL PRACTICE

Clinical and endoscopic features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma

Bao BJ, Huang JF, Zhou GX, Xiao MB, Zhang JG 2504

Expression of COX-2 and P16 protein and their correlations in various types of gastric polyps and gastric cancer cell

Li Q, Gao SL, Cui LJ, Li MQ 2506

Effect of Traditional Chinese Medicine *Xiangganlong* combined with Lamivudine in treatment of active hepatitis: an analysis of 90 cases

Wen R, Wang J, Yan M 2509

Detection of CD44v6 in mesorectum from total mesorectal excision: an analysis of 47 cases

Song Z, Tian SL 2514

Cost and curative effect of endoscopic therapy in treatment of acute biliary pancreatitis

Qin H, Cheng JH, Hou W, Li RX, Zhao Q, Liu NZ 2517

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology SemiMonthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date October 28, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

五羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状

丁健华, 傅传刚, 赵荣华

丁健华, 傅传刚, 中国人民解放军第二军医大学长海医院肛肠外科 上海市 200433

赵荣华, 美国克利福兰基金会佛罗里达医院肛肠外科 美国佛罗里达州 33331

教育部留学回国人员科研启动基金课题, 教外司留[2001]345号

通讯作者: 丁健华, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长海医院肛肠外科, junyi93@yahoo.com.cn

电话: 021-25072073

收稿日期: 2005-08-06 接受日期: 2005-08-26

摘要

五羟色胺(5-HT)是参与调节胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质, 95%来源于肠道黏膜层的嗜铬细胞。胃肠道主要有5-HT1、5-HT2、5-HT3、5-HT4、5-HT7受体。5-HT在发挥生理作用后通过肠黏膜上皮细胞膜上的5-HT转运体(SERT)再摄取至细胞内灭活。SERT基因5'启动子区存在多态性位点5-HTTLPR, 形成L/L、L/S、S/S三种等位基因类型, S型较L型转录效率降低。胃肠道通过肠神经系统自主、协调地完成蠕动、分泌反射。肠嗜铬细胞释放5-HT, 激活黏膜下传入神经纤维, 通过肠神经系统, 调节局部的兴奋和抑制。5-HT信号系统异常可导致胃肠道动力及分泌功能异常、内脏高敏感性, 与慢性便秘、肠易激综合征、腹泻及功能性消化不良等胃肠道功能性疾病密切相关。对SERT表达在肠易激综合征发病机制中作用的研究是目前的热点。SERT基因多态性与肠易激综合征各型间可能存在联系。

关键词: 五羟色胺; 五羟色胺受体; 五羟色胺转运体; 胃肠道功能性疾病

丁健华, 傅传刚, 赵荣华. 五羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2405-2408

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2405.asp>

0 引言

五羟色胺(serotonin, 5-HT)是参与调节胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质和旁分泌信号分子。近年来, 大量的基础及临床研究使我们对5-HT调控胃肠道功能的复杂机制有了深入的认识, 同时推动了胃肠道功能性疾病发病机制及药物治疗的研究。

1 5-HT及其受体

人体5-HT 95%来源于肠道, 主要是黏膜层的肠嗜铬细胞(enterochromaffin cells, EC), 它含有合成5-HT所需要色氨酸羟化酶。此外, 少数也来源于肠神经元。EC细胞对肠腔内压力和化学刺激非常敏感, 一旦肠腔内压力升高即可分泌5-HT, 作用于黏膜下传入神经神经元上

的5-HT受体, 激发蠕动反射, 并调节肠道分泌功能^[1]。

根据分子结构、作用机制及功能不同, 5-HT受体家族包括7个成员(5-HT1-5-HT7), 共15个亚型, 是神经递质受体中最复杂的家族之一。在胃肠道主要有5-HT1、5-HT2、5-HT3、5-HT4、5-HT7受体, 调节胃肠道功能^[2-5]。其中分布于肠神经元上的包括5-HT1A(抑制性)、5-HT3、5-HT4(兴奋性)受体, 调控神经递质的释放; 分布于肠平滑肌上有5-HT2A(收缩作用)、5-HT4、5-HT7(舒张作用)受体, 直接调控平滑肌的运动。此外, 在肠神经元上还发现了5-HT1P受体, 介导慢速兴奋性突触后电位, 但在国际药理学协会提出的5-HT受体分类中未包括该受体, 因此被称为“孤独”受体^[6]。5-HT受体家族的复杂性表明, 5-HT可通过多种途径产生多种作用。而针对5-HT信号系统研发的各种药物也因此产生多种药理作用。

2 5-HT转运体 (serotonin transporter, SERT)

5-HT在发挥生理作用后必须灭活, 以免产生中毒反应及5-HT受体的脱敏。代谢5-HT的单胺氧化酶和其他酶均位于细胞内, 而5-HT在生理pH下带有高电荷及亲水性, 不能穿过细胞膜。因此, 5-HT必须通过载体转运至细胞内以灭活。这个过程主要依靠肠黏膜上皮细胞膜上的5-HT转运体来完成, 5-HT能神经元也可表达5-HT转运体将5-HT再摄取^[7]。研究表明, 抑制5-HT转运体可导致内在初级传入神经元对5-HT反应增强, 如果反应过强或时间较长即引起5-HT受体脱敏^[7,8]。Chen *et al*^[9]研究了SERT基因敲除大鼠, 其肠道未见SERT mRNA, 缺乏正常大鼠肠道具有的很强的摄取5-HT至上皮细胞和肠神经元中的能力。但SERT基因敲除大鼠也有能转运5-HT的分子表达, 包括多巴胺转运体和阳离子转运体, 但结合力和选择性显著低于5-HT转运体。

SERT基因位于17q11.2, 长37.8 kb, 由14个外显子组成, 编码630氨基酸的蛋白。SERT基因的两个多态性位点正日渐得到关注。(1)内含子2的17 bp重复片段VNTR(variable number tandem repeats), 形成三个等位基因: S Tin2.9, S Tin2.10, S Tin2.12。(2)另一多态性位点为5'启动子区44 bp的插入/缺失, 称为5-HTTLPR(SERT gene-linked polymorphic region), 形成长型(L)和短型(S)两种等位片段, 从而产生L/L、L/S、S/S三种等位基因类型。偶尔有超长片段(super-long, XL 和 XXL)^[10]。VNTR的功能尚不清楚, 但5-HTTLPR调节SERT基因的转录。S型较L型转录效率降低, 5-HT

结合及重摄取减少, 5-HT能活动延长^[10, 11]。

3 5-HT对胃肠道功能的生理调节机制

胃肠道是唯一在无中枢神经系统支配情况下, 能自主、协调地完成复杂的蠕动、分泌反射的器官。这归功于其内在神经支配—肠神经系统(enteric nervous system, ENS)。肠神经系统具有内在传入神经元和中间神经元, 使胃肠道不需要外在神经支配而能接受刺激信号, 产生反射。然而, 肠神经系统对胃肠道的调控作用需要其感受到肠腔内压力和化学刺激因素, 但无内在或外在神经纤维达黏膜上皮。因此, 神经元感受肠腔内刺激是一种神经上皮现象^[8, 12]。这个过程即由肠嗜铬细胞介导, 这些细胞感受肠腔内刺激后释放大量的5-HT, 后者激活黏膜下初级传入神经纤维^[8]。

5-HT刺激内在初级传入神经元后, 该神经元在肌间神经丛中与上行、下行中间神经元形成突触, 从而调节局部的兴奋和抑制^[8]。上行性中间神经元通过释放P物质和ACh作用于兴奋性运动神经元, 引起环行肌收缩。下行性中间神经元通过释放5-HT、血管活性肠肽、生长抑素、速激肽、NO、ACh等神经递质作用于抑制性神经元, 引起环行肌松弛。由此形成了胃肠道由近端向远端的蠕动反射^[13, 14]。此外, 5-HT也可直接作用于一些肠神经元及肌细胞等效应器来发挥作用。研究表明^[15], 参与蠕动反射的5-HT受体主要为5-HT₄受体, 在这个蠕动反射中的内在初级传入神经元是CGRP能神经元, 由5-HT作用于5-HT₄受体而激活。体外研究证明, 5-HT₄受体激动剂可引起结肠近端收缩和远端松弛。而由此引起的蠕动反射又可由CGRP拮抗剂阻断。虽然未发现人5-HT₃受体在结肠蠕动反射中有明显作用, 但其介导了胃结肠反射^[16]。

4 5-HT和胃肠道功能性疾病

最近愈来愈多的研究发现, 5-HT信号系统异常可导致胃肠道动力及分泌功能异常和内脏高敏感性, 这与慢性便秘、肠易激综合征(IBS)、腹泻及功能性消化不良等胃肠道功能性疾病密切相关。

在慢传输型便秘患者的结肠黏膜中, 5-HT阳性细胞数量明显多于正常对照组^[17]。Miwa *et al*^[18]研究了健康人和IBS便秘型、腹泻型患者结肠黏膜, 发现IBS便秘型结肠黏膜中5-HT含量显著高于健康人及腹泻型IBS患者。对结肠无力症患者结肠黏膜、黏膜下及肌层的5-HT进行的免疫组织化学观察和半定量分析发现, 结肠无力症患者结肠黏膜5-HT显著增高, 黏膜下及肌层无明显变化^[19]。这种5-HT升高的原因及与这些疾病的关系尚不清楚, 可能的解释: (1)结肠动力障碍引起的5-HT反应性升高; (2)某些因素引起5-HT反常升高使5-HT受体脱敏, 参与了结肠动力障碍; (3)5-HT受体亚型存在表达及分布异常, 与5-HT共同参与了结肠动力障碍。随后一项对5-HT受体

在结肠无力症患者左半结肠中表达的研究发现: 总体上, 5-HT受体在结肠无力症患者左半结肠黏膜肌层、环肌层和纵肌层中的表达均呈下调趋势。但在环肌层中5-HT受体水平越高, 结肠传输速度却越慢, 提示5-HT受体在结肠无力症结肠壁各层中均存在表达异常, 而且某些特定的或功能变异的受体亚型存在着表达上调^[20]。

有关SERT表达的模式在IBS的发病机制中作用的研究是目前的热点。对SERT基因敲除大鼠研究发现^[9], 其肠道虽然可通过多巴胺转运体和阳离子转运体转运部分5-HT, 但其效率明显下降, 大鼠能存活、生长, 但其肠功能出现异常, 其大便水分较正常大鼠明显增多, 结肠动力增加, 也有一小部分大鼠出现动力下降、便秘及腹泻便秘交替情况, 症状与IBS患者一致。前者可由大量未回收的5-HT引起肠蠕动反射和分泌反射增强引起, 而对便秘和腹泻便秘交替的解释, 可能由于一方面大量5-HT作用导致受体脱敏引起暂时性便秘, 另一方面神经间隙的长期放大的5-HT能活性导致5-HT受体下调, 从而降低了5-HT效应。Liu *et al*^[21]发现SERT敲除大鼠肠壁5-HT₃受体出现了适应性变化, 表现为对5-HT结合力下降和脱敏。5-HT受体激动剂的药理研究也证实, 随着5-HT受体激动剂在神经间隙的作用延长, 5-HT₁、5-HT₂受体表达下调^[22]。这些研究支持上述假设。Bellini *et al*^[23]研究了IBS腹泻型患者血小板SERT, 并与正常人和5-HT₃受体阻断剂阿洛斯拉琼治疗前后比较, 发现腹泻型IBS患者血小板膜上表达的SERT密度低、结合力低, 推测其引起5-HT重摄取能力下降, 与IBS腹泻型症状有关。阿洛斯拉琼治疗后, 虽然SERT转运功能无改变, 但症状明显缓解。由于SERT蛋白在体内所有细胞中具有同样的分子特性, 可以认为这种5-HT再摄取能力的改变也发生在肠道中, 因此, 肠壁大量5-HT残留在突触间隙, 作用于突触后受体, 产生过多生理作用、延长作用时间, 引起肠动力、分泌、感觉异常, 而表现出IBS腹泻型的临床症状。同时该研究显示, 临床症状的严重性与5-HT摄取能力改变的程度有关。血小板膜上SERT密度越低, 症状越重。其他研究也发现, IBS和炎症性肠病中结肠黏膜mRNA SERT表达均下降^[24]。临床上, 5-HT₃受体拮抗剂阿洛斯拉琼能有效治疗IBS腹泻型也已形成共识。因此, 5-HT灭活不足、过多的5-HT作用于受体可能是IBS的发病机制。

如前所述, SERT基因转录控制区(5-HTTLPR)存在多态性, 以此调控SERT基因的转录, 如S型较L型转录效率降低。因此在IBS的研究中, SERT基因多态性分析越来越受到重视。Pata *et al*^[25]对54例IBS患者和91例健康对照组SERT基因的两个多态性区域VNTR和5-HTTLPR进行了比较, 发现SERT多态性在健康人和IBS患者中无显著差异。IBS分成腹泻型、便秘型、交替型, 将三组进行组间比较发现, 5-HTTLPR等位基因S/S在便秘型中较其他两组明显高($P < 0.05$), 而与健康组比较无差异, 但S/S的出现

频率在腹泻型和便秘腹泻交替型中较健康对照组低; L/S型在腹泻型(88%)中较便秘型、交替型和对照组明显高; L/L型各组间无差异。VNTR基因在各组间无差异。因此未发现IBS和SERT基因多态性间有联系, SERT不是决定是否患IBS的因素。但如果患者有IBS, 而患者为S/S型, 则更可能为便秘型, 而L/S型更易患腹泻型。此后, Yeo *et al*^[26]研究了194例北美腹泻型IBS女性患者和448例正常女性对照, 发现两组间L/L型无差异, 但S/S和L/S在对照组(17.2%、47.8%)和腹泻型IBS(31.4%、31.9%)间有差异。因此, 作者认为SERT启动子区基因多态性与女性腹泻型IBS有关, 可能是腹泻型IBS的候选基因。此外, SERT基因多态性情况也影响了阿洛斯拉对腹泻型IBS患者的疗效, Camilleri *et al*^[27]对30例腹泻型IBS患者(男女各15例)予阿洛斯拉1 mg 2/d口服共6 wk, 服药前后分别测定结肠运输功能, 并测定患者的SERT基因多态性。结果L/L型疗效优于L/S型。结论: SERT启动子区的基因多态性影响腹泻型IBS患者对5-HT₃受体拮抗剂的治疗反应, 影响药物的效应风险比。可能因为L/S型有较多5-HT残留于突触间隙, 对突触后受体的过度刺激可引起其部分脱敏, 影响了药物的疗效。综上所述, SERT基因多态性与IBS各型间可能存在联系, 然而由于不同的人群中SERT基因多态性分布并不一致, 一种多态性在一个人群中与某种疾病有关, 但在另一人群中未必。这可能部分导致了各研究结果的不一致, 尚有待多中心、大样本的SERT基因多态性、IBS及其对药物治疗反应的研究, 以进一步揭示其中的复杂关系。

总之, 随着研究的不断深入, 5-HT信号系统在胃肠道功能的生理及病理生理中的复杂作用正不断得到解析。事实上, 由于5-HT是中枢神经系统中重要的信号分子, 与情绪、食欲、睡眠、记忆、学习等许多生理心理功能相关, 有关5-HT信号系统研究更为深入的是在神经精神性疾病中, 5-HT及SERT表达改变可引起焦虑、抑郁、强迫症、恐惧症、甚至精神分裂症^[28]。临床上, 慢传输性便秘、IBS、功能性腹胀等胃肠功能性疾病患者常伴有明显的情绪精神状态异常, 而一些针对5-HT信号系统的抗抑郁药、抗焦虑药也能有效缓解IBS^[29], 这又从另一个侧面提示了5-HT在胃肠道功能性疾病中扮演了重要角色, 需要我们进一步探索。相信对5-HT、5-HT受体亚型、SERT及其基因多态性的深入透彻研究, 将有助于我们认识慢传输性便秘、IBS等胃肠道功能性疾病的发病机制, 并为临床药物治疗提供重要依据。

5 参考文献

- Cooke HJ. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 77-80
- Tuladhar BR, Ge L, Naylor RJ. 5-HT₇ receptors mediate the inhibitory effect of 5-HT on peristalsis in the isolated guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 1210-1214
- Briejer MR, Akkermans LM, Schuurkes JA. Gastrointestinal prokinetic benzamides: the pharmacology underlying stimulation of motility. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 631-651
- Read NW, Gwee KA. The importance of 5-hydroxytryptamine receptors in the gut. *Pharmacol Ther* 1994; 62: 159-173
- Prins NH, Briejer MR, Van Bergen PJ, Akkermans LM, Schuurkes JA. Evidence for 5-HT₇ receptors mediating relaxation of human colonic circular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 849-852
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylcharek EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46: 157-203
- Chen JX, Pan H, Rothman TP, Wade PR, Gershon MD. Guinea pig 5-HT transporter: Cloning, expression, distribution and function in intestinal sensory reception. *Am J Physiol* 1998; 275: G433-G448
- Pan H, Gershon MD. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J Neurosci* 2000; 20: 3295-3309
- Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, Gershon MD. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J Neurosci* 2001; 21: 6348-6361
- Collier DA, Stober G, Li T, Heils A, Catalano M, Di Bella D, Arranz MJ, Murray RM, Vallada HP, Bengel D, Muller CR, Roberts GW, Smeraldi E, Kirov G, Sham P, Lesch KP. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: Possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry* 1996; 1: 453-460
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996; 274: 1527-1531
- Bertrand PP, Thomas EA, Kunze WA, Bornstein JC. A simple mathematical model of second-messenger mediated slow excitatory postsynaptic potentials. *J Comput Neurosci* 2000; 8: 127-142
- Goyal RK, Hirano I. The enteric nervous system. *N Engl J Med* 1996; 335: 1106-1115
- Ponti FD. Pharmacology of serotonin: what a clinician should know. *Gut* 2004; 53: 1520-1535
- Grider JR, Foxx-Orenstein AE, Jin JG. 5-hydroxytryptamine₄ receptor agonists initiate the peristaltic reflex in human, rat, and guinea pig intestine. *Gastroenterology* 1998; 115: 370-380
- Björnsson ES, Chey WD, Ladabaum U, Woods ML, Hooper FG, Owyang C, Halser WL. Differential 5-HT₃ mediation of human gastrocolonic response and colonic peristaltic reflex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1998; 275: 498-505
- Baig MK, Zhao RH, Woodhouse SL, Abramson S, Weiss JJ, Noguera JJ, Wexner SD. Variability in serotonin and enterochromaffin cells in patients with colonic inertia and idiopathic diarrhoea as compared to normal controls. *Colorectal Dis* 2002; 4: 348-354
- Miwa J, Echizen H, Matsueda 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
- Zhao RH, Baig MK, Mack J, Abramson S, Woodhouse S, Wexner SD. Altered serotonin immunoreactivities in the left colon of patients with colonic inertia. *Colorectal Dis* 2002; 4: 56-60
- Zhao RH, Baig MK, Thaler KJ, Mack J, Abramson S, Woodhouse S, Tamir H, Wexner SD. Reduced expression of serotonin receptor(s) in the left colon of patients with colonic inertia. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 81-86
- Liu MT, Rayport S, Jiang Y, Murphy DL, Gershon MD. Expression and function of 5-HT₃ receptors in the enteric neurons of mice lacking the serotonin transporter. *Am J Physiol* 2002; 283: 1398-1411
- Saucier C, Morris SJ, Albert PR. Endogenous serotonin-2A and -2C receptors in Balb/c-3T3 cells revealed in serotonin-free medium: desensitization and down-regulation by serotonin. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 1347-1357

- 23 Bellini M, Rappelli L, Blandizzi C, Costa F, Stasi C, Colucci R, Giannaccini G, Marazziti D, Betti L, Baroni S, Mumolo MG, Marchi S, Del Tacca M. Platelet serotonin transporter in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome both before and after treatment with alosetron. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2705-2711
- 24 Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 1657-1664
- 25 Pata C, Erdal ME, Derici E, Yazar A, Kanik A, Ulu O. Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1780-1784
- 26 Yeo A, Boyd P, Lumsden S, Saunders T, Handley A, Stubbins M, Knaggs A, Asquith S, Taylor I, Bahari B, Crocker N, Rallan R, Varsani S, Montgomery D, Alpers DH, Dukers GE, Purvis I, Hicks GA. Association between a functional polymorphism in the serotonin transporter gene and diarrhea predominant irritable bowel syndrome in women. *Gut* 2004; 53: 1452-1458
- 27 Camilleri M, Atanasova E, Carlson PJ, Ahmad U, Kim HJ, Viramontes BE, McKinzie S, Urrutia R. Serotonin-transporter polymorphism pharmacogenetics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 425-432
- 28 Austin MC, Whitehead RE, Edgar CL, Janosky JE, Lewis DA. Localized decrease in serotonin transporter-immunoreactive axons in the prefrontal cortex of depressed subjects committing suicide. *Neuroscience* 2002; 114: 807-815
- 29 Whitehead WE, Palsson O, Jones KR. Systematic review of the comorbidity of irritable bowel syndrome with other disorders: what are the causes and implications? *Gastroenterology* 2002; 122: 1140-1156

电编 李琪 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 •

2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知

本刊讯 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展, 由中华医学会肝病学分会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的“第5届全国肝脏疾病学术研讨会”定于2006-05在辽宁省大连市召开。届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题继续进行继续教育讲座, 并授予参会代表国家级继续教育 I 类学分。现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1) 病毒性肝炎发病机制的研究进展; (2) 病毒性肝炎的治疗策略; (3) 乙型病毒性肝炎的长期治疗; (4) 丙型肝炎的抗病毒治疗; (5) 肝纤维化发病机制研究进展; (6) 肝纤维化的防治; (7) 肝硬化的规范化治疗; (8) 肝细胞癌的病因学研究进展; (9) 肝癌的发病机制研究进展; (10) 肝癌的早期诊断; (11) 肝癌的手术治疗及方案选择; (12) 肝癌的非手术治疗; (13) 肝癌的生物治疗; (14) 自身免疫性肝病的发病机制; (15) 自身免疫性肝病的诊断和治疗; (16) 肝移植后肝炎复发的诊断预防和治疗; (17) 生物人工肝的应用及进展; (18) 小儿自身免疫性肝病; (19) 肝肾综合征; (20) 肝功能衰竭; (21) 肝干细胞的研究进展及临床应用; (22) 脂肪肝及酒精性肝病; (23) 非酒精性脂肪性肝病。

2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及500字(词)左右中文摘要各一份, 应包括目的、材料与方法、结果、讨论, 并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿, 恕不退稿)。凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不再受理。

3 论文寄至地址

400010, 重庆市渝中区临江路74号, 中华肝脏病杂志编辑部收。请在信封左下角注明“会议征文”。欢迎用软盘和电子邮件方式投稿。电子邮件地址: zhgz@vip.163.com。征文截稿日期: 2006-02-28(以邮戳为准)。

欢迎从事肝病临床和基础研究工作的医务人员及科研工作者踊跃投稿, 参加会议。

大蒜素对人胃癌细胞 SGC-7901及BGC-823 G₂/M 期的阻滞调节机制

柳星, 马锐, 陈威, 白雪蕾, 袁媛

柳星, 马锐, 陈威, 白雪蕾, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001

柳星, 女, 1970-04-21生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2002年中国医科大学肿瘤学硕士生, 副主任医师, 主要从事肿瘤临床及基础研究。

十五国家科技攻关项目, No. 2004BA703B04-02

通讯作者: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室: yyuan@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-23256666-6153 传真: 024-22703576

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Inhibition of Allicin on G₂/M phase of human gastric cell line SGC-7901 and BGC-823

Xing Liu, Rui Ma, Wei Chen, Xue-Lei Bai, Yuan Yuan

Xing Liu, Rui Ma, Wei Chen, Xue-Lei Bai, Yuan Yuan, the Third Laboratory of the Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by the National Science and Technology Research and Development Program of China during the 10th Five-Year Plan Period, No. 2004BA703B04-02

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

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

Abstract

AIM: To explore the inhibitory effect of Allicin on the G₂/M phase of human gastric cell line SGC-7901 and BGC-823 and its mechanism.

METHODS: The proliferation inhibition rate and IC₅₀ of Allicin (72 h) to SGC-7901 and BGC-823 cells were examined by MTT assay. The cycles of the cells were measured by flow cytometry when IC₅₀ concentration of Allicin was adopted. The expression of CDC2 and CyclinB protein were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Allicin inhibited the proliferation of SGC-7901 (IC₅₀ = 23 mg/L) and BGC-823 (IC₅₀ = 35 mg/L) cells and the inhibition rate was elevated with the increase of Allicin concentration. After treatment with IC₅₀ concentration of Allicin, the percentage of G₀/G₁ phase cells was decreased, but that of G₂/M phase ones was significantly increased for both SGC-7901 (24, 48 h vs control: 26.47±2.54%, 28.88±2.75% vs 24.30±2.74%, *P* < 0.01) and BGC-823 (24, 48 h vs

control: 22.78±1.45%, 24.87±1.61% vs 20.32±1.34%, *P* < 0.01). CDC2 and CyclinB proteins were positively expressed in SGC-7901 and BGC-823 cells without Allicin treatment. After treatment, the comparative rates of CDC2 and CyclinB expression were 87.2% and 59.3% in SGC-7901 cells, respectively, and 84.4% and 62.8% in BGC-823 cells, respectively (all *P* < 0.01).

CONCLUSION: Allicin causes arrest of SGC-7901 and BGC-823 cells in G₂/M phase, and the mechanism is related to the down-regulation of CDC2 and CyclinB expression.

Key Words: Allicin; SGC-7901; BGC-823; G₂/M phase inhibition; CDC2; CyclinB

Liu X, Ma R, Chen W, Bai XL, Yuan Y. Inhibition of Allicin on G₂/M phase of human gastric cell line SGC-7901 and BGC-823. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2409-2412

摘要

目的: 研究大蒜素对人胃癌细胞SGC-7901及BGC-823 G₂/M期阻滞作用及其调节机制。

方法: 应用MTT法测定大蒜素对人胃癌细胞株SGC-7901和BGC-823细胞增殖抑制率及72 h的IC₅₀。通过流式细胞仪检测IC₅₀浓度的大蒜素对SGC-7901和BGC-823细胞周期的影响。应用免疫组化染色检测大蒜素作用前后SGC-7901和BGC-823细胞CDC2和CyclinB蛋白表达。

结果: 不同浓度的大蒜素可以抑制人胃癌细胞株SGC-7901和BGC-823的增殖, 且随着大蒜素浓度的增大, 抑制率逐渐增高。大蒜素抑制SGC-7901细胞增殖50%的药物浓度(IC₅₀): 72 h为23 mg/L; 大蒜素抑制BGC-823细胞增殖50%的药物浓度(IC₅₀): 72 h为35 mg/L。大蒜素作用于两种细胞, 其细胞周期均发生了明显的变化, 主要表现为G₀/G₁期细胞减少, G₂/M期细胞增多(SGC-7901细胞24, 48 h vs 对照: 26.47±2.54%, 28.88±2.75% vs 24.30±2.74%, *P* < 0.01; BGC-823细胞24, 48 h vs对照: 22.78±1.45%, 24.87±1.61% vs 20.32±1.34%, *P* < 0.01), S期细胞无明显变化。未经大蒜素处理的两种细胞, CDC2和CyclinB蛋白表达均为阳性, 大蒜素处理后, CDC2和CyclinB

蛋白表达下降. SGC-7901细胞经23 mg/L大蒜素处理后, CDC2蛋白相对阳性表达率为87.2%; CyclinB蛋白相对阳性表达率为59.3%. BGC-823细胞CDC2蛋白在35 mg/L大蒜素作用后, 相对阳性表达率为84.4%; CyclinB蛋白相对阳性表达率为62.8%, 与对照组相比均有显著性差异($P<0.01$).

结论: 大蒜素使人胃癌细胞株SGC-7901和BGC-823停滞于G₂/M期, 其机制是通过CDC2和CyclinB蛋白表达下降实现的.

关键词: 大蒜素; SGC-7901; BGC-823; G₂/M期阻滞; CDC2; CyclinB

柳星, 马锐, 陈威, 白雪蕾, 袁媛. 大蒜素对人胃癌细胞SGC-7901及BGC-823 G₂/M期的阻滞调节机制. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2409-2412
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2409.asp>

0 引言

细胞周期有3个调控点, 分别是G₀/G₁, G₁/S和G₂/M, 其中G₁/S和G₂/M最为重要. G₂期向M期的转变涉及到细胞分裂, 完成一个细胞向两个细胞的转化, 故G₂/M期阻滞显得更为重要. 目前G₂/M期阻滞的机制不完全清楚. 在真核细胞中, 正常细胞G₂/M进程由细胞周期蛋白B(CyclinB)-P34CDC2复合物调控. 大蒜素是从大蒜球茎中分离出的一种化合物, 抗肿瘤机制为阻断致癌物的合成、抗突变、抗畸变; 直接杀伤; 抑制肿瘤细胞增殖; 诱导细胞周期特异性阻滞; 诱导凋亡; 调节机体免疫功能; 对抗肿瘤药物的增敏作用和抗耐药等, 是通过多个途径完成的. 国内外对大蒜素抑制肿瘤细胞周期, 使之停滞于G₂/M期的报道虽然很多, 但是从机制方面探讨大蒜素如何使肿瘤细胞停滞于G₂/M期, 目前罕见报道. 我们应用MTT法及流式细胞仪, 深入研究大蒜素对肿瘤细胞的抑制作用以及对肿瘤细胞周期的影响. 并通过免疫组化等技术, 检测在G₂/M期调控中起重要作用的CDC2蛋白和CyclinB蛋白的表达水平, 探讨大蒜素对肿瘤细胞周期阻滞的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌转移淋巴结细胞系SGC-7901, 人胃低分化腺癌细胞系BGC-823由中国医科大学细胞生物学教研室提供. MTT(Sigma公司); 碘化丙啶(PI), Rnase(Fluka公司); 即用型鼠mAb P34CDC2, SP试剂盒, DAB试剂盒, 抗原修复液II, 胰酶消化液(福州迈新公司); 即用型鼠mAb CyclinB(武汉博士德公司); 大蒜素注射液(30 mg/支)(上海禾丰制药有限公司); 流式细胞仪型号: FACScan(B.D USA);

1.2 方法 将两种细胞用含有100 mL/L小牛血清的

RPMI 1640培养液, 于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养, 每2-3 d传代1次, 取对数生长期细胞用于实验.

1.2.1 MTT法测定细胞增殖抑制率 将两种细胞密度分别调整至 5×10^7 /L, 接种于96孔板. 用不同浓度大蒜素处理细胞, 设立不加任何处理因素的对照组. 每个浓度3个复孔. 用酶标仪在570 nm处测定每孔吸光度. 以大蒜素浓度为横坐标, 以细胞抑制率为纵坐标, 绘制细胞增殖抑制曲线, 并测定药物半数抑制浓度(IC₅₀). 以下式计算实验组细胞增殖抑制率, 细胞增殖抑制率=(1-实验组吸光度值/对照组吸光度值)×100%.

1.2.2 流式细胞仪分析细胞周期 取生长状态良好的细胞, 接种在大方瓶中, 培养至密度达60-70%时, 加入MTT法测得的72 h IC₅₀浓度大蒜素, 培养24 h后, 收集细胞. 采用cellQuest进行细胞周期各期的百分比分析, 每组实验重复5次.

1.2.3 CDC2和CyclinB蛋白表达 培养细胞分别加入MTT法测得的72 h IC₅₀浓度的大蒜素, 作用24 h后收集细胞, 同时设立不加处理的对照组. 应用细胞爬片方法制成细胞涂片, 行常规SP免疫组化染色, 苏木素复染, 显微镜下观察结果. 判断标准: 以细胞核、细胞质呈清晰棕黄色颗粒为阳性细胞. 高倍视野下查200个细胞, 分别计算阳性细胞百分比, 并换算成治疗组占对照组的阳性细胞的相对百分比.

统计学处理 两样本比较采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 大蒜素对胃癌细胞生长的抑制作用 对照组细胞呈正常的对数生长, 大蒜素对SGC-7901和BGC-823两种细胞的生长均有明显的抑制作用, 且呈浓度依赖性(图1). 大蒜素抑制SGC-7901细胞增殖50%的药物浓度(IC₅₀): 72 h为23 mg/L; 大蒜素抑制BGC-823细胞增殖50%的药物浓度(IC₅₀): 72 h为35 mg/L.

2.2 大蒜素对细胞周期的阻滞作用 SGC-7901细胞和BGC-823细胞在IC₅₀浓度大蒜素诱导24, 48 h后收集,

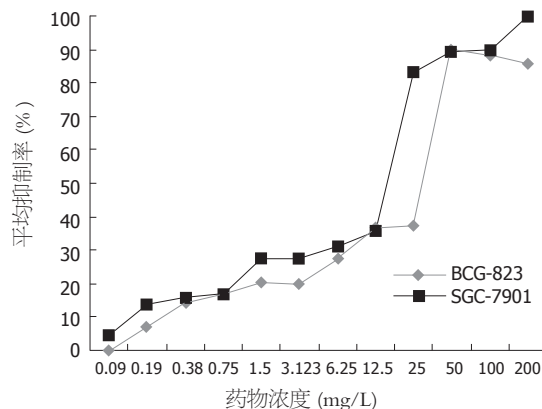


图1 大蒜素对SGC-7901和BGC-823细胞增殖抑制的作用.

流式细胞仪检测, 结果显示两种细胞的细胞周期均发生了明显的变化, 主要表现为G₀/G₁期细胞减少, G₂/M期细胞增多, S期细胞无明显变化, 提示两种胃癌细胞经大蒜素处理后细胞周期阻滞于G₂/M期($P<0.01$, 表1)。

表1 大蒜素对SGC-7901和BGC-823细胞周期的影响(%, mean \pm SD, $n=5$)

	t/h	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
SGC-7901	对照(0)	62.47 \pm 2.02	13.23 \pm 1.64	24.30 \pm 2.74
	24	58.21 \pm 2.03 ^b	15.32 \pm 1.60 ^b	26.47 \pm 2.54 ^b
	48	57.54 \pm 2.31 ^b	13.58 \pm 1.88 ^b	28.88 \pm 2.75 ^b
BGC-823	对照(0)	61.14 \pm 1.77	34.54 \pm 1.92	20.32 \pm 1.34
	24	59.04 \pm 1.91 ^b	28.18 \pm 1.76 ^b	22.78 \pm 1.45 ^b
	48	56.53 \pm 1.58 ^b	18.60 \pm 1.91 ^b	24.87 \pm 1.61 ^b

^b $P<0.01$ vs 对照组。

2.3 CDC2和CyclinB蛋白的表达 未经大蒜素处理的两种细胞, CDC2和CyclinB蛋白表达均为阳性表达。经大蒜素处理后, CDC2和CyclinB蛋白表达下降。SGC-7901细胞经23 mg/L大蒜素处理后, CDC2蛋白相对阳性表达率为87.2%; CyclinB蛋白相对阳性表达率为59.3%。BGC-823细胞CDC2蛋白在35 mg/L大蒜素作用后, 相对阳性表达率为84.4%; CyclinB蛋白相对阳性表达率为62.8%($P<0.01$, 图2-3)。

3 讨论

大蒜素是从大蒜球茎中分离出的一种化合物^[1]。Filomeni *et al*^[2]发现大蒜素能使神经母细胞SH-SY5Y

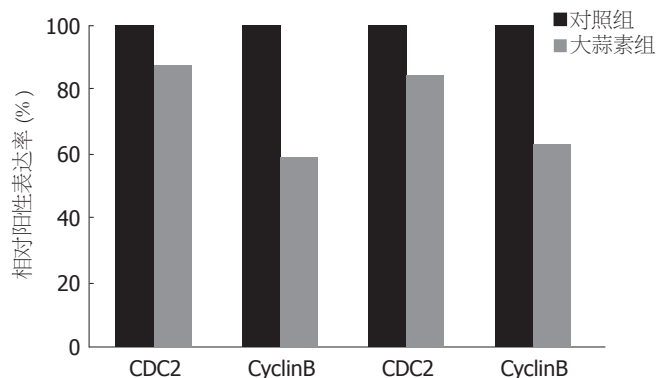


图2 大蒜素作用SGC-7901和BGC-823后cdc2和cyclinB蛋白相对阳性表达率。

停滞于G₂/M期。Wu *et al*^[3]亦发现大蒜素能使人肝癌细胞(J5)阻滞于G₂/M期, 并呈明显的时间、剂量依赖性。Wong *et al*^[4]从大蒜等植物中提取的有机硫化物(OSCs)能阻滞人类白血病细胞于G₂/M期。本结果显示, 不同浓度的大蒜素可以抑制人胃癌细胞株SGC-7901, BGC-823的增殖, 且随着大蒜素浓度的增大, 抑制率逐渐增高, 浓度为0.19 mg/L的大蒜素对SGC-7901的抑制率为12.1%, 当浓度提高到200 mg/L时抑制率则达88.6%。同样浓度的大蒜素对BGC-823的抑制率分别是6.5%和84.8%, 表现出对胃癌细胞的抑制呈大蒜素浓度依赖性。通过流式细胞仪的检测, IC₅₀浓度的大蒜素使人胃癌细胞株SGC-7901, BGC-823停滞于G₂/M期, 与对照组相比, 两种胃癌细胞株G₂/M期比例增高, G₀/G₁期比例下降, S期比例无明显变化。

细胞周期能否启动进行细胞增殖, 主要的调控

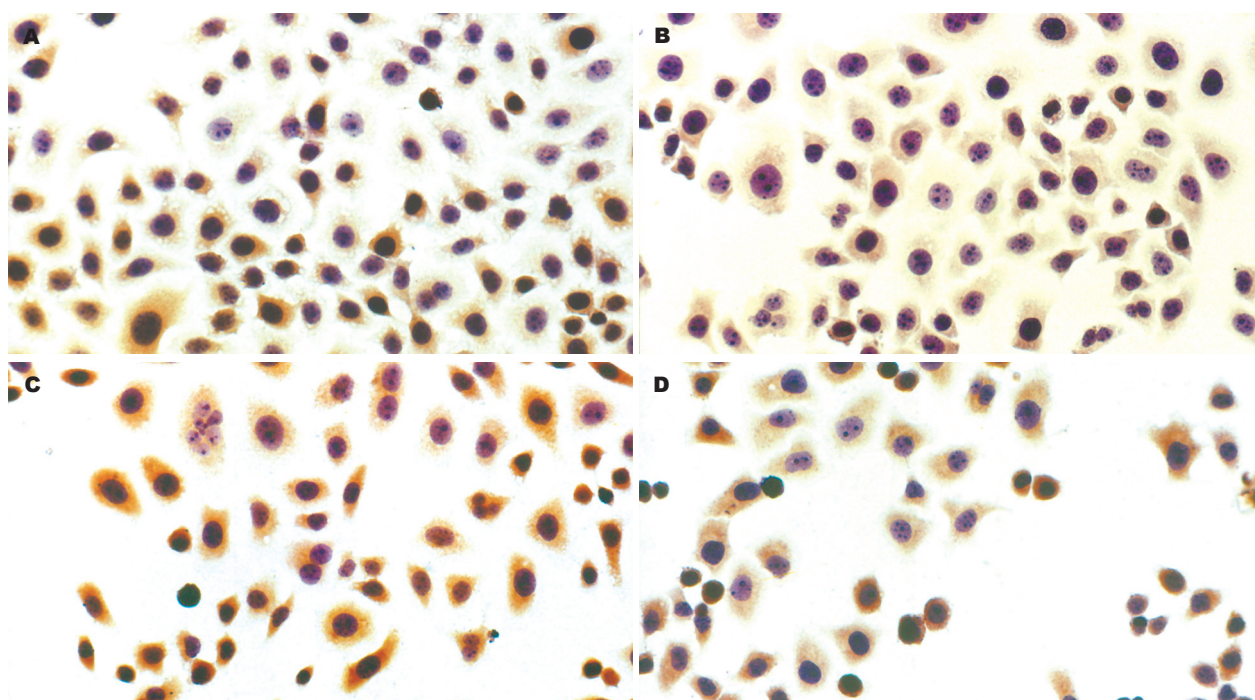


图3 胃癌细胞CDC2和CyclinB蛋白表达(SP \times 400)。A: SGC-7901细胞对照组CDC2阳性表达; B: SGC-7901细胞大蒜素处理后CDC2蛋白表达下降; C: BGC-823细胞对照组CyclinB阳性表达; D: BGC-823细胞大蒜素处理后CyclinB蛋白表达下降。

点在G₁期,它决定细胞能否通过G₁期,进入S期,它是细胞周期的驱动机制^[5]. G₁期检测点能防止DNA受损的细胞进入S期的复制. G₂/M期是细胞周期的监控机制^[5],其能确保细胞复制的忠实性^[6,7], G₂期检测点能防止受损的DNA和未完成复制的DNA进入有丝分裂. G₂期向M期的转变涉及到细胞分裂,包括胞质分裂和核DNA分裂^[8],完成一个细胞向两个细胞的转化. 在肿瘤细胞,其会以几何倍数增长,故G₂/M期阻滞显得更为重要. 目前G₂/M期阻滞的机制不完全清楚. 在真核细胞中,正常细胞G₂/M进程由CyclinB-P34CDC2复合物调控. P34CDC2是CDC2基因编码的34 ku的周期蛋白依赖激酶, CyclinB是调节亚基. 在G₂后期,二者结合形成有丝分裂促进因子(MPF),然后CDC2蛋白N端Thr14和Tyt15脱磷酸化, Thr161磷酸化,从而被活化而具激酶活性,进而诱导一系列底物磷酸化,引导核膜崩解、染色质凝聚等有丝分裂所具有的变化. 目前对G₂/M期阻滞的研究主要集中在CyclinB和P34CDC2上. 本结果提示,未经大蒜素处理的两种细胞, CDC2和CyclinB蛋白表达均为阳性表达. 经大蒜素处理后, CDC2和CyclinB蛋白表达下降. SGC-7901细胞经23 mg/L大蒜素处理后, CDC2蛋白相对阳性表达率为87.2%; CyclinB蛋白相对阳性表达率为59.3%. BGC-823细胞CDC2蛋白在35 mg/L大蒜素作用后,相对阳性表达率为84.4%; CyclinB蛋白相对阳性表达率为62.8%. 结果提示大蒜

素作用于胃癌细胞株,下调CDC2和CyclinB蛋白表达水平,从而抑制了MPF活性,阻止细胞进入有丝分裂期,最终发生G₂/M期阻滞. 如果大蒜素协同G₂/M期特异性化疗药物治疗肿瘤,可望更好地抑制和杀死肿瘤细胞.

4 参考文献

- 1 Sengupta A, Ghosh S, Bhattacharjee S. Allium vegetables in cancer prevention :an overview. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5: 237-245
- 2 Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res* 2003; 63: 5940-5949
- 3 Wu CC, Chung JG, Tsai SJ, Yang JH, Sheen LY. Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 1937-1947
- 4 Wong WW, Macdonald S, Langler RF, Penn LZ. Novel synthetic organosulfur compounds induce apoptosis of human leukemic cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 1367-1374
- 5 曾益新主编. 肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 107-112
- 6 Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-1828
- 7 Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 1996; 274: 1643-1645
- 8 Heerdt BG, Houston MA, Mariadason JM, Augenlicht LH. Dissociation of staurosporine-induced apoptosis from G2-M arrest in SW620 human colonic carcinoma cells: initiation of the apoptotic cascade is associated with elevation of the mitochondrial membrane potential($\Delta\psi$). *Cancer Res* 2000; 60: 6704-6713

电编 张勇 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 •

第一届全国临床营养支持学术会议通知

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

1 征文要求

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

2 截稿日期

征文截止日期:2006-03-15.

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

人 CD40 ligand 基因真核表达质粒的构建及对人肝癌细胞 HepG2 的促凋亡作用

徐 智, 沈苏南, 钱晓萍, 禹立霞, 刘宝瑞

徐智, 沈苏南, 钱晓萍, 禹立霞, 刘宝瑞, 南京大学医学院附属鼓楼医院
肿瘤中心 江苏省南京市 210008

徐智, 女, 1980-06-19生, 江苏省南京市人, 汉族, 2003年南京大学医学院
肿瘤学硕士生。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471701

通讯作者: 刘宝瑞, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学医学院附
属鼓楼医院肿瘤中心, baoruiliu@medmail.com.cn

电话: 025-83106666-76382

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Construction and expression of a eukaryotic expression plasmid containing human CD40 ligand in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and its effect on apoptosis

Zhi Xu, Su-Nan Shen, Xiao-Ping Qian, Li-Xia Yu, Bao-Rui Liu

Zhi Xu, Su-Nan Shen, Xiao-Ping Qian, Li-Xia Yu, Bao-Rui Liu,
Cancer Center of Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing
University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.
30471701

Correspondence to: Professor Bao-Rui Liu, Cancer Center of Drum
Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, 321 Zhongshan
Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province,
China. baoruiliu@medmail.com.cn

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

Abstract

AIM: To construct and express a eukaryotic expression plasmid containing human CD40 ligand (CD40L) in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 for the biological function study of CD40L on HepG2 cells.

METHODS: Human CD40L cDNA was synthesized by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with the specific primers from the RNA of human peripheral blood monocyte (PBMC) and directly ligated into the eukaryotic expression vector pcDNATM3.1/myc-His(-)A through digestion with specific restriction endonuclease. The recombined plasmid was transformed into the *E. coli* DH5 α to amplify CD40L gene. Then HepG2 cells were divided into 4 groups. The cells in group A were transfected with the recombined plasmid, and group B with the blank plasmid (not containing CD40L cDNA). The cells

in group C were just normally cultured, and the ones in group D weren't transfected but added G418 as the control for transfection. The expression of CD40L and CD40 were detected by RT-PCR and fluorescent activated cell sorter (FACS) in HepG2 cells, and the apoptosis, cell cycle, as well as Fas expression, were measured by FACS.

RESULTS: The full-length human CD40L cDNA was successfully cloned into the eukaryotic vector pcDNATM3.1/myc-His(-)A. The recombinant plasmid was stably transfected into group A and the rate of CD40L expression was 39.7%. There was no CD40L expression in group B and C. The rates of CD40 expression in group A, B and C were 15.4%, 31.7% and 28.5%, respectively. The apoptotic rate of group A was 45.0 \pm 0.3%, but neither group B or C showed obvious apoptosis ($P < 0.01$). Compared with group C, a larger proportion of cells in group A was restrained at G0/G1 phase (90.4 \pm 1.3% vs 60.6 \pm 1.5%, $P < 0.01$), while the proportions of the cells in S phase (6.32 \pm 1.0% vs 12.0 \pm 0.7%) and G2/M phase (3.3 \pm 0.7% vs 27.3 \pm 1.2%) were reduced (both $P < 0.01$). The expression of Fas in group A showed marked increase as compared with that in group B and C (27.8 \pm 1.5% vs 3.2 \pm 0.8%, 4.2 \pm 1.0%, respectively, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: The eukaryotic expression plasmid pcDNATM3.1/myc-His(-)A can be stably expressed in HepG2 cell line. CD40L-induced apoptosis of HepG2 is correlated with the increased expression of Fas and cell cycle arrest.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; CD40 ligand; Plasmid; Eukaryotic expression vector

Xu Z, Shen SN, Qian XP, Yu LX, Liu BR. Construction and expression of a eukaryotic expression plasmid containing human CD40 ligand in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and its effect on apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2413-2419

摘要

目的: 构建含人CD40 ligand(CD40L)基因的真核表达载体, 并使之在人肝癌细胞HepG2中表达, 研究CD40L稳定表达对HepG2细胞的影响。

方法: 从人外周血单个核细胞总RNA中经RT-PCR扩增出人CD40L基因, 经过酶切连接进入真核表达载体pcDNATM3.1/myc-His(-)A制备重组质粒。重组质粒经酶切及测序证实人CD40L基因成功克隆进入真核表达载体pcDNATM3.1/myc-His(-)A, 并进一步转入大肠杆菌(*E. coli* DH5 α)大量扩增。实验分4组, A组HepG2细胞转染重组质粒, B组HepG2细胞转染不含CD40L cDNA的空质粒, C组HepG2细胞正常培养, D组HepG2细胞加入G418作为转染对照。RT-PCR及流式细胞术鉴定A, B, C 3组细胞表面CD40L和CD40的表达后, A, B, C 3组细胞分别设6个复孔培养72 h后, 流式细胞术检测细胞凋亡、细胞周期分布和Fas表达。

结果: 测序结果显示人CD40L基因真核表达质粒CD40L-pcDNATM3.1/myc-His(-)A构建成功。流式细胞术检测A组HepG2细胞表面CD40L表达为39.7%, CD40表达为15.4%; B和C组细胞表面仅有CD40表达, 分别为31.7%和28.5%。A组细胞凋亡率 $45.0 \pm 0.3\%$, B, C组均未发生明显凋亡($P < 0.01$)。与C组细胞比较, A组细胞周期分布主要阻滞在G1期($90.4 \pm 1.3\%$ vs $60.6 \pm 1.5\%$, $P < 0.01$), S期($6.32 \pm 1.0\%$ vs $12.0 \pm 0.7\%$)和G2/M期分布($3.3 \pm 0.7\%$ vs $27.3 \pm 1.2\%$)均有减少($P < 0.01$)。A组细胞Fas表达率($27.8 \pm 1.5\%$)较B组($3.2 \pm 0.8\%$)和C组($4.2 \pm 1.0\%$)明显上调($P < 0.01$)。

结论: 我们构建的人CD40L基因真核表达质粒CD40L-pcDNATM3.1/myc-His(-)A可以在人肝癌细胞HepG2中稳定表达, CD40L对于HepG2细胞具有促凋亡的作用, 这可能与CD40L-CD40作用后导致HepG2细胞Fas表达上调和细胞周期阻滞有关。

关键词: 肝癌; CD40L; 质粒; 真核表达载体

徐智, 沈苏南, 钱晓萍, 禹立霞, 刘宝瑞. 人CD40 ligand基因真核表达质粒的构建及对入肝癌细胞HepG2的促凋亡作用. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2413-2419

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2413.asp>

0 引言

原发性肝癌(HCC)是最常见的恶性肿瘤, 除手术切除外对放疗和化疗多不敏感。日本临床研究发现CD3mAb激活的淋巴细胞治疗手术后HCC患者与手术后未行免疫治疗的患者相比, 无病生存时间获得显著延长^[1]。提示免疫基因疗法(immunogenetic therapy)在肝癌的治疗中具有潜力。CD40 ligand(CD40L), 属于肿瘤坏死因子(TNF)基因超家族, 主要在活化的T淋巴细胞表面表达。转基因表达CD40L的细胞联合其他细胞因子可刺激B细胞体外大量扩增, 使之成为丰富的抗原递呈细胞(APC), 在B细胞瘤苗制备及特异性免疫治疗领域发挥重要作用^[2-5]。我们在肝癌特异性B

细胞瘤苗的制备中, 构建了含有人CD40L的真核表达载体, 并使其在人肝癌细胞HepG2中稳定表达, 发现CD40L对于HepG2细胞有促进凋亡的作用, 并对这一作用机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌HepG2细胞株、大肠杆菌*E. coli* DH5 α 由本实验室提供; 健康人外周血来源于南京市血液中心; 淋巴细胞分离液(Ficoll, 上海生化试剂二厂); pcDNATM3.1/myc-His(-)A、RPMI 1640培养液、Trizol试剂盒和LipofectamineTM 2000(Invitrogen公司); 小牛血清(FCS, 杭州四季青公司); M-MLV RTase cDNA Synthesis试剂盒、DL 2000 marker、*Bam*H I、*Eco*R I、*Bgl* II和*Hind* III(Takara公司); *Taq*酶和T₄连接酶(Promega公司); 小量胶回收试剂盒(上海华舜生物公司); 鼠抗人FITC-CD40LmAb, 鼠抗人FITC-CD40mAb, 鼠抗人PE-FasAb, Annexin V:PE Apoptosis Detection Kit I和CycleTEST PlusTM试剂盒(BD公司)。引物合成和测序由上海博亚生物公司完成。

1.2 方法 使用淋巴细胞分离液常规分离人外周血单个核细胞(PBMC)。RPMI 1640, 100 mL/L FCS, 4 mg/L植物血凝素培养PBMC 12 h后收集细胞, 用Trizol抽提总RNA, M-MLV RTase cDNA Synthesis试剂盒制备cDNA文库。PCR扩增cDNA文库中CD40L cDNA。引物f:CG GAA TTC GCC ACC ATG ATC GAA ACA TAC AAC C, r:CCG GGA TCC TCA GAG TTT GAG TAA GCC AAAG。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环35次, 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增后的CD40L cDNA和pcDNATM3.1/myc-His(-)A分别经过*Eco*R I和*Bam*H I酶切后使用琼脂糖电泳, 小量胶回收试剂盒回收带有*Bam*H I和*Eco*R I酶切位点的CD40L cDNA和pcDNATM3.1/myc-His(-)A, T₄连接酶连接回收片断获得重组质粒。重组质粒转化大肠杆菌*E. coli* DH5 α , 在50 mg/L氨苄青霉素LB培养板上培养并筛选阳性克隆细菌。挑取10个阳性克隆细菌经SDS碱裂解法抽提重组质粒后分别行*Eco*R I和*Bam*H I, *Bgl* II和*Eco*R I以及*Hind* III酶切鉴定。3种酶切结果均与预计相符的重组质粒通过ABI 3730自动测序仪测序鉴定。使用LipofectamineTM 2000转染HepG2细胞, 实验分4组: A组: 测序正确的重组质粒CD40L-pcDNATM3.1/myc-His(-)A转染HepG2细胞; B组: 不含CD40L的空质粒pcDNATM3.1/myc-His(-)A转染HepG2细胞; C组: HepG2细胞单纯培养; D组: HepG2细胞加入G418。待细胞生长融合达90%后转染, 按4 μ g质粒和10 μ L LipofectamineTM 2000的比例制备脂质体DNA复合物转染细胞, 转染后24 h更换含100 mL/L FCS

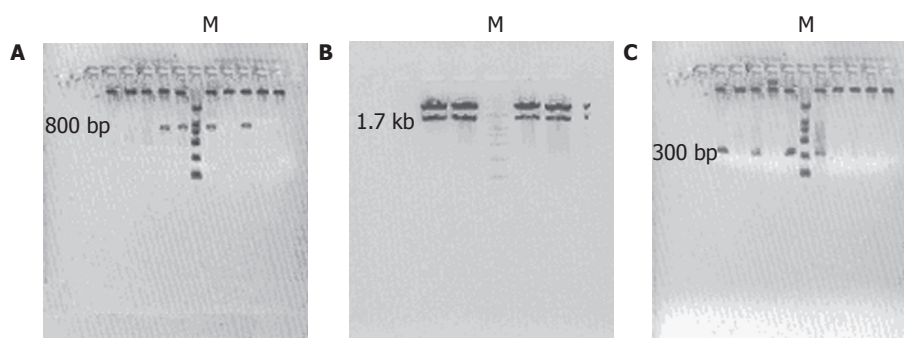


图 1 酶切检测各克隆质粒结果. A: *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切结果; B: *Bgl* II 和 *EcoR* I 酶切结果; C: *Hind* III 酶切结果; M: DL 2 000 marker (下同).

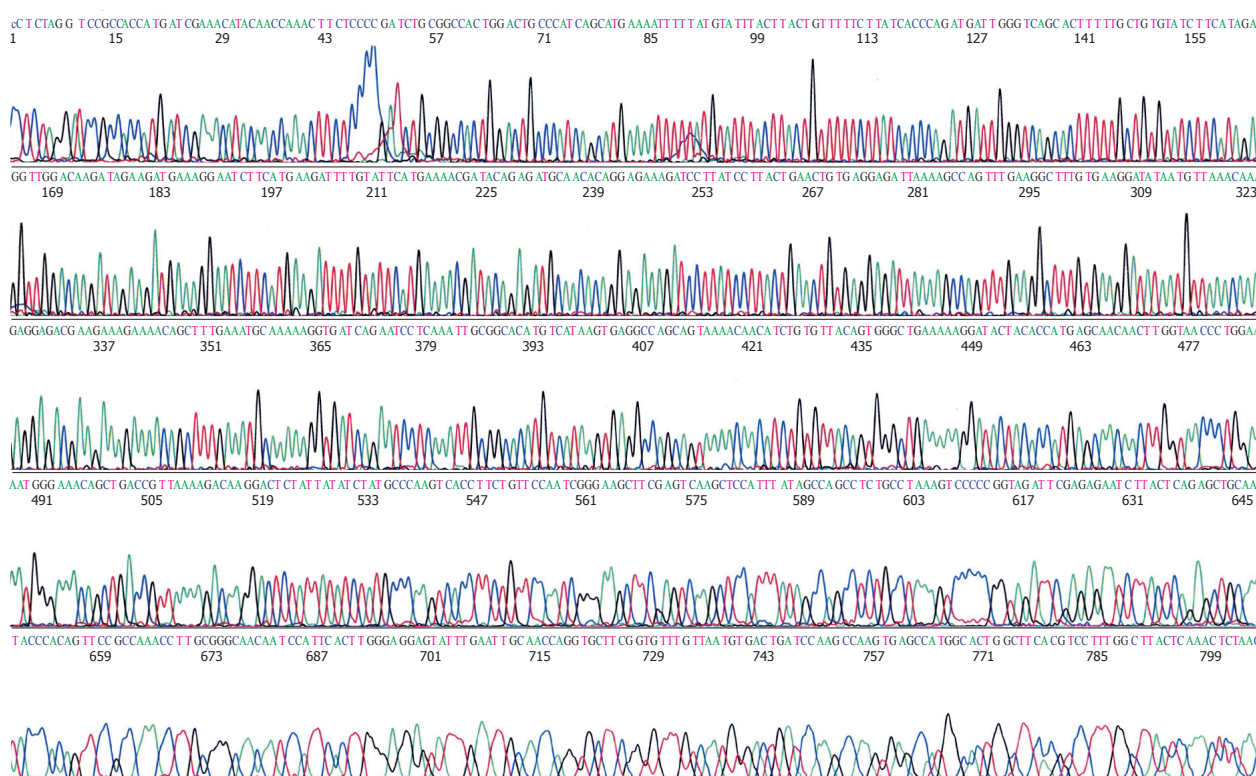


图 2 测序检测重组质粒结果.

的RPMI 1640完全培养液, 48 h后1:10稀释A, B, D组细胞并加入300 mg/L G418加压筛选, C组细胞继续单纯培养. 10 d后, D组细胞完全死亡, A, B组细胞形成具有G418抗性基因的克隆, 继续在96孔板中培养单克隆细胞并扩增. 使用Trizol抽提A, B, C组细胞中总RNA, 经RT-PCR扩增后琼脂糖电泳PCR产物. 引物使用f和r, 反应条件同上. A, B, C组细胞各取 1×10^5 个, 分别混合鼠抗人FITC-CD40LmAb和鼠抗人FITC-CD40mAb各10 μ L, 室温避光孵育30 min, PBS洗涤2遍, 流式细胞仪(FACS)检测CD40L和CD40表达. 3组细胞各以 2×10^5 个/孔接种在6孔板内, 每组设6个复孔, 100 mL/L FCS RPMI 1640培养液在50 mL/L CO₂, 37°C培养箱中培养72 h, 48 h后换液. 培养72 h后的3组细胞各复孔分别使用Annexin V:PE Apoptosis Detection Kit I, CycleTEST Plus™试剂盒和鼠抗人

E-FasmAb经流式细胞仪检测凋亡, 细胞周期分布和Fas表达, 实验按说明书操作.

统计学处理 使用方差分析和t检验.

2 结果

CD40L cDNA接入在pcDNATM3.1/myc-His(-)A多克隆位点*EcoR* I 和*Bam* H I 之间, *EcoR* I 和*Bam* H I 酶切结果显示pcDNATM3.1/myc-His(-)A长约5.5 kb, CD40L cDNA长约800 bp; *Bgl* II和*EcoR* I 为CD40L-pcDNATM3.1/myc-His(-)A内在唯一限制性内切酶位点, *Bgl* II和*EcoR* I 之间约为1.7 kb, 其余约为4.5 kb; *Hind* III为CD40L cDNA和pcDNATM3.1/myc-His(-)A内部各含有的一个限制性内切酶位点, 之间长度约为300 bp, 其余约为6 kb(图1). 测序结果显示CD40L cDNA序列与NIH公布的CD40L cDNA序列

一致, 并且接入方向正确(图2). RT-PCR后电泳结果显示所得PCR产物长度约为800 bp, 与CD40L cDNA长度一致, 而转染空质粒和未转染的HepG2细胞总RNA经RT-PCR后没有CD40L cDNA(图3). A组HepG2

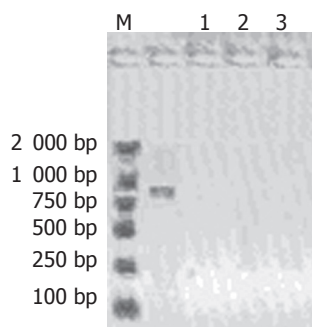


图3 RT-PCR检测3组细胞CD40L mRNA表达结果. 1: 重组质粒CD40L-pcDNATM3.1/myc-His(-)A转染的HepG2细胞; 2: 空质粒pcDNATM3.1/myc-His(-)A转染HepG2细胞; 3: HepG2细胞(下同).

细胞表面有CD40L和CD40稳定表达, 其中CD40L表达为39.7%, CD40表达为15.4%; B, C组细胞表面仅有CD40表达, 分别为31.7%和28.5%(图4). A组细胞凋亡率 $45.0 \pm 0.3\%$, B和C组均未发生明显凋亡($P < 0.01$)(图5和表1). A组细胞周期G0/G1, S和G2/M分别为 $90.4 \pm 1.3\%$, $6.32 \pm 1.0\%$, $3.3 \pm 0.7\%$, C组分别为 $60.6 \pm 1.5\%$, $12.0 \pm 0.7\%$, $27.3 \pm 1.2\%$ (图6). A组与C组相比, 细胞周期主要阻滞在G0/G1期($P < 0.01$), S和G2/M期分布减少($P < 0.01$)(表2). A, B, C组细胞Fas表达率分别为 $27.8 \pm 1.5\%$, $3.2 \pm 0.8\%$ 和 $4.2 \pm 1.0\%$ (图7), A组表

表1 3组细胞凋亡率(% , mean \pm SD)

	A	B	C
凋亡率	45.0 ± 0.3^b	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0

^b $P < 0.01$ vs B, C组.

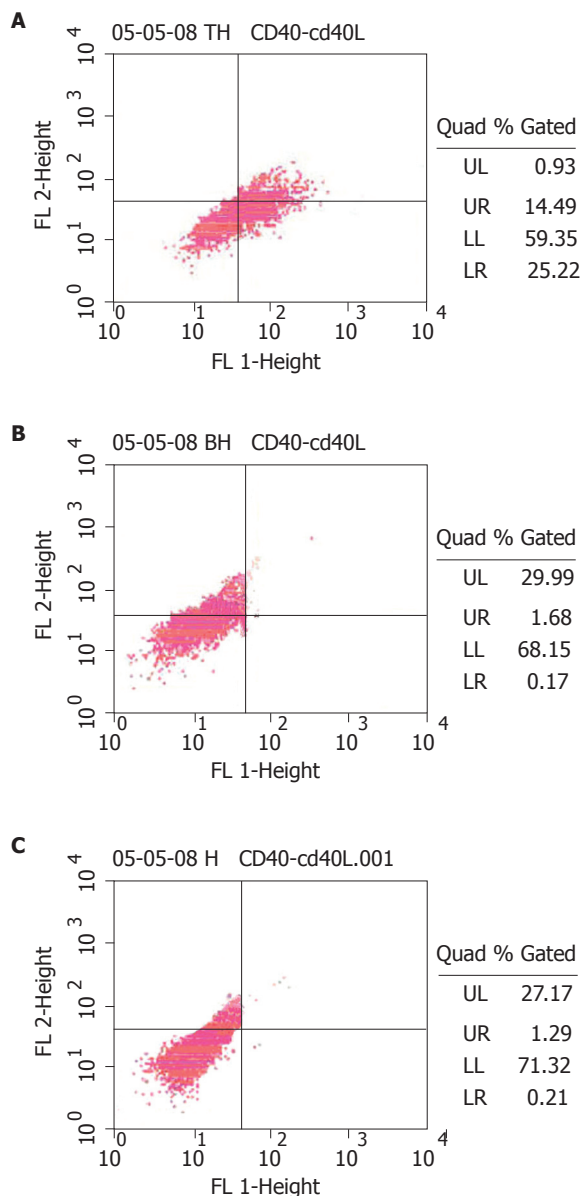


图4 FACS检测3组细胞CD40和CD40L结果.

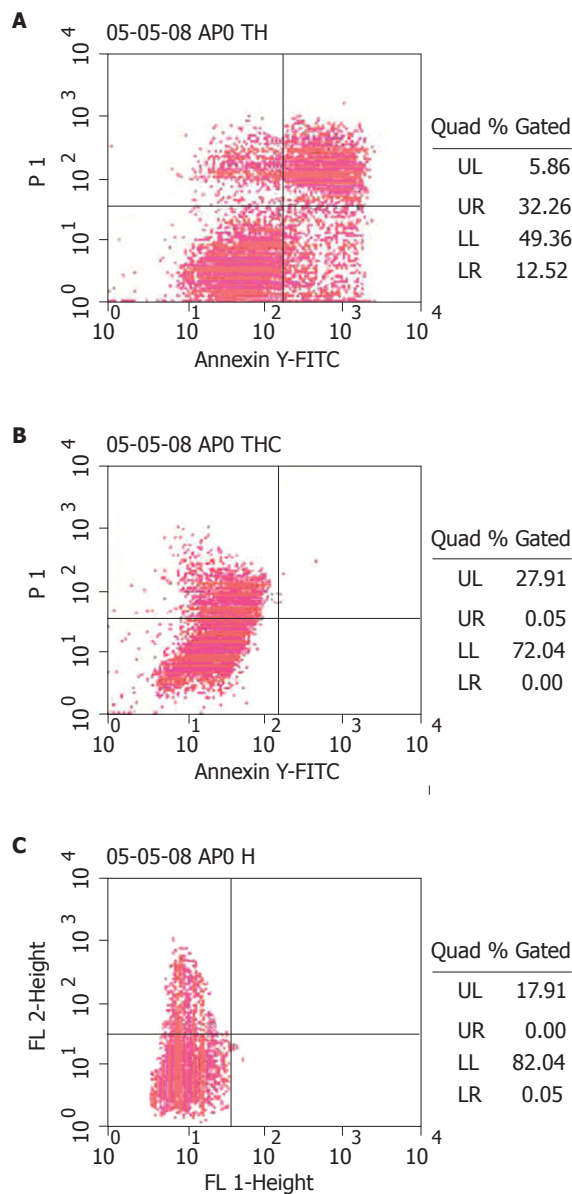


图5 FACS检测3组细胞凋亡结果.

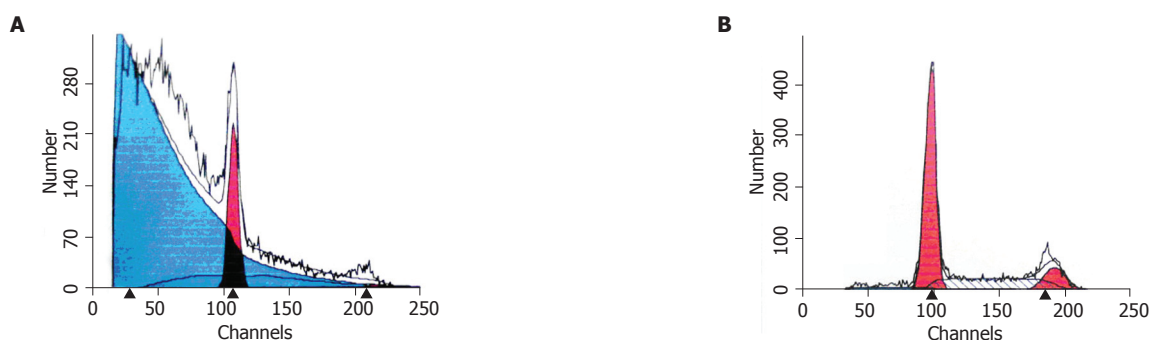


图 6 FACS检测A, C组细胞周期分布. A: A组; B: C组.

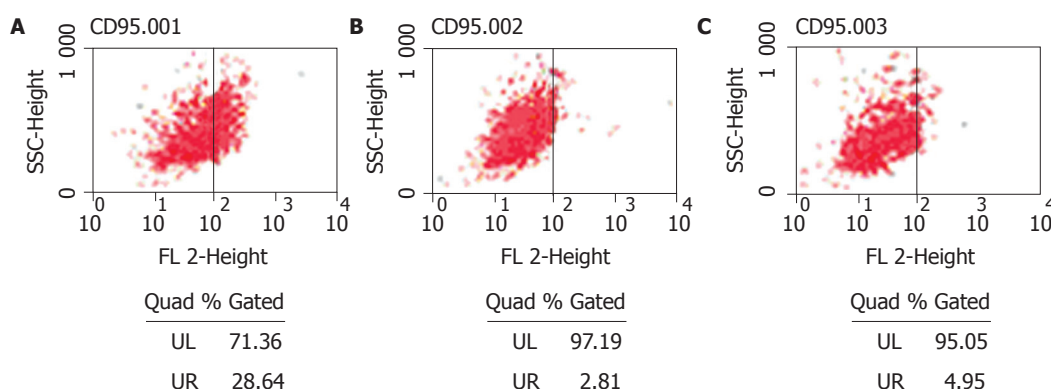


图 7 FACS检测3组细胞Fas结果.

表 2 细胞周期分布 (% , mean \pm SD)

	A	C
G0/G1	90.4 \pm 1.3 ^b	60.6 \pm 1.5
S	6.32 \pm 1.0 ^d	12.0 \pm 0.7
G2/M	3.3 \pm 0.7 ^f	27.3 \pm 1.2

^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$, ^f $P < 0.01$ vs C组.表 3 3组细胞Fas表达率 (% , mean \pm SD)

	A	B	C
Fas表达率	27.8 \pm 1.5 ^b	3.2 \pm 0.8	4.2 \pm 1.0

^b $P < 0.01$ vs B, C组.

达率明显高于B, C组($P < 0.01$)(表3).

3 讨论

CD40L是35 ku的II型膜蛋白,属于肿瘤坏死因子(TNF)家族,可以短暂表达在成熟的CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞亚群、 $\gamma\delta$ T细胞、肥大细胞、IL-2激活的NK细胞等多种细胞表面. CD40L与CD40胞外区结合后, CD40形成多聚体复合物激活NF- κ B(nuclear factor kappa of B cells)或经过TRAF家族分子、JAK3、STAT3等信号途径活化第二信使,进一步调控核内基因转录^[6]. 在正常B细胞中, CD40L-CD40通过NF- κ B上调IL-6、黏附分子(CD54)和抗凋亡蛋白(cIAP1, cIAP2, Bcl-xL, A1等)表达^[7,8],促使B细胞增殖活化. 在T细胞中, CD40L-CD40上调TRAF1表达进

而抑制CD8⁺T细胞凋亡^[9]. 目前CD40L-CD40对肿瘤细胞生长调控机制尚未明确: 对于Hodgkin淋巴瘤, 低分化B细胞恶性肿瘤(如滤泡细胞淋巴瘤)等, CD40L-CD40可以导致肿瘤增殖、耐受化疗; 对于HIV相关淋巴瘤, CD40L-CD40活化的NF- κ B促进病毒复制, 加速肿瘤的生长; 对于非HIV淋巴瘤, CD40L-CD40导致TRAF的活化促使其他TNFR家族成员(如Fas等)表达, 诱导细胞进入凋亡相关级联反应途径, 抑制肿瘤细胞生长^[10-13].

我们发现, 转染重组质粒的HepG2细胞与对照组细胞(转染空质粒和未转染的HepG2细胞)相比CD40的表达发生下调, 推测这一变化可能与CD40L-CD40相互作用有关, 或由于CD40L基因在转录过程中产生了影响CD40转录的信号分子. CD40L在HepG2细胞中表达后对CD40表达影响的具体调控机制尚有待进一步研究. 我们构建的CD40L-pcDNATM3.1/myc-His(-)A可以在人肝癌细胞HepG2中稳定表达, 转染重组质粒的HepG2在表达CD40和CD40L的同时出现凋亡现象, 而对照组细胞在相同培养条件下均未出现凋亡, 说明pcDNATM3.1/myc-His(-)A对于HepG2细胞本身并不具有促凋亡作用, 而是由于CD40L-CD40相互作用而导致凋亡发生. 目前研究显示CD40L可以通过细胞周期阻断和/或诱导凋亡对多种肿瘤细胞(如乳腺癌、非小细胞肺癌、宫颈癌、膀胱癌、胶质细胞瘤等)产生生

长抑制效应,但是对于其相应的正常细胞并没有明显的副作用^[14-21]. 本研究结果表明稳定表达CD40L的HepG2细胞, Fas表达上调, 细胞周期主要阻滞在G0/G1期, S期和G2/M期分布减少, 推断CD40L对HepG2的生长调控机制可能是通过CD40L-CD40作用促使TNFR家族成员Fas表达并阻断细胞生长周期, 诱导凋亡的发生.

