

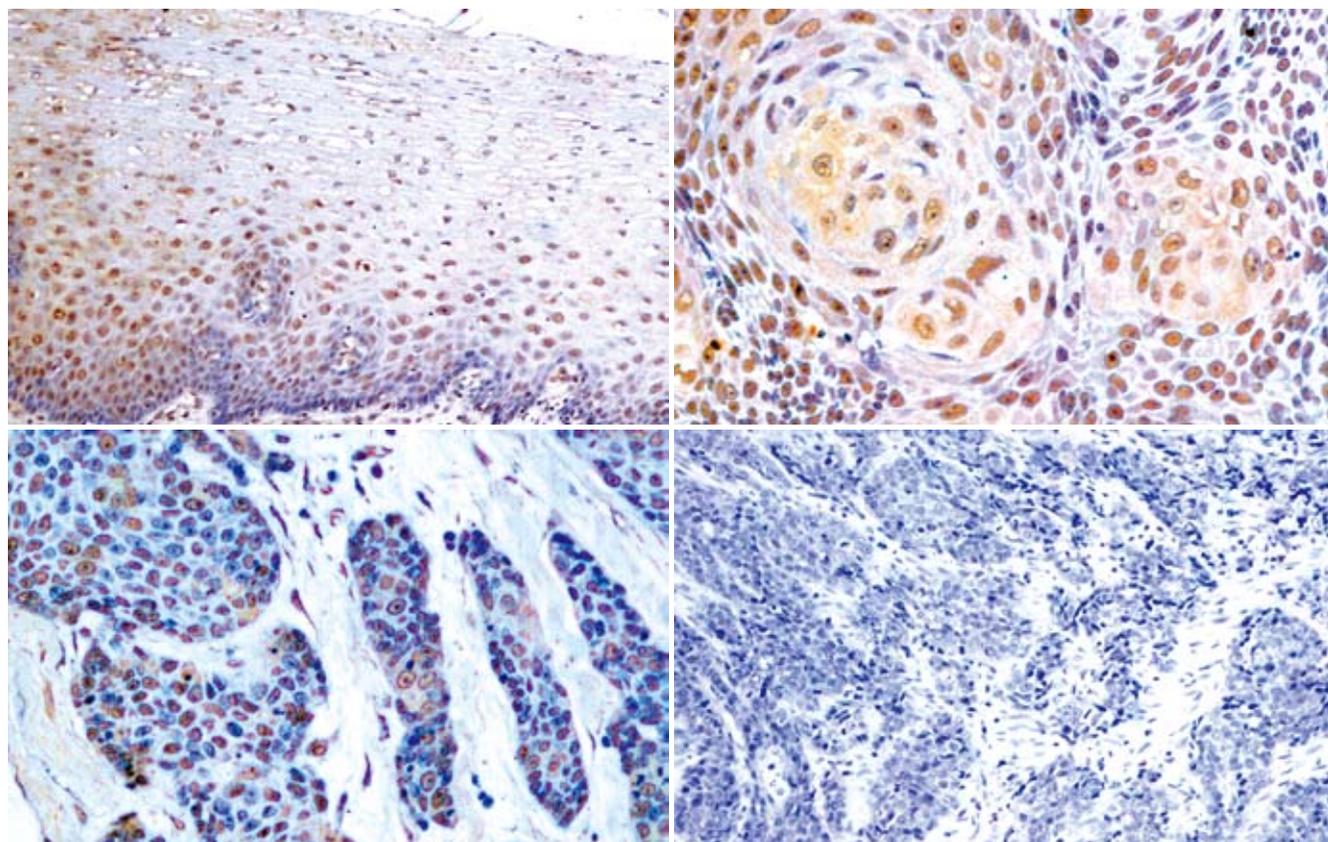
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年7月8日 第16卷 第19期 (Volume 16 Number 19)



19 / 2008

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcj@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
裘法祖教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
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

纪小龙教授
姜洪池教授
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
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升主任医师
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
白文元教授
苕新明教授
陈洪副教授
陈军贤主任医师
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈卫昌教授

陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马金城教授
马欣主任医师

毛高平主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴熙绪主任医师
朴云峰教授
秦成勇教授
曲智威副主任医师
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋于刚教授
孙富强副教授
孙侃教授
孙自勤教授
唐采白副教授
唐爱英教授
唐丽安教授
田德安主任医师
童强主任医师
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王吉耀教授
王莉瑛教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
吴萍主任医师
夏时海副教授
徐秀英副教授
许春舫主任医师
许乐主任医师
许亚平副教授
杨冬华教授
杨建民教授
杨希山教授
杨幼林主任医师
杨云生教授
杨昭徐教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
于红刚副教授
于晓峰主任医师
袁伟建教授
展玉涛副主任医师
张春清教授

张方信主任医师
张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授
邹晓平主任医师

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅廷亮教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授

龚建平教授
巩鹏教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
季加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

裘正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强教授
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭群友副教授
汤恢煊教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王要军教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐智教授

许戈良教授
严律南教授
严以群主任医师
杨广顺教授
杨维良教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于恩达教授
于健春教授
于良副教授
于则利教授
郁宝铭教授
郁正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德珩教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
党双锁副教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师

秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
唐霓副教授
唐世刚教授
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
杨林研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群研究员
黄恒青主任医师
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

白玉贤教授
曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬研究员
刘云鹏教授
马力文主任医师
吴晴教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

陈克敏教授
程红岩教授
褚建国主任医师
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
扬业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
刘海峰主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
倪才方教授
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授

刘鲁明教授
唐文富副主任医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员
高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授

梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赧宏研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周士胜教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
左国营副主任药师

消化病理学

杜祥教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
阎晓初副教授
易永芬教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2008年7月8日

第16卷

第19期

(总第243期)

述 评	2077 瘦素与肝纤维化关系及研究方法 刘勇钢, 卢建华
基础研究	2080 HBx基因下调p21对HepG2细胞增殖与凋亡的影响 郭晓榕, 程斌, 郑要初, 林松挺, 黎培员 2086 Tankyrase与端粒酶在大鼠肝癌发生中的表达变化 陈颖, 孔庆忠 2092 白藜芦醇下调小鼠非乙醇性脂肪性肝炎环氧合酶2的表达 肖虎, 张皎月, 郑涓 2097 非立磁标记猪骨髓间充质干细胞自体肝内移植的MR成像 方亮, 施晓雷, 丁义涛 2102 小檗碱对3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型PI-3K p85蛋白表达的影响 易屏, 陆付耳, 陈广, 徐丽君, 董慧, 王开富 2107 靶向5-LOX的siRNA诱导胰腺癌细胞的凋亡 张海峰, 周国雄, 丁晓凌, 沈勤, 杨江勇 2112 肠炎宁糖浆对内脏高敏感大鼠脑、脊髓CRF表达的影响 晁冠群, 吕宾, 孟立娜, 张烁, 张璐, 郭赞
临床研究	2119 S100A2基因及其蛋白在食管癌中的表达及其临床意义 尹玉, 张洪福 2125 散发性结直肠癌中hMSH2与PTEN的表达及临床意义 宋伟庆, 范占彬, 王辉, 袁虎方, 杨彦林, 王利伟, 韩彩丽
文献综述	2131 白介素21的生物学功能与炎症性肠病的研究进展 张峰, 张雪莉, 刘冬, 王伟, 柳巨雄 2137 TGF- β /CTGF在肠纤维化机制中的作用 安彩萍, 马晓芑, 吴焕淦, 刘慧荣, 施征 2144 苷类中药肠道细菌生物转化的研究进展 李咏梅, 李晓眠, 朱泽 2149 中医中药配合化疗治疗大肠癌术后患者的临床新进展 钱金方
研究快报	2154 IL-10对TGF- β 诱导的大鼠肝星状细胞CTGF表达的影响 杨悦杰, 黄芬, 胡静, 马力, 李智伟 2158 不同压力二氧化碳气腹对大鼠胃肠动力的影响 孟凌新, 牟峰, 朱玉梅 2161 HO-1 mRNA在砷暴露肝损伤小鼠肝组织中的表达 罗天永, 吴君, 张韵, 欧兵, 程明亮, 杨勤 2166 大鼠胰腺上皮内瘤变和胰腺癌模型血清蛋白质谱的差异表达 王磊, 刘海林, 廖萍, 王文静, 袁平 2171 卡巴胆碱对烫伤大鼠口服补液时小肠TNF- α 及水通道蛋白-1的影响 包呈梅, 胡森, 耿世佳, 吴静, 车晋伟, 田易军, 陆江阳, 武彦, 盛志勇
临床经验	2175 干扰素诱导抗病毒蛋白基因多态性与慢性丙型肝炎疗效的相关性 邹梦娜, 黄雁翔, 李卓, 马丽娜, 林尊慧, 郭向华, 曹振环, 陈新月

	<p>2181 早期误诊为肝性脑病患者的临床分析21例 隆莉, 张继万</p> <p>2184 终末期肝病肾脏损坏的临床与病理关系 董建平, 田国保, 谢雯, 张维燕, 张黔英, 曾争</p> <p>2188 遗传性胰腺炎临床和遗传特点分析13例 骆休, 吴志雄, 刘奇才, 陈志东</p> <p>2191 采用基因芯片技术筛选黑斑息肉综合征相关基因 戴益琛, 宋于刚, 谢军培, 曾伟</p>
病例报告	2195 小肠淋巴管扩张症合并病毒性肝炎2例 林香春, 吴静, 高炳霞, 沈文斌
致 谢	2198 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>2091 世界华人消化杂志网络版的发表前链接</p> <p>2096 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>2111 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>2118 世界华人消化杂志作者署名要求</p> <p>2130 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>2143 北京百世登生物医学科技有限公司第二期编辑培训纪要</p> <p>2153 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策</p> <p>2157 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>2160 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知</p> <p>2165 中华医学会第八次全国消化系疾病学术会议征文通知</p> <p>2170 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>2180 世界华人消化杂志正文要求</p> <p>2187 世界华人消化杂志被收录情况</p> <p>2194 PNS与WJG论坛会议-朱作言院士访问WJG纪实</p>
封面故事	尹玉, 张洪福. S100A2基因及其蛋白在食管癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2119-2124 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2119.asp
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2008-07-08
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣
总 编 辑 马连生
常务副总编辑 张海宁
编辑部主任 张海宁
期 刊 名 称 世界华人消化杂志
主 管 单 位 山西省科学技术厅
主 办 单 位 太原消化病研治中心

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
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

出版 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

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 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊. 《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://wcjd.wjgnet.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部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.

2008年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079**
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 **M 4481**

国内定价 每份24.00元 全年864.00元

广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

July 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 19

EDITORIAL	2077 Relationship between leptin and hepatic fibrosis and its research methodology <i>Liu YG, Lu JH</i>
BASIC RESEARCH	2080 Effects of down-regulation of <i>p21</i> by HBx gene on HepG2 cell proliferation and apoptosis <i>Guo XR, Cheng B, Zheng YC, Lin ST, Li PY</i> 2086 Expression alteration of tankyrase and telomerase in HCC development in rats <i>Chen Y, Kong QZ</i> 2092 Resveratrol down-regulates hepatic cyclooxygenase-2 expression in mice with nonalcoholic steatohepatitis <i>Xiao H, Zhang JY, Zheng J</i> 2097 <i>In vivo</i> MRI of autologous swine Feridex-labeled mesenchymal stem cells transplanted into liver <i>Fang L, Shi XL, Ding YT</i> 2102 Effects of berberine on PI-3K p85 protein expression in insulin-resistant cell model in 3T3-L1 adipocytes <i>Yi P, Lu FE, Chen G, Xu LJ, Dong H, Wang KF</i> 2107 Small interfering RNA targeted on 5-lipoxygenase induces apoptosis of pancreatic cancer cells <i>Zhang HF, Zhou GX, Ding XL, Shen Q, Yang JY</i> 2112 Effect of Changyanning Tangjiang on the expression of corticotropin releasing factor in spinal cord and brain of rats with visceral hypersensitivity <i>Chao GQ, Lv B, Meng LN, Zhang S, Zhang L, Guo Y</i>
CLINICAL RESEARCH	2119 Expression of S100A2 mRNA and protein and its clinical significance in esophageal cancer <i>Yin Y, Zhang HF</i> 2125 Expression of hMSH2 and PTEN protein in sporadic colorectal carcinoma and their clinical significances <i>Song WQ, Fan ZB, Wang Y, Yuan HF, Yang YL, Wang LW, Han CL</i>
REVIEW	2131 Advances in biological function of interleukin-21 and inflammatory bowel disease <i>Zhang F, Zhang XL, Liu D, Wang W, Liu JX</i> 2137 Roles of TGF- β /CTGF in intestinal fibrosis <i>An CP, Ma XP, Wu HG, Liu HR, Shi Z</i> 2144 Advances in biotransformation of glycosides from Chinese medicinal by human intestinal bacteria <i>Li YM, Li XM, Zhu Z</i> 2149 New clinical advances in treatment of postoperative large intestinal cancer through Chinese medicinal in combination with chemotherapy <i>Qian JF</i>
RAPID COMMUNICATION	2154 Effect of interleukin-10 on TGF- β_1 -induced CTGF expression in hepatic stellate cells <i>Yang YJ, Huang F, Hu J, Ma L, Li ZW</i> 2158 Effects of different intra-abdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum on gastrointestinal motility in rats <i>Meng LX, Mu F, Zhu YM</i> 2161 Expression of HO-1 mRNA in hepatic tissues in arsenic exposed mice <i>Luo TY, Wu J, Zhang Y, Ou B, Cheng ML, Yang Q</i> 2166 Differential expression of serum proteomic spectra in rat model of pancreatic intraepithelial neoplasia and dimethylbenzanthracene-induced pancreatic carcinoma <i>Wang L, Liu HL, Liao P, Wang WJ, Yuan P</i>

	2171 Effect of carbachol on expression of TNF- α and aquaporin-1 in small intestine during enteral resuscitation of scald injury in rats <i>Bao CM, Hu S, Geng SJ, Wu J, Che JW, Tian YJ, Lu JY, Wu Y, Sheng ZY</i>
CLINICAL PRACTICE	2175 Association between single nucleotide polymorphism of IFN-induced antiviral protein genes and curative effect of antiviral treatment in chronic hepatitis C patients <i>Zou MN, Huang YX, Li Z, Ma LN, Lin ZH, Guo XH, Cao ZH, Chen XY</i> 2181 Clinical analysis of 21 cases with early misdiagnosis as hepatic encephalopathy <i>Long L, Zhang JW</i> 2184 Relationship between clinical renal dysfunction and renal pathology in patients with end-stage liver disease <i>Dong JP, Tian GB, Xie W, Zhang WY, Zhang QY, Zeng Z</i> 2188 Clinical and hereditary characteristics of hereditary pancreatitis: an analysis of 13 cases <i>Luo X, Wu ZX, Liu QC, Chen ZD</i> 2191 Screening and annotation of genes associated with Peutz-Jeghers syndrome using gene chip technique <i>Dai YC, Song YG, Xie JP, Zeng W</i>
CASE REPORT	2195 Intestinal lymphangiectasia complicated by viral hepatitis: an analysis of 2 cases <i>Lin XC, Wu J, Gao BX, Shen WB</i>
ACKNOWLEDGMENT	2198 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Yin Y, Zhang HF.</i> Expression of S100A2 mRNA and protein and its clinical significance in esophageal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(19): 2119-2124 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2119.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date July 8, 2008

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

Taiyuan Research and Treatment Center
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of
Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan
030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wcjdnet.com

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese
Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wcjdnet.com
<http://www.wcjdnet.com>

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspa-
pers and Journals (Code No. 82-261)
China International Book Trading
Corporation PO Box 399, Beijing,
China (Code No. M4481)

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

RMB 24 Yuan for each issue
RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2008 Published by *WCJD*. All rights re-
served; no part of this publication may be
reproduced, stored in a retrieval system, or
transmitted in any form or by any means,
electronic, mechanical, photocopying, re-
cording, or otherwise without the prior per-
mission of *WCJD*. Authors are required to
grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal repre-
sent the viewpoints of the authors except
where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at
www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If
you do not have web access please contact
the editorial office.

Copyright © 2008 by Editorial Department
of *World Chinese Journal of Digestology*

瘦素与肝纤维化关系及研究方法

刘勇钢, 卢建华

刘勇钢, 天津市传染病医院; 天津市肝病研究所病理科 天津市 300192
卢建华, 石家庄市第五医院检验科 河北省石家庄市 050021
刘勇钢, 副主任医师, 主要从事肝纤维化方面的研究。
作者贡献分布: 刘勇钢与卢建华对此文所作贡献均等。
通讯作者: 刘勇钢, 300192, 天津市南开区苏堤路75号, 天津市传染病医院; 天津市肝病研究所病理科. lyg13602168512@yahoo.com.cn
电话: 022-27468193
收稿日期: 2008-04-21 修回日期: 2008-06-02
接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-07-08

Relationship between leptin and hepatic fibrosis and its research methodology

Yong-Gang Liu, Jian-Hua Lu

Yong-Gang Liu, Department of Laboratory Pathology, Tianjin Liver Disease Institute, Tianjin Infection Disease Hospital, Tianjin 300192, China
Jian-Hua Lu, Department of Laboratory, Shijiazhuang Fifth Hospital, Shijiazhuang 050021, Hebei Province, China
Correspondence to: Dr. Yong-Gang Liu, Department of Laboratory Pathology, Tianjin Liver Disease Institute, Tianjin Infection Disease Hospital, 75 Sudi Road, Nankai District, Tianjin 300192, China. lyg13602168512@yahoo.com.cn
Received: 2008-04-21 Revised: 2008-06-02
Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-07-08

Abstract

Leptin protein is closely related to hepatic fibrosis. Combining previous animal experiments and our study of leptin in liver tissues *in situ*, we hypothesized that leptin appearance in liver tissues *in situ* should be one of the important step in hepatic fibrosis process. Research methodology of leptin within hepatic fibrosis was also analyzed.

Key Words: Hepatic fibrosis; Leptin

Liu YG, Lu JH. Relationship between leptin and hepatic fibrosis and its research methodology. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2077-2079

摘要

瘦素与肝纤维化关系密切. 本文结合既往的动物实验以及作者对肝组织原位瘦素的研究, 推测肝脏原位瘦素的出现可能意味着肝纤维化进程启动的一个重要步骤, 并对瘦素研究方法进行分析.

关键词: 肝纤维化; 瘦素

刘勇钢, 卢建华. 瘦素与肝纤维化关系及研究方法. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2077-2079
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2077.asp>

0 引言

越来越多的证据表明, 瘦素与肝纤维化关系密切, 而肝纤维化是继发于各种形式慢性肝损伤之后组织修复过程中的代偿反应, 他也是慢性肝病发展为肝硬化必经的病理过程. 据世界卫生组织报道, HBV感染呈世界性流行, 全球约3.5亿人为慢性HBV感染者^[1]; 而全球HCV的平均感染率约为3%, 约1.7-2.0亿人感染HCV^[2]. 大量慢性HBV及HCV感染者经肝纤维化逐渐加重最终进展为肝硬化并导致死亡^[3]. 故深入研究瘦素与肝纤维化并确立合适的研究方法意义重大.

1 瘦素概述

瘦素是由ob基因编码的蛋白质类激素, 由167个氨基酸残基组成, 分子质量为16 kDa^[4]. 通常认为瘦素主要由脂肪细胞表达, 后有研究发现胎盘和胃组织内可产生瘦素^[5-6], 近年卢建华 *et al*发现慢性乙型肝炎患者肝组织可有瘦素表达, 且与肝组织脂肪变性未见相关性^[7]. 而肝内非脂肪细胞产生的瘦素与肝纤维化的关系密不可分.

2 瘦素与肝纤维化相关的动物实验证据

Potter *et al*^[8]对大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)体外培养达14 d以上时, 应用RT-PCR及激光共聚焦技术分析, 发现有瘦素mRNA和蛋白表达, 而HSC对于肝脏细胞外基质合成及肝纤维化发生起着重要作用. 在对正常大鼠、ob/ob小鼠(由于编码瘦素基因第105位氨基酸-精氨酸的密码子变成终止密码子, 故出现瘦素合成障碍)和Zucker大鼠(瘦素受体ob-R缺乏)的动物实验研究表明瘦素与肝纤维化过程密切相关. Otte *et al*^[9]以苯巴比妥和递增CCl₄剂量来诱导大鼠肝纤维化、肝硬化模型. 用半定量RT-PCR检测瘦素及其受体的mRNA, 其蛋白的表达以Western

■背景资料

HBV、HCV感染呈世界性流行并部分导致肝病慢性化, 大量慢性肝病患者经肝纤维化逐渐加重最终进展为肝硬化并导致死亡, 故深入研究肝纤维化并确立合适的研究方法意义重大.

■同行评议者

余宏宇, 教授, 中国人民解放军第二军医大学第二附属医院长征医院病理科; 范建高, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心

■创新盘点

本文结合既往的动物实验以及作者对肝组织原位瘦素的研究,推测肝脏原位瘦素的出现可能意味着肝纤维化进程启动的一个重要步骤,慢性乙型肝炎患者肝纤维化的发生可能存在“n+瘦素”的机制。

blot蛋白印迹分析测定,瘦素及其受体的定位用免疫组化检测。结果表明正常的肝组织不表达瘦素,但有其受体的mRNA表达;在纤维化、硬化的肝脏中,随肝纤维化程度的增加,瘦素mRNA及瘦素蛋白水平不断升高,而瘦素受体mRNA及蛋白的表达未显著改变。Honda *et al*^[10]针对ob/ob小鼠给予硫代乙酰胺(TAA),结果8 wk后几乎没有发生肝纤维化,肝组织中的 $\alpha 1(I)$ 前胶原mRNA以及TGF $\beta 1$ mRNA的表达亦明显受到抑制。Potter *et al*^[11]发现瘦素缺乏的ob/ob鼠注射CCl₄时肝纤维化程度轻微,其后外源性给予瘦素时则发生纤维化。但对C57BL/6小鼠实验^[12]表明,单独给予瘦素时肝组织无明显病理改变,而同时注射瘦素比较单独注射CCl₄时,明显增强了前者肝星状细胞活化和细胞外基质的合成。Ikejima *et al*^[13]以ob-R缺乏Zucker大鼠建立TAA肝纤维化模型,正常大鼠为对照组,发现正常肝脏不产生瘦素,但在TAA诱导的肝纤维化期间活化的HSC产生瘦素;在Zucker大鼠, TAA诱导的肝纤维化几乎完全被阻止; I型前胶原、TGF- $\beta 1$ mRNA水平较低, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达显著减少。Sakaida *et al*^[14]应用猪血清诱导Zucker大鼠肝纤维化,结果发现对照组在注射猪血清8 wk后出现肝纤维化, Zucker大鼠纤维化程度极其轻微;与正常对照组比较, Zucker大鼠 $\alpha 1(I)$ 胶原mRNA和 α -SMA表达显著减少。

3 肝病临床的瘦素血清学研究

在这方面成功的血清学肝纤维化研究是很有限的。Lin *et al*^[15]观察了26例男性肝硬化患者和25例健康对照者,肝硬化组体脂量和血清白蛋白均低于对照组,但肝硬化组血清瘦素(酶免法)显著升高于对照组(均值6.0对3.4 g/L, $P < 0.01$)。García-Suárez *et al*^[16]用RIA法检测30例原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者及29名年龄、体质量配对的正常人的血清瘦素水平,发现随PBC组织学分期的加重,瘦素水平显著增加。

4 大多数血清瘦素方面的研究困惑

Testa *et al*^[17]分析了40例慢性病毒性肝炎与52例肝硬化患者血清瘦素水平,发现虽然肝硬化组血清瘦素水平明显高于慢性肝炎组($P < 0.05$),但令人困惑的是,上述两组瘦素水平却均低于对照组($P < 0.01$),仅女性肝硬化患者血清瘦素高于对照组($P < 0.05$)。Piche *et al*^[18]观察了77例慢性丙型肝炎(CHC)患者与22例健康对照者血清瘦素水平,发现无论是CHC组还是对照组,女性血清瘦素水平

均较高。

由于影响血清瘦素的因素更多是非肝脏来源的,故肝纤维化瘦素血清学研究存在很大的障碍和局限性。Giannini *et al*^[19]对16例腹水为漏出液的失代偿性肝硬化患者测定腹水、血清瘦素水平,发现腹水及血清瘦素均与患者体质量指数(BMI)及体脂肪(BF)有相关性,而与肿瘤坏死因子 α (TNF- α)无相关性,提示肝硬化患者血清瘦素与腹水瘦素水平是由机体的代谢状况所决定的。而Comlekci *et al*^[20]认为血清瘦素水平无论男女,均仅与身体脂肪百分比(BFP)及身体脂肪量(BFM)有显著相关。