目前已有研究证实将稳定表达CD40L的NIH3T3细胞作为刺激源活化DC与既往使用GM-CSF和IL-4培养方法相比, CD40L活化的DC MHC II类分子、CD80和IL-12的表达更高, 可以在体内产生更强的激活CTL能力^[22-27]. 另有研究报道CD40L可以持续扩增B细胞达56 d之久, 使之高表达MHC I, MHC II, CD80, CD86等抗原递呈必需的分子, 并有效提呈肿瘤细胞裂解物、抗原肽、抗原cDNA甚至RNA, 诱发特异性细胞免疫反应^[28-30]. 我们构建的稳定表达CD40L的HepG2细胞是否具有同样活化DC或B细胞的能力, 同时CD40L作为细胞免疫应答中关键的共刺激分子, 能否增强HepG2细胞作为抗原的免疫原性, 这些表达CD40L的HepG2细胞和凋亡细胞可否成为更有利于APC提呈的抗原, 将是我们深入研究的方向. 总之, 人CD40L基因真核表达质粒CD40L-pcDNATM3.1/myc-His(-)A可以在人肝癌细胞HepG2中稳定表达, CD40L的稳定表达引起HepG2细胞CD40表达下调、Fas表达上调和细胞周期阻滞在G1期, 产生促凋亡作用. 以上结果将有助于今后对CD40L在肝癌免疫治疗中的应用进行深入研究.

4 参考文献

- 1 Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Sakamoto M, Hirohashi S, Ohashi Y, Kakizoe T. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 2000; 356: 802-807
- 2 von Bergwelt-Baildon MS, Vonderheide RH, Maecker B, Hirano N, Anderson KS, Butler MO, Xia Z, Zeng WY, Wucherpfennig KW, Nadler LM, Schultze JL. Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood* 2002; 99: 3319-3325
- 3 Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 2003; 63: 2836-2843
- 4 Ivanov R, Aarts T, Hagenbeek A, Hol S, Ebeling S. B-cell expansion in the presence of the novel 293-CD40L-sCD40L cell line allows the generation of large numbers of efficient xenoantigen-free APC. *Cytotherapy* 2005; 7: 62-73
- 5 Coughlin CM, Vance BA, Grupp SA, Vonderheide RH. RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood* 2004; 103: 2046-2054
- 6 Xu Y, Song G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J Biomed Sci* 2004; 11: 426-438
- 7 Herold MJ, Kuss AW, Kraus C, Berberich I. Mitochondria-dependent caspase-9 activation is necessary for antigen receptor-mediated effector caspase activation and apoptosis in WEHI 231 lymphoma cells. *J Immunol* 2002; 168: 3902-3909
- 8 Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-1683
- 9 Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 1998; 273: 34120-34127
- 10 Clodi K, Asgari Z, Younes M, Palmer JL, Cabanillas F, Carbone A, Andreeff M, Younes A. Expression of CD40 ligand (CD154) in B and T lymphocytes of Hodgkin disease: potential therapeutic significance. *Cancer* 2002; 94: 1-5
- 11 Johnson PW, Watt SM, Betts DR, Davies D, Jordan S, Norton AJ, Lister TA. Isolated follicular lymphoma cells are resistant to apoptosis and can be grown in vitro in the CD40/stromal cell system. *Blood* 1993; 82: 1848-1857
- 12 Berberich I, Shu G, Siebelt F, Woodgett JR, Kyriakis JM, Clark EA. Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J* 1996; 15: 92-101
- 13 Schattner EJ, Mascarenhas J, Bishop J, Yoo DH, Chadburn A, Crow MK, Friedman SM. CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood* 1996; 88: 1375-1382
- 14 Alexandroff AB, Jackson AM, Paterson T, Haley JL, Ross JA, Longo DL, Murphy WJ, James K, Taub DD. Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours. *Mol Immunol* 2000; 37: 515-526
- 15 Tong AW, Papayoti MH, Netto G, Armstrong DT, Ordonez G, Lawson JM, Stone MJ. Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 691-703
- 16 Cui W, Li LY. Functional modulating effect of CD40 ligand on CD40-transfected human lung carcinomas. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004; 26: 150-153
- 17 Gao YL, Shi HZ, Liu M, Gu XS. Inhibition of human glioma cell growth by a soluble recombinant human CD40 ligand. *Aizheng* 2002; 21: 1112-1115
- 18 Yamada M, Shiroko T, Kawaguchi Y, Sugiyama Y, Egilmez NK, Chen FA, Bankert RB. CD40-CD40 ligand (CD154) engagement is required but not sufficient for modulating MHC class I, ICAM-1 and Fas expression and proliferation of human non-small cell lung tumors. *Int J Cancer* 2001; 92: 589-599
- 19 Hess S, Engelmann H. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 1996; 183: 159-167
- 20 Eliopoulos AG, Dawson CW, Mosialos G, Floettmann JE, Rowe M, Armitage RJ, Dawson J, Zapata JM, Kerr DJ, Wakelam MJ, Reed JC, Kieff E, Young LS. CD40-induced growth inhibition in epithelial cells is mimicked by Epstein-Barr Virus-encoded LMP1: involvement of TRAF3 as a common mediator. *Oncogene* 1996; 13: 2243-2254
- 21 Bugajska U, Georgopoulos NT, Southgate J, Johnson PW, Graber P, Gordon J, Selby PJ, Trejdosiewicz LK. The effects of malignant transformation on susceptibility of human urothelial cells to CD40-mediated apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1381-1395
- 22 Mazouz N, Ooms A, Moulin V, Van Meirvenne S, Uyttenhove C, Degiovanni G. CD40 triggering increases the efficiency of dendritic cells for antitumoral immunization. *Cancer Immunol* 2002; 2: 2
- 23 Li Q, Grover AC, Donald EJ, Carr A, Yu J, Whitfield J, Nelson M, Takeshita N, Chang AE. Simultaneous targeting of CD3 on T cells and CD40 on B or dendritic cells augments the antitumor reactivity of tumor-primed lymph node cells. *J Immunol* 2005; 175: 1424-1432

- 24 Korokhov N, Nouredini SC, Curiel DT, Santegoets SJ, Scheper RJ, de Gruijl TD. A single-component CD40-targeted adenovirus vector displays highly efficient transduction and activation of dendritic cells in a human skin substrate system. *Mol Pharm* 2005; 2: 218-223
- 25 Cignetti A, Vallario A, Roato I, Circosta P, Allione B, Casorzo L, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Leukemia-derived immature dendritic cells differentiate into functionally competent mature dendritic cells that efficiently stimulate T cell responses. *J Immunol* 2004; 173: 2855-2865
- 26 Schlienger K, Chu CS, Woo EY, Rivers PM, Toll AJ, Hudson B, Maus MV, Riley JL, Choi Y, Coukos G, Kaiser LR, Rubin SC, Levine BL, Carroll RG, June CH. TRANCE- and CD40 ligand-matured dendritic cells reveal MHC class I-restricted T cells specific for autologous tumor in late-stage ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1517-1527
- 27 Loskog A, Totterman TH, Bohle A, Brandau S. *In vitro* activation of cancer patient-derived dendritic cells by tumor cells genetically modified to express CD154. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 846-853
- 28 Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J, Delgado JC, Gribben JG, Nadler LM. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* 1997; 100: 2757-2765
- 29 Van den Bosch GA, Ponsaerts P, Nijs G, Lenjou M, Vanham G, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. Ex vivo induction of viral antigen-specific CD8 T cell responses using mRNA-electroporated CD40-activated B cells. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 458-467
- 30 Rodriguez-Pinto D, Moreno J. B cells can prime naive CD4+ T cells *in vivo* in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1097-1105

电编 张敏 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 •

消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知

本刊讯 《中华胃肠外科杂志》与浙江省人民医院定于2006-04-21/25在杭州共同举办“消化道肿瘤外科治疗专题”高级论坛，主要探讨消化道肿瘤手术治疗的有关问题，包括不同术式的选择及手术的规范化问题、腹腔镜下进行各种手术的选择及相关问题。为活跃学术论坛，促进消化道肿瘤外科治疗的发展，特向广大普外科工作者征稿。

1 会议具体内容

论坛的具体内容包括：(1)肝移植手术适应证及相关问题(黄洁夫主讲)；(2)肝胆系统肿瘤手术的选择(郑树森主讲)；(3)消化系统肿瘤的综合治疗(樊代明主讲)；(4)胰腺肿瘤外科治疗进展(赵玉沛主讲)；(5)胃癌的根治性手术(詹文华主讲)；(6)腹腔镜下的胃癌根治术(余佩武主讲)；(7)胃癌腹膜转移的外科治疗(朱正纲主讲)；(8)低位直肠癌的保肛手术(汪建平主讲)；(9)腹腔镜下的结直肠癌手术(郑民华主讲)；(10)规范的TME手术及相关问题(顾晋主讲)；(11)胃癌外科治疗的新进展(叶再元主讲)。

2 征文要求

内容应与消化道肿瘤(以胃肠道为主)外科治疗有关。采用word文档格式，字数3 500字符左右，摘要500字左右(宋体、小四号)。

3 文章投送形式

分两种：(1)电子邮件投稿：将征文以附件形式提交，注明“消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛”征文，文件名为会议名称加第一作者姓名；电子信箱：zhwcwk@21cn.com。(2)邮寄：打印稿用A4(附软盘)，软盘请注明研讨题目、作者。

4 联系地址及截稿

截稿日期：2006-01-31(以当地邮戳为准)。联系地址：广州市中山二路58号(510080)中山大学附属第一医院《中华胃肠外科杂志》编辑部一室，电话：020-87335945。

二乙基亚硝胺所诱导大鼠肝癌表达上调的基因

阚卫兵, 方肇勤, 管冬元, 赵晓珍, 吴中华, 盛学仕, 高必峰

阚卫兵, 中国上海中医药大学附属普陀医院 上海市 200062
方肇勤, 管冬元, 赵晓珍, 吴中华, 盛学仕, 中国上海中医药大学 上海市 201203
高必峰, 科罗拉多大学医学院 美国科罗拉多州 80220
阚卫兵, 男, 1970-01-16生, 山东省鄄城县人, 汉族, 2005年上海中医药大学博士毕业, 主治医师, 主要从事中医药的分子生物学实验研究。
国家自然科学基金资助项目, No.30271576
通讯作者: 方肇勤, 201203, 上海市浦东区张江蔡伦路1200号, 上海中医药大学中医基础学院实验中医教研室. zqfang@sh163d.sta.net.cn
电话: 021-51322119
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-15

Up-regulated genes in diethylnitrosamine-induced liver cancer in rats

Wei-Bing Kan, Zhao-Qin Fang, Dong-Yuan Guan,
Xiao-Zhen Zhao, Zhong-Hua Wu, Xue-Shi Sheng, Bi-Feng Gao

Wei-Bing Kan, Affiliated Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
Zhao-Qin Fang, Dong-Yuan Guan, Xiao-Zhen Zhao, Zhong-Hua Wu, Xue-Shi Sheng, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
Bi-Feng Gao, Medicinal College of Colorada State University, 80220 Colorada, United States
Correspondence to: Zhao-Qin Fang, Department of Laboratory Medicine, College of Laboratory Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Zhangjiang Cailun Road, Pudong District, Shanghai 201203, China. zqfang@sh163d.sta.net.cn
Received: 2005-05-08 Accepted: 2005-06-15

Abstract

AIM: To investigate the differentially expressed genes in rat liver cancer induced by diethylnitrosamine (DEN), and to explore mechanism in DEN-induced carcinogenesis.

METHODS: The model of liver cancer was induced by DEN. The RNA was extracted purified from the cancer cells with routine methods. Affymetrix Rat 230A GeneChip and technique were used to detect the discrepancies of gene expression between tissues of normal control and liver cancer.

RESULTS: Of 15 710 genes in the GeneChip, the positive expression covered a percentage of 84.54% in liver cancer. There were 509 genes whose expression levels in liver cancer were about 5 times as high as those in the normal controls, of which 325 were EST fragments. Of the 325 genes, 184 ones were with known function, of which 168 had been reported in relevant references.

Of the 168 genes, 100 ones were associated with the tumor (36 with liver cancer), 4 with liver, and the other 64 had no relation with tumor and liver.

CONCLUSION: DEN-induced up-regulations of genes in liver cancer are fairly complicated, of which 168 ones need paying more attention to.

Key Words: Liver cancer; Gene; GeneChip; Rats; Diethylnitrosamine

Kan WB, Fang ZQ, Guan DY, Zhao XZ, Wu ZH, Sheng XS, Gao BF. Up-regulated genes in diethylnitrosamine-induced liver cancer in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2420-2426

摘要

目的: 首次大范围地观察二乙基亚硝胺(DEN)诱导的大鼠肝癌组织基因表达的差异, 探索DEN诱发肝癌的分子机制。

方法: DEN诱导大鼠肝癌, 常规抽提和纯化RNA, 采用Affymetrix Rat 230A GeneChip及技术比较肝癌组织与正常大鼠肝组织基因表达的差异。

结果: 在芯片的15 710个基因中, 肝癌有84.54%的基因阳性表达, 肝癌基因表达在正常肝脏5倍以上的有509个, 其中325个为EST片段, 已知基因184个, 其中的168个基因可以检索到有关文献的报道。在这168个基因中, 有100个基因被发现与肿瘤有关, 其中有36个与肝癌有关; 有4个基因与肝脏有关; 另有64个基因与肿瘤和肝脏无关。

结论: DEN诱发大鼠肝癌的后基因组变化中168个基因值得优先关注。

关键词: 肝癌; 基因; 基因芯片; 大鼠; 二乙基亚硝胺

阚卫兵, 方肇勤, 管冬元, 赵晓珍, 吴中华, 盛学仕, 高必峰. 二乙基亚硝胺所诱导大鼠肝癌表达上调的基因. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2420-2426
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2420.asp>

0 引言

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤, 其发病隐匿、恶性程度高、预后差, 严重威胁到人类的身心健康。因

而探求肝癌的发病机制, 寻求有效的治疗方法, 一直是基础医务工作者努力的方向. 二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌涉及到多基因的改变^[1-8], 为更广泛地揭示DEN诱发大鼠肝癌肝组织基因表达的差异, 上海中医药大学与美国科罗拉多大学医学院联合采用Affymetrix Rat 230A GeneChip芯片对大鼠肝组织进行了基因检测.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ wistar大鼠, 24只, 体质量100-120 g, 随机分为2组, 正常与模型组各12只, 常规饲养, 模型组大鼠自由饮用80 $\mu\text{g/L}$ DEN水溶液, 至20 wk处死动物. 取出肝脏立即进行RNA抽提. 采用GIBCO公司Trizol试剂盒及其方法抽提肝(含肝癌)组织总RNA, 采用RNeasy Mini试剂盒及其操作手册方法纯化RNA. 纯化后, RNA的 A_{260} 和 A_{280} 的比值在1.9-2.1之间. 用Agilent 2100 Bioanalyzer检测总RNA并确认其完整性. 每组动物随机取5份纯化后的RNA, 混匀、合并成一份样本, 定量. 将总RNA转录为双链cDNA, 用基因芯片纯化模块(Affymetrix)净化和复原双链cDNA.

1.2 方法 以双链cDNA为模板, 用RNA转录标记试剂盒在生物素标记核糖核苷酸混合物中进行转录, 转录产生生物素标记的cRNA. 用基因芯片纯化模块(Affymetrix)净化生物素标记cRNA. 将cRNA在94℃断裂缓冲液(在10 mL/L Tween 20中添加100 mol/L MES、1 mol/L Na^+ 、20 mol/L EDTA)中孵育35 min使其变为50-200个碱基的片段. cRNA片段的最终浓度定量为0.05 g/L. 每样本取200 μL 和Affymetrix Rat 230A GeneChip® arrays芯片在GeneChip® Hybridization Oven 640(Affymetrix)杂交箱中, 45℃下杂交孵育16 h. 杂交完成后, 去除杂交液, 冲洗芯片, 用GeneChip® Fluidics Station 450(Affymetrix)对芯片行抗生蛋白链菌素-藻蓝蛋白染色. 用分辨率为2.5-3 μm 的GeneChip Scanner 3000(Affymetrix)扫描读取芯片信息.

统计学处理 详细步骤和灵敏度问题以及定量的方法参考Affymetrix genechip网站的技术手册.

2 结果

DEN诱发大鼠肝癌成功, 造模至20 wk时, 模型组大鼠均出现肝癌. Affymetrix Rat 230A GeneChip检测结果, 肝癌组织有84.54%(每张芯片含有15 710个基因)的基因有表达, 芯片杂交后扫描图见图1, 其中肝癌组织基因表达大于正常基因(大于2倍)计2 796个(图2). 将肝癌组织与正常肝组织所测的读数数值比较, 求出比值, 按比值由高到低排序, 剔除比值小于5

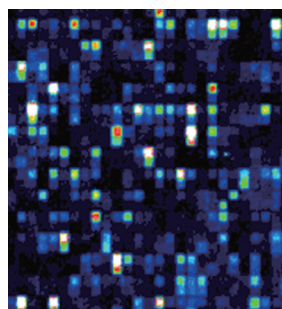


图1 芯片杂交后扫描图.

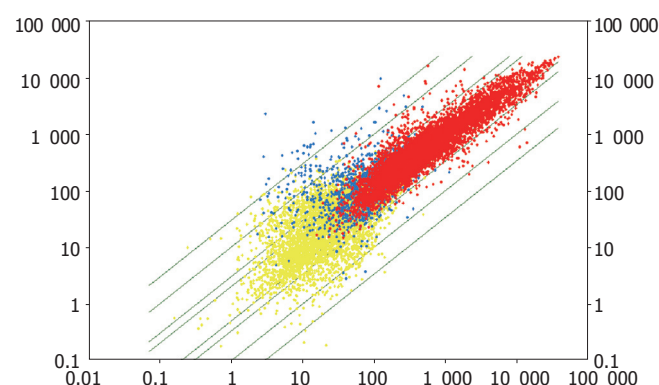


图2 正常大鼠肝脏与肝癌基因表达比较. 图2中纵坐标为肝癌表达基因读数, 横坐标为正常肝脏表达基因读数; 图2中红色表示表达阳性的基因, 蓝色为疑似表达的基因, 黄色为接近阴性表达的基因; 为了在绘图中能够更好的体现杂交后数值的差异性, 图2采用 Log_2 数值作图以描述其差异.

倍的, 以及肝癌组织表达值读数在50以下的基因, 共得到509个基因, 其中325个基因是EST(未知基因)片段, 184个为已知基因. 通过PubMed先后采用基因名称加Liver cancer、基因名称加cancer, 以及基因名称加Liver的检索方法, 对186个基因的20 a内的国外文献检索后, 统计表明: 已知基因中有16个基因在国外文献报道较少或无报道, 168个基因中有100个基因与肿瘤有关(其中有36个基因与肝癌有关), 4个基因与肝脏有关, 64个基因与肿瘤和肝脏无关(在文章中只是涉及到肿瘤和肝癌, 而非专门探讨的也归于此类). 兹将比值最高的前168个基因, 依据正常肝脏表达与否(表达读数小于50者计为不表达)依次归类如下.

2.1 肝癌组织表达大于正常肝脏的基因 这类基因, 在正常肝脏中有一定数量的表达, 大多表达数量很少. (1)肝癌组织表达大于(30倍以上)正常肝脏的基因, 3个基因在肝癌期间出现非常高的表达, 大于正常肝脏表达的30倍以上(表1). (2)肝癌组织表达大于(30倍以下)正常肝脏的基因(表2).

2.2 肝癌独特表达的基因 这类基因, 按照Affymetrix芯片数据处理, 正常肝脏所表达均为阴性, 其芯片读数大多在50以下. 这类基因共有107个. (1)肝癌组织表达

大于正常肝脏30倍以上的基因(表3). (2)肝癌组织表达 大于正常肝脏30倍以下的基因(表4).

表1 肝癌组织表达大于 (30倍以上) 正常肝脏的基因

Genbank编号	基因名称英文 (缩写和中文)	芯片读数 肝癌/肝脏	比值
56335	Glutathione-S-transferase, placental enzyme pi type(GST-pi, 谷胱甘肽-S-转移酶pi)	21 055/555	37
3817620	Aldose reductase-like protein (ARL-1, 醛糖还原酶相似蛋白)	12 703/121	104
1177817	UDP-glucuronosyltransferase (UGT, 尿苷二磷酸-葡萄糖醛酰转移酶)	9 203/114	80

表2 肝癌组织表达大于 (30倍以下) 正常肝脏的基因

Genbank编号	基因名称英文(缩写和中文)	芯片读数 肝癌/肝脏	比值
7106239	aflatoxin B1 aldehyde reductase (AFAR, 黄曲毒素B乙醛还原酶)	18 598/1 813	10
6978470	Alpha-fetoprotein (Afp, 甲胎蛋白)	11 241/518	21
18183584	metallothionein-2 and metallothionein-1(金属硫蛋白2金属硫蛋白1)	11 211/1 603	6
13994165	Cytochrom P450 15-beta gene (Cyp2c12, 细胞色素P450 β 15)	10 270/524	19
6012070	dithiolethione-inducible gene-1 (DIG-1)	9 839/1 672	5
6978636	CD74 antigen	7 646/1 257	6
533123	lipid-binding protein(脂质结合蛋白)	6 922/593	11
14389298	vimentin (Vim, 房肽素)	5 655/481	11
204281	gamma-glutamylcysteine synthetase(γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶)	5 261/881	6
9506444	carbonic anhydrase 2 (Ca2, 碳酸酐酶2)	4 349/187	23
6978504	Annexin V (Anx5)	3 747/358	10
13929189	lectin, galactose binding, soluble 3 (Lgals3)	3 590/456	7
8659576	thioredoxin reductase (硫氧还蛋白还原酶)	3 089/555	5
8393380	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6pd, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)	2 950/295	9
18959233	glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnmb, 糖蛋白nmb)	2 861/201	14
6981203	Matrix Gla protein (Mgp)	2 835/296	9
3104998	Glutathione-S-transferase, alpha type (谷胱甘肽-S-转移酶 α)	2 719/268	10
6981031	Heme oxygenase (Hmox1, 血红素加氧酶)	2 302/393	5
13592078	S-100 related protein, clone 42C (S100A10)	2 538/287	8
4133939	annexin VII	1 917/266	7
6978562	ATPase inhibitor (Atpi, ATP酶抑制因子)	1 852/237	7
3152927	mama	1 681/293	5
6978424	Alpha-2-macroglobulin (A2m, 巨球蛋白 α 2)	1 662/65	25
16758695	gamma-glutamyl transpeptidase γ (谷氨酰胺转肽酶)	1 588/155	10
16905066	Crystallin, alpha polypeptide 2 (Cryab, 晶体蛋白 α 多肽2)	1 535/154	9
18188890	procollagen, type I , alpha 2 (I 型前胶原, α 2)	1 476/133	11
16757993	Pyruvate kinase 3 (Pkm2, 丙酮酸激酶3)	1 397/181	7
13929207	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2 (Scd2)	1 356/55	24
11560084	connective tissue growth factor (Ctgf, 结缔组织生长因子)	1 326/152	8
13928849	3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh, 3磷酸甘油酸脱氢酶)	1 256/85	14
13506724	calcium binding protein (S100A6, 钙结合蛋白)	1 211/183	6
14010868	Aldehyde dehydrogenase class 3 (Aldh3a1, 醛脱氢酶3)	1 083/59	18
9910397	Ly6-C antigen gene (Ly6c)	1 056/190	5
6981229	Avian myelocytomatosis viral (v-myc)	1 004/127	7
1565293	interferon inducible protein 10 (IP-10, 干扰素诱导蛋白10)	956/149	6
13540651	norvegicus gro (Gro1)	954/147	6
19424349	guanylate binding protein 2, interferon-inducible (Gbp2)	941/89	10
11761540	Pituitary tumor transforming gene (Pttg1, 垂体瘤转化基因)	900/112	8
16758363	S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B) (S100a9, 钙粒蛋白B)	873/85	10
3127192	kidney-specific protein (KS, 肾特殊蛋白)	849/163	5
16758851	matrix metalloproteinase 12 (Mmp12, 基质金属蛋白酶12)	847/81	10
16758665	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1, 金属蛋白酶的抑制因子1)	808/99	8
9506466	carbonyl reductase (Cbr, 碳酰还原酶)	783/135	5
9506952	procollagen C-proteinase enhancer protein (Pcolce)	667/114	5
460632	asparagine synthetase (天冬酰胺合成酶)	648/115	5
10120485	glutathione S-transferase Yb4 gene (GstYb4, 谷胱甘肽S-转移酶Yb4)	572/105	5
19745193	thymic stromal-derived lymphopoietin, receptor (Tslpr)	568/80	7
432480	tyrosine kinase receptor (Ptk-3, 酪氨酸激酶受体)	465/59	7
12018329	leucocyte specific transcript 1 (Lst1, 白细胞特殊转录物)	391/68	5

9507122	factor-responsive smooth muscle protein (SM-20)	389/51	7
8393732	Lysyl oxidase (Lox, 赖氨酰氧化酶)	379/70	5
313807	cyclin B (细胞周期蛋白)	376/58	6
19173783	BCL2-related protein A1 (Bcl2a1, BCL2关联蛋白A1)	363/63	5
6978826	Fatty acid binding protein 2 (Fabp2, 脂肪酸结合蛋白2)	354/60	5
9845260	beta-galactoside-binding lectin (Lgals1)	347/64	5
497993	polo like kinase (plk)	316/51	6
6978608	Calcium-binding protein, intestinal, vitamin D-dependent (Calb3, 钙结合蛋白维生素D依赖型)	313/59	5
7230611	small rec (srec)	291/54	5

表 3 肝癌独特表达的基因 (表达大于正常肝脏30倍以上)

Genbank编号	基因名称英文 (缩写和中文)	芯片读数 肝癌/肝脏	比值
13937374	Insulin-like growth factor II (Igf2, 胰岛素样生长因子2)	2 158/14	153
14939371	procollagen type I, alpha 1 (I 型前胶原 α 1)	1 708/39	43
16758127	p75NTR-associated cell death executor (NADE, p75NTR关联细胞死亡执行子)	1 530/25	61
13300509	solute carrier family1 member3 (SLC1A3, 溶质载体家族1成员3)	1 372/15	91
8393822	Neurofilament protein, middle polypeptide (NF-M, 神经丝蛋白中等多肽)	826/10	80
4251655	Phosphofructokinase, liver, B-type (PFKL, 肝型磷酸果糖激酶)	889/14	62
3283976	ABC-type transporter MRP3 (多药耐药相关蛋白MRP3)	784/12	62
6980975	Glypican 3 (Gpc3)	779/11	67
6981339	Purkinje cell protein 4 (Pcp4, 浦肯野细胞蛋白4)	665/8	79
13929097	neurofilament, light polypeptide (NfL, 神经丝轻链多肽)	606/10	60
3366931	beta defensin-1(β 防御素-1)	568/12	47
16758093	Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP, 脂肪型脂肪酸结合蛋白)	561/5	110
18644703	p16Ink4a (细胞周期依赖性激酶抑制基因)	533/2	190
13928713	Small inducible gene JE (Scya2)	479/8	56
12958612	regulator of G-protein signaling 2 (RGS2, G蛋白信号2调节因子)	379/10	35
6978856	Follistatin (Fst, 滤泡素抑制素)	369/10	34
11596856	mink-related peptide 2 (Kcne3)	331/10	30
790632	macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α , 巨噬细胞炎症蛋白1 α)	306/5	54
13303079	t-cell receptor active beta-chain C-region (T细胞受体 β 链恒定C区)	276/6	40
6978806	Epithelial membrane protein 1 (Emp1, 上皮膜蛋白1)	273/8	31
11560134	brain acidic membrane protein (Basp1, 脑产酸膜蛋白)	247/7	31
6981331	plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1, I 型纤溶酶原激活剂抑制因子)	240/7	30
16758073	chemokine orphan receptor 1 (Rdc1, 趋化因子孤儿受体)	156/4	34
16758835	interleukin 1 receptor type II (IL-1R II, II 型白细胞介素1受体)	118/3	35
5263284	glutamate receptor subunit 3 (mGLUR3, 代谢型谷氨酸受体亚单位3)	115/2	39
18959247	Oxidized low density lipoprotein receptor1(LOX-1, 氧化低密度脂蛋白受体1)	103/2	54
6981705	Very low density lipoprotein receptor (Vldlr, 极低密度脂蛋白受体)	92/2	36

表 4 肝癌独特表达的基因 (表达大于正常肝脏30倍以下)

Genbank编号	基因名称英文 (缩写和中文)	芯片读数 肝癌/肝脏	比值
16758619	androgen regulated vas deferens protein (Avdp, 雄激素调节输精管蛋白)	1 006/41	24
10863918	thymosin, beta 10 (Tmsb10, 胸腺素 β 10)	885/37	23
17105345	phospholipid scramblase 1 (Plscr1)	554/40	13
9506474	Cell division cycle control protein 2 (Cdc2a)	544/40	13
8496160	insulin-like growth factor binding protein 5 (胰岛素样生长因子结合蛋白5)	437/44	9
8393182	Carboxypeptidase A1 (pancreatic), (Cpa1, 羧肽酶A1)	336/21	15
6978540	Activating transcription factor 3 (Atf3, 活化转录因子3)	312/12	24
19424307	lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (galectin 2) (Lgals2)	307/17	17
11024651	transforming growth factor, beta-1 (Tgfb1, 转化生长因子 β 1)	305/16	18
13928927	kidney-derived aspartic protease-like protein (Kdap)	305/44	6
11067378	G alpha interacting protein (Gaip)	299/16	18
19923702	Cell surface glycoprotein CD44 (Cd44)	296/12	23
11559930	Homeobox gene Pem (Pem, 同源基因Pem)	251/24	10
13929055	Lutheran blood group (Lu, 吕德兰血型基因)	246/33	7
8504695	Discoidin domain receptor	241/36	6
8394182	regulator of G-protein signaling 4 (Rgs4, G 蛋白信号4调节因子)	240/12	18

16758941	MHC class II transactivator (C2ta, MHC II 类反式作用子)	239/31	7
13592080	secretin receptor (Sctr, 糜蛋白酶受体)	218/12	17
9506846	probasin (LOC54 193)	208/30	6
205247	Ly6-B antigen	199/7	25
202845	aldehyde dehydrogenase (醛脱氢酶)	199/29	6
13928813	phospholipase A2, group II A (Pla2g2a, 磷脂酶A2, II A组)	193/10	18
14949700	nucleolar phosphoprotein p130 (核仁磷蛋白p130)	195/7	26
9665228	espin	184/35	5
18959245	adaptor-related protein complex 3, mu 2 subunit (Ap3m2)	165/20	7
6981305	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (Tnfrsf11b, 肿瘤坏死因子11b)	165/29	5
8505375	Insulin-like growth factor-binding protein 5 (胰岛素样生长因子结合蛋白5)	162/23	7
4090268	GAS-7 protein	161/28	5
13592086	acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (Soat1)	155/18	8
5672675	salt-inducible protein kinase (盐诱导蛋白激酶)	155/23	6
4063710	melanocyte-specific gene 1 protein (msg1, 黑素细胞特殊基因1蛋白)	155/27	5
1785998	neogenin	153/28	5
4559279	defensin-5 precursor (防御素5前体细胞)	152/23	6
13928735	Adenosine monophosphate deaminase 3 (Ampd3, 磷酸腺苷脱氨酶3)	150/10	14
20302072	cadherin 13 (Cdh13, 钙黏蛋白13)	147/27	5
4131769	Very low density lipoprotein receptor (极低密度脂蛋白受体)	144/17	8
1654376	calcium-dependent tyrosine kinase (钙依赖型酪氨酸激酶)	138/20	6
8393483	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1 (Gri1)	133/18	7
204322	glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP, 糖依赖性胰岛素释放肽)	130/24	5
16758167	fibroblast growth factor 13 (Fgf13, 成纤维细胞生长因子13)	123/11	10
9506448	carbonic anhydrase 4 (Ca4, 碳酸酐酶4)	123/20	6
13928725	CD8 antigen, alpha-chain (Cd8a)	122/5	24
16647985	synaptojanin 2B2	121/4	26
13183122	prostaglandin transporter subtype 2 (Pgt2)	120/17	6
13928873	forkhead box M1 (Foxm1)	119/15	7
16758103	peptidoglycan recognition protein (Pglyrp)	116/10	11
16758681	nuclear pore complex protein (Nup107, 核孔复合体蛋白)	116/13	8
7709997	CD3 antigen delta polypeptide (Cd3d)	112/11	10
17737277	transmembrane domain protein regulated in adipocytes 40 kDa (Tpra40-pending)	112/18	6
1816432	Naglucoase cotransporter	109/13	8
13888554	Myelin basic protein (髓磷脂碱蛋白)	108/20	5
13929019	secretory carrier membrane protein 5 (Scamp5)	105/17	5
13929053	Shank1	104/16	6
6978700	Carboxypeptidase E (Cpe, 羧肽酶E)	103/4	22
16075338	G-protein coupled receptorG (蛋白结合受体)	103/8	12
8917586	integrin beta 2 alpha subunit (整合素β2α亚单位)	101/9	10
6978652	Cholinergic receptor, muscarinic 3 (Chrm3, 胆碱能受体毒蕈碱3)	98/12	7
8393983	phospholipase C, gamma 2 (Plcg2, 磷脂酶Cγ2)	96/14	6
19526760	caveolin 1 alpha	92/11	8
9957243	3-O-sulfotransferase	89/10	8
9967140	CINC-2 alpha	89/12	6
12711687	intermediate conductance calcium-activated potassium channel (Kcnn4)	88/8	10
6978506	Adrenomedullin (Adm)	86/8	9
16758815	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2 (Edg2)	84/3	25
13540657	bone marrow stromal cell antigen 1 (Bst1)	83/5	14
440381	receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP receptor)	83/11	7
8394099	Parathyroid hormone (Pth, 甲状旁腺激素)	83/13	6
1228945	protein tyrosine phosphatase epsilon C	83/14	5
8393708	lactate dehydrogenase 3, C chain, spermspecific (乳酸脱氢酶3 C链)	80/8	9
14581684	Mg1	79/14	5
13676840	Alpha1,2-fucosyltransferase a (Fut1, 墨角藻糖基转移酶α2)	78/5	14
4324681	late gestation lung protein 1 (Lgl1)	73/12	6
6981645	Transforming growth factor, alpha (Tgfa)	73/13	5
14974738	cell cycle protein p55CDC	71/8	7
1669582	eosinophil cationic protein	68/9	7
13540542	neuronal pentraxin receptor (Npr)	65/11	5
206470	pancreatic secretory trypsin I (胰蛋白酶 I)	62/4	15

6978544	ATPase, Na ⁺ K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide (Atp1a2)	62/8	7
207535	thyrotropin-beta-subunit (促甲状腺素 β 亚单位)	60/6	9
13929101	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 (Apba2)	50/9	5

3 讨论

在以上的众多基因中, 以胰岛素样生长因子2(IGF-2)、p75NTR关联细胞死亡执行子(NADE)、细胞周期依赖性激酶抑制基因(p16Ink4a)三个基因与肿瘤的关系尤为突出, 现将这三个基因的最新研究以及与肿瘤的关系进行简单的阐述.

3.1 IGF-2 人类的IGF-2是肝细胞自分泌和/或旁分泌的生长因子之一. Lee *et al*^[9]用黄曲毒素B1(AFB1)诱导的p53基因突变体p53mt249肝细胞癌, 发现肝癌形成中p53mt249通过IGF-2启动子4显著增加了IGF-2的转录表达, 使胎儿型IGF-2积累. IGF-2启动子4可以被野生型的p53和p53mt249所识别, 野生型p53抑制转录因子Sp1和TBP在启动子4上的结合; 而p53mt249在野生型p53不在的情况下, 可以刺激转录因子Sp1的磷酸化, 从而增加转录因子结合在启动子4上. p53mt249转染被HBV-X蛋白和TNF- α 诱导凋亡的肝细胞, 可以通过增加IGF-2的产量而阻滞该细胞凋亡. 这个结果解释了诱变剂AFB1诱导的p53mt249突变体诱发肝细胞癌的分子机制. Fan *et al*^[10]发现在正常的成年肝组织中IGF-2和IGF-2R是很少表达的, 而其mRNA在慢性肝炎, 肝细胞癌, 肝硬化中分别约有33.3%, 66.7%, 72%的病人是高表达的. IGF-2和IGF-2R在肝细胞癌 I - III级(Edmondson 分级)的阳性率分别为0.25%, 76.2%, 100%. 另一研究发现^[11], 乙型肝炎X病毒蛋白(HBx)在诱导肝细胞瘤形成过程中, 通过被蛋白激酶C或分裂活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化的Sp1刺激IGF-2表达. PTEN在肝细胞瘤细胞株中的表达, 使Sp1被去磷酸化, 诱导Sp1与DNA结合的降低, 阻滞HBx激活IGF-2的转录. PTEN阻断了PKC、MAPK和MAPK激酶对Sp1磷酸化作用, 在肝细胞瘤形成过程中下调了IGF-2的表达. Scharf *et al*^[12]也观察到IGF-2和IGF-2受体在肝细胞癌和肝细胞瘤细胞株中高表达. 此外, IGF-2在胃癌的发病机制中也起到重要作用, 而血浆IGF-2水平的升高与肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌的严重程度呈正相关^[13,14].

3.2 NADE NADE最初是从人类卵巢卵泡细胞cDNA文库克隆出来的, 作为不明蛋白命名为pHGR74, 调节神经生长因子诱导的凋亡. Mukai *et al*^[15]通过酵母双杂交系统筛选了p75NTR联合蛋白, 并命名为p75NTR关联细胞死亡执行子(NADE). 鼠的NADE与人类的HGR74蛋白具有显著同源性, NADE特定结合在p75NTR的细胞死亡结构域, 在293T细胞中两者共同表现诱导

激活caspase-2、caspase-3和细胞核DNA断裂. 在缺失p75NTR时, NADE不能诱导凋亡. 在PC12、nnr5细胞株和少突胶质细胞得到同样的结果. 在被神经生长因子诱导的包含p75NTR介导的凋亡中, NADE是第一个信号衔接分子, 它在神经遗传学的发病机制中扮演一个重要角色. Mukai *et al*^[16]报道NADE是p75NTR联合蛋白, 通过和p75NTR死亡结构域的结合响应NGF介导凋亡. NADE有4个亚型: NADE2、NADE3、NADE4/Bex1和NADE5/Bex2. NADE在NGF诱导的少突胶质细胞凋亡和锌离子诱导的神经元死亡中起到重要作用. Tong *et al*^[17]从乳腺癌细胞株中分离出人类的NADE(pHGR74). 研究还发现NADE在人类的内分泌器官和鼠的胚胎组织是高表达的. NADE在中国仓鼠卵巢细胞株和人类MDA-MB-231乳腺癌细胞株中表达, 对细胞有抑制生长的作用.

3.3 p16Ink4a 该基因是细胞周期依赖性激酶抑制基因, 其表达的蛋白可直接与CDK4和CDK6结合而阻止其与cyclinD结合, 也可与cyclin-CDK复合物结合抑制其活性, 从而抑制pRb蛋白磷酸化和转录调节因子E2F的释放, 借此参与细胞周期调节, 促成细胞周期停滞. Pang *et al*^[18]对68例肝细胞癌进行了研究, 证实p16Ink4a甲基化率为61.7%. 认为该基因的甲基化在肝硬化向肝癌的转变中起到重要作用. Jarmalaite *et al*^[19]研究了64例与吸烟有关的肺癌, 发现肿瘤组织中p16Ink4a的甲基化约34%. 认为p16Ink4a基因启动子的CpG-岛的甲基化, 是导致抑癌基因失活的重要原因. Lee^[20]对8个正常的骨髓、3个反应性粒细胞增多的病人和21个恶性血液病的病人p16Ink4a mRNA的表达进行了研究, 发现p16Ink4a在正常的骨髓仅有少量的表达, 而在血液恶性肿瘤病人中表达异常增高($P<0.05$), 认为该基因高表达可能与血液学恶性肿瘤的发病机制有关.

在正常和肝癌两张芯片的看家基因中, 包括同一基因的上、中、下游的片段, 芯片读数具有一致性, 高表达的均高, 低表达的均低. 说明该芯片的技术以及本次检测的技术和结果均是可靠的, 假阳性率是非常低的, 同时也说明整个实验的各环节, 包括RNA的抽提、cDNA的转录等方法均是成功的. 在DEN诱发大鼠肝癌所表达大于正常肝脏5倍的509个基因中, 325个基因是EST未知基因片段, 占63%! 而且这些EST片段中的大部分无论是从芯片的绝对读数, 还是从相对比值上, 都比国内外研究肝癌所涉及

的已知基因变化更为明显. 这揭示了肝癌基础研究的广阔未知领域. 变化最为明显的168个已知基因中有68个(占40%)是国内外研究肿瘤中所未涉及的, 在肿瘤有关基因中所涉及到肝癌数目更少. 这进一步表明, 肿瘤(尤其是肝癌)的基础研究尚有广阔的未知领域, 而借助大通量的基因芯片技术检测, 得以充分展现出那些变化显著的基因, 这对于今后有重点和有选择性的研究是十分必要和有幫助的. 基因芯片的结果分析方法有很多, 基因读数比值排序分析法未必是最好的, 但是是行之有效的方法. 通过对这种方法整理出的基因结果分析, 我们发现比值越大、排序越靠前的基因, 其于肿瘤和肝癌的关系越明显, 并且一些基因是人类在肿瘤的发生中认识比较早和研究比较多的基因, 例如比值最高的前两个基因p16Ink4a, IGF2. 因此, 我们对以上168个基因中比值最高、肝癌中上调最显著的前30个基因进行文献检索, 总结分类. 我们的研究还表明, 在这些上调的基因中, 清热、健脾、活血和3者组方等不同的中医处方、西药喃氟啉具有选择性的调节作用(另文报道), 而有些基因则不受调控. 提示其中一些基因可能是这些治疗方法的靶基因, 而那些不能被调节者, 一旦今后研究证实是肝癌发生发展的关键基因, 可以用于中西药新药筛选的参考基因.

4 参考文献

- 1 方肇勤, 管冬元, 李海燕, 胡效丰. 不同中医治法对大鼠肝癌作用的比较. 上海中医药大学学报 1999; 13: 57-59
- 2 Fang ZQ, Guan DY, Liang SH. Study on correlative genes in rat with hepatocarcinoma induced by DEN with DD-PCR. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 116
- 3 Guan DY, Fang ZQ. Advances in TCM Treatment of Primary Hepatocarcinoma. *J Trad Chin Med* 2000; 20: 223-226
- 4 管冬元, 方肇勤, 梁尚华, 秦红友, 鲁恒心. 不同治法对大鼠肝癌相关基因转录作用的研究. 上海中医药大学学报 2001; 15: 41-45
- 5 方肇勤, 管冬元, 梁尚华, 秦红友, 李海燕. 不同中医治法对DEN诱发大鼠肝癌作用的比较研究. 中医杂志 2002; 43: 542-544
- 6 管冬元, 鲁恒心, 方肇勤. 不同中医治法对ras/MAPK信号通路相关基因转录调节的实验研究. 中国中医基础医学杂志 2002; 8: 36-38
- 7 方肇勤, 管冬元, 梁尚华. 清热活血健脾中药对大鼠肝癌基因转录差异的调整. 世界华人消化杂志 2003; 11: 276-280
- 8 Guan DY, Fang ZQ, Lu HX, Li HY. Preliminary investigation on regulating effects of different TCM treatments on transcription of the correlated genes of liver cancer in rats. *J Trad Chin Med* 2003; 23: 62-66
- 9 Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM, Lee YI. Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 3717-3726
- 10 Fan ZR, Yang DH, Cui J, Qin HR, Huang CC. Expression of insulin like growth factor II and its receptor in hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 285-288
- 11 Kang-Park S, Lee YI, Lee YI. PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling; the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells. *FEBS Lett* 2003; 545: 203-208
- 12 Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol* 2001; 54: 138-144
- 13 Pavelic K, Kolak T, Kapitanovic S, Radosevic S, Spaventi S, Kruslin B, Pavelic J. Gastric cancer: the role of insulin-like growth factor 2 (IGF 2) and its receptors (IGF 1R and M6-P/IGF 2R). *J Pathol* 2003; 201: 430-438
- 14 LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003; 195: 127-137
- 15 Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, Sato TA. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 2000; 275: 17566-17567
- 16 Mukai J, Suvanto P, Sato TA. Nerve growth factor-dependent regulation of NADE-induced apoptosis. *Vitam Horm* 2003; 66: 385-402
- 17 Tong X, Xie D, Roth W, Reed J, Koeffler HP. NADE (p75NTR-associated cell death executor) suppresses cellular growth *in vivo*. *Int J Oncol* 2003; 22: 1357-1362
- 18 Pang A, Ng IO, Fan ST, Kwong YL. Clinicopathologic significance of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 146: 8-15
- 19 Jarmalaite S, Kannio A, Anttila S, Lazutka JR, Husgafvel-Pursiainen K. Aberrant p16 promoter methylation in smokers and former smokers with nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 106: 913-918
- 20 Lee YK, Park JY, Kang HJ, Cho HC. Overexpression of p16INK4A and p14ARF in hematological malignancies. *Clin Lab Haematol* 2003; 25: 233-237

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

用 PCA 方法选择 HBV DNA 多聚酶 TP 区 VH 抗体

于俊岩, 兰林, 王宇明

于俊岩, 兰林, 王宇明, 第三军医大学西南医院感染病研究所 重庆市 400038

于俊岩, 男, 1969-07-17生, 山西屯留县人, 汉族, 1992年长治医学院毕业, 2001年山西医科大学传染病学硕士研究生毕业, 2003年至今在第三军医大学攻读传染病学博士学位, 讲师, 主要从事慢性乙型肝炎发病机理研究。国家自然科学基金资助项目, No.30100159

通讯作者: 兰林, 400038, 重庆第三军医大学西南医院感染病研究所。Llin6624@hotmail.com

电话: 023-68752193

收稿日期: 2005-04-21 接受日期: 2005-06-01

Isolation of the variable fragments of heavy chain against the terminal protein region of hepatitis B virus polymerase with protein fragment complementation assay

Jun-Yan Yu, Lin Lan, Yu-Ming Wang

Jun-Yan Yu, Lin Lan, Yu-Ming Wang, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30100159

Correspondence to: Dr. Lin Lan, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. Llin6624@hotmail.com

Received: 2005-04-21 Accepted: 2005-06-01

Abstract

AIM: To isolate the variable fragments of heavy chain (VH) against the terminal protein (TP) region of hepatitis B virus (HBV) polymerase (Pol) with protein fragment complementation assay (PCA).

METHODS: The plasmid pPNL6, which contained scFv antibody library, was extracted from Yeast Display scFv Antibody Library to amplify the VH antibody fragment. The HBV DNA secreted by HepG2.2.15 cells was used as the template to amplify HBV DNA TP. Then the VH antibodies were selected with PCA using the TP region as the antigen.

RESULTS: After amplification, TP region with a length of 540 bp were obtained. Three TP antigen-specific VH antibodies were amplified by PCA, and then they were translated into amino acids according to the DNA sequences and Werner Müller databank.

CONCLUSION: TP region antigen-specific VH antibodies

can be directly selected from HBV DNA Pol with PCA.

Key Words: HBV; Terminal protein; Variable fragments of heavy chain; Protein fragment complementation assay

Yu JY, Lan L, Wang YM. Isolation of the variable fragments of heavy chain against the terminal protein region of hepatitis B virus polymerase with protein fragment complementation assay. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(20):2427-2430

摘要

目的: 用PCA方法选择HBV DNA多聚酶TP区VH抗体。

方法: 从Yeast Display scFv Antibody Library中提取包含scFv抗体库的质粒pPNL6, 扩增VH抗体片段。以HepG2.2.15细胞分泌的HBV DNA为模板, PCR扩增HBV DNA末端蛋白(TP)。以TP区作为抗原, 用PCA方法进行VH抗体选择。

结果: PCR扩增的TP区共540 bp。对HBV DNA多聚酶TP区进行抗体选择, 用PCA方法从抗体库中选出3个对应抗体, 根据DNA序列和Werner Müller数据库可标明3个抗体。

结论: 对HBV DNA多聚酶TP区进行抗体选择, 用PCA方法可以从抗体库中较为简便的选择出对应抗体。

关键词: 乙型肝炎病毒; 末端蛋白; VH抗体; PCA方法

于俊岩, 兰林, 王宇明. 用PCA方法选择HBV DNA多聚酶TP区VH抗体. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2427-2430

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2427.asp>

0 引言

PCA方法的原理^[1]是大肠杆菌中的二氢叶酸还原酶(DHFR)可以特异地被甲氧苄氨嘧啶(TMP)所抑制, 从而阻止嘌呤、胸苷酸、蛋氨酸、泛酸盐的生物合成, 导致细菌裂解。而鼠的二氢叶酸还原酶(mDHFR)对低浓度的TMP并不敏感, 如果细菌中存在mDHFR就可以恢复以上物质的生物合成, 细菌得以存活。在PCA方法中, mDHFR基因被分割成两部分: mDHFR(1)和mDHFR(2), 分别与抗原和抗体基因相连。当编码mDHFR的两个载体被共转化进细菌

时, 如果特异性抗原、抗体相互识别, 那么分别与他们相连的mDHFR(1)和mDHFR(2)就会接触而恢复完整的mDHFR酶活性, 细菌得以存活. 抗原或抗体与mDHFR之间的Linker[(Gly₄Ser)_n]可长可短, 不同的抗原/抗体需要不同的长度, 但是较长的Linker可能产生较高的结合率.

1 材料和方法

1.1 材料 Yeast Display scFv Antibody Library(抗体库)(<http://www.biomolecular.org/resources/index.html>)由Michael Feldhaus赠送, 抗体载体pBluescript/SK(+)-mDHFR(1)及抗原载体pBluescript/SK(+)-mDHFR(2)由Stephen W. Michnick(加拿大蒙特利尔大学Stephen Michnick实验室: http://michnick.bcm.umontreal.ca/index_en.php)赠送, 限制性内切酶均购自新英格兰公司, BD In-FusionTM PCR Cloning Kit购自BD Biosciences Clontech, BL21(DE3)pLysS购自Promega, HepG2.2.15细胞由第三军医大学西南医院感染病研究所引进并保存. 引物及测序由上海生物工程公司完成. HepG2.2.15细胞在含10 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中(含青霉素100 kU/L, 链霉素100 kU/L), 37℃, 50 mL/L CO₂的孵箱中用24孔培养板培养. 收集细胞培养液, 加入PEG8000至终浓度为100 g/L, 冰浴放置4 h, 12 000 g离心30 min, 将沉淀溶解于原培养液体积10 g/L的TNE缓冲液中(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 100 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA). 加入SDS至终浓度为10 g/L, 蛋白酶K至终浓度为1 g/L, 50℃孵育2 h. 经酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀, 将DNA溶解于TE缓冲液中(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA). 作为PCR扩增HBV DNA末端蛋白的模板.

1.2 方法

1.2.1 建立抗体库 从Yeast Display scFv Antibody Library中提取包含scFv抗体库的质粒pPNL6, 扩增VH抗体片段, 正义引物: 5'-ACCGCGGTGGCGGCCGCATGGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC-3', 反义引物: 5'-GCCACCAGAGCGGCCGCCACCGGATCCTAGATTCC-3'. PCR反应体系: MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, pfu酶6 U, 引物1 μmol/L, 总体积50 μL. PCR反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 58℃ 45 s, 75℃ 45 s, 循环35次, 75℃ 10 min. PCR反应产物做琼脂糖凝胶纯化.

1.2.2 建立TP区抗原载体 以HepG2.2.15细胞分泌的HBV DNA为模板, PCR扩增HBV DNA末端蛋白(terminal protein, TP), 正义引物: 5'-ACCGCGGTGGCGGCCGCGACCACCAAATGCCCTATC-3', 反义引物: 5'-AC

CACCGCCACCAGAACCCTTGTTCCTCAAGAATATG GTGAC-3', PCR反应体系: MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, pfu酶6 U, 引物1 μmol/L, 总体积50 μL. PCR反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 45 s, 55℃ 1 min, 75℃ 1 min, 循环35次, 75℃ 10 min. PCR扩增Linker I, 模板即为引物, 正义引物: 5'-GGTTCTGTGGCGGTGGTTCTGGTGGTGGCGGTTCTGGTGCGGCGGCTCC-3', 反义引物: 5'-CTACTTTACTTCGGAAGAACCACCACCGCCAGAACCACCGCCAC CAGAGCCACCACCACCGGAGCCGCCGCCACC-3', PCR反应体系: MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, pfu酶6 U, 引物1 μmol/L, 总体积50 μL. PCR反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 45 s, 65℃ 1 min, 75℃ 1.5 min, 循环35次, 75℃ 10 min. 以TP区、Linker I 为模板, 用TP区正义引物和Linker I 反义引物以PCR扩增TP-Linker I. PCR反应体系: MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, pfu酶6 U, 引物1 μmol/L, 总体积50 μL. PCR反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 45 s, 55℃ 1 min, 75℃ 1 min, 循环35次, 75℃ 10 min. PCR反应产物做琼脂糖凝胶纯化. 用BD In-FusionTM PCR Cloning Kit做连接反应(具体按试剂盒手册进行操作), 把TP-Linker I 插入抗原载体pBluescript/SK(+)-mDHFR(2), 即pBluescript/SK(+)-TP-Linker I -mDHFR(2).

1.2.3 建立抗体载体 PCR扩增Linker II, 模板即为引物, 正义引物: 5'-ACCGCGGTGGCGGCCGCTCTGGTGGCGGCGGCTCC-3', 反义引物: 5'-GTCGAACCATTCCGGAAGAACCACCACCGCCAGAACCACCGCCA CCAGAGCCACCACCACCGGAGCCGCCGCCACC-3', PCR反应体系: MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, pfu酶6 U, 引物1 μmol/L, 总体积50 μL. PCR反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 45 s, 65℃ 1 min, 75℃ 1.5 min, 循环35次, 75℃ 10 min. 用BD In-FusionTM PCR Cloning Kit做连接反应, 把Linker II 插入抗体载体pBluescript/SK(+)-mDHFR(1), 即pBluescript/SK(+)-Linker II -mDHFR(1). 再用BD In-FusionTM PCR Cloning Kit做连接反应, 把抗体VH插入载体pBluescript/SK(+)-Linker II -mDHFR(1), 即pBluescript/SK(+)-VH-Linker II -mDHFR(1).

1.2.4 选择抗体 用化学法把抗原载体pBluescript/SK(+)-TP-Linker I -mDHFR(2)转化入大肠杆菌菌株BL21(DE3)pLysS, 即BL21(DE3)pBluescript/SK(+)-TP-Linker I -mDHFR(2), 用电击转化法把抗体载体pBluescript/SK(+)-VH-Linker II -mDHFR(1)转化入感受态细胞BL21(DE3)pBluescript/SK(+)-TP-Linker I -mDHFR(2). 转化条件: Cuvette Gap: 0.1 cm; Voltage:

1.5 kV; Field Strength: 15 kV/cm; Capacitor: 25 uf; Resistor: 200 Ω ; Time Constant: 4.0 ms. 共转化20次以完成抗体库的转化。用PCA方法进行阳性克隆选择: M9选择培养基的制备, 标准M9培养基中含100 mg/L Ampicillin, 1 mmol/L IPTG, 10 mg/L TMP. 把电击转化的细胞转入SOC培养基孵育30 min后, PBS洗涤2次, 以彻底清除SOC培养基。铺板于M9选择培养基上进行30℃ 24-72 h培养, 存活细菌即为

阳性克隆。对存活细菌进行PCR扩增VH片段, 并对PCR产物进行测序。

2 结果

HepG2.2.15细胞培养见图1。以HepG2.2.15细胞分泌的HBV DNA为模板, PCR扩增TP区, 共540 bp(图2)。测序结果见图3。用TP区正义引物和Linker I 反义引物以PCR扩增TP-Linker I, 其中Linker I 长96 bp. PCR

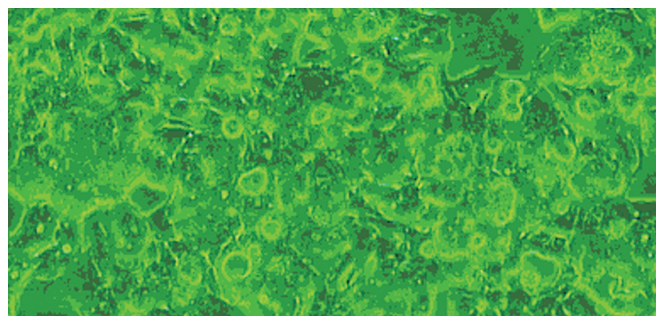


图1 HepG2.2.15细胞 ($\times 200$).

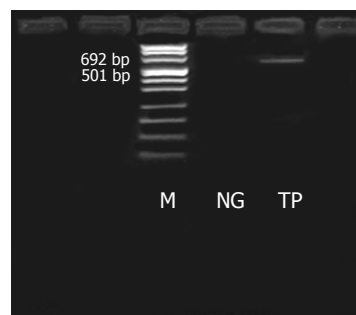


图2 TP区PCR扩增产物.

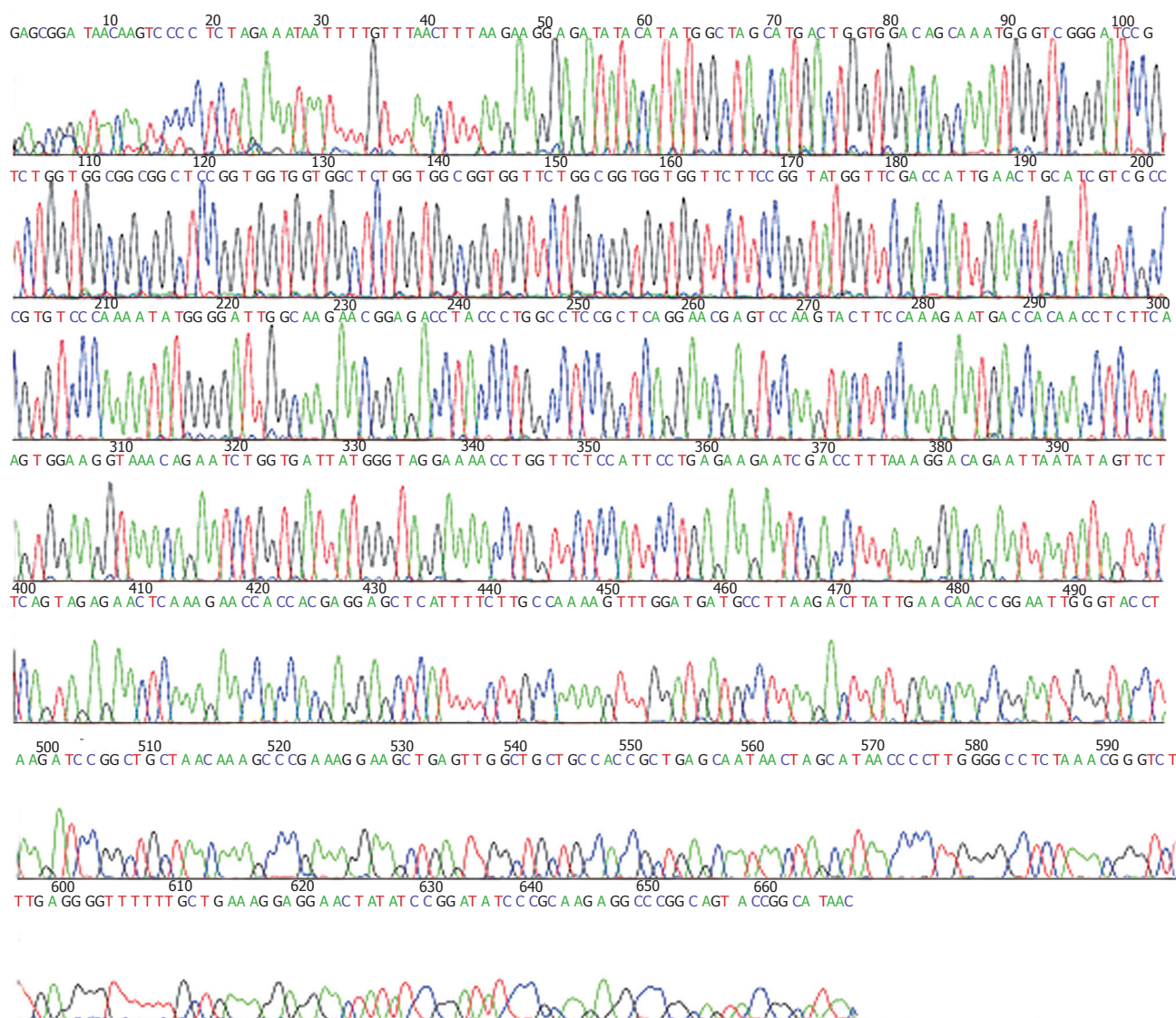


图3 HBV DNA TP区测序图 (从92位开始到631位结束).

Translation of VH1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	GGSSISGSYF	WSWIRQPAGKGLEWIGR	-IYTSGST
Translation of VH2	EVQL-ESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSS--YI	MNWWVRQAPGKLEWVSS	.ISSSSSYI
Translation of VH3	QVQLVESEA EVKPKGSSVKVCKAS	GDTFNT--YA	ISWVRHAPGGGLEWMGG	IIPIVATT
	CDR1 VH		CDR2 VH	
	TYNPSLKSRITISLDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYC		ASS - - - GGSSW -Y-	-----DAF
	YYADSVKGRFTISKDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC		ARDYRN	FYYYYYGM
	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC		ARGRRWGGAYGDYW	-----SSL
	CDR3 VH			
	DIWGQGTMTVSS			
	DVWGQGTITVTVSS			
	DSWGQGTITVTVSS			

图4 TP区特异性VH抗体氨基酸序列。

扩增与抗体相连的Linker II, 长63 bp. 在抗体库中共选择出3个TP区相关抗体, 根据DNA序列和Werner Müller数据库(<http://www.dnapiplot.de/input/human-v.html>)标明了3个抗体(图4)。

3 讨论

HBV共有4个开放阅读框架(open reading frame, ORF), 编码至少7个病毒蛋白, 其中HBV DNA多聚酶(DNA polymerase, Pol)在病毒复制周期中起着核心作用. 它分为4个功能区, 从氨基端起依次是: 末端蛋白区(1-178 aa)、空隔区(179-336 aa)、逆转录区(337-680 aa)和RNase H区(681-832 aa). HBV多聚酶是一个多功能酶^[3], 在病毒的复制周期中发挥着关键作用. 末端蛋白(TP)作为HBV多聚酶的组成部分, 具有多种功能, 主要是由前基因组RNA反转录负链DNA时作为引物; HBV多聚酶虽然在细胞质中合成, 其全部或其裂解形成的TP区可移行至细胞核内, 以完成反转录中的功能. Pol上共有4个抗原表位, 分别位于TP区8-20 aa和20-30 aa、空隔区的225-250 aa和RNase H区的800-832 aa. Putlitz *et al*^[2](1999)报道: 抗TP区的单抗对病毒的前基因组RNA逆转录的作用最强. 因此, Pol的TP区是一个很好的抗原表位, 中和其功能, 将会干扰病毒的复制。

细胞内抗体通常指的是scFv(single chain variable fragments, scFv), 但scFv几乎不能在细胞内发挥作用. 因为scFv在细胞内质网成熟, 而细胞内的还原环境使scFv不能形成二硫键, 这对抗体的正确折叠至关重要, 从而影响scFv的可溶性与稳定性. 而VH抗体不存在这样的缺陷^[3], VH抗体不需要链内二硫键也同样具有活性. VH抗体可在原核细胞或真核细胞内表

达, 已证明它们有很强的中和抗原的作用^[4], 如在抗肿瘤蛋白RAS的三种抗体中: scFv、VH和VL(轻链可变区抗体), VH的活性是scFv的五倍, 而VL实验证明无活性. 还有一点, 在选择特异性抗体中, VH抗体库的多样性要比scFv抗体库的多样性小的多。

从抗体库中选择有效抗体目前有很多方法, 如噬菌体展示技术, 核糖体展示技术, 酵母双杂交技术等^[5]. 这些方法各有利弊, 但从我们的实验中可以看出PCA方法在抗体选择中显示出很多优点. 比如作为与抗体结合的抗原不需要表达与纯化, 只需要抗原的基因, 这大大减少了实验难度; 由于抗原抗体的结合是在细胞内自然环境下发生, 所以选择出的抗体特异性最强; 整个实验工作量不大、费时少, 少有假阳性, 在任何实验室都可以开展。

用PCA方法选择出的抗体与抗原的亲合性有待进一步鉴定. 选择出的抗体对HBV DNA复制的抑制作用, 我们将在后续论文中发表。

4 参考文献

- 1 Pelletier JN, Arndt KM, Pluckthun A, Michnick SW. An *in vivo* library-versus-library selection of optimized protein-protein interactions. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 683-690
- 2 zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999; 73: 4188-4196
- 3 Holt LJ, Herring C, Jespers LS, Woolven BP, Tomlinson IM. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol* 2003; 21: 484-490
- 4 Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 1988; 242: 423-426
- 5 Mossner E, Koch H, Pluckthun A. Fast selection of antibodies without antigen purification: adaptation of the protein fragment complementation assay to select antigen-antibody pairs. *J Mol Biol* 2001; 308: 115-122

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

Pol II -ChIP-PE-MS 方法的建立及其在 SNP 功能研究中的应用

晏泽辉, 邓国宏, 王宇明

晏泽辉, 邓国宏, 王宇明, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所
重庆市 400038

晏泽辉, 男, 1978-12-16生, 湖北省罗田县人, 汉族, 2003年第三军医大学西南医院硕士生, 医师。

国家自然科学基金资助, No.30470964

通讯作者: 王宇明, 400038, 重庆市, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所。wym417@mail.tmmu.com.cn

电话: 023-68754141

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Construction of RNA polymerase II-Chromatin immunoprecipitation-primer extension-mass spectrum and its application in function research of single nucleotide polymorphism

Ze-Hui Yan, Guo-Hong Deng, Yu-Ming Wang

Ze-Hui Yan, Guo-Hong Deng, Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases of Chinese PLA, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30470964

Correspondence to: Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases of Chinese PLA, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. wym417@mail.tmmu.com.cn

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

Abstract

AIM: To construct a new method named PolII-ChIP-PE-MS (RNA polymerase II-Chromatin immunoprecipitation-primer extension-mass spectrum), and to validate the reliability of this method in the study of single nucleotide polymorphism (SNP) allele-specific quantification of RNA polymerase loading.

METHODS: The C/T SNP of SNRPN at nt 1654312 (numbered according to NT_026446) was genotyped in a genomic DNA sample and a cDNA sample of HepG2 cell line by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). After the ChIP assay was performed for phosphorylated Pol II using antibodies highly specific for certain phosphorylated serine residues of the CTD, the extension of short primer was carried out and then the samples were analyzed using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF).

RESULTS: Comparison of genomic DNA and cDNA of HepG2 cells conformed that, in cell lines heterozygous with respect to this SNP, only one of the two alleles present in the genomic DNA produced an mRNA transcript. When chromatin from heterozygous cell lines was analyzed for the SNP at nt1654312 in SNRPN, the pro-immunoprecipitated starting material and the genomic DNA contained similar amounts of each allele, whereas the material (chromatin to which phosphorylated Pol II was bound) contained predominantly one allele, corresponding to the single allele that produced an mRNA transcript.

CONCLUSION: Pol II-ChIP-PE-MS is successfully constructed and it is an applicable and reliable method to detect the SNP allele-specific quantification of RNA polymerase loading. It can be used in detecting the function of disease-related gene SNP.

Key Words: Single nucleotide polymorphism; RNA polymerase II; Chromatin immunoprecipitation; Primer extension; Mass spectrum

Yan ZH, Deng GH, Wang YM. Construction of RNA polymerase II-Chromatin immunoprecipitation-primer extension-mass spectrum and its application in function research of single nucleotide polymorphism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2431-2436

摘要

目的: 建立RNA多聚酶II-染色质免疫沉淀-引物延伸-飞行时间质谱技术(Pol II -ChIP-PE-MS), 并利用该方法检测SNP等位特异磷酸化Pol II 结合量, 为活体状态下研究疾病关联基因SNP的功能研究提供一种高通量的研究手段。

方法: 采用PCR-RFLP方法对HepG2细胞印迹基因SNRPN(仅父源等位基因表达)基因组DNA和cDNA进行基因分型, 利用Pol II CTD末端Ser5特异性抗体进行染色质免疫沉淀, 针对SNP位点两侧序列设计PCR引物和延伸引物, 以外侧引物进行PCR扩增, 采用延伸引物进行VLET引物延伸, 产物纯化后经MALDI-TOF质谱鉴定。

结果: 对SNRPN杂合子细胞的SNRPN C1654312T SNP

进行Pol II-ChIP-PE-MS分析发现, 基因组DNA样本和染色质免疫沉淀前样本在C、T等位点都包含相同Pol II结合量, 但免疫沉淀后标本(被磷酸化RNA多聚酶 II结合的染色质)就仅在T等位点有结合, 与产生mRNA转录的等位点相对应。

结论: 成功建立起Pol II-ChIP-PE-MS方法, 利用该方法检测SNP等位特异磷酸化Pol II结合量是可靠的, 可以利用Pol II-ChIP-PE-MS策略鉴定疾病关联基因SNP的功能。

关键词: 单核苷酸多态性; RNA多聚酶 II; 染色质免疫沉淀; 引物延伸; 质谱

晏泽辉, 邓国宏, 王宇明. Pol II-ChIP-PE-MS方法的建立及其在SNP功能研究中的应用. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2431-2436
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2431.asp>

0 引言

目前对于常见疾病的遗传易感基因单核苷酸多态性(SNP)的功能研究特别是非编码区(启动子或内含子区域)SNP功能研究相对薄弱^[1]. 传统的SNP功能研究手段通常是通过报告基因试验研究不同等位对该序列启动子活性的影响, 或通过电泳移动漂移实验(EMSA)分析不同等位的寡核苷酸探针结合转录因子能力的差异^[2]. 但这两类方法均为体外功能研究方法, 缺乏染色质的天然结构及转录的三维调控过程, 且只能对单个SNP位点逐个进行分离的研究, 存在着明显的局限性, 说服力有限. 我们前期研究所确定的肝病关联SNP位点位于基因转录区^[3], 迫切需要发展一种快速、高通量、多位点协同的SNP功能研究方法. 我们利用染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)和飞行时间质谱测定等策略建立RNA多聚酶 II-ChIP-引物延伸-飞行时间质谱技术(RNA polymerase II-chromatin immunoprecipitation-primer extension-mass spectrum, Pol II-ChIP-PE-MS), 以活体状态下检测影响基因调控的SNP的敏感方法, 并利用该方法验证检测SNP等位特异磷酸化RNA多聚酶 II结合量的可靠性, 为活体状态下研究疾病关联基因SNP的功能研究提供一种高通量研究手段。

1 材料和方法

1.1 材料 日本TOMY公司UR-200P超声波破碎仪, Dynal MPC®-S磁力架. 羊抗鼠IgG包被的Dynabeads®M-280免疫磁珠购自Dynal公司; RNA多聚酶 II H14 mAb购自Covance公司; Anti-T Antigen pAb101购自Santa公司; 甲醛、甘氨酸、LiCl、脱氧胆酸钠(DOC)、NP-40、十二烷基硫酸钠(SDS)、鲑鱼精

DNA、焦磷酸钠购自Sigma公司; Tris、HEPES、完全蛋白酶抑制剂、糖原、牛血清白蛋白(BSA)、Triton X-100、蛋白酶K、RNA酶A、TriPure、RT-PCR试剂盒等购自Roche公司; RPMI 1640、优级胎牛血清购自Hyclone公司; Taq聚合酶、Hotstar DNA聚合酶、ddNTP、SAP购自MBI公司; 内切酶*Bst*U I、*Pst* I 购自BioLab公司; 其他试剂为国内产品, 购自北京鼎国生物技术公司. 细胞裂解缓冲液: 50 mmol/L HEPES(pH7.5), 140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mL/L甘油, 5 g/L NP-40, 2.5 g/L Triton X-100, 1×完全蛋白酶抑制剂, 5 g/L胃酶抑素, 10 mmol/L焦磷酸钠. 核裂解缓冲液: 10 mmol/L Tris(pH8), 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L EGTA, 1×完全蛋白酶抑制剂, 5 g/L胃酶抑素, 10 mmol/L焦磷酸钠. 超声降解缓冲液: 10 mmol/L Tris(pH8), 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L EGTA, 100 mL/L甘油, 1×完全蛋白酶抑制剂, 5 g/L胃酶抑素, 10 mmol/L焦磷酸钠. ChIP洗涤液1(1×RIPA缓冲液): 50 mmol/L HEPES(pH7.5), 0.5 mol/L LiCl, 1 mmol/L EDTA, 10 g/L NP-40, 7 g/L DOC, 1×完全蛋白酶抑制剂, 5 g/L胃酶抑素, 10 mmol/L焦磷酸钠. ChIP洗涤液2: 含100 mg/L的鲑鱼精子DNA的1×RIPA缓冲液. ChIP洗涤液3: 含300 mmol/L NaCl和终浓度为100 mg/L鲑鱼精子DNA的1×RIPA缓冲液. ChIP洗涤液4: 含250 mmol/L LiCl的1×RIPA缓冲液. PCR引物由北京奥科生物公司合成, 实验中所用引物见表1.