5 病毒性肝炎患者肝组织原位瘦素及血清学

卢建华 *et al*^[7,21]通过肝脏原位瘦素检测,发现慢性乙型肝炎患者肝组织多数有瘦素表达(42/72),而非活动性HBsAg携带者肝组织很少有瘦素表达(2/34),两组间瘦素表达差异有统计学意义($P < 0.01$),且肝脏瘦素表达与肝脏脂肪变性未见相关性;在慢性乙型肝炎患者肝组织中,可见活化的肝星状细胞表达瘦素(经免疫组化双重染色证实)。在对54例进行了人体测量学指标收集的慢性乙型肝炎患者(其中男性患者中,低体质指数组2例,正常体质指数组28例,高体质指数组14例,超高体质指数组2例;女性患者中,正常体质指数组8例),同时进行了血清瘦素(ELISA法)和肝组织原位瘦素检测,发现健康体质量组女性血清瘦素显著高于男性低体质指数组、正常体质指数组或高体质指数组的血清瘦素水平($P < 0.05$);而在男性低体质指数组、正常体质指数组(BMI < 25)、高体质指数组、超高体质指数组,血清瘦素水平逐渐升高,且这三组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。同时为避免性别与体脂量对血清瘦素检测值的影响,对上述54例慢性乙型肝炎患者中的30例BMI < 25 男性患者血清与肝组织瘦素检测结果进行比较,发现肝组织瘦素阳性17例血清瘦素水平为 7.38 ± 6.46 pg/L,阴性13例血清瘦素水平为 5.14 ± 4.77 pg/L($P > 0.05$)。

6 瘦素研究方法中可能出现的误区

很多证据已表明,血清瘦素主要受性别和体脂量影响,而且性别可能是同等体质指数下决定体脂量的重要因素,故没有人体测量学记录的血清瘦素研究中,统计数据分类将处于混乱状态。从目前的经验来看,单纯的血清瘦素研究是评判患者体脂量多少及变化情况的较好指标,但若研究肝纤维化时,建议结合肝组织原位瘦

素研究以便达到研究目的. 在卢建华 *et al*的研究中, 未见到慢性乙型肝炎患者肝脏瘦素表达与肝脏脂肪变性之间的相关性, 而肝组织瘦素原位表达部位可见活化的肝星状细胞表达瘦素(经免疫组化双重染色证实), 在卢等的研究经验中认为, 简单地把肝组织脂肪变性与肝组织原位瘦素联系起来, 尤其是在研究的初始阶段, 会把研究者带入思路陷阱.

7 结论

肝组织原位瘦素与肝纤维化关系密切, 推测肝组织原位瘦素可能是肝纤维化形成中的一个重要环节. 在肝纤维化研究方面, 瘦素是一个非常重要的研究指标之一, 且研究方法应侧重于肝组织原位瘦素研究, 也可辅以血清对照研究; 单纯的血清瘦素研究不适于肝纤维化研究; 而没有人体测量学的血清瘦素研究是不可取的. 在结合既往的动物实验以及现有的肝组织原位瘦素研究, 卢建华 *et al*推测肝脏原位瘦素的出现可能意味着肝纤维化进程启动的一个重要步骤, 慢性乙型肝炎患者肝纤维化的发生可能存在“n+瘦素”的机制. 即当仅有外源性瘦素而无“n”条件时, 不能启动肝纤维化(如非活动性HBsAg携带者); 当具备“n”条件时, 肝组织会有原位瘦素产生并在局部发挥作用可推进肝纤维化进程(如慢性乙型肝炎患者), 此时外源性瘦素可以恢复(如ob/ob鼠)或增强(如C57BL/6小鼠)纤维化进程.

8 参考文献

- World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 204 dex, 2000-10, cited 2008-04; 1(1): 24 screens. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/in.html>
- Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004; 24 Suppl 2: 3-8
- Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-538
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3: 1029-1033
- Bado A, Lévassieur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998; 394: 790-793
- 卢建华, 刘勇钢, 郎振为, 刘玉珍, 侯军良, 段毅力, 梅志勤, 叶立红. 慢性乙型肝炎患者肝组织瘦素的表达. *中华传染病杂志* 2007; 25: 177-178
- Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 178-182
- Otte C, Otte JM, Strodthoff D, Bornstein SR, Fölsch UR, Mönig H, Kloehn S. Expression of leptin and leptin receptor during the development of liver fibrosis and cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004; 112: 10-17
- Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002; 36: 12-21
- Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 2003; 38: 281-288
- Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001; 34: 288-297
- Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 1399-1410
- Sakaida I, Jinhua S, Uchida K, Terai S, Okita K. Leptin receptor-deficient Zucker (fa/fa) rat retards the development of pig serum-induced liver fibrosis with Kupffer cell dysfunction. *Life Sci* 2003; 73: 2491-2501
- Lin SY, Wang YY, Sheu WH. Increased serum leptin concentrations correlate with soluble tumour necrosis factor receptor levels in patients with cirrhosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57: 805-811
- García-Suárez C, Crespo J, Fernández-Gil PL, Amado JA, García-Unzueta MT, Pons Romero F. [Plasma leptin levels in patients with primary biliary cirrhosis and their relationship with degree of fibrosis] *Gastroenterol Hepatol* 2004; 27: 47-50
- Testa R, Franceschini R, Giannini E, Cataldi A, Botta F, Fasoli A, Tenerelli P, Rolandi E, Barreca T. Serum leptin levels in patients with viral chronic hepatitis or liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 33-37
- Piche T, Vandebos F, Abakar-Mahamat A, Vanbiervliet G, Barjoan EM, Calle G, Giudicelli J, Ferrua B, Laffont C, Benzaken S, Tran A. The severity of liver fibrosis is associated with high leptin levels in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004; 11: 91-96
- Giannini E, Romagnoli P, Tenconi GL, Botta F, Malfatti F, Chiarbonello B, Mamone M, Barreca T, Testa R. High ascitic fluid leptin levels in patients with decompensated liver cirrhosis and sterile ascites: relationship with TNF-alpha levels. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 275-280
- Comlekci A, Akpınar H, Yesil S, Okan I, Ellidokuz E, Okan A, Ersoz G, Tankurt E, Batur Y. Serum leptin levels in patients with liver cirrhosis and chronic viral hepatitis. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 779-786
- 卢建华, 赵文伟, 段毅力, 刘勇钢, 钱静. 病毒性肝炎合并肝组织脂肪变性患者肝组织瘦素表达研究. *河北医药* 2007; 29: 676-677

同行评价

本文文献收集全面新颖, 分析总结客观, 文笔和归纳较好, 具有较好的学术价值.

HBx基因下调*p21*对HepG2细胞增殖与凋亡的影响

郭晓榕, 程斌, 郑要初, 林松挺, 黎培员

■背景资料

乙肝病毒x可通过反式活化作用等调控宿主细胞基因表达, 影响细胞信号转导、细胞增殖与分化等参与乙肝相关性肝癌的发生发展, 但其确切机制尚未完全阐明, 从分子水平探讨其发生机制有利于指导其临床防治。

郭晓榕, 程斌, 郑要初, 林松挺, 黎培员, 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

郭晓榕, 2006年华中科技大学同济医学院硕士, 主要从事消化系统肿瘤研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30570821

作者贡献分布: 郭晓榕与郑要初对此文所作贡献均等; 此课题由程斌设计; 研究过程由郭晓榕, 郑要初, 黎培员及林松挺完成; 研究所用新试剂及分析工具由程斌提供; 数据分析由郭晓榕与郑要初完成; 本论文写作由郭晓榕与程斌完成。

通讯作者: 程斌, 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。

b.cheng@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83663612 传真: 027-83646605

收稿日期: 2008-04-02 修回日期: 2008-04-30

接受日期: 2008-05-05 在线出版日期: 2008-07-08

Effects of down-regulation of *p21* by HBx gene on HepG2 cell proliferation and apoptosis

Xiao-Rong Guo, Bin Cheng, Yao-Chu Zheng, Song-Ting Lin, Pei-Yuan Li

Xiao-Rong Guo, Bin Cheng, Yao-Chu Zheng, Song-Ting Lin, Pei-Yuan Li, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Science Foundation of China, No. 30570821

Correspondence to: Dr. Bin Cheng, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, China. b.cheng@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2008-04-02 Revised: 2008-04-30

Accepted: 2008-05-05 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To establish gene-transfected cell strain HepG2/HBx and study the effect of HBx on cell cycle, proliferation and apoptosis of HepG2 cells as well as the potential regulative role of *p21*.

METHODS: HBx was transfected into HepG2 cells and G418 selection was used to obtain the positive clones of HepG2/HBx cells. Then HBx mRNA expression and protein expression were detected using RT-PCR and western blot analysis respectively. MTT assay and flow cytometry were adopted to measure the proliferation, cell cycle and apoptosis of HepG2/HBx, HepG2 and HepG2/pcDNA3.1 (HepG2 cells transfected with pcDNA3.1) cells. Semi-quantified RT-PCR

was used to evaluate the expression of *p21* and *p53* in three groups.

RESULTS: The expression of mRNA and protein of HBx in HepG2/HBx cells was confirmed by RT-PCR and western blot respectively. The proliferation of HepG2/HBx cells was accelerated. The proportion of HepG2/HBx cells decreased significantly in G₀/G₁ phase (43.34% ± 3.11% vs 57.69 ± 4.28%, *P* < 0.01), but increased remarkably in S phase (28.69% ± 1.17% vs 22.41% ± 1.99%, *P* < 0.05) and the apoptosis rate of HepG2/HBx cells was at a significantly lower level (1.19% ± 0.06% vs 5.43% ± 0.42%, *P* < 0.001). Compared with HepG2 and HepG2/pcDNA3.1 cells, the expression of *p21* mRNA in HepG2/HBx was down-regulated (0.16 ± 0.05 vs 0.78 ± 0.15, *P* < 0.001), while there was no significant difference in the expression of *p53* gene.

CONCLUSION: The HBx gene down-regulates the expression of *p21* mRNA, which may play an important role in accelerating cell cycle, improving growth and inhibiting apoptosis of HepG2 cells.

Key Words: HBx gene; *p21*; *p53*; HepG2 cells; MTT assay; Flow cytometry; Western blot; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Guo XR, Cheng B, Zheng YC, Lin ST, Li PY. Effects of down-regulation of *p21* by HBx gene on HepG2 cell proliferation and apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2080-2085

摘要

目的: 构建转基因细胞模型HepG2/HBx, 观察HBx基因对HepG2细胞增殖、周期和凋亡的影响, 探讨细胞周期蛋白P21在其中的作用和意义。

方法: 应用脂质体转染和G418筛选构建稳定表达HBx的转基因细胞HepG2/HBx, RT-PCR和Western blot鉴定HBx mRNA与蛋白的表达。分别以四唑蓝(MTT)比色法、流式细胞术检测HepG2/HBx细胞及对照组HepG2与HepG2/pcDNA3.1细胞(转染空载体pcDNA3.1的HepG2细胞)的增殖、周期和凋亡。另半定

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普外科

量RT-PCR检测各组细胞中细胞周期蛋白P21与抑癌基因*p53* mRNA的表达。

结果: HepG2/HBx细胞中有HBx mRNA和蛋白的表达。HepG2/HBx细胞生长速度加快。HepG2/HBx中G₀/G₁期细胞比例较对照组显著减少(43.34%±3.11% vs 57.69±4.28%, $P<0.01$), S期细胞比例明显增加(28.69%±1.17% vs 22.41%±1.99%, $P<0.05$), 同时还发现与对照组相比其凋亡率也显著降低(1.19%±0.06% vs 5.43%±0.42%, $P<0.001$)。细胞周期蛋白*p21* mRNA在HepG2/HBx细胞中的表达较对照组细胞显著降低(0.16±0.05 vs 0.78±0.15, $P<0.001$), 而*p53*表达则无显著变化。

结论: HBx基因可下调细胞周期蛋白P21 mRNA的表达, 可能参与HBx基因加速HepG2细胞周期进程、促进细胞增殖以及抑制细胞凋亡的作用。

关键词: HBx基因; *p21*; *p53*; HepG2细胞; 四唑蓝比色法; 流式细胞术; 免疫印迹; 逆转录-聚合酶链反应

郭晓榕, 程斌, 郑要初, 林松挺, 黎培员. HBx基因下调*p21*对HepG2细胞增殖与凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2080-2085

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2080.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)慢性感染与原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生密切相关^[1-2]。乙肝病毒x(hepatitis B virus x protein, HBx)蛋白具有多种生物学功能, 可与宿主细胞的多种蛋白相互作用, 调控宿主细胞基因表达, 进而影响宿主细胞的信号转导、细胞增殖与分化等, 其对肝细胞周期与凋亡的影响是HBV致HCC发生的重要机制之一^[3-4]。*p21*是一种通用的细胞周期依赖性激酶抑制剂, 可控制细胞周期G₁/S调控点, 抑制细胞增殖; *p53*是一种重要的抑癌基因, 可参与细胞周期蛋白的调控^[5-9]。因此, 研究HBx基因对细胞周期及凋亡的影响及可能的调控机制有助于阐明乙肝相关性肝癌的发生机制。我们通过脂质体转染构建稳定表达HBx的转基因细胞模型HepG2/HBx, 观察HBx基因对HepG2细胞周期及凋亡的影响, 探讨细胞周期相关基因*p21*与*p53*在HBx致乙肝相关性肝癌发生机制中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞系HepG2为本实验室保存细

胞株, 重组质粒pcDNA3.1(+)/v5-hisB-HBx由上海中国人民解放军第二军医大学遗传研究所何晓文教授惠赠; DH5 α 由西班牙Navarra大学癌症基因研究所钱程教授提供; Effectene转染试剂盒(invitrogen); 聚合酶等(TaKaRa); 鼠mAb(ABCam)。Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒为宝灵曼公司产品。HBx、*p21*、*p53*及内参 β -actin引物均由上海Sangon生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 HepG2细胞的转染与筛选: 重组质粒pcDNA3.1(+)/v5-hisB-HBx经酶切、PCR及测序鉴定后按Effectene说明书进行转染操作, 48 h后用含500 mg/L G418的选择培养基筛选阳性克隆, 挑取克隆扩大培养并将G418浓度减至250 mg/L维持筛选, 以获取稳定表达HBx的转基因细胞株HepG2/HBx, 实验设空白对照组为HepG2细胞与空载体对照组HepG2/pcDNA3.1细胞(转染pcDNA3.1的HepG2细胞)。

1.2.2 转基因细胞株HepG2/HBx的鉴定: RT-PCR检测HBx mRNA的表达: 提取各组细胞总RNA逆转录生成cDNA, 取2 μ L cDNA作模板扩增HBx基因片段, HBx基因上游引物为: 5'-CGGAATTCCGATGGCTGCTAGGCTGTG-3', 下游引物为: 5'-CCCTCGAGGGGTTGCATGGTGCTGGT-3', 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C预变性10 min, 94 $^{\circ}$ C变性45 s, 52 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 扩增30个循环, 20 g/L琼脂糖凝胶电泳后成像观察。Western blot检测HBx蛋白的表达: 以细胞裂解液充分裂解各组细胞, 100 $^{\circ}$ C加热5 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心2 min, 吸上清上样后行SDS-PAGE电泳, 半干转印于NC膜上, 室温封闭1 h, 加入鼠单克隆第一抗体, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 加入羊抗鼠的第二抗体, 室温孵育1 h, 采用Odyssey双色红外激光成像系统检测。

1.2.3 MTT法检测细胞的增殖活性: 各组细胞消化后制成单细胞悬液, 以 1×10^4 细胞/孔接种于96孔板, 共4板, 各设6复孔, 另设一空白对照孔。培养24 h后, 取出1板每孔加MTT溶液(5 g/L)20 μ L, 置培养箱继续培养4 h, 吸弃孔内上清液, 每孔加入150 μ L的DMSO, 振摇15 min后在490 nm波长下分别测定各孔吸光度(A值), 取其均数作为本次A值的计数值。培养48、72、96 h后再重复上述步骤, 以时间为横轴, A值为纵轴绘制各组细胞生长曲线图。

1.2.4 PI染色法检测细胞周期分布: 收集3组对数

■ 研发前沿

*p21*是一种细胞周期依赖性激酶抑制因子, 可控制细胞周期G₁/S调控点, 抑制细胞增殖。HBx基因对肝细胞周期与增殖的影响是乙肝相关性肝癌发生的重要机制之一, *p21*在HBx致肝细胞癌发生机制中的作用尚不清楚。

■创新盘点

本研究采用RT-PCR技术在HBx转基因细胞HepG2/HBx中证实HBx基因可能通过下调细胞周期蛋白P21表达参与加速HepG2细胞周期进程、促进细胞增殖、抑制细胞凋亡,有助于从分子水平了解乙肝相关性肝癌的发生机制。

表 1 *p21*、*p53*与 β -actin的引物序列

基因	引物序列	PCR扩增片段(bp)	反应条件	ID
β -actin	5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3'	404	94℃变性5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环30次; 72℃延伸10 min	60
	5'-ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC-3'			
<i>p21</i>	5'-TTG ATT AGC AGC GGA ACA-3'	270	94℃变性5 min; 94℃ 60 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环28次; 72℃延伸5 min	1026
	5'-TAC AGT CTA GGT GGA GAA ACG-3'			
<i>p53</i>	5'-GCG CAC AGA GGA AGA GAA TC-3'	501	94℃变性5 min; 94℃ 60 s, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环30次; 72℃延伸7 min	7157
	5'-GGC CAA CTT GTT CAG TGG AG-3'			

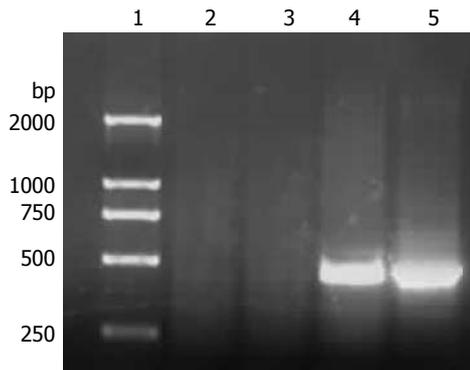


图 1 RT-PCR鉴定HepG2/HBx中HBx mRNA的表达. 1: Marker DL2000; 2: HepG2; 3: HepG2/pcDNA3.1; 4: LHepG2/HBx; 5: pcDNA3.1/HBx.

生长期的细胞, 每个样本细胞总数为 2×10^6 , 加入 -20°C 750 mL/L乙醇固定过夜, 取出离心后PBS重悬, 300目尼龙网过滤, 加入10 g/L Rnase 37℃孵育15 min, 再加入碘化丙锭(PI)避光染色30 min, 采用美国BD公司FACSort型流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.2.5 Annexin V/PI标记法检测细胞凋亡: 分别收集上述三组细胞制成单细胞悬液, 每个样本细胞总数为 1×10^5 , 离心弃去培养液, 按Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒说明进行操作, 美国BD公司FACSort型流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.6 RT-PCR半定量检测*p21*与*p53* mRNA表达: TRIzol法提取HepG2/HBx、HepG2/pcDNA3.1以及HepG2细胞总RNA, 各取5 μg 逆转录为cDNA. 以2 μL cDNA为模板, 行PCR扩增*p21*与*p53*基因片段与内参 β -actin, 各基因片段引物设计以及扩增条件见表1. 15 g/L琼脂糖凝胶电泳后成像观察并进行灰度分析, 所有测量重复3次, 取其平均值, 以*p21*、*p53*与 β -actin的灰度比值作为*p21*与*p53*的相对表达量。

统计学处理 数据采用mean \pm SD表示. 运用SPSS13.0软件来进行统计学处理, 组间采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

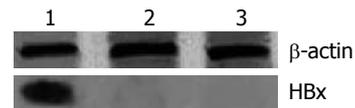


图 2 Western blot鉴定HepG2/HBx中HBx蛋白的表达. 1: HepG2/HBx; 2: HepG2/pcDNA3.1; 3: HepG2.

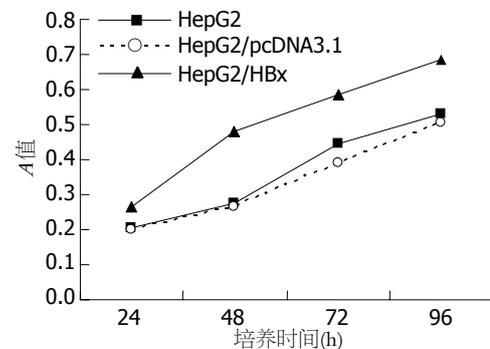


图 3 HepG2/HBx、HepG2/pcDNA3.1与HepG2细胞生长曲线。

2 结果

2.1 HBx基因表达的鉴定 RT-PCR显示, HepG2/HBx细胞与重组质粒pcDNA3.1/HBx可见长465 bp的HBx条带, 而空白对照组HepG2细胞与空载体对照组HepG2/pcDNA3.1细胞均未见HBx条带(图1); Western blot显示实验组可见HBx蛋白表达条带, 而空白及空载体对照组则显示HBx蛋白表达条带(图2). 表明稳定表达HBx的转基因细胞株HepG2/HBx构建成功。

2.2 细胞增殖 MTT法检测各组细胞A值发现, HepG2/pcDNA3.1与HepG2细胞生长速度基本一致, 而HepG2/HBx细胞在48、72、96 h各时间点的A值均明显高于对照组HepG2/pcDNA3.1细胞和HepG2细胞($P < 0.001$), 提示转染HBx基因后的HepG2细胞生长速度明显加快(图3), 表明HBx可能对HepG2细胞具有促增殖作用。

2.3 细胞周期分布 经PI染色法流式细胞术检测发现, 与对照组HepG2/pcDNA3.1和HepG2细胞相比, 转染HBx基因后的HepG2/HBx细胞 G_0/G_1

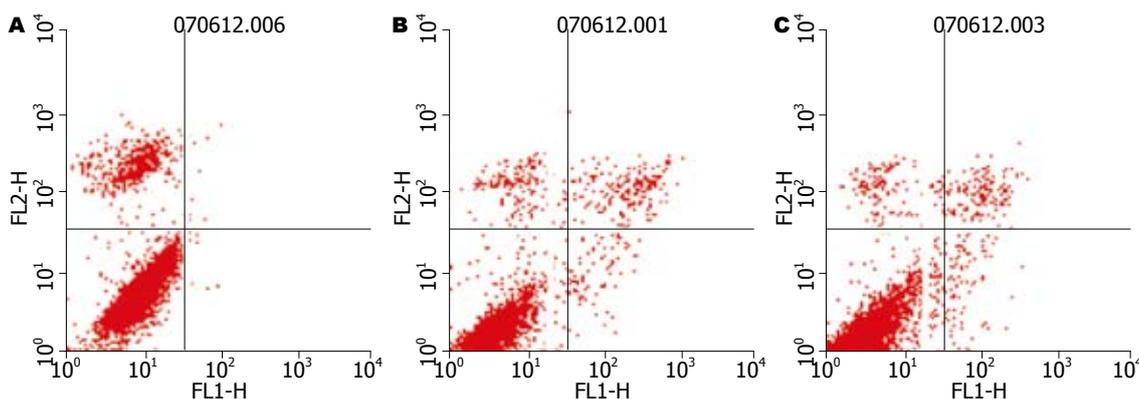


图 4 HBx基因对HepG2细胞凋亡的影响. A: HepG2/HBx; B: HepG2/pcDNA3.1; C: HepG2.

应用要点
 本研究发现HBx通过下调p21表达促进HepG2细胞增殖、抑制细胞凋亡,为深入探讨HBx致肝细胞恶性转化和癌变机制提供了理论基础.