表1 引物序列

引物目的	引物名称	引物序列 (5'→3')
SNRPN 基因鉴定	正向引物	CTACTCTTTGAAGCTTCTGCC
	反向引物	TGAAGATTCGGCCATCTTGC
	第一轮扩增正向引物	ACGTTGGATGTGCCAGCTTGCATTGTTTC
SNRPN PE分析	第一轮扩增反向引物	ACGTTGGATGGATGCTTCTGAAGACCTAGG
	SNRPN延伸引物	TGCATTGTTTCTAGGAGAACC

1.2 方法 在含有100 mL/L的胎牛血清RPMI 1640培养基中37℃, 50 mL/L CO₂条件下按常规方法培养HepG2细胞数天, 维持胞生长量为10⁷-10⁸个. 按照说明书的方法利用TriPure试剂提取HepG2细胞DNA和总mRNA. 按照RT-PCR试剂盒操作程序进行逆转录以及PCR扩增. 我们按照Sakatani *et al*^[4]所述的方法利用*Bst*U I 和*Pst* I 对SNRPN的nt 1654312位点SNP进行PCR-RFLP分型.

1.2.1 染色质免疫沉淀 对HepG2细胞参照参考文献[5]进行的ChIP测定. 终浓度为10 g/L的甲醛固定处于对数生长期的HepG2细胞, 然后用理想配比过剩的甘

氨酸(终浓度为0.125 mol/L)终止固定. 刮脱、收集、洗涤细胞后加入适量体积的细胞裂解缓冲液充分溶解, 冰上孵育10 min后, 5 000 *g*, 4℃离心10 min; 去上清; 然后用细胞核裂解缓冲液重悬沉淀, 冰上孵育10 min后, 5 000 *g*, 4℃再次离心10 min后去上清. 用超声降解缓冲液再次重悬沉淀, 用超声破碎仪断裂染色质20次, 把染色质片段化到500-1 000 bp左右(冰上操作, 超声探头在标本中的浸没深度至少1 cm; 功率200 W; 脉冲时间20 s; 每次脉冲后将标本在冰水中放置1 min, 每次超声降解过程中避免气泡出现). 将超声降解后得到的样本4℃高速(16 000 *g*)离心10 min后转移上清到新的试管中, 然后依照实验要求把标本分装成3份(另取10 μL上清用蛋白酶K消化1 h用电泳检测超声片段化效果). 用100 μL含5 g/L BSA冷的PBS预处理包被有羊抗鼠IgG的免疫磁珠12 h, 以减少非特异性吸附. 然后4℃在一个旋转平台上将2 μg RNA多聚酶 II H14 mAb和Anti-T Antigen pAb101对照抗体分别与预处理的免疫磁珠轻微摇动孵育过夜. 用DynaMPC磁架收集磁珠, 用含有5 g/L BSA冷的PBS洗涤磁珠3次, 然后分别加入分装好的两份超声降解的标本, 充分混合, 4℃在一个旋转平台上轻微摇动孵育1 h, 最后用DynaMPC磁架收集磁珠(去上清)即得磁珠-染色质免疫沉淀复合物. 分别用ChIP洗涤液1, 2, 3, 4洗涤磁珠-染色质免疫沉淀复合物各2次, 然后用TE溶液洗涤1次. 每次洗涤分别用不同洗涤液充分混合轻摇5 min. 然后用100 μL TE重悬磁珠, 加入1 μg RNA酶A和1 μg蛋白酶K, 在55℃条件下孵育3 h, 然后在65℃条件下孵育12 h以逆转交联; 最后用酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)抽提2次, 以糖原为载体, 用冰无水乙醇沉淀DNA, 自然凉干后, 用100 μL的TE溶解管底的DNA沉淀(有可能肉眼看不到), 然后标本编号, -20℃保存备用. 然后进行SNRPN基因的PCR扩增, 并利用*Bst*U I和*Pst* I对染色质免疫沉淀标本的SNRPN nt1654312位点进行PCR-RFLP分型.

1.2.2 引物延伸和质谱测定 我们采用Sun *et al*^[6]建立的VSET(very short extension)方法来进行引物延伸. 首先利用2 μL染色质免疫沉淀标本为模板进行第一轮PCR扩增, 扩增条件是: 96℃预变性1 min, 然后94℃45 s, 56℃45 s, 72℃30 s, 循环扩增6次; 94℃45 s, 65℃45 s, 72℃30 s, 循环扩增30次; 最后72℃延伸10 min. 然后向PCR产物中加入2 μL SAP, 37℃孵育20 min以去掉反应体系中未结合的残留dNTP, 随后85℃孵育10 min以灭活SAP. 然后以5 μL该PCR产物为模板, 在含有100 μmol/L延伸引物、1 U Hotstar DNA聚合酶和2.5 mmol/L dTTP、ddATP、ddGTP、ddCTP的25 μL反应体系中进行VSET引物延伸, 延

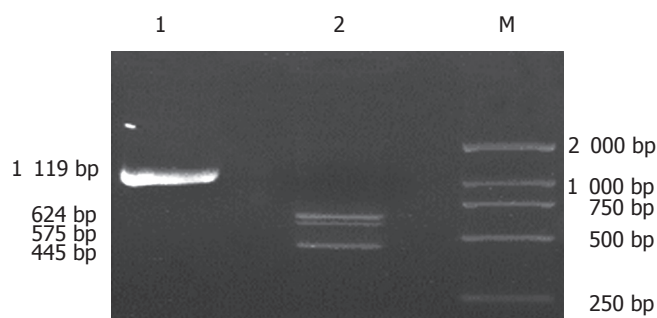


图1 C1654312T杂合子细胞HepG2细胞SNRPN基因扩增及其限制性酶切电泳分析. 1: SNRPN基因PCR产物; 2: *Bst*U I和*Pst* I双酶切SNRPN基因PCR产物; M: DNA分子质量标准, DL 2000.

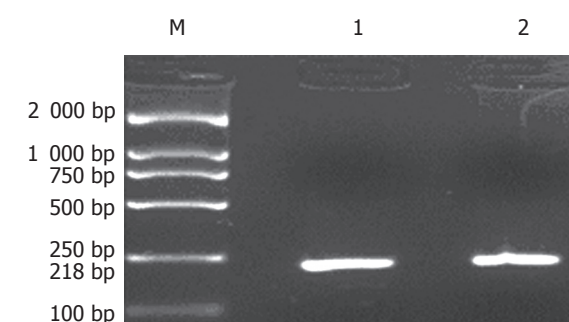


图2 SNRPN C1654312T杂合子细胞HepG2细胞cDNA扩增及其限制性酶切电泳分析. M: DNA分子质量标准, DL 2000; 1: SNRPN cDNA扩增产物; 2: *Bst*U I限制性酶切SNRPN cDNA扩增产物.

伸反应条件是: 94℃预变性5 min, 然后94℃5 s, 52℃5 s, 72℃5 s, 循环延伸40次. 利用醋酸铵-酒精沉淀法纯化延伸产物后溶解在10 μL ddH₂O中送上海基康生物技术有限公司进行MALDI-TOF测定.

2 结果

2.1 HepG2细胞SNRPN nt1654312位点SNP分型 HepG2细胞基因组DNA PCR扩增及*Bst*U I和*Pst* I双酶切后20 g/L琼脂糖电泳分析结果(图1)证明HepG2细胞株SNRPN基因nt1654312位点SNP为C/T杂合子基因型. HepG2细胞cDNA扩增及*Bst*U I酶切后30 g/L琼脂糖电泳分析结果(图2)证明HepG2细胞株SNRPN基因nt1654312保持印迹状态, 仅出现一种等位即T等位表达.

2.2 HepG2细胞ChIP产物*Bst*U I和*Pst* I双酶切分析 SNRPN C1654312T杂合子细胞ChIP产物利用*Bst*U I和*Pst* I双酶切后20 g/L琼脂糖电泳分析结果表明免疫沉淀前样本与基因组DNA一样, 依然包含C/T杂合的双等位状态, 但免疫沉淀后标本中就只有T等位的DNA片段被沉淀出来(图3).

2.3 引物延伸-飞行时间质谱分析 SNRPN C1654312T杂合子HepG2细胞经Pol II-ChIP-PE-MS分析结果表明: 染色质免疫沉淀前样本在C、T等位点包含相同Pol II结合量(图4); 免疫沉淀后标本(被磷酸化RNA多聚酶 II 结合的染色质)就仅在T等位点有结合(图5), 与

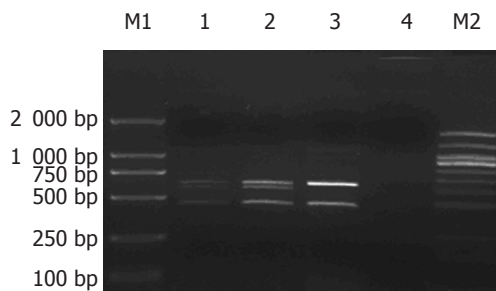


图 3 HepG2细胞ChIP产物 Bst Ⅰ和 Pst Ⅰ双酶切电泳分析结果. M1: DNA分子质量标准, DL 2000; 1: HepG2细胞SNRPN基因PCR产物; 2: 免疫沉淀前标本PCR产物; 3: 免疫沉淀后标本PCR产物; 4: 免疫沉淀对照标本PCR产物; M2: DNA分子质量标准, 100 bp Ladder.

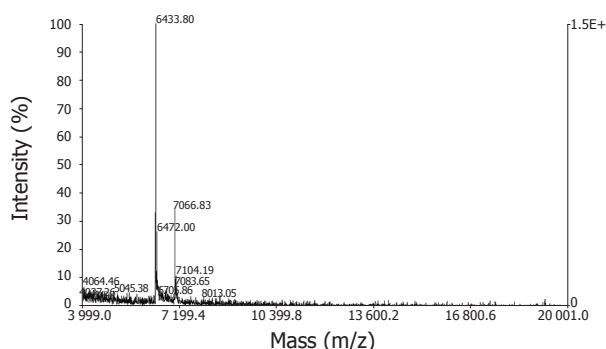


图 5 SNRPN C1654312T杂合子HepG2细胞免疫沉淀后标本引物延伸-飞行时间质谱分析结果. 6433 μ 峰: 延伸引物; 7066 μ 峰: T等位延伸产物.

产生mRNA转录的等位点相对应; 而对照标本无任何等位表达存在(图6), 说明Pol II-ChIP-PE-MS特异性强, 结果可信.

3 讨论

由于SNP为双等位多态, 两种等位多态之间仅有1个碱基的差异, 其功能研究必须在表达水平或蛋白水平揭示单碱基等位特异性的差异. 编码区的SNP通常更容易预测他们的序列和编码蛋白的结构和功能, 但更多的SNP位于非编码区. 对于非编码区(启动子或内含子区域)的关联位点, SNP的等位特异性差异无法在mRNA转录本得到反映, 通常以该SNP位点附近序列为对象, 通过报告基因试验研究不同等位对该序列启动子活性的影响, 或通过电泳移动漂移实验(EMSA)分析不同等位的寡核苷酸探针结合转录因子能力的差异^[2]. 这两类方法都存在着明显的局限性: (1)必须逐个位点、逐个等位构建报告基因或合成寡核苷酸探针, 工作量繁重, 费时费力; (2)目标DNA片段很短, 为体外功能研究, 缺乏染色质的天然结构及转录的三维调控过程, 其生物学中肯性受到质疑; (3)只能对SNP位点逐个进行分离的研究, 无法揭示多个位点SNP单倍型的功能; (4)阴性结果只能说明该位点SNP不是致病位点, 不能排除相邻的其他位点. 另外疾病

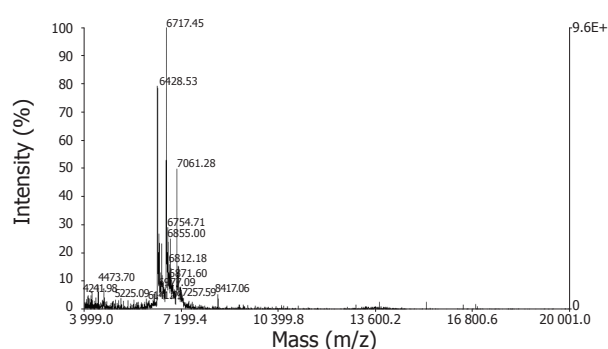


图 4 SNRPN C1654312T杂合子HepG2细胞免疫沉淀前标本引物延伸-飞行时间质谱分析结果. 6433 μ 峰: 延伸引物; 6717 μ 峰: C等位延伸产物; 7061 μ 峰: T等位延伸产物.

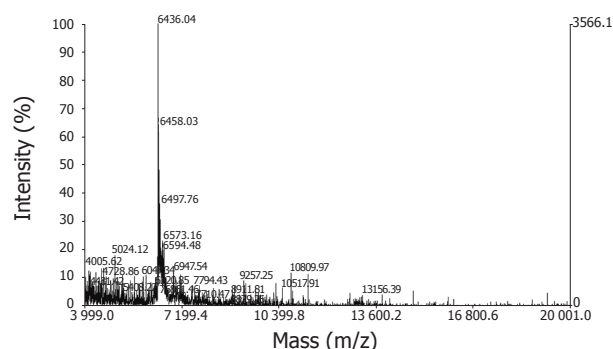


图 6 SNRPN C1654312T杂合子HepG2细胞ChIP对照标本引物延伸-飞行时间质谱分析结果. 6433 μ 峰: 延伸引物.

关联rSNP位点通常位于基因转录调控区, 紧密连锁不平衡的区域内可能存在众多的SNP, 逐点进行功能研究存在困难, 要找出其中与疾病直接相关的调节性SNP, 用上述两种方法存在困难, 迫切需要发展一种快速、高通量、多位点协同的SNP功能研究方法, 能够用于评价活体状态下也就是在一个正常功能的细胞核中的自然染色体中SNP对染色质的转录调节作用. 研究已经证实, 与染色质结合的RNA聚合酶 II 是真核细胞mRNA转录所必需的转录因子, RNA聚合酶 II 激活后被磷酸化, 结合到转录起始位点, 启动真核细胞所有mRNA的转录. mRNA转录过程与RNA多聚酶 II CTD末端特异性丝氨酸残基磷酸化有关, Ser5的磷酸化与转录的启动、延伸和mRNA的带帽全过程相关, 磷酸化的RNA多聚酶 II 与相关染色质片段的结合量与相对应基因的转录活性是有关系的^[7,8]. 我们设想, 位于调控区的SNP要表现功能意义, 应该具备2个条件: (1)位于转录起始点附近; (2)对转录的影响具有等位特异性. 因此我们有理由推测: 活体状态下, 在感兴趣一个或者多个SNP是杂合子的细胞中, 这些SNP也能够影响蛋白质-DNA的相互作用, 表现出等位特异性差异, 因此检测蛋白质-DNA的相互作用的等位特异性差异就可以反映出现在这些SNP表达过程中的不同影响; 杂合子细胞同源染色体上SNP位点两个

等位区域转录活性在宏观上可以表现为磷酸化RNA多聚酶II结合量,因此检测磷酸化RNA多聚酶II结合量差异即可精巧地反映等位特异性转录活性的差异.

一般调节性多态性的作用是微小的,这就需要一种高通量、敏感的分析方法来测定同一份免疫沉淀样本中两个不同等位点的相对结合量才能反应出这种微小差异.而染色质免疫沉淀(ChIP)技术是近几年来发展的一种高通量DNA-蛋白相互作用研究技术,能实现维持染色质天然结构状态的转录活性观察,且易于高通量进行^[9,10].为达到此目的,我们通过PCR来扩增免疫沉淀样本中特异性DNA序列,然后利用引物延伸和基于质谱吸光的原理建立的飞行时间-质谱技术(MALDI-TOF)来进行分析.在本研究中,我们试图证明:是否可以用RNA多聚酶II-ChIP-引物延伸及飞行时间质谱技术(Pol II-ChIP-PE-MS)来检测磷酸化的RNA多聚酶II对细胞中一个基因的两种不同等位点的结合量差异;同时也试图研究这种差异是否与体内基因表达等位差异性有关系.我们首先通过磷酸化RNA多聚酶II-ChIP技术将杂合子细胞目标基因SNP附近的DNA片段沉淀、分离,然后利用该位点特异的引物扩增,采用引物延伸-质谱(PE-MS)技术^[10,11]鉴定沉淀的DNA片段中目标SNP两种等位的比率,该比率可以反映两种等位染色体之间该位点RNA多聚酶II结合量的差异.如果有差异,表明该SNP能影响所在基因的转录活性;如果没有差异,则该SNP不能影响基因的转录量.为此,我们利用该方法研究了SNRPN(编码小核糖核蛋白多肽N)的表达. SNRPN是一个印迹基因,它的两个等位基因根据父系来源的不同有显著的不同表达水平(仅父源等位基因表达).为了区分不同表达量的等位基因,我们选择SNRPN外显子4上C1654312T(数字依据NT_026446来确定)为杂合子的HepG2细胞作为研究对象,以研究该C/T SNP(dbSNP rs705)的等位特异性表达情况,比较染色体DNA并以cDNA验证该结果.结果表明, C/T杂合子HepG2细胞系中, SNRPN基因依然维持其印迹状态,逆转录PCR产物酶切实实验证实SNRPN等位基因仅仅只有一个等位产生mRNA的转录,仅仅父源的T等位出现转录.同时我们利用一种对RNA多聚酶II CTD的磷酸化丝氨酸残基高度特异性的抗体进行ChIP测定两种等位对磷酸化RNA多聚酶II的结合量.当对SNRPN杂合子细胞进行Pol II-ChIP-PE-MS分析发现,基因组DNA以及免疫沉淀前标本在每个等位基因都有相同的磷酸化RNA多聚酶II结合量,但免疫沉淀后的物质(被磷酸化RNA多聚酶II结合的染色质)则仅在一个等位基因即T等位有磷酸化RNA多聚酶II结合,这表明在RNA多聚酶II被TF II H磷酸化之前(也就是mRNA合成开始之前)SN-

RPN的C等位基因是被转录抑制的,这一结果与实验中产生mRNA转录的等位点相对应.

本研究说明, Pol II-ChIP-PE-MS检测出的磷酸化RNA多聚酶II结合量可以反应出等位基因特异性的表达量,该方法可以精确的反应出双等位的SNP两种等位之间的精确表达量的差异,可以用于筛选影响基因表达的调节性SNP及其功能研究.利用Pol II-ChIP-VSET-MS策略进行SNP的功能研究,能够实现ChIP的优点,在活体状态下用甲醛固定生长期的细胞,能够自然出现单倍型的活体染色质的环境,转录调节过程能得到活体状态下一样的控制,具有在活体状态下进行分析的技术优势;其次该方法是通过检测RNA多聚酶II等位特异性结合量的差异来精确反映体内的调节性多态性的特征,在RNA转录本中无合适特定遗传标志出现的条件下也能敏感的检测出影响体内基因调节的SNP,特别适合那些位于非编码区(启动子或内含子区域)调节性SNP的功能研究,而后者正是当前研究的难点和热点;再次,本研究虽然只分析了印迹基因SNRPN的等位表达状态,但是这种带有一般性的方法能够应用于任何自然状态下发生的DNA-蛋白质相互作用,这就能够使我们利用该方法体内状态下来研究被特殊的候选因子结合的等位特异性调节转录过程状态;另外,该方法可以同时免疫沉淀出所有的被RNA多聚酶II结合的(有或影响mRNA表达)DNA片段,因此设计多种位点的延伸引物,同时利用质谱分析技术的高通量特性,可以进行多重引物延伸-质谱测定,从而可以进行快速、高通量、多位点协同的SNP功能研究.

4 参考文献

- 1 The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-796
- 2 Pitarque M, von Richter O, Rodriguez-Antona C, Wang J, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M. A nicotine C-oxidase gene (CYP2A6) polymorphism important for promoter activity. *Hum Mutat* 2004; 23: 258-266
- 3 Deng G, Zhou G, Zhai Y, Li S, Li X, Li Y, Zhang R, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Wang Y, He F. Association of estrogen receptor alpha polymorphisms with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004; 40: 318-326
- 4 Sakatani T, Wei M, Katoh M, Okita C, Wada D, Mitsuya K, Meguro M, Ikeguchi M, Ito H, Tycko B, Oshimura M. Epigenetic heterogeneity at imprinted loci in normal populations. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 1124-1130
- 5 Takahashi Y, Rayman JB, Dynlacht BD. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 2000; 14: 804-816
- 6 Sun X, Ding H, Hung K, Guo B. A new MALDI-TOF based mini-sequencing assay for genotyping of SNPs. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E68
- 7 O'Brien T, Hardin S, Greenleaf A, Lis JT. Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* 1994; 370: 75-77
- 8 Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing

- factors during transcription. *Genes Dev* 2000; 14: 2452-2460
- 9 Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004; 303: 1378-1381
- 10 Buck MJ, Lieb JD. ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* 2004; 83: 349-360
- 11 Storm N, Darnhofer-Patel B, van den Boom D, Rodi CP. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Methods Mol Biol* 2003; 212: 241-262

电编 张敏 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 •

WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于2003-04-15开通. WJG包括: 1995-2005年第1-48期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2005年第1-24期及特刊.

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). 高影响力论文排序: 点击次数, 下载次数, 引用次数. 高影响力论文即特别受同行关注, 影响范围广, 被点击次数、下载次数、引用次数多的论文. 一篇论文如果能进入高影响力论文行列, 其研究成果一般多有创新性, 学术水平较高, 学术价值较大, 因而影响力大. 投稿须知包括: 投稿细则, 述评, 研究原著, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告等要求及书写格式.

2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)

世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护.

世界华人消化杂志 2004年 5月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠.

100101, 北京市, 中国人民解放军第306医院载人航天主着陆场医疗救护队. yuemx@ns.cetin.net.cn

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会. 方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8次在直升机上的医疗救护演练经验, 2次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会. 并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案. 结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的ICU全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全. 创造了反应速度第一; 技术装备第一. 使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高. 载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求. 航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念. 载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护. 结论: 对返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务.

论文目次

目次网页包括: 岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004年5月;12(5):1009-1014. 功能目次包括: 点击率: 71, 下载率: 9, 引用率: 0, 摘要, 相关文章, 被引用次数, HTML, PDF.

4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 301, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链接.

5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号, 刊名, 题目, 作者, E-mail, 收稿, 送审, 审回, 退稿, 接受, 审稿费, 出版费, 彩色图制作费, 黑白图制作费, 英文摘要加工费, 英文全文加工费, 加急费, 其他, 发票编号, 送修, 修回, 重修, 编辑, 入库, 卷号, 期号, 起止页.

甜菜碱对酒精性肝损伤大鼠凋亡基因 caspase-12 表达的影响

张频, 龚作炯

张频, 龚作炯, 武汉大学人民医院感染科 湖北省武汉市 430060
张频, 女, 1979-09-23生, 湖北省荆州市人, 汉族, 2004年武汉大学医学院硕士研究生, 主要从事肝脏疾病的研究。
通讯作者: 龚作炯, 湖北省武汉市, 430060, 武汉大学人民医院感染科. zjgong@163.com
电话: 027-88041911-8385
收稿日期: 2005-09-05 接受日期: 2005-09-30

Effects of betaine on expression of caspase-12 in ethanol-induced liver injury in rats

Pin Zhang, Zuo-Jiong Gong

Pin Zhang, Zuo-Jiong Gong, Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Zuo-Jiong Gong, Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. zjgong@163.com
Received: 2005-09-05 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To investigate the effects of betaine on the expression of caspase-12 in the liver of rats with ethanol-induced liver injury.

METHODS: Forty-eight female SD rats were randomly divided into 4 groups: control, model, and low and high dose betaine group. Except the rats in control group, all the rats were fed fat-rich diet plus ethanol plus fish oil gavage for 8 wk. Betaine was administered intragastrically in the rats of betaine groups after 4-week exposure of ethanol. The expression of caspase-12 was detected in the liver tissues by immunohistochemistry and semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Compared with that in control group, the expression of caspase-12 was markedly induced in the liver after chronic ethanol consumption (mRNA: 1.00 vs 0.18, $P < 0.01$; protein: 0.2969±0.0451 vs 0.0526±0.0234, $P < 0.01$). However, the level of caspase-12 expression was significantly lower in high- and low-dose betaine group than that in model group (mRNA: 0.10, 0.12 vs 1.00, $P < 0.01$; protein: 0.1215±0.0130, 0.1850±0.0085 vs 0.2969±0.0451, $P < 0.01$).

Significant difference of caspase-12 expression also existed between high- and low-dose betaine group (mRNA: 0.10 vs 0.12, $P < 0.05$; protein: 0.1215±0.0130 vs 0.1850±0.0085, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Betaine suppresses the expression of caspase-12 both in mRNA and protein level in the rats with ethanol-induced liver injury, which may be related to its anti-apoptotic mechanism.

Key Words: Ethanol-induced liver; Betaine; caspase-12

Zhang P, Gong ZJ. Effects of betaine on expression of caspase-12 in ethanol-induced liver injury in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(20):2437-2440

摘要

目的: 研究甜菜碱对凋亡基因caspase-12表达的影响, 探讨其抗酒精性肝损伤(ALD)大鼠肝细胞凋亡的机制。

方法: 采用酒精加鱼油灌胃配合高脂饮食建立酒精性肝损伤模型, 应用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法和免疫组化法检测大鼠肝组织凋亡基因caspase-12 mRNA和蛋白水平。

结果: 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织caspase-12表达明显增强(mRNA: 1.00 vs 0.18, $P < 0.01$; 蛋白: 0.2969±0.0451 vs 0.0526±0.0234, $P < 0.01$), 但高、低剂量甜菜碱能抑制其表达(mRNA: 0.10, 0.12 vs 1.00, $P < 0.01$; 蛋白: 0.1215±0.0130, 0.1850±0.0085 vs 0.2969±0.0451, $P < 0.01$)。甜菜碱高、低剂量组之间有显著差异(mRNA: 0.10 vs 0.12, $P < 0.05$; 蛋白: 0.1215±0.0130 vs 0.1850±0.0085, $P < 0.05$)。

结论: 甜菜碱能抑制凋亡基因caspase-12 mRNA和蛋白的表达, 可能是其减少凋亡的机制之一。

关键词: 酒精性肝损伤; 甜菜碱; caspase-12

张频, 龚作炯. 甜菜碱对酒精性肝损伤大鼠凋亡基因caspase-12表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2437-2440
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2437.asp>

0 引言

肝细胞凋亡在酒精性肝损伤中的作用日益引起重

视,是目前该领域的研究热点之一.在众多复杂的机制中,酗酒引起的高同型半胱氨酸血(hyperhomocysteinemia, HHcy)诱发的内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress),继而诱导的肝细胞凋亡是其重要机制之一^[1,2]. HHcy与多种疾病的发生有关^[3-5],对机体是非常有害的^[6,7].最终ER应激激发了一个包括caspase-12, 9, 3特异的级联反应. ER过强应激时,激活的caspase-12不通过其它通路能独立诱导肝细胞凋亡. caspase-12是目前较理想的抗凋亡治疗靶位^[8]. 以往的研究结果已证实甜菜碱对ALD大鼠肝细胞凋亡具有良好的拮抗作用. 我们研究甜菜碱对凋亡基因caspase-12表达的影响,以探讨其抗凋亡的可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 盐酸甜菜碱,纯度99%,浙江巨化集团进出口有限公司赠予;硫酸亚铁,上海化学试剂公司生产;鱼油和560 mL/L酒精,自购;Trizol试剂购自Invitrogen公司;100 bp DNA ladder Marker购自TaKaRa生物技术有限公司;M-MLV逆转录酶及其缓冲液,10 mmol/L dNTPS, oligo(dT)₁₅随机引物购自Promega公司;Taq DNA聚合酶及其缓冲液,核糖核酸酶抑制剂(RNasin)购自Biostar公司;caspase-12聚合酶链反应扩增引物由武汉伯杰生物股份有限公司合成;兔抗鼠caspase-12及多克隆兔抗caspase-12抗体购自Stressgen公司;SP、DAB试剂盒购自北京中山公司. SPF级SD♀大鼠48只,体质量150±10 g,由武汉大学动物实验中心提供. 正常喂养1 wk后,采用随机数字法将大鼠随机分为4组,每组12只,分为正常对照组、模型组和甜菜碱高、低剂量组. 模型制备在目前常用的酒精灌胃的造模方法基础上加以改进,以灌酒精+鱼油制作酒精性肝损伤大鼠模型. 正常组以普通饮食,并灌胃9 g/L氯化钠溶液. 其余各组每日予酒精+0.5 mL鱼油灌胃,酒精剂量开始为7 g/kg,随后每周递增0.2 g/kg,每日上午一次,共8 wk;同时给予自制饲料(配方如下:普通饲料:猪油:全脂奶粉为80:10:10,同时按5 g/kg饲料给予硫酸亚铁^[9,10]). 所有大鼠始终均自由饮水. 造模第4周开始,甜菜碱组按200 mg/kg给予甜菜碱水剂灌胃,每日下午1次. 实验结束时,乌拉坦(200 g/L, 100 g/L)麻醉动物,剖腹部取肝脏,一部分放-80℃冰箱保存用于做RT-PCR,另一部分于100 g/L甲醛溶液固定,用于免疫组织化学染色检测.

1.2 方法 取黄豆大小的肝组织标本于匀浆器内研磨,用Trizol试剂、氯仿和异丙醇, RNA沉淀后,用无RNAse缓冲液溶解,使用紫外分光光度计测定A₂₆₀和A₂₈₀,计算RNA的浓度和纯度. RNA 2 μg加oligo(dT)₁₅随机引物0.5 μg及DEPC处理水至总

体积15 μL, 70℃孵育5 min,随后在冰上迅速冷却. 然后依次加入5 μL M-MLV缓冲液, 1.25 μL dNTPS(10 mmol/L), RNasin 25 U, 200U M-MLV逆转录酶以及DEPC处理水至总体积25 μL. 反应在42℃中进行60 min,随后85℃ 5 min终止,并于冰箱中4℃保存. caspase-12正义: 5'ATTCCTGGTCTTTATGTCCC 3', 反义: 5'ATACTCTCTCAATGGTGGGC 3', 扩增片段全长为495 bp; 磷酸甘油脱氢酶基因(reduced glyceraldehydes phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内对照, 正义: 5'TCCCTCAAGATTGTCAGCAA 3', 反义: 5'AGATCCACAACGGATACATT 3, 扩增片段全长为309 bp. PCR反应体系包括: 10×Taq缓冲液 5 μL, dNTP(10 mmol/L)1 μL, 基因特异性引物(正义链及反义链, 各25 μmol/L)1 μL, 2.0 U Taq DNA聚合酶及cDNA 1 μL, 加水至总体积50 μL. 反应过程如下: 初始94℃孵育3 min, 随后30个循环, 包括94℃变性45 s, 54℃退火45 s, 72℃延伸1 min. 最后在72℃延伸7 min. 为了保证用于PCR反应的cDNA量一致,采用看家基因GAPDH作为内参照. 将能获得等量的GAPDH PCR扩增产物的cDNA用作扩增目的产物. PCR结束时,取产物5 μL在20 g/L琼脂糖凝胶(含0.1 g/L溴化乙锭)中电泳,紫外光下观察. 采用法国VL凝胶成像及分析系统进行PCR产物半定量分析. 将石蜡包埋的肝组织块切成3 μm厚,常规脱蜡入水. 30 mL/L H₂O₂去离子水孵育5-10 min,消除内源性过氧化物酶活性;正常兔血清工作液孵育10-15 min封闭非特异性结合部位. 然后滴加多克隆兔抗caspase-12(1:200稀释)一抗4℃过夜,随后滴加生物素结合的羊抗兔二抗孵育10-15 min. PBS冲洗后,滴加辣根标记链霉卵白素工作液室温下孵育10-15 min. 最后以DAB显色,阳性反应呈棕黄色. 阴性对照以PBS代替相应的一抗. 光镜下每张切片随机选取6个不重叠视野,采用HPIAS-1000全自动医学彩色图像分析系统,测定平均光密度,计算每组平均值,反映阳性强度.

统计学处理 采用单因素多个均数比较的方差分析统计法,在作方差齐性检验后,进行各组数据两两之间的均数比较,使用SPSS 10.0统计学软件处理.

2 结果

在实验期间,模型组大鼠有4只因酒精灌胃误入气管死亡,其余组大鼠全部存活.

2.1 甜菜碱对caspase-12 mRNA表达的影响 采用quantiscan软件扫描分析吸光度进行定量,正常对照组大鼠caspase-12 mRNA表达的吸光度为0.18,模型组为1.00,甜菜碱高、低剂量组分别为0.10和0.12. 与正常组对比,模型组caspase-12 mRNA表达显著增

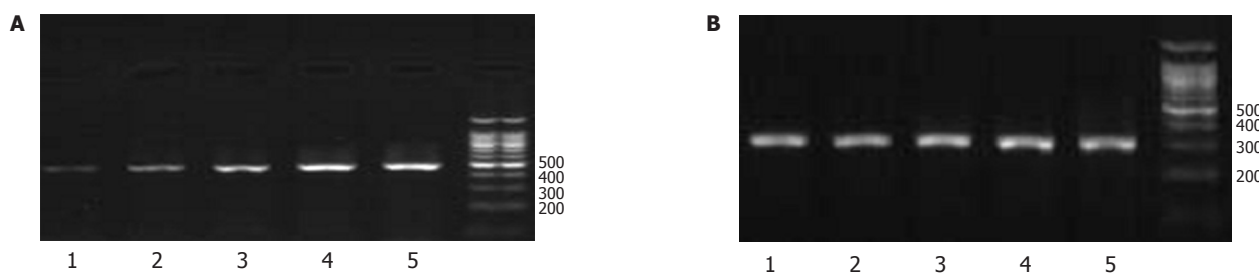


图1 caspase-12 mRNA表达情况. A: caspase-12; B: GAPDH内对照. 1: 正常组; 2: 甜菜碱高剂量组; 3: 甜菜碱低剂量组; 4, 5: 模型组.

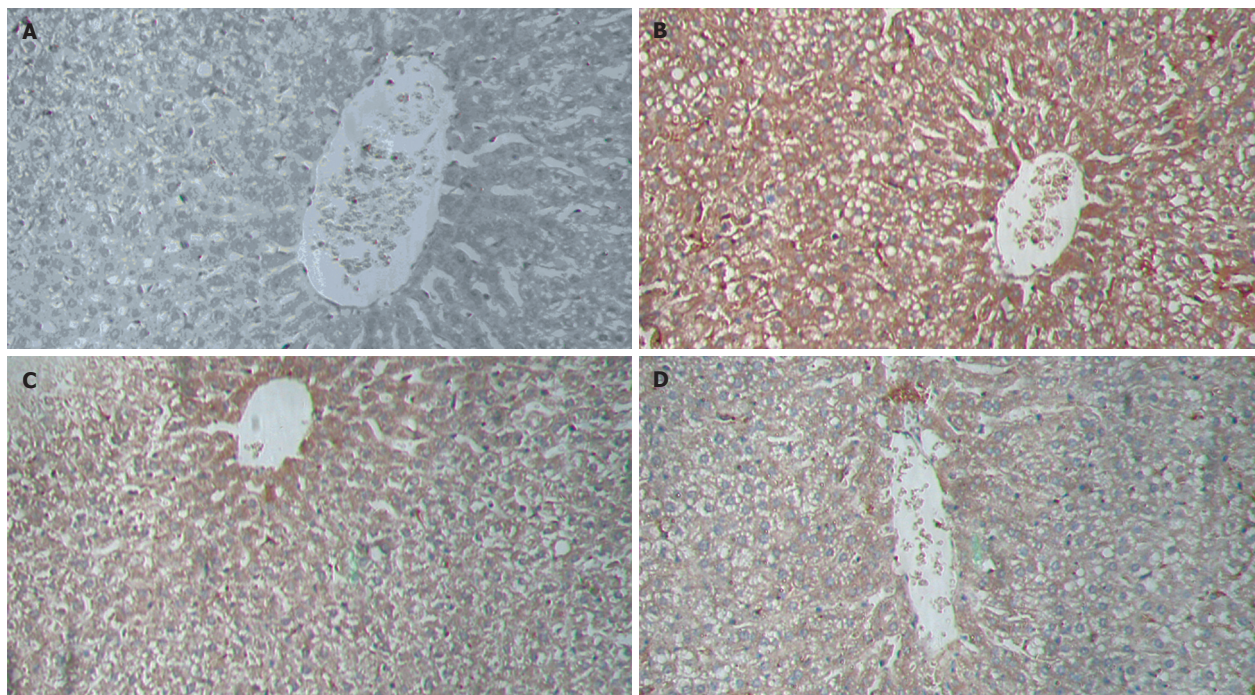


图2 大鼠肝组织caspase-12表达 (SP × 200). A: 正常组; B: 模型组; C: 甜菜碱低剂量组; D: 甜菜碱高剂量组.

加($P < 0.01$); 与模型组比较, 甜菜碱高、低剂量组caspase-12 mRNA表达显著减少($P < 0.01$), 且甜菜碱高、低剂量组之间有显著差异($P < 0.05$, 图1).

2.2 甜菜碱对caspase-12蛋白的影响 免疫组织化学染色结果显示, caspase-12蛋白染色定位于肝细胞胞质(图2). 模型组caspase-12蛋白表达较正常组显著增加($0.296\ 9 \pm 0.045\ 1$ vs $0.052\ 6 \pm 0.023\ 4$, $P < 0.01$), 甜菜碱高、低剂量组较模型组表达显著减少($0.121\ 5 \pm 0.013\ 0$ vs $0.296\ 9 \pm 0.045\ 1$; $0.185\ 0 \pm 0.008\ 5$ vs $0.296\ 9 \pm 0.045\ 1$, $P < 0.01$), 甜菜碱高、低剂量组之间有显著差异($0.121\ 5 \pm 0.013\ 0$ vs $0.185\ 0 \pm 0.008\ 5$, $P < 0.05$).

3 讨论

细胞凋亡(apoptosis)是由基因控制的细胞自主的有序性死亡. 肝细胞凋亡发生于许多肝脏疾病, 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)与肝细胞凋亡的关系是目前的研究热点之一^[11-13], 鉴于凋亡在ALD中的重要作用的认识, 通过对凋亡机制的干预可能为酒精性肝损伤的防治提供一个新的途径^[14,15]. 介导细

胞凋亡的两条经典的传导通路是死亡受体活化和线粒体损伤, 但酒精性损伤引起肝细胞凋亡的确切机制尚不清楚, 一般认为ALD的凋亡与肿瘤坏死因子(TNF- α)相关^[16], Esfandiari *et al*^[17]研究发现, 慢性酒精摄入和叶酸缺乏可以激活ER应激信号通路. 过度内质网应激启动的细胞凋亡, 是一条新的细胞凋亡信号传导通路^[18]. 此信号传导通路包括非折叠蛋白反应和钙离子起始信号等机制^[19], 内质网应激可以特异性激活caspase-12, caspase-12裂解caspase-3等下游效应蛋白酶, 最终导致细胞凋亡. 新近研究表明^[20,21], ER stress引起凋亡时胞质内的caspase-7转移至ER表面激活caspase-12. 活化的caspase-12在无需细胞色素C(cytochrome C)参与的情况下激活caspase-9和caspase-3引起凋亡^[22]. 另外Liu *et al*^[23]的实验, 通过使用caspase-9的抑制剂不能减少顺铂诱导的细胞凋亡, 而用caspase-3的抑制剂仅轻度抑制了细胞凋亡, 但当培养细胞转染抗caspase-12的抗体后能显著减少细胞的凋亡, 从而也得出结论, caspase-12是内质网应激特异性caspase蛋白, 参与内质网应激时的细胞调

亡过程. Jiang *et al*^[24]证实, 抑制caspase-12的表达, 是抗ER stress诱导的凋亡的有潜力的治疗途径.

甜菜碱^[25,26]又名三甲基甘氨酸, 为人体内唯一可替代叶酸或S-腺苷蛋氨酸作为甲基供体, 是参与蛋氨酸循环及卵磷脂合成的一种季胺盐可溶性生物碱^[27,28]. 在多种植物的根、茎或种子中含有这种生物碱, 在甜菜中含量较多(10-15 g/kg). 甜菜碱已被证明对酒精性肝损伤有防治作用, 能降低酒精摄入小鼠HHcy、内质网应激和肝细胞损伤^[29,30]. 我们的前期实验还证实了它可以减少ALD大鼠肝细胞凋亡的发生, 但其拮抗凋亡的机制尚未见报道. 本实验结果显示, 模型组大鼠caspase-12 mRNA和蛋白高表达, 证实caspase-12可能介导了肝细胞凋亡的发生. 同时甜菜碱组大鼠凋亡基因caspase-12 mRNA和蛋白的表达均显著降低($P<0.01$), 表明甜菜碱抗肝细胞凋亡的机制可能与抑制凋亡基因caspase-12的表达有关, 且与药物剂量有一定关系. 这可能是甜菜碱抗酒精性肝损伤肝细胞凋亡的机制之一, 从而为临床应用甜菜碱治疗酒精性肝损伤提供了依据.

4 参考文献

- 1 Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1699-1708
- 2 Blasco C, Caballeria J, Deulofeu R, Lligona A, Pares A, Lluís JM, Gual A, Rodes J. Prevalence and mechanisms of hyperhomocysteinemia in chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1044-1048
- 3 Fernandez M, Fernandez G, Diez-Ewald M, Torres E, Vizcaino G, Fernandez N, Narvaez J, Arteaga-Vizcaino M. Plasma homocysteine concentration and its relationship with the development of preeclampsia. Effect of prenatal administration of folic acid. *Invest Clin* 2005; 46: 187-195
- 4 Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Makowski J, Fowler B, Kuhlmann MK. Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine are related to degree of renal insufficiency in type 2 diabetes. *Clin Chem* 2005; 51: 891-897
- 5 Wijekoon EP, Hall B, Ratnam S, Brosnan ME, Zeisel SH, Brosnan JT. Homocysteine metabolism in ZDF (Type 2) diabetic rats. *Diabetes* 2005; 54: 3245-3251
- 6 Mato JM, Lu SC. Homocysteine, the bad thiol. *Hepatology* 2005; 41: 976-979
- 7 Fowler B. Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Semin Vasc Med* 2005; 5: 77-86
- 8 Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature* 2000; 403: 29-30
- 9 Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Cabrera J, Burkhardt S, Osuna C, Lewinski A. Indole-3-propionic acid, a melatonin-related molecule, protects hepatic microsomal membranes from iron-induced oxidative damage: relevance to cancer reduction. *J Cell Biochem* 2001; 81: 507-513
- 10 Karbownik M, Reiter RJ, Burkhardt S, Gitto E, Tan DX, Lewinski A. Melatonin attenuates estradiol-induced oxidative damage to DNA: relevance for cancer prevention. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226: 707-712
- 11 Deaciuc IV, D'Souza NB, Burikhanov R, Nasser MS, Voskresensky IV, De Villiers WJ, McClain CJ. Alcohol, but not lipopolysaccharide-induced liver apoptosis involves changes in intracellular compartmentalization of apoptotic regulators. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 160-172
- 12 Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 491-508
- 13 Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002; 27: 63-68
- 14 Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708-1717
- 15 Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005; 11: RA337-RA345
- 16 Ji C, Deng Q, Kaplowitz N. Role of TNF-alpha in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology* 2004; 40: 442-451
- 17 Esfandiari F, Villanueva JA, Wong DH, French SW, Halsted CH. Chronic ethanol feeding and folate deficiency activate hepatic endoplasmic reticulum stress pathway in micropigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G54-G63
- 18 Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 381-395
- 19 Shinohara T, Ikesugi K, Mulhern ML. Cataracts: Role of the unfolded protein response. *Med Hypotheses* 2005
- 20 Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 33869-33874
- 21 Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277: 34287-34294
- 22 Obeng EA, Boise LH. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280: 29578-29587
- 23 Liu H, Baliga R. Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1985-1992
- 24 Jiang S, Xie Q, Zhang W, Zhou XQ, Jin YX. Preparation of anti-mouse caspase-12 mRNA hammerhead ribozyme and identification of its activity *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4094-4097
- 25 Kim YC, Jung YS, Kim SK. Effect of betaine supplementation on changes in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids and experimental cholestasis induced by alpha-naphthylisothiocyanate. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 663-670
- 26 Kharbanda KK, Rogers DD 2nd, Mailliard ME, Siford GL, Barak AJ, Beckenhauer HC, Sorrell MF, Tuma DJ. A comparison of the effects of betaine and S-adenosylmethionine on ethanol-induced changes in methionine metabolism and steatosis in rat hepatocytes. *J Nutr* 2005; 135: 519-524
- 27 Krueger KJ, McClain CJ, McClave SA, Dryden GW. Nutritional supplements and alternative medicine. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 130-138
- 28 Craig SA. Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 539-549
- 29 Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1488-1499
- 30 Kharbanda KK, Rogers DD 2nd, Mailliard ME, Siford GL, Barak AJ, Beckenhauer HC, Sorrell MF, Tuma DJ. Role of elevated S-adenosylhomocysteine in rat hepatocyte apoptosis: Protection by betaine. *Biochem Pharmacol* 2005

大肠癌组织 Ets-1, MMP-1 和 VEGF 的表达及意义

洪玮, 刘南植, 张庆, 李秀梅, 倪志

洪玮, 刘南植, 张庆, 李秀梅, 倪志, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

洪玮, 女, 1980-12-02生, 安徽六安人, 汉族, 华中科技大学同济医学院消化内科在读硕士研究生, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

通讯作者: 洪玮, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. hongwei_80@126.com

电话: 027-83663612 传真: 027-83663585

收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-10-11

Expression of E26 transformation-specific-1, matrix metalloproteinases-1 and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma

Wei Hong, Nan-Zhi Liu, Qing Zhang, Xiu-Mei Li, Zhi Ni

Wei Hong, Nan-Zhi Liu, Qing Zhang, Xiu-Mei Li, Zhi Ni, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Wei Hong, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. hongwei_80@126.com

Received: 2005-09-28 Accepted: 2005-10-11

Abstract

AIM: To study the expression of E26 transformation-specific-1 (Ets-1), matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human colorectal carcinoma, and to explore the role of Ets-1 in the angiogenesis and metastasis of carcinoma.

METHODS: The expression of Ets-1, MMP-1 and VEGF were detected in colorectal carcinoma ($n = 61$) and normal colon tissues ($n = 21$) by the immunohistochemical method respectively.

RESULTS: Ets-1, MMP-1 and VEGF were negatively expressed in all normal mucosal tissues. The positive rates of Ets-1, MMP-1 and VEGF expression were 75.4%, 78.7% and 82.0% in colorectal carcinoma respectively. No significant correlation was found between their positive rates and tumor's size as well as the differentiation ($P > 0.05$). The expression of Ets-1, MMP-1 and VEGF were significantly correlated with Duke's staging ($\chi^2 = 10.718, P < 0.01$; $\chi^2 = 8.323, P < 0.01$; $\chi^2 = 6.145, P < 0.05$), the depth of invasion

($\chi^2 = 7.705, P < 0.01$; $\chi^2 = 19.101, P < 0.01$; $\chi^2 = 14.707, P < 0.01$), lymphatic invasion ($\chi^2 = 9.333, P < 0.01$; $\chi^2 = 3.965, P < 0.05$; $\chi^2 = 4.638, P < 0.05$) and distant metastasis ($\chi^2 = 5.472, P < 0.05$; $\chi^2 = 4.125, P < 0.05$; $\chi^2 = 5.034, P < 0.05$). Ets-1 expression was positively associated with MMP-1 and VEGF level ($r = 0.447, P < 0.01$; $r = 0.425, P < 0.05$).

CONCLUSION: Ets-1 was over-expressed in colorectal carcinoma, and its expression was related to clinical staging, invasion and metastasis. Ets-1 expression was also positively related to MMP-1 and VEGF level. Their expression can become referential indexes to predict the malignant behavior of colorectal carcinoma.

Key Words: E26 transformation-specific-1, Matrix metalloproteinases-1; Vascular endothelial growth factor; Colorectal carcinoma

Hong W, Liu NZ, Zhang Q, Li XM, Ni Z. Expression of E26 transformation-specific-1, matrix metalloproteinases-1 and vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2441-2445

摘要

目的: 检测大肠癌中转录因子Ets-1, 基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达, 探讨Ets-1在大肠癌血管生成和浸润转移中的作用。

方法: 应用免疫组化SP法检测61例大肠癌组织和21例正常大肠组织中Ets-1, MMP-1和VEGF蛋白的表达水平。

结果: Ets-1, MMP-1和VEGF在正常大肠黏膜中表达均为阴性。在大肠癌组织中表达的阳性率分别为75.4%, 78.7%和82.0%。其表达水平与肿瘤大小和分化程度无关($P > 0.05$), 与Duke's分期($\chi^2 = 10.718, P < 0.01$; $\chi^2 = 8.323, P < 0.01$; $\chi^2 = 6.145, P < 0.05$)、浸润深度($\chi^2 = 7.705, P < 0.01$; $\chi^2 = 19.101, P < 0.01$; $\chi^2 = 14.707, P < 0.01$)、淋巴结转移($\chi^2 = 9.333, P < 0.01$; $\chi^2 = 3.965, P < 0.05$; $\chi^2 = 4.638, P < 0.05$)和远处转移($\chi^2 = 5.472, P < 0.05$; $\chi^2 = 4.125, P < 0.05$; $\chi^2 = 5.034, P < 0.05$)密切相关。在大肠癌中, Ets-1的表达与MMP-1和VEGF的表达呈正相关($r = 0.447, P < 0.01$; $r = 0.425, P < 0.05$)。

结论: Ets-1在大肠癌中高表达,与临床分期、浸润深度、转移密切相关.Ets-1的表达与MMP-1和VEGF的表达呈正相关,三者的表达水平可作为判定大肠癌恶性生物学行为的参考指标.

关键词: 转录因子Ets-1; 基质金属蛋白酶-1; 血管内皮生长因子; 大肠癌

洪玮, 刘南植, 张庆, 李秀梅, 倪志. 大肠癌组织Ets-1, MMP-1和VEGF的表达及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2441-2445
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2441.asp>

0 引言

众所周知, 肿瘤的恶性生物学行为一侵袭转移是导致癌症患者死亡的主要原因, 研究证实, 肿瘤灶的血管生成加速了实体瘤的生长, 侵袭, 转移^[1,2], Ets-1是与肿瘤血管发生和侵袭转移有关的转录因子^[3,4]. 近来关于转录因子Ets-1在血管发生和浸润转移中的作用受到了国内外学者的关注^[5-8], 但在大肠癌中关于Ets-1与MMP-1, VEGF的相关研究较少. 我们用免疫组化SP法检测Ets-1和MMP-1, VEGF在大肠癌中的表达水平及关系, 探讨Ets-1与大肠癌血管发生和浸润转移的关系, 为大肠癌的早期发现和判断预后提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-10/2004-10手术切除大肠癌标本61例, 男30例, 女31例, 平均年龄52.6(26-81)岁, 肿瘤平均直径为5.5 cm. 病理组织学诊断高分化腺癌21例, 中分化腺癌28例, 低分化腺癌12例. Duke's A期14例, B期18例, C期17例, D期12例. 淋巴结转移29例, 未转移者32例. 远处转移12例, 未转移49例. 所有患者术前均未经过任何抗癌治疗. 另21例正常大肠组织为对照(取自肠镜标本). 标本均经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡切片厚3-5 μm . 兔抗人Ets-1多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 兔抗人MMP-1多克隆抗体和VEGF多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 即用型SP试剂盒和DAB显色剂购自北京中山试剂公司, 其他常规试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 方法 采用免疫组化SP法染色, 每批染色均设立对照组, 以PBS代替一抗为阴性空白对照, 用已知阳性切片为阳性对照. 简要步骤如下: 组织切片常规脱蜡脱水后, 使用3 mL/L H_2O_2 甲醇阻断内源性酶, 柠檬酸抗原修复液热水浴30 min, 用15 mL/L的正常山羊血清以减少非特异性着色, 再滴入相应抗体(Ets-1, MMP-1和VEGF的滴度均为1:100), 4℃冰箱过夜, 继而滴入1:200生物素标记的第二抗体, 30 min后清洗切片后再滴入1:200稀释的链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP), 孵育20 min后经1 g/L DAB- H_2O_2 显色后, 苏木素

复染, 常规封片, 镜检并摄像. 细胞质出现棕黄色颗粒者为阳性, 高倍镜下($\times 200$)对每张切片随机选择5个视野, 计数200个细胞/视野, 按阳性细胞数占视野总细胞数的百分比分为3级: 无阳性细胞或阳性细胞数 $<5\%$ 为阴性(-), 阳性细胞数在5-50%之间为阳性(+), 阳性细胞数 $>50\%$ 为强阳性(++).

统计学处理 采用SPSS11.0分析软件进行统计学处理, 根据数据性质, 分别应用 χ^2 检验, fishers精确概率法以及Spearman等级相关分析, 设 $P<0.05$ 为差异显著性标准.

2 结果

2.1 Ets-1, VEGF和MMP-1的表达 Ets-1, MMP-1和VEGF在大肠癌中阳性率分别为75.4%, 78.7%和82.0%, 显著高于癌旁正常大肠黏膜($\chi^2 = 18.983, P<0.01$; $\chi^2 = 22.285, P<0.01$; $\chi^2 = 23.963, P<0.01$), Ets-1, MMP-1和VEGF在癌旁正常大肠黏膜中的表达均为阴性. Ets-1阳性染色颗粒以癌细胞胞质为主, 少数可见癌细胞胞核染色. MMP-1阳性染色颗粒以癌细胞胞质为主, 主要表达在侵袭前沿, 和Ets-1的表达是共定位的, 在部分间质细胞也可见阳性表达. VEGF阳性染色颗粒以癌细胞胞质为主, 少量可见癌细胞胞膜染色, 在部分血管内皮细胞可见阳性表达(图1).

2.2 Ets-1, VEGF和MMP-1的表达与临床病理的关系 Ets-1的表达与肿瘤大小和分化程度无关($P>0.05$), 与Duke's分期、浸润深度、淋巴结转移和远处转移相关($\chi^2 = 10.718, P<0.01$; $\chi^2 = 7.705, P<0.01$; $\chi^2 = 9.333, P<0.01$; $\chi^2 = 5.472, P<0.05$). MMP-1的表达与肿瘤大小和分化程度无关($P>0.05$), 与Duke's分期、浸润深度、淋巴结转移和远处转移有关($\chi^2 = 8.323, P<0.01$; $\chi^2 = 19.101, P<0.01$; $\chi^2 = 3.965, P<0.05$; $\chi^2 = 4.125, P<0.05$). VEGF的表达与肿瘤大小和分化程度无关($P>0.05$), 与Duke's分期、浸润深度、淋巴结转移和远处转移有关($\chi^2 = 6.145, P<0.05$; $\chi^2 = 14.707, P<0.01$; $\chi^2 = 4.638, P<0.05$; $\chi^2 = 5.034, P<0.05$, 表1).

2.3 Ets-1, MMP-1和VEGF的相互关系 在大肠癌中, Ets-1和MMP-1表达呈正相关($r = 0.447, P = 0.005$), Ets-1表达和VEGF呈正相关($r = 0.425, P = 0.012$, 表2).

3 讨论

肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤血管形成.在新生血管形成之前, 由于被动供氧和营养扩散的限制, 肿瘤灶仅以一种小的, 无症状的病损存在. 而新生血管形成之后, 肿瘤灶局部快速播散, 增强肿瘤灶的远处转移能力^[9-11]. 因此, 恶性肿瘤的生长转移与其间质血管的生成密切相关, 如果能找到有效调节血管生成的途径, 则有望控制肿瘤的生长和转移, 从而阻止肿瘤的恶性生

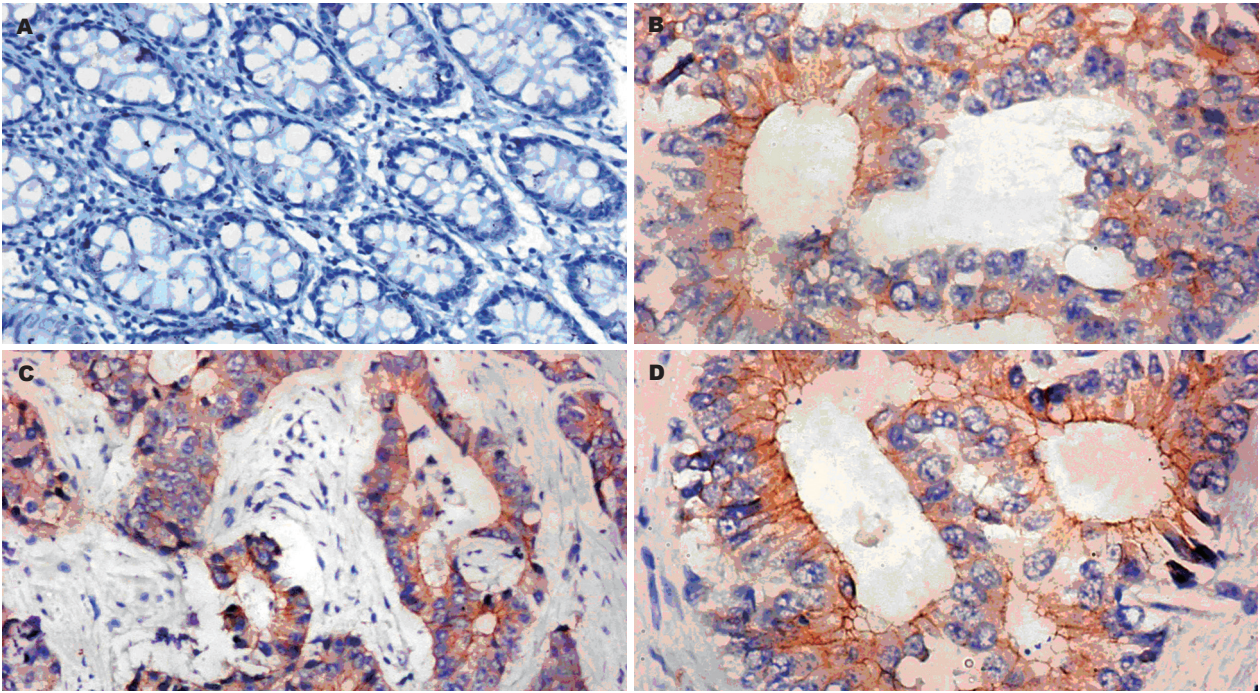


图 1 大肠癌组织中Ets-1, MMP-1和VEGF的表达. A: 正常组织未见Ets-1的表达 (×200); B: Ets-1在肿瘤细胞胞质中明显表达(×400); C: MMP-1在肿瘤细胞胞质中明显表达 (×200); D: VEGF在肿瘤细胞胞质中明显表达(×400).

物学行为, 延长肿瘤患者的生命. Ets-1是从白血病病毒E26分离出来的v-ets同源的原癌基因c-ets-1的表达产物, 它是Ets家族中具有代表性的转录因子. Ets家族是一组转录因子群, 具有由85个氨基酸构成的winged helix-turn-helix构造的DNA结合区(称作ETS区), 可以识别、结合嘌呤丰富的DNA核心序列GGAA/T, 这一序列存在于与细胞外基质降解以及血管生成有关的许多基因的5'-侧翼调节区, 如MMP-1, MMP-3, MMP-9和尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA), 从而调节这些基

因的转录^[12-14]. Vandenbunder *et al*^[15]用鸡胚进行原位杂交分析中发现, 血管形成(vasculogenesis)和血管新生(angiogenesis)时, 处于血管形成期的内皮细胞中都高表达Ets-1 mRNA. Khatun *et al*^[16]发现Ets-1可以上调MMP-1, MMP-3, MMP-9, 整合素 β 和uPA的表达, 使内皮细胞转化为成血管表型, 从而诱导了癌组织的血管生成, 促进了癌的侵袭转移. 本研究发现, Ets-1在大肠癌中呈高表达, 有淋巴结和远处转移者Ets-1阳性表达率显著高于无淋巴结和无远处转移者, 且随着Duke's

表 1 Ets-1, MMP-1和VEGF的表达与大肠癌临床病理的关系

病理因素		n	Ets-1		MMP-1		VEGF	
			+	-	+	-	+	-
大小	≤5 cm	28	21	7	22	6	23	5
	>5 cm	33	25	8	26	7	27	6
组织学分化	高	21	15	6	15	6	16	5
	中	28	22	6	24	4	24	4
	低	12	9	3	9	3	10	2
Duke's分期	A	14	7	7	8	6	9	5
	B	18	12	6	13	5	14	4
	C	17	15	2	15	2	15	2
	D	12	12	0 ^b	12	0 ^b	12	0 ^a
浸润深度	T1	5	2	3	1	4	2	3
	T2	9	5	4	4	5	5	4
	T3	15	11	4	13	4	12	3
	T4	32	28	4 ^b	30	2 ^b	31	1 ^b
淋巴结转移	有	29	27	2	26	3	27	2
	无	32	19	13 ^b	22	10 ^a	23	9 ^a
远处转移	有	12	12	0	12	0	12	0
	无	49	34	15 ^a	36	13 ^a	38	11 ^a

^aP<0.05, ^bP<0.01.

表2 Ets-1, MMP-1和VEGF的相互关系

Ets-1的表达	MMP-1的表达		VEGF的表达	
	+	-	+	-
+	41	5	42	4
-	7	8	8	7

分期和浸润深度的进展, Ets-1的表达显著增加。

MMPs是一大类锌依赖性内肽酶家族, 活性部位都含有一个 Zn^{2+} , 均能降解一种或几种细胞外基质, 在基质降解过程中起主导作用。MMP-1(亦称胶原酶)能降解I, II, III型胶原, 把I型胶原分解成1/4和3/4片段, 破坏基底膜, 通过对细胞外基质的改建, 促进肿瘤新生血管的形成, 利于肿瘤的浸润与转移^[17-20]。目前认为, 肿瘤侵袭转移的进程依赖于肿瘤细胞蛋白水解活性的增加^[21]。已知I和III型胶原是胃肠道间质的主要结构组分, 故MMP-1在降解肠道组织基底膜, 以利于肿瘤的进一步侵袭中起了重要作用^[22]。基因分析表明, MMPs的启动子区域PEA-3位点是Ets基因产物的结合点, 是一个功能性的转录元件^[23]。我们发现MMP-1主要表达在大肠癌细胞的胞质里, 且主要表达在侵袭前沿, 和Ets-1的表达是共定位的, 相关分析也显示Ets-1和MMP-1显著正相关, 从而表明Ets-1和MMP-1都在大肠癌的侵袭中起了重要作用。VEGF是目前引起大家关注的最主要的一种促血管生长的因子, 亦称血管渗透因子(vascular permeability factor, VPF)^[24], 它是一个有效的, 多功能的细胞因子, 特异作用于血管内皮细胞, 促进内皮细胞的有丝分裂和趋化作用, 还增加血管通透性, 使管内的纤维蛋白原等外渗^[25]。在肿瘤细胞, VEGF通过直接刺激内皮细胞增殖和迁移发挥重要作用。它也活化很多蛋白酶降解周围的基质, 促进肿瘤的侵袭转移^[26]。Iwasaka *et al*^[27]发现VEGF, bFGF可诱导内皮细胞表达Ets-1, 表达的Ets-1进一步诱导uPA, MMP-1等在血管新生中所必要的基因的表达。另一方面, VEGF诱导产生的Ets-1可调节VEGFR-1(Flt-1)的表达, 从而促进VEGF与内皮细胞的结合^[28]。我们发现, VEGF与Ets-1的表达呈明显正相关, 支持VEGF诱导Ets-1基因表达的观点, 从而提出VEGF和Ets-1可能在血管发生中起协同作用。

Hahne *et al*^[29]报道VEGF可诱导内皮细胞表达Ets-1基因, 而后者上调MMP-1, -3, -9和uPA等蛋白水解酶类的表达, 促使基底膜分解, 参与血管形成过程。在这个通路中, Ets-1处于中间环节, 如果阻断Ets-1的表达则有可能达到阻断肿瘤血管生成的目的^[30]。Kitange *et al*^[31]报道, 用Ets-1的反义寡核苷酸处理神经胶质瘤细胞后, 可抑制细胞的迁移和侵入, 同时伴有Ets-1和uPA表达的下调。应用Ets-1的反义寡核苷酸可有效抑制人内皮

细胞和血管平滑肌细胞中VEGF, HGF和c-met的表达^[32]。提示Ets-1反义寡核苷酸有望成为一个有效的抗肿瘤药物。

总之, 本实验证实Ets-1在大肠癌中高表达, 与临床分期、浸润深度、转移密切相关, 在大肠癌血管发生和侵袭转移中都起了重要作用。Ets-1和MMP-1, VEGF均参与肿瘤浸润和淋巴转移过程, 检测三者的表达可做为判定大肠癌恶性生物学行为的参考指标, 为大肠癌的早期发现和判断预后提供理论依据。

4 参考文献

- Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS* 2004; 112: 402-412
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1011-1027
- Hahne JC, Okuducu AF, Kaminski A, Florin A, Soncin F, Wernert N. Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth. *Oncogene* 2005; 24: 5384-5388
- Rothhammer T, Hahne JC, Florin A, Poser I, Soncin F, Wernert N, Bosserhoff AK. The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 118-128
- Tsutsumi S, Kuwano H, Nagashima N, Shimura T, Mochiki E, Asao T. Ets-1 expression in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 654-656
- Alipov G, Nakayama T, Ito M, Kawai K, Naito S, Nakashima M, Niino D, Sekine I. Overexpression of Ets-1 proto-oncogene in latent and clinical prostatic carcinomas. *Histopathology* 2005; 46: 202-208
- Katayama S, Nakayama T, Ito M, Naito S, Sekine I. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human breast carcinoma: differential expression with histological grading and growth pattern. *Histol Histopathol* 2005; 20: 119-126
- Lincoln DW 2nd, Bove K. The transcription factor Ets-1 in breast cancer. *Front Biosci* 2005; 10: 506-511
- Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. The vascular network of tumours-what is it not for? *J Pathol* 2003; 201: 173-180
- Verheul HM, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol* 2004; 202: 5-13
- Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* 2005; 25: 3327-3333
- Lelievre E, Lionneton F, Soncin F, Vandenbunder B. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 391-407
- Reddy SY, Obika S, Bruice TC. Conformations and dynamics of Ets-1 ETS domain-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15475-15480
- Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 2003; 303: 11-34
- Vandenbunder B, Pardanaud L, Jaffredo T, Mirabel MA, Stehelin D. Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myc and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 1989; 107: 265-274
- Khatun S, Fujimoto J, Toyoki H, Tamaya T. Clinical implications of expression of ETS-1 in relation to angiogenesis in ovarian cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 769-773
- Nishikawa A, Iwasaki M, Akutagawa N, Manase K, Yamashita S, Endo T, Kudo R. Expression of various matrix proteases and Ets family transcriptional factors in ovarian cancer cell lines: correlation to invasive potential. *Gynecol Oncol* 2000; 79:

- 256-263
- 18 Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Zhang H, Yoshimura T, Kawazoe S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. *Hepatol Res* 2003; 27: 289-301
- 19 Torlakovic EE, Bilalovic N, Nesland JM, Torlakovic G, Florenes VA. Ets-1 transcription factor is widely expressed in benign and malignant melanocytes and its expression has no significant association with prognosis. *Mod Pathol* 2004; 17: 1400-1406
- 20 Ozaki I, Zhao G, Mizuta T, Ogawa Y, Hara T, Kajihara S, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Hepatocyte growth factor induces collagenase (matrix metalloproteinase-1) via the transcription factor Ets-1 in human hepatic stellate cell line. *J Hepatol* 2002; 36: 169-178
- 21 Nakayama T, Ito M, Ohtsuru A, Naito S, Sekine I. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2001; 14: 415-422
- 22 Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K. Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* 2003; 200: 568-576
- 23 Singh S, Barrett J, Sakata K, Tozer RG, Singh G. ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis. *Curr Drug Targets* 2002; 3: 359-367
- 24 Mukhopadhyay D, Zeng H, Bhattacharya R. Complexity in the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF)-receptors signaling. *Mol Cell Biochem* 2004; 264: 51-61
- 25 Chodorowska G, Chodorowski J, Wysokinski A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in physiological and pathological conditions. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]* 2004; 59: 8-14
- 26 Ferroni P, Spila A, Martini F, D'Alessandro R, Mariotti S, Del Monte G, Graziano P, Buonomo O, Guadagni F, Roselli M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor tumor tissue content of colorectal cancer. *Oncology* 2005; 69: 145-153
- 27 Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1996; 169: 522-531
- 28 Mukherjee T, Kumar A, Mathur M, Chattopadhyay TK, Ralhan R. Ets-1 and VEGF expression correlates with tumor angiogenesis, lymph node metastasis, and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 430-436
- 29 Hahne JC, Okuducu AF, Kaminski A, Florin A, Soncin F, Wernert N. Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth. *Oncogen* 2005; 1124: 5384-5388
- 30 Konno S, Iizuka M, Yukawa M, Sasaki K, Sato A, Horie Y, Nanjo H, Fukushima T, Watanabe S. Altered expression of angiogenic factors in the VEGF-Ets-1 cascades in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2004; 39: 931-939
- 31 Kitange G, Shibata S, Tokunaga Y, Yagi N, Yasunaga A, Kishikawa M, Naito S. Ets-1 transcription factor-mediated urokinase-type plasminogen activator expression and invasion in glioma cells stimulated by serum and basic fibroblast growth factors. *Lab Invest* 1999; 79: 407-416
- 32 Hashiya N, Jo N, Aoki M, Matsumoto K, Nakamura T, Sato Y, Ogata N, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. *In vivo* evidence of angiogenesis induced by transcription factor Ets-1: Ets-1 is located upstream of angiogenesis cascade. *Circulation* 2004; 109: 3035-3041

电编 张勇 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 •

更正与说明专栏

本刊讯 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论。在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿。投稿者凭文章的编号, 可免费注册(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>)使用中国生物医学基金论文摘要库3年。中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要。这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大计划项目基金资助, 内容丰富、数据准确, 体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向, 可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供思路。(世界胃肠病学杂志社 2005-10-10)

载脂蛋白 B 基因单核苷酸多态性与非酒精性脂肪性肝病

姚 华, 李玉华

姚华, 新疆医科大学附属中医医院党委书记 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

李玉华, 新疆医科大学研究生处 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

姚华, 男, 1959-01-06生, 山东省曹县人, 汉族, 2001年新疆医科大学劳动卫生与环境卫生学博士, 教授, 主要从事环境疾病与基因的研究。

新疆乌鲁木齐市科学技术项目, No.Y31102

通讯作者: 姚华, 830000, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学附属中医医院. yaohua01@sina.com

电话: 0991-5840541

收稿日期: 2005-08-06 接受日期: 2005-08-25

Relationship between single nucleotide polymorphism of apolipoprotein B gene and nonalcoholic fatty liver disease

Hua Yao, Yu-Hua Li

Hua Yao, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yu-Hua Li, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by the Science and Technology Foundation of Urumqi, No.Y31102

Correspondence to: Dr. Hua Yao, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. yaohua01@sina.com

Received: 2005-08-06 Accepted: 2005-08-25

Abstract

AIM: To investigate the relations of single nucleotide polymorphism (SNP) of the apolipoprotein B (ApoB) gene at *Msp* I, *Xba* I and *Eco*R I sites with the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: The SNP of ApoB gene at *Msp* I, *Xba* I and *Eco*R I sites was analyzed using polymerase chain reaction and oligonucleotide arrays in 299 patients with NAFLD and 278 healthy controls. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), ApoB and ApoA I were also detected in the blood samples from those patients and controls.

RESULTS: The frequencies of the rare allele M⁻ at *Msp* I site and X⁺ at *Xba* I sites were significantly higher in NAFLD patients than those in the controls (M⁻: 0.065 vs 0.038, *P* < 0.05; X⁺: 0.062 vs 0.031, *P* < 0.05). The rare allele at *Eco*R I site was not notably different between

the patients and controls. In the *Msp* I polymorphism, The HDL-C and LDL-C levels of patients with M⁺M⁺ genotype at *Msp* I site were markedly higher than those with M⁺M⁻ genotype (1.75±0.25 vs 1.62±0.30, *P* < 0.05; 3.00±0.62 vs 2.79±0.78, *P* < 0.05). The levels of blood lipid and apolipoprotein were not significantly different between patients with different genotypes at *Xba* I site.

CONCLUSION: The ApoB SNP at *Msp* I and *Xba* I sites is involved in the pathogenesis of NAFLD, and the variation at *Msp* I site is associated with the regulation of LDL-C and HDL-C metabolism.