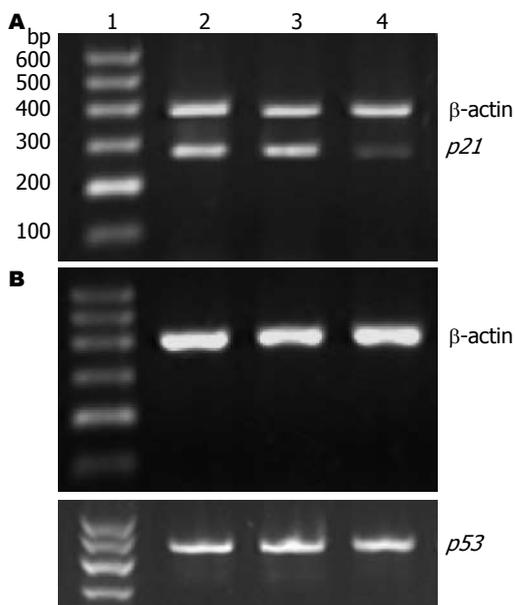


图 5 HBx基因对HepG2细胞p21 mRNA和p53 mRNA表达的作用. A: p21 mRNA; B: p53 mRNA. 1: DNA marker; 2: HepG2; 3: HepG2/pcDNA3.1; 4: HepG2/HBx.

表 2 HBx基因对HepG2细胞周期的影响 (mean ± SD, %)

分组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
HepG2/HBx	43.34 ± 3.11 ^a	28.69 ± 1.17 ^a	27.96 ± 4.06 ^a
HepG2/ pcDNA3.1	54.99 ± 1.88	23.04 ± 3.36	18.61 ± 1.40
HepG2	57.69 ± 4.28	22.41 ± 1.99	19.91 ± 2.60

^aP<0.05 vs 对照组.

期细胞比例明显减少($P = 0.004$), S期和G₂/M期细胞比例显著增多(S期: $P = 0.032$; G₂/M期: $P = 0.015$), 而HepG2/pcDNA3.1与HepG2细胞的细胞周期分布情况则无明显差异($P > 0.05$, 表2), 表明HBx基因可促进G₀/G₁期细胞向S期和G₂/M转化, 具有加速细胞周期进程的作用.

2.4 细胞凋亡 经Annexin V/PI标记法流式细胞术检测发现, 转染HBx基因后的HepG2/HBx细胞凋亡率为1.19% ± 0.06%, 与两对照组HepG2/pcDNA3.1细胞(4.91% ± 0.18%)和HepG2细胞(5.43% ± 0.42%)相比显著降低($P < 0.001$), 差异有统计学意义, 而后两者间无显著差异($P > 0.05$), 显示HBx具有抑制细胞凋亡的作用(图4).

2.5 细胞周期相关基因p21、p53 mRNA表达的变化 p21基因与β-actin基因RT-PCR共扩增, 结果

显示, 转染HBx的HepG2/HBx细胞p21 mRNA的表达(0.16 ± 0.05)较对照组HepG2(0.78 ± 0.15)与HepG2/pcDNA3.1(0.69 ± 0.21)细胞明显降低(图5A), 差异有统计学意义($P < 0.001$), 提示HBx可下调p21基因mRNA的表达. p53基因与β-actin基因RT-PCR共扩增的结果发现, HepG2/HBx细胞p53基因的表达(0.76 ± 0.13)与对照组HepG2(0.73 ± 0.21)和HepG2/pcDNA3.1(0.81 ± 0.09)细胞相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(图5B), 表明HBx对p53 mRNA的表达无明显影响.

3 讨论

HBx基因是HBV基因组中最小的开放读码框, 其所编码的HBx蛋白可作为反式激活因子激活多种信号转导通路, 如Ras、MAPK、PI3K-Akt、Src、JAK/STAT、Notch/Jagged、NF-κB^[10-20], 影响细胞增殖、周期和凋亡, 参与肝细胞的恶性转化与癌变^[21-28]. Benn *et al*的研究发现, HBx基因可下调Chang氏肝细胞的G₁/S和G₂/M检测点状态, 促进细胞增殖, 并增强肝癌细胞的抗凋亡能力, 这可能是肝癌细胞呈现较强恶性表型的机制之一^[29]. 新近研究发现转染HBx基因的HepG2细胞对紫外线损伤更加敏感, 凋亡率增加, 细胞周期阻滞于G₂/M期^[30]. 为进一步探讨HBx蛋白在HCC发生中的作用机制, 本课题特构

■同行评价

本研究技术路线明确,方法先进,图表清晰,结论可靠,具有一定的科学性。

建稳定表达HBx的转基因细胞株HepG2/HBx,首先观察HBx基因对HepG2细胞增殖、周期和凋亡的影响,结果发现转染HBx基因的HepG2/HBx细胞生长速度明显高于对照组HepG2与HepG2/pcDNA3.1细胞,表明HBx可促进HepG2细胞的增殖.流式细胞术检测结果显示HepG2/HBx细胞G₀/G₁期细胞比例显著减少,S期和G₂/M期细胞比例明显增多,提示HBx可促进G₀/G₁期细胞向S期和G₂/M转化,加速细胞周期进程.同时我们还通过Annexin V/PI标记法流式细胞术观察细胞凋亡,发现HepG2/HBx细胞凋亡率较两对照组细胞显著降低,提示HBx可抑制HepG2细胞的凋亡.因此,我们在HepG2细胞进行的HBx转基因研究再次证实了HBx可加速细胞周期进程、抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,这与国内外文献报道基本一致^[29-30].

*p21*是一种通用的细胞周期依赖性激酶抑制剂,可与所有的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK2、4、6)复合物相结合,控制细胞周期G₁/S调控点,抑制细胞增殖,在肿瘤的发生发展过程中起着重要作用.新近研究发现,P21蛋白的表达存在P53依赖性和非P53依赖性两条调节途径.国内彭绍华 *et al*应用免疫组织化学法检测HCC组织中HBx蛋白和P21蛋白的表达发现,HBx蛋白表达的增高伴随着P21蛋白表达的下降,表明HBx蛋白可下调P21蛋白的表达^[31].晚近也有研究表明,HBx还可通过不依赖P53的途径调节P21蛋白的表达.Ahn *et al*^[32]报道表明,P53反应元件位于人*p21*启动子的转录起始位点上方-2285和-1394位置,而HBx抑制*p21*启动子位点位于转录起始位点上方-63和-21位置.P53蛋白是目前认为与肿瘤发生密切相关的抑癌基因之一,主要在细胞核内发挥作用,Diao *et al*发现,在人类原代培养的肝细胞中,HBx蛋白可抑制Fas介导的细胞凋亡,在缺乏P53蛋白的红白血病细胞中,HBx蛋白也可抑制Fas介导的细胞凋亡,这种抑制作用与依赖SEK1的SAPK/JNK信号传导通路有关,而与P53蛋白无关^[33].Lee *et al*发现HBx蛋白可激活PI3K,通过PI3K-Akt-Bad信号传导通路,抑制Caspase3的活性,最终抑制细胞的凋亡,这种抑制作用也与P53蛋白无关^[34].

我们在HBx转基因细胞证实HBx可加速细胞周期进程、抑制细胞凋亡的基础上,进一步通过RT-PCR检测了HepG2/HBx与HepG2/pcDNA3.1和HepG2细胞中细胞周期蛋白相关基因*p21* mRNA的表达,结果发现转染HBx基因的

HepG2细胞(HepG2/HBx)*p21*表达显著下降,提示HBx可下调肿瘤抑制基因*p21*的表达,表明HBx可能通过对*p21*基因的转录抑制作用,减少P21蛋白表达,有利于细胞从G₀/G₁期向S期和G₂/M期的转化,从而加速细胞周期进程,促进细胞增殖,这与Park *et al*的报道一致^[35].同时,我们采用RT-PCR技术还检测了这三组细胞*p53*基因mRNA的表达,发现三组细胞间*p53*基因的表达水平无显著差异.推测HBx可能通过非P53依赖性途径下调P21蛋白的表达,削弱细胞周期G₁/S控制点的调控作用,促进G₀/G₁期细胞向S期细胞的转化,从而加速HepG2细胞的增殖与生长;另外,其抑制HepG2细胞凋亡的作用也可能与P53蛋白无关,这与Diao和Lee *et al*的研究结果相一致^[33-34].因此,我们的研究初步证实了HBx基因可能通过非P53依赖途径下调细胞周期蛋白P21的表达而加速细胞周期进程、促进细胞增殖、抑制细胞凋亡,从而参与乙肝相关性肝癌的发生机制.关于HBx基因通过何种或哪些途径调控细胞周期蛋白P21的表达还有待于今后进一步研究.

4 参考文献

- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBxIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003; 22: 2729-2740
- Xu ZH, Zhao MJ, Li TP. p73beta inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73alpha. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1094-1097
- Su F, Theodosios CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001; 75: 215-225
- Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, Will H, Harris CC. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 14707-14712
- Lin Y, Nomura T, Yamashita T, Dorjsuren D, Tang H, Murakami S. The transactivation and p53-interacting functions of hepatitis B virus X protein are mutually interfering but distinct. *Cancer Res* 1997; 57: 5137-5142
- Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 1996; 10: 2438-2451
- Ahn JY, Jung EY, Kwun HJ, Lee CW, Sung YC, Jang KL. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the

- status of cellular p53. *J Gen Virol* 2002; 83: 2765-2772
- 9 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 357-368
- 10 Jung JK, Arora P, Pagano JS, Jang KL. Expression of DNA methyltransferase 1 is activated by hepatitis B virus X protein via a regulatory circuit involving the p16INK4a-cyclin D1-CDK 4/6-pRb-E2F1 pathway. *Cancer Res* 2007; 67: 5771-5778
- 11 Reed MF, Zagorski WA, Knudsen ES. RB activity alters checkpoint response and chemosensitivity in lung cancer lines. *J Surg Res* 2007; 142: 364-372
- 12 Lau WM, Ho TH, Hui KM. p16INK4A-silencing augments DNA damage-induced apoptosis in cervical cancer cells. *Oncogene* 2007; 26: 6050-6060
- 13 Chen J, Siddiqui A. Hepatitis B virus X protein stimulates the mitochondrial translocation of Raf-1 via oxidative stress. *J Virol* 2007; 81: 6757-6760
- 14 Gao J, Chen C, Hong L, Wang J, Du Y, Song J, Shao X, Zhang J, Han H, Liu J, Fan D. Expression of Jagged1 and its association with hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 341-347
- 15 Gao J, Song Z, Chen Y, Xia L, Wang J, Fan R, Du R, Zhang F, Hong L, Song J, Zou X, Xu H, Zheng G, Liu J, Fan D. Deregulated expression of Notch receptors in human hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 114-121
- 16 Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, Sundaresan T, Pastorino S, Park JK, Mikolaenko I, Maric D, Eberhart CG, Fine HA. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 2353-2363
- 17 Rand MD, Grimm LM, Artavanis-Tsakonas S, Patriub V, Blacklow SC, Sklar J, Aster JC. Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1825-1835
- 18 Nam Y, Aster JC, Blacklow SC. Notch signaling as a therapeutic target. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6: 501-509
- 19 Yao J, Duan L, Fan M, Yuan J, Wu X. Notch1 induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer cells: involvement of nuclear factor kappa B inhibition. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 502-510
- 20 Aguilera C, Hoya-Arias R, Haegeman G, Espinosa L, Bigas A. Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16537-16542
- 21 Bouchard MJ, Puro RJ, Wang L, Schneider RJ. Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. *J Virol* 2003; 77: 7713-7719
- 22 Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol* 2004; 78: 12725-12734
- 23 Höhne M, Schaefer S, Seifer M, Feitelson MA, Paul D, Gerlich WH. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J* 1990; 9: 1137-1145
- 24 Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998; 72: 266-272
- 25 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10350-10354
- 26 Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 111-114
- 27 Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim H, Kim SJ. Expression of fas ligand in human hepatoma cell lines: role of hepatitis-B virus X (HBX) in induction of Fas ligand. *Int J Cancer* 1999; 82: 587-591
- 28 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 25858-25864
- 29 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11215-11219
- 30 Lee AT, Ren J, Wong ET, Ban KH, Lee LA, Lee CG. The hepatitis B virus X protein sensitizes HepG2 cells to UV light-induced DNA damage. *J Biol Chem* 2005; 280: 33525-33535
- 31 彭绍华, 李程, 李凤美, 郑晖, 冯德云. 肝细胞癌中HBx蛋白与p21蛋白表达的关系及其意义. *中国肿瘤* 2004; 13: 382-384
- 32 Ahn JY, Chung EY, Kwun HJ, Jang KL. Transcriptional repression of p21(waf1) promoter by hepatitis B virus X protein via a p53-independent pathway. *Gene* 2001; 275: 163-168
- 33 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 8328-8340
- 34 Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001; 276: 16969-16977
- 35 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1-->S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000; 19: 3384-3394

编辑 李军亮 电编 何基才

Tankyrase与端粒酶在大鼠肝癌发生中的表达变化

陈颖, 孔庆忠

■背景资料

癌症的发生是一个多因素相互作用的极其复杂的过程。虽然迄今为止在癌症领域的研究已取得了令人可喜的成绩, 但对其发病机制的了解仍相当有限。鉴于目前未有关于tankyrase及其与端粒酶在肝癌发生中的相关报道, 本文探讨tankyrase和端粒酶在肝癌发生不同时期的动态变化及相关性, 以期为今后更深入地研究肿瘤发生机制及诊治积累资料。

■同行评议者

王鲁, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

陈颖, 河南科技学院生命科技学院 河南省新乡市 453003
孔庆忠, 山东大学生命科学学院; 山东蓝金生物工程有限公司 山东省济南市 250100

陈颖, 博士, 讲师, 主要从事分子细胞生物学研究。

作者贡献分布: 此课题由陈颖与孔庆忠设计完成; 数据分析及论文写作均由陈颖与孔庆忠共同完成。

通讯作者: 陈颖, 453003, 河南省新乡市华兰大道东段, 河南科技学院生命科技学院. yingch@yahoo.cn

电话: 0373-3040337

收稿日期: 2008-03-08 修回日期: 2008-04-18

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-07-08

Expression alteration of tankyrase and telomerase in HCC development in rats

Ying Chen, Qing-Zhong Kong

Ying Chen, School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Qing-Zhong Kong, School of Life Science, Shandong University; Shandong Lanjin Biotechnology Company, Jinan 250100, Shandong Province, China

Correspondence to: Ying Chen, School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan Province, China. yingch@yahoo.cn

Received: 2008-03-08 Revised: 2008-04-18

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To explore the dynamic states of and relationship between tankyrase and telomerase reverse transcriptase (TERT) in hepatocellular carcinoma (HCC) development in rats.

METHODS: SD rats were assigned randomly to control group ($n = 42$) and model group ($n = 42$). HCC model was induced by diethyl nitrosoamine (DEN). Twelve rats from both groups were randomly executed at 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 wk for further test. The expression of tankyrase and TERT was detected using Western blot and immunofluorescence analysis, whereas telomerase activity and the expression of Ki-67 were assayed using TRAP and immunohistochemical methods, respectively.

RESULTS: Compared with the low expression level of telomerase and TERT in normal tissue

and precancerous lesions, the expression level of tankyrase was significantly increased in inflammatory stage, as well as in hepatocirrhotic stage, especially in HCC stage, in which stage peak values of all these factors were obtained. The expression of tankyrase was positively correlated with telomerase and TERT ($r = 0.898$, $P = 0.038$; $r = 0.943$, $P = 0.016$), but no relationship was found between tankyrase and Ki-67. However, Ki-67 was positively correlated with telomerase and TERT ($r = 0.986$, $P = 0.002$; $r = 0.93$, $P = 0.022$).

CONCLUSION: Over-expression of tankyrase might be one of the factors that regulates telomerase function as telomere elongation. Tankyrase, TERT, telomerase and Ki-67 are closely related to HCC progression.

Key Words: Tankyrase; Telomerase; Telomerase reverse transcriptase; Ki-67; Hepatocellular carcinoma

Chen Y, Kong QZ. Expression alteration of tankyrase and telomerase in HCC development in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2086-2091

摘要

目的: 探讨tankyrase与端粒酶在肝细胞肝癌发生、发展过程中的动态变化及其相关性。

方法: SD大鼠随机分为对照组($n = 42$)和造模组($n = 42$), 二乙基亚硝胺诱导大鼠肝细胞肝癌模型。给药后3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 wk随机处死对照组及造模组中的6只大鼠。采用Western blot法检测tankyrase和端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)的表达; 免疫荧光方法原位检测细胞内TERT的表达; TRAP法检测端粒酶活性; 免疫组化方法检测细胞增殖活性(Ki-67)。

结果: 在肝细胞癌变过程中, 相对于端粒酶、TERT及Ki-67在正常组织和癌前病变中的低水平表达, tankyrase在肝炎期表达就显著增加。但至肝硬化, 特别是肝癌期几种检测指标的表达均至高峰。Tankyrase与端粒酶活性和TERT的表达呈正相关($r = 0.898$, $P = 0.038$; $r = 0.943$, $P = 0.016$), 但与细胞的增殖活性无相关性; 而

细胞增殖活性与端粒酶和TERT呈正相关($r = 0.986, P = 0.002; r = 0.93, P = 0.022$).

结论: Tankyrase可能是调控端粒酶行使功能的因素之一. Tankyrase、端粒酶、TERT和Ki-67均与肝细胞肝癌的发生、发展密切相关.

关键词: Tankyrase; 端粒酶; 端粒酶催化亚基; Ki-67; 肝癌

陈颖, 孔庆忠. Tankyrase与端粒酶在大鼠肝癌发生中的表达变化. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2086-2091
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2086.asp>

0 引言

端粒长度在维持染色体末端结构的完整性、染色体复制及调控细胞衰老和癌症发生等诸多细胞生物学过程中都发挥着重要作用. 其受到端粒酶和端粒特异结合蛋白的双重调控^[1]. 端粒酶是由端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和端粒酶RNA(telomerase RNA, TR)组成的核糖核蛋白复合体, 其通过在染色体末端添加TTAGGG六聚体重复序列以维持端粒长度的稳定, 借此防止染色体末端融合. 而TRF1、TRF2、Tin2及tankyrase等一些端粒结合蛋白则可通过与端粒DNA的结合, 维持并调控端粒末端结构. 这些蛋白的表达和/或功能异常均可引起端粒结构的改变, 从而导致端粒功能的丧失, 最终为那些通过端粒酶的表达来恢复端粒功能的细胞提供了选择优势.

Tankyrase是poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)家族成员之一, 其通过调控端粒酶与端粒的结合, 间接参与端粒长度的调控^[2]. 在肿瘤发生过程中tankyrase与端粒酶的相关性尚存争议. 鉴于目前未有关于tankyrase及其与端粒酶在肝癌发生中的相关报道, 我们探讨tankyrase和端粒酶在肝癌发生不同时期的动态变化及相关性, 以期为今后更深入地研究肿瘤发生机制及诊治积累资料.

1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley(SD)大鼠购于河南郑州大学实验动物中心; 二乙基亚硝胺、PI购于Sigma; Ki-67抗体购于NeoMarkers; TERT, tankyrase, actin抗体、化学发光试剂盒购于Santa Cruz; 碱磷酶标记IgM, PVTM, DAB检测试剂盒购于北京中杉金桥; NBT/BCIP试剂盒购于华

美生物工程公司; Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA试剂盒购于Roche. 3 mo平均体质量为120 ± 5 g的♂SD大鼠在22 ± 3°C, 湿度40%-70%, 间隔12 h光照的条件下饲养. 适应环境1 wk后, 随机分为对照组($n = 42$)和造模组($n = 42$). 根据Solt-Farber方法, 以2 g/L的二乙基亚硝胺(diethyl nitrosoamine, DENA)制备肝癌模型, 15 wk后停药. 根据大鼠肝癌的诊断标准由两位病理医生进行病理分型^[3]. 造模组的病变可大致分为3阶段: 炎症期(12 wk之前)、肝硬化期(15 wk)和肝癌期(18-21 wk). 分别在给药后3、6、9、12、15、18、21 wk随机处死对照组及造模组中的6只大鼠. 取少量新鲜肝组织置于40 mL/L的多聚甲醛, 4°C固定过夜后行石蜡包埋和HE染色. 其余组织迅速放入液氮中冷冻, 随后置-80°C保存.

1.2 方法

1.2.1 Ki-67表达的检测: 组织切片经柠檬酸抗原修复液修复, 100 mL/L山羊血清封闭. Ki-67抗体(RM-9106)(1 : 80)37°C孵育2 h后以PVTM检测试剂盒(PV-6001)标记二抗, DAB(ZLI-9032)显色. 以PBS代替一抗作阴性对照. 每组实验重复3次, 每张切片至少观察5个视野. IDA-2000高清晰度数码图像分析系统(中科院北京空海科技有限公司)进行光密度分析.

1.2.2 TERT蛋白表达的检测: 组织切片置柠檬酸抗原修复液修复, 200 mL/L山羊血清封闭后, 加抗TERT抗体(sc-7212)(1 : 600)4°C孵育过夜. FITC标记的二抗(ZF-0311)(1 : 400)25°C孵育40 min, 20 mL/L PI室温标记细胞核后封片, 激光共聚焦显微镜检测. PBS代替一抗作为阴性对照. 每张切片至少采集10个视野, 记数1000个细胞. 根据Dinser *et al*的免疫荧光半定量方法对TERT蛋白的表达强度进行相对荧光强度分析^[4-5]. 相对荧光强度 = 荧光强度 × 面积 / 细胞总数. 每组实验重复3次.

1.2.3 TERT和tankyrase蛋白表达的检测: 细胞总蛋白75 μg在60 mL/L SDS-PAGE中恒压电泳后转移至硝酸纤维素膜上并用50 mL/L的脱脂奶粉封闭. 分别加入TERT(sc-7212)(1 : 300), tankyrase(sc-8337)(1 : 500)和actin(sc-1616)(1 : 1000)一抗4°C孵育过夜. 碱磷酶标记的二抗(ZB-2308)(1 : 1000)以NBT/BCIP试剂盒检测TERT的表达. 辣根过氧化物酶标记的二抗以化学发光法(sc-2048)检测tankyrase的表达. actin作为内对照, Labworks 4.0软件(UVP, Inc. USA)定量分析二者的表达强度. 每组实验重复3次.

■ 研究前沿

探寻肝癌发生机制是肝癌研究领域的一大热点, 因而寻找与此相关的分子和新的干预治疗靶点具有重要意义.

■ 相关报道

多个研究小组的研究提示 tankyrase 与端粒酶在肿瘤发生中具有相关性。

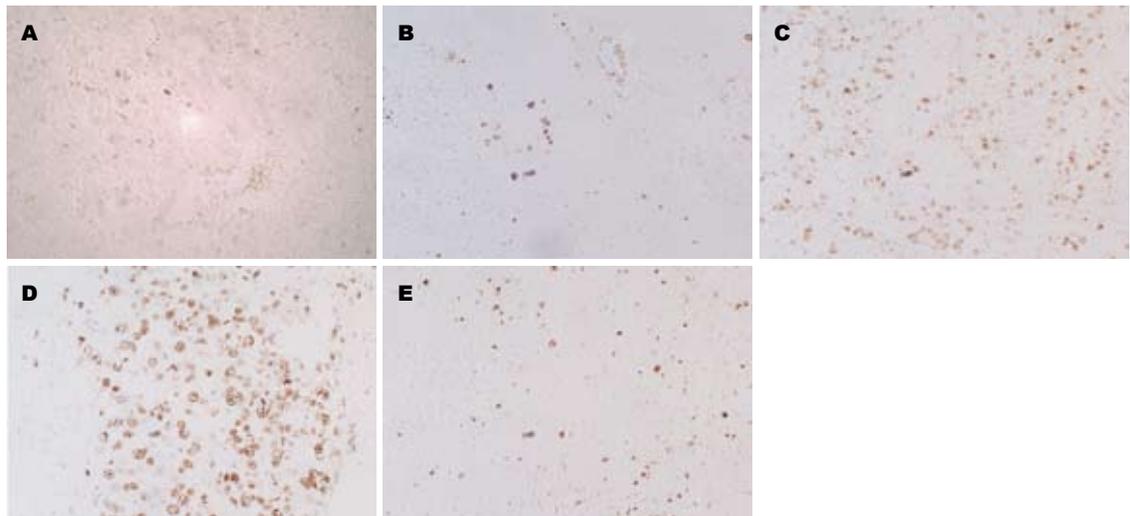


图 1 大鼠肝癌发生不同时期Ki-67的表达(非生物素二步法×400)。A: 正常; B: 炎症期; C: 肝硬化期; D: 肝癌期; E: 癌旁组织。

表 1 Tankyrase, TERT, Ki-67和端粒酶在诱癌不同时期的表达

	tankyrase	端粒酶	TERT ¹	TERT ²	Ki-67
正常	2.4±0.1	23.3±2.3	1.5±0.2	4.5±0.9	0
肝炎期	4.2±1.3 ^b	36.1±4.6	2.0±1.0	6.4±1.7	6.8±0.6 ^b
肝硬化期	14.0±0.8 ^b	62.8±7.5 ^b	11.9±0.1 ^b	13.2±2.3 ^b	17.9±3.2 ^b
肝癌期	8.4±1.3 ^b	62.9±6.6 ^b	10.3±2.7 ^b	17.4±6.0 ^b	18.8±1.6 ^b
癌旁	3.4±0.2	35.0±7.3	2.4±1.1	7.8±0.5	8.6±1.3 ^b