Key Words: Apolipoprotein B; Single nucleotide polymorphism; Nonalcoholic fatty liver disease

Yao H, Li YH. Relationship between single nucleotide polymorphism of apolipoprotein B gene and nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2446-2449

摘要

目的: 探讨载脂蛋白(ApoB)*Msp* I, *Xba* I, *Eco*R I 位点单核苷酸多态性(SNP)与非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)发病的关系, 以及其对血清脂质代谢的影响。

方法: 应用聚合酶链反应和寡核苷酸芯片杂交技术, 对299例非酒精性脂肪性肝病患者和278例正常对照的ApoB *Msp* I, *Xba* I, *Eco*R I 位点的多态性进行分析, 同时检测其血清样本总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 载脂蛋白A I (ApoA I)和载脂蛋白B(ApoB)含量。

结果: NAFLD组*Msp* I 和*Xba* I 位点少见等位基因频率(M⁻和X⁺)分别为0.065和0.062, 高于对照组的0.038和0.031, 差别有统计学意义(*P* < 0.05); ApoB *Eco*R I 位点少见等位基因E⁺在两组间的分布无差别。ApoB *Msp* I 位点M⁺M⁺基因型者HDL-C和 LDL-C水平明显高于M⁺M⁻者(分别为1.75±0.25 vs 1.62±0.30, *P* < 0.05; 3.00±0.62 vs 2.79±0.78, *P* < 0.05), 而*Xba* I 位点不同基因型之间的血脂、载脂蛋白水平差别无统计学意义。

结论: NAFLD的发病与ApoB *Msp* I, *Xba* I 位点多态性有关联, ApoB *Msp* I, *Xba* I 位点可能为NAFLD的易感基因。

关键词: 载脂蛋白B; 单核苷酸多态性; 非酒精性脂肪性肝病

姚华, 李玉华. 载脂蛋白B基因单核苷酸多态性与非酒精性脂肪性肝病. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2446-2449

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2446.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一类肝组织学与酒精性肝病相似, 但无过量饮酒史的临床病理综合征, 以甘油三酯(TG)升高或合并总胆固醇(TC)升高为主要特征, 其具体的发病机制尚不明了. 范建高^[1]提出NAFLD是遗传-环境-代谢相关性疾病, 可见遗传因素在NAFLD的发病中具有一定的作用. ApoB为人体重要的载脂蛋白, 为乳糜微粒、极低密度脂蛋白、中密度脂蛋白、低密度脂蛋白(LDL-C)和脂蛋白(α)的构成成分, 在脂类的转运和代谢过程中起重要的作用. 大量的研究表明, ApoB基因具有丰富的多态性, 其与脂类的代谢及血脂水平关系密切, 国内外有关ApoB基因多态性与动脉粥样硬化、冠心病和心肌梗死相关性的报道较多^[2-7], 而ApoB基因多态性是否与NAFLD有关联则少见文献报道. 我们利用寡核苷酸芯片技术, 研究ApoB *Msp* I, *Xba* I, *Eco*R I 位点单核苷酸多态性与NAFLD发病的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-02/2004-07新疆维吾尔自治区中医医院门诊汉族NAFLD患者299例, 男251例, 女48例, 年龄22-69(43.7 ± 9.6)岁. 对照组278例, 为同期在新疆维吾尔自治区中医医院门诊体检的无血缘关系的健康人. 两组年龄、性别分布一致($P > 0.05$)(表1). 采用美国LOGIQ500Pro彩色超声仪进行脂肪肝的诊断, 受检者空腹, 取平卧或左侧卧位进行肝脏检查, 采用美国通用公司LOGIQ5彩色超声诊断仪, 凸阵探头, 探头频率2-5 MHz. NAFLD的诊断参照中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组的诊断标准^[8]. 生化指标采用日立7060全自动生化分析仪进行测定, 试剂由上海科华-东菱诊断用品有限公司提供, 用真空肝素抗凝管空腹肘静脉采血, 血清TG及TC的测定采用酶法; 高密度脂蛋白(HDL-C)采用聚乙二醇6 000沉淀法测定; LDL-C用聚丙烯硫酸沉淀法测定; 载脂蛋白A I (ApoA I)、载脂蛋白B(ApoB)的测定采用免疫透射比浊法. 所有生化检查质量控制体系完备, 能够保证检测结果的准确性.

ApoB *Msp* I, *Xba* I, *Eco*R I 引物由上海生工生物工程公司提供. ApoB *Msp* I, *Xba* I, *Eco*R I 基因多态性检测试剂盒和基因芯片识读仪由上海百傲科技有限公司提供.

1.2 方法 晨空腹肘静脉采血1 mL, 用EDTA- Na_2 真空抗凝管收集, 上下颠倒, 使充分混匀. 待测全血 -20°C 保存. 用泡沫箱加干冰密封运输. 抽提外周血白细胞中的DNA(抽提方法由上海百傲科技有限公司提供), 4°C 保存备用. 参考文献设计引物^[9,10], ApoB *Msp* I 的引物序列: 5'TCTCGGGAATATTTCAGGAACTATTG 3'和5'CTAAGGATCCTACAATGTCAAGGT 3'; ApoB *Xba* I 的引物序列: 5'GGAGACTATTTCAG AAGCTAA 3'和5'TCAGTCAGAAGTCCGAGAAG 3'; ApoB *Eco*R I 的引物序列: 5'CTGAGAGAAGTGTCTTCGAAG 3'和5'CACTAATGTGAAGGAAAGCTC 3'. PCR反应体系总体积为30 μL , 试剂均由上海百傲科技有限公司提供. PCR反应周期: 94°C 预变性5 min, 然后按 94°C 变性25 s, 56°C 退火25 s, 72°C 延伸25 s, 做40个循环, 最后 72°C 延伸5 min. 扩增产物 98°C 热变性5 min后迅速放入冰盒, -20°C 放置. 取出基因芯片, 做好样品编号, 进行杂交、显色(杂交显色程序由上海百傲科技有限公司提供). 最后通过基因芯片识读仪进行基因型的分析. 随机抽取样本20例, PCR扩增, 基因测序以确定其基因型, 再与基因芯片方法检测结果进行比较, 以保证结果的可靠性.

统计学处理 采用SPSS 11.0软件包进行数据处理和统计分析. 计量资料的比较采用 t 检验, 计数资料的比较采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 血脂的比较 与对照组相比, NAFLD组的体重指数(BMI), TG, TC, LDL-C和ApoB均明显增高(表1).

2.2 基因型分布 对照组ApoB *Msp* I, *Xba* I 和*Eco*R I 位点基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡定律(χ^2 分别为0.428, 0.277和2.729, $P > 0.05$), 说明取样具有群体代表性. 各位点均为野生纯合子基因型占绝大多数, 未发现 M^+M^+ 基因型. NAFLD组*Msp* I 和*Xba* I 位点少见等位基因频率(M^- 和 X^+)分别为0.065和0.062, 高于对照组的0.038和0.031, 差别有统计学意义(表2). ApoB *Eco*R I 位点少见等位基因 E^+ 在两组间的分布无差别.

表1 NAFLD组与对照组一般情况及血脂的比较

	NAFLD组 ($n = 299$)	对照组 ($n = 278$)	t
性别(男/女)	276/48	263/41	
年龄(岁)	43.66 ± 9.56	42.56 ± 9.39	1.46
BMI (kg/m^2)	26.97 ± 2.51^a	24.40 ± 2.40	13.05
TG (mmol/L)	2.58 ± 1.36^a	1.65 ± 0.91	9.91
TC (mmol/L)	5.43 ± 1.02^a	4.96 ± 0.93	6.03
HDL-C (mmol/L)	1.64 ± 0.30	1.64 ± 0.29	0.06
LDL-C (mmol/L)	2.98 ± 0.82^a	2.64 ± 0.70	5.49
ApoA I (g/L)	1.52 ± 0.26	1.49 ± 0.26	1.47
ApoB (g/L)	1.06 ± 0.24^a	0.90 ± 0.22	8.51

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

表2 NAFLD组ApoB *Msp* I, *Xba* I, *Eco*R I 位点基因型及等位基因频率(n, %)

分组	n	<i>Msp</i> I		M ⁺ 等位基 因频率	<i>Xba</i> I			X ⁺ 等位基 因频率	<i>Eco</i> R I			E ⁺ 等位基 因频率
		M ⁺ M ⁺	M ⁺ M ⁻		X ⁻ X ⁻	X ⁻ X ⁺	X ⁺ X ⁺		E ⁺ E ⁺	E ⁺ E ⁻	E ⁻ E ⁻	
NAFLD	299	260(87.0)	39(13.0)	0.065 ^a	264(88.3)	33(11.0)	2(0.7)	0.062 ^c	280(93.6)	18(6.0)	1(0.3)	0.033
对照组	278	257(92.4)	21(7.6)	0.038	261(93.9)	17(6.1)	0(0)	0.031	263(94.6)	14(5.0)	1(0.4)	0.029

$\chi^2 = 4.404$, ^a $P < 0.05$ vs 对照组; $\chi^2 = 6.327$, ^c $P < 0.05$ vs 对照组.

2.3 不同基因型的血脂水平 ApoB *Msp* I 位点M⁺M⁻基因型者HDL-C和LDL-C水平明显高于M⁺M⁺者. *Xba* I 位点不同基因型之间的血脂、载脂蛋白水平差别无统计学意义(表3).

表3 ApoB *Msp* I 和*Xba* I 位点不同基因型血脂水平的比较(mean ± SD)

指标	ApoB <i>Msp</i> I		ApoB <i>Xba</i> I	
	M ⁺ M ⁻ (n = 60)	M ⁺ M ⁺ (n = 517)	X ⁻ X ⁻ /X ⁻ X ⁺ (n = 52)	X ⁻ X ⁻ (n = 525)
性别(男/女)	50/10	459/58	46/6	466/59
年龄(岁)	43.56 ± 10.17	43.04 ± 9.81	42.05 ± 9.49	43.16 ± 9.91
BMI (kg/m ²)	25.61 ± 2.89	25.79 ± 2.71	25.92 ± 2.53	25.73 ± 2.78
TG (mmol/L)	2.17 ± 1.25	2.29 ± 1.62	2.16 ± 1.28	2.31 ± 1.66
TC (mmol/L)	5.24 ± 0.84	5.19 ± 0.98	5.04 ± 0.92	5.21 ± 1.01
HDL-C (mmol/L)	1.75 ± 0.25 ^a	1.62 ± 0.30	1.63 ± 0.30	1.64 ± 0.30
LDL-C (mmol/L)	3.00 ± 0.62 ^a	2.79 ± 0.78	2.82 ± 0.92	2.81 ± 0.76
ApoA I (g/L)	1.54 ± 0.26	1.49 ± 0.26	1.46 ± 0.20	1.50 ± 0.26
ApoB (g/L)	1.01 ± 0.22	0.98 ± 0.24	0.95 ± 0.20	0.99 ± 0.24

^a $P < 0.05$ vs M⁺M⁺基因型.

随机抽取20例样本作基因测序, 测序结果与基因芯片检测结果完全吻合. 证明采用寡核苷酸芯片的检测结果真实可信.

3 讨论

SNP是指基因组DNA上特定的核苷酸位置上存在2种不同碱基, 是由单个核苷酸变异而导致的DNA序列多态性, 是人类第三代遗传标记^[11], 对解释个体的表型差异、不同群体和个体对疾病, 特别是对复杂疾病的易感性以及对各种药物的耐受性和对环境因子的反应具有重要的价值. 是目前人类基因组计划的内容和目标之一^[12,13]. ApoB基因位于人类第2号染色体短臂的23-24区, 全长34 kb, 含有28个内含子与29个外显子, 其基因结构具有丰富的多态性, ApoB *Msp* I、*Xba* I、*Eco*R I 位点的DNA片段分别位于26和29外显子, 接近于与LDL受体结合区. 本资料显示NAFLD组与对照组相比, BMI, TG, TC, LDL-C和ApoB均显著升高, 可见NAFLD患者存在严重的脂质代谢紊乱, 进一步研究发现ApoB *Msp* I 位点M⁺M⁻少见等位基因在NAFLD组的分布显著高于对照组, 说明ApoB *Msp* I 位点多态性与NAFLD的发病有关联. ApoB *Msp* I 位点多态性是由于发生了G→A的碱基置换, 使3 611GGG→GAG, 从而引起*Msp* I 酶切位点的消失, 并

使原先编码的精氨酸(Arg)为谷氨酸所取^[14]. ApoB *Msp* I 位点M⁺少见等位基因的分布具有种族差异, 欧洲人M⁺的频率波动在0.07-0.12之间, 本研究M⁺的频率为0.038, 与徐琼 *et al*^[15]报道的0.02接近. 分析ApoB *Msp* I 不同基因型对血脂水平的影响时, 我们发现M⁺M⁻基因型与HDL-C和LDL-C水平的增高有关, 与以往的研究结论^[16,17]不一致, ApoB-100是介导LDL-C与相应受体结合必不可少的配体, ApoB *Msp* I 多态性可能通过影响ApoB蛋白的三级结构, 减弱LDL-C与其受体的结合, 影响LDL-C的分解代谢率, 导致体内LDL-C水平的升高. HDL-C由肝脏合成, 主要参与胆固醇的逆向转运, 大量研究证实HDL-C是心脑血管疾病的保护因子, 而HDL-C水平与NAFLD的相关性尚无文献报道, 又由于ApoB并非HDL-C的载脂蛋白, 因此, ApoB *Msp* I 多态性、HDL-C及NAFLD三者之间的具体关系有待于进一步的研究. ApoB基因2 488位密码子第三个碱基G→T的突变, 产生一个*Xba* I 内切酶识别位点, 即X⁺等位基因, 该突变不引起氨基酸序列的变化. 本研究中汉族健康人中X⁺等位基因频率为0.031, 与王绿娅 *et al*^[18]报道的0.026接近, 显著低于文献报道的白种人(0.42-0.48)^[19-21], 说明等位基因频率分布在不同人种中差异较大. 我们通过病例对照研究发现ApoB *Xba* I 酶切位点等位基因频率在NAFLD组与对照组间的分布差别有统计学意义, 提示ApoB *Xba* I 酶切位点在脂肪肝的发生中起一定的遗传作用, 少见等位基因X⁺可能参与了NAFLD的发病. 近年许多研究表明ApoB *Xba* I 位点多态性与血清脂质水平密切相关, Renges *et al*^[22]发现X⁺等位基因与较低水平的HDL-C有关. Han *et al*^[23]报道X⁺等位基因与TC、LDL-C、ApoB的升高相关. 在中国人群中, 叶平 *et al*^[24]发现*Xba* I 与HDL-C下降有关. 然而本研究中ApoB *Xba* I 位点多态性对血脂和载脂蛋白水平无明显影响, 可能是X⁺等位基因在中国人中很低, 较难充分观察环境因素、生活方式与它相互作用的影响, 研究X⁺等位基因对血脂水平的独立作用难以获得显著的阳性结果, 由必要进一步加大受试者的数量, 进行系统的血脂水平分期测定, 以求减少等位基因分布不平衡和血脂测定的随机误差造成的影响. ApoB *Eco*R I 酶切位点位于ApoB基因第29外显子, 由于4 154位密码子的第1个碱基G→A的突变, 使原有的*Eco*R I 酶切

位点消失,产生E⁺等位基因,在人群中以E⁺等位基因占绝大多数^[25].关于E⁺等位基因对血浆脂质和载脂蛋白水平是否有影响,研究结论不一致^[26,27].本研究中ApoB^{EcoR}I少见E⁺等位基因在NAFLD组与对照组的分布无差别,可能其并非NAFLD的易感基因.NAFLD由多种病因引起,遗传机制复杂,参与的基因很多,其中每一个基因只是众多微效基因中的一个,研究某一个基因多态性与NAFLD的关系时,往往会因为样本量不足、样本的选择、基因突变频率过低以及环境因素等原因掩盖它们之间真正的联系,因此有必要进行相关基因的联合分析.

4 参考文献

- 范建高. 重视非酒精性脂肪性肝病发病机制的研究. 国外医学·消化系疾病分册 2003; 23: 323-326
- Buraczynska M, Dzida G, Puzniak A, Sobstyl J, Hanzlik J. Restriction fragment length polymorphisms in the apolipoprotein B gene in survivors of myocardial infarction. *Med Sci Monit* 2000; 6: 882-886
- Chiodini BD, Barlera S, Franzosi MG, Beceiro VL, Intronati M, Tognoni G. APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. *Atherosclerosis* 2003; 167: 355-366
- Puri RD, Tewari S, Sinha N, Ramesh V, Khan F, Singh VP, Agrawal S. Polymorphisms in the apolipoprotein B-100 gene: association with plasma lipid concentration and coronary artery disease. *Indian Heart J* 2003; 55: 60-64
- 叶平, 王士雯, 陈保生. 载脂蛋白B基因多态性与冠心病关系的研究. 中华心血管病杂志 1994; 22: 119-121
- 臧彬, 李海宁, 郭津津, 吴可光. 载脂蛋白B基因多态性与心肌梗死的关系. 中国实用内科杂志 2001; 21: 723-724
- 鄢盛恺, 李秀玲, 薛红, 宋耀虹, 杨树德, 陈保生. 汉族人载脂蛋白B基因EcoR I Msp I多态性与冠心病的关系研究. 中华检验医学杂志 2003; 26: 148-152
- 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. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 71
- Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 587-591
- Boerwinkle E, Lee SS, Butler R, Schumaker VN, Chan L. Rapid typing of apolipoprotein B DNA polymorphisms by DNA amplification. Association between Ag epitopes of human apolipoprotein B-100, a signal peptide insertion/deletion polymorphism, and a 3'flanking DNA variable number of tandem repeats polymorphism of the apolipoprotein B gene. *Atherosclerosis* 1990; 81: 225-232
- 张思仲. 人类基因组的单核苷酸多态性及其医学应用. 中华医学遗传学杂志 1999; 16: 119-122
- Tusie Luna MT. The human genetic variability map, single nucleotide polymorphisms (SNP's) and some of their applications to medicine. *Rev Invest Clin* 2001; 53: 308-310
- Zhao LP, Aragaki C, Hsu L, Quiaioit F. Mapping of complex traits by single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 225-240
- Saha N, Tong MC, Tay JS, Jeyaseelan K, Humphries SE. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in Chinese coronary artery disease patients. *Clin Genet* 1992; 42: 164-170
- 徐琼, 周新. 载脂蛋白B基因Msp I多态性分析及其临床应用. 临床检验杂志 1998; 16: 199-202
- Wick U, Witt E, Engel W. Restriction fragment length polymorphisms at the apoprotein genes AI, CIII and B-100 and in the 5' flanking region of the insulin gene as possible markers of coronary heart disease. *Clin Genet* 1995; 47: 184-190
- 赵若智, 刘锡民, 蔡转, 阮旭中, 杨明山, 沈斌章, 刘春杰. 动脉粥样硬化性脑梗塞患者载脂蛋白B基因的Msp I限制性片段长度多态性研究. 中华医学遗传学杂志 1997; 14: 227-230
- 王绿娅, 顾云, 吴桂贤, 王薇, 刘军, 潘晓冬, 吴兆苏. 载脂蛋白B基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的关系. 中华医学杂志 1999; 79: 603-606
- Turner PR, Talmud PJ, Visvikis S, Ehnholm C, Tiret L. DNA polymorphisms of the apoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with perceived risk of cardiovascular disease: European Atherosclerosis Research Study. *Atherosclerosis* 1995; 116: 221-234
- Vilella E, Balanya J, Masana L, Marsal S, La Ville AE, Turner PR. Low density lipoprotein ligand-receptor interactions in normal healthy individuals characterized by their Xba I apolipoprotein B DNA polymorphism. *Atherosclerosis* 1992; 93: 145-153
- Aalto-Setälä K, Tikkanen MJ, Taskinen MR, Nieminen M, Ho-Imberg P, Kontula K. Xba I and c/g polymorphisms of the apolipoprotein B gene locus are associated with serum cholesterol and LDL-cholesterol levels in Finland. *Atherosclerosis* 1988; 74: 47-54
- Renges HH, Wile DB, McKeigue PM, Marmot MG, Humphries SE. Apolipoprotein B gene polymorphisms are associated with lipid levels in men of South Asian descent. *Atherosclerosis* 1991; 91: 267-275
- Han T, Jiang Z, Suo G, Zhang S. Apolipoprotein B-100 gene Xba I polymorphism and cholesterol gallstone disease. *Clin Genet* 2000; 57: 304-308
- 叶平, 陈保生, 王士雯. 应用聚合酶链反应研究载脂蛋白B基因多态性及其临床意义. 中华医学检验杂志 1994; 17: 7-11
- Choong ML, Sethi SK, Koay ES. Effects of intragenic variability at 3 polymorphic sites of the apolipoprotein B gene on serum lipids and lipoproteins in a multiethnic Asian population. *Hum Biol* 1999; 71: 381-397
- Chatterjee R, Haines GA, Perera DM, Goldstone A, Morris ID. Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Hum Reprod* 2000; 15: 762-766
- Moller P, Wallin H, Dybdahl M, Frentz G, Nexø BA. Psoriasis patients with basal cell carcinoma have more repair-mediated DNA strand-breaks after UVC damage in lymphocytes than psoriasis patients without basal cell carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 151: 187-192

电编 张敏 编辑 张海宁

原发性胆汁性肝硬化与自身免疫性胆管炎的临床特征和 HLA-DRB1 等位基因分析

陈嵩, 朱刚剑, 邓国宏, 朱妍

陈嵩, 邓国宏, 朱妍, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

朱刚剑, 荆州市第二人民医院感染科 湖北省荆州市 434000

陈嵩, 男, 1963-09-22生, 贵阳市人, 汉族, 博士, 现为第三军医大学西南医院全军感染病研究所主任医师、副教授, 主要从事慢性肝炎的基础与临床研究。

通讯作者: 陈嵩, 400038, 重庆市, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所. cs196@medmail.com.cn

电话: 023-68754475

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Clinical pathology and HLA-DRB1 allele associations of primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis in Han Chinese

Song Chen, Gang-Jian Zhu, Guo-Hong Deng, Yan Zhu

Song Chen, Guo-Hong Deng, Yan Zhu, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Gang-Jian Zhu, Institute of Infectious Diseases, the Second Hospital of Jingzhou City, Jingzhou 434000, Hubei Province, China

Correspondence to: Song Chen, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. cs196@medmail.com.cn

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

Abstract

AIM: To analyze the clinical and pathological characteristics of both primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune cholangitis (AIC), and to explore their associations with HLA-DRB1 alleles in Han Chinese.

METHODS: Of 94 patients diagnosed with PBC, 12 cases of AIC and 9 cases of overlap syndrome of PBC and autoimmune hepatitis (AIH) were identified. The clinical manifestations and pathological changes exhibited in the liver biopsies from AIC, pure PBC and overlap syndrome were comparatively analyzed. The frequencies of HLA-DRB1 alleles were determined in AIC and PBC patients and healthy controls by polymerase chain reaction with sequence specific primers.

RESULTS: The age, sex, clinical manifestations, bio-chemical markers and histological findings were not significantly different between the AIC and pure PBC patients. However, the score for AIH and the

positive rate of serum antinuclear antibody and/or smooth muscle antibody were higher in patients (8.8 ± 0.9 vs 4.6 ± 0.8 , $t = 17.45$, $P < 0.01$; 84.6% vs 22.2% , $\chi^2 = 17.0039$, $P < 0.01$). The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST) and immunoglobulin G in AIC patients were markedly lower than those in the overlap syndrome patients ($t = 3.44$, $P < 0.01$; $t = 2.83$, $P < 0.01$; $t = 2.18$, $P < 0.05$). Higher allele frequency of HLA-DRB1*08 was found in pure PBC patients, versus controls (9.7% vs 3.3% , $RR = 4.42$, $P < 0.05$), and the allele frequency of HLA-DRB1*08 tended to increase in pure PBC patients.

CONCLUSION: Except the pretreatment score for AIH and the types of immunoserological marker, there were no differences between AIC and pure PBC. AIC may only be a variant pattern of PBC, rather than a separate disease.

Key Words: Liver cirrhosis; Biliary; Hepatitis; Autoimmune; Cholangitis; Overlap syndrome

Chen S, Zhu GJ, Deng GH, Zhu Y. Clinical pathology and HLA-DRB1 allele associations of primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis in Han Chinese. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2450-2454

摘要

目的: 分析原发性胆汁性肝硬化(PBC)和自身免疫性胆管炎(AIC)患者的临床表现、肝组织病理学特征及其与HLA-DRB1等位基因的相关性。

方法: 回顾性分析PBC患者94例, 筛选出13例AIC、9例PBC和自身免疫性肝炎(AIH)重叠综合征(PBC/AIH重叠综合征), 分析AIC、PBC/AIH重叠综合征和单纯PBC患者的临床表现和肝组织病理学特征, 采用序列特异性多聚酶链反应(PCR-SSP)进行HLA-DRB1等位基因分析。

结果: AIC和单纯PBC比较, 在年龄、性别、血生化及肝组织病理学上不能区分二者, 但是AIC患者治疗前AIH计分(8.8 ± 0.9 vs 4.6 ± 0.8 , $t = 17.45$, $P < 0.01$)、ANA和/或SMA阳性率(84.6% vs 22.2% , $\chi^2 = 17.0039$, $P < 0.01$)明显高于单纯PBC。AIC患者血清

ALT、AST、IgG明显低于PBC/AIH重叠综合征患者。PBC患者的HLA-DRB1*08基因频率比健康对照组的显著增高(9.7% vs 3.3%, $RR = 4.42$, $P < 0.05$), 而比AIC患者有增高的趋势。

结论: AIC可能仅是PBC的一种变异形式, 中国汉族PBC的发病与HLA-DR8相关。

关键词: 肝硬化; 胆汁性; 肝炎; 自身免疫性; 胆管炎; 重叠综合征

陈嵩, 朱刚剑, 邓国宏, 朱妍. 原发性胆汁性肝硬化与自身免疫性胆管炎的临床特征和HLA-DRB1等位基因分析. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2450-2454

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2450.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种慢性肝内胆汁淤积性疾病, 在病理学本质上表现为进行性非化脓性胆管炎, 血清抗线粒体抗体(anti-mitochondrial antibody, AMA)是其标志性抗体^[1-3]。在北欧和北美白种人群中, 很多研究显示血清学鉴定的HLA-DR8抗原是PBC易感性的主要决定簇, 相应的易感等位基因是HLA-DPB1*0301和HLA-DQB1*0402^[4,5]。来自丹麦的PBC患者具有不同于德国和北美的易感等位基因, 但主要集中于HLA-DQA1*10501 DQB1*10201^[6]。约5-8%的PBC患者检测AMA阴性, 而常伴有抗核抗体(anti-nuclear antibody, ANA)和/或抗平滑肌抗体(anti-smooth muscle antibody, SMA)阳性。其在临床表现、血生化和肝脏组织病理学上很难与AMA阳性PBC相区别, 被称为自身免疫性胆管炎(autoimmune cholangitis, AIC)^[7-10]。欧美的AMA阴性PBC患者没有显示易感的HLA-DRB1和HLA-DQB1等位基因^[11]。我们对94例临床诊断为PBC的患者进行回顾性研究, 发现AIC 13例、PBC和自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)重叠综合征(PBC/AIH重叠综合征)9例, 对AIC、PBC/AIH重叠综合征及单纯PBC患者的临床表现和肝组织病理学特征进行比较, 并采用序列特异性PCR扩增法(PCR-SSP)对AMA阳性和AMA阴性PBC患者的HLA-DRB1等位基因进行分析, 以探讨中国汉族PBC与AIC的临床表现、肝组织病理学及遗传背景差异。

1 材料和方法

1.1 材料 西南医院和荆州市第二人民医院1993-01/2005-01确诊PBC的住院患者94例, 平均年龄 51.9 ± 7.2 岁, 病程 3.4 ± 2.2 a, 诊断均符合美国肝病学会2000年发表的诊断指南^[12]。AIC的诊断标准引自Czaja *et al*^[13]提出

的标准: (1)ANA和/或SMA阳性和/或高丙种球蛋白血症; (2)具有胆汁淤积和肝细胞损伤的生物化学和(或)组织学特点; (3)免疫荧光法检测AMA阴性; (4)除外慢性病毒感染、代谢性或中毒性肝病。同时, 参照1998年国际自身免疫性肝炎小组修订的描述性诊断标准和计分系统^[14], 对AMA阳性的PBC患者临床治疗前进行评分, 从中筛选具有AIH特征的PBC患者, 临床诊断PBC/AIH重叠综合征。药物治疗后症状消失、血清胆红素恢复正常、 $ALT \leq$ 正常值的2倍、 $ALP \leq$ 治疗前水平的50%为有效, 否则为无效。DL1300-1601-3G(肝抗原谱)试剂盒购自欧蒙公司, 试剂号分别FA1300-1005-2(肝脏马赛克2, ANA、SMA、AMA、抗-LKM1)和FA1201-1005-1(粒细胞马赛克1)。肝脏马赛克2选择HEP-2细胞和5种组织(猴肝脏和心肌组织, 大鼠肝、肾和胃组织)的冰冻切片作为抗原。

1.2 方法 间接免疫荧光法检测血清中ANA、SMA、AMA、抗-LKM1、ANCA, 采用生物薄片马赛克技术(biochipmosa)将带有细胞和组织的6种切片组合成一个反应区。4℃保存备用。待检血清1:100起稀释, 与组织细胞孵育30 min; 加入硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗体结合30 min; 洗片、封片后荧光显微镜观察结果。组织或细胞内出现特异性绿色荧光、血清稀释度 $>1:100$ 为阳性。粒细胞马赛克1操作过程与上述基本相同, 血清稀释度1:10为阳性检测。免疫印迹法检测AMA-M2, 抗-LKM1, 抗-LC1, 抗-SLA/LP:将包被有AMA-M2, LKM1, LC1, SLA/LP抗原的包被膜条置于样品缓冲液中于摇床上预处理5 min, 弃液体; 将待检血清1:101稀释, 与膜在水平振荡条件下温育30 min; 充分洗膜后加入酶标记抗人IgG孵育30 min; 充分洗膜后以NBT/BCIP显色、去离子水终止反应。用欧蒙公司提供的标准条带图比较, 判定结果。PCR-SSP法进行HLA-DRB1分型: 每个PCR反应体系中包括2-4等位基因或组特异性引物, 内参照引物的浓度为1/5。PCR混合液(13 μ L)由基因组DNA(100 ng)、PCR缓冲液(50 mmol/L KCl+1.5 mmol/L $MgCl_2$ +10 mmol/L Tris-Cl, pH 8.3, 10 mg/L明胶)、200 μ mol/L的dNTP, 1 μ mol/L DRB1等位基因引物、0.2 μ mol/L AmpliTaq酶(以1 \times PCR缓冲液1:10稀释, 加拿大生物工程公司上海分公司)。PCR扩增在GeneAmp PCR System 9600(Perkin-Elmer Cetus Instruments)中进行。DNA被扩增30个循环。每一循环由94℃ 20 s、65℃ 50 s和72℃ 20 s组成。PCR产物的存在与否由琼脂糖凝胶电泳鉴定。加载样液(300 mL/L甘油, 加溴酚蓝和二甲苯青染色)2.5 μ L后, PCR反应混合物加至以溴乙锭染色(0.5 mg/L)的10 g/L琼脂糖凝胶中的加样孔中, 以

7-8 V/cm的电压电泳25-30 min. 在紫外线下显色, 并摄影记录. ELISA方法检测全部血清的病毒性肝炎指标(抗-HAV IgM, HBsAg, 抗-HBs, HBeAg, 抗-HBe, 抗-HBc, 抗-HCV IgM和IgG, 抗-HEV IgM和IgG等). B超引导下肝活检术, 活检标本分别用40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 切片做HE染色, 光镜检查. 根据Ishak *et al*^[15]提出的标准进行肝组织炎症分级计和纤维化分期计, 并结合临床根据AIH计分系统进行肝脏组织病理学及治疗前AIH计分.

统计学处理 采用SPSS 10.0软件包进行统计学处理, 计量资料用方差分析, 计数资料用卡方检验. HLA-DRB1各基因亚型采用直接计数法. HLA-DRB1基因频率 = 阳性基因数/样本数×2. 各组间HLA-DRB1基因频率的比较采用 χ^2 检验或Yate校正法. 相对危险度(RR)按Woolf公式计算.

表1 AIC、PBC/AIH重叠综合征和单纯PBC患者的实验室检查比较 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	GGT (nkat/L)	ALP (nkat/L)	IgG (g/L)	IgM (g/L)
PBC/AIH	9	3 829.1 ± 1 878.7 ^b	3 434.0 ± 1 440.3 ^b	8 853.4 ± 2 447.2	8 031.6 ± 3 042.3	22.3 ± 3.7 ^b	5.3 ± 1.0
AIC	13	1 808.7 ± 695.1	1 825.4 ± 996.9	8 466.7 ± 2 945.6	8 665.1 ± 2 680.5	17.8 ± 3.1	4.7 ± 1.0
单纯PBC	72	1 892.0 ± 831.8	1 942.1 ± 873.5	8 890.1 ± 4 275.9	9 176.8 ± 3 902.4	17.5 ± 2.5	4.8 ± 1.3

^b*P* < 0.01 vs 单纯PBC和AIC.

叠综合征为11.2 ± 0.6, AIC患者高于单纯PBC患者(*t* = 17.45, *P* < 0.01), 低于PBC/AIH重叠综合征患者(*t* = 6.93, *P* < 0.01), 差异有统计学意义. AIC患者有2例治疗前AIH计分 ≥ 10分, AMA阳性的PBC患者有9例, 两者间无显著差异(χ^2 = 0.026 8, *P* > 0.05).

2.1 肝组织病理学 AIC患者在肝组织炎症分级计、肝组织AIH计分等指标方面, 均明显低于PBC/AIH重叠综合征患者; AIC和单纯PBC比较, 在肝组织炎症分级计、纤维化分期计及肝组织AIH计分的差异无统计学意义(表2).

表2 AIC、PBC/AIH重叠综合征和单纯PBC患者病理分级分期及AIH计分比较 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	炎症分级	纤维化分期	肝脏组织学AIH计分
PBC/AIH	9	6.3 ± 1.4 ^b	3.1 ± 0.8 ^b	0.6 ± 0.7 ^b
AIC	13	3.2 ± 1.3 ^d	2.3 ± 0.9 ^c	-0.8 ± 0.9 ^d
单纯PBC	72	3.0 ± 1.6	2.2 ± 0.9	-1.1 ± 0.9

^b*P* < 0.01 vs 单纯PBC; ^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.01 vs PBC/AIH重叠综合征.

2.2 HLA-DRB1分型 以PCR-SSP进行的HLA-DRB1分型表明, DRB1*08(编码HLA-DR8抗原)的基因频率在PBC患者组(9.7%)较健康对照组(3.3%)显著增高(*P* < 0.05, *RR* = 4.42), 未见其他等位基因与PBC有显著相关性; PBC患者中的DRB1*08较AIC患者中有增加的趋势(表3).

2 结果

在PBC患者94例中, 血清AMA阴性13例, 均符合AIC诊断标准, 男1例, 女12例, 平均年龄51.9 ± 7.2岁; PBC/AIH重叠综合征患者9例, 平均年龄48.1 ± 6.1岁, 男1例, 女8例. 与单纯PBC患者比较, AIC患者年龄、性别、病程、临床症状、伴发其它自身免疫性疾病比例的差异均无统计学意义. AIC与PBC/AIH重叠综合征患者血清ALT、AST、IgG比较, 差异均有统计学意义(*t*值分别为3.44, 2.83, 2.18; *P*值分别为<0.01, <0.01, <0.05). AIC患者和单纯PBC患者在GGT, ALP, ALT, AST, IgG, IgM等方面差异无统计学意义. AIC患者血清ANA和/或SMA阳性11例(84.6%), 单纯PBC患者11例(22.2%), 两者间有显著差异(χ^2 = 17.003 9, *P* < 0.01, 表1). 治疗前AIH计分AIC患者为8.8 ± 0.9, 单纯PBC患者4.6 ± 0.8, PBC/AIH重

表3 单纯PBC、AIC和正常人群HLA-DRB1等位基因的分布

分组	被检染色体数	HLA-DRB1等位基因的阳性数															
		01	03	04	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16			
PBC	174	17	21	36	30	22 ^a	1	2	10	1	13	3	12	2			
AIC	26	3	3	4	4	0	1	0	1	1	2	0	3	1			
正常对照	120	12	13	22	16	4	1	2	9	2	11	3	15	2			

^a*P* = 0.03, χ^2 = 4.42 vs 正常对照.

2.3 随访及治疗反应 AIC患者中11例采用熊去氧胆酸治疗, 250 mg, 3次/d, 1 a后有效7例(63.7%); 单纯PBC患者72例中, 13例失访, 其余59例患者均采用熊去氧胆酸治疗, 250 mg, 3次/d, 1 a后有效45例(76.3%), 两组间治疗效果无明显差异(χ^2 = 0.254 6, *P* > 0.05). 随访过程中, AIC患者有1例由ANA阳性在随访10 mo转变为AMA及ANA阳性. 单纯PBC患者有3例在随访第3, 12, 23 mo AMA转阴, 其中2例仍可查出ANA和/或SMA.

3 讨论

我们从94例PBC患者中筛选出AIC13例(13.8%)、PBC/AIH重叠综合征9例(9.6%), 未发现PBC与PSC的重叠病例. PBC患者的AMA阳性率为86.2%, 低于文献报道. AIC是PBC或AIH的亚型, 还是两者的重叠或独立的疾病众说纷纭^[16-19]. Lacerda *et al*^[20]从597例临床和病理诊断为PBC的患者中分出35

例AMA阴性患者和AMA阳性患者两组比较, 无论从临床、生化或病理上都不能区分二者, 故认为AIC是PBC的一个亚型。Czaja *et al*^[21]对162例临床诊断为I型自身免疫性肝炎的患者采用AIH计分标准, 发现11例符合AIC的临床和病理特点, 说明AIC可同时具有PBC和AIH的临床特征, 表现为二者的重叠。我们从年龄、性别、血生化及肝组织病理学特征上不能区分AIC和单纯PBC, 但AIC患者治疗前AIH计分、ANA和/或SMA阳性率明显高于单纯PBC; 对AIC与PBC/AIH重叠综合征进行比较, AIC血清ALT、AST、IgG水平明显低于PBC/AIH重叠综合征。这提示AIC可能是PBC/AIH重叠综合征的边缘阶段。AMA阳性与AMA阴性的PBC患者胆管上皮表达丙酮酸盐脱氢酶复合物(M2抗原)的相似性支持AIC与PBC的相互关系^[13,20-22]。从治疗方法上看, 采用UDCA治疗大部分AIC病例有效, 与皮质类固醇治疗AIH不同^[23]。这些特点说明自身免疫性胆管炎比AIH更近似于PBC。

人类白细胞抗原(HLA)是研究得最多的人类免疫遗传学系统, 在自我识别、免疫调节和对异体移植物的排斥反应等过程中发挥重要作用^[24-26]。现已发现70多种疾病与HLA的多态性有关, 其中大多数自身免疫性疾病与II型HLA基因相关^[27]。采用PCR-SSP法对HLA-DRB1进行分析, 我们发现DRB1*08(编码DR8)基因频率在PBC患者为9.7%, 而在健康对照组为3.3%, 有显著性差异($P<0.05$, $RR = 4.42$), 提示DR8相应的等位基因是中国汉族PBC的危险因素。这与来自白种人群的研究结果较为相似。在中国汉族人群中, 仍有约85%PBC患者与HLA-DR8相应的等位基因无关联。在白种人群中, PBC关联的HLA-DRB1*0801、HLA-DQB1*0402单倍型存在连锁不平衡^[28,29]。这提示推测的PBC易感等位基因可能仅是II型MHC区域中的一种, 而不是HLA分子本身。采用短串联重复方法将有助确定PBC关联基因的精确位置。HLA基因和/或其他关联基因在PBC发病过程中可能单独或者与其他遗传性状及环境因素协同发挥作用。我们发现, 13例AIC患者缺乏AMA阳性PBC患者相关的HLA-DRB1*08等位基因。这可能反映所选用的AIC病例数太少; 也可能从遗传背景看, AIC是一种独立的自身免疫性疾病。然而, 除了治疗前AIH计分及自身抗体的类型不同外, AIC和单纯PBC在临床表现、肝组织病理和治疗特征上的差异无统计学意义。因此, 我们认为AIC可能是AMA阳性PBC的一种变异形式, 而非另一种不同的疾病。至于相关的HLA-DR8可能只是PBC的一种表现形式, 而非其发病的遗传易感因素。

4 参考文献

- Joshi S, Cauch-Dudek K, Heathcote EJ, Lindor K, Jorgensen R, Klein R. Antimitochondrial antibody profiles: are they valid prognostic indicators in primary biliary cirrhosis? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 999-1002
- 朱刚剑, 陈嵩, 毛青, 王宇明. 原发性胆汁性肝硬化和自身免疫性肝炎重叠综合征的临床与病理分析. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 6-8
- Feld JJ, Heathcote EJ. Epidemiology of autoimmune liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1118-1128
- Underhill J, Donaldson P, Bray G, Doherty D, Portmann B, Williams R. Susceptibility to primary biliary cirrhosis is associated with the HLA-DR8-DQB1*0402 haplotype. *Hepatology* 1992; 16: 1404-1408
- Mella JG, Roschmann E, Maier KP, Volk BA. Association of primary biliary cirrhosis with the allele HLA-DPB1*0301 in a German population. *Hepatology* 1995; 21: 398-402
- Underhill JA, Donaldson PT, Doherty DG, Manabe K, Williams R. HLA DPB polymorphism in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21: 959-962
- Heathcote EJ. Autoimmune cholangitis. *Clin Liver Dis* 1998; 2: 303-311
- 潘丽恩, 马骥良, 李浩虹. 自身免疫性胆管炎的临床分析. *中华风湿病学杂志* 2003; 7: 291-294
- 马安林, 王泰龄. 自身免疫性胆管炎. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 703-704
- 陈嵩, 王宇明. 自身免疫重叠综合征. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1875-1878
- Stone J, Wade JA, Cauch-Dudek K, Ng C, Lindor KD, Heathcote EJ. Human leukocyte antigen Class II associations in serum antimitochondrial antibodies (AMA)-positive and AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2002; 36: 8-13
- Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000; 31: 1005-1013
- Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Autoimmune cholangitis within the spectrum of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2000; 31: 1231-1238
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938
- Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699
- Kadokawa Y, Omagari K, Ohba K, Masuda J, Hazama H, Kinoshita H, Ohnita K, Mizuta Y, Tanioka H, Imanishi T, Kohno S. Does the diagnosis of primary biliary cirrhosis or autoimmune cholangitis depend on the 'phase' of the disease? *Liver Int* 2005; 25: 317-324
- Beuers U, Rust C. Overlap syndromes. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 311-320
- Washington K. Autoimmune cholangitis: not just AMA-negative primary biliary cirrhosis. *Adv Anat Pathol* 2002; 9: 244-250
- O'Donohue J, Wong T, Portmann B, Williams R. Immunohistochemical differences in the portal tract and acinar infiltrates between primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 1143-1150
- Lacerda MA, Ludwig J, Dickson ER, Jorgensen RA, Lindor KD. Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 247-249
- Czaja AJ, Carpenter HA. Autoimmune hepatitis with incidental histologic features of bile duct injury. *Hepatology* 2001; 34: 659-665
- Miyakawa H, Tanaka A, Kikuchi K, Matsushita M, Kitazawa E, Kawaguchi N, Fujikawa H, Gershwin ME. Detection of antimitochondrial autoantibodies in immunofluorescent AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens. *Hepatology* 2001; 34: 243-248

- 23 Tanaka A, Miyakawa H, Luketic VA, Kaplan M, Storch WB, Gershwin ME. The diagnostic value of anti-mitochondrial antibodies, especially in primary biliary cirrhosis. *Cell Mol Biol* 2002; 48: 295-299
- 24 Lie BA, Thorsby E. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 526-531
- 25 Joshi S, Cauch-Dudek K, Wanless IR, Lindor KD, Jorgensen R, Batts K, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis with additional features of autoimmune hepatitis: response to therapy with ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 2002; 35: 409-413
- 26 Ichiki Y, Aoki CA, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 315-321
- 27 Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transpl Immunol* 2005; 14: 175-182
- 28 Donaldson P, Agarwal K, Craggs A, Craig W, James O, Jones D. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. *Gut* 2001; 48: 397-402
- 29 Invernizzi P, Selmi C, Mackay IR, Podda M, Gershwin ME. From bases to basis: linking genetics to causation in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 401-410

电编 张敏 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 •

首届北京地坛感染病学术会议

本刊讯 为庆祝建院 60 周年, 北京地坛医院决定于 2006-03-02/04 在北京召开全国性的“首届北京地坛感染病学术会议”, 预计全国的同行 500 人参加这次重要的会议。会议邀请了 40 余位我国德高望重、年富力强的感染病专家作专题学术讲演。

1 会议征稿内容

这次感染病学术会议征文的内容包括病毒性肝炎、HIV/AIDS、各种传染性疾病和感染性疾病, 抗生素的合理使用, 也包括新发/复燃的传染病。论文全文和摘要请发到电子信箱: cj@genetherapy.com.cn; 或 hy@genetherapy.com.cn。

2 与会专家名单

首届北京地坛感染病学术会议邀请的专题报告专家(按照汉语拼音排序)有: 白雪帆, 陈智, 陈志海, 成军, 段钟平, 窦晓光, 范小玲, 高志良, 郭利民, 侯金林, 贾继东, 郎振为, 李长青, 李兰娟, 李太生, 李兴旺, 刘沛, 刘庄, 伦文辉, 毛羽, 缪晓辉, 穆毅, 宁琴, 牛俊奇, 任红, 施光峰, 斯崇文, 谭德明, 唐红, 唐小平, 万谟彬, 王风水, 王福生, 王贵强, 王磊, 王玲, 王宇明, 王宪波, 魏红山, 魏来, 翁心华, 谢青, 谢雯, 谢尧, 邢卉春, 徐道振, 杨东亮, 杨钧, 袁正宏, 赵红心, 庄辉。

3 联系方式

首届北京地坛感染病学术会议组织委员会主席为成军教授。地址: 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 邮编: 100011; 电话: 010-64481639; 传真: 010-64481639。Email: cj@genetherapy.com.cn

欢迎全国感染病学界的各位专家和同仁来北京参加这次盛会。

幽门螺杆菌代谢组学研究进展

曾浩, 邹全明

曾浩, 邹全明, 重庆市生物制药工程技术中心 中国人民解放军第三军医大学临床微生物学及免疫学教研室 重庆市 400038
国家863计划资助课题, No.2001AA215161
国家“九五”重点科技攻关项目, No.96-901-01-54
通讯作者: 邹全明, 400038, 重庆市沙坪坝区, 中国人民解放军第三军医大学临床微生物学及免疫学教研室. qmzou@mail.tmmu.com.cn
电话: 023-68752316 传真: 023-68752316
收稿日期: 2005-09-05 接受日期: 2005-09-30

摘要

幽门螺杆菌是引起人类慢性活动性胃炎和消化性溃疡的重要病原菌, 与胃癌和胃淋巴样组织淋巴瘤(MALT)的发生也高度相关. 随着幽门螺杆菌26 695和J99菌株基因组测序工作的完成, 人们对该菌的基因组学特点有了较清楚的认识. 在此基础上, 后基因组学研究特别是代谢组学研究正成为幽门螺杆菌研究的前沿领域. 本文根据近年来国内外的相关资料, 对幽门螺杆菌的主要代谢途径、代谢产物以及环境因素引起的代谢调控特征等代谢组学研究现状进行了综述, 同时对幽门螺杆菌的代谢组学研究面临的问题和发展趋势进行了展望.

曾浩, 邹全明. 幽门螺杆菌代谢组学研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2455-2458
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2455.asp>

0 引言

1997年和1999年相继由Tomb *et al*^[1]和Alm *et al*^[2]完成了幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)26 695菌株和J99菌株的基因组测序工作, 人们对该菌的基因组特点有了较清楚的认识. 2000年和2001年*H pylori*蛋白质组和功能蛋白质组相关数据库相继建立, 成为基因组数据库的重要补充, 已鉴定了200余种蛋白并绘制了包含1 280个蛋白质间相互作用的蛋白质图谱^[3]. 在此基础上, 利用生物芯片、2-D电泳、质谱及生物信息学等技术开展的后基因组学研究正成为*H pylori*研究的前沿领域. *H pylori*代谢组学研究作为功能基因组学研究的重要组成部分, 也成为当前*H pylori*研究的前沿和热点. 我们就这一方面的研究进展作一综述.

1 糖代谢

幽门螺杆菌发现后不久即被归类为弯曲杆菌属. 据报道, 此种属的细菌一般不能代谢碳水化合物. 但大量的研究资料显示^[4-7]: 尽管*H pylori*是一种专性的微需氧菌, 但是它既可以进行糖的有氧氧化, 又可以进行无氧酵解. 然而, 葡萄糖是碳水化合物的唯一来源, 同时也是底物水平磷

酸化的主要来源. 幽门螺杆菌的全基因组分析为这些发现提供了依据.

糖在细胞内的重要性是由透性酶介导的. *H pylori* DNA既不编码磷酸转移酶又不编码葡萄糖激酶. 因此, *H pylori*只能代谢有限的碳水化合物和适应于特别的感染位置. 有三条代谢途径同*H pylori*的葡萄糖代谢有关: 磷酸戊糖途径、糖酵解途径和简单的Entner-Doudorff途径^[8-10]. 大肠杆菌中的Entner-Doudorff途径是可诱导的, 而在幽门螺杆菌中Entner-Doudorff途径似乎是必须的, 尽管这个途径产能较糖酵解少, 但可以代谢葡萄糖醛酸. 同该代谢途径有关酶的基因已经在*H pylori* DNA上确认.

丙酮酸是糖酵解和Entner-Doudorff途径的终产物, 在有氧和无氧条件下丙酮酸的去向已被阐明^[11,12]. 其中一个实验组研究发现在缺氧情况丙酮酸可代谢为乳酸、乙醇和醋酸, 而在有氧情况下丙酮酸的主要代谢产物为醋酸. 另一组研究发现细胞在微需氧情况下与丙酮酸孵育可产生乳酸、醋酸、甲酸、丁二酸和丙氨酸. 丁二酸的形成说明丙酮酸掺入到三羧酸循环, 丙氨酸的出现为丙酮酸在生物合成过程中起重要作用的观点提供了有力的支持. 乳酸、乙醇和醋酸的形说明发酵代谢中丙酮酸的作用. 有关研究和对*H pylori* DNA序列的分析资料均对幽门螺杆菌的微需氧特性提供了证明.

三羧酸循环有关酶和糖酵解途径有关酶的基因已被证明存在于*H pylori* DNA上. 一个有趣的发现是氧化还原酶的受体2-oxoglutarate在三羧酸循环中充当催化剂. 而且, 一些研究显示在三羧酸循环中存在着还原反应^[13]. 有意思的是, 在这些还原反应中, 延胡索酸在无氧呼吸中发挥了电子受体的作用.

2 氨基酸代谢

*H pylori*培养基的发展以及生长所需氨基酸的确认有助于了解*H pylori*的氨基酸代谢情况^[14]. Testerman *et al*^[15]的研究表明, 所有测试的菌株都需要添加精氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸. 其中10个菌株中的8个需要丙氨酸, 5个需要丝氨酸. 同时, *H pylori*基因组的分子数据分析显示, *H pylori*染色体编码的蛋白没有参与精氨酸或组氨酸的生物合成途径, 这就可以解释在生长培养基中对于精氨酸和组氨酸的需求^[16]. 尽管Testerman *et al*^[15]观察到丙氨酸能够促进细菌在葡萄糖存在时生长能力, 但Mendz *et al*^[17]证明*H pylori*在添加精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和丝氨酸作为单一基质的无

葡萄糖培养基中生长良好,检测到氨基酸分解代谢的主要产物为醋酸、甲酸、丁二酸和乳酸.这些结果说明可以把碳水化合物从基本营养素为氨基酸的培养基中去除.而且研究结果表明,直到其它代谢产物显著衰竭时,添加到混合氨基酸生长培养基中的葡萄糖才会被利用^[18].同时在对于*H pylori*基因序列的分析中,确认了编码同氨基酸代谢有关的酶的基因.对于必需氨基酸来说,基因水平的分析显示其生物合成途径是不完全的.相反,非必需氨基酸的合成则是通过传统的途径合成的.

3 脂肪酸和磷脂的代谢

脂质的分解为*H pylori*提供了另外的碳源和能量,而且磷脂也是磷酸盐的重要来源.*H pylori*似乎还有编码同 β -氧化有关的酶^[19],一些研究还显示*H pylori*具有磷脂酶活性,如磷脂酶A₁、A₂或C^[20-22].关于脂肪酸和磷脂的合成,迄今为止尚无实验研究.然而,根据*H pylori* DNA序列分析,至少有14个同脂肪合成有关的酶的基因被确认^[23].来源于大肠杆菌的cfa基因在*H pylori* DNA上的发现,提示像其它细菌一样,环丙烷脂肪酸也存在于*H pylori*基因组中.关于磷脂的合成途径,相关基因也已在*H pylori*基因序列中发现^[24].而且,Ge *et al*^[25]还确认了磷脂酰丝氨酸合成酶及其相应的基因(pssA).

4 生物成分的摄取、合成以及酸碱平衡的调节

4.1 核苷酸的生物合成 单磷酸核苷以及脱氧单磷酸核苷可以通过从头合成途径合成,也可以通过补救合成途径合成.试验研究^[26]和*H pylori* DNA分子研究资料分析的结果^[1]显示:*H pylori*可以从头合成很多嘧啶核苷酸,同时也可以进行有限的补救合成.另外,嘌呤核苷酸则补救合成多于从头合成.

4.2 氮源 分析*H pylori*的基因序列显示,它可能能够利用几种底物作为其氮源,包括尿素、氨和三种氨基酸(精氨酸、丝氨酸和谷氨酸).氨可以通过尿素酶对尿素的分解产生^[27],它使得氮源以铵离子的形式存在.*H pylori*似乎也可以编码脂肪酰胺酶^[28],该酶催化酰胺分解,通过产氨为细菌代谢提供氮源.

4.3 铁的摄取 正如其他细菌一样,*H pylori*也需要一个铁离子摄入系统为细菌的代谢过程提供铁,铁对于生物体系统来说是一个非常重要的元素.当分析*H pylori*的基因序列时,发现铁摄取机制是如此复杂以及铁摄取系统是如此繁冗.同时,基因序列分析结果提示*H pylori*存在着一个同大肠杆菌含铁血黄素介导的枸橼酸铁(fec)摄取相似的铁摄入系统.

已经证实*H pylori* DNA上具有编码摄取含铁血黄素的、胞质结合蛋白依赖的转运系统成分的基因,由于*H pylori*存在类似于大肠杆菌内的fec系统,所以细菌具有吸收铁离子的能力.在大肠杆菌中,该系统在无氧条件下对于离子的供应发挥着非常重要的作用^[29].Frazier *et al*确定

了一无血红素的胞质铁蛋白,可能同残余铁的储存有关^[30].

关于铁摄取的调节,在脑膜炎球菌中存在的frpB基因也被发现存在于*H pylori*基因组中,编码蛋白同大肠杆菌中的几种TonB蛋白依赖的外膜受体是相同的^[31].TonB蛋白是细菌摄取含铁血黄素的必要成分.而且,*H pylori*似乎也编码重要的铁摄取调节因子Fur蛋白.在同铁离子摄取有关的2个fecA基因、3个frpB基因和fur基因的上游可以见到和Fur结合结构域一致的结构^[1].

4.4 酸碱平衡的调节 由于特殊的生长环境,*H pylori*必须进行一些适应性的改变才能定居在酸性的环境中.在体外,*H pylori*一般不可以存在于pH3以下的环境条件,如果加入类似于胃腔环境的尿素浓度,*H pylori*将得到保护^[32].因此,*H pylori*产生的尿素酶使得它可以生存于酸性环境中.然而,Meyer-Rosberg *et al*^[33]的研究结果显示,尿素酶可以降低*H pylori*在碱性条件下的存活率.

维持*H pylori*在酸性胃腔内定植、生存的其它机制也是存在的.和其它细菌一样,*H pylori*可以维持质子的转运,通过调节胞浆膜两侧的电势差以抵消pH梯度的变化^[34],从而产生一个膜内的正电势.原因可能是提高了阳离子的浓度而非泵出了阴离子,*H pylori*缺乏编码阴离子转运至胞外相关蛋白的基因也说明了这一点.三种质子转运的ATP酶已经在*H pylori*中被证实:ATP酶-439、ATP酶-948和ATP酶-115^[35].

已经证实在*H pylori*存在H⁺耦联的离子转运系统,该系统同来自于Enterococcus hirae的NapA蛋白以及来自E.coli的NhaA蛋白相关,上述蛋白是Na⁺/H⁺转运蛋白的抑制物,并且控制细胞的离子内流和外流.

宿主环境内的pH变化可以被认为是一种生化信号,从而引起相应的基因表达或抑制.在这方面,可以从McGowan *et al*的报告中得到证实,他们的研究发现*H pylori*胞外pH值的改变可以导致其蛋白内容的变化^[36].

5 呼吸链

在*H pylori*中,有证据显示有氧呼吸和无氧呼吸均存在.质子转运通过NDH-I脱氢酶和各种细胞色素.NDH-I复合物可以通过NADH催化醌的分解^[37].一些研究报告认为原始的cbb3型细胞色素氧化酶是*H pylori*有氧呼吸的终末氧化酶^[38].除了NDH-I复合体,四种其他的电子传递脱氢酶也已被证实^[1]:一个还原酶复合体(HydABC)、一个D-乳酸脱氢酶和两个sn-甘油-3-磷酸脱氢酶(需氧或厌氧形式).

在有氧呼吸中,氧是电子传递的最终受体.Hazell *et al*^[39]已经证实*H pylori*存在延胡索酸还原酶,提示*H pylori*可以同其他厌氧菌或兼性厌氧菌一样通过无氧呼吸得到ATP.所以,在无氧呼吸中,延胡索酸可以作为电子受体.Marcell *et al*提出,由于大多数呼吸醌是6-甲基醌,这就意味着在*H pylori*中无氧呼吸较有氧呼吸更常见^[40].

6 活性氧代谢

一般来讲主要有三个机制促使*H pylori*抵抗活性氧代谢

造成的损伤, 这些机制由超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(Kat)和烷基过氧化氢还原酶(Ahp)催化^[41]. 胃黏膜炎症导致有毒的氧代谢产物增加, 超氧负离子是一种高活性的氧, 可受超氧化物歧化酶的催化而歧化为 H_2O_2 ; 过氧化氢由过氧化氢酶催化转变为 O_2 和 H_2O ; 烷基过氧化氢还原酶催化烷基过氧化氢还原为相应的乙醇. 在多数细菌中, 烷基过氧化氢还原酶是双组分系统, 由蛋白AhpF和AhpC组成. AhpC在过氧化物还原酶活性中起主要作用, 附属的黄素酶即AhpF具有NADH或NADPH氧化酶活性. *H. pylori*基因tsaA与ahpC为直系同源物, 但在*H. pylori*基因组中没有确认ahpF的同源物. 然而有证据表明细菌中存在NADH氧化酶活性^[42]. 过氧化氢酶可在细胞胞质、周质区和细胞表面表达. 这种酶是传统意义上的过氧化氢酶, 缺乏过氧化物酶活性. 这些过氧化氢酶通常可在哺乳动物细胞中发现, 包含亚铁血红素修复基团并具有NADPH结合活性. 但在*H. pylori*中, 过氧化氢酶katA基因产物的检测显示其基序通常与NADH关联而不是NADPH结合蛋白^[43]. 目前的研究表明, 参与抵抗氧化损伤酶的相关基因组和实验数据是一致的, 但序列分析确认一些基因的功能及其在防御机制中潜在的作用仍需进一步的阐明.

*H. pylori*是一种可在人胃黏膜定植, 并与慢性活动性胃炎、萎缩性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤等疾病发生相关的革兰氏阴性螺杆菌, 也是WHO确认的惟一与癌症发生密切相关的细菌. 由于其在医学和生物学上的重要地位, 受到科技界和医学界的广泛关注. *H. pylori*是发现最晚的胃肠道致病菌, 但却是目前研究最透彻的致病菌之一. 近几年在基因组和后基因组研究方面进展迅速, 其中*H. pylori*代谢组学也日益成为该领域的研究热点. 相信随着研究的深入, 代谢组学研究必将在揭示*H. pylori*基因功能的功能基因组学研究中发挥更大的作用: 它能帮助人们更好地了解生物体中各种复杂的相互作用、生物系统对环境 and 基因变化的响应, 为人们提供一个了解基因表型的独特途径. 同时, 在疫苗开发、药物筛选、临床诊断和治疗等领域, 也将从代谢指纹图谱研究中大大受益.

7 参考文献

- 1 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547
- 2 Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397: 176-180
- 3 Bumann D, Meyer TF, Jungblut PR. Proteome analysis of the common human pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics* 2001; 1: 473-479
- 4 Chalk PA, Roberts AD, Blows WM. Metabolism of pyruvate and glucose by intact cells of *Helicobacter pylori* studied by ^{13}C NMR spectroscopy. *Microbiology* 1994; 140: 2085-2092
- 5 Mendz GL, Burns BP, Hazell SL. Characterisation of glucose transport in *Helicobacter pylori*. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1244: 269-276
- 6 Wanken AE, Conway T, Eaton KA. The Entner-Doudoroff pathway has little effect on *Helicobacter pylori* colonization of mice. *Infect Immun* 2003; 71: 2920-2923
- 7 Mendz GL, Hazell SL, Burns BP. Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 3023-3028
- 8 Hoffman PS, Goodwin A, Johnsen J, Magee K, Veldhuyzen van Zanten SJ. Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J Bacteriol* 1996; 178: 4822-4829
- 9 Mendz GL, Burns BP. Characterization of arginine transport in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2003; 8: 245-251
- 10 Kim H, Wu CA, Kim DY, Han YH, Ha SC, Kim CS, Suh SW, Kim KK. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) from *Helicobacter pylori*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004; 60: 1447-1449
- 11 Wang G, Maier RJ. An NADPH quinone reductase of *Helicobacter pylori* plays an important role in oxidative stress resistance and host colonization. *Infect Immun* 2004; 72: 1391-1396
- 12 Mendz GL, Hazell SL, van Gorkom L. Pyruvate metabolism in *Helicobacter pylori*. *Arch Microbiol* 1994; 162: 187-192
- 13 Mendz GL, Hazell SL. Fumarate catabolism in *Helicobacter pylori*. *Biochem Mol Biol Int* 1993; 31: 325-332
- 14 Reynolds DJ, Penn CW. Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology* 1994; 140: 2649-2656
- 15 Testerman TL, McGee DJ, Mobley HL. *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3842-3850
- 16 Cerda O, Rivas A, Toledo H. *Helicobacter pylori* strain AT-CC700392 encodes a methyl-accepting chemotaxis receptor protein (MCP) for arginine and sodium bicarbonate. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 224: 175-181
- 17 Mendz GL, Hazell SL. Amino acid utilization by *Helicobacter pylori*. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27: 1085-1093
- 18 Mendz GL, Hazell SL. Glucose metabolism by *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 1994; 8: 2179-2180
- 19 Farinha P, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6370-6378
- 20 Orihara T, Wakabayashi H, Nakaya A, Fukuta K, Makimoto S, Naganuma K, Entani A, Watanabe A. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric mucosal phospholipid content and its fatty acid composition. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 269-275
- 21 Triantafyllidis JK, Barbatzas C, Cheracakis P, Ladas S, Tsikalakis D, Dadioti P. *Helicobacter pylori* infection and gastric juice total phospholipid concentration in patients with bleeding peptic ulcer. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2642-2643
- 22 Wakabayashi H, Orihara T, Nakaya A, Miyamoto A, Watanabe A. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric mucosal phospholipid contents and their fatty acid composition. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 566-571
- 23 Chen MC, Hu CT, Wang LY, Lin HH. The efficacy of *Helicobacter pylori* eradication related to CYP2C19 metabolism. *Ali-*

- ment Pharmacol Ther 2005; 22: 274-275
- 24 Ernst FD, Kuipers EJ, Heijens A, Sarwari R, Stoof J, Penn CW, Kusters JG, van Vliet AH. The nickel-responsive regulator NikR controls activation and repression of gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2005; 73: 7252-7258
- 25 Ge Z, Taylor DE. The *Helicobacter pylori* gene encoding phosphatidylserine synthase: sequence, expression, and insertional mutagenesis. *J Bacteriol* 1997; 179: 4970-4976
- 26 Owen RJ, Xerry J, Gotada T, Naylor G, Tompkins D. Analysis of geospecific markers for *Helicobacter pylori* variants in patients from Japan and Nigeria by triple-locus nucleotide sequence typing. *Microbiology* 2004; 150: 151-161
- 27 Nakamura H, Yoshiyama H, Takeuchi H, Mizote T, Okita K, Nakazawa T. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun* 1998; 66: 4832-4837
- 28 Mendz GL, Jimenez BM, Hazell SL, Gero AM, O'Sullivan WJ. Salvage synthesis of purine nucleotides by *Helicobacter pylori*. *J Appl Bacteriol* 1994; 77: 674-681
- 29 Kammler M, Schon C, Hantke K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993; 175: 6212-6219
- 30 Waidner B, Greiner S, Odenbreit S, Kavermann H, Velayudhan J, Stahler F, Guhl J, Bisse E, van Vliet AH, Andrews SC, Kusters JG, Kelly DJ, Haas R, Kist M, Bereswill S. Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun* 2002; 70: 3923-3929
- 31 Beucher M, Sparling PF. Cloning, sequencing, and characterization of the gene encoding FrpB, a major iron-regulated, outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 1995; 177: 2041-2049
- 32 Clyne M, Labigne A, Drumm B. *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect Immun* 1995; 63: 1669-1673
- 33 Meyer-Rosberg K, Scott DR, Rex D, Melchers K, Sachs G. The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1996; 111: 886-900
- 34 Sachs G, Meyer-Rosberg K, Scott DR, Melchers K. Acid, protons and *Helicobacter pylori*. *Yale J Biol Med* 1996; 69: 301-316
- 35 Melchers K, Herrmann L, Mauch F, Bayle D, Heuermann D, Weitzenegger T, Schuhmacher A, Sachs G, Haas R, Bode G, Bensch K, Schafer KP. Properties and function of the P type ion pumps cloned from *Helicobacter pylori*. *Acta Physiol Scand Suppl* 1998; 643: 123-135
- 36 Pflock M, Kennard S, Delany I, Scarlato V, Beier D. Acid-induced activation of the urease promoters is mediated directly by the ArsRS two-component system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2005; 73: 6437-6445
- 37 Smith MA, Edwards DI. Oxygen scavenging, NADH oxidase and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 347-353
- 38 Nagata K, Tsukita S, Tamura T, Sone N. A cb-type cytochrome-c oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 1996; 142: 1757-1763
- 39 Hazell SL, Mendz GL. How *Helicobacter pylori* works: an overview of the metabolism of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1997; 2: 1-12
- 40 Tatusov RL, Mushegian AR, Bork P, Brown NP, Hayes WS, Borodovsky M, Rudd KE, Koonin EV. Metabolism and evolution of *Haemophilus influenzae* deduced from a whole-genome comparison with *Escherichia coli*. *Curr Biol* 1996; 6: 279-291
- 41 Odenbreit S, Wieland B, Haas R. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J Bacteriol* 1996; 178: 6960-6967
- 42 Smith MA, Edwards DI. Oxygen scavenging, NADH oxidase and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 347-353
- 43 Manos J, Kolesnikow T, Hazell SL. An investigation of the molecular basis of the spontaneous occurrence of a catalase-negative phenotype in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1998; 3: 28-38

电编 张敏 编辑 管鑫妍 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 •

技法与经验

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

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法 1.1 原理；1.2 适应证；1.3 器材准备；1.4 步骤；1.5 实例

2 结果

3 讨论 3.1 并发症；3.2 优点和缺点；3.3 经验与技巧

4 参考文献

Toll 样受体及其在病毒性肝炎发病机制中的作用

赵甫涛, 姬新颖, 潘 蕾, 贾战生

赵甫涛, 姬新颖, 潘蕾, 贾战生, 第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
国家自然科学基金资助项目, No.30570086
通讯作者: 贾战生, 710038, 陕西省西安市, 第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. jiazsh@fmmu.edu.cn
电话: 029-83377853 传真: 029-83537377
收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-09-30

摘要

先天性免疫系统发挥防御作用的关键是对病原体的识别, 这一识别主要由Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)完成. TLRs通过识别病原微生物及其特殊结构, 介导宿主相关细胞因子的分泌和天然免疫应答的产生. 病毒基因组具有一些哺乳动物基因组所没有的特性物质, 比如高CpG含量和dsRNA等. 这些基因组核酸起着同病毒感染相关的分子信号的作用. 近年研究显示, TLRs在病毒性肝炎的发病机制中通过诱导TNF、IFN等的生成和调节Th1和Th2反应平衡而产生免疫刺激并发挥抗病毒作用. 因此, 对TLRs的认识和深入研究将为新型肝炎疫苗和免疫调节剂的研制提供新的重要理论依据, 并为病毒性肝炎的预防和治疗提供新的思路 and 手段.

赵甫涛, 姬新颖, 潘蕾, 贾战生. Toll样受体及其在病毒性肝炎发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2459-2463
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2459.asp>

0 引言

Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是近年来发现的在宿主抗病原微生物的免疫应答中起重要作用的细胞表面受体分子. 它们不仅在天然免疫应答中识别病原微生物的病原相关分子模式、激活先天性免疫应答, 还引起细胞因子的释放, 上调共刺激分子的表达, 为获得性免疫的启动提供必要的活化信号. 宿主通过这些受体感知病原微生物并直接做出防御反应, 不同的TLRs执行特定的抗肝炎病毒生物学效应^[1,2].

1 TLRs家族的成员、结构特点和分布表达

Toll蛋白最早是1996年Lemaitre *et al*^[3]在研究果蝇胚胎发育过程中发现的, 称为dToll, 随后发现它在介导成年果蝇天然免疫反应过程中起重要作用. 1997年, Medzhitov *et al*^[4]首次在人体分离出果蝇Toll的同系物, 先称为人类Toll蛋白, 后命名为TLR4. 迄今, 已在哺乳动物中发现了11种TLR, 称为TLRs家族, 并分别命名为TLR1-11^[5-9].

TLRs结构与dToll受体存在同源性, 由胞外区、跨膜段和胞内区组成, 属I型跨膜蛋白受体. 其胞外区有550-980个氨基酸, 存在18-31个氨基酸的富含亮氨酸的重

复序列(leucine-rich repeats, LRRs). LRRs中亮氨酸间隔分布于几个固定位点, 如此结构的LRRs利于促进蛋白质间的相互黏附, 可用来识别病原体或其产物. LRRs结构区的C端侧翼为富半胱氨酸区域, 与跨膜段连接. LRRs也参与控制配体对TLRs胞内负责信号传导结构区的激活. TLRs胞内区包括Toll同源结构域(Toll homology domain, TH domain)和分子羧基端长短不同的短尾肽(一般有0-22个氨基酸). TH domain有至少128个氨基酸, 结构较保守, 该序列与IL-1受体的胞内区有高度同源性, 又被称为Toll/IL-1受体(Toll/IL-1 receptor, TIR)同源区, 它是TLRs和IL-1R向下游进行信号传导的核心元件. 在TIR中有23个氨基酸位置是固定的(图1), 所形成的三个区域分别为其编码蛋白的标志区域和信号介导区域^[10,11].



图1 TIR结构示意图.

TLRs广泛分布于各种组织中, 且有细胞分布特异性. TLR1, 6, 9广泛分布于各类免疫细胞, TLR2, 4, 5分布于除T、B、NK外的免疫细胞, TLR3只特异分布于树突状细胞(DC)^[12], TLR7, 8分布于外周血白细胞. TLR1, 2, 4, 5, 6均表达于细胞表面^[13-16], TLR7, 8均来源于X性染色体, 结构高度保守, TLR3, 7, 8, 9存在于酸性胞内体(如endosome)^[17-22].

2 TLRs配体的特异性

Medzhitov和Janeway^[23]将天然免疫细胞所识别的主要靶分子称为病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 将与之相对应的识别受体称为模式识别受体(pattern recognition receptor, PRRs). PAMPs均可被宿主作为外来分子进行识别, 且能激发宿主细胞因子如IL-1、TNF- α 等及其他活性分子的合成, 对感染具有十分重要的作用. PRRs在先天性免疫中居于重要地位, 宿主能通过它们区别病原体与自我组织. TLRs即是一类PRRs, 通过识别不同病原体的PAMPs在抗感染天然免疫中发挥重要作用^[24].