¹Western blot; ²免疫荧光。^b $P < 0.01$ vs 正常。

1.2.4 端粒酶活性的检测: 用Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA试剂盒以telomeric repeat amplification protocol(TRAP)方法检测端粒酶活性。操作步骤按说明书。端粒酶相对活性 = (样本 $A_{450nm} - A_{690nm}$ / 阳性对照 $A_{450nm} - A_{690nm}$) × 100。每组实验重复3次。

统计学处理 实验数据均用mean±SD表示, SPSS11.0软件对实验数据进行方差分析(ANOVA)和Spearman相关分析, $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 肝癌发生过程中细胞增殖活性变化 诱癌过程中细胞增殖活性逐渐增强(图1)。对照组未见Ki-67阳性表达的细胞, 造模组从诱癌的3 wk起即可见零星分布的阳性细胞。肝硬变至肝癌期阳性细胞主要分布在增生结节中。定量分析表明炎症后期Ki-67的表达量分别是诱癌3 wk的1.13-1.89倍。其在肝硬变期的表达量急增至炎症期的2.7倍。这种高水平表达一直持续到诱癌结束并有极显著差异($P < 0.001$), 提示细胞增殖极度活跃(表1)。而癌旁组织中Ki-67的表达无统计学意义。

2.2 端粒酶活性的变化 对照组及造模组的炎症期和癌旁组织中端粒酶活性较低并维持在相对稳定的水平, 端粒酶相对活性介于23.3%-41%之间。随着病变的演进, 端粒酶活性在肝硬化期急增至62.8%($P = 0.02$)并在其后的癌症发生过程中持续保持这一高水平($P < 0.01$)而癌旁组织无显著性差异(表1)。

2.3 TERT蛋白表达的变化 炎症期TERT蛋白表达强度较对照组中升高但尚未达到显著性差异水平。而至肝硬化和肝癌期其表达量为13.22-17.38, 是对照组的2.95-3.88倍, 有显著性差异($P = 0.044$ 和 $P < 0.001$)(图2)。为证实免疫荧光结果, 我们又用Western blot方法进一步验证TERT的表达(图3)。结果发现, TERT蛋白表达变化与免疫荧光方法所得结果基本一致(表1)。

2.4 Tankyrase蛋白表达的变化 Tankyrase蛋白在整个诱癌过程中呈先上升后下降再上升的表达变化趋势(图4)。对照组中tankyrase蛋白少量表达, 炎症早期(诱癌3 wk)其表达量显著增加($P < 0.001$), 至后期(12 wk)又下降至正常水平($P = 0.834$)。但在肝硬化及肝癌阶段其表达量又激增,

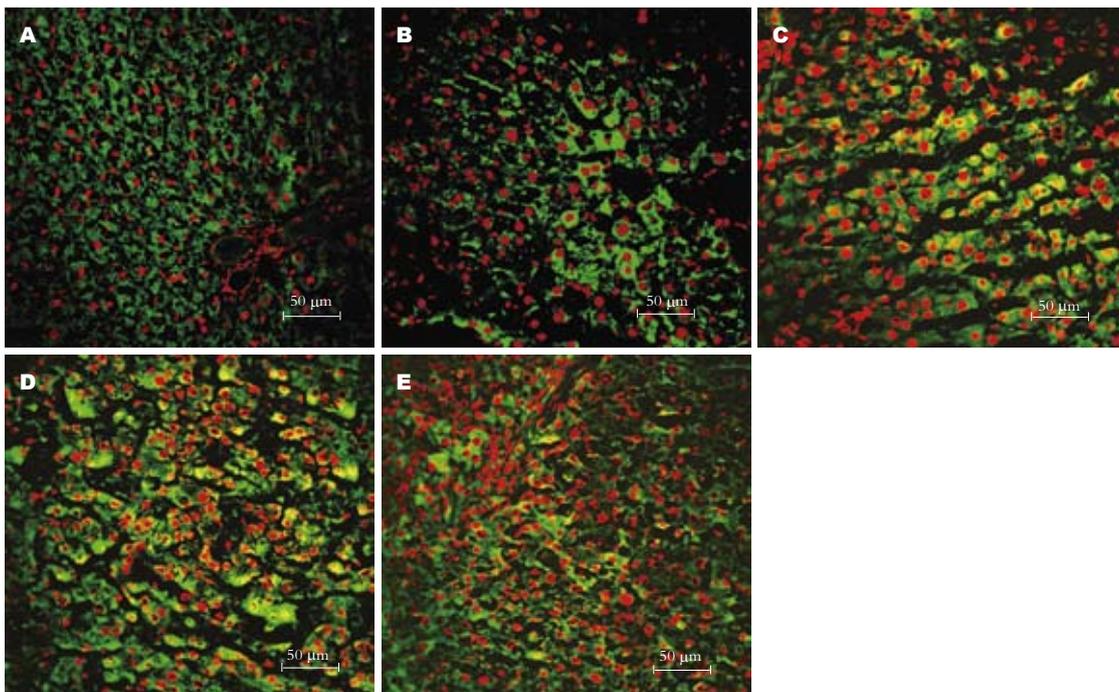


图 2 大鼠肝癌诱癌过程中TERT的表达(免疫荧光). A: 正常; B: 炎症期; C: 肝硬化期; D: 肝癌期; E: 癌旁组织. FITC标记TERT(绿色), PI标记细胞核(红色), 二者叠加呈黄色.

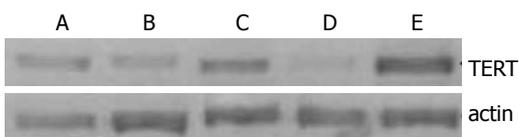


图 3 大鼠肝癌诱癌过程中TERT的表达(Western blot). A: 正常; B: 炎症期; C: 肝硬化期; D: 癌旁组织; E: 肝癌期. actin: 内对照.

此时的表达量是正常组织的3.1-5.8倍($P < 0.001$). 而癌旁组织tankyrase的表达无统计学意义(表1).
2.5 Tankyrase, TERT, 端粒酶及Ki-67之间的相关性 Tankyrase蛋白的表达与TERT($P = 0.016, r = 0.943$)和端粒酶($P = 0.038, r = 0.898$)的表达变化呈正相关关系, 而与Ki-67之间却无相关性($P = 0.069, r = 0.849$). 统计学分析显示TERT与端粒酶二者呈正相关($P = 0.006, r = 0.97$). 与TERT蛋白的表达和Ki-67的显著性相关($P = 0.022, r = 0.93$)相比, 端粒酶活性与Ki-67之间的相关性达到了极显著性水平($P = 0.002, r = 0.986$).

3 讨论

端粒酶可通过维持端粒长度使细胞越过Hayflick极限, 促使细胞永生化及癌变. 正常体细胞中端粒酶活性受到严格的调控, 而80%以上的肿瘤细胞中端粒酶活性却显著升高^[6]. 端粒酶活性的调控主要涉及TR和TERT. 由于TR在多种组织中都高表达, 而TERT在正常细胞中的表达通常受到抑制, 仅在永生和肿瘤细胞中表达上调, 因

■创新盘点

本研究首次对tankyrase在肝癌发生过程中的动态变化进行了研究.

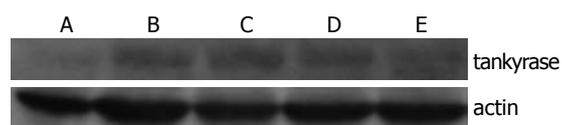


图 4 大鼠肝癌发生过程中tankyrase的表达(Western blot). A: 正常; B: 炎症期; C: 肝硬化期; D: 肝癌期; E: 癌旁组织. actin: 内对照.

此通常将TERT的表达作为调控端粒酶活性的限速步骤. 鉴于目前未有关于TERT蛋白在肿瘤发生过程中动态变化的报道, 我们首先对端粒酶与TERT蛋白在肝癌发生中的变化进行了初步研究. 结果表明, 端粒酶活性伴随肝癌的发生、发展逐步升高. 正常肝组织、炎症期和癌旁组织中端粒酶活性较低, 至肝硬化和肝癌期端粒酶活性急剧升高. 对TERT蛋白表达的定量分析结果显示其表达变化与端粒酶活性升高的趋势基本一致, 且二者呈正相关关系^[7-8]. 提示TERT可能调节端粒酶活性. 对细胞增殖活性的研究发现, 细胞增殖活性与端粒酶活性和TERT表达同步升高, 呈正相关. 因抗增殖活性因子可抑制TERT和端粒酶活性, 进而促进肿瘤细胞的分化^[9-10], 所以我们推测诱癌早期端粒酶活性可能促进了细胞增生. 而后期端粒酶活性的激增可能导致端粒功能的恢复和基因组稳定性的增加, 促使细胞生存能力进一步增强, 使细胞向永生化直至癌变方向发展. 同时我们还观察到同一增生结节和癌巢中单细胞内TERT及Ki-67的异

■应用要点

本研究初步探明了tankyrase和端粒酶在肝癌发生过程中的变化,为下一步以二者为靶点的分子治疗奠定了基础,并对肝癌的诊断、治疗及预后有着积极意义。

质性表达现象,提示在癌变过程中癌细胞发展的不同步性。推测很可能只有那些增殖活性和端粒酶活性都相对较高的细胞促进并维持肿瘤生长。

在由端粒酶介导的端粒延伸的癌细胞中,tankyrase等端粒相关蛋白也可通过调控端粒酶与端粒的结合,而诱导端粒延伸^[2,11-16]。我们采用Western blot方法分析了tankyrase在癌症发生过程中的动态变化,结果显示tankyrase在诱癌过程中出现两次表达高峰,与正常组织中tankyrase的表达相比均有显著差异。这两次表达高峰之间,即在由炎症期向肝硬化和肝癌期转换时tankyrase表达量却降至正常肝组织表达水平,且癌旁组织中tankyrase的表达与正常组织相比并无显著性差异。提示很可能有不同类型的tankyrase参与癌的发生。目前研究发现,tankyrase有1和2种。Tankyrase1表达的高低与端粒长度的维持密切相关。其表达过低,肿瘤细胞可不依赖端粒长度和端粒酶活性而被阻滞在有丝分裂后期。相反,其长期过表达则有可能诱导端粒长度以一种依赖tankyrase的PARP催化活性和端粒酶活性的方式延伸^[12,17]。与tankyrase1相反,体内实验表明,tankyrase2的高表达与端粒长度的维持无关,但可通过耗竭NAD⁺,而诱导以细胞坏死为特征的细胞死亡^[18-19]。此外tankyrase-2在肿瘤细胞中未有差异性表达而仅具有自身抗原的特性^[20-21]。鉴于炎症期观察到大量的细胞坏死,因此此时tankyrase的高表达极有可能与tankyrase2的高表达相关,而肝硬化和肝癌时tankyrase的高表达很可能由tankyrase1介导^[22-23]。由于目前未有分别针对tankyrase1和2的特异性商业抗体,这一推测有待今后进一步的研究证实。与多个小组的研究结果相一致,我们还发现,tankyrase不仅在癌细胞中表达升高,而且还与端粒酶活性和TERT蛋白的表达呈正相关^[24-25]。提示tankyrase可能通过ADP-核糖基化端粒长度的负调控子TRF1(telomeric repeat binding factor 1),从而抑制TRF1与端粒的结合,促进端粒酶与端粒的结合,间接调控端粒酶全酶的完整性和活性,这一过程可能更依赖于TERT蛋白的高表达^[26]。引人深思的是,tankyrase蛋白的表达升高却与细胞的增殖活性无关。

肿瘤细胞中端粒的缩短可导致肿瘤细胞的衰老和死亡,目前已将端粒酶作为肿瘤治疗的靶点^[27-29]。但研究发现端粒酶抑制剂不能完全抑制端粒酶活性,所残留的端粒酶活性和部分