不同TLRs胞外区氨基酸组成的差异决定了各自有其特征性的配体. 目前已经明确: TLR1识别膜孔蛋白、PGN、糖脂和非典型LPS等^[25-27], TLR2可识别大部分现已发现的PAMPs结构, 如G⁺菌的PGN、分枝杆菌和疏密螺旋体的脂蛋白、酵母菌和支原体的某些成分等^[28-32], TLR3识别病毒dsRNA和聚肌胞苷酸poly(I:C)^[33], TLR4主要识别LPS及具有保守类脂A结构的衍生物^[34,35], 还识别

活结核杆菌的某些成分及内源性配体热休克蛋白60, 70等^[36,37]; TLR5识别鞭毛蛋白^[38]; TLR6主要识别细菌的肽聚糖和脂肽^[39]; TLR7, 8识别抗病毒化合物, 许多情况下识别相同配体ssRNA^[40,41]; TLR9主要识别非甲基化CpG DNA^[42]。另外, TLR1和TLR6能与TLR2形成复合受体识别一些微生物成分^[43]。最近发现TLR11识别Profilin样分子^[44]。

3 TLRs介导的信号传导通路

TLRs识别配体后, 可通过髓样分化因子88(MyD88)依赖和非依赖两种信号传导途径, 激活NF- κ B和MAPK, 引起多种细胞因子的释放, 上调APC细胞表面CD80、CD86等共刺激分子, 并最终激活特异性免疫系统^[45,46]。

在MyD88依赖性信号传导通路, MyD88起着关键作用^[47], 其C端有一个TIR结构域, 与激活的IL-1/TLRs胞质区形成蛋白质复合体来参与信号传导; MyD88的N端具有一个与肿瘤坏死因子受体(TNFR)胞内区相关的死亡结构域(death domain, DD)。当MyD88的C端TIR区与IL-1R/TLRs的胞质区发生相互作用时, MyD88通过N端死亡区募集带有同源结构的下游信号分子IRAK(IL-1R associated kinase)的死亡区域, 并与其结合^[48]。MyD88作用的靶物质已证实是IRAK4。IRAK4与IL-1R/TLRs和MyD88 N端形成的受体复合物结合后, 即自动磷酸化。IRAK4磷酸化后, 即从受体复合物中解离、释放出来, 促进肿瘤坏死因子相关因子6(TRAF6)的聚合和活化^[49], 进一步激活NF- κ B诱导激酶(NF- κ B-inducing kinase, NIK), NIK引起NF- κ B激酶抑制物(inhibitor of NF- κ B kinases, IKKs)磷酸化并激活, IKKs继而作用于NF- κ B复合物中的特异性抑制因子I κ B, 使其两个丝氨酸位点磷酸化, 最终导致其泛素化而降解。通常, NF- κ B与其抑制蛋白I κ B相结合, 以复合物形式存在于胞质中。I κ B降解后, NF- κ B得以释放、游离, 并转运到细胞核内, 其活性二聚体启动细胞因子(如TNF- α 和IL-1, 6, 8, 12等)和辅助黏附分子CD80、CD86的基因转录, 诱导特异靶基因的表达, 从而激活特异性免疫系统^[50-52]。

4 TLRs在病毒性肝炎发生和发展机制中的作用

免疫因素在病毒性肝炎的发生和发展过程中起着重要作用, 在肝脏的先天性免疫反应中, 肝的淋巴细胞则具有举足轻重的作用。病毒感染过程中, NK细胞释放IFN- γ , 诱导T细胞介导的免疫反应, 导致感染细胞发生凋亡; 细胞毒性T淋巴细胞激活Kupffer细胞, 产生TNF- α , 从而诱导肝细胞凋亡^[53]。近年研究证实, TLRs通过诱导IFN和TNF等细胞因子的合成及调节Th1和Th2的反应平衡等而产生免疫刺激并发挥抗病毒作用^[54]。

Isogawa *et al*^[55]研究发现, 给HBV转基因鼠静脉注射TLR3, 4, 5, 7, 9特异性的配体, 能够于24 h内通过IFN- α/β 依赖途径抑制HBV的复制。在浆细胞样DC, TLR9识别

病毒来源的DNA, TLR9对A/D型CpG DNA的识别导致IFN- α 的诱导产生。在动物模型中, CpG ODN发挥着有效的Th1样免疫增强剂的作用。Imiquimod和R-848是imidazoquinoline家族中相对低分子量的化合物, 在动物模型中显示其具有很强的抗病毒作用。Imiquimod的活性主要通过细胞因子IFN- α 和IL-12等的诱导来调节, R-848是一个更有效的Imiquimod类似物^[56]。Weeratna *et al*^[57]应用HBsAg作为模型抗原在老鼠中进行了研究, 结果发现, CpG ODN作为疫苗佐剂能增强体液和细胞免疫应答, 其作用明显优于R-848。Cooper *et al*^[58]研究也发现, 在进行预防性乙型肝炎疫苗I、II期临床试验的志愿者和HIV患者体内, CpG 7909有很好的耐受性和增强的免疫原性。

一些学者对HCV蛋白诱导的细胞内信号和促炎性细胞因子等进行了研究。Sun *et al*^[59]研究发现病毒感染和TLR3配体可激活先天性免疫反应, NK细胞产生IFN- γ , 通过STAT1、IRF-1及p21cip1/waf1的活化而清除病毒感染的肝细胞。Matsumoto *et al*^[60]研究表明, TLR3配体蛋白及其下游的信号分子均与IFN- α/β 的产生有关。此外, 有研究发现, 人TLR3的表达还提高了NF- κ B活性, 在DC的不同分化阶段TLR3的表达不一样, 提示TLR3与DC功能的调节有关^[61]。Li *et al*^[62]报道, HCV NS3/4A丝氨酸蛋白酶可水解TRIF(Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β)的特定蛋白质, 分解的TRIF通过TLR3通路而抑制poly(I:C)活化的信号, 导致TLR3不能与活化IRF-3和NF- κ B的激酶相结合, 从而导致病毒的持续感染。Duesberg *et al*^[63]证实了HCV C蛋白的合成脂肽是通过TLR2和TLR4介导的信号通路来调节免疫细胞活化的。Dolganiuc *et al*^[64]发现, HCV C与NS3蛋白经TLR2触发炎症细胞活化, 却无法活化TLR2或MyD88缺乏小鼠的巨噬细胞。C与NS3诱导IRAK活化、p38磷酸化、细胞外调节激酶和c-jun氨基端激酶(JNK), 并诱导AP-1活化。C与NS3蛋白诱导的NF- κ B活化与I κ B α 磷酸化增多相关。TLR2介导的细胞活化依赖于C与NS3蛋白的构象和C蛋白aa2-122与NS3蛋白aa 1 450-1 643区域的必需序列。而且, HCV C蛋白与TLR2在细胞内共区域化存在。因此, HCV C与NS3蛋白是通过TLR2信号通路, 从而诱导人外周血单核细胞炎症性细胞因子的产生。这些研究表明, TLR2, 3, 4均参与了HCV的识别和天然免疫反应的活化。

目前研究发现, 血液中病毒感染后发生免疫应答时, 浆细胞源性DC(pDC)是主要产生IFNs等抗病毒细胞因子的免疫细胞。Honda *et al*^[65]研究证实, 病毒和TLR活化的MyD88依赖性信号传导通路中IFN- α/β 的诱导产生都受IRF-7的调控。在人和小鼠, 产生IFN的pDC的细胞表面表达TLR7和TLR9, pDC及B淋巴细胞通过TLR7识别ssRNA而激活协同刺激分子并产生细胞因子^[66]。Gibson *et al*^[67]研究表明, imiquimod和resiquimod诱导纯化的pDC产生IFN- α 和IFN- ω , 受resiquimod刺激的pDC还产生一些其他细胞因子, 如TNF- α 和IP-10。

Lund *et al*^[68]应用TLR7缺陷小鼠的研究显示ssRNA病毒通过TLR7刺激IFN- α / β 应答, 同时通过MyD88缺陷小鼠的研究显示这种应答也依赖于MyD88. Akira *et al*^[24]研究发现, 在MyD88敲除小鼠中, 对imidazoquinolines的免疫应答被完全阻断, 这提示TLRs与对imidazoquinolines的免疫应答有关. 进一步研究表明, 在抗病毒免疫反应中, MyD88缺陷小鼠的腹腔巨噬细胞不能合成TNF或IL-12等细胞因子. TLR7缺陷小鼠的巨噬细胞对Imiquimod或R-848没有应答, 对其它TLRs调节剂却有应答. 这些结果表明, TLRs参与了抗病毒免疫反应, 且TLR7对imidazoquinolines的应答是必不可少的^[69]. 此外, 这些调节剂还可诱导B细胞扩增及DC表达CD80、CD86, 而TLR7基因敲除小鼠细胞的这两种作用都明显减弱, 同时INF- α 、TNF和IL-12的表达也减弱^[70]. 因此, 有国外学者^[71]认为TLR7是一个新的病毒感染感受器.

总之, TLRs的活化提供了一种治疗HBV和HCV感染的新策略, 靶向TLRs的信号途径可能是治疗肝炎病毒感染的新途径. 随着研究的不断深入, 相信还会有更多的令人惊奇和鼓舞的新发现.

5 问题与展望

TLRs是近年才发现的第一个通过感知微生物病原体而直接做出防御反应的介导天然免疫反应的古老受体家族, 是宿主非特异性免疫的主要受体, 它的发现和深入研究有助于进一步揭示与肝炎病毒感染有关的免疫现象. 自从TLRs发现以来, 该领域的研究取得了长足的进步, 但是仍有许多问题尚待解决, 如: TLRs与配体结合的机制; 这些受体之间的相互作用如何; 是否还存在其他感受受体和配体, 尤其是TLR7、8的天然配体; 以及在信号传导方面, 不同的TLR如何诱导特异性的信号通路调节不同基因的表达以介导不同的生物学效应等. 同时, 研究表明, TLRs的过激活也会导致免疫紊乱甚至自身免疫性疾病的发生, 因此, 如何调控TLRs的表达也是一个值得研究的重大课题.

随着对TLRs研究的不断深入, 上述问题将逐步得以阐明, 也将极大地拓展我们对病原体与宿主免疫反应之间相互作用复杂性的认识, 还有助于我们了解宿主抗肝炎病毒免疫反应的机制, 并为临床治疗奠定基础. 而且, 由于基因研究可阐明人TLRs基因的突变能否增加对病毒感染的敏感性, 因此, 研制作用于TLRs的疫苗可辅助刺激非特异性免疫, 进而加强特异性免疫. 此外, 针对TLRs为靶点的药物研究也正成为一个热点, 对TLRs信号通路中某些环节的干预将可能成为一种免疫治疗新策略, 并有可能为提高病毒性肝炎的疗效带来希望.

由此, 阻断TLRs的功能是一个潜在的治疗选择, 可通过三种手段实现: (1)发展特异的结合并中和外源或内源配体的可溶性TLRs分子; (2)发展干预TLRs细胞内位点的小分子物质, 在配体与TLRs结合后, 防止细胞内信号分子

与微生物的相互作用; (3)发展干扰TLRs的细胞外位点的小分子物质或抗体, 阻止配体与细胞表面的TLRs位点结合. 如果TLRs的配体结合物的准确性和特异性足够高, 这将是最有效的治疗方法. 因此, TLRs的认识和深入研究将为新型肝炎疫苗和免疫调节剂的研制提供新的重要理论依据, 并在很大程度上影响严重病毒性肝炎的预后. 有理由相信, 加强对TLRs的研究将会为病毒性肝炎预防和治疗的基础研究和临床应用开辟广阔的前景.

6 参考文献

- 1 Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-680
- 2 Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995
- 3 Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983
- 4 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397
- 5 Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1518: 157-161
- 6 Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a subfamily of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11: 372-378
- 7 Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 588-593
- 8 Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 1999; 231: 59-65
- 9 Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14
- 10 Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sci* 2000; 68: 241-258
- 11 Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 219-232
- 12 Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171: 3154-3162
- 13 Funami K, Matsumoto M, Oshiumi H, Akazawa T, Yamamoto A, Seya T. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol* 2004; 16: 1143-1154
- 14 Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6646-6651
- 15 Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190-198
- 16 Zhang H, Tay PN, Cao W, Li W, Lu J. Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett* 2002; 532: 171-176
- 17 Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11: 362-371
- 18 Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena

- P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 5998-6004
- 19 Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2987-2997
- 20 Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol* 2004; 173: 1179-1183
- 21 Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1958-1968
- 22 Nishiya T, DeFranco AL. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* 2004; 279: 19008-19017
- 23 Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; 173: 89-97
- 24 Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; 85: 85-95
- 25 Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10-14
- 26 Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W, Zahringier U, Hartung T, Gobel UB, Schumann RR. Toll-like receptor-2 mediates Treponema glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* 2001; 276: 22041-22047
- 27 Asai Y, Ohyama Y, Gen K, Ogawa T. Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2001; 69: 7387-7395
- 28 Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999; 274: 33419-33425
- 29 Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2000; 164: 554-557
- 30 Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14459-14463
- 31 Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; 285: 732-736
- 32 Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, Weis JJ. Cutting edge: inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999; 163: 2382-2386
- 33 Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738
- 34 Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749-3752
- 35 Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Meer JW. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol* 2002; 23: 135-139
- 36 Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164: 558-561
- 37 Gao B, Tsan MF. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* 2003; 278: 174-179
- 38 Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 2003; 4: 1247-1253
- 39 Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13: 933-940
- 40 Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303: 1529-1531
- 41 Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526-1529
- 42 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745
- 43 Ozinsky A, Smith KD, Hume D, Underhill DM. Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2000; 6: 393-396
- 44 Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005; 308: 1626-1629
- 45 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376
- 46 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511
- 47 Liu N, Montgomery RR, Barthold SW, Bockenstedt LK. Myeloid differentiation antigen 88 deficiency impairs pathogen clearance but does not alter inflammation in Borrelia burgdorferi-infected mice. *Infect Immun* 2004; 72: 3195-3203
- 48 Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, Volpe F. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 346-351
- 49 Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998; 187: 2097-2101
- 50 Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5567-5572
- 51 Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002; 416: 750-756
- 52 Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003; 300: 1148-1151
- 53 Takehara T, Hayashi N. Natural killer cells in hepatitis C virus infection: from innate immunity to adaptive immunity. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: S78-S81
- 54 Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential

- toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 2003; 197: 101-109
- 55 Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J Virol* 2005; 79: 7269-7272
- 56 Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai MA. Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21: 1-14
- 57 Weeratna RD, Makinen SR, McCluskie MJ, Davis HL. TLR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848). *Vaccine* 2005; 23: 5263-5270
- 58 Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, Cameron DW, Heathcote J. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 2004; 24: 693-701
- 59 Sun R, Gao B. Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-gamma). *Gastroenterology* 2004; 127: 1525-1539
- 60 Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 147-154
- 61 Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1364-1369
- 62 Li K, Foy E, Ferreón JC, Nakamura M, Ferreón AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2992-2997
- 63 Duesberg U, von dem Bussche A, Kirschning C, Miyake K, Sauerbruch T, Spengler U. Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)-core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunol Lett* 2002; 84: 89-95
- 64 Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, Golenbock DT, Finberg RW, Kurt-Jones E, Szabo G. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* 2004; 127: 1513-1524
- 65 Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005; 434: 772-777
- 66 Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, Cella M, Lande R, Uze G. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 796-805
- 67 Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, Gleason RM, Rogers LM, Fuller AE, Oesterich JL, Gordon KB, Qiu X, McKane SW, Noelle RJ, Miller RL, Kedl RM, Fitzgerald-Bocarsly P, Tomai MA, Vasilakos JP. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* 2002; 218: 74-86
- 68 Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 5598-5603
- 69 Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3: 196-200
- 70 Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002; 3: 499
- 71 Crozat K, Beutler B. TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6835-6836

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 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 •

2006年即将召开的国际会议

10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus
February 22-25, 2006
isde@sapmea.asn.au
www.isde.net

Easl 2006 - The 41st Annual Meeting
April 26-30, 2006

Canadian Digestive Disease Week Conference
March 4-12, 2006
www.cag-acg.org

XXX pan-American congress of digestive diseases
XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas
November 25-December 1, 2006
amg@gastro.org.mx
www.gastro.org.mx

World Congress on Gastrointestinal Cancer
June 14-17, 2006
c.chase@imedex.com

7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association
September 3-7, 2006
convention@edinburgh.org
www.edinburgh.org/conference

Annual Postgraduate Course
May 25-26, 2006
www.asge.org/education

71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course
October 20-25, 2006

T 辅助细胞亚群与炎症性肠病的关系

崔玉芳, 徐 菡, 安小霞, 王子兵

崔玉芳, 徐菡, 安小霞, 王子兵, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所免疫学研究室 北京市 100850
通讯作者: 崔玉芳, 100850, 北京市海淀区太平路27号. yufangc@vip.sina.com
电话: 010-66931353 传真: 010-68214653
收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-09-30

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病机制及治疗问题一直是临床和基础科学家困扰的问题. 直至目前为止对其病因仍不清楚. IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩氏病(Crohn's disease, CD), 前者是一种慢性非特异性结肠炎症, 重者发生溃疡甚至癌变; 病变主要累及结肠黏膜和黏膜下层, 临床主要表现为腹泻、腹痛和黏液脓血便. 后者病变可累及胃肠道各部位, 是一种慢性肉芽肿性炎症, 呈阶段性分布, 主要临床表现为腹痛、腹泻、瘻管及不同程度的全身症状. 本综述从IBD发病的病因学, Th1和Th2亚群及炎症细胞因子、调节性T细胞在其中的作用等方面简述了该领域的研究进展, 期望能对从事该领域的研究者在探索IBD的发病机制和治疗策略方面有所裨益.

崔玉芳, 徐菡, 安小霞, 王子兵. T辅助细胞亚群与炎症性肠病的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2464-2468
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2464.asp>

0 引言

近年研究发现, Th细胞亚群的免疫调节失衡在感染症、自身免疫病、免疫缺陷症等多种疾病的发生发展中起重要作用, 特别是在炎症性肠病发病中的作用引起临床和基础研究者的重视. 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)通常是指病因尚不清楚的非特异性肠道炎性疾病. 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩氏病(Crohn's disease, CD)均属IBD. 以往传统的观念认为该病在欧美国家较为多见^[1], 但近10余年来随着报道病例数的明显增多^[2,3], 该病已经成为我国一种较常见的消化道疾病和消化病学研究的新热点^[4]. 在最近的十余年里, 基础和临床科学家都致力于研究该病的病因学及其发病机制^[4], 特别是有关T辅助细胞亚群在其中的作用受到越来越多的关注^[5]. 我们仅就该方面的研究进展作一简述.

1 IBD的病因学研究进展

IBD的病因学研究一直是该领域的研究重点. 大多数研究者认为, 该病的发病多与环境、遗传、特别是免疫学因素有关, 是一种多基因参与的作用于免疫系统和靶器官的疾病. 由于IBD的病因学及发病机制至今尚未阐明, 有

关其有效治疗措施的研究一直未有突破性进展. 目前的研究称, 免疫学因素在其发病过程中起至关重要的作用. 最近有学者称免疫调节紊乱是发病的关键因素, 肠道菌群失调是导致免疫损伤和免疫失调的重要始动因素^[6,7]. 已知在人肠道中寄生着大约400余种细菌^[8], 常住菌占90%以上(主要为厌氧菌), 其中大肠杆菌与肠球菌各占50%, 过路菌(如类大肠杆菌, 产气杆菌, 变形杆菌, 绿脓杆菌和肺炎杆菌等)不超过10%, 芽胞菌与酵母菌数量也不超过总菌数的10%. 正常情况下, 各菌群间按一定比例组合, 互相制约, 相互依存, 从质和量上在肠道内形成一定的生态平衡, 并不致病. 但是当机体的内外环境发生某些变化, 如寄生环境发生改变, 或长期使用或滥用抗生素时, 导致肠道过剩菌(含过路菌、芽胞菌和酵母菌等)繁殖显著超过正常值的40%以上时, 则引起肠道食物的分解紊乱, 进而出现肠道菌群失调症^[9], 临床上表现为急、慢性腹泻. 严重者或长期反复发作而未治愈者, 肠黏膜屏障功能受到持续破坏, 在免疫因素的作用下, 最终可导致IBD的发生^[10]. 而在IBD致病的免疫学因素中, 近年来研究表明, 以Th1和Th2亚群以及炎症细胞因子在其中的作用最为重要和最受重视.

2 Th1、Th2细胞亚群在IBD中的作用

2.1 Th1/Th2亚群分类的新概念及功能 已知T细胞属高度异质性的细胞群体, 在机体的免疫调节和免疫应答中具有至关重要的作用. 根据其在发育过程中细胞表面分化抗原的不同, 较早将其分为CD4⁺细胞和CD8⁺细胞亚群, 前者又称为辅助性/诱导性T细胞(T_{H1}), 后者又称为抑制性/细胞毒性T细胞(Ts/c). 然而, 随着对T细胞功能研究的不断深入, 以往的分类方法虽然对区分T细胞亚群的异质性有一定价值, 但没有确切反映出T细胞的功能群体. 1986年Mosmann *et al*^[11]首先根据小鼠CD4⁺T细胞产生细胞因子类型的不同, 将CD4⁺T细胞区分为Th1和Th2两种亚群. 此后的研究证实在人体内也存在相应的Th1和Th2亚群^[15], 而且发现小鼠和人的CD8⁺T细胞也存在与Th1和Th2亚群相似的Tc1和Tc2两个亚群^[12-15]. 因而, 目前趋向于将其统称为Th1类和Th2类T细胞^[15]. 实际在临床实践中, 根据T辅助细胞分泌的细胞因子谱进行分类, 更有利于反映T细胞的功能. 已知Th1细胞的优势细胞因子主要是IL-2、IFN- γ , Th2的优势细胞因子是IL-4、IL-5、IL-10. 2002年Neurath *et al*^[16]用Th1细胞表达IFN- γ 和TNF- β , 而Th2细胞表达IL-4、IL-5、IL-9和IL-13来表述Th1和Th2

细胞亚群, 这一观点目前已为大多数学者所接受. 近年研究发现, Th1细胞主要介导细胞免疫反应, 其中起主要作用的是IFN- γ ^[17,18]. Th2细胞主要介导体液免疫反应, 其中起主要作用的是IL-4^[19-21]. IFN- γ 和IL-4是调节细胞和体液免疫功能的关键细胞因子, Th1和Th2型细胞单独和二者之间的相互作用(如IL-12及Th1细胞的优势细胞因子IFN- γ , 能促进CD4⁺T细胞向Th1极化而抑制向Th2极化; Th2细胞的优势细胞因子IL-4, 能促进CD4⁺T细胞向Th2极化而抑制向Th1极化)调节着机体的免疫平衡, 维持机体内环境的稳定, 一旦这种平衡机制失调, 机体就会产生各种疾病^[22-27]. 近年研究发现, Th1和Th2亚群的免疫调节失衡与感染症、自身免疫病、免疫缺陷症等多种疾病的发生发展有关, 特别是在炎症性肠病发病中具有重要作用^[28-30].

2.2 Th1/Th2亚群在IBD中的作用 临床研究发现^[31,32], 结肠炎患者固有层(lamina propria, LP)中的CD4⁺T(LPT)细胞增殖反应较正常人为低, 表现在经TCR/CD3应答途径的增殖信号反应下降, 而CD2/CD28的协同信号途径正常. 进一步对CD患者LPT的研究表明^[32], 其所表达的IL-4、IL-5和IL-2均有所下降, 而IFN- γ 较对照组明显增加, 特别是经过CD2/CD28的信号途径, IFN- γ 的增加更加明显, 因而被认为与分泌IFN- γ 的T细胞(Th1)比例增高有关. 对来源于UC患者LPT细胞的分析表明, 主要是IL-5的表达增高, 而IL-4、IFN- γ 和IL-2的表达均属正常^[31]. 进一步研究表明, UC患者IL-13 mRNA的表达明显增加^[18], 已知IL-13与IL-4共用同一个受体^[33], 而且二者在结构和功能上有许多共同之处, 如均在调节超敏反应和Th2型肠道炎症中起重要作用. 因而推测, UC与Th2细胞的关系更为密切^[22,34]. 这些结果提示, 上述两种IBD免疫病理过程的特点可能与分泌的炎症因子类型不同有关, 进而决定不同的炎症过程, 而引起这种不同反应的差别很可能与黏膜所接触的抗原类型有关^[35]. 有关结肠炎动物模型的研究也表明, 由三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBs)诱发的肠道炎症部位中, 可以检测到IFN- γ 和IL-12表达的增高, 而IL-4的表达则出现降低. 若此时给动物注射抗IL-12和/或抗IFN- γ 的抗体, 则可以阻止结肠炎的发生, 抗IL-12抗体还可以减轻结肠炎病变的程度. 据此推测, 该模型是由于抗原(TNP半抗原和模型鼠自身结肠蛋白的结合物)诱发Th1细胞产生大量的IFN- γ , 后者可激活M Φ 进而产生一系列炎症和趋化因子, 如TNF- α 、IL-1、IL-6和IL-8, 最终导致结肠炎的发生. 此时, 若调节机体与Th1功能相拮抗的Th2的水平, 干预或中和促炎细胞因子的产生和作用, 则可缓解或减轻结肠炎的症状和病变程度. 新近有关用抗IL-12抗体对72例活动性CD治疗的临床结果显示, CD患者在临床症状改善的同时, 其结肠黏膜固有层单核细胞分泌的IL-12, IFN- γ , TNF- α 均有所减少^[36], 提示抗IL-12抗体的应用可能减少了Th1细胞的比例, 导致IFN- γ 等优势细胞

因子的减少. 因而, 目前不少学者把研究黏膜炎症的焦点集中在Th1和Th2细胞亚群的比值上, 他们认为, IFN- γ 和TGF- β 的平衡和失调对黏膜特发性炎症的发生和发展具有至关重要的作用^[37].

2.3 Th1/Th2型优势应答与IBD 不少资料研究表明, CD患者的异常免疫反应以Th1反应占优势, 表现在其肠道组织中的IL-12和IFN- γ 的表达明显增高, 而IL-4、IL-5未见增加^[11]. 还发现结肠组织中含有IL-12的巨噬细胞大量增加, 因而认为, CD是由IL-12驱动的Th1占优势的疾病; 此外, CD患者中的抗体以IgG2型升高为主, 而IgG2型的分泌受IFN- γ 的影响, 进一步支持了CD是以Th1型反应占优势的疾病. 而在关于UC异常免疫反应的研究中, 多数认为以Th2型细胞因子占优势^[9,31], 即UC患者肠黏膜的IL-4、IL-10 mRNA的表达水平升高, CD30优先表达在Th2细胞上. 综上可看出, Th1/Th2的失衡在IBD的发病机制中具有重要作用. 已知传统治疗IBD的效果较差, 故通过调节Th1/Th2的失衡有可能成为治疗IBD的一个新思路. 而且已有的资料表明, 抗IL-12的单抗能够使Th1驱动的结肠炎迅速缓解, 而抗IL-4的单抗对于治疗Th2驱动的结肠炎取得明显疗效. 因而, 检测Th1或Th2型细胞因子并不仅仅在于疾病的辅助诊断, 而更着重于分析疾病发生发展的趋势和规律, 以便正确指导临床治疗.

3 炎症细胞因子在IBD中的作用

Th1/Th2细胞的失衡一直被认为是IBD的重要发病机制之一^[11,15], 而Th1/Th2细胞亚群的分型是以它们分泌的优势细胞因子谱来表述的, 由此可看出细胞因子在IBD发病中的重要作用. 已知细胞因子主要为免疫细胞所分泌的能调节多种生物学功能的小分子多肽, 在机体的免疫应答过程中具有至关重要的作用, 是当前免疫学研究领域中最关注的前沿问题之一. 除了前述的免疫调节功能之外, 目前的研究表明, 由单核和巨噬细胞产生的IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF等均属于促炎细胞因子, 参与细胞免疫反应; 而主要由T细胞产生的IL-4, IL-5, IL-10, IL-13和TGF- β 等属于抗炎细胞因子, 参与体液免疫反应. 而且已经明确, IL-12和IFN- γ 主要通过促进Th1分化和抑制Th2分化使Th1细胞处于优势, IL-4和IL-13主要通过促进Th2分化和抑制Th1分化使Th2细胞占优势. 显然Th1和Th2之间的平衡是由促炎和抗炎因子之间的平衡所决定, 因而两类细胞因子之间的平衡失调是真正导致IBD发病的原因之一^[38]. 在IBD中, 无论是CD, 还是UC, 两类细胞因子均出现异常的表达. 最近有学者应用real-time RT-PCR的研究表明, UC患者肠道组织Th1和Th2型多种细胞因子mRNA的表达均明显高于正常组^[39], 表明细胞因子的异常表达确实在IBD的发病中起着重要作用. 由于在IBD中参与的细胞因子较多, 故仅择其功能明确者简述如下. 在UC患者局部肠黏膜中可检测到由淋巴细胞、巨噬细胞

和中性粒细胞等炎症细胞所分泌的IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、和TNF等炎症细胞因子,被认为是介导UC发病的重要原因^[40,41]。而IL-4、IL-10、IL-13和TGF- β 等能对抗或中和上述炎症因子,在维持肠道正常的免疫功能中起重要作用^[39,40]。研究发现,在UC活动期可检测到IL-1 β 和TNF- α 的明显升高,二者除了本身所导致的肠道组织损伤外,前者还可通过自分泌和旁分泌作用,促进IL-6、IL-8、和TNF- α 的生成增加,后者则可募集中性粒细胞等^[42-44]。因此,IL-1 β 和TNF- α 直接和间接参与了UC的发生。UC时还可观察到IL-6、IL-8的明显升高,前者可与IL-1 β 和TNF- α 互相作用,后者是中性粒细胞的强力趋化因子,均在UC发病中起重要作用^[45,46]。在抗炎细胞因子中,由Th2细胞分泌的IL-4和IL-10(细胞因子合成抑制因子),能抑制IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等促炎因子的生成^[47],从而达到抑制炎症和维持肠道免疫功能的重要作用。UC患者中IL-4、IL-10分泌减少,导致其抑制炎症因子的能力减弱,已经证实去除IL-10基因后,小鼠可出现自发性结肠炎,由此看出IL-4和IL-10与UC的发病有密切关系^[40,48-51]。最近报道,在其结构和功能上与IL-4相似的IL-13,在IBD患者中也出现异常表达,如UC患者IL-13 mRNA的表达明显增加^[33,52,53],支持其在调节Th2型肠道炎症中起重要作用。综上看出,两类细胞因子之间的平衡失调是导致IBD发病的重要原因。然而应该强调的是,细胞因子单独的和各个因子之间的协同或拮抗作用所组成的细胞因子网络是导致IBD发生的重要环节。因而我们认为,在制定以关键细胞因子为靶标的IBD的治疗策略中,应充分考虑到其网络相互作用的重要环节,以获得理想的治疗效果。

4 CD4⁺ CD25⁺ T细胞在IBD中的作用

近年来研究发现,机体内存在的天然CD4⁺ CD25⁺调节性T细胞(CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell, Tregs)也具有极强的免疫调节功能,可能是介导机体主动免疫耐受的主要细胞^[54]。已有研究表明,Tregs细胞占外周CD4⁺T细胞的5-10%,大部分是在胸腺内产生,也可以在外周诱导产生^[55]。该细胞组成性表达许多表面分子,最为显著的有CD25、CD62L、CD103、CTLA4以及GITR等^[56-60]。新近发现的一种转录因子Foxp3对于Tregs细胞的发育及功能发挥起着重要作用^[61-64],其表达可受TGF β 调节,且在体外已经证实TGF β 能够诱导小鼠CD4⁺ CD25⁺T细胞表达Foxp3^[65,66]。研究表明,Tregs细胞缺失或功能缺陷可直接导致人和动物多种自身免疫性疾病的发生及其它炎症性疾病的出现。目前已经明确,Tregs细胞能够有效抑制其它T细胞的活化和增殖^[67,68],而这些抑制作用可能是通过其分泌的IL-10和TGF- β 等免疫抑制因子实现的^[69,70]。有关Tregs在IBD中的作用目前还鲜有报道,有资料显示,能够抑制动物体内实验性结肠炎的发展^[71,72]。研究发现,Smad3(为TGF- β 信号转导通路中的一个重要信号分子)基因敲

除小鼠(Smad3^{-/-})易发生渐进性的白细胞增多症及胃炎、肠炎感染性疾病。我们最近对Smad3基因敲除小鼠免疫功能的研究结果表明,Smad3基因敲除后出现明显的免疫学功能上的变化,表现在外周血CD4/CD8比值的明显下降、外周血和胸腺CD8细胞以及外周血和脾脏CD19细胞的明显降低。进一步研究表明,Smad3基因敲除小鼠胸腺、脾脏和淋巴结Tregs细胞的含量均较野生型小鼠明显增高,分别为野生型小鼠的1.29、1.27和1.36倍,提示Tregs细胞功能的异常可能与小鼠免疫功能低下以及发生包括肠炎在内的感染症有关(未发表)。已知在UC时,IL-10阳性细胞以及IL-10 mRNA的表达均明显增高^[73],那么由于Smad3基因敲除所引起的肠炎是否与Tregs细胞的增高及分泌IL-10的能力增强有关(类似Th2占优势的UC),还是Tregs虽然数量增加但其功能有缺陷,即抑制炎症因子的能力缺乏或下降(类似于Th1占优势的CD),其详细的机制本实验室正在进一步研究中。

总之,虽然近年来T辅助细胞亚群在IBD中作用的研究已经受到重视并取得较快的进展,根据优势细胞因子谱进行Th2和Th2细胞的分类及在炎症性疾病发病中作用已被广泛接受,Tregs在IBD中的作用也逐渐引起关注。然而,尚有较多问题需要探讨,譬如,如何从调节Th1和Th2细胞亚群平衡的关键细胞因子为靶标制定IBD的有效治疗措施,Tregs在IBD患者体内的功能状态和作用机制究竟如何等。相信随着分子生物学等前沿技术在该领域中的迅速应用,在不断阐明IBD发病机制的基础上,通过调节Th1/Th2平衡及针对关键细胞因子为靶标的治疗策略一定会取得令人鼓舞的进展,从而研究和开发出治疗IBD更有效的药物。

5 参考文献

- 1 Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 2000; 35: 154-167
- 2 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 3 Ouyang Q, Tandon R, Goh KL, Ooi CJ, Ogata H, Fiocchi C. The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 408-413
- 4 江学良, 崔慧雯. 溃疡性结肠炎. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 1-2
- 5 Wen Z, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: autoimmune or immune-mediated pathogenesis? *Clin Dev Immunol* 2004; 11: 195-204
- 6 Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1646-1656
- 7 Inoue S, Nakase H, Chiba T. Etiopathogenesis and aggravating factors in ulcerative colitis. *Nippon Rinsho* 2005; 63: 757-762
- 8 Ardizzone S, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002; 252: 475-496
- 9 Isolauri E. Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 1142S-1146S
- 10 Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 2001; 48: 132-135
- 11 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coff-

- man RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357
- 12 Kang KH, Im SH. Differential regulation of the IL-10 gene in Th1 and Th2 T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1050: 97-107
- 13 Houman H, Hamzaoui A, Ben Ghorbal I, Khanfir MS, Feki M, Hamzaoui K. Tc1/Tc2 ratio in the inflammatory process in patients with Behcet's disease. *Mediators Inflamm* 2004; 13: 247-253
- 14 Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 2002; 39: 531-536
- 15 邢同京, 章廉. Th类细胞极化群体的基础和临床. 第1版. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 10-13
- 16 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573
- 17 Lemos MP, Fan L, Lo D, Laufer TM. CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cell-restricted MHC class II controls Th1 CD4+ T cell immunity. *J Immunol* 2003; 171: 5077-5084
- 18 van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1491-1500
- 19 Mita Y, Dobashi K, Endou K, Kawata T, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. *Immunol Lett* 2002; 81: 71-75
- 20 Kikuchi T, Crystal RG. Antigen-pulsed dendritic cells expressing macrophage-derived chemokine elicit Th2 responses and promote specific humoral immunity. *J Clin Invest* 2001; 108: 917-927
- 21 Daichou Y, Kurashige S, Hashimoto S, Suzuki S. Characteristic cytokine products of Th1 and Th2 cells in hemodialysis patients. *Nephron* 1999; 83: 237-245
- 22 Kasakura S. A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori* 1998; 46: 915-921
- 23 Kocjan T, Wraber B, Repnik U, Hojker S. Changes in Th1/Th2 cytokine balance in Graves' disease. *Pflugers Arch* 2000; 440: R94-R95
- 24 Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003; 8: 223-246
- 25 Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1024: 138-146
- 26 Tsuda H, Yamasaki H. Type I and type II T cell profiles in chronic myelogenous leukemia. *Acta Haematol* 2000; 103: 96-101
- 27 Iwasaka H, Noguchi T. Th1/Th2 balance in systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2237-2243
- 28 Iqbal N, Oliver JR, Wagner FH, Lazenby AS, Elson CO, Weaver CT. T helper 1 and T helper 2 cells are pathogenic in an antigen-specific model of colitis. *J Exp Med* 2002; 195: 71-84
- 29 Van Damme N, De Keyser F, Demetter P, Baeten D, Mielants H, Verbruggen G, Cuvelier C, Veys EM, De Vos M. The proportion of Th1 cells, which prevail in gut mucosa, is decreased in inflammatory bowel syndrome. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 383-390
- 30 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51: 2-9
- 31 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; 157: 1261-1270
- 32 Mariani P, Bachetoni A, D'Alessandro M, Lomanto D, Mazzocchi P, Speranza V. Effector Th-1 cells with cytotoxic function in the intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2029-2035
- 33 Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* 2003; 300: 1527-1528
- 34 Lakatos L. Immunology of inflammatory bowel diseases. *Acta Physiol Hung* 2000; 87: 355-372
- 35 Vohra P. Inflammatory bowel disease. *Indian J Pediatr* 2000; 67: 747-756
- 36 Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezada M, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W, Yang Z. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2069-2079
- 37 Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997; 18: 61-64
- 38 Xia B, Crusius J, Meuwissen S, Pena A. Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 446-458
- 39 Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003; 11: 175-179
- 40 Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129: 550-564
- 41 Nielsen OH, Kirman I, Rudiger N, Hendel J, Vainer B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 180-185
- 42 Kurtovic J, Segal I. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. *Trop Gastroenterol* 2004; 25: 9-14
- 43 Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman ML, Zanker B, Muggia A, Antonioli D, Peppercorn MA, Strom TB. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 818-826
- 44 Andoh A, Ogawa A, Kitamura K, Inatomi O, Fujino S, Tsujikawa T, Sasaki M, Mitsuyama K, Fujiyama Y. Suppression of interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory responses by leukocytapheresis therapy in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1150-1157
- 45 Nielsen OH, Gionchetti P, Ainsworth M, Vainer B, Campieri M, Borregaard N, Kjeldsen L. Rectal dialysate and fecal concentrations of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2923-2928
- 46 Carlson M, Raab Y, Seveus L, Xu S, Hallgren R, Venge P. Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis. *Gut* 2002; 50: 501-506
- 47 Nielsen OH, Koppen T, Rudiger N, Horn T, Eriksen J, Kirman I. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1786-1793
- 48 Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, Hajeer AH, McMahon R, Whorwell PJ, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999; 54: 386-390
- 49 Jijon HB, Churchill T, Malfair D, Wessler A, Jewell LD, Parsons HG, Madsen KL. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G641-651
- 50 Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2386-2392
- 51 Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Brennan FM, Hodgson HJ. Local delivery of adenoviral vectors encoding murine interleukin 10 induces colonic interleukin 10 production and is therapeutic for murine colitis. *Gut* 2003; 52: 981-987
- 52 Kadivar K, Ruchelli ED, Markowitz JE, Defelice ML, Strogatz ML, Kanzaria MM, Reddy KP, Baldassano RN, von Allmen D,

- Brown KA. Intestinal interleukin-13 in pediatric inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 593-598
- 53 Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497
- 54 Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 389-400
- 55 Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS, Wood KJ. Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 2004; 172: 923-928
- 56 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
- 57 Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyra F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13031-13036
- 58 Szanya V, Ermann J, Taylor C, Holness C, Fathman CG. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol* 2002; 169: 2461-2465
- 59 Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192: 303-310
- 60 Zelenika D, Adams E, Humm S, Graca L, Thompson S, Cobbold SP, Waldmann H. Regulatory T cells overexpress a subset of Th2 gene transcripts. *J Immunol* 2002; 168: 1069-1079
- 61 Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 430-435
- 62 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061
- 63 Shevach EM. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 2001; 193: F41-46
- 64 Tommasini A, Ferrari S, Moratto D, Badolato R, Boniotti M, Pirulli D, Notarangelo LD, Andolina M. X-chromosome inactivation analysis in a female carrier of FOXP3 mutation. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 127-130
- 65 Schramm C, Huber S, Protschka M, Czochra P, Burg J, Schmitt E, Lohse AW, Galle PR, Blessing M. TGFbeta regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *Int Immunol* 2004; 16: 1241-1249
- 66 Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875-1886
- 67 Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 2001; 14: 205-215
- 68 Mamura M, Lee W, Sullivan TJ, Felici A, Sowers AL, Allison JP, Letterio JJ. CD28 disruption exacerbates inflammation in Tgf-beta1-/- mice: in vivo suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells independent of autocrine TGF-beta1. *Blood* 2004; 103: 4594-4601
- 69 Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003; 197: 111-119
- 70 Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2: 816-822
- 71 Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742
- 72 Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, Roberts AB, Deng C. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. *EMBO J* 1999; 18: 1280-1291
- 73 Melgar S, Yeung MM, Bas A, Forsberg G, Suhr O, Oberg A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. Overexpression of interleukin 10 in mucosal T cells of patients with active ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 127-137

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 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 •

专家门诊

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

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

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

0 引言；1 诊断；2 治疗；3 特色；4 门诊时间

凋亡途径与肿瘤治疗

汤睿, 朱正纲

汤睿, 朱正纲, 上海第二医科大学附属瑞金医院 上海消化外科研究所 上海市 200025
上海市卫生局重点学科建设科研课题, No. 05 III 005
通讯作者: 朱正纲, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海第二医科大学附属瑞金医院, 上海消化外科研究所. zzg1954@hotmail.com
电话: 021-64370045-611003 传真: 021-64373909
收稿日期: 2005-07-25 接受日期: 2005-08-10

摘要

经典的凋亡途径是指死亡受体途径和线粒体途径, 其调控可通过死亡受体、线粒体、凋亡抑制蛋白和Caspase酶等多个水平实现, 也受相关传导通路信号的调节. 凋亡与肿瘤的发生、发展和治疗密切相关, 利用有关的凋亡诱导和调控机制诱导肿瘤细胞凋亡已经成为治疗肿瘤的一个重要途径, 我们即对该方面的研究进展进行综述.

汤睿, 朱正纲. 凋亡途径与肿瘤治疗. 世界华人消化杂志 2005;13(20): 2469-2472
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2469.asp>

0 引言

细胞凋亡是由于内外环境变化或死亡信号触发, 在相关基因调控下引起的细胞主动死亡过程. 在生理状态下能消除机体内老化细胞及潜在性异常生长细胞, 对于保持机体稳态发挥重要作用. 凋亡调控失调可引起人体多种疾病, 也是肿瘤发生的重要原因之一, 近年研究也发现化疗等多种抗肿瘤治疗的部分机制与诱导凋亡有关. 因此, 阐明凋亡的相关机制以及利用凋亡机制对肿瘤进行治疗具有重要意义. 本文概要回顾了主要的凋亡机制及调节手段, 并对利用凋亡机制治疗肿瘤方面的研究进展作一简要综述.

1 主要凋亡途径和相关调控机制

尽管有关凋亡机制的研究在近十多年得到了很大的进展, 但能够确切详尽解释细胞凋亡, 尤其是哺乳动物细胞凋亡的机制并不多, 目前为广大学者普遍接受的经典途径有以下两条: (1)死亡受体途径:即通过死亡配体与相应的位于细胞表面的死亡受体, 主要是TNFR家族受体(包括TNFR1、TNFR2、Fas、DR4、DR5等)结合, 配体受体结合后死亡受体胞内段的死亡域吸引衔接蛋白(如FADD、TRADD)并募集Caspase 8, 10的前体, 形成死亡诱导信号复合物(DISC), 产生有活性的启动Caspase, 再激活Caspase 3, 6, 7等效应Caspase, 从而诱导细胞凋亡. (2)线粒体途径: 各种凋亡信号, 如DNA损伤、外来刺激、生长因

子去除以及部分化疗药物可以诱导线粒体释放细胞色素C(cytochrome C, Cyto C)、Smac/Diablo等促凋亡多肽进入细胞质, Cyto C与凋亡蛋白酶激活因子(Apaf-1)结合, 募集Caspase 9前体形成凋亡小体(apoptosome), 产生具有活性的Caspase 9, 再激活下游的效应Caspase诱导凋亡.

细胞凋亡受到严格而复杂的调控, 其调控手段可通过死亡受体、线粒体、凋亡抑制蛋白和Caspase酶等多个水平实现, 也受到相关信号转导通路信号的调节. 比如, 通过细胞表面死亡受体的表达变化, 自分泌、旁分泌途径或外来死亡受体配体的种类和量的变化调节死亡受体途径; 通过Bcl-2家族成员在细胞内定位的改变, 促凋亡和抗凋亡Bcl-2家族蛋白含量比例的变化调节线粒体途径; 凋亡诱导过程中Caspase激活和已活化Caspase受到凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)的抑制; 某些内源或外源信号可以激活p53, p53可通过校验点功能、调节促凋亡和抗凋亡Bcl-2家族蛋白含量比例以及促进活性氧的产生抑制凋亡; NF- κ B信号通路的激活可以上调多种抑制凋亡的有关蛋白, 从而抑制凋亡等等. 当然, 通过以上调控, 细胞是否最终发生凋亡取决于促凋亡和抗凋亡因素的对比.

2 诱导凋亡的肿瘤治疗

肿瘤细胞通常具有一定的凋亡抵抗机制, 利用细胞凋亡机制针对肿瘤的治疗也就是在凋亡调节的各个水平上使促凋亡和抗凋亡的平衡发生改变, 诱导肿瘤细胞凋亡. 从近年的研究来看, 主要针对以下几个环节.

2.1 针对死亡受体 死亡受体是一大类家族, 目前研究比较详细的是TNF受体家族, 目前发现的包括TNFR1、TNFR2、Fas、DR4、DR5等十几个成员, 不同受体与其相应的死亡配体结合启动凋亡的下游途径, 竞争性抗体也可激活下游途径, 目前主要的研究方向是利用相应配体和竞争性抗体作为治疗手段.

2.1.1 肿瘤坏死因子 α (TNF α) TNF α 被引入肿瘤治疗已经有很长的历史, 从诱导凋亡角度主要是通过TNFR1, 体外研究中TNF α 具有强大的诱导凋亡作用, 但其实际临床疗效欠佳, 且副作用大, 只有大剂量的局部肢体灌注可能用于临床^[1].

2.1.2 针对Fas-FasL系统 对凋亡机制的研究发现激活Fas具有强大的诱导凋亡作用, 因此针对Fas的凋亡治疗得以开展. 对于不表达或低表达Fas的肿瘤, 可通过上调Fas的表达诱导肿瘤细胞凋亡, 如安息香酸衍生物TAC-101诱导

结肠癌细胞凋亡^[2]、化疗药物DOX^[3]对Lewis肺癌抗肿瘤作用的部分机制就是通过上调Fas表达实现的。对于高表达Fas的肿瘤,则可应用抗Fas抗体诱导凋亡,然而抗Fas抗体的全身应用却可导致实验动物的肝功能衰竭乃至死亡,不可能应用于临床^[4]。尽管如此,由于大部分人类肿瘤存在p53的缺失或失活,而针对死亡受体的凋亡诱导并不依赖于p53,所以此种方式仍具有吸引力^[5],要改善的是细胞选择性。此外,通过基因治疗手段体外转染使肝癌细胞表达FasL也可增加其凋亡率^[6]。

2.1.3 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 近年来,应用TRAIL诱导肿瘤细胞凋亡的治疗受到学者的广泛关注,TRAIL与细胞表面的DR4、DR5受体特异性结合,通过死亡结构域激发和传导凋亡信号诱导细胞凋亡^[1]。相对于TNF α 、FasL,TRAIL安全性好,也更具有临床应用前景。灵长类动物静脉注射实验表明即使高剂量也无明显毒副作用^[7]。主要原因是正常细胞能表达不具备诱导凋亡下游效应的诱骗受体(DcR1、DcR2),而诱骗受体在肿瘤细胞不表达,因此TRAIL治疗具有肿瘤特异性^[5,7]。从目前研究来看,重组的可溶性TRAIL对包括大肠癌、肺癌、乳癌、肾癌、脑肿瘤、黑色素瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、尤文氏瘤、骨肉瘤、成神经细胞瘤、白血病、淋巴瘤等多种肿瘤细胞系具有广谱的诱导凋亡作用^[7,8],对大肠癌、乳癌、神经胶质瘤、多发性骨髓瘤等多种异位移植瘤具有抑制作用^[1,7,8]。此外,针对DR4、DR5受体的单抗对肿瘤细胞系和肿瘤种植模型也具有抗肿瘤作用^[9,10]。尽管如此,某些肿瘤对TRAIL治疗仍有抵抗作用,但一些报道表明TRAIL联合化疗和放疗时,能增加肝癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌等肿瘤细胞对TRAIL的敏感性,获得对多种实体肿瘤的抗肿瘤活性,联合应用具有协同作用^[7,11-16]。其机制可能是:竞争性TRAIL受体R1和R2的转录活性上升;化疗药物引起抗凋亡蛋白如Bcl-2、Bcl-X_L或FLIP的下调;上调促凋亡分子,包括Caspase、FADD等^[16-18]。由于上述原因,TRAIL结合临床常规的放化疗可能是最有前途的。

2.2 针对Bcl-2蛋白家族 Bcl-2家族在调节线粒体途径中发挥了至关重要的作用。家族中的抗凋亡蛋白成员包括Bcl-2、Bcl-X_L和Mcl-1等,促凋亡蛋白包括Bax、Bik、Bad和仅有BH3结构域的Bid、Bim、PUMA等BH3蛋白,这些蛋白多定位于细胞内的膜结构上,尤其是线粒体膜上。凋亡诱导过程中,Bax等促凋亡蛋白从细胞质转移至线粒体外膜,改变线粒体膜的通透性,使Cyto C释放入细胞质;BH3蛋白也可通过Bid蛋白剪切、Bad蛋白磷酸化和Bim蛋白从微管复合物上解离等促进凋亡发生。而抗凋亡蛋白Bcl-2或Bcl-X_L能阻止Bax或Bak激活并移位至线粒体外膜,或直接作用于线粒体膜通路从而阻止Cyto C释放,并可至少部分阻断BH3蛋白的作用。Bcl-2家族蛋白的

突变和表达变化能极大地改变细胞对药物的反应性。治疗角度,目前主要是通过拮抗Bcl-2家族抗凋亡蛋白或降低其水平来达到促进肿瘤细胞凋亡的目的。研究表明,反义寡核苷酸治疗具有良好的耐受性^[19],能增加许多细胞毒性药物的抗癌作用。多项对淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤等血源性肿瘤的各期临床研究表明反义治疗有效^[20],在胃癌、胰腺癌、肝癌、胆管癌等消化道肿瘤的体外和动物移植瘤实验中反义治疗能够诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤生长^[21-25]。此外,三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病的研 究也提示下调Bcl-2是诱导肿瘤细胞凋亡的机制之一^[26]。Bcl-2、Bcl-X_L的竞争物正在研究中,设计的竞争物模拟BH3蛋白,用于治疗Bcl-2水平增高的肿瘤,结合传统化疗可增加凋亡率^[27-30]。

2.3 针对IAPs IAPs是凋亡调控的另一类重要蛋白,目前在人体中已发现的成员包括XIAP、NAIP、c-IAP1、c-IAP2、Survivin、BRUCE和ML-IAP。其抑制凋亡作用主要是通过直接抑制Caspase蛋白酶的活性实现。许多人类肿瘤存在XIAP和Survivin等IAPs的高表达^[31],因此,用药理措施干预IAPs的表达以恢复肿瘤细胞对凋亡信号的敏感性也引起了学者的兴趣。应用反义治疗下调IAPs水平可增加细胞对死亡受体刺激的敏感性,有报道下调XIAP能诱导胃癌细胞凋亡并增加细胞对化疗药物的敏感性^[32]。同时,IAPs也可被线粒体释放的Smac/Diablo蛋白所抑制,这种负性调节作用主要通过Smac/Diablo与IAPs竞争Caspase结合位点、消除IAPs对Caspase活性的抑制作用实现的^[33]。对恶性胶质瘤^[34]和非小细胞肺癌^[35]的体内外实验证实,应用Smac激动剂能够增加原先对TRAIL和细胞毒性药物耐受肿瘤的治疗敏感性,因此也具有临床应用前景。

2.4 针对NF- κ B 许多肿瘤细胞存在NF- κ B的组成性激活,NF- κ B的下游基因与肿瘤的发生、发展等多个环节有关,其中也包括多种抗凋亡蛋白,如Bcl-2、Bcl-X_L、Bfl-1、cIAP1、cIAP2、TRAF1、TRAF2等,NF- κ B通过诱导或上调这些抗凋亡蛋白抑制凋亡^[36],同时也有报道NF- κ B能促进Fas、FasL、DR4和DR5的表达,在某些特定的情况下促进凋亡^[37],但总体而言,NF- κ B的组成性激活有助于肿瘤细胞逃脱凋亡。同时,NF- κ B也可被外来刺激如细胞因子、化疗药物等激活,这也是肿瘤细胞对化疗药物产生耐受的原因之一^[36]。由于以上发现,使NF- κ B可能成为肿瘤治疗的新靶标。通过抑制NF- κ B的活性增加肿瘤细胞对放化疗的敏感性,可能成为新的放化疗辅助措施。目前可应用的方法和药物包括:转染I κ B- α 突变体阻断NF- κ B活化;针对NF- κ B亚基设计的反义寡核苷酸治疗直接封闭NF- κ B的转录;抗氧化剂PDTC、calpain抑制剂抑制NF- κ B激活;蛋白酶抑制剂PSI、PS-341等阻止I κ B- α 磷酸化等;一些传统药物如糖皮质激素、水杨酸类、砷剂和全反式维甲酸等经证实也是NF- κ B抑制剂,可能更适合应用于临床^[36,38,39]。

2.5 针对Caspase 启动Caspase在诱导凋亡的起始阶段起了关键作用, 而效应Caspase则是诱导细胞凋亡的最终执行者, 因此抗肿瘤药物对Caspase的激活能力也决定了药物诱导凋亡的能力. 各种化疗药物在诱导肿瘤细胞凋亡过程中常伴有各种Caspase活性的增高. 同时, 部分肿瘤细胞存在Caspase的表达缺失而影响Caspase激活, 此种表达缺失可由于基因表达突变或促进子的过度甲基化引起, 转染Caspase 3^[40,41]、Caspase 8^[42,43]和去甲基化治疗^[44]能够增加死亡受体诱导或放化疗诱导凋亡的敏感性.

总之, 随着对凋亡机制的深入研究, 我们对肿瘤的抵抗凋亡能力、各种治疗诱导肿瘤细胞凋亡、肿瘤细胞对药物诱导凋亡的耐受性等有关机制都有了更多的了解, 这为我们利用凋亡机制治疗肿瘤提供了更多的手段. 如上所述, 砷剂、NF- κ B抑制剂中的传统药物已经应用于临床, TRAIL及其与放化疗的结合、各种反义治疗正处于临床试验阶段, 并很有希望在不久的将来应用于临床, 而针对不同靶点的基因治疗尚处于探索阶段, 在体外有效的方法是否能应用于体内需要继续研究探讨. 然而由于不同肿瘤的特点各不相同, 这些治疗手段和相应的治疗方案也并不完善, 因此还需要更多进一步的实验和临床研究进行筛选和完善.

3 参考文献

- Wajant H, Gerspach J, Pfizenmaier K. Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 55-76
- Sako T, Nakayama Y, Minagawa N, Inoue Y, Onitsuka K, Katsuki T, Tsurudome Y, Shibao K, Hirata K, Nagata N, Ohie S, Kohno K, Itoh H. 4-[3,5-Bis(trimethylsilyl)benzamido] benzoic acid (TAC-101) induces apoptosis in colon cancer partially through the induction of Fas expression. *In Vivo* 2005; 19: 125-132
- Yoshimoto Y, Kawada M, Ikeda D, Ishizuka M. Involvement of doxorubicin-induced Fas expression in the antitumor effect of doxorubicin on Lewis lung carcinoma in vivo. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 281-288
- Kakinuma C, Takagaki K, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S, Uemura A, Shibutani Y. Acute toxicity of an anti-Fas antibody in mice. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 412-420
- El-Deiry WS. Insights into cancer therapeutic design based on p53 and TRAIL receptor signaling. *Cell Death Differ* 2001; 8: 1066-1075
- Chen J, Su XS, Jiang YF, Gong GZ, Zheng YH, Li GY. Transfection of apoptosis related gene Fas ligand in human hepatocellular carcinoma cells and its significance in apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2653-2655
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shakhrokh Z, Schwall RH. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; 104: 155-162
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003; 10: 66-75
- Chuntharapai A, Dodge K, Grimmer K, Schroeder K, Marsters SA, Koeppen H, Ashkenazi A, Kim KJ. Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. *J Immunol* 2001; 166: 4891-4898
- Ichikawa K, Liu W, Zhao L, Wang Z, Liu D, Ohtsuka T, Zhang H, Mountz JD, Koopman WJ, Kimberly RP, Zhou T. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 2001; 7: 954-960
- Yamamoto T, Nagano H, Sakon M, Wada H, Eguchi H, Kondo M, Damdinsuren B, Ota H, Nakamura M, Wada H, Marubashi S, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Yagita H, Monden M. Partial contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway to antitumor effects of interferon-alpha/5-fluorouracil against hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7884-7895
- Ganten TM, Haas TL, Sykora J, Stahl H, Sprick MR, Fas SC, Krueger A, Weigand MA, Grosse-Wilde A, Stremmel W, Krammer PH, Walczak H. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitization of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ* 2004; 11: S86-S96
- Chen XP, He SQ, Wang HP, Zhao YZ, Zhang WG. Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors and anti-tumor effects of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2433-2440
- Zhu H, Zhang L, Huang X, Davis JJ, Jacob DA, Teraishi F, Chiao P, Fang B. Overcoming acquired resistance to TRAIL by chemotherapeutic agents and calpain inhibitor I through distinct mechanisms. *Mol Ther* 2004; 9: 666-673
- Xu ZW, Kleeff J, Friess H, Buchler MW, Solioz M. Synergistic cytotoxic effect of TRAIL and gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2003; 23: 251-258
- Shankar S, Chen X, Srivastava RK. Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. *Prostate* 2005; 62: 165-186
- Han J, Goldstein LA, Gastman BR, Rabinovitz A, Wang GQ, Fang B, Rabinowich H. Differential involvement of Bax and Bak in TRAIL-mediated apoptosis of leukemic T cells. *Leukemia* 2004; 18: 1671-1680
- Olsson A, Diaz T, Aguilar-Santelises M, Osterborg A, Celsing F, Jondal M, Osorio LM. Sensitization to TRAIL-induced apoptosis and modulation of FLICE-inhibitory protein in B chronic lymphocytic leukemia by actinomycin D. *Leukemia* 2001; 15: 1868-1877
- Morris MJ, Tong WP, Cordon-Cardo C, Drobnjak M, Kelly WK, Slovin SF, Terry KL, Siedlecki K, Swanson P, Rafi M, DiPaola RS, Rosen N, Scher HI. Phase I trial of BCL-2 antisense oligonucleotide (G3139) administered by continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 679-683
- Chanan-Khan A. Bcl-2 antisense therapy in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol* 2004; 16: 581-585
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Toge T. Preclinical evaluation of antisense bcl-2 as a chemosensitizer for patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2004; 101: 2177-2186
- Wacheck V, Heere-Ress E, Halaschek-Wiener J, Lucas T, Meyer H, Eichler HG, Jansen B. Bcl-2 antisense oligonucleotides chemosensitize human gastric cancer in a SCID mouse xenotransplantation model. *J Mol Med* 2001; 79: 587-593
- Xu Z, Friess H, Solioz M, Aebi S, Korc M, Kleeff J, Buchler MW. Bcl-x(L) antisense oligonucleotides induce apoptosis and increase sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Int J Cancer* 2001; 94: 268-274
- Baba M, Iishi H, Tatsuta M. *In vivo* electroporetic transfer of bcl-2 antisense oligonucleotide inhibits the development of hepatocellular carcinoma in rats. *Int J Cancer* 2000; 85: 260-266
- Kim JH, Liu L, Lee SO, Kim YT, You KR, Kim DG. Susceptibility of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65: 6312-6320
- Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, Tang W, Li XS, Xiong SM, Shen ZX, Sun GL, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Gazin C, Naoe T, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia:

- As2O3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 1996; 88: 1052-1061
- 27 Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435: 677-681
- 28 Wang S, Yang D, Lippman ME. Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin Oncol* 2003; 30: 133-142
- 29 Baell JB, Huang DC. Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 851-863
- 30 Kutzki O, Park HS, Ernst JT, Orner BP, Yin H, Hamilton AD. Development of a potent Bcl-x(L) antagonist based on alpha-helix mimicry. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 11838-11839
- 31 Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1796-1803
- 32 Tong QS, Zheng LD, Wang L, Zeng FQ, Chen FM, Dong JH, Lu GC. Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 509-514
- 33 Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 2002; 7: 163-166
- 34 Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma *in vivo*. *Nat Med* 2002; 8: 808-815
- 35 Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, Oh-Hara T, Tsuruo T. Predominant suppression of apoptosis by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res* 2003; 63: 831-837
- 36 Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 883-888
- 37 Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1470: M55-M62
- 38 Orłowski RZ, Baldwin AS Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 2002; 8: 385-389
- 39 Muerkoster S, Arlt A, Witt M, Gehrz A, Haye S, March C, Grohmann F, Wegehenkel K, Kalthoff H, Folsch UR, Schafer H. Usage of the NF-kappaB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2003; 104: 469-476
- 40 Yang XH, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 348-354
- 41 Yang XH, Edgerton S, Thor AD. Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to radiation therapy. *Int J Oncol* 2005; 26: 1675-1680
- 42 Gui JH, Xu YM, Yu CJ, Zhao J, Jia LT, Wang CJ, Yang AG, Qiu DH, Yu WZ, He J. Pro-apoptotic efficiencies of three reconstructed human caspase-8 on cervical cancer cell line HeLa. *AiZheng* 2005; 24: 160-165
- 43 Casciano I, Banelli B, Croce M, De Ambrosio A, di Vinci A, Gelvi I, Pagnan G, Brignole C, Allemanni G, Ferrini S, Ponzoni M, Romani M. Caspase-8 gene expression in neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1028: 157-167
- 44 Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworcniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001; 20: 5865-5877

电编 张敏 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 •

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 页码160, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教研人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wjcd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com。

不同胃黏膜疾病胃蛋白酶原 C 组织原位表达与胃蛋白酶原血清学检测水平的比较

李红梅, 宁佩芳, 袁媛

李红梅, 宁佩芳, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001

国家“十五”科技攻关项目, No.2004BA703B04-02

国家自然科学基金资助项目, No.30171054

通讯作者: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第一附属医院肿瘤研究所第三研究室. yyuan@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-2325666-6153

收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-09-30

In situ expression and serum level of pepsinogen C in different gastric mucosa diseases

Hong-Mei Li, Pei-Fang Ning, Yuan Yuan

Hong-Mei Li, Pei-Fang Ning, Yuan Yuan, the Third Department of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by the National Key Technology Research and Development Program of China during the 10th Five-Year Plan Period, No.2004BA703B04-02, and the National Natural Science Foundation of China, No.30171054

Correspondence to: Dr. Yuan Yuan, the Third Department of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan@mail.cmu.edu.cn

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

Abstract

AIM: To explore the matching degree of *in situ* expression and serum level of pepsinogen C (PGC) in different gastric mucosal biopsies, and to evaluate its value in the diagnosis of gastric cancer.

METHODS: A total of 129 gastric mucosa biopsies and its corresponding serum specimens were collected from patients with superficial gastritis ($n = 30$), gastric ulcer or erosion ($n = 35$), atrophic gastritis (29), and gastric cancer ($n = 35$). The expression of PGC in the gastric mucosa was detected by immunohistochemistry, and the concentration of serum pepsinogen A (sPGA) and pepsinogen C (sPGC) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The positive rate of PGC antigen expression decreased in the tissues of superficial gastritis (100%), gastric ulcer or erosion (80.00%), atrophic gastritis (34.48%), and gastric cancer (11.43%) in sequence ($P < 0.05$). The expression rate decreased as the increase of the disease severity. There was no statistical difference in the concentration of sPGA and sPGC among the above

4 groups. The ratio of sPGA to sPGC in the superficial gastritis, gastric ulcer or erosion, atrophic gastritis, and gastric cancer was 11.55 ± 0.69 , 9.39 ± 0.86 , 8.86 ± 0.63 , and 6.83 ± 0.68 , respectively ($P < 0.05$), and decreased as the reduction of the PGC expression. There was specific correlation between the expression of PGC in gastric mucosa and the ratio of sPGA to sPGC in the serum ($r = 0.297$, $P = 0.001$).

CONCLUSION: Tissue expression of PGC has negative correlation with the severity of the gastric mucosal disease. The ratio of sPGA to sPGC is closely related with the tissue expression of PGC antigen, and it is a convenient and economic index for the screening and diagnosis of gastric cancer.

Key Words: Pepsinogen C; Pepsinogen A; Expression; Serology; Gastric cancer

Li HM, Ning PF, Yuan Y. *In situ* expression and serum level of pepsinogen C in different gastric mucosa diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2473-2476

摘要

目的: 通过对不同类型胃黏膜活检组织胃蛋白酶原(PGC)的表达和血清胃蛋白酶原含量的检测, 研究二者的匹配程度及其在胃癌筛查与诊断中的价值。

方法: 129例胃黏膜活检组织及其血清标本(浅表性胃炎30例, 胃黏膜糜烂溃疡35例, 萎缩性胃炎29例, 胃癌35例), 采用免疫组织化学染色检测胃黏膜标本中PGC的表达情况; 采用酶联免疫吸附实验检测血清PGA(sPGA)和PGC(sPGC)含量。

结果: 30例浅表性胃炎PGC抗原均为阳性表达, 表达率为100%, 而胃黏膜糜烂溃疡、萎缩性胃炎和胃癌组PGC抗原阳性表达率分别为80.00%, 34.48%和11.43%, 其表达率随疾病恶性程度的增加而下降($P < 0.05$)。sPGC、sPGA含量各组间无统计学差异, sPGA/sPGC比值从浅表性胃炎→胃黏膜糜烂溃疡→萎缩性胃炎→胃癌依次下降, 分别为 11.55 ± 0.69 , 9.39 ± 0.86 , 8.86 ± 0.63 , 6.83 ± 0.68 ($P < 0.05$)。sPGA/sPGC比值随其病变组织PGC表达程度的降低而下降, 具有良好的相关性($r = 0.297$, $P = 0.001$)。

结论: PGC的组织表达与胃黏膜细胞恶性程度呈负相关。sPGA/sPGC与PGC抗原组织表达有良好的相关性, 是一个方

便、经济的胃癌及癌前病变筛选和诊断的指标, 具有较好的临床实用价值。

关键词: 胃蛋白酶原C; 胃蛋白酶原A; 表达; 血清学; 胃癌

李红梅, 宁佩芳, 袁媛. 不同胃黏膜疾病胃蛋白酶原C组织原位表达与胃蛋白酶原血清学检测水平的比较. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2473-2476
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2473.asp

0 引言

胃癌普查和胃癌癌前疾病患者的定期随访是发现早期胃癌的重要手段^[1,2], 简单、有效、经济、实用的普查方法是肿瘤学研究的热点, 多年来, 科研人员一直致力于探索诊断胃癌的生物学标志物的研究。

胃蛋白酶原(PG)是一种具有消化功能的内切蛋白酶, 属于天冬氨酸蛋白水解酶。在酸性条件下被激活, 转化为具有消化功能的胃蛋白酶。根据免疫学和生化学特点, 胃蛋白酶原可分为胃蛋白酶原A(PGA)和胃蛋白酶原C(PGC)^[3]。在人类, 胃蛋白酶原C最初出现于胚胎后期, 约胚胎的第32-36周, 是胃黏膜细胞分化成熟, 消化功能逐渐完善的一种标志^[4]。本实验室先期研究表明^[5], PGC组织表达判定胃癌及其癌前疾病的灵敏度及特异度均高, 但胃黏膜组织标本只能通过胃镜活检或术后标本获得, 操作复杂, 成本较高, 作为胃癌普查手段受到一定限制, 因此我们进一步对这些患者的血清标本进行了胃蛋白酶原C的检测, 旨在探讨组织学PGC的表达水平与血清PGC浓度之间的关系, 同时检测血清PGA, 以探讨血清PG水平在胃癌诊断中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 中国医科大学肿瘤研究所第三研究室收集的129例胃黏膜活检组织及其对应的血清标本, 包括浅表性胃炎30例, 胃黏膜糜烂溃疡35例, 萎缩性胃炎29例, 胃癌35例。男76例, 女53例; 年龄16-80岁, 中位年龄51岁, 各病理组在性别及年龄构成上差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.1.2 试剂 抗胃蛋白酶原C抗体(anti-pepsinogen C antibody, 商品名2D5)由日本临床检验研究所惠赠; 免疫组化用SP二步法试剂盒为福建迈新公司产品(Lot No: Kit-9801D2); PGC, PGA ELISA试剂盒购于芬兰百得公司(Cat. NO.6001080)。

1.2 方法

1.2.1 胃蛋白酶原C的免疫组织化学染色(SP二步法) 实验过程按说明书操作。结果判定根据细胞着色强度及阳性细胞数进行综合评分。着色强度以多数细胞呈色程度为准, 凡细胞质或腺腔内黏液着浅棕色者为1分, 棕色者2分, 深棕色者为3分, 不着色为0分; 整块切片中阳性细胞占所有胃黏膜细胞中的比例<30%为1分, 30-70%为2分, >70%

为3分, 无细胞染色为0分。根据上述两项指标的积分数分为4级, 0分为阴性(-); 2-3分为(+); 4分为(++); 5-6分为(+++)。≥2分(+)为阳性表达; ≥4分(++~+++)为过表达或强阳性。

1.2.2 PGA、PGC血清ELISA检测 均严格按照试剂盒说明操作。

统计学处理 利用SPSS 10.0软件包进行统计学处理: PGC的免疫组织化学结果采用 χ^2 检验分析, PGA、PGC血清ELISA检测结果等计量资料采用多组间的单因素方差分析并作组间均数的两两比较, PGC组织原位表达与sPGA、sPGC浓度的关系应用Spearman等级相关分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 各类胃黏膜组织胃蛋白酶原C的动态表达 129例胃黏膜PGC免疫组织化学检测发现30例浅表性胃炎PGC抗原均为阳性表达, 表达率为100%, 而胃黏膜糜烂溃疡、萎缩性胃炎、胃癌PGC抗原阳性表达率分别为80.00%, 34.48%和11.43%。PGC抗原阳性表达率从浅表性胃炎→胃黏膜糜烂溃疡→萎缩性胃炎→胃癌依次逐渐下降。由胃良性疾病到胃癌前疾病, PGC表达率显著下降($P<0.01$); 由胃癌前疾病到胃癌, PGC表达率逐渐下降($P<0.05$)(表1)。PGC主要在细胞质及细胞膜着色, 细胞核内无阳性物质。在浅表性胃炎和胃糜烂溃疡这类胃良性疾病中, PGC表达阳性细胞数多, 着色深。在萎缩性胃炎和胃癌组织中PGC的表达呈灶状分布, 仅个别腺管或细胞中有表达, 并且阳性物质的着色较浅, 综合评分在3分以下。

表1 不同胃黏膜病变PGC组织原位表达及血清PG浓度 (mean±SD, $\mu\text{g/L}$)

	<i>n</i>	PGC阳性 表达(%)	sPGA	sPGC	sPGA/sPGC
浅表性胃炎	30	100.00 ^b	94.20±7.79	10.20±1.92	11.55±0.69 ^b
糜烂溃疡	35	80.00 ^{bc}	92.51±7.62	12.72±1.84	9.39±0.86
萎缩性胃炎	29	34.48 ^{cd}	86.99±7.64	12.22±2.49	8.86±0.63 ^c
胃癌	35	11.43 ^d	73.26±6.09	14.80±2.37	6.83±0.68 ^d

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 胃癌组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 浅表性胃炎组。

2.2 不同胃疾病胃蛋白酶原含量血清学检测 129例患者进行胃黏膜组织学PGC检测的同时, 我们也检测了其血清PGA、PGC的水平。本组测得sPGA含量从浅表性胃炎、胃黏膜糜烂溃疡、萎缩性胃炎到胃癌组依次降低, sPGC浓度从浅表性胃炎、胃黏膜糜烂溃疡、萎缩性胃炎到胃癌组有升高趋势, 但各组间比较均无统计学差异($P>0.05$)。各组sPGA/sPGC比值从浅表性胃炎→胃黏膜糜烂溃疡→萎缩性胃炎→胃癌依次下降, 浅表性胃炎组与胃癌组比较有极显著统计学差异($P<0.01$), 与萎缩性胃炎组相比有显著差异($P<0.05$)(表1)。通过对本组PGC组织原位表达与sPGA、sPGC及sPGA/sPGC的Spearman等级相关分析发

现, sPGA/sPGC的比值下降与其病变组织原位PGC表达的降低呈伴随关系, 两者具有良好的相关性($r = 0.297$, $P = 0.001$).

3 讨论

PGC组织表达的动态变化可以体现不同胃黏膜的分化程度及胃疾病的恶性程度, 随着胃疾病加重, PGC表达减少. PGC表达产物的缺乏可能是胃黏膜细胞恶性转化的结果^[6]. 胃底腺主细胞是胃蛋白酶原的主要来源, 胃癌常伴有胃黏膜萎缩, 导致主细胞被大量破坏, 胃黏膜分泌功能受损^[7]; 同时由于恶性转化的细胞存在分化障碍, 致癌因子使胚细胞中的胃蛋白酶原基因受损突变, 导致胃黏膜细胞的终末分化产物PGC-Ag表达减少^[8]. PGC作为胃分化成熟的一种功能蛋白酶, 在萎缩性胃炎表达显著下降, 说明这类胃疾病与胃良性疾病相比, 细胞分化障碍明显, 生物学特性更接近胃癌. 本研究结果表明, 随着疾病加重, 由胃良性疾病→胃癌前疾病→胃癌, PGC阳性表达率依次逐渐下降, 说明PGC的组织表达与胃癌的发生发展有良好的相关性.

胃蛋白酶原大部分分泌入胃腔, 一小部分酶原透过胃黏膜毛细血管入血. 血清胃蛋白酶原水平可反映胃蛋白酶分泌及胃黏膜的状态和功能^[9-11]. 正常情况下, PGA为血液中PG的主要同功酶, 占总PG的75%, 血清PGA水平明显高于PGC. 这是由于主细胞合成与释放PGA入血速度较快, 代谢清除率较慢. 研究中通过对胃黏膜组织中PGC表达和血清PGC水平比较发现, 随着疾病加重, 胃黏膜组织中PGC表达率逐渐降低, 而其血清PGC水平有所升高, 两者呈不平衡势态, 但各组间sPGC无统计学差异. 究其原因可能由于PGC表达细胞分布较广, 胃外器官如乳腺及前列腺等也产生PGC^[12-14], 因而局灶病变对其影响有限, 因此, 当细胞损伤时, 血清PGC的变化不明显, 表明单独应用血清PGC对胃癌的诊断无显著意义. 文献^[15,16]报道, 胃癌患者血清PGA/PGC比值明显低于正常对照组人群, 对于胃癌的筛查及诊断有一定价值. 我们也发现, 随着患者胃疾病的加重, sPGA/sPGC比值呈逐步下降趋势, 胃良性疾病(浅表性胃炎)与癌前疾病(萎缩性胃炎)和恶性疾病(胃癌)相比差异显著, 表明胃黏膜疾病在从良性到恶性转化的这一质变过程中, 其细胞功能也发生了质的变化, 二者的比值对胃疾病的筛查和诊断具有实际应用价值.

我们通过对不同胃黏膜PGC表达程度及其血清sPGA/sPGC比值变化的比较发现, 随着胃黏膜疾病组织学恶性程度的增加, 组织PGC表达率下降, 同时血清PGA/PGC比值也下降, 二者呈伴随关系, 具有良好的相关性, 这一点互相验证了不同胃黏膜疾病PGC组织学表达程度及其血清PGA/PGC比值测定均可以作为胃癌及其癌前疾病筛查的可靠指标, 有学者曾将血清PGA/PGC比值誉为胃黏膜疾病的“血清学活检”^[11,17].

总之, PGC作为胃疾病发生发展的判定指标在组织学上的意义更大, 而作为血清学的检查方法作用有限, 但如与血清PGA结合, 以sPGA/sPGC比值筛查胃黏膜疾病是一个较好的指标, 而且具有非侵入性、标本方便获得和成本较低的特点, 对胃黏膜疾病的大规模筛查具有实用价值.

4 参考文献

- 1 Lahner E, Caruana P, D'Ambra G, Ferraro G, Di Giulio E, Delle Fave G, Bordi C, Annibale B. First endoscopic-histologic follow-up in patients with body-predominant atrophic gastritis: when should it be done? *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 443-448
- 2 Conchillo JM, Houben G, de Bruine A, Stockbrugger R. Is type III intestinal metaplasia an obligatory precancerous lesion in intestinal-type gastric carcinoma? *Eur J Cancer Prev* 2001; 10: 307-312
- 3 Fernandez R, Vizoso F, Rodriguez JC, Merino AM, Gonzalez LO, Quintela I, Andicoechea A, Truan N, Diez MC. Expression and prognostic significance of pepsinogen C in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 508-514
- 4 Kageyama T, Ichinose M, Tsukada-Kato S, Omata M, Narita Y, Moriyama A, Yonezawa S. Molecular cloning of neonate/infant-specific pepsinogens from rat stomach mucosa and their expression change during development. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 806-812
- 5 宁佩芳, 孙丽萍, 刘慧杰, 袁媛. 胃蛋白酶原C在胃癌及胃癌前疾病诊断中的意义. *中华医学杂志* 2004; 84: 818-821
- 6 Broutet N, Plebani M, Sakarovitch C, Sipponen P, Megraud F. Pepsinogen A, pepsinogen C, and gastrin as markers of atrophic chronic gastritis in European dyspeptics. *Br J Cancer* 2003; 88: 1239-1247
- 7 Whiting JL, Sigurdsson A, Rowlands DC, Hallissey MT, Fielding JW. The long term results of endoscopic surveillance of premalignant gastric lesions. *Gut* 2002; 50: 378-381
- 8 Kitahara F, Kobayashi K, Sato T, Kojima Y, Araki T, Fujino MA. Accuracy of screening for gastric cancer using serum pepsinogen concentrations. *Gut* 1999; 44: 693-697
- 9 Miki K, Morita M, Sasajima M, Hoshina R, Kanda E, Urita Y. Usefulness of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 735-739
- 10 Ley C, Mohar A, Guarner J, Herrera-Goepfert R, Figueroa LS, Halperin D, Parsonnet J. Screening markers for chronic atrophic gastritis in Chiapas, Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 107-112
- 11 Dinis-Ribeiro M, da Costa-Pereira A, Lopes C, Barbosa J, Guilherme M, Moreira-Dias L, Lomba-Viana H, Silva R, Abreu N, Lomba-Viana R. Validity of serum pepsinogen I/II ratio for the diagnosis of gastric epithelial dysplasia and intestinal metaplasia during the follow-up of patients at risk for intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Neoplasia* 2004; 6: 449-456
- 12 Serra C, Vizoso F, Lamelas ML, Rodriguez JC, Gonzalez LO, Merino AM, Baltasar A, Perez-Vazquez MT, Medrano J. Comparative study of two androgen-induced markers (apolipoprotein D and pepsinogen C) in female and male breast carcinoma. *Int J Surg Investig* 2000; 2: 183-192
- 13 Merino AM, Vazquez J, Rodriguez JC, Fernandez R, Quintela I, Gonzalez LO, Sanchez LM, Vizoso F. Pepsinogen C expression in tumors of extragastric origin. *Int J Biol Markers* 2000; 15: 165-170
- 14 Diaz M, Rodriguez JC, Sanchez J, Sanchez MT, Martin A, Merino AM, Vizoso F. Clinical significance of pepsinogen C tumor expression in patients with stage D2 prostate carcinoma. *Int J Biol Markers* 2002; 17: 125-129
- 15 Rojo JV, Merino AM, Gonzalez LO, Vizoso F. Expression and clinical significance of pepsinogen C in epithelial ovarian

- 16 carcinomas. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 104: 58-63
Suzuki H, Masaoka T, Hosoda H, Nomura S, Ohara T, Kangawa K, Ishii H, Hibi T. Plasma ghrelin concentration correlates with the levels of serum pepsinogen I and pepsinogen I/II ratio—a possible novel and non-invasive marker for gastric atrophy. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1249-1254
- 17 Dinis-Ribeiro M, Lopes C, da Costa-Pereira A, Guilherme M, Barbosa J, Lomba-Viana H, Silva R, Moreira-Dias L. A follow up model for patients with atrophic chronic gastritis and intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* 2004; 57: 177-182

电编 张敏 编辑 管鑫妍 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 BRIEF REPORT •

胃癌细胞 PTEN 甲基化与其表达的相关性

邓全军, 于皆平, 刘 芬, 齐元玲, 刘诗权, 于红刚

邓全军, 于皆平, 刘芬, 齐元玲, 刘诗权, 于红刚, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

国家自然科学基金资助项目, No.30300154

通讯作者: 于红刚, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. smiledeng@126.com

电话: 027-88076874

收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-09-30

Relationship between PTEN methylation and its mRNA expression in human gastric cancer cells *in vitro*

Quan-Jun Deng, Jie-Ping Yu, Fen Liu, Yuan-Ling Qi, Shi-Quan Liu, Hong-Gang Yu

Quan-Jun Deng, Jie-Ping Yu, Fen Liu, Yuan-Ling Qi, Shi-Quan Liu, Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30300154

Correspondence to: Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. smiledeng@126.com

Received: 2005-09-10 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the methylation status of the 5'CpG island of PTEN promoter region

and the mRNA expression of PTEN gene in gastric cancer cell lines *in vitro*.

METHODS: The methylation status of PTEN promoter region and expression of PTEN mRNA in gastric cancer cell lines SGC-7901 (moderately differentiated), BGC-823 (lowly differentiated), MGC-803 (lowly differentiated), HGC-27 (non-differentiated) were measured by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) and semi-quantitative reverse transcription PCR, respectively.

RESULTS: The methylation of PTEN gene in promoter region was found in HGC-27, MGC-803, and BGC-823 cells, but not in SGC-7901 ones. HGC-27 cells had the highest methylation level of PTEN gene (138.217 ± 7.898 , $P < 0.01$), then MGC-803 and BGC-823 cells, and no significant difference was found between MGC and BGC ($P > 0.05$). SGC-7901 cells had the highest expression of PTEN mRNA (0.336 ± 0.079 , $P < 0.01$), then BGC-823, MGC-803 and HGC-27 (lowest, 0.113 ± 0.047 , $P < 0.05$), and there was no significant difference between BGC and MGC ($P > 0.05$). The expression of PTEN mRNA decreased gradually following the increase of the level of PTEN methylation. In addition,

PTEN methylation status and the expression of PTEN mRNA were correlated with the differentiation level of the cancer cells.

CONCLUSION: Hypermethylation may be the main cause that leads to the decrease of the PTEN mRNA expression in gastric cancer, and also it may be the major mechanism that contributes to tumorigenesis and the progression of gastric carcinoma.

Key Words: PTEN gene; Gastric carcinoma; Methylation-specific polymerase chain reaction

Deng QJ, Yu JP, Liu F, Qi YL, Liu SQ, Yu HG. Relationship between PTEN methylation and its mRNA expression in human gastric cancer cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2476-2480

摘要

目的: 探讨胃癌细胞PTEN基因启动子区域甲基化与其mRNA表达的关系。

方法: 采用甲基化特异性PCR法(MSP)检测四种胃癌细胞系SGC-7901(中度分化)、BGC-823(低度分化细胞)、MGC-803(低度分化细胞)、HGC-27中PTEN基因甲基化状态, RT-PCR检测四种胃癌细胞系PTEN表达水平(未分化)。

结果: HGC-27、MGC-803、BGC-823细胞系可检测到PTEN基因启动子的甲基化, SGC-7901细胞未检测到甲基化, 甲基化水平的顺序依次为: HGC-27最高(138.217 ± 7.898 , $P < 0.01$), MGC-803、BGC-823次之($P > 0.05$)。PTEN mRNA表达水平的依次顺序为: SGC-7901最高(0.336 ± 0.079 , $P < 0.01$), BGC-823、MGC-803次之($P > 0.05$), HGC-27表达水平最低(0.113 ± 0.047 , $P < 0.05$), 其表达水平随着其启动子区甲基化水平增高而降低。PTEN mRNA表达及其启动子甲基化水平还与胃癌细胞分化程度相关。

结论: 胃癌细胞PTEN基因启动子区域出现异常甲基化, 可能是导致其mRNA表达异常的主要原因, 也可能是导致胃癌发生、发展的重要机制之一。

关键词: PTEN基因; 胃癌细胞; 甲基化特异的PCR

邓全军, 于皆平, 刘芬, 齐元玲, 刘诗权, 于红刚. 胃癌细胞PTEN甲基化与其表达的相关性. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2476-2480
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2476.asp>

0 引言

10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物基因(PTEN)是近年来发现的一种新的抑癌基因, 定位于染色体10q23.3^[1-3], 具有双重特异性磷酸酶活性, 在细胞的生长发育、凋亡、移动、信号传递等方面起着重要的调控作用。该基因功能的缺失导致其磷酸酶活性剧降, 细胞恶性

增殖能力增强、细胞游走性增加并抑制细胞凋亡。胃癌的发生、发展是一个多步骤、多阶段且有序的过程, 主要是癌基因功能增强、抑癌基因及DNA修复基因突变或功能缺失所致。许多研究证实, PTEN基因在胃癌中失活及表达异常, 并与其发生发展密切相关。DNA甲基化是基因表达的一个重要调节者, PTEN基因由于高甲基化而失活在人类的大肠癌、成胶质细胞瘤、子宫内膜癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、星形细胞瘤、卵巢癌等病中都有报道^[4-10]。因此, 目前认为除了编码区突变外, 启动子区发生甲基化也是导致抑癌基因功能缺失的机制之一。我们采用敏感的甲基化特异性PCR法(MSP)和RT-PCR检测胃癌细胞PTEN启动子区域CpG岛甲基化状态及其表达水平, 以探讨PTEN甲基化改变、PTEN表达异常与胃癌发生、发展的关系, 为胃癌的发生、发展机制提供分子生物学依据, 并为胃癌防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 SGC-7901、BGC-823、MGC-803、HGC-27细胞由本室保存。其中, SGC-7901为中度分化细胞, BGC-823、MGC-803为低度分化细胞, HGC-27为未分化细胞。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640培养基购自Gibco公司, MMLV逆转录酶购自Promega公司, Taq酶购自Biostar公司。PTEN甲基化和未甲基化二套引物和内参引物由上海生物工程技术有限公司合成。亚硫酸氢钠、氢醌均购自Sigma公司, Wizard DNA clean up system购自Promega公司, Sss-I酶购自New England Biolabs公司, 蛋白酶K、Rnase A、平衡酚、异丙醇、乙酸钠、碘化钠等均购自武汉生命技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901、BGC-823、MGC-803、HGC-27细胞接种于含10 mL/L小牛血清(56℃灭活30 min)、 100×10^3 U/L青霉素及 100×10^3 U/L链霉素的pH7.2的RPMI 1640培养液中, 在37℃、50 mL/L的CO₂培养箱中培养。

1.2.2 RT-PCR检测胃癌细胞PTEN mRNA表达水平 Trizol试剂提取细胞总RNA, 用紫外可见分光光度仪检测RNA的纯度及浓度, 每种取总RNA 1 μg用MMLV逆转录酶进行逆转录, PCR扩增PTEN, 同时扩增β-actin作为内参。PTEN引物序列: 上游引物: 5'-ACCAGTGGCACTGTTGT TTCAC3'; 下游引物: 5'-TTCCTCTGGTCCTGGTATGAA G3'; 产物长度289 bp。内参照β-actin引物系列: 上游引物: 5'-CGAGCGGGAAATCGTGC GTGACATTAAGGAGA3'; 下游引物: 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACA TCTGC3'; 产物长度479 bp。PTEN PCR反应条件: 94℃ 3 min预变性后开始20个循环: 94℃ 30 s、54℃ 30 s、72℃ 45 s, 最后于72℃延伸7 min, β-actin PCR反应条件: 94℃ 3 min预变性后开始循环: 94℃ 40 s、56℃ 45 s,

研究证实,在人类的胃癌中也普遍存在PTEN失活现象及表达的异常^[17-20],并且其失活与胃癌的发生、发展密切相关^[21,22]。目前认为,突变、缺失及异常甲基化是导致PTEN基因失活的主要机制^[21,23-27]。但研究表明,PTEN基因的突变、缺失在胃癌的发生、发展中不起主要作用^[28,29],因此其启动子CpG岛区域甲基化状况与胃癌发生、发展的关系就成为瞩目的焦点。在本实验中四种胃癌细胞系中有三种可检测到PTEN启动子区CpG岛的甲基化状态,并且胃癌细胞PTEN基因CpG岛甲基化水平与细胞分化程度相关,说明PTEN发生甲基化参与了胃癌的进展,这也表明启动子甲基化与胃癌的发生、发展关系密切。

PTEN蛋白没有SH2结构,也没有跨膜信号,它是定位于细胞质的一种磷酸酶,其5'端非翻译区含有多个CpG岛,因此有学者推测,细胞可以通过甲基化而下调PTEN的mRNA表达量,从而在RNA水平调控PTEN蛋白表达量。本实验结果显示,在三种胃癌细胞系中都检测到PTEN启动子区CpG岛的甲基化状态,且细胞甲基化水平越高,其mRNA表达水平越低,后者的表达水平随着前者甲基化的增高而降低,这表明PTEN启动子甲基化与其mRNA表达量密切相关。据此我们推测,在胃癌细胞中,PTEN启动子区CpG岛发生甲基化将直接导致其mRNA表达减少或无表达,进而使其蛋白表达异常,以致该基因失活,这也与国外学者Kang *et al*^[21]的报道相一致;PTEN因甲基化而失活后将导致与肿瘤发生、发展相关的一系列生物学行为的改变,例如细胞增殖与凋亡失调,肿瘤侵袭转移能力增强等,从而也说明PTEN基因甲基化在胃癌的发生、发展中同样起着至关重要的作用。但Sato *et al*^[29]也对胃癌PTEN基因甲基化状态进行了检测,结果显示:PTEN作为抑制基因,并未参与胃癌的发生、发展,这可能是由于PTEN基因启动子区富含的CpG岛并未全部发生甲基化,且所设计的引物并未能针对已发生甲基化的区域扩增,故仅仅只扩增出未甲基化产物。

另外我们发现,PTEN甲基化及其mRNA表达与细胞分化程度相关,即PTEN甲基化水平高且其mRNA表达水平低的细胞分化程度低。一般来说,细胞分化程度越低,其恶性程度就越高,病人预后越差,因此我们可以通过对上述两个指标的检测来达到预测肿瘤恶性程度及预后的目的。还有研究提示^[12],胃癌中PTEN基因异常甲基化可能与EB病毒感染有关,因EB病毒感染阳性胃癌中PTEN启动子甲基化率为76.2%(16/21),而EB病毒阴性胃癌者仅为25%(14/56)。故此我们展望能够通过清除EB病毒的策略来防止PTEN基因发生异常甲基化,从而达到预防与治疗肿瘤的目的。

我们通过对PTEN基因甲基化状态及其表达的研究,表明PTEN基因启动子区域出现异常甲基化,可能是导致PTEN基因mRNA表达异常的主要原因,也可能是导致该基因失活的重要机制之一,这将有助于揭示胃癌的发

生、发展机制,也为肿瘤的防治提供了新的思路。另外对PTEN表达及其甲基化状态的检测也将有助于判断肿瘤的恶性程度和预后。以上结果仅从基因水平分析PTEN在胃癌发生发展中的异常改变,其参与肿瘤发生发展的机制还有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-362
- 2 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovannella BC, Iltmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- 3 Li DM, Sun H. TEPI1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; 57: 2124-2129
- 4 Garcia JM, Silva J, Pena C, Garcia V, Rodriguez R, Cruz MA, Cantos B, Provencio M, Espana P, Bonilla F. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41: 117-124
- 5 Yu J, Zhang H, Gu J, Lin S, Li J, Lu W, Wang Y, Zhu J. Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. *BMC Cancer* 2004; 4: 65
- 6 Schondorf T, Ebert MP, Hoffmann J, Becker M, Moser N, Pur S, Gohring UJ, Weisshaar MP. Hypermethylation of the PTEN gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett* 2004; 207: 215-220
- 7 Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta Neuropathol* 2003; 106: 479-485
- 8 Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, Gruber P, MacDonald ND, Ryan A, Jacobs IJ, Akslen LA, Das S. Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression. *Int J Oncol* 2004; 25: 1615-1623
- 9 Soria JC, Lee HY, Lee JL, Wang L, Issa JP, Kemp BL, Liu DD, Kurie JM, Mao L, Khuri FR. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1178-1184
- 10 Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res* 2004; 64: 3014-3021
- 11 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826
- 12 Kang GH, Lee S, Kim WH, Lee HW, Kim JC, Rhyu MG, Ro JY. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 787-794
- 13 Gu J, Tamura M, Pankov R, Danen EH, Takino T, Matsumoto K, Yamada KM. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* 1999; 146: 389-403
- 14 Leslie NR, Downes CP. PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal* 2002; 14: 285-295
- 15 Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-

- activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* 1998; 143: 1375-1383
- 16 Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4240-4245
- 17 Li JY, Zheng HC, Yang L, Xu L, Yang XF, Gao H, Zhang YC, Xin Y. Altered expression of PTEN gene and LOH of its epigenetic microsatellite in gastric carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004; 26: 389-392
- 18 周庆华, 刘丽娜, 吕申, 王梅, 刘春英. 胃癌组织PTEN、cyclinE表达与幽门螺旋杆菌感染的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2560-2563
- 19 Sun H, Zheng H, Yang X, Wu D, Zhang S, Kuang L, Xin Y. Expression of PTEN and Caspase-3 and their clinicopathological significance in primary gastric malignant lymphoma. *Chin Med Sci J* 2004; 19: 19-24
- 20 Fei G, Ebert MP, Mawrin C, Leodolter A, Schmidt N, Dietzmann K, Malfertheiner P. Reduced PTEN expression in gastric cancer and in the gastric mucosa of gastric cancer relatives. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 297-303
- 21 Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 285-291
- 22 Zheng HC, Chen Y, Kuang LG, Yang L, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. Expression of PTEN-encoding product in different stages of carcinogenesis and progression of gastric carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003; 25: 13-16
- 23 Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, Issa JP. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 1999; 59: 5438-5442
- 24 Li YL, Tian Z, Wu DY, Fu BY, Xin Y. Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of tumor suppressor gene PTEN in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 285-288
- 25 Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Park JI, Chae KS, Kim HJ, Chi SG. Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 104: 318-327
- 26 Lu QJ, Zhao XD, Song JY, Li XH, Ma Y, Meng H, Jiang WG. Research on the mechanisms of PTEN gene inactivation in ovarian cancer. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2005; 34: 266-269
- 27 Wang JY, Huang TJ, Chen FM, Hsieh MC, Lin SR, Hou MF, Hsieh JS. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in advanced gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2003; 442: 437-443
- 28 Chang JG, Chen YJ, Perng LI, Wang NM, Kao MC, Yang TY, Chang CP, Tsai CH. Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in cancers of the digestive tract. *Eur J Cancer* 1999; 35: 647-651
- 29 Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, Endoh Y, Sakata K, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Terashima M, Nishizuka S, Zou T, Meltzer SJ. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer. *Virchows Arch* 2002; 440: 160-165

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 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 BRIEF REPORT •

潘托拉唑对胃黏膜损伤保护作用及其机制

乐桥良, 张志坚, 林克荣, 王雯

乐桥良, 张志坚, 林克荣, 王雯, 南京军区福州总医院消化科 福建省福州市 350025

通讯作者: 乐桥良, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 南京军区福州总医院消化科. leql@sina.com

电话: 0591-87893856

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Protective effect of pantoprazole on gastric mucosal lesions in rats and

its mechanism

Qiao-Liang Le, Zhi-Jian Zhang, Ke-Rong Lin, Wen Wang

Qiao-Liang Le, Zhi-Jian Zhang, Ke-Rong Lin, Wen Wang, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Correspondence to: Qiao-Liang Le, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou

350025, Fujian Province, China. leql@sina.com
Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-06

Abstract

AIM: To explore the protective effect of pantoprazole on the gastric mucosal lesions in rats and its related mechanism.

METHODS: Before the gastric mucosal lesion was induced by pure alcohol, the rats were intravenously injected with pantoprazole (20 mg/kg), *N* ω -nitro-*L*-arginine methyl ester (*L*-NAME, 4 mg/kg), and *L*-arginine (250 mg/kg). The gastric mucosal blood flow (GMBF) was detected by laser Doppler flowmetry (LDF), and the level of NO $_2^-$ /NO $_3^-$ in the gastric mucosa and serum was measured by cadmium granulation reduction and colorimetric method. The ulcer index (UI), the severity of tissue necrosis, and neutrophils infiltration were observed.

RESULTS: Compared with that in the control group, the UI was significantly decreased (5.7 ± 2.1 vs 25.4 ± 2.5 , $P < 0.01$), and the degrees of tissue necrosis and neutrophils infiltration were markedly lightened. The protective effect of pantoprazole was significantly decreased by *L*-NAME. The inhibitory effect of *L*-NAME was antagonized by prior administration of *L*-arginine. The GMBF and the content of NO $_2^-$ /NO $_3^-$ in gastric mucosa and serum were increased by the intravenous administration of pantoprazole. This effect was prevented by the pretreatment of *L*-NAME, but the antisecretion effect of pantoprazole was not affected by *L*-NAME.

CONCLUSION: Pantoprazole can protect gastric mucosa against the lesions in rats by the mediation of nitric oxide (NO), and the protective effect has no relation with its antisecretion action of gastric acid.

Key Words: Pantoprazole; Gastric mucosal lesion; Cytoprotection; Nitric oxide

Le QL, Zhang ZJ, Lin KR, Wang W. Protective effect of pantoprazole on gastric mucosal lesions in rats and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2480-2484

摘要

目的: 探讨潘托拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护的作用及其机制。

方法: 在乙醇诱导大鼠胃黏膜损伤前, 预先给予(iv)潘托拉唑(20 mg/kg)、*L*-硝基-精氨酸甲酯(*L*-NAME, 4 mg/kg)及*L*-精氨酸(250 mg/kg)。采用激光多普勒血流计(LDF)测定胃黏膜血流量(GMBF), 采用镉粒还原和比色法测定胃黏膜和血浆

NO $_2^-$ /NO $_3^-$ 含量, 并观察了胃黏膜损伤指数(ulcer index, UI)、溃疡坏死组织和中性粒细胞浸润严重程度的变化。

结果: 与模型损伤组比, 潘托拉唑组大鼠UI明显降低(5.7 ± 2.1 vs 25.4 ± 2.5 , $P < 0.01$), 溃疡坏死组织和中性粒细胞浸润程度明显减轻。预先用*L*-NAME处理后, 潘托拉唑保护胃黏膜损伤作用明显减弱; *L*-NAME抑制作用可被*L*-精氨酸拮抗。iv潘托拉唑, 可增加GMBF、胃黏膜和血浆NO $_2^-$ /NO $_3^-$, *L*-NAME可逆转这种作用, 但对潘托拉唑抑制酸分泌作用无明显影响。

结论: 潘托拉唑通过一氧化氮介导对大鼠胃黏膜损伤有重要的保护作用, 而与潘托拉唑抑制酸分泌作用无关。

关键词: 潘托拉唑; 胃黏膜损伤; 细胞保护; 一氧化氮

乐桥良, 张志坚, 林克荣, 王雯. 潘托拉唑对胃黏膜损伤保护作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2480-2484

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2480.asp>

0 引言

潘托拉唑(pantoprazole)显著抑制酸分泌作用的机制已基本阐明^[1-3]; 但它对胃黏膜具有保护作用^[4-13]的机制尚未完全阐明。一氧化氮(nitric oxide, NO)是扩血管物质, 可增加胃黏膜血流量, 对胃黏膜具有保护作用^[14-23]。有关NO是否介导潘托拉唑对胃黏膜保护作用尚未见报道。我们研究了潘托拉唑对大鼠胃黏膜保护作用, 并探讨NO是否参与了这一过程。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要药品和试剂 潘托拉唑是扬子江药业公司提供的产品, *L*-硝基-精氨酸甲酯(*N* ω -nitro-*L*-arginine methyl ester, *L*-NAME)为Sigma公司产品, *L*-精氨酸为上海华美工程公司产品。镉粒为上海亭新工厂产品, 甘氨酸、亚硝酸盐为上海试剂一厂产品, 硫酸铜、*N*-1-奈乙胺盐酸盐为上海试剂三厂产品, 对氨基苯磺酸为上海山海科技研究所产品, 硫酸、硫酸锌、氢氧化钠、酚红为上海试剂二厂产品。

1.1.2 实验动物 纯种、♂、健康SD大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供), 体质量200-260 g, 实验前禁食24 h, 但不禁水。

1.1.3 主要仪器 XHF-1高速分解器为上海金山生化仪器厂产品, TG $_{328}$ B型分析天平为上海天平仪器厂产品, 801型离心机为上海手术器械厂产品, 724微机型可见分光光度计为上海光学仪器厂产品, 眼科手术器械一套。激光多普勒血流计(LDF), LDF-III型, 南开大学制造, 技术参数如下: He-Ne光源, 功率2 mW, 输出功率>1 mW, 光纤长2.5 m, 测定范围为1 mm半球区域, 量程选 $\times 1$ 档, 时间常数1 s档, 频率为4 kHz。

1.2 方法

1.2.1 胃黏膜损伤模型制备 大鼠禁食24 h后, 30 g/L戊巴比钠(4 mg/kg)ip麻醉, 用1 mL无水乙醇灌胃, 1 h后腹正中切口进入腹腔, 沿胃大弯处剪开胃, 并进行各项实验指标测定。

1.2.2 给药和分组 取SD大鼠99只, 随机分为9组, 每组11只。I组: 假手术组, 作为正常对照; II组: 损伤模型组, 作为损伤对照; III组: 潘托拉唑组, 在用无水乙醇灌胃30 min前, iv潘托拉唑(20 mg/kg)。IV组: *L*-NAME组, 在iv潘托拉唑20 min前, iv *L*-NAME(4 mg/kg)。V组: *L*-精氨酸(*L*-arginine)组, 在iv *L*-NAME 15 min前, iv *L*-精氨酸(250 mg/kg)。I-IV组又分成2组, 其中1组用于胃酸、胃黏膜血流量、胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 测定, 另1组用于胃黏膜损伤指数判定和组织学观察。对照组给予等量的生理盐水。

1.2.3 胃液pH测定 取胃液2 mL, 加酚红指示剂2滴, 黄色表示有胃酸存在。用0.1 mol/L氢氧化钠滴定至粉红色。所耗氢氧化钠mL数 $\times 50$, 即为胃酸浓度(mmol/L), 并换算成pH。

1.2.4 胃黏膜血流量(GMBF)测定 采用LDF测定, 开机预热30 min调出LDF-III GMBF测定程序, 从胃大弯处作一小切口, 用LDF的探头轻轻垂直接触胃黏膜表面, 待血流稳定后, 在胃体大小弯、胃窦大小弯取4点测定GMBF, 取其平均值, 以激光多普勒信号电压值(mV)表示血流量的相对数值。

1.2.5 胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量测定 取胃, 用钝性刀片刮取胃黏膜, 组织匀浆, 离心后, 取上清液, -20°C 贮存待测; 取外周血2 mL, EDTA抗凝, 离心后, 取上清液, -20°C 贮存待测; 采用镉粒还原和比色法测定^[24]。

1.2.6 胃黏膜损伤指数(ulcer index, UI)判定 按Guth标准计算溃疡指数, 处死动物, 取出胃及十二指肠, 沿大弯侧剪开后, 展平, 按溃疡或糜烂面积大小给予计分: 斑点状糜烂为1分, 糜烂 <1 mm为2分, 糜烂介于1-2 mm之间为3分, 糜烂为2-4 mm为4分, 糜烂 >4 mm为5分。

1.2.7 组织学观察 将全胃固定于甲醛液, 制成石蜡切片, HE染色, 光镜下观察, 评定标准如下: (1)坏死物质: 未见为0, 仅在溃疡底面边缘有少许为(+), 薄层覆盖整个溃疡底为(++), 厚层覆盖为(+++). (2)中性粒细胞浸润: 未见为0, 偶见(+), 明显(+++), 介于后两者之间为(++).

统计学处理 多组计量资料之间比较采用方差分析, 组间两两比较用 q 检验, 实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示; 计数资料之间采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 UI测定 损伤模型组大鼠UI(25.4 ± 2.5)比正常对照组(0)明显升高($P < 0.01$); 潘托拉唑组与损伤模型组比明显降低($P < 0.01$); *L*-NAME组与损伤模型组比无明显差异($P > 0.05$), 而比潘托拉唑组明显升高($P < 0.01$); *L*-精氨酸组

与损伤模型组和*L*-NAME组比均明显降低($P < 0.01$)(表1)。

2.2 胃组织学观察 损伤模型组大鼠溃疡底部可见大量坏死物质, 周围组织中中性粒细胞浸润明显; 潘托拉唑组溃疡底部坏死物质和周围组织中中性粒细胞浸润均比损伤模型组明显减轻($P < 0.01$); *L*-NAME组溃疡底部坏死物质和周围组织中中性粒细胞浸润与损伤模型组比均无明显差异($P > 0.05$), 而比潘托拉唑组严重($P < 0.01$); *L*-精氨酸组与损伤模型组和*L*-NAME组比二者均明显减轻($P < 0.01$), 与潘托拉唑组比无明显差异($P > 0.05$)(表1)。

表1 各组大鼠胃黏膜损伤指数变化和组织学观察 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n = 11$)

组别	UI	坏死物质		中性粒细胞	
		$\leq +$	$++ \sim +++$	$\leq +$	$++ \sim +++$
II	25.4 ± 2.5	2	9	2	9
III	5.7 ± 2.1^b	9	2 ^b	8	3 ^b
IV	24.9 ± 2.4^d	2	9 ^d	2	9 ^d
V	5.9 ± 2.2^b	8	3 ^b	9	2 ^b

^b $P < 0.01$ vs II组; ^d $P < 0.01$ vs III组。

2.3 GMBF 损伤模型组大鼠GMBF与正常对照组比明显降低($P < 0.01$), 潘托拉唑组与损伤模型组比明显升高($P < 0.05$), *L*-NAME组与损伤模型组比无明显差异($P > 0.05$), 而比潘托拉唑组明显降低($P < 0.05$)(表2)。

2.4 胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量 损伤模型组大鼠胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 比正常对照组均非常显著增加($P < 0.01$); 潘托拉唑组比正常对照组非常显著增加($P < 0.01$), 亦比损伤模型组明显增加($P < 0.05$); *L*-NAME组与潘托拉唑组比显著减少($P < 0.01$), 而与正常对照组比无明显差异($P > 0.05$)(表2)。

2.5 胃液pH 损伤模型组大鼠胃液pH与正常对照组比明显降低($P < 0.05$), 潘托拉唑组与损伤模型组比明显升高($P < 0.01$), *L*-NAME组与潘托拉唑组比无明显差异($P > 0.05$)(表2)。

表2 I-IV组大鼠GMBF、胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 及胃液pH的变化 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n = 11$)

组别	GMBF (mV)	胃黏膜 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (nmol/L)	血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($\mu\text{mol/L}$)	pH
I	320 ± 49	0.36 ± 0.05	29.95 ± 2.08	3.44 ± 0.55
II	190 ± 25^b	0.68 ± 0.07^b	54.79 ± 4.26^b	2.26 ± 0.38^a
III	294 ± 44	0.87 ± 0.08	81.46 ± 6.39	6.87 ± 0.76
IV	190 ± 28^c	0.43 ± 0.07^d	31.68 ± 3.46^d	6.75 ± 0.76

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs I, III组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs III组。

3 讨论

潘托拉唑是人工合成的质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI), 通过抑制胃壁细胞分泌小管的 H^+/K^+ -ATP酶, 使胃酸分泌的最终步骤阻断, 其抑制作用强而持久, 从而可以治疗消化性溃疡^[1-3]。有研究表明, 潘托拉唑对胃黏膜损伤具有保护作用^[4-13]; Blandizzi *et al*^[4]报道潘托

拉唑能有效预防消炎痛引起大鼠胃体和胃窦的胃黏膜损伤,在消炎痛引起的溃疡模型中,也能明显改善其UI; Shah *et al*^[5]报道潘托拉唑对乙醇引起的胃黏膜损伤有细胞保护作用的同时能加强细胞保护适应,预先给阿司匹林、氯化氨或应激造成的实验性胃黏膜损伤的大鼠iv潘托拉唑,能明显减轻胃黏膜损伤^[6,7];潘托拉唑对非甾体抗炎药(NSAIDs)引起的胃黏膜损伤有很好的保护作用^[8,9], Bianchi *et al*^[8]对需要连续长期应用NSAIDs类药治疗的风湿性疾病患者同时给予潘托拉唑口服,与对照组比,潘托拉唑能非常有效的预防消化性溃疡发生;潘托拉唑对危重患者应激性胃黏膜损害及胃黏膜出血有很好的预防作用^[10-12];对于志愿者口服阿司匹林引起的胃黏膜损伤潘托拉唑也有保护作用^[13]. 本实验结果显示,预先用潘托拉唑给由乙醇诱导胃黏膜损伤大鼠iv,与损伤模型组比,胃黏膜损伤指数明显降低,病理组织观察,其溃疡坏死物质和周围中性粒细胞浸润亦明显减少,表明潘托拉唑对大鼠胃黏膜损伤具有保护作用.

一氧化氮(NO)是由血管内皮细胞产生血管舒张因子^[14,15],近年来有报道,NO对胃黏膜损伤有保护作用^[14-23]; Konturek *et al*^[16]发现NO介导了vit C保护健康志愿者口服阿斯匹林诱导的胃黏膜损伤;NO抑制剂L-NAME能增加水应激的胃黏膜损伤,而NO前体L-精氨酸能明显减轻这种胃黏膜损伤^[17-19];NO可减轻由乙醇诱导的实验性胃黏膜损伤的严重程度^[20-23], Kalia *et al*^[20]预先用L-NAME(NOS抑制剂)处理大鼠,发现会加重由乙醇诱导的胃黏膜损伤,并且这种胃黏膜损伤能被L-精氨酸逆转,另外,L-NAME能明显降低大鼠GMBF和胃黏膜血红蛋白含量^[21],表明NO对胃黏膜损伤有保护作用.我们用L-NAME预先处理大鼠,能明显升高潘托拉唑降低的胃黏膜损伤指数,溃疡底部坏死物质增多,周围中性粒细胞浸润也非常明显,在L-NAME给药15 min前给予L-精氨酸则能抑制这种损伤作用,表明NO介导了潘托拉唑对胃黏膜的保护作用.

本实验结果显示,iv潘托拉唑,能明显增加胃黏膜和血浆NO₂/NO₃含量,同时GMBF亦升高,而在潘托拉唑iv 20 min前给予L-NAME则能逆转这种作用.本实验结果还显示,潘托拉唑能显著提高胃液pH,抑制胃酸分泌,而L-NAME则对潘托拉唑抑制胃酸分泌的作用无明显影响.

总之,我们认为,潘托拉唑对大鼠胃黏膜损伤具有保护作用,NO通过增加GMBF介导了这种保护作用,而与潘托拉唑抑制胃酸分泌作用无关.

4 参考文献

- 1 Ley LM, Becker A, Luhmann R, Sander P, Luckner PW. Pharmacodynamic effects of 3-day intravenous treatment with pantoprazole or ranitidine after 10 days of oral ranitidine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2005; 27: 25-29
- 2 Lehmann FS, Beglinger C. Role of pantoprazole in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease. *Expert Opin*

- Pharmacother* 2005; 6: 93-104
- 3 Bardhan KD, Bishop AE, Polak JM, Romanska HM, Rowland A, Thompson M, Morris P, Schaefer-Preuss S, Luehmann R, McCaldin B. Pantoprazole in severe acid-peptic disease: the effectiveness and safety of 5 years' continuous treatment. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 10-22
- 4 Blandizzi C, Natale G, Gherardi G, Lazzeri G, Marveggio C, Colucci R, Carignani D, Del Tacca M. Gastroprotective effects of pantoprazole against experimental mucosal damage. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14: 89-99
- 5 Shah PJ, Gandhi MS, Shah MB, Goswami SS, Santani D. Study of Mimulus elengi bark in experimental gastric ulcers. *J Ethnopharmacol* 2003; 89: 305-311
- 6 Lazzaroni M, Bianchi Porro G. Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy: clinical results with H₂ antagonists and proton pump inhibitors. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: S73-S78
- 7 Lazzaroni M, Bianchi Porro G. Prophylaxis and treatment of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced upper gastrointestinal side-effects. *Dig Liver Dis* 2001; 33: S44-S58
- 8 Bianchi Porro G, Lazzaroni M, Imbesi V, Montrone F, Santagada T. Efficacy of pantoprazole in the prevention of peptic ulcers, induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs: a prospective, placebo-controlled, double-blind, parallel-group study. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 201-208
- 9 Stupnicki T, Dietrich K, Gonzalez-Carro P, Straszak A, Terjung A, Thomas KB, Luhmann R, Fischer R. Efficacy and tolerability of pantoprazole compared with misoprostol for the prevention of NSAID-related gastrointestinal lesions and symptoms in rheumatic patients. *Digestion* 2003; 68: 198-208
- 10 Steinberg KP. Stress-related mucosal disease in the critically ill patient: risk factors and strategies to prevent stress-related bleeding in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2002; 30: S362-S364
- 11 Spirt MJ. Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy. *Clin Ther* 2004; 26: 197-213
- 12 Metz DC. Preventing the gastrointestinal consequences of stress-related mucosal disease. *Curr Med Res Opin* 2005; 21: 11-18
- 13 Sachs G. Physiology of the parietal cell and therapeutic implications. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 68S-73S
- 14 Uchida M, Matsueda K, Shoda R, Muraoka A, Yamato S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. *Jpn J Pharmacol* 2001; 85: 133-138
- 15 Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek PCh, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 761-773
- 16 Konturek PC, Kania J, Gessner U, Konturek SJ, Hahn EG, Konturek JW. Effect of vitamin C-releasing acetylsalicylic acid on gastric mucosal damage before and after *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Eur J Pharmacol* 2004; 506: 169-177
- 17 Ohta Y, Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol Res* 2001; 43: 535-541
- 18 Samini M, Moezi L, Jabarizadeh N, Tavakolifar B, Shafaroodi H, Dehpour AR. Evidences for involvement of nitric oxide in the gastroprotective effect of bromocriptine and cyclosporin A on water immersion stress-induced gastric lesions. *Pharmacol Res* 2002; 46: 519-523
- 19 乐桥良, 文晓冬. 大鼠应激性溃疡中一氧化氮的作用. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 815-816
- 20 Kalia N, Bardhan KD, Reed MW, Jacob S, Brown NJ. L-Arginine protects and exacerbates ethanol-induced rat gastric mucosal injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 915-924
- 21 Ko JK, Cho CH, Lam SK. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2503-2508

- 22 Sanchez S, Martin MJ, Ortiz P, Motilva V, Herrerias JM, Alarcon de la Lastra C. Role of prostaglandins and nitric oxide in gastric damage induced by metamizol in rats. *Inflamm Res* 2002; 51: 385-392
- 23 Gallego-Sandin S, Novalbos J, Rosado A, Gisbert JP, Galvez-Mugica MA, Garcia AG, Pajares JM, Abad-Santos F. Effect of ibuprofen on cyclooxygenase and nitric oxide synthase of gastric mucosa: correlation with endoscopic lesions and adverse reactions. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1538-1544
- 24 乐桥良, 张捷, 许其增, 高河元. 一氧化氮和前列腺素在门静脉高压性胃病大鼠胃黏膜灌注中的作用. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 232-234

电编 张敏 编辑 管鑫妍 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 BRIEF REPORT •

清热化湿法对温病湿热证大鼠肝脏 LDL-R mRNA 的影响

吕文亮, 高清华, 李华锋

吕文亮, 李华锋, 湖北中医学院中医系 湖北省武汉市 430061
高清华, 湖北中医学院病原病理实验室 湖北省武汉市 430061
湖北省教育厅青年基金重点资助项目, No.2003A003
通讯作者: 吕文亮, 430061, 湖北省武汉市武昌区, 湖北中医学院中医系. lvwenliang66@163.com
电话: 027-68889091
收稿日期: 2005-06-21 接受日期: 2005-07-08

Effect of *Qingre Huashi* recipe on liver low density lipoprotein-receptor mRNA in rats with epidemic febrile disease of dampness-heat syndrome

Wen-Liang Lv, Qing-Hua Gao, Hua-Feng Li

Wen-Liang Lv, Hua-Feng Li, Department of Traditional Chinese Medicine, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Qing-Hua Gao, Laboratory of Pathogen and Pathology, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Supported by the Key Foundation for Youths of Education Office of Hubei Province, No.2003A003

Correspondence to: Wen-Liang Lv, Department of Traditional Chinese Medicine, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuchang District, Wuhan 430061, Hubei Province, China.

lvwenliang66@163.com

Received: 2005-06-21 Accepted: 2005-07-08

Abstract

AIM: To establish the rat models of dampness-heat syndrome by stimulation of compound factors, and to investigate the effect of *Qingre Huashi* recipe on the expression of low density lipoprotein-receptor (LDL-R) mRNA in the liver tissues of rats.

METHODS: Forty-eight male Wistar rats were randomly divided into six groups: normal control, dampness-heat syndrome model, *Qingre Huashi* (A), *Qingre Jiedu* (B), *Xuanqi Huashi* (C), and Lipanthyl (D) group. Each group contained 8 rats. Except the rats in the normal control group, the ones in other groups were all treated with the fat and sweet diet plus artificial climate box plus *Salmonella typhimurium* to establish the model of dampness-heat syndrome. Then the rats in A, B, C, D group were treated the corresponding medicine for 5 d. The expression of LDL-R mRNA was detected in the liver tissues of rats by Using reverse transcription polymerase chain reaction.

RESULTS: The expression of LDL-R mRNA was significantly lower in model group than that in the normal

controls ($P = 0.005$), while the expression of LDL-R mRNA was markedly higher in A, B, C and D group than that in the model group (0.779 ± 0.0425 , 0.616 ± 0.0384 , 0.6315 ± 0.0283 , 0.8004 ± 0.0394 vs 0.4738 ± 0.0480 , all $P < 0.01$). LDL-R mRNA expression was notably different between group A and B ($P = 0.04$), but not between group A and C ($P > 0.05$), B and C ($P > 0.05$), as well as A and D ($P > 0.05$).

CONCLUSION: *Qingre Huashi* recipe can increase the expression of LDL-R mRNA in the liver tissues of rat model of dampness-heat syndrome.

Key Words: *Qingre Huashi* recipe; Epidemic febrile disease; Dampness-heat syndrome; Low density lipoprotein-receptor mRNA; Rats

Lv WL, Gao QH, Li HF. Effect of *Qingre Huashi* recipe on liver low density lipoprotein-receptor mRNA in rats with epidemic febrile disease of dampness-heat syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2484-2487

摘要

目的: 采用复合因素造模法建立大鼠湿热证模型, 探讨清热化湿法(复合治法)对该湿热证模型大鼠肝脏LDL-R mRNA表达的影响。

方法: 清洁级Wistar δ 大鼠48只, 随机分成正常对照组、湿热证模型组、清热化湿(A)法组、清热解毒(B)法组、宣气化湿(C)法组和力平脂(D)组, 每组8只。除正常对照组外, 其余组以“肥甘饮食+人工气候箱+鼠伤寒沙门菌”法造模。完成后治疗组连续给药5 d。模型组给予等量生理盐水。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测LDL-R mRNA。

结果: 模型组大鼠肝脏LDL-R mRNA的表达显著低于正常对照组($P = 0.005$)。A、B、C、D组LDL-R mRNA的表达显著高于模型组(0.779 ± 0.0425 , 0.616 ± 0.0384 , 0.6315 ± 0.0283 , 0.8004 ± 0.0394 vs 0.4738 ± 0.0480 , 均 $P < 0.01$)。A组升高LDL-R mRNA优于B组($P = 0.04$); A组与C组相比无显著性差异($P > 0.05$); B组与C组比较, 两者无显著性差异($P > 0.05$); A组与D组比较无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: 清热化湿法可增强湿热证模型大鼠肝脏LDL-R mRNA表达。

关键词: 清热化湿法; 温病湿热证; LDL-R mRNA; 大鼠

吕文亮, 高清华, 李华锋. 清热化湿法对温病湿热证大鼠肝脏LDL-R mRNA的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2484-2487
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2484.asp>

0 引言

清热化湿法可明显降低湿热证模型大鼠LDL-C含量, 促

进肝脏中的LDL-R表达, 发挥其调节体内胆固醇平衡的作用^[1-3]。LDL与LDL-R结合后才能发挥效应, 而LDL-R mRNA的表达则对LDL-R的表达起着调控作用。为从更深层次揭示清热化湿法调节脂质代谢的作用机制, 我们应用逆转录-聚合酶链反应技术, 从基因水平观察清热化湿法对LDL-R mRNA表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar δ 大鼠48只, 体质量 200 ± 20 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供, 清热化湿(A)法: 黄连20 g, 厚朴^{另包}20 g, 藿香^{另包}20 g, 石菖蒲^{另包}20 g, 丹参16 g, 土大黄10 g, 茯苓20 g, 栀子10 g; 清热解毒(B)法: 黄连20 g, 黄芩15 g, 黄柏15 g, 栀子20 g; 宣气化湿(C)法: 杏仁18 g, 薏苡仁18 g, 薏仁6 g, 竹叶6 g, 厚朴6 g, 通草6 g, 半夏15 g, 滑石18 g; 力平脂(D)组: 力平脂(法国利博福尼制药公司生产), 使用前用生理盐水配成1.8 g/L混悬液。TRIzol Reagent Total RNA试剂盒购自美国Invitrogen公司; RNA PCR试剂盒[RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0]购自大连宝生生物有限公司。丙烯酰胺和定标用的蛋白为Sigma公司产品, 标准分子质量DNA marker购自日本TaKaRa公司。

1.2 方法 大鼠随机分成正常对照组、湿热证模型组、A、B、C、D组, 每组8只。除空白对照组外, 其余模型组、治疗A、B、C、D组以“肥甘饮食+人工气候箱+鼠伤寒沙门菌”法造模^[4]; 维持5-7 d左右, 造模成功。治疗组每天给药1次, 连续5 d。模型组给予等量生理盐水, 第5天给药前禁食12 h, 给药60 min后, 用30 g/L戊巴比妥钠30-50 mg/kg麻醉, 切开腹部迅速取肝脏, 液氮冻存供LDL-R mRNA检测; 用TRIzol核酸提取试剂提取肝细胞总RNA测定RNA样品含量及纯度: $A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$, 说明其纯度满足分子生物学实验的要求。在NCBI上查找大鼠LDL-R基因序列, 然后用Primer Premier5软件设计引物, 并由北京奥科生物技术有限责任公司合成。内对照为3磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)。LDL-R引物序列: (GenBank No.M94388)上游引物: 5'-AAC TAG ACT GCTCCC CCA AGA C -3', 下游引物: 5'-CTG CGA TGGATA CAC TCACTA CTG-3', 扩增的cDNA序列片段长度为340 bp。GAPDH引物序列: 上游引物: 5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3', 下游引物: 5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3', 扩增的cDNA序列片段长度为309 bp。

在PCR仪中设置逆转录程序: $30^{\circ}\text{C} \times 10 \text{ min} - 42^{\circ}\text{C} \times 30 \text{ min} - 99^{\circ}\text{C} \times 5 \text{ min} - 4^{\circ}\text{C} \times 5 \text{ min}$ 。每一管反应前液面上需加矿物油50 μL , 防止高温下的挥发。反应停止后置于 4°C 备用。在PCR仪中设置PCR程序: $94^{\circ}\text{C} \times 4 \text{ min} - (94^{\circ}\text{C} \times 45 \text{ s} - 45^{\circ}\text{C} \times 45 \text{ s} - 72^{\circ}\text{C} \times 1 \text{ min}) \times 35$ 个循环- $72^{\circ}\text{C} \times 5 \text{ min} - 4^{\circ}\text{C}$ 保存。反应停止后, 取PCR反应产物10 μL , 进

行20/L琼脂糖凝胶电泳(含0.5 mg/L溴化乙锭)分析,经凝胶密度扫描系统处理,测定各电泳带灰度值。各反应体系以GAPDH mRNA的RT-PCR产物为内参照,计算待测mRNA的RT-PCR产物与它的灰度比值,作为待测mRNA的表达值。 $\text{LDL-R mRNA相对量} = \text{LDL-R电泳带灰度值} / \text{GAPDH电泳带灰度值}$ 。

统计学处理 用SPSS 10.0统计软件,数据以mean \pm SD表示,采用单因素方差分析,组间用 q 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

肝细胞总RNA提取结果见图1。正常对照组、湿热模型组、治疗A、B、C、D组大鼠肝脏LDL-R mRNA表达分别为 0.8820 ± 0.0585 , 0.4738 ± 0.0480 , 0.7791 ± 0.0425 , 0.6161 ± 0.0384 , 0.6315 ± 0.0283 , 0.8004 ± 0.0394 (图2)。模型组大鼠肝脏LDL-R mRNA的表达显著低于正常对照组($P = 0.005 < 0.01$); A、B、C、D组LDL-R mRNA的表达显著高于模型组($P = 0.001 < 0.01$)。以A法与B法比较, A法升高LDL-R mRNA优于B法($P = 0.04 < 0.05$); 以A法与C法比较, 虽然无显著性差异, 但A法LDL-R mRNA相对含量高于C组; 以B法与C法比较, 两者无显著性差异($P > 0.05$); 以A法与力平脂组比较无显著性差异($P > 0.05$), 提示清热化湿(A)法具有上调LDL-R mRNA的作用, 与力平脂的作用相当。

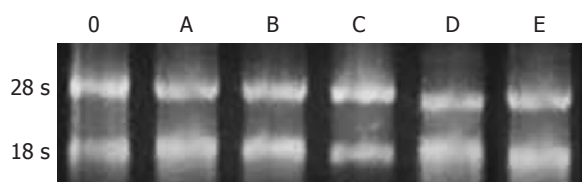


图1 Total RNA甲醛胶电泳。

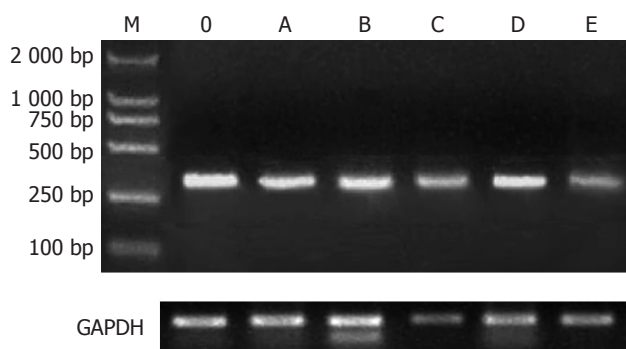


图2 PCR的结果电泳图。M: marker; O: 正常对照组; A: 清热化湿法组; B: 清热解暑法组; C: 宣气化湿法组; D: 力平脂组; E: 模型组。

3 讨论

脂类代谢异常为湿邪生化物质基础之一, 清热化湿法作用机制与调控脂类代谢相关^[1,2], 湿热证动物模型稳定, 可重复性好^[3-7]。本课题组在此基础上研究了清热化湿法

对湿热模型大鼠脂类代谢的影响, 表明该法可明显降低LDL-C、升高HDL-C; 肝脏是人体脂蛋白及胆固醇代谢的主要场所, 也是LDL-R较为密集的器官。肝脏LDL-R表达的变化可反映血清胆固醇的代谢^[8,9]。肥甘饮食中的胆固醇降低了肝脏LDL-R mRNA水平, 因此降低了肝脏LDL-R数量, 引起血循环中LDL的堆积^[10]。

LDL-R功能缺陷, 是引起高胆固醇血症的主要原因之一, 血脂失调症患者的LDL-R转录水平处于严重的抑制状态^[11]。中医药领域有关调节脂类代谢的作用机制较多^[12-15]。但是对LDL受体研究较少, 研究^[16,17]证实, 中药亦可提高LDL-R基因表达, 解除LDL-R的抑制状态, 促进LDL-R表达, 使血中LDL-C减少, 从而调控血脂水平。本结果表明, 温病湿热证模型组LDL-R mRNA表达明显低于正常组, 提示湿热证病理状态下, 降低了肝脏LDL-R mRNA水平, 抑制了LDL-R的转录, 降低了肝脏LDL-R数量, 引起血循环中LDL的堆积, 此与有关文献报道的观点相似^[18-20]。研究显示: 治疗各组LDL-R mRNA表达均高于湿热模型组, 表明各治疗组药物通过提高LDL-R mRNA的表达水平, 降低湿热证对LDL-R转录的抑制作用, 比较清热化湿(A)法与清热解毒(B)法、宣气化湿(C)法升高LDL-R mRNA表达情况, A法优于B、C法。

总之, 清热化湿法可能通过增强湿热证模型大鼠肝脏LDL-R mRNA表达, 继而促进LDL-R蛋白合成, 增加了肝表面的LDL-R数量与活性, 增强肝脏对脂质等代谢功能, 加快血中LDL-C的清除, 加速脂蛋白分解, 从而起到了调控血脂水平的作用。这可能是清热化湿法调节脂类代谢的作用机制之一。

4 参考文献

- 1 吕文亮. 清热祛湿法研究回顾及今后研究思路探讨. 中医研究 2004; 17: 2-5
- 2 吕文亮. 湿邪与血脂代谢异常关系的探讨. 河南中医学院学报 2004; 19: 5-6
- 3 王瑾, 陈宜鸿, 赵志玲. 中医温病湿热证动物模型实验的研究. 解放军药学报 2002; 18: 209-211
- 4 张智, 闪增郁, 向丽华, 陈燕萍, 李爽姿, 张雪亮. 大鼠实验性高脂血症两种造模方法的比较. 中国中医基础杂志 2004; 10: 113-114
- 5 吴仕九, 杨运高, 杨钦河, 佟丽. 清热利湿法对湿热证动物模型的影响. 中国中西医结合脾胃杂志 1999; 7: 200-201
- 6 陈爽白, 常淑枫, 肖照岑, 郭义. 湿热证大鼠模型的复制及三仁汤对其影响的实验观察. 天津中医 2002; 19: 38-39
- 7 苏奎国. 解毒化湿法治疗湿温分证实验研究. 中国现代实用医学杂志 2004; 17: 2474-2479
- 8 关建红, 梁爱华, 冯前进, 胡姗姗. 降脂宁水提取剂对高脂血症大鼠肝细胞基因表达的影响. 中国中药杂志 2002; 27: 289-291
- 9 李文彪, 王毅仁. 清源调脂胶囊对高脂血症大鼠低密度脂蛋白受体基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志 2002; 10: 327-329
- 10 邓国兴, 郑玉光, 吴中秋. 化痰消痰饮防治大鼠高脂饮食性脂肪肝的研究. 河北医学 2004; 10: 673-674
- 11 秦树存, 王士雯. 低密度脂蛋白受体缺陷的诊断与治疗. 心血管病学进展 1995; 16: 22-25
- 12 马世平, 王宗仁, 龙钢, 行利, 李军昌, 方坤泉. 芪丹通脉片对高脂血症的药理作用. 第四军医大学学报 2000; 21: 515-516
- 13 焦亚斌, 李冀, 肖洪彬, 张鹏, 旺建伟, 李胜志, 郭文峰. 活血化痰法对实验性高脂血症大鼠调血脂作用的研究. 中医药信息 2002; 19:

- 55-56
14 佟继铭, 刘玉玲, 符景春. 黄芩茎叶总黄酮调血脂作用研究. 中草药 2000; 31: 196-197
15 贺立勃. 瓜蒌、薤白降脂作用的析因研究. 湖南中医药导报 2002; 8: 205-207
16 熊文生, 曾益宏. 理脾化痰降脂片对高脂血症影响的临床研究. 中国医药学报 2000; 15: 115-117
17 牛晓红, 金红, 宋剑南. 健脾祛痰化痰方药-沥水调脂胶囊抗低密

- 度脂蛋白氧化修饰作用的研究. 中国中医基础医学杂志 2002; 8: 732-734
18 淳泽, 李佳楠, 陈东辉, 罗霞, 程耀锋, 杨志荣. 温胆汤对高脂血症大鼠脂质代谢的影响. 中国中药杂志 2003; 28: 1184-1187
19 刘萍, 张静生, 郑菲, 富伟能, 陈汝兴. 中药对低密度脂蛋白受体基因表达的影响. 中国中西医结合急救杂志 2000; 7: 141-143
20 王东生, 周衡, 殷文学. 清热利湿法调脂的临床观察. 中国中医药信息杂志 2001; 8: 50-52

电编 张敏 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

• 研究快报 BRIEF REPORT •

熊胆粉对二甲基亚硝胺诱发大鼠肝纤维化的抑制作用

权明吉, 金仁顺, 朴 龙, 朴东明

权明吉, 金仁顺, 朴龙, 朴东明, 延边大学医院病理科 吉林省延吉市 133000

通讯作者: 朴东明, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医院病理科. pdm11172000@yahoo.com.cn

电话: 0433-2660121 传真: 0433-2513610

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Inhibitory effects of bear bile powder on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Ming-Ji Quan, Ren-Shun Jin, Long Piao, Dong-Ming Piao

Ming-Ji Quan, Ren-Shun Jin, Long Piao, Dong-Ming Piao, Department of Pathology, Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Correspondence to: Dong-Ming Piao, Department of Pathology, Hospital of Yanbian University, 119 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. pdm11172000@yahoo.com.cn

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

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of bear bile powder on rat liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine (DMN).

METHODS: A total of 30 rats were randomly divided into 3 groups: normal control group, model group, and bear bile group (10 in every group). The rat liver fibrosis model was induced by peritoneal injection of DMN

(10 g/L) for 4 wk. At the same time, the rats in the bear bile group received bear bile powder (400 mg/kg) orally once a day for 4 wk. Then the activities of serum alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), and the contents of total protein (TP) were detected. Meanwhile, the pathological changes of liver tissues were observed under light microscope after HE staining, and the area density of collagenous fiber were examined. The amount and distribution of Kupffer cell (KC) and hepatic stellate cell (HSC) were detected by immunohistochemical SP method through the distribution of ED1 and α -smooth muscle actin (α -SMA).

RESULTS: Compared with that in the model group, the level of serum ALT was decreased, and AST was significantly decreased ($4\,370.87 \pm 1\,338.60$ nkat/L vs $5\,741.15 \pm 1\,000.20$ nkat/L, $P < 0.05$) in the bear bile group. The TP content and the ratio of liver to body weigh were increased. The area density of collagenous fiber was notably decreased (6.73 ± 1.31 vs 9.90 ± 1.93 , $P < 0.01$). The pathological changes were lighter, and the occurrence rate of diffused liver fibrosis was lower in the bear bile group than those in the model group. The fibrous septa became thin or disappeared, and the expressions of ED1 and α -SMA were markedly reduced in the bear bile group.

CONCLUSION: The bear bile powder can prevent DMN-induced rat liver fibrosis, and the mechanism may relate to its inhibition on the activation of the HSC and KC.

Key Words: Bear bile powder; Dimethylnitrosamine; Liver fibrosis; Rats

Quan MJ, Jin RS, Piao L, Piao DM. Inhibitory effects of bear bile powder on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2487-2490

摘要

目的: 探讨熊胆粉对二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱发大鼠肝纤维化的抑制作用。

方法: 将30只大鼠随机分为正常组、模型组及熊胆组, 每组各10只。用10 g/L DMN腹腔注射诱发大鼠肝纤维化模型, 用400 mg/kg熊胆粉灌胃共4 wk, 检测血清AST、ALT值和总蛋白(TP)含量。肝组织做HE、直接红染色, 观察肝组织的病理变化, 并检测肝组织内胶原纤维的面密度。免疫组化采用SP法, 利用单克隆抗体ED1和 α -SMA观察库普弗细胞(Kupffer cell, KC)和肝星状细胞(hepatic satellite cell, HSC)的数量及分布。

结果: 熊胆组与模型组比较血清ALT值下降, AST值明显下降($4\ 370.87 \pm 1\ 338.60$ nkat/L vs $5\ 741.15 \pm 1\ 000.20$ nkat/L, $P < 0.05$), TP升高, 肝/体质量比增加, 胶原纤维的面密度明显下降(6.73 ± 1.31 vs 9.90 ± 1.93 , $P < 0.01$)。熊胆组肝组织病理变化较模型组轻, 纤维间隔变细、或消失, 形成弥漫性肝硬化的少。KC和HSC在增生的纤维组织及间隔内分布, 熊胆组两种细胞的数量明显减少。

结论: 熊胆粉具有较好的抑制DMN诱发大鼠肝纤维化的作用, 其机制可能与抑制KC, 减少细胞因子的分泌, 从而抑制HSC的激活和转化, 减少胶原纤维合成和分泌有关。

关键词: 熊胆粉; 二甲基亚硝胺; 肝纤维化; 大鼠

权明吉, 金仁顺, 朴龙, 朴东明. 熊胆粉对二甲基亚硝胺诱发大鼠肝纤维化的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2487-2490
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2487.asp>

0 引言

近十多年来我国学者利用中医中药的优势, 进行了大量抗肝纤维化的动物实验和临床研究, 取得了可喜的成就, 但利用动物胆汁进行抗肝纤维化的研究尚少, 我们用二甲基亚硝胺(DMN)诱发大鼠肝纤维化模型, 探讨熊胆粉抑制肝纤维化的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD δ 大鼠(清洁级), 体质量160-180 g, 由

延边大学医学院动物科提供。

1.1.2 试剂及药物 DMN购自美国Sigma公司, 直接红(Direct Red 80)购自美国Aldrich Chem公司, 免疫组化单克隆抗体ED1购自英国Serotec公司, α -SMA购自Denmak Dako公司, 熊胆粉(明月山牌)由吉林省延边熊厂提供。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 参照Matsuda *et al*^[1]的方法制备动物模型, 将30只动物随机分为3组, 正常组(10只): 注射用生理盐水1 mL/kg连续3 d/wk, 腹腔内注射共4 wk, 同时用生理盐水2 mL/d灌胃共4 wk。模型组(10只): 10 g/L DMN(生理盐水稀释)1 mL/kg连续3 d/wk, 腹腔内注射共4 wk, 同时用生理盐水2 mL/d灌胃共4 wk。熊胆组(10只): 10 g/L DMN腹腔内注射的同时用熊胆粉400 mg/(kg·d)灌胃共4 wk。实验第4周末检测大鼠体质量后用乙醚麻醉, 心脏采血离心处理。

1.2.2 血清生化指标的检测 血清ALT、AST活性检测采用Reiman氏方法, 总蛋白含量采用Biuret法, 全部Kit购自Eiken Chemical(Tyoko, Japan)公司, 严格按Kit说明书进行操作, 利用分光光度计(Ultaspec 4050, LKB, Switzerland)测定吸光度, 对照标准曲线计算AST、ALT值和总蛋白含量。

1.2.3. 病理学检查 肝/体质量百分比: 采血后立即取肝脏称质量, 计算肝/体质量百分比。病理学检查: 取肝组织二块, 经40 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片行HE和直接红染色(1 g/L直接红picric acid饱和液), 光镜下观察肝组织的病理变化及纤维组织增生程度。直接红染色的切片利用CMIAS真彩色病理图像分析系统(北京航空航天大学)进行胶原纤维的定量分析, 观察条件: 物镜10倍, 每张切片随机选4个视野, 图像采集、分割处理, 参数统计分析, 得出目标总面积/统计场总面积之比值。免疫组织化学染色: 切片厚4-5 μ m, 常规脱蜡至水, 用SP法进行免疫组化染色, ED1工作浓度为1:500, α -SMA工作浓度为1:50; 观察肝组织内KC和HSC数量及分布。

统计学处理 采用SPSS 10.0软件进行统计学分析。

2 结果

实验过程中模型组、熊胆组大鼠各死亡1只。

2.1 熊胆组与模型组比较血清ALT活性下降, AST活性明显下降($P < 0.05$); 总蛋白含量和肝/体质量比升高, 胶原纤维面密度明显下降($P < 0.01$, 表1)。

2.2 病理学观察结果 正常组肝小叶结构正常, 肝细胞无变性、坏死, 肝小叶中央静脉壁和汇管区有少量胶原纤维(图1A)。模型组肝小叶结构紊乱, 肝细胞变性、灶状或片状坏死, 汇管区大量纤维组织增生, 并形成较粗的纤维间隔伸入肝组织内, 大部分形成弥漫性肝硬化(8/9只)(图1B)。熊胆组肝细胞变性、坏死较模型组轻, 汇管区纤维组织减少, 纤维间隔变细或消失, 纤细的纤维间隔伸入肝组织内, 部分形成弥漫性肝硬化(4/9只)(图1C)。

表1 实验第4周末各项指标的检测结果

组别	n	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	TP (g/L)	肝/体质量比 (%)	面密度 (%)
正常组	10	398.91 ± 106.35	1 365.27 ± 435.09	69.67 ± 6.09	2.950 ± 0.15	1.27 ± 0.28
模型组	9(1)	1 201.91 ± 215.04	5 741.15 ± 1 000.20	50.32 ± 9.81	2.156 ± 0.54	9.90 ± 1.93
熊胆组	9(1)	1 041.04 ± 144.53	4 370.87 ± 1 338.60 ^a	56.48 ± 3.65	2.411 ± 0.54	6.73 ± 1.31 ^b

()内为死亡动物数, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

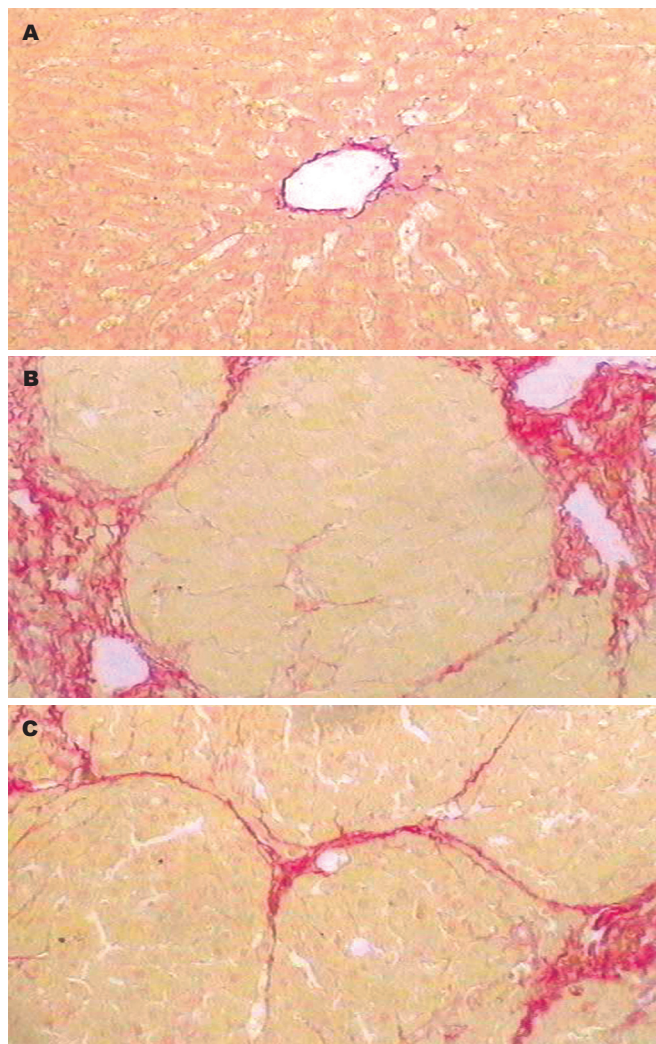


图1 光镜下肝组织内纤维组织增生程度(直接红染色 $\times 100$)。A: 正常组; B: 模型组; C: 熊胆组。

2.3 免疫组化染色结果 正常组 α -SMA在肝小叶中央静脉壁有少量阳性表达, 汇管区的各种血管壁阳性表达, 肝细胞间无阳性细胞, ED1在肝小叶中央静脉周围、汇管区和肝实质内有少量阳性细胞分布。模型组大量肝KC(ED1+)和HSC(α -SMA+)在增生的纤维组织及间隔内弥漫分布, 肝实质内散在分布。熊胆组肝KC和HSC的分布与模型组相似, 但两种细胞的数量明显减少。

3 讨论

熊胆是珍贵的中药材之一, 熊胆特有的成分是熊去氧胆酸(UDCA), 引流熊胆粉和天然熊胆的化学成分和各种胆汁酸的含量接近。国内外的研究已证实熊胆有抗炎、利

胆、保肝、降血脂等多方面药理作用, 最近的研究表明熊胆粉对培养的瘤细胞有抑制作用, 对受照小鼠有明显的防辐射作用, 熊胆牛黄胶囊对柯萨奇病毒B4型和副流感病毒I型有显著的抑制作用^[2-4]。熊胆粉能明显对抗四氯化碳 CCl_4 引起的小鼠血清谷丙转氨酶升高, 对 CCl_4 所致的肝病理组织改变有一定保护作用, 熊胆粉有效缓解高脂高热量饮食引起的肝脂肪变性^[5], 熊胆粉治疗急慢性、黄疸型肝炎和肝硬化有较好的疗效^[6-9], 利用UDCA治疗急、慢性肝炎和肝硬化均收到较好的疗效^[10-12]。本实验血清检测结果表明, 熊胆粉有较好的降酶作用, 其中AST活性下降较明显($P < 0.05$), 血清总蛋白含量和肝/体质量比升高, 肝组织胶原纤维面密度明显减少($P < 0.01$)。病理学观察表明模型组肝细胞排列紊乱、肝细胞弥漫性变性, 可见较多灶状、片状坏死, 汇管区纤维组织明显增生、纤维间隔较粗、伸入肝组织内, 大多数形成弥漫性假小叶(8/9), 熊胆组肝细胞变性、坏死较模型组轻, 汇管区纤维组织增生较轻, 纤维间隔变细或消失, 纤细的纤维间隔部伸入肝组织内, 部分形成弥漫性假小叶(4/9), 表明熊胆粉具有较好的抑制DMN诱发大鼠肝纤维化的作用。

肝细胞损伤或坏死刺激、激活KC, KC活化后分泌多种细胞因子再激活HSC, HSC转化为成纤维样细胞或肌纤维细胞, 表达 α -SMA。单克隆抗体ED1可识别全部单核巨噬细胞系统的细胞, 包括几乎全部的肝KC。最近的研究提示KC分泌的转化生长因子 α (TGF- α)活化HSC, 加速向肌成纤维细胞转化。肿瘤坏死因子 α (TNF- α)也是KC合成的主要的蛋白质, 是参与肝纤维化的主要的细胞因子之一, 在肝纤维化始动激活和调控中具有重要的作用^[13]。实验研究证实 CCl_4 、猪血清诱发的大鼠肝纤维化中ED1阳性的KC显著增加, 主要位于增生的纤维间隔部位^[14,15]。本实验免疫组化染色的结果, 模型组在增生的纤维组织及间隔内大量KC(ED1+)和HSC(α -SMA+)分布, 表明KC与激活、活化HSC密切相关。熊胆组KC和HSC也分布在纤维组织及间隔内, 但两种细胞的数量明显减少, 提示熊胆粉通过抗炎等作用, 抑制肝KC的增生和活化, 减少各种细胞因子的释放, 抑制HSC的激活和转化, 减少细胞外基质的产生, 抑制肝纤维化的形成。

4 参考文献

- 1 Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, Ichida T, Asakura H, Komoriya Y, Nishiyama E, Nakamura T. Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion

- on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26: 81-89
- 2 孙铁民, 梁伟, 张启明, 金雨, 胡晓红, 郑铨淳. 熊胆抑瘤作用研究. 辽宁中医杂志 2003; 30: 66
- 3 刘曙晨, 骆传环, 高月. 熊胆的辐射防护作用实验研究. 中华临床医药杂志 2001; 2: 9-10
- 4 郭建生, 胡海蓉, 王小娟, 程丑夫, 贺海波, 吴萍. 熊胆牛黄胶囊抗病毒作用的药效学研究. 中医学药刊 2003; 21: 906-907
- 5 姜皓, 施维锦, 李可为, 傅勇. 熊胆粉对豚鼠肝脂肪变性的预防. 上海第二医科大学学报 2000; 20: 313-314
- 6 石丽霞, 张文超, 张振家. 熊胆注射液治疗黄疸型肝炎280例疗效观察. 新中医 2001; 33: 23-24
- 7 王丽影, 高昕, 佟子林, 王喜军. 熊胆的化学成分、药理作用及临床研究概况. 中医药信息 2005; 22: 30-33
- 8 Li YW, Zhu XY, But PP, Yeung HW. Ethnopharmacology of bear gall bladder. I. *J Ethnopharmacol* 1995; 47: 27-31
- 9 Matsumoto N, Nakashima T, Kashima K. Effectiveness of bovine gallstone (Goou) and bear gall powder (Yutan) on chronic liver diseases: a preliminary report. *Tokai J Exp Clin Med* 1995; 20: 9-16
- 10 Podda M, Ghezzi C, Battezzati PM, Crosignani A, Zuin M, Roda A. Effects of ursodeoxycholic acid and taurine on serum liver enzymes and bile acids in chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1990; 98: 1044-1050
- 11 Galsky J, Bansky G, Holubova T, Konig J. Effect of ursodeoxycholic acid in acute viral hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 1999; 28: 249-253
- 12 Nakamura K, Yoneda M, Takamoto S, Nakade Y, Yokohama S, Tamori K, Aso K, Matui T, Sato Y, Aoshima M, Makino I. Effect of ursodeoxycholic acid on autoimmune-associated chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 413-418
- 13 Armbrust T, Ramadori G. Functional characterization of two different Kupffer cell populations of normal rat liver. *J Hepatol* 1996; 25: 518-528
- 14 Orfila C, Lepert JC, Alric L, Carrera G, Beraud M, Vinel JP, Pipy B. Expression of TNF-alpha and immunohistochemical distribution of hepatic macrophage surface markers in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. *Histochem J* 1999; 31: 677-685
- 15 Bhunchet E, Eishi Y, Wake K. Contribution of immune response to the hepatic fibrosis induced by porcine serum. *Hepatology* 1996; 23: 811-817

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 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 BRIEF REPORT •

磷酸化黏着斑激酶在结肠癌中表达及意义

刘启胜, 于红刚, 齐元玲, 曹俊, 罗和生, 于皆平

刘启胜, 于红刚, 齐元玲, 曹俊, 罗和生, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

国家自然科学基金资助项目, No.30470782

通讯作者: 于红刚, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. wuzhixuan2003@126.com

电话: 027-88076874

收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-09-30

Expression and significance of phosphorylated focal adhesion kinase in colon carcinoma

Qi-Sheng Liu, Hong-Gang Yu, Yuan-Ling Qi, Jun Cao, He-Sheng Luo, Jie-Ping Yu

Qi-Sheng Liu, Hong-Gang Yu, Yuan-Ling Qi, Jun Cao, He-Sheng Luo, Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.

30470782

Correspondence to: Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. wuzhixuan2003@126.com

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

Abstract

AIM: To investigate the expression of phosphorylated focal adhesion kinase (phospho-FAK) and its significance in human colon carcinoma.

METHODS: The phospho-FAK (including FAK) expression was detected by Western blotting in 20 cases of colon carcinoma and their corresponding para-cancer tissues.

RESULTS: The positive rate of FAK expression in the cancer tissues was significantly higher than that in the

corresponding normal tissues (95% vs 60%, $\chi^2 = 5.16$, $P < 0.05$). The mean level of FAK expression in the cancer tissues was 0.482 ± 0.150 , while the mean level of expression in the normal tissue was 0.269 ± 0.015 ($t = 6.39$, $P < 0.01$). The positive rate of Tyr-397 FAK protein expression in the cancer tissues was 90%, while the positive rate in the corresponding normal tissues was only 20% ($\chi^2 = 17.1$, $P < 0.01$). The mean level of Tyr-397 FAK protein expression in the cancer tissue was notably higher than that in the corresponding para-cancer tissues (0.385 ± 0.021 vs 0.110 ± 0.005 , $t = 54.23$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The up-regulation of FAK expression, especially Tyr-397 FAK protein expression, may play an important role in the tumorigenesis and progression of colon carcinoma.

Key Words: Colon carcinoma; FAK; Phosphorylation

Liu QS, Yu HG, Qi YL, Cao J, Luo HS, Yu JP. Expression and significance of phosphorylated focal adhesion kinase in colon carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2490-2493

摘要

目的: 观察磷酸化黏着斑激酶(phosphorylated focal adhesion kinase, phospho-FAK)在结肠癌组织和对应癌旁组织中的表达, 探讨其在结肠癌发病的可能机制。

方法: 采用Western blotting方法检测20例新鲜结肠癌及相对应的癌旁组织FAK表达水平, 并在调平每对组织FAK的含量后再进行FAK Tyr397磷酸化蛋白的检测。

结果: 20例结肠癌组织FAK阳性表达率为95%, 对应癌旁组织FAK阳性表达率为60%($\chi^2 = 5.16$, $P < 0.05$); 癌组织表达平均值为 0.482 ± 0.150 , 癌旁表达平均值为 0.269 ± 0.015 ($t = 6.39$, $P < 0.01$)。20例结肠癌组织18例有FAK Tyr397磷酸化蛋白表达, 表达率为90%, 而对应癌旁组织仅有4例有FAK Tyr397磷酸化蛋白表达, 表达率为20%($\chi^2 = 17.1$, $P < 0.01$); 癌组织表达平均值为 0.385 ± 0.021 , 癌旁表达平均值为 0.110 ± 0.005 ($t = 54.23$, $P < 0.01$)。

结论: FAK特别是FAK Tyr397磷酸化蛋白的表达水平增加在结肠癌的发生、发展中可能起重要作用。

关键词: 结肠癌; 黏着斑激酶; 磷酸化

刘启胜, 于红刚, 齐元玲, 曹俊, 罗和生, 于皆平. 磷酸化黏着斑激酶在结肠癌中表达及意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2490-2493
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2490.asp>

0 引言

结肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤, 随着生活条件的改

善, 饮食西化, 我国结肠癌发病率上升趋势非常明显, 但其发病机制尚未完全明确. 黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一种非受体蛋白酪氨酸激酶, 分布在细胞黏着斑部位, 相对分子质量为 M_r 125 000, 是整合素介导的细胞与细胞外基质之间信号事件的关键性调节分子, 参与调节细胞的多种生物学功能^[1]. 研究表明, 在多种肿瘤组织中都有FAK特别是磷酸化FAK表达显著增加, 且磷酸化FAK的表达与肿瘤的发生及生物学行为(如增殖、凋亡、黏附、迁移等)有一定的相关性. 为此我们采用western blotting方法在组织水平上进一步证实FAK在结肠癌组织及对应癌旁组织中的表达, 特别是对于对肿瘤侵袭和转移密切相关的磷酸化形式的FAK, 以探讨它们的表达与结肠癌发病的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集武汉大学人民医院及中南医院2005-02/2005-07手术切除的结肠癌新鲜标本20例. 每例手术切除的标本均取癌组织、对应癌旁组织(距癌组织 >5 cm)各1份, 液氮冷冻后置 -70°C 冰箱保存. 所有标本均经HE染色病理证实, 其中男12例, 女8例, 年龄25-79岁(平均56.2岁), 所有患者术前均未接受放、化疗。

1.1.2 主要试剂 兔抗FAK多克隆抗体(cell signaling), 兔抗磷酸化FAK Tyr397多克隆抗体(upstate biotechnology), 羊抗兔IgG-HRP, 预染蛋白Mark-er(pierce signaling), ECL试剂盒(Santa Cruz Biotechnology), 硝酸纤维素膜(Amersham), Aprotinin、Leupeptin、Pepstalin、PMSF等(武汉天源生物技术公司)

1.2 方法

1.2.1 总蛋白的提取 取约100 mg组织标本, 加入1 mL组织裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10 g/L 脱氧胆酸钠, 10 mL/L NP40, 10 g/L SDS, Aprotinin、Leupeptin、Pepstalin均为1 g/L, PMSF 1 mmol/L), 匀浆, 操作均在冰上进行. 13 000 g, 4°C 离心10 min. 取上清置于Ep管. 用Bradford法测定蛋白浓度。

1.2.2 Western blotting 参照《分子克隆》中的实验方法, 以 β -actin的水平作为等量蛋白质上样对照, 每个标本至少重复3次进行SDS-PAGE电泳, 并转至硝酸纤维素膜上, 室温封闭2 h后, 用TBST缓冲液漂洗3次, 再加入兔抗人FAK抗体(1:1 000), 4°C 孵育过夜, TBST缓冲液漂洗3次后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(1:2 000), 室温摇床孵育2 h, 增强化学发光系统显色, 暗室内X光底片感光成像。

1.3 图像分析及处理 采用法国Bio-profil图像分析系统对western印迹结果进行图像分析, 并根据条带的积分吸光度值对FAK进行蛋白量的调平, 使每对组织中所含FAK的蛋白量相等, 再用同样方法对FAK Tyr397磷酸化蛋白行western印迹检测(方法同上), 以比较调平后每对组织FAK

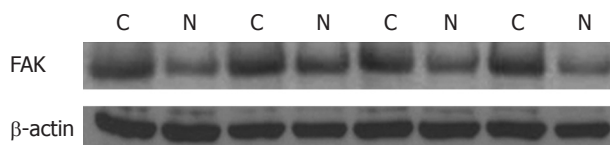


图1 癌与癌旁组织的FAK表达. N: 癌旁组织; C: 癌组织.

Tyr397磷酸化蛋白的表达差异. 将每个样本FAK的积分光密度值与 β -actin的积分光密度值相比, FAK Tyr397磷酸化蛋白的积分光密度值与相应调平后FAK的积分光密度值相比, 分别得出积分光密度比值. 以比值代表它们的蛋白质含量.

统计学处理 计数资料采用卡方检验和四格表的精确概率法, 计量资料采用 t 检验, 均以 $P < 0.05$ 为有统计学差异.

2 结果

2.1 FAK蛋白在结肠癌及相应癌旁组织的表达 20例结肠癌组织中有19例可见不同浓度的FAK阳性带(图1), 其在结肠癌组织的阳性表达率为95%, 而对应癌旁组织有12例出现不同浓度的FAK阳性带, 阳性表达率为60%($\chi^2 = 5.16$, $P < 0.05$, 表1), 在与 β -actin的积分光密度值相比中癌组织表达平均值为 0.482 ± 0.150 , 癌旁表达平均值为 0.269 ± 0.015 , FAK在结肠癌组织的表达水平高于癌旁组织($t = 6.39$, $P < 0.01$, 表1).

表1 FAK在结肠癌及相应癌旁组织的表达 ($n = 20$)

组别	阳性表达率 (%)	FAK/ β -actin (mean \pm SD)
癌旁组织	60	0.269 ± 0.015
癌组织	95 ^b	0.482 ± 0.150^d

^b $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 癌旁组织.

2.2 在把每对组织的FAK含量调为一致后, 20例结肠癌组织中有18例可见不同浓度的FAK Tyr397磷酸化蛋白阳性带(图2), 表达率为90%, 而对应癌旁组织仅有4例出现较低浓度的FAK Tyr397磷酸化蛋白阳性带, 表达率为20%($\chi^2 = 17.1$, $P < 0.01$, 表1), 在与对应的FAK积分光密度值相比中, 癌组织表达平均值为 0.385 ± 0.021 , 癌旁表达平均值为 0.110 ± 0.005 ($t = 54.23$, $P < 0.01$, 表2).

表2 FAK Tyr397在结肠癌及相应癌旁组织的表达 ($n = 20$)

组别	阳性表达率 (%)	P-FAK/FAK (mean \pm SD)
癌旁组织	20	0.110 ± 0.005
癌组织	90 ^b	0.385 ± 0.021^d

^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$ vs 癌旁组织.

3 讨论

FAK是Schaller *et al* 1992年发现的能使Src内源性蛋白酪

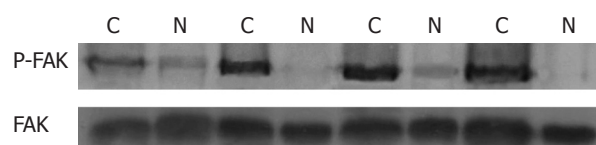


图2 调平总FAK后FAK Tyr397的表达. N: 癌旁组织; C: 癌组织.

氨酸激酶激活的主要底物, 是一种重要的非受体蛋白酪氨酸激酶(non-receptor protein tyrosine kinases)^[1]. FAK并不是癌基因, 但在肿瘤中表达明显增高. 国内外众多学者报道了FAK在不同来源的肿瘤中均表达上调^[2-5], 并与肿瘤的浸润转移存在密切关系. FAK有6个可以被磷酸化的酪氨酸位点, 其中Tyr397为自主磷酸化位点, 是一个极其重要的磷酸化位点. 当黏着斑形成后, Tyr397首先发生自身磷酸化, 同时Tyr397磷酸化后可以直接与含SH₂结构区域的信号分子如Src、PI-3K等结合. Src与FAK两者结合形成FAK/Src复合物后能够彼此激活, 活化的Src可催化FAK的其他酪氨酸磷酸化位点使其发生磷酸化, 从而使FAK完全激活^[6], 亦使FAK信号传导通路活化, 启动下游相应的重要事件发生. Tyr397作为整个事件的启动点, 其作用显得尤为突出^[7], 因此Tyr397的磷酸化水平可反映胞内FAK的活化状况. 最近也发现在结肠腺瘤向结肠癌的转化过程中, FAK特别是FAK Tyr397磷酸化蛋白的表达逐渐升高^[8].

目前关于临床肿瘤标本中FAK磷酸化状态的报道尚少, 在本实验中, 我们采用免疫印迹方法测定FAK和Tyr397-FAK, 它比单纯测定FAK更能反应肿瘤的演变过程、侵袭和转移等生物学行为. 本实验结果也显示Tyr397-FAK磷酸化蛋白在癌及癌旁组织中的表达率及表达水平均有明显差异.

FAK介导多条信号传导通路, 是细胞内多条信号传导通路的交汇点. 许多因子都可激活FAK使其磷酸化, 而磷酸化FAK表达的上调被认为在肿瘤发生、发展多个方面中起着重要作用, 诸如增殖、扰乱细胞-细胞接触、运动、侵袭、抗凋亡以及血管生成等^[9]. 我们通过敏感性很高的western blotting方法直接比较结肠癌组织和相对应癌旁组织的FAK蛋白表达, 而且为了更好的说明FAK Tyr397磷酸化蛋白的重要性, 特意调平每对组织的FAK蛋白后再次比较FAK Tyr397磷酸化蛋白表达, 而不是在总蛋白量相同下进行比较, 这样就使研究在相同的遗传背景下进行, 从而提高结果的可信度. 本实验结果表明结肠癌组织中FAK蛋白和FAK Tyr397磷酸化蛋白的表达均高于对应的癌旁组织. 特别是在FAK蛋白表达相同的情况下, 癌组织与癌旁组织中的FAK Tyr397磷酸化蛋白表达仍然有明显差异性, 这可能说明在肿瘤的发生、发展中起关键作用的是活化的FAK蛋白, Yu *et al*^[10]和Glover *et al*^[11]从细胞水平也分别证实FAK Tyr397磷酸化蛋白随刺激因素的时间和剂量增加而增加, 且有明显的因果关

系,刺激的作用是引起FAK Tyr397磷酸化,而不是促进FAK蛋白的表达,在许多癌旁组织中也有中低度表达的FAK,这可能是因为FAK本身并不是癌基因的缘故,FAK在成熟组织和许多细胞株中均可能有表达,但只是表达强度较弱,而FAK Tyr397磷酸化蛋白在癌旁组织中几乎无表达,这更加说明了磷酸化的FAK在肿瘤的多个方面所起到的重要作用.细胞实验中增加FAK的磷酸化可促进细胞运动、增加细胞侵袭力等细胞生物学改变^[12,13],这说明了磷酸化的FAK在肿瘤的发生、浸润、转移中起重要的作用.我们同样认为结肠癌由于磷酸化FAK表达的增加,导致肿瘤发生并加速恶性细胞的增殖、浸润和转移.因此测定FAK Tyr397磷酸化蛋白的表达比单纯测定FAK更能有效预示肿瘤的发生、发展和预后,可以作为一个肿瘤标记物.

有基于此,通过应用FAK磷酸化抗体、抑制剂^[14]及其过表达FAK的显性负抑制子(FAK-related non-kinase, FRNK)^[15]等可抑制FAK的磷酸化,来达到抑制癌细胞增殖、降低侵袭力、运动及转移等,这有望成为结肠癌治疗的新领域.

4 参考文献

- 1 Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003; 116: 1409-1416
- 2 Weiner TM, Liu ET, Craven RJ, Cance WG. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 1993; 342: 1024-1025
- 3 Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 2000; 19: 5606-5613
- 4 Lark AL, Livasy CA, Calvo B, Caskey L, Moore DT, Yang X, Cance WG. Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 215-222
- 5 Schneider GB, Kurago Z, Zaharias R, Gruman LM, Schaller MD, Hendrix MJ. Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion. *Cancer* 2002; 95: 2508-2515
- 6 Ruest PJ, Roy S, Shi E, Mernaugh RL, Hanks SK. Phospho-specific antibodies reveal focal adhesion kinase activation loop phosphorylation in nascent and mature focal adhesions and requirement for the autophosphorylation site. *Cell Growth Differ* 2000; 11: 41-48
- 7 Fu YM, Zhang H, Ding M, Li YQ, Fu X, Yu ZX, Meadows GG. Specific amino acid restriction inhibits attachment and spreading of human melanoma via modulation of the integrin/focal adhesion kinase pathway and actin cytoskeleton remodeling. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 587-598
- 8 Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2417-2423
- 9 Schlaepfer DD, Mitra SK. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 92-101
- 10 Yu HG, Schrader H, Otte JM, Schmidt WE, Schmitz F. Rapid tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130Cas by gastrin in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 135-146
- 11 Glover S, Delaney M, Dematte C, Kornberg L, Frasco M, Tran-Son-Tay R, Benya RV. Phosphorylation of focal adhesion kinase tyrosine 397 critically mediates gastrin-releasing peptide's morphogenic properties. *J Cell Physiol* 2004; 199: 77-88
- 12 Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Togawa A, Nakamura H, Murakami-Murofushi K, Kobayashi S, Imamura F, Inoue M. Cyclic phosphatidic acid inhibits RhoA-mediated autophosphorylation of FAK at Tyr-397 and subsequent tumor-cell invasion. *Int J Oncol* 2003; 22: 1247-1256
- 13 Hauck CR, Sieg DJ, Hsia DA, Loftus JC, Gaarde WA, Monia BP, Schlaepfer DD. Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 7079-7090
- 14 Nolan K, Lacoste J, Parsons JT. Regulated expression of focal adhesion kinase-related nonkinase, the autonomously expressed C-terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6120-6129
- 15 Hauck CR, Hsia DA, Puente XS, Cheresch DA, Schlaepfer DD. FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. *EMBO J* 2002; 21: 6289-6302

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

MMP-2 和 MMP-9 蛋白在结肠癌中的表达

张明林, 许建明, 梅 俏, 鲍峻峻

许建明, 梅俏, 鲍峻峻, 安徽医科大学第一附属医院消化内科 安徽省合肥市 230022

张明林, 安徽省马鞍山市人民医院消化内科 安徽省马鞍山市 243000

通讯作者: 许建明, 230022, 安徽省合肥市, 安徽医科大学第一附属医院消化内科. XJM1017@yahoo.com.cn

电话: 0551-2922039

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 protein in colonic carcinoma

Ming-Lin Zhang, Jian-Ming Xu, Qiao Mei, Jun-Jun Bao

Jian-Ming Xu, Qiao Mei, Jun-Jun Bao, Digestive Department of the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China

Ming-Lin Zhang, Digestive Department of the People's Hospital, Maanshan 243000, Anhui Province, China

Correspondence to: Jian-Ming Xu, 230022, Digestive Department of the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China. XJM1017@yahoo.com.cn

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

Abstract

AIM: To analyze the correlation of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) and MMP-9 protein expression with the pathological factors in colonic carcinoma, and to investigate the clinical significance of matrix metalloproteinases in the occurrence of colonic carcinoma.

METHODS: The expression of MMP-2 and MMP-9 protein were measured by immunohistochemistry in the resected specimens from 31 patients with colonic carcinoma, and their relations with clinicopathologic factors were analyzed by SPSS 10.0 for Windows software. The specimens from ulcerative colitis ($n = 20$), colon adenoma ($n = 21$), and normal colon ($n = 10$) tissues were used as the controls.

RESULTS: The positive rate of MMP-2 protein expression was significantly different between colonic carcinoma and normal colon tissues (10.0% vs 54.8%, $P < 0.05$), while no significant difference was found between other groups. The positive rates of MMP-2 and MMP-9 expression tended to increase in ulcerative colitis, colon adenoma, and colonic carcinoma gradually. The positive rates of MMP-2 and MMP-9 protein expression were significantly correlated with

the Dukes's staging and lymph node metastasis (C-D stage vs A-B stage: 76.9% vs 38.9%, $P < 0.05$; 84.6% vs 27.8%, $P < 0.05$; metastasis vs non-metastasis: 76.9% vs 38.9%, $P < 0.05$; 84.6% vs 27.8%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Over-expression of MMP-2 and MMP-9 protein play important roles in the carcinogenesis and metastasis of colonic carcinoma.

Key Words: Colonic carcinoma; Matrix metalloproteinases; Ulcerative colitis; Colonic adenoma

Zhang ML, Xu JM, Mei Q, Bao JJ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 protein in colonic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2494-2497

摘要

目的: 分析基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和MMP-9蛋白与结肠癌病理因素的关系, 探讨MMP蛋白在结肠癌发生中的临床意义。

方法: 用SP免疫组化法检测31例结肠癌中MMP-2和MMP-9蛋白表达情况, 并用SPSS 10.0 for Windows软件统计分析MMP蛋白与临床病理因素的关系。以20例溃疡性结肠炎、21例结肠腺瘤和10例正常结肠黏膜作为对照组。

结果: MMP-2除结肠癌组和正常结肠黏膜组间相比具有显著性差异(10.0% vs 54.8%, $P < 0.05$)外, 其余各组间比较差异无统计学意义, MMP-9各组间比较差异无统计学意义, 从溃疡性结肠炎、结肠腺瘤到结肠癌中MMP-2和MMP-9蛋白表达阳性率不同且具有递增趋势。MMP-2和MMP-9蛋白表达与结肠癌的Duke's分期及有无淋巴结转移显著相关(A+B期: 38.9%和27.8%; C+D期: 76.9%和84.6%; 无淋巴结转移: 38.9%和27.8%; 有淋巴结转移: 76.9%和84.6%, $P < 0.05$)。

结论: MMP-2和MMP-9蛋白过度表达对结肠癌的诊断、Duke's分期及有无淋巴结转移判断具有重要的临床意义。

关键词: 结肠肿瘤; 基质金属蛋白酶类; 溃疡性结肠炎; 结肠腺瘤

张明林, 许建明, 梅俏, 鲍峻峻. MMP-2和MMP-9蛋白在结肠癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2494-2497

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2494.asp>

0 引言

肿瘤在生长和转移过程中必须破坏由细胞间基质和基底膜组成的细胞外基质(ECM)^[1]。目前研究证明, 基质

金属蛋白酶类(matrix metalloproteinases, MMPs)对肿瘤的侵袭和转移起着极为重要的作用^[2-5]。MMPs中主要是MMP-2、MMP-9参与ECM降解。我们应用免疫组织化学方法研究MMP-2和MMP-9蛋白等在溃疡性结肠炎、结肠腺瘤、结肠癌等过程中的不同表达,并分析MMP-2和MMP-9蛋白与结肠癌的病理因素关系,探讨MMP-2和MMP-9蛋白在结肠癌发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选取马鞍山市人民医院1998-2003经手术病理证实的结肠癌31例,登录各个患者的年龄、性别,并根据临床和病理资料对于肿瘤的部位、组织学类型、肿瘤大小、有无转移、Duke's分期及浸润深度各项资料进行分析。31例结肠癌中男性11例,女性20例,年龄40-73岁,平均 61.9 ± 8.7 岁; <60岁10例, ≥60岁21例; 位于右半结肠11例,横结肠2例,左半结肠18例; 肿瘤直径<5 cm 13例, ≥5 cm 18例; A期4例, B期14例, C期11例, D期2例; 管状腺癌25例, 乳头状腺癌1例, 黏液腺癌4例, 未分化腺癌1例; 无淋巴结转移18例, 有淋巴结转移13例; 浸润至黏膜下层1例, 深肌层3例, 浆膜层27例。另随机收集20例溃疡性结肠炎、21例结肠腺瘤和10例正常结肠黏膜作为对照组,标本取自马鞍山市人民医院1998-2003的存档蜡块。鼠抗人MMP-2、MMP-9多克隆抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司, SP免疫组化试剂盒均购自福州迈新公司。

1.2 方法 对31例结肠癌的病理蜡块,重新制作石蜡切片,厚4 μm,用3 mL/L H₂O₂灭活内源性过氧化物酶10 min。PBS(pH 7.4)水洗。然后分别与一抗(鼠抗人MMP-2 1:100稀释; 鼠抗人MMP-9 1:150稀释)、二抗及过氧化物酶标记的链霉素亲和素抗体孵育,以PBS代替一抗作为阴性对照。PBS水洗后DAB显色15 min,苏木素复染,封片观察。

免疫组化结果判定^[6]: MMP-2, MMP-9染色以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。阳性细胞数: 0分为无阳性细胞, 1分为阳性细胞数<25%, 2分为阳性细胞25-50%, 3分为阳性细胞51-75%, 4分为阳性细胞数>75%。染色强度: 0分为无染色, 1分为弱染色, 2分为中等强度染色, 3分为强染色。计算各抗体的阳性细胞数和染色强度的得分,以3-7分为阳性。

统计学处理 百分率比较用 χ^2 检验,所有统计处理均在SPSS 10.0统计软件包中完成。

2 结果

2.1 正常结肠组织、溃疡性结肠炎、结肠腺瘤和结肠癌中MMP-2, MMP-9蛋白的表达率比较 MMP-2和MMP-9染色阳性物质主要分布在结肠癌细胞的细胞质,呈散在或团状分布,部分间质细胞如血管内皮细胞、纤维母细胞中亦有MMP-2, MMP-9表达,但表达强度弱于癌细胞。

在结肠腺瘤、溃疡性结肠炎以及正常结肠黏膜组织中的阳性染色细胞主要位于结肠腺体部位。

结肠癌中MMP-2, MMP-9的阳性表达率分别为54.8%和58.1%(表1),正常黏膜组织中阳性表达率分别为10.0%和30.0%,以弱或中等表达为主。结肠腺瘤中MMP-2, MMP-9阳性表达率分别为42.9%和52.4%,溃疡性结肠炎中MMP-2, MMP-9阳性表达率分别为30.0%和40.0%,均以强表达为主。

表1 正常结肠组织、溃疡性结肠炎、结肠腺瘤和结肠癌中MMP-2, MMP-9蛋白的表达率比较

组织学类型	n	MMP-2		阳性率 (%)	P值	MMP-9		阳性率 (%)	P值
		-	+			-	+		
正常结肠组织	10	9	1	10.0		7	3	30.0	
溃疡性结肠炎	20	14	6	30.0	>0.05	12	8	40.0	>0.05
结肠腺瘤	21	12	9	42.9	>0.05	10	11	52.4	>0.05
结肠癌	31	14	17	54.8	<0.05 ^a	13	18	58.1	>0.05

^aP < 0.05 vs 对照组。

在结肠组织MMP的表达中, MMP-2除结肠癌组和正常结肠黏膜组间相比具有显著性差异(P<0.05)外,其余各组间比较差异无统计学意义。MMP-9各组间比较差异无统计学意义。但从正常结肠黏膜组织、溃疡性结肠炎、结肠腺瘤到结肠癌的MMP-2, MMP-9表达具有递增趋势。

2.2 结肠癌中MMP-2, MMP-9蛋白表达与临床病理因素的关系 结肠癌中MMP-2和MMP-9蛋白表达水平与患者性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤直径、结肠癌分化程度及组织浸润程度无关(P>0.05)。Dukes分期A+B期和C+D期两组中, MMP-2阳性表达率分别为38.9%和76.9%, MMP-9阳性表达率分别为27.8%和84.6%,组间比较有显著差异(P<0.05)。结肠癌有淋巴结转移和无淋巴结转移两组中, MMP-2阳性表达率分别为76.9%和38.9%, MMP-9阳性表达率分别为84.6%和27.8%,组间比较有显著差异(P<0.05)(表2)。

3 讨论

肿瘤侵袭和转移过程涉及肿瘤细胞穿过细胞外基质屏障、血管壁的基底膜及穿出血管壁进入宿主微环境的过程。细胞外基质是细胞生存的重要内环境,由胶原、糖蛋白、蛋白多糖等构成,含有大量蛋白酶、细胞因子、黏附分子。研究表明, MMP是降解细胞外基质最重要的一组蛋白酶,在消化系肿瘤的发生、发展及侵袭和转移中具有重要作用^[2-5,7]。MMP家族按结构和基质特性不同可分为胶原酶(MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18)、明胶酶(MMP-2, MMP-9)、基质降解素(MMP-3, MMP-10, MMP-11)、膜型MMP等4大类^[8-10]。目前发现MMP-2、MMP-9被认为是在肿瘤侵袭转移过程中最直接和最重要的MMP。

本组实验结果显示, MMP-2表达在结肠癌中最高,

表2 MMP-2, MMP-9表达与结肠癌临床病理因素之间的关系

变量		MMP-2		阳性率(%)	P值	MMP-9		阳性率(%)	P值
		-	+			-	+		
性别	男	6	5	45.5	>0.05	7	4	36.4	>0.05
	女	8	12	60.0		8	12	60.0	
年龄(岁)	<60	6	4	40.0	>0.05	6	4	40.0	>0.05
	≥60	8	13	61.9		9	12	57.1	
肿瘤位置	右半结肠	5	4	44.4	>0.05	5	4	44.4	>0.05
	横结肠	1	3	75.0		2	2	50.0	
	左半结肠	8	10	55.6		8	10	55.6	
肿瘤直径	<5 cm	6	7	53.8	>0.05	8	5	38.5	>0.05
	≥5 cm	8	10	55.6		7	11	61.1	
Dukes分期	A+B期	11	7	38.9	<0.05	13	5	27.8	<0.05
	C+D期	3	10	76.9		2	11	84.6	
组织学类型	管状腺癌	11	14	56.0	>0.05	11	14	56.0	>0.05
	乳头状腺癌	0	1	100.0		1	0	0.0	
	黏液腺癌	2	2	50.0		2	2	50.0	
	未分化癌	1	0	0.0		1	0	0.0	
淋巴结转移	无	11	7	38.9	<0.05	13	5	27.8	<0.05
	有	3	10	76.9		2	11	84.6	
组织浸润程度	黏膜下或肌层	3	1	25.0	>0.05	3	1	25.0	>0.05
	浆膜或浆膜外层	11	16	59.3		12	15	55.6	

MMP-9蛋白表达在结肠癌中较高,但差异无显著性,其次为结肠腺瘤和溃疡性结肠炎,正常结肠黏膜组织中最低,但各组间比较无显著性差异, MMP-2、MMP-9在不同组织类型中表达符合溃疡性结肠炎→结肠腺瘤→结肠癌的演变趋势. Levy *et al*^[11-13]报道有72%的结直肠腺癌组织中的MMP-2 mRNA水平显著升高,且阳性率与肿瘤的浸润深度与转移相关. 黄文斌 *et al*^[14]采用免疫组化法检测87例结肠癌组织中MMP-2表达情况,结果发现结肠癌组织中MMP-2侵及结肠肌层的阳性表达率明显低于侵及结肠浆膜层者, MMP-2的表达与肿瘤的侵袭、转移有关. 同时相关研究结果提示, MMP-2、MMP-9表达与溃疡性结肠炎的结肠炎症程度相关, MMP-2、MMP-9参与溃疡性结肠炎患者溃疡边缘基底膜的破坏和重塑过程,抑制MMP-2和MMP-9可有效减轻组织破坏以及结肠炎症过程.

本研究结果显示,结肠癌中MMP-2和MMP-9蛋白表达水平与患者性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤直径、结肠癌分化程度及组织浸润程度无关. 在有淋巴结转移的结肠癌中MMP-2、MMP-9表达率明显高于无淋巴结转移者,组间比较有显著差异,提示结肠癌组织中MMP-2和MMP-9通过降解细胞外基质,促进结肠肿瘤细胞向肠壁深层浸润,发生淋巴结转移. Dukes分期中C+D期的结肠癌中MMP-2、MMP-9表达率明显高于A+B期,组间比较有显著差异,提示结肠癌中MMP-2、MMP-9过度表达与结肠癌Dukes分期和结肠癌的侵袭性密切相关. 本研究结果与Baker *et al*^[15-18]研究结果一致,表明MMP-2、MMP-9在促进结肠癌的淋巴结转移过程中起重要作用,具体机制尚待进一步研究.

4 参考文献

- Cawston T. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today* 1998; 4: 130-137
- Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 140-146
- Parsons SL, Watson SA, Collins HM, Griffin NR, Clarke PA, Steele RJ. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br J Cancer* 1998; 78: 1495-1502
- Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1999; 20: 749-755
- Leeman MF, Curran S, Murray GI. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol* 2003; 201: 528-534
- 钱颀, 刘南植, 程胜平. 胃癌组织Angiopoietin-2及MMP-9表达的意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 299-302
- Mysliwiec AG, Ornstein DL. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2002; 1: 208-219
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 207-214
- Oberg A, Hoyhtya M, Tavelin B, Stenling R, Lindmark G. Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 1085-1091
- Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, Swift RI, Abulafi AM. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 107: 541-550
- Levy AT, Cioce V, Sobel ME, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 439-444
- Vessey CJ, Wilding J, Folarin N, Hirano S, Takeichi M, Soutter P, Stamp GW, Pignatelli M. Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive

- squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1995; 176: 151-159
- 13 Chan CC, Menges M, Orzechowski HD, Orendain N, Pistorius G, Feifel G, Zeitz M, Stallmach A. Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16: 133-140
- 14 黄文斌, 朱晓群, 史良会, 徐国祥, 齐琼, 林鸿民. 大肠癌组织中基质金属蛋白酶-2和基质金属蛋白酶-9的表达. *临床与实验病理学杂志* 2002; 18: 496-499
- 15 Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2000; 87: 1215-1221
- 16 Wagenaar-Miller RA, Gorden L, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 119-135
- 17 Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 245-252
- 18 Masuda H, Aoki H. Host expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in normal colon tissue affects metastatic potential of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 393-397

电编 张敏 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

• 研究快报 BRIEF REPORT •

直肠癌 TME 术后检测癌组织及直肠系膜内 MMP-7 的意义

张好刚, 田素礼, 张日平

张好刚, 田素礼, 张日平, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 田素礼, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科. pwtsl@public.hr.hl.cn

电话: 0451-86605575 传真: 0451-86672339

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Significance of detection for matrix metalloproteinase-7 in rectal cancer tissues and mesorectum after total mesorectal excision

Hao-Gang Zhang, Su-Li Tian, Ri-Ping Zhang

Hao-Gang Zhang, Su-Li Tian, Ri-Ping Zhang, the Third Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Dr. Su-Li Tian, the Third Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. pwtsl@public.hr.hl.cn

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

Abstract

AIM: To detect the expression of matrix metallopro-

teinase(MMP)-7 in the mesorectum of patients with rectal cancer, and to provide theoretical evidence for the total mesorectal excision (TME).

METHODS: The expression of MMP-7 was detected in the specimens from cancer tissues, mesorectum (in the plane, tissues 2 cm distal to the lower margin, and the distal end of the tumor), and outer pelvic fascia by SP immunohistochemistry in 47 patients after TME. And the data were compared with the result of HE staining.

RESULTS: The positive rate of MMP-7 expression was 29.8% (14/47) in the mesorectum. Of those positive expressions, 7 were in the plane of tumor, 3 in both the tumor plane and tissues 2 cm distal to the lower margin of the tumor, and 4 only in the tissues 2 cm distal to the tumor. The positive rate was 14.8% (7/47) by HE staining, and the result of MMP-7 staining was all positive. The positive rate of MMP-7 expression was 91.5% (14/47) in the tumor tissues. There was no MMP-7 expression in the mesorectum, distal end of the outer pelvic fascia, and the control tissues (normal

rectal mucosa and mesorectum 10 cm distal to the upper margin of the tumor).

CONCLUSION: MMP-7 is expressed in mesorectal tissues of the tumor plane and tissues 2 cm distal to the tumor. The positive expression of MMP-7 is correlated with the degree of the tumor differentiation, depth of invasion, and the Dukes staging.

Key Words: Rectal cancer; Mesorectum; Matrix metalloproteinase-7

Zhang HG, Tian SL, Zhang RP. Significance of detection for matrix metalloproteinase-7 in rectal cancer tissues and mesorectum after total mesorectal excision. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2497-2500

摘要

目的: 研究直肠癌患者直肠系膜内MMP-7表达, 为全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)提供理论依据。

方法: 直肠癌TME术后, 应用免疫组化SP法检测47例患者癌组织、直肠系膜(肿瘤平面、肿瘤下缘下2 cm和系膜远端)及盆筋膜壁层MMP-7的表达。并与病理组织学染色(常规HE染色)结果进行比较。

结果: 直肠系膜中MMP-7的阳性表达率为29.8%(14/47), 有7例患者只在肿瘤平面系膜内有MMP-7表达, 3例在肿瘤平面和肿瘤下缘下2 cm处系膜内有MMP-7表达, 4例只在肿瘤下缘下2 cm有MMP-7阳性表达。常规病理染色阳性率为14.8%(7/47), 其MMP-7染色均为阳性。在癌组织中, MMP-7的阳性率为91.5%(14/47)。在直肠系膜远端、盆筋膜壁层和对照组织(距肿瘤上缘10 cm以上的正常直肠黏膜和系膜)中, MMP-7均无表达。

结论: 直肠系膜内MMP-7表达可及肿瘤平面和肿瘤下缘下2 cm处, 但尚未达到直肠系膜远端和盆筋膜壁层。肿瘤的分化程度、肠壁浸润深度和Dukes分期与系膜内MMP-7阳性表达有关。从分子病理学的角度可以认为TME是科学的。

关键词: 直肠癌; 直肠系膜; MMP-7

张好刚, 田素礼, 张日平. 直肠癌TME术后检测癌组织及直肠系膜内MMP-7的意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2497-2500
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2497.asp>

0 引言

基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)是一种与肿瘤浸润和转移密切相关的蛋白水解酶^[1]。在直肠癌中, 只在癌细胞和个别异形性上皮细胞表达, 在肿瘤间质和淋巴细胞中均不表达, 具有较强的癌细胞特异性, 是一种肿瘤微转移的标志物^[2-5]。

我们在全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)术后, 检测癌组织、直肠系膜和盆筋膜壁层组织中MMP-7的表达, 希望能够了解直肠系膜内MMP-7的表达特点, 从分子病理学的角度为TME提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2004-04/2005-04的直肠癌患者47例, 所有病例均经病理证实。其中男性28例、女性19例, 年龄48-79岁, 中位年龄59岁。Dukes分期A期19例、B期15例、C期13例。47例患者均行TME, 其中Dixon术37例, Miles术10例。

1.2 方法

1.2.1 标本采集过程 (1)手术中, 在肿瘤平面和距离肿瘤下缘2 cm处的盆筋膜壁层各取一块组织(大小1.0 cm×1.0 cm)。(2)手术结束时, 立即将新鲜切除的手术标本平铺在无菌单上, 沿直肠远切缘游离直肠系膜至肿瘤下缘。无张力下测量系膜长度。在肿瘤下缘、肿瘤下缘下2 cm和直肠系膜远端分别截取1 cm宽的直肠系膜。(3)在肿瘤对侧纵向剖开肠管, 无菌生理盐水洗净, 避开缺血及坏死区, 在肿瘤实质取1.0 cm×1.0 cm大小组织2块。将切取组织置入40 g/L甲醛溶液中固定。同时测量肿瘤大小, 观察大体分型, 记录患者临床资料。另采集因直肠良性病变, 行直肠部分切除的标本15例, 取正常直肠黏膜及正常直肠系膜作为对照组。

1.2.2 染色 将所切取标本常规石蜡包埋, 每隔1 mm连续切片2张, 切片厚5 μm。将每2张切片随机分配, 其中一张行常规病理染色(发现微转移灶为阳性), 另一张行免疫组化MMP-7染色(抗MMP-7抗体和UltraSensitive™ S-P超敏试剂盒购自福州迈新公司)。以迈新公司提供阳性片为阳性对照, PBS代替一抗作为阴性对照。细胞膜或胞质染成棕黄色、棕褐色颗粒为阳性, 阴性细胞不着色。高倍镜下(×400)观察染色较好的二十个视野, 计数阳性细胞, 1-5个为+, 6-25个为++, 26个以上为+++。

统计学处理 应用SPASS 10.0统计软件对数据进行 χ^2 检验或Fisher精确检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 各组织中MMP-7的表达 MMP-7在对照组中无表达, 在直肠癌中阳性率为91.5%(43/47), 在直肠系膜中为29.8%(14/47), 与对照组比较均有显著性差异。盆筋膜壁层MMP-7无表达。在直肠系膜中, 有7例患者只在肿瘤平面系膜内有MMP-7表达, 3例在肿瘤平面和肿瘤下缘下2 cm处系膜内有MMP-7表达, 4例只在肿瘤下缘下2 cm有MMP-7阳性表达。直肠癌直肠系膜MMP-7的表达与肿瘤的临床病理特征的关系(表1)。

2.2 常规病理染色和MMP-7免疫组织化学染色阳性表达情况 通过常规病理染色, 我们发现7例患者的标本在直肠系膜中有转移灶, 阳性率为14.8%(7/47)。这7例患者的

表1 直肠癌临床病理特征与直肠系膜MMP-7的表达的关系

临床病理特征	n	MMP-7表达					P值
		-	+	++	+++	阳性率(%)	
肿瘤形态 肿块型	14	11	1	1	0	14.2	<0.05
溃疡型	22	16	2	3	2	31.8	
浸润型	11	6	0	3	2	45.4	
分化程度 高+中	24	17	2	3	31	16.6	<0.05
低分化	23	16	3	3	1	30.4	
浸润深度 T ₁ +T ₂	22	15	3	1	3	18.1	<0.05
T ₃ +T ₄	25	18	2	4	1	28.0	
TNM分期 I+II	19	5	0	2	1	15.7	<0.05
III+IV	15	10	3	1	1	33.3	
肿瘤纵径 ≤3 cm	20	14	1	3	2	30.0	>0.05
>3 cm	19	13	2	3	1	31.5	

直肠系膜均有MMP-7表达. 在常规病理染色未发现转移灶的40例患者中, 有7例MMP-7染色阳性, MMP-7染色的阳性率为29.8%(14/47). 两阳性率差别有显著性($P<0.05$).

盆筋膜壁层无常规病理染色阳性, 也无MMP-7阳性表达.

3 讨论

手术治疗是直肠癌综合治疗的基础. 近20 a的TME的应用使直肠癌手术治疗效果得到很大的改善. 局部复发率由25%降至3-7%^[6-9]. 现在已经广为外科医生们所接受, 是直肠癌外科治疗的金标准. Heald^[10-13]和Wang *et al*^[14]认为TME应在盆筋膜脏壁两层间锐性切除, 直肠系膜(盆筋膜脏层)完整切除无撕脱, 并保证肉眼及镜下无切缘累及.

然而, 对于肿瘤而言, 其浸润和转移是肿瘤细胞与细胞外基质相互作用的结果. 在其发展成为肉眼及镜下可以检查到的转移灶之前, 已经发生了微转移. 微转移的检测方法有很多种, 连续切片法是最早应用于检测微转移的粗略方法, 而免疫学和分子生物学的发展为检测微小癌灶及少量癌细胞的存在提供了更多特异性高、敏感性强的方法. 在这些方法中免疫组化方法简单、价格便宜, 可以广泛的应用于临床, 并且最重要的是, 它比常规病理组织染色有更高的敏感性^[15].

MMP-7是基质金属蛋白酶家族中分子量最小的成员, 具有强大的基质降解活性和广泛的底物特异性, 它在肿瘤的发展、转移和浸润过程中起重要的作用^[1]. 在大肠癌中, MMP-7具有很强的癌细胞特异性, 正常黏膜中不表达. 淋巴结中MMP-7的表达可以作为诊断大肠癌淋巴结转移尤其是微转移的依据^[16,17]. 我们的结果表明, 正常直肠黏膜和系膜内无MMP-7阳性染色, 91.5%(14/47)的患者癌组织中有MMP-7表达, 与国内外的文献报道相符^[18].

在系膜中, 我们通过常规病理染色发现7例微转移, 并且其MMP-7表达均为阳性. 在常规病理染色结果阴性的40例患者中, 有7例MMP-7表达阳性. 这7例患者的直肠系膜中存在微转移灶. 因此TME术后检测直肠系膜中

MMP-7的表达能够提高临床分期的准确性, 对判断患者预后、指导术后辅助治疗具有重要意义. 通过直肠癌生物学特征与其系膜中MMP-7表达比较发现, 分化低、浸润深或是Dukes分期晚的直肠癌患者与MMP-7的阳性表达有关. 而肿瘤大小的不同在MMP-7的阳性表达率方面, 我们未发现差异. 这与肿瘤中MMP-7表达情况并不完全相同.

我们通过比较与肿瘤不同距离的直肠系膜MMP-7表达情况发现, 4例患者只在肿瘤下缘下2 cm有MMP-7阳性表达, 这可能是文献中提到的肿瘤通过静脉和淋巴进行直肠系膜内跳跃式播散的表现^[19,20]. 从直肠系膜远端和盆筋膜壁层中我们未检测到MMP-7的表达, 我们可以看出, TME切除微转移灶的彻底性. 这为TME从分子病理学的角度提供了理论依据.

我们只是在纵向研究了直肠系膜的几个平面(肿瘤平面、下缘下2 cm和直肠系膜远端)的MMP-7表达情况, 只能说明这几个纵向平面的情况, 并不能说明MMP-7在系膜内表达具体有多远和多深, 这些尚需要做进一步的研究.

4 参考文献

- 1 Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 101-117
- 2 Roeb E, Arndt M, Jansen B, Schumpelick V, Matern S. Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 518-524
- 3 Boedefeld WM 2nd, Soong R, Weiss H, Diasio RB, Urist MM, Bland KI, Heslin MJ. E1A-F is overexpressed early in human colorectal neoplasia and associated with cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-7. *Mol Carcinog* 2005; 43: 13-17
- 4 Mimori K, Yamashita K, Ohta M, Yoshinaga K, Ishikawa K, Ishii H, Utsunomiya T, Barnard GF, Inoue H, Mori M. Coexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and epidermal growth factor (EGF) receptor in colorectal cancer: an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor is effective against MMP-7-expressing cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8243-8249
- 5 Zeng ZS, Shu WP, Cohen AM, Guillem JG. Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 144-148
- 6 Mahteme H, Pahlman L. Good colorectal cancer surgery. *Tech Coloproctol* 2005; 9: 1-7
- 7 Ho K, Seow-Choen F. Surgical results of total mesorectal excision for rectal cancer in a specialised colorectal unit. *Recent Results Cancer Res* 2005; 165: 105-111
- 8 Grotowski M. Rectal cancer-review of methods and treatment results. *Pol Merkurusz Lek* 2004; 16: 289-292
- 9 Leong AF. Total mesorectal excision (TME)-twenty years on. *Ann Acad Med Singapore* 2003; 32: 159-162
- 10 Heald RJ. Total mesorectal excision (TME). *Acta Chir Iugosl* 2000; 47: 17-18
- 11 Heald RJ, Moran BJ, Ryall RD, Sexton R, MacFarlane JK. Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997. *Arch Surg* 1998; 133: 894-899
- 12 Moore E, Heald RJ, Cecil TD, Sharpe GD, Sexton R, Moran BJ. Almost all five year disease free survivors are cured following rectal cancer surgery, but longer term follow-up detects some late local and systemic recurrences. *Colorectal Dis* 2005; 7: 403-405
- 13 Heald RJ. Sphincter and nerve preserving total mesorectal

- excision. *Acta Chir Jugosl* 2002; 49: 7-8
- 14 Wang Z, Zhou ZG, Wang C, Zhao GP, Chen YD, Gao HK, Zheng XL, Wang R, Chen DY, Liu WP. Microscopic spread of low rectal cancer in regions of mesorectum: pathologic assessment with whole-mount sections. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2949-2953
- 15 Tsavellas G, Patel H, Allen-Mersh TG. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 1307-1320
- 16 Roeb E, Matern S. Matrix metalloproteinases and colorectal cancer. *Med Klin (Munich)* 2003; 98: 763-770
- 17 万远廉, 潘义生, 刘玉村, 郭源, 魏群. RT-PCR方法诊断大肠癌淋巴结微转移. *中国实用外科杂志* 2000; 20: 47-48
- 18 Shiomi T, Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 145-152
- 19 王小林, 卿三华, 黄祥成, 吴承堂, 宋京翔, 姚学清. 直肠癌直肠系膜播散的临床病理观察. *中华胃肠外科杂志* 2002; 5: 210-212
- 20 Zhao GP, Zhou ZG, Lei WZ, Yu YY, Wang C, Wang Z, Zheng XL, Wang R. Pathological study of distal mesorectal cancer spread to determine a proper distal resection margin. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 319-322

电编 张敏 编辑 管鑫妍 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 BRIEF REPORT •

幽门螺杆菌vacA基因重组表达的包涵体复性及ELISA方法的建立

党双锁, 王宏仓, 贾晓黎, 袁利超, 王宝峰, 张欣, 张正国, 程延安

党双锁, 王宏仓, 贾晓黎, 袁利超, 王宝峰, 张欣, 张正国, 程延安, 西安交通大学第二医院感染科 陕西省西安市 710004

通讯作者: 党双锁, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学第二医院感染科. shuang suo640212@sohu.com

电话: 029-83036998

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Disease, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, 157 West 5th Road, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. shuang suo640212@sohu.com

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

Renaturation of *Helicobacter pylori* vacA gene recombined expressive inclusion body and construction of ELISA method

Shuang-Suo Dang, Hong-Cang Wang, Xiao-Li Jia, Li-Chao Yuan, Bao-Feng Wang, Xin Zhang, Zheng-Guo Zhang, Yan-An Cheng

Shuang-Suo Dang, Hong-Cang Wang, Xiao-Li Jia, Li-Chao Yuan, Bao-Feng Wang, Xin Zhang, Zheng-Guo Zhang, Yan-An Cheng, Department of Infectious Disease, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Shuang-Suo Dang, Department of Infectious

Abstract

AIM: To increase the biological activity of the expressive product through denaturation and renaturation of *H. pylori* vacA gene recombined expressive inclusion body, and to discuss the feasibility of mass production of VacA antigen.

METHODS: The VacA antigen expressed engineering bacterium was induced by Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The expressed inclusion body was denatured, renatured and dialyzed, and its activity was identified. The plates of ELISA were folded by the produced antigen. Then the ELISA method was constructed to determine the biological activity of the

antigen.

RESULTS: The recombinant engineering bacterium expressed M_r 3 300 target protein in the form of inclusion body. SDS-PAGE showed the purity of the optimized inclusion body was above 95%. The accordant rate was 97.1% between ELISA and blot electrophoresis after the activity examination was performed in 126 healthy people.

CONCLUSION: The biological activity of *H pylori* vacA gene recombinant expressive inclusion body can be significantly and stably improved after denaturation and renaturation. So the inclusion body can be used as a candidate for the production of *H pylori* vaccine.

Key Words: *Helicobacter pylori*; VacA gene; Inclusion body; Renaturation; Denaturation

Dang SS, Wang HC, Jia XL, Yuan LC, Wang BF, Zhang X, Zhang ZG, Cheng YA. Renaturation of *Helicobacter pylori* vacA gene recombinant expressive inclusion body and construction of ELISA method. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2500-2503

摘要

目的: 通过对vacA重组工程菌表达产物包涵体的变性、复性, 提高表达产物的生物学活性, 建立ELISA方法, 讨论VacA抗原规模生产的可行性。

方法: 利用已经构建的表达VacA抗原的工程菌, 用IPTG诱导, 表达的包涵体通过系列条件的变性、复性、透析, 并经活性鉴定。所制抗原用以包被ELISA板, 建立ELISA方法并确定抗原的生物学活性。

结果: 重组工程菌可表达 M_r 3 300的目的蛋白, 表达形式为包涵体, 条件优化后的包涵体经SDS-PAGE显示纯度达95%以上, 活性经ELISA法测定正常人126例和blot电泳测定结果符合率为97.1%。

结论: 包涵体变性复性后生物活性大幅度提高, 并且具有良好的重复性和稳定性, 可作为幽门螺杆菌疫苗制备的候选抗原及临床检测的诸多方法的抗原原料。

关键词: 幽门螺杆菌; vacA基因; 包涵体; 变性; 复性

党双锁, 王宏仓, 贾晓黎, 袁利超, 王宝峰, 张欣, 张正国, 程延安. 幽门螺杆菌vacA基因重组表达的包涵体复性及ELISA方法的建立. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2500-2503

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2500.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)为革兰氏阴性细菌, 螺杆菌状, 与多种胃病密切相关, 细胞空泡毒素

A(vacuolating cytotoxin A, vacA)存在于所有*H pylori*菌株, 但仅在50-60%的菌株中表达^[1-9]。我们以*H pylori*菌株11 638总DNA为模板扩增了vacA基因的一个片段, 通过重组技术表达VacA抗原。该抗原主要以包涵体形式存在, 包涵体一级结构(即氨基酸序列)虽然正确, 但其立体结构是错误的, 所以没有生物活性^[10-12]。因此, 为获得天然状态的目标蛋白, 我们在分离回收包涵体后, 溶解包涵体并使其中的目标蛋白质恢复应有的天然构象和活性。用复性后的蛋白建立ELISA检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料 正常人血清126例取自西安市中心血站; *H pylori*菌株11 638为西京医院消化内科惠赠。

1.2 方法

1.2.1 构建vacA重组表达载体 vacA引物按照菌株11 638 vacA的基因序列设计, 采用pRSETA His6表达载体, 转化大肠杆菌BL21(DE3), 酶切鉴定重组克隆, IPTG诱导目的蛋白表达; 采用分级分离的方法, 对诱导全菌的外周质, 胞质及沉淀进行分析, 判断目的蛋白表达形式。

1.2.2 包涵体变性和复性 变性液为20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 6 mol/L盐酸胍; 20 mmol/L 2-巯基乙醇(pH8.5); 1 mmol/L EDTA·2Na; 10 mL/g包涵体, 室温过夜充分溶解包涵体。复性液为20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 0.4 mol/L L-精氨酸; 1 mmol/L还原型谷胱甘肽; 0.1 mmol/L氧化型谷胱甘肽, 透析液为0.1 mol/L盐酸胍; 20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 25 mmol/L NaCl, 4℃下透析, 离心, 取上清浓缩。

1.2.3 复性蛋白检测 活性鉴定用ELISA方法检测, 以复性蛋白为包被抗原, 0.05-15 μg/孔, 血清按1:100稀释, 博士德酶标羊抗人IgG 1:10 000稀释, TMB显色; 深圳伯劳特公司的*H pylori* blot电泳测定临界阳性血清, PBS为空白对照。

1.2.4 血清抗体检测 用复性蛋白为包被抗原, 1 μg/孔, 血清按1:100稀释, 博士德酶标羊抗人IgG 1:10 000稀释, TMB显色, 以 $A_{450nm}>0.5$ 为阳性, 设立阳性对照和阴性对照, 确定ELISA方法, 检测血清的抗vacA抗体, 结果和blot电泳测定结果相比较。

2 结果

2.1 vacA基因重组表达载体的构建 重组质粒可切出903 bp的外源片段。

2.2 表达形式鉴定 表达vacA相对分子质量为 M_r 3 300, 主要以包涵体形式存在。

2.3 复性蛋白的活性鉴定 经纯化的vacA倍比稀释后包被ELISA板, 用抗vacA抗体阳性血清(深圳伯劳特*H pylori*抗原筛出)测定其活性, 可见复性的vacA具有良好的抗原活性。

2.4 ELISA方法 检测正常人血清抗vacA抗体, 和blot电泳

测定结果相比, 特异性为97.6%, 敏感性为96.5%, 符合率97.1%(表1)。

表1 ELISA法和blot电泳对比检测结果比较

	blot电泳阳性	blot电泳阴性	合计
ELISA阳性	40	3	43
ELISA阴性	1	82	83

3 讨论

幽门螺杆菌为定植于人胃部的革兰氏阴性螺杆菌状细菌, 和慢性胃炎、消化性溃疡、黏膜相关淋巴样组织性淋巴瘤和胃癌等疾病的发生密切相关。它是世界性分布的病菌, 在人群中约有半数受到*H pylori*的感染。细胞空泡毒素A基因存在于所有的*H pylori*菌株中, 编码可损伤上皮细胞的空泡毒素A, 但仅在50-60%的菌株中表达^[13]。

*vacA*基因编码的蛋白质, 是*H pylori*所特有的分泌性毒素, 能使哺乳动物的上皮细胞发生空泡变化, 最终导致细胞死亡。是一种重要致病因子^[16], 也是*H pylori*毒力分型的标志^[14-17], 感染*H pylori*的个体是否发病, 与宿主基因易感性、环境因素及所感染*H pylori*菌株的型别有关, 在感染了*H pylori*的人群中约有15%的人发病^[18-21], 因而对*H pylori*的菌株型别的检测就尤为重要。

*vacA*作为*H pylori*的一种与疾病发生密切相关的重要抗原, 在制备*H pylori*的疫苗方面有很大的应用价值。我们以*H pylori*菌株11 638总DNA为模板扩增了*vacA*基因的一个片段, 并选择pRSETA His6表达载体, 高水平的表达His6-*vacA*。由于许多外源蛋白质在大肠杆菌细胞内表达时, 不能自发折叠生成一定的空间结构和特定生物功能的蛋白质, 而是以包涵体形式存在于细胞内, 虽然包涵体具有富集目标蛋白、抗蛋白酶及对宿主毒性小等特点, 但由于没有生物活性, 不能直接应用, 目前对包涵体形成和复性过程中发生聚集的机制尚不清楚, 许多已建立的高效复性方法是在反复实验和优化的基础上建立的, 且没有普遍性^[22-25]。本研究中所表达的外源蛋白以包涵体形式存在, 上清中可溶性目的蛋白极少, 因此, 解决包涵体的复性成为获得具有天然构象的目的蛋白的关键。

我们根据His6与金属离子Ni²⁺高亲和力结合的特性^[26], 通过镍柱直接一步纯化并进行重折叠, 纯度可直接达到98%, 并具有较高的生物学活性。

但由于亲和柱的特点, 获得大量的抗原比较困难, 我们通过更换不同的变性剂(脲素、盐酸胍、SDS等)使包涵体彻底溶解, 改变pH值、温度、蛋白浓度、变性剂浓度等, 确立复性条件, 采用稀释复性的方法, 获得大量的目的蛋白, 和阳性对照抗原比较具有良好的活性和抗原性。

利用该抗原来建立检测血清抗体的ELISA方法, 和blot电泳测定结果相比, 特异性为97.6%, 敏感性为96.5%, 符合率97.1%。可作为筛查幽门螺杆菌*vacA*感染的有效的

方法。该抗原可以大批量生产, 满足临床检测的需要。

4 参考文献

- Murakita H, Hirai M, Ito S, Azuma T, Kato T, Kohli Y. Vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, atrophic gastritis and gastric carcinoma patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: S29-S31
- Konturek PC, Bielanski W, Konturek SJ, Hahn EG. *Helicobacter pylori* associated gastric pathology. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 695-710
- Peek RM Jr, Blaser MJ, Mays DJ, Forsyth MH, Cover TL, Song SY, Krishna U, Pietenpol JA. *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res* 1999; 59: 6124-6131
- Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY. Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J Clin Pathol* 1999; 52: 215-218
- Hirai M, Azuma T, Ito S, Kato T, Kohli Y, Fujiki N. High prevalence of neutralizing activity to *Helicobacter pylori* cytotoxin in serum of gastric-carcinoma patients. *Int J Cancer* 1994; 56: 56-60
- Zhang ZW, Farthing MJ. Molecular mechanisms of *H pylori* associated gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 369-374
- Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y, Roorda P, Feller M, Dankert J, Tytgat GN, van der Ende A. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis* 1996; 173: 1171-1175
- McNamara D, O'Morain C. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: S294-298
- Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 1990; 58: 603-610
- 宁云山, 李妍, 王小宁. 包含体蛋白质的复性研究进展. *生物技术通讯* 2001; 12: 237-240
- 冯小黎. 重组包涵体蛋白质的折叠复性. *生物化学与生物物理进展* 2001; 28: 482-485
- Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Isolation and renaturation of bio-active proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 1512-1515
- Cover TL, Vaughn SG, Cao P, Blaser MJ. Potentiation of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin activity by nicotine and other weak bases. *J Infect Dis* 1992; 166: 1073-1078
- Szabo I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* 1999; 18: 5517-5527
- McGee DJ, Mobley HL. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 241: 155-180
- Mahachai V, Tangkijvanich P, Wannachai N, Sumpathanukul P, Kullavanijaya P. CagA and VacA: virulence factors of *Helicobacter pylori* in Thai patients with gastroduodenal diseases. *Helicobacter* 1999; 4: 143-147
- 韩锋产, 阎小君, 苏成芝. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A及细胞空泡毒素A的研究. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 160-161
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131
- Atherton JC. *Helicobacter pylori* unmasked-the complete genome sequence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 1137-1140
- Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut* 1999; 45: 499-502

- 21 Blaser MJ. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question in mucosal damage? *Ann Med* 1995; 27: 559-563
- 22 Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Kondoh A, Fisher RJ. Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett* 1994; 345: 125-130
- 23 Goldberg ME, Expert-Bezancon N, Vuillard L, Rabilloud T. Non-detergent sulphobetaines: a new class of molecules that facilitate *in vitro* protein renaturation. *Fold Des* 1996; 1: 21-27
- 24 Clark EDB. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9: 157-163
- 25 Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E.coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* 1997; 66: 197-238
- 26 Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, Naumann M, Meyer TF. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2000; 2: 155-164

电编 张敏 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 •

第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

本刊讯 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容

本次会议的征文内容包括: (1)介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果; (2)结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应证和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果; (3)中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应证、临床疗效和经验教训; (4)中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择; (5)中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验; (6)采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验; (7)肛门、结直肠损伤及异物处理的经验; (8)介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物。

2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性;全文4 000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄: (1)广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编: 518029, 电话: 0755-82699768, 手机:13714327555, Email:kewei1968@126.com; (2)深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机:13923803457, Email:ssshhqqq66@163.com。

3 其他

本次会议可授予国家级继续教育 I 类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知。欢迎广大相关领域工作及研究人员参加。

胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤临床与内镜表现特征

鲍柏军, 黄介飞, 周国雄, 肖明兵, 章建国

鲍柏军, 黄介飞, 周国雄, 肖明兵, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

章建国, 南通大学附属医院病理科 江苏省南通市 226001

通讯作者: 鲍柏军, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科. bamboo@medmail.com.cn

电话: 0513-5052608

收稿日期: 2005-09-03 接受日期: 2005-09-30

Clinical and endoscopic features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma

Bai-Jun Bao, Jie-Fei Huang, Guo-Xiong Zhou, Ming-Bing Xiao, Jian-Guo Zhang

Bai-Jun Bao, Jie-Fei Huang, Guo-Xiong Zhou, Ming-Bing Xiao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Jian-Guo Zhang, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Bai-Jun Bao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. bamboo@medmail.com.cn

Received: 2005-09-03 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To investigate the clinical and endoscopic features of gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma, and to improve the accuracy of early diagnosis.

METHODS: The clinical and endoscopic data of 22 patients, who were surgically and pathologically diagnosed with gastric MALT lymphoma, were retrospectively reviewed and analyzed.

RESULTS: Most of the symptoms were exhibited as abdominal discomfort and upper gastrointestinal hemorrhage. Most of the pathological changes appeared in the gastric antrum and body in the form of bulgy, ulcerative and infiltrative lesions, featuring as multiform, multi-morphology, and diffuse changes under endoscope. All the 22 patients were diagnosed with B cell lymphoma, and *Helicobacter pylori* was founded in 18 cases (81.8%).

CONCLUSION: The clinical symptoms of gastric MALT lymphoma have no specificity. The endoscopic features are of variety, and the lesions are extensive. Clumpy and deep biopsy with timely immunohistochemistry can

improve the accuracy of endoscopic diagnosis.

Key Words: Lymphoma; Mucosa associated lymphoid tissue; Endoscope; *Helicobacter pylori*

Bao BJ, Huang JF, Zhou GX, Xiao MB, Zhang JG. Clinical and endoscopic features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2504-2506

摘要

目的: 探讨胃黏膜相关淋巴组织(mucosa associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤临床及内镜表现特征, 以提高早期诊断水平。

方法: 总结22例经手术及病理证实的MALT 淋巴瘤患者的临床及内镜表现资料。

结果: 临床表现以腹部不适及上消化道出血为主。病变多见于胃窦、体部, 表现为隆起性、溃疡性及浸润性损害, 以多灶性、多形性及弥漫性病变为特征。22例均为B细胞淋巴瘤, 18例(81.8%)幽门螺杆菌(*H pylori*)阳性。

结论: 胃 MALT 淋巴瘤临床表现无特异性, 内镜下病变形态多样、范围广。内镜下多块、深挖取材结合及时免疫组织化学检查可提高内镜诊断准确率。

关键词: 淋巴瘤; 黏膜相关淋巴组织; 内镜; 幽门螺杆菌

鲍柏军, 黄介飞, 周国雄, 肖明兵, 章建国. 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤临床与内镜表现特征. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2504-2506

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2504.asp>

0 引言

胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤是结外非霍奇金淋巴瘤的常见类型。此病起病隐匿, 早期缺乏特异性临床表现, 内镜下表现与胃溃疡、胃息肉及胃恶性肿瘤相似, 甚至内镜下活检病理都难与胃癌鉴别, 而且病例类型多样, 病理表现复杂, 因此, 临床诊断困难。我们总结本院1999-01/2005-03经内镜及手术病理确诊的22例胃MALT淋巴瘤临床表现及内镜特点, 以期提高对胃MALT淋巴瘤的认识和诊断水平。

1 材料和方法

1.1 材料 选取我院1999-01/2005-03经内镜及手术病理确诊的22例胃MALT淋巴瘤。男10例, 女12例, 26-78岁, 平均

年龄60.9岁。

1.2 方法 所有病例均行胃镜检查、活检和手术探查,并经病理检查证实。标本经40 g/L福尔马林固定、石蜡切片(5 μ m)、HE染色和免疫组织化学检查。免疫组织化学采用S-P法,抗体为LCA、CD20、CD79 α 、uchl₁、CD3、bcl-10等(购自福州迈新生物有限公司)。MALT淋巴瘤组织学诊断标准为:(1)淋巴滤泡边缘区肿瘤细胞为中心细胞样(CCL)细胞;(2)CCL细胞有向浆细胞分化倾向;(3)瘤细胞浸润至腺体上皮组织中,破坏腺上皮,形成特征性的嗜上皮现象;(4)肿瘤性滤泡和反应性淋巴滤泡可同时存在。并符合Dawson *et al*原发性胃恶性淋巴瘤诊断标准:(1)无浅表淋巴结肿大;(2)无肝脾肿大;(3)周围血白细胞分布正常;(4)胸片证实无纵隔淋巴结肿大;(5)手术时除区域淋巴结受累外,未发现其他肿块。

胃黏膜活检和(或)手术切除标本,经HE或Warthin-Starry银染色,观察组织中有无*H pylori*感染,结合快速尿素酶试验及*H pylori*-DNA(PCR法)检测结果。

2 结果

2.1 临床症状 MALT淋巴瘤起病隐匿,从发病到就诊的平均时间为9.6 mo(1-36 mo)。主要症状依次为腹痛18例,黑便13例,腹胀12例,消瘦6例,呕血3例,纳差2例,发热及进食哽噎各1例。22例患者17例有程度不等的贫血。

2.2 内镜下表现

2.2.1 病变分布 病变主要在胃窦和胃体。局限于胃窦部3例,胃体部1例,同时累及胃体、胃窦(包括幽门)者11例,胃底、胃体者3例,胃底、贲门者1例,广泛受累3例。

2.2.2 形态特点 胃MALT淋巴瘤在内镜下主要有3种表现,即溃疡型、息肉或结节型、浸润型。其中溃疡型12例,其特点为大而深的单发或多发溃疡,溃疡表面高低不平,底覆污苔,大多病例见出血,溃疡边缘不规则隆起,可呈“堤岸状”,质地脆,触之易出血,溃疡直径3-6 cm;隆起型4例,特点为单发或多发结节状或息肉样隆起的肿块,表面可见正常黏膜,间以浅溃疡或糜烂,周边皱襞呈放射状或形成巨大皱襞,隆起结节大小1.5-3.0 cm;弥漫型6例,特点为黏膜皱襞粗大、不规则,表面呈颗粒状或结节不平,可见糜烂、浅溃疡及陈旧性出血灶,胃蠕动消失或减弱,病变范围广,往往累及多个部位,约5-10 cm。22例患者无一例发生胃腔狭窄、梗阻,内镜无法检查者。上述三型之间并无截然分界,常并存,以其中之一为主。本组22例患者17例内镜下表现为典型的恶性病变(即深大、不规则溃疡、巨大肿块及弥漫浸润),5例为非恶性病变(即浅溃疡或结节样隆起)。

2.3 病理学结果 所有病例均经常规HE切片并结合免疫组织化学染色检查确诊为非霍奇金B细胞淋巴瘤MALT型。内镜下活组织检查确诊3例,倾向恶性淋巴瘤5例,黏膜慢性炎3例,误诊为低分化腺癌11例。

2.4 幽门螺杆菌 22例患者中*H pylori*阳性18例,阳性率

81.8%。

3 讨论

MALT的概念于1983年由英国病理学家Isaacson首先提出,意指长期抗原刺激使与黏膜上皮相关淋巴细胞产生免疫应答及局部炎症,并从无到有,发生免疫反应性淋巴瘤增殖,并由良性到恶性,产生异常克隆而导致淋巴瘤。约半数发生在胃肠道,又以胃为主,其他如肺、甲状腺、眼结膜、乳腺、肝、肾、子宫、前列腺和膀胱等部位均可发生。晚近报道此病亦可发生于肝外胆道^[1]。

胃MALT淋巴瘤为原发性胃恶性淋巴瘤的主要类型,是结外型非霍奇金淋巴瘤中最常见者。在西方国家,该病多见于50-70岁患者,男:女1.1-2.8:1。国内报道发病年龄较胃癌年轻10岁,本组22例胃MALT患者,男女性别比近1:1,发病年龄26-78岁,以50-75岁为主,也有学者认为此病发病年龄呈双峰现象。此病病程较长,与胃癌相比,全身情况相对较好,临床症状无特异性,腹部不适(腹痛、腹胀)最为常见,其次为消化道出血,患者就诊时往往有贫血。

本组22例胃MALT淋巴瘤内镜下主要表现为溃疡型、浸润型及隆起型。内镜特点为病变范围广泛,常累及多个部位,多见于胃窦、胃体部,大体形态表现多样,以恶性病变特征为主,形态学上往往易与胃癌混淆,但此病病变的多形性、多灶性及弥漫性更为突出,且内镜下表现与患者全身情况及病程不甚相符,故临床上遇到病程较长(尤其是超过6 mo以上)、全身情况较好,内镜表现似“胃癌”的患者,尤需高度警惕MALT淋巴瘤的可能。内镜检查目前仍是诊断本病的重要手段,遇下列情况应考虑非霍奇金淋巴瘤:(1)病变呈多形性、多灶性;(2)有黏膜下肿块现象;(3)黏膜水肿、皱襞粗大,黏膜皱襞无向心性集中,而围绕在肿块周围;(4)肿瘤质地柔软;(5)病变范围广泛,有跨区域、跨幽门损害。病理诊断是确诊本病的关键,但由于常规活检取材组织小、少及挤压、变形等因素干扰以及其是一种在黏膜及黏膜下层广泛浸润转移的多灶性疾病,均影响胃活检诊断准确率。对可疑病例争取多处、多点、多次、挖掘式活检,在溃疡边缘或隆起糜烂处活检,必要时采用内镜下黏膜切除术可提高活检诊断率。对内镜表现似恶性病变,而病理检查为“淋巴组织增生或见到异形细胞者”,内镜下多块、深挖取材结合及时免疫组织化学检查可提高内镜诊断准确率。本组有2例患者经此而明确诊断。近年来有学者提出,超声内镜诊断胃淋巴瘤的符合率高于胃镜及其他检查,并能准确判断胃淋巴瘤浸润胃壁深度、侵犯周围器官及淋巴结情况^[2],随访超声内镜可明确治疗效果,并可在疾病复发的早期阶段检测到^[3]。Ribeiro *et al*^[4]还提出应用联合流式细胞分析和免疫细胞化学方法在超声内镜引导下的细针吸引术,有利于提高胃淋巴瘤的诊断准确率。

大量流行病学资料表明此病与*H pylori*感染有关,本

组 *H. pylori* 感染率为81.8%,也佐证了此观点.胃MALT淋巴瘤需根治 *H. pylori*,近年来研究表明,对早期MALT淋巴瘤,根治 *H. pylori* 感染已然足够^[5],对低度恶性且局限于原位的胃MALT淋巴瘤患者, *H. pylori* 根除可作为第一线治疗,且应做定期随访^[6], Aviles *et al*^[7]认为对低度恶性MALT淋巴瘤,单用化疗是安全有效的治疗措施,对不能化疗者可选用手术或放疗,而 *H. pylori* 阴性的MALT淋巴瘤患者可用化疗或放疗,或CD20单克隆抗体取代手术^[8],对EII期以上病变及瘤周或深部有淋巴结肿大者抗 *H. pylori* 治疗反应差应早期手术.由于残留的MALT是发展为胃癌的一项额外的危险因素,因而对已经过治疗的胃MALT淋巴瘤患者仍需长期内镜随访观察^[9].某些病毒如EB可能在淋巴瘤的起源中起一定作用,晚近有学者报道,HCV在胃MALT淋巴瘤的发生中可能也起一定的作用^[10].

4 参考文献

- 1 Shimura T, Kuwano H, Kashiwabara K, Kojima M, Masuda N, Suzuki H, Kanoh K, Saitoh T, Asao T. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the extrahepatic bile duct. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 360-362
- 2 彭燕, 许国铭, 邹晓平, 金震东. 超声内镜在胃淋巴瘤诊断中的应用. *中国内镜杂志* 2002; 8: 28-30
- 3 Jee SR, Seol SY. Low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of stomach. *Korean J Gastroenterol* 2005; 45: 312-320
- 4 Ribeiro A, Vazquez-Sequeiros E, Wiersema LM, Wang KK, Clain JE, Wiersema MJ. Eus-guided fine-needle aspiration combined with flow cytometry and immunocytochemistry in the diagnosis of lymphoma. *Gastrointest Endoscopy* 2001; 53: 485-491
- 5 Al-Akwaa AM, Siddiqui N, Al-Mofleh IA. Primary gastric lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 5-11
- 6 高利利, 梁浩, 纪小龙. 幽门螺杆菌相关性胃MALT淋巴瘤的发病机制及治疗. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 789-790
- 7 Aviles A, Nambo MJ, Neri N, Talavera A, Cleto S. Mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) lymphoma of the stomach: results of a controlled clinical trial. *Med Oncol* 2005; 22: 57-62
- 8 Franco M, Rugge M, D'Andrea E, Mescoli C, Menin C, Farinati F. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori*: scratch and win. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 115-119
- 9 Copie-Bergman C, Locher C, Levy M, Chaumette MT, Haioun C, Delfau-Larue MH, Leroy K, Gaulard P, Delchier JC. Metachronous gastric MALT lymphoma and early gastric cancer: is residual lymphoma a risk factor for the development of gastric carcinoma? *Ann Oncol* 2005; 16: 1232-1236
- 10 Seve P, Renaudier P, Sasso AJ, Dumontet C, Salles G, Coiffier B, Zoulim F, Broussolle C, Trepo C. Hepatitis C virus infection and B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a cross-sectional study in Lyon, France. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1361-1365

电编 张勇 编辑 管鑫妍 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

• 临床经验 CLINICAL PRACTICE •

不同类型胃息肉及胃癌中环氧化酶-2和P16蛋白的表达及相关性

李强, 高善玲, 崔路佳, 李明琦

李强, 高善玲, 崔路佳, 李明琦, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科
黑龙江省哈尔滨市 150086
通讯作者: 李强, 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. asss2002@163.com
电话: 0451-86605143
收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Qiang Li, Department of Gastroenterology,
the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin
150086, Heilongjiang Province, China. asss2002@163.com
Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-26

Expression of COX-2 and P16 protein and their correlations in various types of gastric polyps and gastric cancer cell

Qiang Li, Shan-Ling Gao, Lu-Jia Cui, Ming-Qi Li

Qiang Li, Shan-Ling Gao, Lu-Jia Cui, Ming-Qi Li, Department of
Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical

Abstract

AIM: To explore the expression of COX-2 and P16 in various types of gastric polyps and gastric cancer cell, and to investigate the relationship between COX-2 and P16 protein in the process of gastric cancer.

METHODS: The expression of COX-2 and P16 proteins were detected in normal gastric mucosa ($n = 10$), non-tumor gastric polyps ($n = 30$, inflammatory polyps

and hyperplastic polyps), tumor gastric polyps ($n = 20$, adenomatous polyps), and gastric cancer ($n = 40$) by S-P immunohistochemical staining.

RESULTS: In the normal gastric mucosa, non-tumor gastric polyps, tumor gastric polyps, and gastric cancer cell, the expression rate of the COX-2 was 10%, 13.33%, 45%, and 75%, respectively; and the rate of P16 protein expression in those tissues was 90%, 86.67%, 60%, and 32.5%, respectively. The positive rates of COX-2 and P16 protein were both significantly different between gastric cancer and other tissues ($P < 0.05$). The expression of COX-2 and P16 were associated with the differentiation degree of gastric cancer and lymph node metastasis. COX-2 expression was negatively related to P16 expression in gastric cancer ($P < 0.05$).

CONCLUSION: COX-2 and P16 protein play key roles in the development of gastric cancer, and can be used as important indexes in the research of the biological behavior of gastric cancer.

Key Words: Gastric polyps; Gastric cancer; P16 protein; Cyclooxygenase-2

Li Q, Gao SL, Cui LJ, Li MQ. Expression of COX-2 and P16 protein and their correlations in various types of gastric polyps and gastric cancer cell. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2506-2509

摘要

目的: 研究不同类型胃息肉及胃癌中COX-2(环氧化酶-2)和P16蛋白的表达, 探讨COX-2、P16蛋白在胃癌发生、发展中的作用及其相互关系。

方法: 采用S-P免疫组织化学方法检测10例正常胃黏膜, 30例非肿瘤性胃息肉(炎性及增生性胃息肉), 20例肿瘤性胃息肉(腺瘤性胃息肉)和40例胃癌组织中, COX-2和P16蛋白的表达情况。

结果: COX-2表达, 在正常胃黏膜、非肿瘤性胃息肉、肿瘤性胃息肉及胃癌中分别为10%, 13.33%, 45%, 75%, 胃癌组阳性率与其他三组差异有显著性($P < 0.05$); P16蛋白表达, 在正常胃黏膜、非肿瘤性胃息肉、肿瘤性胃息肉及胃癌中分别为90%, 86.67%, 60%, 32.5%, 胃癌组阳性率与其他三组差异有显著性($P < 0.05$)。COX-2、P16蛋白表达与胃癌分化程度、淋巴结转移、呈一定相关性。COX-2与P16蛋白的表达呈负性相关($P < 0.05$)。

结论: COX-2、P16蛋白在胃癌发生、发展中起一定作用, 可作为判定胃癌生物学行为的有用指标。

关键词: 胃息肉; 胃癌; 蛋白质P16; 环氧化酶-2

蛋白的表达及相关性. 世界华人消化杂志 2005;13(20):2506-2509

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2506.asp>

0 引言

肿瘤的发生是一个多因素参与的过程。近年来研究发现, COX-2在多种肿瘤中表达上调, 可能是促进肿瘤发生、发展的原因之一, 是肿瘤防治的一个新的靶点。抑癌基因P16在许多肿瘤中表达减少, 与多种肿瘤发生、发展有关。我们检测了不同类型胃息肉及胃癌中COX-2、P16蛋白的表达, 讨论COX-2、P16蛋白在胃癌发生、发展中的作用及其相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料 10例正常胃黏膜取自内镜下活检, *H. pylori*感染阴性; 40例胃癌组织, 30例非肿瘤性胃息肉和20例肿瘤性胃息肉来自本院病理科存档蜡块, 所有标本经病理科确诊, 且无使用非甾体类抗炎药及糖皮质激素史。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 采用S-P法染色。鼠抗人COX-2单克隆抗体, 鼠抗人P16单克隆抗体, S-P免疫组化试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。实验步骤按试剂盒说明书进行。用PBS液代替一抗作阴性对照, 乳腺癌组织作阳性对照。

1.2.2 结果判定 COX-2、P16蛋白均定位于细胞质, 呈棕黄色颗粒状, 并根据染色强度分为: 阴性(-)为无棕色反应; 弱阳性(+)为部分细胞显色; 阳性(++)为绝大部分细胞显色。

统计学处理 率的比较采用 χ^2 检验, COX-2与P16的关系用Spearman等级相关分析, 在SPSS软件下完成。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 COX-2、P16蛋白在不同类型胃息肉及胃癌中的表达 (图1, 表1)。从表1可以看出从正常胃黏膜到胃癌P16蛋白表达逐渐减弱, COX-2表达逐渐增强。肿瘤性胃息肉与非肿瘤性胃息肉中COX-2、P16蛋白表达有显著性差异。

2.2 COX-2、P16蛋白与胃癌生物学行为的关系 (表2) 从表2可以看出COX-2、P16蛋白表达与胃癌的分化程度、淋巴结转移呈现一定相关性, 与胃癌的远处转移无显著

表1 COX-2、P16蛋白在不同类型胃息肉及胃癌中的表达

	<i>n</i>	P16蛋白表达(+)		COX-2表达(+)	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
正常胃黏膜	10	9	90.00%	1	10.00%
非肿瘤性胃息肉	30	26	86.67%	4	13.33%
肿瘤性胃息肉	20	12	60.00% ^c	9	45.00% ^a
胃癌	40	13	32.50% ^a	30	75.00% ^e

^a $P < 0.05$ vs 其他3组; ^c $P < 0.05$ vs 非肿瘤性胃息肉及正常胃黏膜; ^e $P < 0.05$ vs 其他3组; ^b $P < 0.05$ vs 非肿瘤性胃息肉及正常胃黏膜。

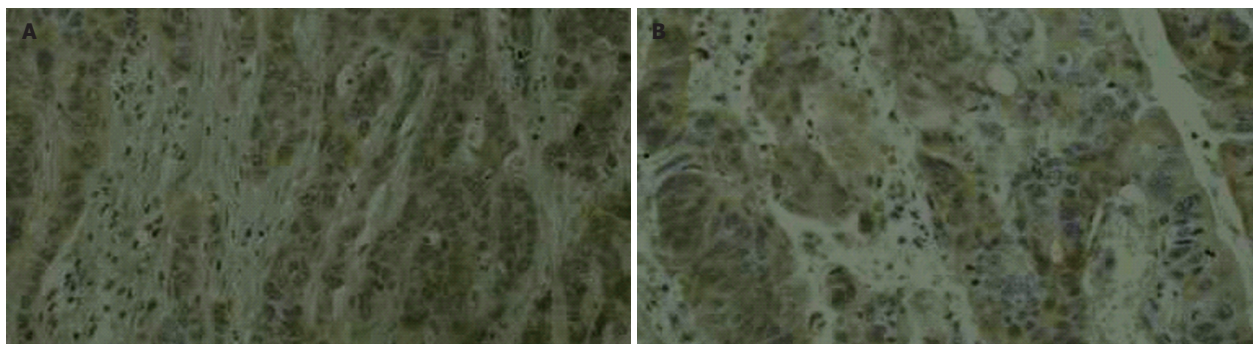


图1 胃癌组织阳性染色(免疫组化S-P×400). A: COX-2阳性染色; B: P16阳性染色.

性差异.

表2 COX-2、P16蛋白与胃癌生物学行为的关系

临床病理因素	n	P16蛋白表达(+)		COX-2表达(+)	
		n	%	n	%
组织学类型					
高中分化型	14	8	57.14% ^a	6	42.85% ^e
低未分化型	26	5	19.23%	24	92.31%
淋巴结转移					
无	8	6	75.00% ^c	3	37.50% ^g
有	32	7	21.88%	27	84.38%
远处转移					
无	35	12	34.29%	26	74.29%
有	5	1	20.00%	4	80.00%

^a $P<0.05$ vs 低未分化组; ^c $P<0.05$ vs 有淋巴结转移; ^g $P<0.05$ vs 低未分化组;

^g $P<0.05$ vs 有淋巴结转移.

2.3 胃癌中COX-2、P16蛋白表达的相关性 胃癌组中P16表达阳性而COX-2表达阴性占9例, P16表达阴性而COX-2表达阳性占26例, 对COX-2、P16蛋白在胃癌中表达进行相关性分析发现, COX-2与P16表达呈负相关($P<0.05$), 在P16阴性的胃癌组织中COX-2表达较高.

3 讨论

环氧化酶(COX)是前列腺素合成过程中的关键酶. 包括COX-1和COX-2两种同工酶. COX-1属结构型酶, 在全身多种组织中均可微量恒定表达, 执行机体稳定功能. 而COX-2则是诱导型酶, 在正常组织中无表达, 当细胞受到炎性介质、细胞因子、生长因子等因素刺激时在细胞中迅速诱导产生^[1,2]. 其作用不仅包括产生前列腺素引起疼痛和支持炎症反应过程, 而且通过促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 促进肿瘤新生血管形成等机制参与多种肿瘤的发生、发展过程^[3-7]. 目前已证实COX-2在人类多种恶性肿瘤中有过度表达^[8,9]. p16为抑癌基因, 定位于染色体9P21, 因其对多种肿瘤有抑制作用而被称为多肿瘤抑制基因. 它可与CyclinD(细胞周期素D)竞争性结合CDK4(细胞周期蛋白依赖性激酶4), 并抑制CDK4的活性, 从而阻止Rb磷酸化, 阻止细胞由G₁期进入S期, 从而使细胞增殖

停止. 研究表明, P16低表达与许多恶性肿瘤发生、发展有关^[10,11].

3.1 COX-2与P16蛋白在不同类型胃息肉中的表达 国内学者依据病理学特征将胃息肉分为炎性息肉、增生性息肉、炎性纤维性息肉、腺瘤性息肉. 其中腺瘤性息肉为肿瘤性息肉, 其他为非肿瘤性息肉. 多数学者认为腺瘤性胃息肉与胃癌发生有关. 既然胃癌中存在COX-2与P16蛋白表达异常, 那么在胃良性肿瘤胃息肉中是否存在COX-2、P16蛋白表达异常. 从本研究结果可以看到在腺瘤性息肉中存在COX-2与P16蛋白表达异常, 且腺瘤性胃息肉中COX-2与P16蛋白表达, 同炎性及增生性胃息肉差异有显著性, 而炎性及增生性胃息肉中, COX-2与P16蛋白表达, 与正常胃黏膜差异无显著性. 说明腺瘤性胃息肉带有更多与胃癌相同的生物学性质, 可能容易癌变.

3.2 COX-2和P16蛋白在胃癌中表达及其相互关系 本实验中, COX-2阳性表达, 胃癌组织明显高于非癌组织, 与国内外报道一致^[12-14], 且COX-2表达与胃癌的分化程度和淋巴结转移密切相关. 说明COX-2参与了胃癌的发生、发展过程. 而P16阳性表达, 胃癌组明显低于非癌组织, 且P16表达与胃癌的分化程度和淋巴结转移密切相关. 说明P16可能参与了胃癌的发生、发展过程, 其低表达为胃癌发生的分子事件, 与文献报道一致^[15,16]. 我们同时发现了胃癌组中P16蛋白表达程度与COX-2表达呈负相关, 即在P16表达阴性的胃癌组织中COX-2表达较高, 推测P16蛋白表达减少与COX-2表达增高, 可能具有协同作用. 是否一些因素诱导COX-2表达后, COX-2反过来诱导P16等一系列癌基因及抑癌基因表达异常? 能否通过降低COX-2的表达, 从而使P16表达升高? 有待于进一步研究.

总之, COX-2和P16蛋白在胃癌的发生、发展中起重要作用, 检测COX-2和P16蛋白表达, 可作为辅助临床判断胃癌生物学行为及推测预后的有用指标.

4 参考文献

- Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 1996; 270:G393-G400
- Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G. Characterization of Prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 1996; 111: 445-454

- 3 Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac. *Int J Cancer* 2001; 91: 894-899
- 4 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 135-138
- 5 Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclooxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 429-434
- 6 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 796-800
- 7 陈丰霖, 王小众, 李建英, 陈治新, 黄月红, 林明晞. 环氧合酶-2、Fas、FasL表达与胃癌细胞凋亡的关系. *福建医科大学学报* 2002; 36: 385-387
- 8 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
- 9 Wu AW, Gu J, Ji JF, Li ZF, Xu GW. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1990-1994
- 10 He XS, Su Q, Chen ZC, He XT, Long ZF, Ling H, Zhang LR. Expression, deletion [was deletion] and mutation of p16 gene in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 515-521
- 11 Jeong J, Park YN, Park JS, Yoon DS, Chi HS, Kim BR. Clinical significance of p16 protein expression loss and aberrant p53 protein expression in pancreatic cancer. *Yonsei Med J* 2005; 46: 519-525
- 12 张合喜, 王友洁, 赵卫星. COX-2蛋白在胃黏膜癌前病变与胃癌中表达的意义. *新乡医学院学报* 2005; 22: 13-15
- 13 罗玉芹, 吴开春, 孙安华, 潘伯荣, 张学庸, 樊代明. 浅表性胃炎、胃黏膜不典型增生及胃癌组织中Cox-1、Cox-2、INOS表达的意义. *中华消化杂志* 2000; 20: 223-236
- 14 Sung JJ, Leung WK, Go MY, To KF, Cheng AS, Ng EK, Chan FK. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000; 157: 729-735
- 15 杨苏敏, 杨丽苏, 李丽, 邓丽英, 王崇宇, 原学斌, 申向东. 胃癌中MTS1/P16基因甲基化状态及P16蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 1427-1429
- 16 刘新兰, 秦景, 吕怀盛, 张建中, 王宁菊, 李蓉. 胃癌组织P16基因蛋白表达的意义. *第四军医大学学报* 2002; 23: 351-354

电编 张勇 编辑 管鑫妍 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

• 临床经验 CLINICAL PRACTICE •

中药降肝隆联合拉米夫定治疗活动性肝炎 90 例

文睿, 王坚, 严明

文睿, 王坚, 东南大学附属南京市第二医院中西医结合科 江苏省南京市210003

严明, 江苏省中医院 江苏省南京市210003

通讯作者: 文睿, 210003, 江苏省南京市, 东南大学附属南京市第二医院中西医结合科. wenrui_51@hotmail.com

电话: 025-83465482

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Effect of Traditional Chinese Medicine *Xiangganlong* combined with Lamivudine in treatment of active hepatitis: an analysis of 90 cases

Rui Wen, Jian Wang, Ming Yan

Rui Wen, Jian Wang, Department of Integrated Traditional Chinese

Medicine with Western Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanjing City, Medical College of Southeast University, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

Ming Yan, Traditional Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Rui Wen, Department of Integrated Traditional Chinese Medicine with Western Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanjing City, Medical College of Southeast University, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China. wenrui_51@hotmail.com

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

Abstract

AIM: To investigate the long term effect of Traditional Chinese Medicine *Xiangganlong* combined with Lamivudine in the treatment of active hepatitis and cirrhosis.

METHODS: The randomly selected 90 patients with active hepatitis and cirrhosis were divided into treat-

ment group and control group. The patients in the former were treated with *Xiangganlong* combined with Lamivudine, the patients in the control group were treated with general treatment according to the symptoms. Six to sixty-seven months after treatment, the serum virus level, liver function, complications, the occurrence rate of hepatocellular carcinoma, and the mortality rate were analyzed.

RESULTS: The negative rates of hepatitis B virus DNA in the patients of treatment group and control group were 61.4% (27/44) and 6.5% (3/46), respectively, and there was significant difference between them ($P = 0.000\ 1$). The negative rate of HBeAg was also markedly higher in the patients of treatment group than that in the controls [33.3% (11/33) vs 6.7% (2/30), $P = 0.032\ 1$]. The variation rates of YMDD were 11.4%, 22.7%, 34.1%, 38.6% after 12, 24, 36, 37-67 mo of combined Lamivudine treatment, respectively. In the patients with no YMDD variation, the total bilirubin (TBil) and Child-pugh score were significantly declined, while the level of albumin (A) was increased as compared with that in the controls ($17.90 \pm 1.01\ \mu\text{mol/L}$ vs $62.57 \pm 52.23\ \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$; 5.18 ± 1.40 vs 7.50 ± 3.16 , $P < 0.01$; $42.32 \pm 6.39\ \text{g/L}$ vs $38.35 \pm 7.27\ \text{g/L}$, $P < 0.01$). The occurrence rate of complications was 11.4% and 45.6% ($P = 0.007$) in the treatment and control group, respectively, while the occurrence rate of hepatocellular carcinoma was not significantly different between those two groups ($P = 0.299\ 8$). The mortality was 9.1% and 30.4% ($P = 0.037\ 7$) in the treatment and control group, respectively.

CONCLUSION: The Traditional Chinese Medicine *Xiangganlong* combined with Lamivudine can impress the proliferation of HBV, decrease the variation rates of YMDD, improve the hepatic function, reduce the occurrence of the complications and mortality.

Key Words: Traditional Chinese Medicine; *Xiangganlong*; Lamivudine; Active hepatitis; Liver cirrhosis; Hepatitis B virus; YMDD variation

Wen R, Wang J, Yan M. Effect of Traditional Chinese Medicine *Xiangganlong* combined with Lamivudine in treatment of active hepatitis: an analysis of 90 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2509-2513

摘要

目的: 观察降肝隆联合拉米夫定治疗活动性肝炎肝硬化90例5 a的长期疗效。

方法: 随机选择活动性肝炎肝硬化患者90例, 分为治疗组和对照组。治疗组采用降肝隆煎剂和拉米夫定联合治疗; 对照

组采用退黄、降酶、抗纤维化、支持及对症处理; 疗程6-67 mo, 疗程的中位数为31.4 mo。对血清病毒水平、肝功能、合并症、肝癌的发生率、病死率进行观察。

结果: HBV DNA阴转率: 治疗组为61.4%(27/44), 对照组为6.5%(3/46), 两组比较, 差异显著($P = 0.000\ 1$); HBeAg转阴率: 治疗组为33.3%(11/33), 对照组为6.7%(2/30), 两组比较, 差异显著($P = 0.032\ 1$); 治疗组患者12, 24, 36, 37-67 mo, 变异率分别为11.4%, 22.7%, 34.1%, 38.6%。治疗组YMDD非变异病例的总胆红素(TBil)、Child-pugh分级积分下降, 白蛋白(A)升高, 与对照组相比, 差异显著($17.90 \pm 1.01\ \mu\text{mol/L}$ vs $62.57 \pm 52.23\ \mu\text{mol/L}$; 5.18 ± 1.40 vs 7.50 ± 3.16 ; $42.32 \pm 6.39\ \text{g/L}$ vs $38.35 \pm 7.27\ \text{g/L}$, $P < 0.01$); 合并症的发生率: 治疗组11.4%, 对照组45.6%, 两组比较, 差异显著($P = 0.007$); 肝癌的发生率, 两组无显著差异($P = 0.299\ 8$); 死亡率: 治疗组为9.1%, 对照组为30.4%, 两组比较, 差异显著($P = 0.037\ 7$)。

结论: 降肝隆联合拉米夫定治疗活动性肝炎肝硬化, 可抑制病毒复制, YMDD累计变异率较低, 肝功能得到改善, 减少了合并症的发生、降低了患者的病死率。

关键词: 中药; 降肝隆; 拉米夫定; 活动性肝炎; 肝硬化; 乙型肝炎; YMDD变异

文睿, 王坚, 严明. 中药降肝隆联合拉米夫定治疗活动性肝炎90例. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2509-2513

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2509.asp>

0 引言

活动性肝炎肝硬化(active liver cirrhosis, ALC)是在肝硬化基础上, 病毒持续复制, 造成肝脏炎症的持续, 肝脏纤维的增生。根据ALC的病变特点, 我们采用中药降肝隆联合拉米夫定治疗ALC。降肝隆可以温阳补肾, 清热解毒, 益气养血, 化瘀通络, 养肝缩脾; 拉米夫定可抑制病毒, 治疗肝硬化有一定的疗效和良好的相关性^[1,2], 我们试图通过中药降肝隆和拉米夫定联用, 来达到清除病毒、减轻肝脏炎症、促进肝脏纤维降解之目的。这一疗法在临床取得较好的近期疗效, 但长期疗效究竟如何? 为此, 我们用中药降肝隆联合拉米夫定进行了长达5 a的临床研究, 旨在观察: 患者血清HBeAg、HBV DNA水平的变化, YMDD变异率, HBeAg、HBeAb的血清转换率; 患者血清总胆红素、白蛋白、Child-pugh分级积分的变化; 患者合并症的发生率、慢性重型肝炎的发生率、原发性肝癌的发生率及死亡率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例选择 选择1999-08/2005-05我院住院、门诊及江苏省中医院门诊的90例ALC患者, 用分层随机抽样平均分为治疗组和对照组。入选病例标准: 年龄18-70岁男、女ALC患者, HBeAg、HBV DNA阳性或HBeAg阴性、

表1 两组治疗前后的血清HBeAg、HBV DNA及YMDD变化

组别/n		HBeAg(+)	HBeAg(-)	HBeAg(+) \rightarrow HBeAb(+)	HBV DNA	YMDD
治疗组	治疗前	33	11		44	
44	治疗后	22 ^a	16	4	17 ^b	17
对照组	治疗前	30	16		46	
46	治疗后	28	17	1	43	0

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 治疗组、治疗后。

HBV DNA阳性、肝功能异常、B超提示肝硬化者。排除病例: 临床诊断肝癌或可疑肝癌患者; 或病原学提示有其它病毒感染者; 或有严重合并症者; 或酒精性肝硬变者; 或代谢性肝硬变者。治疗组: 44例, 其中男40例, 女4例, 年龄19-62岁, 年龄中位数为39.2岁; 病程: 0.5-34 a, 病程中位数为10.7 a。代偿性肝硬变22例, 失代偿性肝硬变22例。Child-pugh分级, A级31例, B级8例, C级5例。对照组: 46例, 其中男40例, 女6例, 年龄18-65岁, 年龄中位数为39.8岁。病程: 0.5-34 a, 病程中位数为10.6 a。代偿性肝硬变22例, 失代偿性肝硬变24例。Child-pugh分级, A级33例, B级7例, C级6例。治疗组及对照组在年龄、性别、病程、诊断及Child分级、疗程等诸方面均有可比性。

1.1.2 主要试剂 TBil试剂由瑞士得克公司提供; ALT、AST、A、G试剂由上海长征康仁医学有限公司提供; Cr试剂由英国Randox公司提供。ELISA法试剂由美国Abbott公司提供。凝固法检测试剂由上海太阳生物技术有限公司提供, 美国SYSMEX公司生产的CA-500. SERIES血凝检测仪检测。提取试剂为QIAamp DNA Blood Mini Kit, 由美国QIAGEN公司提供。PCR试剂由大连宝生物有限公司提供; YMDD测序试剂盒由美国USB公司提供, 用美国DNA Sequencer测序仪检测。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准 ALC的临床诊断依照西安会议“病毒性肝炎防治方案”制定的ALC临床诊断标准。Child-pugh分级按陈灏珠主编的《实用内科学》第10版标准: A级: 5-8分, B级9-11分, C级12-15分。

1.2.2 治疗方法 治疗组: 告之患者病情及用药之利弊, 经患者同意签字后, 方可选入治疗组。治疗组用中药煎剂降肝隆(基本方: 巴戟天、叶下珠、白术、杏仁、鸡血藤等。阳虚者加温阳药; 阴虚者加用生、熟地、女贞子), 1剂/3 d, 或丸剂, 4.0 g, 3次/d, 拉米夫定0.1 g/d。对照组: 中成药如复方鳖甲软肝片、大黄蛰虫丸等抗纤维化治疗及降酶、保肝治疗。两组均可用人体白蛋白支持, 如感染、出血、肝脑等合并症的对症处理相同。疗程6-67 mo, 疗程的中位数为31.4 mo。本研究的治疗终点定义为: 治疗过程中患者因YMDD变异, 病情加重, 临床诊断为慢性重型肝炎, 改为阿德福韦治疗者; 或与本病相关合并症死亡者。

1.2.3 临床观察项目及指标 在治疗期间两组患者每月查肝功能及血常规、肾功能, 每3 mo作HBV-M检测、HBV DNA定量检测, HBV DNA定量 $< 5.0 \times 10^5$ copies/L为阴性;

HBeAg定量 < 280 PEIU/L为阴性, HBeAb ≤ 1.0 S/CO为阳性; YMDD检测, 每6 mo查凝血酶原时间(PT)1次, B超检查肝脾大小及门静脉的变化; 同时认真观察症状及合并症的变化。

1.2.4 检测方法 用美国雅培公司AEROSSET型生化仪检测血清TBil、ALT、AST、血清白蛋白(A)、球蛋白(G)、肌酐(Cr)。用ELISA法检测HBV-M, 用PCR法检测HBV DNA。PT: 凝固法检测, 检测时质控同时进行。MDD变异的检测: 对患者血清中的HBV DNA进行提取、扩增(PCR)、测序。

统计学处理 计数数据用 χ^2 检验, 计量资料mean \pm SD, 用t检验(SAS8.0)。

2 结果

2.1 两组治疗前后的血清HBeAg、HBV DNA、YMDD变异变化(表1)。治疗组的HBeAg(+)治疗前33例, 治疗后22例, 阴转11例, 阴转率为33.3%(11/33), 和对照组6.7%(2/30)相比, $P = 0.032$ 1; 治疗组与对照组HBeAg(+) \rightarrow HBeAb(+), 分别为12.1%(4/33)和3.3%(1/30), 两组相比 $P = 0.232$ 7; HBV DNA阴转率, 治疗组与对照组分别为61.4%(27/44)和6.5%(3/46), 两组相比 $P = 0.000$ 1; YMDD变异率为38.6%(17/44), 对照组则为0。

本组44例使用拉米夫定治疗的患者, 治疗6-12 mo变异者5例, 变异率11.4%(5/44); 治疗13-24 mo变异者5例, 变异率22.7%(10/44); 治疗25-36 mo变异者5例, 变异率34.1%(15/44); 治疗37-67 mo变异者2例, 变异率38.6%(17/44)。

2.2 两组治疗前后TBil、A、Child-pugh变化(表2) 治疗前治疗组TBil、A、Child-pugh积分与对照组相比 $P > 0.05$; 治疗后, 治疗组非变异病例TBil、A、Child-pugh积分与对照组相比, 显著差异, $P < 0.01$; 治疗后变异病例TBil、A、Child-pugh积分与自身治疗前及对照组治疗后相关指标相比, 均无显著差异, $P > 0.05$ 。

2.3 两组合并症与死亡率比较(表3) 治疗组合并症的发生率11.4%(5/44), 和对照组45.6%(21/46)相比, $P = 0.007$; 慢性重型肝炎的发生率11.4%(5/44), 和对照组15.2%(7/46)相比, $P = 0.638$ 1; 肝癌的发生率治疗组与对照组分别为4.5%(2/44)和10.9%(5/46), 两组相比, $P = 0.299$ 8; 治疗组的死亡率9.1%(4/44), 对照组为30.4%(14/46), 两组相比差异显著($P = 0.037$ 7)。

表2 两组治疗前后TBil、A、Child-pugh变化

组别/ <i>n</i>			TBil(μ mol/L)	A(g/L)	Child-pugh积分
治疗组	治疗前		44.21 \pm 36.88	36.74 \pm 6.47	7.17 \pm 2.73
44	治疗后	变异	65.89 \pm 35.09	37.60 \pm 8.51	7.17 \pm 2.58
		非变异	17.90 \pm 1.01 ^b	42.32 \pm 6.39 ^b	5.18 \pm 1.40 ^b
对照组	治疗前		30.75 \pm 20.51	36.29 \pm 8.48	6.80 \pm 2.57
46	治疗后		62.57 \pm 52.23	38.35 \pm 7.27	7.50 \pm 3.16

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表3 两组合并症与死亡率比较

组别	<i>n</i>	感染	出血	肝脑	肝肾	重型肝炎	肝癌	死亡人数	死亡率
治疗组	44		3	2		5	2	4 ^a	9.1% ^a
对照组	46	5	6	6	4	7	5	14	30.4%

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

2.4 治疗终点 治疗组: 7例达到治疗终点, 5例因YMDD变异, 病情加重, 3例改用阿德福韦及中药治疗, 病情现已好转稳定, 目前仍在治疗中, 2例死亡; 另外两例死亡者, 其中1例在治疗第27 mo发生肝癌, 外院行肝移植术后4 mo, YMDD变异, 发生暴发性肝炎而死亡, 1例因发生合并症而死亡; 对照组: 14例中7例因慢性重型肝炎、7例合并症死亡而达到治疗终点. 在随访观察过程中, 治疗组的失访率9.1%(4例), 对照组的失访率13.0%(6例).

3 讨论

国外多中心研究结果表明: 拉米夫定治疗HBV相关的失代偿性肝硬化, 可使病情稳定, 肝功能改善, 患者的生存期延长, 提高患者在肝移植前的存活率. 部分患者经治疗后延缓进行肝移植的时间, 甚至不需做肝移植^[2,3]. 本组观察结果表明, 中药降肝隆联合拉米夫定长期治疗ALC, 可使多数患者血清HBV DNA持续阴性, 肝功能明显改善, 合并症、死亡率明显下降, 但出现YMDD变异后, 可出现肝功能的波动, 甚至出现肝功能衰竭, 若尽早改用阿德福韦治疗, 部分患者仍可获得持续的疗效.

中药降肝隆联合拉米夫定治疗ALC, 能抑制病毒复制, 推迟了YMDD变异的发生, 减少了YMDD变异率. 拉米夫定能抑制病毒复制, 降肝隆中温补肾阳的巴戟天^[4]、清热解毒的中药叶下珠也有抗病毒作用, 本组病例血清HBV DNA转阴率为61.4%(27/44), 和对照组6.5%(3/46)相比, $P = 0.0001$, 差异显著; HBeAg的阴转率为33.3%(11/33), 和对照组6.7%(2/30)相比, 差异显著, $P = 0.0321$; 据有关报道, 拉米夫定的耐药, 一般见于连续治疗6 mo以后, 治疗3 a的YMDD变异率为57%^[5], 王氏报道 ALC的YMDD的12, 24, 36, 48 mo变异率分别为26.92%, 39.56%, 26.925%, 58.79%^[6], 与本组病例拉米夫定治疗6-12, 13-24, 25-36, 37-67 mo患者血清YMDD变异率11.4%, 22.7%, 34.1%, 38.6%相比, 明显低于前者, 说明温阳补肾, 清热解毒之降肝隆^[7], 具有扶正祛邪协同拉米

夫定持续抗病毒(包括变异病毒)、使血清HBV DNA持续阴转之功效.

益气养血, 化瘀通络, 改善肝功能, 减少合并症, 降低病死率: ALC患者TBil顽固难降, ALT、AST异常, 白蛋白下降, 球蛋白的增高, 提示肝脏炎症持续, 肝脏功能进一步受损, 将使ALC由代偿到失代偿, 最终肝功能衰竭. 中药降肝隆在温补肾阳、清热解毒的同时加用益气养血, 化瘀通络之白术、鸡血藤等, 在病毒复制受到抑制的同时改善了患者的肝功能, 表现为胆红素下降、白蛋白的升高, Child-pugh积分下降, 与对照组相比, 有显著差异, $P < 0.01$; 与曾氏的报道结果相一致^[8]. 但是随着治疗时间的延长, 发生YMDD变异患者的胆红素上升、白蛋白下降, Child-pugh积分升高, TBil、A、Child-pugh积分的变化与自身治疗前相关指标相比, 无显著差异, $P > 0.05$, 与对照组相比, 亦无显著差异, $P > 0.05$, 与梁氏的报道结果相一致^[9]. YMDD变异后, 虽然部分患者已改善的肝组织病变不能继续维持^[10], 临床表现为TBil、A再次异常, Child-pugh积分升高, 部分患者还可导致肝功能恶化^[11], 已有少数致死病例的报道^[12], 但是本研究治疗组、对照组患者的合并症发生率、死亡率分别为11.4%(5/44), 45.6%(21/46), 9.1%(4/44), 30.4%(14/46), $P = 0.007$ 、 $P = 0.0377$, 差异显著, 这就是说, 在YMDD变异后, 经益气养血, 化瘀通络中药调理及西药的对症治疗, 部分患者的病情相对稳定, 合并症发生率仍比对照组少, 死亡率仍比对照组低. 慢性重型肝炎的发生率, 两组无显著差异, 说明: 即使不用拉米夫定治疗, ALC中仍有一部分患者会因病毒复制导致肝脏炎症活动, 发生慢性重症肝炎, 危及生命.

治疗终点与死因的探讨: 治疗组除7例达治疗终点外, 无一例达到规定的停药指征, 虽然有4例HBeAg(+)→HBeAb(+), 但血清转换未达6 mo, 且部分患者血清转换很难持久^[13], 表现为肝功能生化指标仍波动, 故未停药, 在病毒清除之前, 拉米夫定是不能停用的, 停药后肝炎的

再活动可能是致命性的^[14]。本研究治疗组7例达到治疗终点的患者, 5例因YMDD变异, 病情加重, 3例及时改用阿德福韦和中药联合治疗后, 黄疸逐渐消退, 肝功能接近正常, 和国外的有关报道相一致^[15], 2例死亡; 另外两例死亡者, 一例在治疗第27 mo发生肝癌, 外院行肝移植术4 mo后, YMDD变异, 发生暴发性肝炎而死亡; 1例因合并症死亡。对照组: 14例死亡患者中7例因慢性重型肝炎、7例因合并症死亡而达到治疗终点。两组的死因提示: ALC患者生理平衡非常脆弱, 一旦在肝硬变的基础上病毒复制引起慢性重症肝炎, 其预后非常差, 终末期合并症是ALC主要死亡原因, 因此, 如果ALC患者肝功能反复波动, 病程进展快, 应尽早使用抗病毒药, 其目的: 一是防止慢性重型肝炎的发生, 二是迅速阻止病程的快速进展, 否则出现难治性并发症, 将危及生命; 使用拉米夫定治疗的ALC患者一旦出现YMDD变异, 应及早更换抗病毒药; 肝脏移植后的患者, 仍要注意病毒指标的监测, 若发生病毒变异, 也要尽早更换抗病毒药; 大多数ALC终末期患者, 抗病毒治疗仍不能替代肝脏移植。

总之, 降肝隆联合拉米夫定治疗ALC, 病毒复制受到抑制, 肝功能得到改善, 虽病毒变异后, 疗效受到一定的影响, 但仍减少了合并症的发生、降低了ALC的病死率, 提高了患者的生活质量, 且无肾功能损害和血小板进一步减少的弊端^[16], YMDD变异的患者要及时更换抗病毒药-阿德福韦, 即使肝移植后, 仍要注意病毒指标的监测, 若出现YMDD变异, 要及时调整抗病毒药, 以免发生肝功能衰竭。对终末期ALC, 除抗病毒及对症治疗外, 仍要考虑肝脏移植。本组病例仍在观察之中。

4 参考文献

- 1 Villeneuve JP, Condreay LD, Willems B, Pomier-Layrargues G, Fenyves D, Bilodeau M, Leduc R, Peltekian K, Wong F, Margulies M, Heathcote EJ. Lamivudine treatment for decompensated cirrhosis resulting from chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000; 31: 207-210
- 2 刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江. 拉米夫定治疗乙型肝炎相关失代偿期肝硬变的进展. *世界华人消化杂志* 2004; 7: 1682-1684
- 3 Kapoor D, Guptan RC, Wakil SM, Kazim SN, Kaul R, Agarwal SR, Raisuddin S, Hasnain SE, Sarin SK. Beneficial effects of lamivudine in hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 308-312
- 4 杨婉凤, 王灵台, 陈建杰. 补肾冲剂抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究. *肝脏* 2002; 7: 110-111
- 5 Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, Condreay LD, Chien RN. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001; 33: 1527-1532
- 6 王磊, 闫杰, 张照华, 王晶波, 杜以真, 李晓迎, 王耀宗. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎患者YMDD变异及影响因素的研究. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 585-589
- 7 文睿, 王坚, 严明. 中药降肝隆联合拉米夫定治疗活动性肝炎肝硬化的临床研究. *中西医结合肝病杂志* 2003; 13: 81-83
- 8 曾维群, 郭树华, 张大志, 周智, 任红, 张全海, 王志毅. 拉米夫定治疗活动性肝炎肝硬变的疗效观察. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 176-178
- 9 梁伟峰, 杨丹红, 沈月洪. 拉米夫定抗乙肝病毒感染中YMDD变异类型及时间研究. *中华肝脏病杂志* 2003; 5: 302-304
- 10 Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 105-117
- 11 Manolakopoulos S, Karatapanis S, Elefsiniotis J, Mathou N, Vlachogiannakos J, Iliadou E, Kouglioumtzan A, Economou M, Triantos C, Tzourmakliotis D, Avgerinos A. Clinical course of lamivudine monotherapy in patients with decompensated cirrhosis due to HBeAg negative chronic HBV infection. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 57-63
- 12 Wang JH, Lu SN, Lee CM, Lee JF, Chou YP. Fatal hepatic failure after emergence of the hepatitis B virus mutant during lamivudine therapy in a patient with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 366-369
- 13 Song BC, Suh DJ, Lee HC, Chung YH, Lee YS. Hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine therapy is not durable in patients with chronic hepatitis B in Korea. *Hepatology* 2000; 32: 803-806
- 14 Lim SG, Wai CT, Rajnakova A, Kajiji T, Guan R. Fatal hepatitis B reactivation following discontinuation of nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Gut* 2002; 51: 597-599
- 15 Perrillo R, Hann HW, Mutimer D, Willems B, Leung N, Lee WM, Moorat A, Gardner S, Woessner M, Bourne E, Brosgart CL, Schiff E. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2004; 126: 81-90
- 16 文睿, 王坚, 严明. 中药降肝隆联合拉米夫定治疗活动性肝炎肝硬变的长期疗效观察. *中华实用中西医杂志* 2004; 4: 2444-2446

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

全直肠系膜切除术直肠系膜 CD44v6 检测 47 例

宋哲, 田素礼

宋哲, 田素礼, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 田素礼, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科. dr_tiansuli@163.com

电话: 0451-86605575

收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-09-30

Detection of CD44v6 in mesorectum from total mesorectal excision: an analysis of 47 cases

Zhe Song, Su-Li Tian

Zhe Song, Su-Li Tian, the Third Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Dr. Su-Li Tian, the Third Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. dr_tiansuli@163.com

Received: 2005-09-10 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To detect the expression of CD44 splice variant v6 (CD44v6) in the tissues of rectal cancer and mesorectum, and to prove the scientific nature of the total mesorectal excision for rectal cancer on the basis of molecular level.

METHODS: CD44v6 protein was detected by SP immunohistochemical method in the tissues of rectal cancer, mesorectum (2 cm distal from the tumor), and distal mesorectal margin (5 cm distal from the tumor) from 47 rectal cancer patients received total mesorectal excision.

RESULTS: CD44v6 was highly expressed in the tissues of rectal cancer. The positive rate of CD44v6 expression was significantly different (0/20 vs 15/47, $P < 0.01$) between the normal rectal mucosa and mesorectum (2 cm distal from the tumor), but no significant difference existed between the normal mesorectum and distal mesorectal margin (5 cm distal from the tumor). The positive rate of CD44v6 expression was related with the lymphatic metastasis (metastasis vs non-metastasis: 88.5% vs 61.9%, $P < 0.05$) and clinical stages (Dukes C-D vs A-B: 88.5% vs 61.9%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: It is useful to detect the expression of CD44v6 protein in the tissues of rectal cancer for the

evaluation of the local apoptotic degree of mesorectum. The excision margin of distal mesorectum should be no less than 5 cm from the tumor in the surgical management of rectal cancer.

Key Words: CD44v6; Mesorectum; SP immunohistochemical staining

Song Z, Tian SL. Detection of CD44v6 in mesorectum from total mesorectal excision: an analysis of 47 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2514-2516

摘要

目的: 通过检测CD44v6在的直肠癌及直肠系膜内的表达, 从分子水平证明全直肠系膜切除术治疗直肠癌的科学性。

方法: 行全直肠系膜切除术的直肠癌患者47例于直肠癌组织、直肠系膜(距肿瘤下缘2 cm)、直肠系膜远端切缘(距肿瘤下缘5 cm)取病理标本, 采用免疫组化SP法对标本进行CD44v6检测。

结果: 直肠癌组织中CD44v6高度表达, 正常直肠系膜组织中CD44v6的阳性表达率(0/20)与直肠系膜(距肿瘤下缘2 cm)的CD44v6的阳性表达率(15/47)存在显著差异($P < 0.01$), 而与直肠系膜远端切缘(4/47)无差异($P > 0.05$)。同时发现直肠癌中CD44v6的阳性表达率与肿瘤的淋巴转移(有vs无: 88.5% vs 61.9%, $P < 0.05$)和临床分期(Dukes C-D vs A-B: 88.5% vs 61.9%, $P < 0.05$)有关。

结论: 对直肠癌组织进行CD44v6蛋白的检测, 有助于评估直肠系膜局部病变程度; 肿瘤远端直肠系膜切除长度至少比肿瘤平面多5 cm。

关键词: CD44v6; 直肠系膜; SP免疫组化

宋哲, 田素礼. 全直肠系膜切除术直肠系膜CD44v6检测47例. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2514-2516

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2514.asp>

0 引言

直肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 术后的复发和转移是致死的主要原因. Heald *et al*^[1,2]提出直肠癌术后局部复发是由于原发肿瘤远侧的直肠系膜内残留了播散的癌组织, 而直肠系膜切除不足是盆腔复发的直接原因, 并由此提出全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)的概念. 其应用于临床以来有效的降低了局部复发率, 作

为直肠癌手术的“金标准”正被越来越多的人接受^[3-9]。分化抗原簇(CD)是一种黏附分子,为细胞表面跨膜糖蛋白,它能介导细胞与细胞或细胞与基质间相互接触和结合的过程,研究表明CD44拼接变异体—CD44v6与肿瘤的侵袭转移密切相关^[10-13]。我们通过免疫组化方法检测CD44v6在直肠系膜中的表达,为直肠癌根治术中直肠系膜的合理切除范围提供依据,进而从分子水平证明全直肠系膜切除术的科学性。

1 材料和方法

1.1 材料 采集本院2004-03/2005-03行全直肠系膜切除的直肠癌标本共47例。其中男性26例,女性21例,年龄39-79岁。所有病例均经病理诊断证实,其中溃疡型28例(59.6%),肿块型19例(40.4%);高分化腺癌8例(17.0%),中分化腺癌15例(31.9%),低分化腺癌20例(42.6%),未分化癌4例(8.5%)。Dukes'A期4例(8.5%),B期17例(36.2%),C期25例(53.2%),D期1例(2.1%)。

1.2 方法 一抗鼠抗人CD44v6抗体和UltraSensitive™ SP超敏试剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司。采用SP免疫组织化学方法,操作步骤按试剂盒说明进行,组织切片置入0.01 mol/L(pH6.0)柠檬酸盐缓冲液中行高温高压抗原修复,用已知阳性切片作阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。每例分别于直肠癌组织(I)、直肠系膜(距肿瘤下缘2 cm)(II)、直肠系膜远端切缘(距肿瘤下缘5 cm)(III)取病理标本(大小约1 cm³)作为试验组;另采集因直肠良性病变,行直肠部分切除的标本20例,取正常直肠黏膜组织(I')及正常直肠系膜(II')标本(大小约1 cm³)作为对照组。标本经40 g/L中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,4 μm厚连续切片。

统计学处理 阳性信号为细胞膜中呈现棕黄色颗粒,以阳性细胞数少于10%为阴性(-),阳性细胞数大于10%为阳性(+)。采用SPSS10.0统计分析软件包处理,数据统计采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 CD44v6在直肠癌及直肠系膜组织中的表达 直肠癌组织、正常直肠黏膜组织中CD44v6的阳性表达率分别为76.6%和0,两者存在显著差异($P<0.01$),说明CD44v6在直肠癌组织中的表达具有高度特异性。正常直肠系膜组织、直肠系膜远端切缘(距肿瘤下缘5 cm)、直肠系膜(距肿瘤下缘2 cm)中CD44v6的阳性表达率分别为0.85%, 31.9%;正常直肠系膜组织中CD44v6的阳性表达率与直肠系膜(距肿瘤下缘2 cm)的CD44v6的阳性表达率存在显著差异($P<0.01$),而与直肠系膜远端切缘无差异($P>0.05$)(表1)。

2.2 CD44v6与直肠癌某些临床病理特征的关系 CD44v6的阳性表达率与直肠癌淋巴结转移和Dukes'分期密切相关。有淋巴结转移和无淋巴结转移的直肠癌原发灶中

表1 CD44v6在直肠癌、直肠系膜中的表达

分组	<i>n</i>	CD44v6阳性例数	阳性率(%)
试验组			
I	47	36	76.6 ^b
II	47	15	31.9 ^d
III	47	4	8.5
对照组			
I'	20	0	0
II'	20	0	0

^b $P<0.01$ vs I'; ^d $P<0.01$ vs II'.

CD44v6的阳性表达率分别为88.5%和61.9%,有显著差异($P<0.05$)。Dukes'A-B期和C-D期直肠癌的CD44v6的阳性表达率分别为61.9%和88.5%有显著差异($P<0.05$)。而其阳性表达率与肿瘤的大体类型和分化程度无关($P>0.05$)(表2)。

表2 CD44v6与直肠癌临床病理特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	CD44v6阳性例数	阳性率(%)	<i>P</i> 值
大体类型				
溃疡型	28	22	78.6	
肿块型	19	14	73.7	>0.05
分化程度				
高-中分化	23	17	73.9	
低-未分化	24	19	79.2	>0.05
淋巴转移				
无	21	13	61.9	
有	26	23	88.5	<0.05
Dukes' 分期				
A-B期	21	13	61.9	
C-D期	26	23	88.5	<0.05

3 讨论

人CD44基因位于11号染色体短臂上^[14],其产物为一种跨膜糖蛋白,能介导淋巴细胞归巢和参与细胞黏附,CD44变异体中的CD44v6与恶性肿瘤的转移密切相关。用抗CD44v6变异蛋白的抗体与CD44v6变异型产物相结合,显示原鼠癌细胞的转移潜能被终止^[15],将CD44v6的cDNA转染到非转移性肿瘤细胞系并使其过度表达,可使后者获得转移潜能^[16]。从而证实了CD44v6是一个与肿瘤有关的黏附分子。目前多数学者认为,CD44v6可以作为判断大肠癌转移的一个生物学指标。本试验结果显示的CD44v6在有肿瘤转移组中表达增多的现象亦印证了这一点。

直肠癌TME的理论基础是建立在盆腔脏层和壁层之间有一个平面,为直肠癌完整切除设定了切除范围,并且直肠癌浸润转移通常局限在此范围内。约有65-80%的直肠癌有周围局部的病变,包括直接浸润和直肠周围淋巴结转移或直肠血管周围淋巴结转移,而所有这些局部病变均在盆腔脏层筋膜范围之内^[9]。传统手术多为钝性剥离,在解剖直肠骶骨筋膜时遇到阻力,如不锐性剪断,则

可能向前方偏离进入直肠系膜, 而且外科医生可能会注意切除肿瘤远端2 cm的肠管而将系膜在靠近癌灶的下方切断, 使远端直肠系膜切除不全, 或许区域性播散的癌灶恰恰就在那里, 其后果可想而知. 我们基于CD44v6的上述特性, 检测其在直肠系膜中的表达情况, 发现距肿瘤下缘2 cm直肠系膜组织CD44v6的阳性表达率高于正常直肠系膜, 存在显著差异($P<0.01$), 而距肿瘤下缘5 cm的直肠系膜远端切缘CD44v6的阳性表达率与正常直肠系膜无差异($P>0.05$). 这符合直肠癌TME手术直肠系膜切除范围的原则即肿瘤远端直肠系膜切除长度至少比肿瘤平面多5 cm.

我们从分子水平上论证了全直肠系膜切除术在预防直肠癌局部复发方面的价值, 为全直肠系膜切除术的科学性提供理论依据. 同时提醒外科医生不能单纯为了降低术后吻合口漏的发生率而残留了可能存在播散癌灶的远端直肠系膜, 增加术后复发的可能性.

4 参考文献

- 1 Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery-the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69: 613-616
- 2 Heald RJ, Karanjia ND. Results of radical surgery for rectal cancer. *World J Surg* 1992; 16: 848-857
- 3 Ulrich A, Schmidt J, Weitz J, Buchler MW. Total mesorectal excision: the Heidelberg results after TME. *Recent Results Cancer Res* 2005; 165: 112-119
- 4 Piso P, Dahlke MH, Mirena P, Schmidt U, Aselmann H, Schlitt HJ, Raab R, Klempnauer J. Total mesorectal excision for middle and lower rectal cancer: a single institution experience with 337 consecutive patients. *J Surg Oncol* 2004; 86: 115-121
- 5 Cecil TD, Sexton R, Moran BJ, Heald RJ. Total mesorectal excision results in low local recurrence rates in lymph node-positive rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 1145-1149
- 6 Leroy J, Jamali F, Forbes L, Smith M, Rubino F, Mutter D, Marescaux J. Laparoscopic total mesorectal excision (TME) for rectal cancer surgery: long-term outcomes. *Surg Endosc* 2004; 18: 281-289
- 7 Zhou ZG, Wang Z, Yu YY, Shu Y, Cheng Z, Li L, Lei WZ, Wang TC. Laparoscopic total mesorectal excision of low rectal cancer with preservation of anal sphincter: a report of 82 cases. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1477-1481
- 8 Ridgway PF, Darzi AW. The role of total mesorectal excision in the management of rectal cancer. *Cancer Control* 2003; 10: 205-211
- 9 Enker WE. Total mesorectal excision-the new golden standard of surgery for rectal cancer. *Ann Med* 1997; 29: 127-133
- 10 Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, Pyrhonen S. CD44 variant 6 expression predicts response to treatment in advanced colorectal cancer. *Oncol Rep* 2004; 11: 41-45
- 11 Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, Kudo T, Hirohashi S, Ochiai A, Tohnai I, Ueda M, Kimata K. CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncol Rep* 2003; 10: 1919-1924
- 12 Marhaba R, Zoller M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 2004; 35: 211-231
- 13 Chun SY, Bae OS, Kim JB. The significance of CD44 variants expression in colorectal cancer and its regional lymph nodes. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 696-700
- 14 Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44-a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989; 10: 423-428
- 15 Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zoller M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993; 177: 443-455
- 16 Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 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》发表文章配发内容通知

本刊讯 从2006年开始,《世界华人消化杂志》将对述评、食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、基础研究、临床研究、前沿综述、研究快报、临床经验等主要栏目,每篇文章配发以下内容,请广大作者投稿前将以下内容补上.

(1)背景资料:简要、精确概括此文的相关背景,使读者更广泛的了解文章的相关知识,更深入的理解文章的意义.(2)研发前沿:简要介绍此文章研究领域中的研究热点、重点.(3)相关报道:为了方便读者对您文章有更深入的理解,或得到更系统,详实的相关知识,请您提供与您文章有关的其他发表的研究报道的文章出处、链接等,以方便读者进行更广泛的阅读.(4)创新盘点:总结、提炼此文章与其他相关、或类似文章、报道的不同点以及创新之处,以方便读者比较,并有重点的阅读您的文章.(5)应用要点:总结此文章在实际应用中的价值,或对应用的指导、改进作用,以及在将来应用中的前景.(6)名词解释:将文章中出现的,对文章的理解有重要意义,而大部分读者可能不太熟悉,或理解的不是很全面、准确,或者这些词在此文中的意思异于他处的名词给予简单、直白、明了的解释说明.(7)同行评论:编辑部将同行评议时审稿专家的意见中最能概括文章特点、价值、意义的词语、句子进行概括总结,使读者可以对文章有个比较客观的认识.

总之,以上各项表达用通俗易懂的1-3句话描述.(世界胃肠病学杂志社 2005-10-10)

经内镜治疗急性胆源性胰腺炎临床疗效/费用分析

覃华, 程继华, 侯伟, 李荣香, 赵秋, 刘南植

覃华, 侯伟, 李荣香, 赵秋, 刘南植, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
程继华, 湖北省汉川市人民医院胃镜室 湖北省汉川市 431600
通讯作者: 覃华, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. drqinhua@yahoo.com.cn
电话: 027-83663612 传真: 027-83662891
收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-09-30

Cost and curative effect of endoscopic therapy in treatment of acute biliary pancreatitis

Hua Qin, Ji-Hua Cheng, Wei Hou, Rong-Xiang Li, Qiu Zhao, Nan-Zhi Liu

Hua Qin, Wei Hou, Rong-Xiang Li, Qiu Zhao, Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Ji-Hua Cheng, Department of Endoscopy, Hanchuan People's Hospital, Hanchuan 431600, Hubei Province, China
Correspondence to: Hua Qin, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. drqinhua@yahoo.com.cn
Received: 2005-09-21 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To evaluate the clinical value of endoscopic therapy (ERCP) and its curative effect/cost in the treatment of acute biliary pancreatitis.

METHODS: The clinical data of 136 patients with acute biliary pancreatitis were analyzed. In those patients, 53 were treated with endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP), and 83 were treated with conservative treatment.

RESULTS: The 53 patients received ERCP were all successfully finished the examination. The status of their disease was improved, and no complications occurred. The time of hospitalization was significantly shorter (12.64 ± 5.04 d vs 25.54 ± 12.96 d, $P < 0.05$) and the cost were markedly lower ($12\ 503.25 \pm 5\ 342.14$ RMB vs $31\ 325.54 \pm 15\ 790.47$ RMB, $P < 0.05$) in patients treated with ERCP than those with conservative treatment, and the mortality was decreased.

CONCLUSION: ERCP is safe and effective in the treatment of acute biliary pancreatitis. It can significantly reduce the time and cost of hospitalization, as well

as decrease the mortality rate.

Key Words: Endoscopic therapy; Biliary pancreatitis; Curative effect/cost

Qin H, Cheng JH, Hou W, Li RX, Zhao Q, Liu NZ. Cost and curative effect of endoscopic therapy in treatment of acute biliary pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(20):2517-2519

摘要

目的: 评价经内镜(ERCP)治疗急性胆源性胰腺炎的临床价值及其疗效/费用情况。

方法: 分析2001-01/2005-06经内镜(ERCP)治疗的53例急性胆源性胰腺炎患者以及同期经内科保守治疗的83例急性胆源性胰腺炎患者的临床资料, 评价ERCP治疗的临床价值及疗效/费用情况。

结果: 经ERCP治疗的53例患者均顺利完成ERCP检查及治疗, 术后患者病情明显好转, 无明显并发症发生, 与常规治疗组相比其平均住院时间明显缩短(12.64 ± 5.04 d vs 25.54 ± 12.96 d, $P < 0.05$), 平均住院费用明显降低($12\ 503.25 \pm 5\ 342.14$ 元 vs $31\ 325.54 \pm 15\ 790.47$ 元, $P < 0.05$), 患者死亡率明显降低。

结论: 急性胆源性胰腺炎行ERCP治疗是安全有效的, 可明显缩短平均住院时间、降低平均住院费用及患者死亡率。

关键词: 内镜; 胆源性胰腺炎; 疗效/费用

覃华, 程继华, 侯伟, 李荣香, 赵秋, 刘南植. 经内镜治疗急性胆源性胰腺炎临床疗效/费用分析. *世界华人消化杂志* 2005;13(20):2517-2519
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2517.asp>

0 引言

随着内镜诊疗技术的不断发展, 经内镜介入治疗现已逐步应用于急性胆源性胰腺炎(特别是重症患者)的治疗。为了评价经内镜(ERCP)治疗急性胆源性胰腺炎的临床价值, 我们总结分析了2001-01/2005-06经ERCP治疗的53例急性胆源性胰腺炎患者以及同期经内科保守治疗的83例急性胆源性胰腺炎患者的临床资料, 报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料 急性胆源性胰腺炎患者经常规治疗组83例, 男性37例, 女性46例。年龄36-79岁, 平均年龄 47.66 ± 10.34

岁. 其中轻型胰腺炎69例、重症胰腺炎14例, 合并胸腔积液10例、急性肾功能不全11例、低血容量性休克者9例. 经ERCP治疗组53例, 男性28例, 女性25例. 年龄34-82岁, 平均年龄 46.74 ± 8.56 岁. 其中轻型胰腺炎45例、重症胰腺炎8例, 合并胸腔积液8例、急性肾功能不全9例、低血容量性休克6例(行ERCP前均经扩容等治疗后纠正).

1.2 方法 急性胰腺炎的诊断及分级参照《急性胰腺炎的临床诊断及分级标准》^[1]. 患者入院后48 h评估患者病情, 并据此时病情状况分为轻型和重症胰腺炎. 急性胆源性胰腺炎诊断标准^[2,3]: 急性上腹部疼痛伴恶心、呕吐、腹胀、上腹部压痛、反跳疼等; 血尿淀粉酶增高; 肝功能试验提示血ALT、AST、AKP、GGT增高和/或胆红素增高; B超、CT或MRCP提示胆管扩张和/或胆管结石、胆囊结石、胆道蛔虫等胆系疾病; B超和/或CT提示急性胰腺炎的影像学改变. 两组患者均予以常规综合治疗: 禁食、胃肠减压、吸氧、药物抑制胃酸、抑制胰腺分泌及胰酶活性、防治感染、维持水电解质及酸碱平衡、对症支持治疗等. 内镜治疗组同时予以ERCP检查和治疗, 根据术中发现选择不同的治疗方法: 十二指肠乳头括约肌切开术+取结石、蛔虫等, 和/或鼻胆管、内置管引流术等. 所有患者根据其病情决定禁食时间的长短, 内镜治疗组患者术后3 h及24 h常规行血、尿淀粉酶检查, 同时观察患者腹痛等情况, 继续常规综合治疗. 观察腹部及全身症状、体征改善时间, 并发症和平均住院天数和费用等指标.

统计学处理 两组患者平均住院时间和平均住院费用均以mean \pm SD表示, 两组平均住院时间和平均住院费用之间有无显著性差异采用 t 检验分析.

2 结果

常规治疗组83例患者中有4例由轻型进展为重症胰腺炎, 3例(3.6%)死于多脏器功能衰竭. 本组平均住院时间为 25.54 ± 12.96 d(5-96 d), 平均住院费用为 $31\,325.54 \pm 15\,790.47$ 元(5 810.92-324 876.45元).

ERCP治疗组53例患者均顺利完成ERCP检查及治疗, 其中有1例患者在行乳头切开时局部乳头部少许渗血, 局部止血后渗血停止; 另有5例患者术后出现一过性血、尿淀粉酶水平较术前升高, 均在术后3 d恢复正常水平, 病情无明显加重, 未见轻型向重症胰腺炎进展者, 无严重并发症, 无患者死亡. 本组中有4例急性重症胆源性胰腺炎患者, 经常规保守治疗后症状无明显好转, 行ERCP治疗, 经ERCP治疗结束后患者腹痛减轻, 体温逐渐下降至正

常, 次日患者一般情况明显好转、自觉症状明显减轻, 复查外周血白细胞及血淀粉酶水平均明显降低, 1 wk后患者基本恢复正常. 本组平均住院时间为 12.64 ± 5.04 d(6-28 d), 平均住院费用为 $12\,503.25 \pm 5\,342.14$ 元(3 417.04-30 145.34元). 与常规治疗组相比, ERCP治疗组疗效明显优于常规治疗组, 患者在内镜治疗后症状明显减轻, 病情明显改善, 康复快, 可明显缩短患者平均住院时间, 降低患者平均住院费用($P < 0.05$). 经常规治疗病情无缓解者经内镜治疗后可使患者症状减轻, 病情迅速缓解, 改善患者生活质量, 降低患者死亡率(表1).

3 讨论

急性胆源性胰腺炎可由胆系结石、胆道感染、胆道蛔虫、十二指肠乳头狭窄、Oddi's括约肌功能不全等所致, 大多合并胆系感染, 重症患者可同时合并呼吸、循环功能衰竭以及脓毒血症等严重并发症^[4], 预后差, 死亡率高, 行外科手术治疗近期死亡率可高达30-40%. 随着内镜诊疗技术的不断发展, 经内镜介入治疗现已应用于急性胆源性胰腺炎(特别是重症患者)的治疗, 与外科手术治疗相比具有创伤小、并发症少、对患者体质要求低、平均住院时间短及住院费用低、疗效确切等优点, 外科手术已不再是急性胆源性胰腺炎的首选治疗措施^[5]. 急诊ERCP行胆管取石或胆道引流等治疗现已逐渐成为急性胆源性胰腺炎的常规治疗措施^[2,6-8], 对于合并胆囊结石的患者可联合腹腔镜胆囊切除术治疗^[9].

急性胆源性胰腺炎经ERCP治疗是相对安全的, ERCP治疗不仅不会加重患者病情, 而且可以减轻胰腺坏死情况^[10]. 在本研究中, 常规治疗组患者中有4例由轻型进展为重症胰腺炎, 3例死于多脏器功能衰竭. ERCP治疗组中, ERCP术后患者病情无明显加重, 未见轻型胰腺炎进展为重症胰腺炎者, 除1例患者在行EST时乳头部少量出血(经1:10 000肾上腺素局部注射后出血停止), 5例患者术后出现一过性血淀粉酶增高外, 无严重的治疗相关的并发症发生, 亦无患者死亡, 疗效明显优于常规治疗组.

急性胆源性胰腺炎患者经ERCP治疗后患者症状可以明显减轻, 术后患者血清胆红素、淀粉酶及脂肪酶即开始下降^[11]. 本研究中, 经ERCP治疗组中有4例诊断为急性重症胆源性胰腺炎者, 予以常规保守治疗后症状无明显好转而行ERCP治疗, 经ERCP治疗结束后患者腹痛减轻, 体温逐渐下降至正常, 次日患者一般情况明显好转、自觉症状明显减轻, 复查外周血白细胞及血淀粉酶水平均明显降低, 1 wk后患者基本恢复正常.

表1 急性胆源性胰腺炎常规治疗组与内镜治疗组结果比较

	常规治疗组 ($n = 83$)	内镜治疗组 ($n = 53$)	P 值
平均住院时间 (d)	25.54 ± 12.96	12.64 ± 5.04	< 0.05
平均住院费用 (元)	$31\,325.54 \pm 15\,790.47$	$12\,503.25 \pm 5\,342.14$	< 0.05
死亡数 (%)	3 (3.6)	0 (0)	—

急性胆源性胰腺炎患者早期经ERCP治疗可明显减少胰腺坏死情况, 缩短患者平均住院日, 降低患者死亡率^[10,12]. Zhou *et al*^[13]通过对45例患者随机对照研究后认为对于重症胆源性胰腺炎患者内镜治疗可以明显降低其住院时间及住院费用, 本研究中ERCP治疗组与常规治疗组相比, 患者平均住院时间明显缩短(12.64 ± 5.04 d *vs* 25.54 ± 12.96 d, $P < 0.05$), 平均住院费用明显降低($12\,503.25 \pm 5\,342.14$ 元 *vs* $31\,325.54 \pm 15\,790.47$ 元, $P < 0.05$), 死亡率为0, 与上述结果一致. 急性胆源性胰腺炎经内镜(ERCP)治疗可以提高疗效, 同时可明显降低患者住院费用及住院时间, 从而降低医疗成本, 节约社会医疗资源.

在临床治疗中, 应充分认识到急性胰腺炎(特别是急性重症胰腺炎)应予以综合性治疗措施, 严密监测患者的生命体征, 尽快完善CT、MRCP等检查, 及早明确是否为急性胆源性胰腺炎、有无胆系感染存在. 确诊为急性胆源性胰腺炎者, 特别是合并阻塞性黄疸及胆系感染者, 应尽可能早期行ERCP检查及十二指肠乳头括约肌切开或/和胆道引流等治疗^[14-16]. 行ERCP检查及治疗前应积极予以抗感染、补液、抑制胰腺分泌以及抗休克等综合治疗以改善患者一般情况, 使患者能够更好的耐受ERCP检查及治疗. 行ERCP检查及治疗时应尽可能选择性胆管插管, 避免胰管多次显影, 绝对禁忌胰腺腺泡显影, 简化操作, 缩短操作时间, 以免加重患者病情. 术中予以吸氧, 加强血压、血氧饱和度及心电监护; 如术中操作困难或患者难以耐受ERCP检查及治疗, 应即时停止操作, 以免出现严重的并发症, 患者行ERCP检查及治疗后应严密观察患者病情变化, 继续予以积极的综合治疗直至患者康复.

4 参考文献

- 1 中华医学会外科学会胰腺学组. 急性胰腺炎的临床诊断及分级标准. 中华外科杂志 1997; 35: 773-775
- 2 Ricci F, Castaldini G, de Manzoni G, Borzellino G, Rodella L, Kind R, Cordiano C. Treatment of gallstone pancreatitis: six-year experience in a single center. *World J Surg* 2002; 26: 85-90
- 3 Fiocca F, Santagati A, Ceci V, Donatelli G, Pasqualini MJ, Moretti MG, Speranza V, Di Giuli M, Minervini S, Sportelli G, Giri S. ERCP and acute pancreatitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2002; 6: 13-17
- 4 Flint R, Windsor J, Bonham M. Trends in the management of severe acute pancreatitis: interventions and outcome. *ANZ J Surg*. 2004; 74: 335-342
- 5 Bedirli A, Sozuer EM, Sakrak O, Babayigit H, Yilmaz Z. Comparison of the results of early, delayed and elective surgery in biliary pancreatitis. *Turk J Gastroenterol* 2003; 14: 97-101
- 6 Norton ID, Petersen BT. Interventional treatment of acute and chronic pancreatitis. Endoscopic procedures. *Surg Clin North Am* 1999; 79: 895-911
- 7 Wullstein C, Bechstein WO. Acute pancreatitis. *Chirurg* 2004; 75: 641-651
- 8 Veltke-Schlieker W, Adler A, Abou-Rebyeh H, Wiedenmann B, Rosch T. Endoscopic therapy of acute and chronic pancreatitis. *Internist(Berl)* 2005; 46: 166-174
- 9 Maione G, Guffanti E, Fontana A, Pozzi C, Baticci F, Noto S, Franzetti M. Acute biliary pancreatitis. Therapeutic trends. *Minerva Chir* 1999; 54: 843-850
- 10 Besselink MG, van Minnen LP, van Erpecum KJ, Bosscha K, Gooszen HG. Beneficial effects of ERCP and papillotomy in predicted severe biliary pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 37-39
- 11 Dominguez Fernandez E, Suchan KL, Gerke B, Rossner E, Post S, Manegold BC. Results of emergency ERCP in the treatment of acute biliary pancreatitis. *Zentralbl Chir* 2002; 127: 786-790
- 12 Piskac P, Riebel O, Hnizdil L, Znojil V, Piskacova I. Emergency ERCP and acute biliary pancreatitis. *Bratisl Lek Listy* 1999; 100: 668-671
- 13 Zhou MQ, Li NP, Lu RD. Duodenoscopy in treatment of acute gallstone pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 608-610
- 14 Nitsche R, Folsch UR. Role of ERCP and endoscopic sphincterotomy in acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999; 13: 331-343
- 15 Gonzalez-Huezo MS, Jerez-Gonzalez L, Bobadilla-Diaz J, Robles-Diaz G, Uscanga L. Endoscopic cholangiography in mild acute biliary pancreatitis: when and for whom? *Rev Gastroenterol Mex* 2002; 67: 87-92
- 16 Hagenmuller F, Keuchel M. Acute pancreatitis. Early elective endoscopic intervention. *Chirurg* 2000; 71: 265-268

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿),我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力,提高了《世界华人消化杂志》的学术质量,在此表示衷心感谢!

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院

潘秀珍 教授
福建省立医院消化内科

程明亮 教授
贵阳医学院附属医院

任建林 副教授
厦门大学中山医院

戴冬秋 教授
沈阳中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

石统东 副教授
中国人民解放军第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所

房殿春 教授
中国人民解放军第三军医大学西南医院消化内科

吴开春 教授
中国人民解放军第四军医大学西京医院消化内科

房静远 教授
上海第二医科大学附属仁济医院

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

谷俊朝 副教授
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

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

侯晓华 教授
华中科技大学同济医学院协和医院消化内科

许玲 副教授
中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

江学良 副主任医师
长海医院研究生公寓201房间

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

吕宾 主任医师
浙江中医院附属医院

杨刚毅 副教授
重庆医科大学附属第二医院内分泌科

罗和生 教授
武汉大学人民医院消化内科

严律南 教授
华西医科大学附属第一医院

刘杞 教授
重庆医科大学病毒性肝炎研究所

周丁华 副教授
解放军二炮总医院

李增山 副教授
中国人民解放军第四军医大学病理教研室

张锦生 教授
上海复旦大学上海医学院病理学系

聂青和 副教授
中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科全军感染病治疗中心

周晓东 研究员
广州中山大学附属第二医院