缩短的端粒又可引起靶细胞对端粒酶抑制剂的耐受性。抑制tankyrase活性的升高不仅可以使端粒末端得到保护,还可阻断端粒酶与端粒的结合,进而诱导癌细胞的衰老,并增加端粒酶抑制剂的药理学效应^[17,30-31]。因此更为详尽的阐明tankyrase在肿瘤发生中的作用,特别是不同类型的tankyrase在肿瘤发生中的作用将对肿瘤发生机制的认识及肿瘤的诊治有着积极、重要意义。

4 参考文献

- 1 Artandi SE, DePinho RA. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 39-46
- 2 Smith S, Giriat L, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998; 282: 1484-1487
- 3 Squire RA, Levitt MH. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Res* 1975; 35: 3214-3223
- 4 Dinsler R, Kreppel F, Zaucke F, Blank C, Paulsson M, Kochanek S, Maurer P. Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem Cell Biol* 2001; 116: 69-77
- 5 Lau WK, Yeung CW, Lui PW, Cheung LH, Poon NT, Yung KK. Different trends in modulation of NMDAR1 and NMDAR2B gene expression in cultured cortical and hippocampal neurons after lead exposure. *Brain Res* 2002; 932: 10-24
- 6 Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-352
- 7 Satra M, Gatselis N, Iliopoulos D, Zacharoulis D, Dalekos GN, Tsezou A. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in liver tissues from patients with hepatocellular cancer and chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat* 2007; 14: 41-47
- 8 Shimojima M, Komine F, Hisatomi H, Shimizu T, Moriyama M, Arakawa Y. Detection of telomerase activity, telomerase RNA component, and telomerase reverse transcriptase in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2004; 29: 31-38
- 9 Xu D, Erickson S, Szeps M, Gruber A, Sangfelt O, Einhorn S, Pisa P, GrandEr D. Interferon alpha down-regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and nonmalignant hematopoietic cells. *Blood* 2000; 96: 4313-4318
- 10 Rama S, Suresh Y, Rao AJ. Regulation of telomerase during human placental differentiation: a role for TGFbeta1. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 182: 233-248
- 11 Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Iwama H, Ando K, Tauchi T, Ohyashiki K. Impaired telomere regulation mechanism by TRF1 (telomere-binding protein), but not TRF2 expression, in acute leukemia cells. *Int J Oncol* 2001; 18: 593-598
- 12 Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S. Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol*

- 2002; 22: 332-342
- 13 Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 2003; 423: 1013-1018
- 14 Smith S, de Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* 2000; 10: 1299-1302
- 15 Shervington A, Patel R, Lu C, Cruickshanks N, Lea R, Roberts G, Dawson T, Shervington L. Telomerase subunits expression variation between biopsy samples and cell lines derived from malignant glioma. *Brain Res* 2007; 1134: 45-52
- 16 Hsiao SJ, Smith S. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* 2008; 90: 83-92
- 17 Seimiya H, Muramatsu Y, Ohishi T, Tsuruo T. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2005; 7: 25-37
- 18 Kaminker PG, Kim SH, Taylor RD, Zebarjadian Y, Funk WD, Morin GB, Yaswen P, Campisi J. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* 2001; 276: 35891-35899
- 19 Hsiao SJ, Poitras MF, Cook BD, Liu Y, Smith S. Tankyrase 2 poly(ADP-ribose) polymerase domain-deleted mice exhibit growth defects but have normal telomere length and capping. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2044-2054
- 20 Kuimov AN, Kuprash DV, Petrov VN, Vdovichenko KK, Scanlan MJ, Jongeneel CV, Lagarkova MA, Nedospasov SA. Cloning and characterization of TNKL, a member of tankyrase gene family. *Genes Immun* 2001; 2: 52-55
- 21 Monz D, Munnia A, Comtesse N, Fischer U, Steudel WI, Feiden W, Glass B, Meese EU. Novel tankyrase-related gene detected with meningioma-specific sera. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 113-119
- 22 Gelmini S, Quattrone S, Malentacchi F, Villari D, Travaglini F, Giannarini G, Della Melina A, Pazzagli M, Nicita G, Selli C, Orlando C. Tankyrase-1 mRNA expression in bladder cancer and paired urine sediment: preliminary experience. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 862-866
- 23 Gelmini S, Poggesi M, Pinzani P, Mannurita SC, Cianchi F, Valanzano R, Orlando C. Distribution of Tankyrase-1 mRNA expression in colon cancer and its prospective correlation with progression stage. *Oncol Rep* 2006; 16: 1261-1266
- 24 Xu D, Zheng C, Bergenbrant S, Holm G, Bjorkholm M, Yi Q, Gruber A. Telomerase activity in plasma cell dyscrasias. *Br J Cancer* 2001; 84: 621-625
- 25 MacNamara B, Wang W, Chen Z, Hou M, Mazur J, Gruber A, Porwit-MacDonald A. Telomerase activity in relation to pro- and anti-apoptotic protein expression in high grade non-Hodgkin's lymphomas. *Haematologica* 2001; 86: 386-393
- 26 Donigian JR, de Lange T. The role of the poly(ADP-ribose) polymerase tankyrase1 in telomere length control by the TRF1 component of the shelterin complex. *J Biol Chem* 2007; 282: 22662-22667
- 27 陈陵, 杨仕明, 蔡永国, 房殿春, 李晶晶, 罗元辉. 针对端粒酶蛋白催化亚单位的肿瘤免疫治疗研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 528-533
- 28 Shay JW. Meeting report: the role of telomeres and telomerase in cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 3513-3517
- 29 Parkinson EK, Minty F. Anticancer therapy targeting telomeres and telomerase: current status. *BioDrugs* 2007; 21: 375-385
- 30 Seimiya H. The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 2006; 94: 341-345
- 31 卢宏达, 黄涛, 申雯竹, 甄燕, 孔庆志. 端锚酶反义寡核苷酸联合反义端粒酶催化亚单位对人肺腺癌A549细胞端粒动力学的的影响. *癌症* 2007; 26: 1164-1169

■同行评价
本文实验设计合理, 数据图表可靠, 学术价值较好.

编辑 潘伯荣 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志网络版的发表前链接

本刊讯 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-08)

白藜芦醇下调小鼠非乙醇性脂肪性肝炎环氧合酶2的表达

肖虎, 张皎月, 郑涓

■背景资料

随着非乙醇性脂肪肝(NAFLD)呈流行趋势, NASH患病率也增加. 其发病机制并不十分清楚, 但炎症过程与其发生发展有密切的关系, NASH时肝脏COX-2表达增加. 白藜芦醇是一种多酚类植物抗癌素, 具有抗氧化、抗炎等多种作用, 可能对NASH具有有益的作用.

肖虎, 张皎月, 郑涓, 华中科技大学协和医院内分泌科 湖北省武汉市 430022
肖虎, 2005年华中科技大学同济医学院附属协和医院博士, 副主任医师, 主要从事糖脂毒性研究.
湖北省科技攻关计划, No. 2007AA302B05
作者贡献分布: 肖虎对此文作主要贡献; 此课题由肖虎, 张皎月及郑涓设计; 研究过程由肖虎与张皎月操作完成; 数据分析由肖虎完成; 本论文写作由肖虎完成.
通讯作者: 肖虎, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院内分泌科.
xiaohu71@sohu.com
电话: 027-85726130
收稿日期: 2008-03-14 修回日期: 2008-04-19
接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-07-08

Resveratrol down-regulates hepatic cyclooxygenase-2 expression in mice with nonalcoholic steatohepatitis

Hu Xiao, Jiao-Yue Zhang, Juan Zheng

Hu Xiao, Jiao-Yue Zhang, Juan Zheng, Department of Endocrinology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by: the Key Science-Technology Project of Hubei Province, No. 2007AA302B05
Correspondence to: Hu Xiao, Department of Endocrinology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. xiaohu71@sohu.com
Received: 2008-03-14 Revised: 2008-04-19
Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of resveratrol on gene expression of cyclooxygenase (COX)-2 in mice with diet-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

METHODS: Thirty male C57BL/6J mice were assigned randomly to three groups: normal control group, high fat group (HF group) and high fat resveratrol treatment group (HR group). The mice in normal control group ($n = 10$) were fed with standard diet. The mice in HF group ($n = 10$) and in HR group ($n = 10$) were fed with high fat diet. After 8-week high fat diet, the mice in HR group were fed with resveratrol 400 mg/(kg·day) for 16 wk. Hepatic

COX-2 expression was determined using RT-PCR and Western blot.

RESULTS: Steatohepatitis was discernable in HF group and was markedly alleviated in HR group. COX-2 were not expressed in normal mouse liver. The mRNA expression and protein expression of COX-2 were significantly lower in HR group than those in HF group ($0.76\% \pm 0.18\%$ vs $1.48\% \pm 0.23\%$, $11.2\% \pm 3.5\%$ vs $27.9\% \pm 4.6\%$, both $P < 0.01$), but not returned to normal level.

CONCLUSION: COX-2 may play an important role in NASH pathogenesis. Resveratrol improves NASH at least partly by downregulating expression of COX-2 in the liver.

Key Words: Fatty liver; Nonalcoholic fatty liver disease; Cyclooxygenase 2; Resveratrol

Xiao H, Zhang JY, Zheng J. Resveratrol down-regulates hepatic cyclooxygenase-2 expression in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2092-2096

摘要

目的: 研究白藜芦醇对饮食诱导的非乙醇性脂肪性肝炎(NASH)小鼠肝脏COX-2表达的影响.

方法: ♂小鼠30只随机分为正常对照组(NC组, $n = 10$)、高脂喂养组(HF组, $n = 10$)和高脂喂养白藜芦醇治疗组(HR组, $n = 10$). NC组给予标准基础饲料, HF组和HR组给予高脂饲料喂养. HR组小鼠高脂喂养8 wk后, 每日给予400 mg/kg白藜芦醇灌胃治疗. HR组和HF组均继续高脂饲料喂养16 wk. 实验结束后处死小鼠并取肝脏组织, 分别用RT-PCR法及免疫印迹法检测肝脏COX-2 mRNA和蛋白的表达.

结果: HF组小鼠出现明显的脂肪性肝炎, HR组小鼠的脂肪性肝炎明显减轻. NC组小鼠肝组织无COX-2 mRNA和蛋白的表达, HF组小鼠肝组织有高水平的COX-2 mRNA和蛋白的表达, 分别为 $1.48\% \pm 0.23\%$ 和 $27.9\% \pm 4.6\%$, HR组COX-2 mRNA和蛋白的表达水平较HF

■同行评议者

陈耀凯, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

组明显降低, 分别为 $0.76\% \pm 0.18\%$ 和 $11.2\% \pm 3.5\%$, 两组间差异有统计学意义($P < 0.01$), 但未降至正常。

结论: COX-2在NASH中发挥着重要作用, 白藜芦醇至少部分是通过下调肝脏COX-2的表达达到改善NASH的作用。

关键词: 脂肪肝; 非乙醇性脂肪性肝病; 环氧合酶2; 白藜芦醇

肖虎, 张皎月, 郑涓. 白藜芦醇下调小鼠非乙醇性脂肪性肝炎环氧合酶2的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2092-2096
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2092.asp

0 引言

非乙醇性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒史肝实质细胞脂肪变性和脂肪沉积为特征的临床病理综合征, 疾病谱随病程的进展表现为单纯脂肪肝、脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、脂肪性肝纤维化和肝硬化^[1-3]。流行病学研究发现^[4], 在美国和其他西方发达国家中20%-30%的成年人具有NAFLD, 这其中又有10%的人达到NASH的诊断标准, 成为严重的公共卫生问题。在我国随着生活水平的提高, NAFLD和NASH的发病人数也在增加^[5]。NAFLD的发病机制并不十分清楚, 但是炎症过程与NAFLD的发生发展有密切关系, NASH时肝脏COX-2表达增加^[6-8]。白藜芦醇是一种多酚类植物抗毒素^[9], 具有抗氧化、抗炎等多种作用。我们观察白藜芦醇是否可以改善饮食诱导的NASH, 并初步探讨其机制, 尤其是对NASH肝组织COX-2表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂4 wk龄SPF级C57BL/6J小鼠30只, 体重11-13 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠正常基础饲料购自湖北省实验动物中心, 其脂肪、蛋白质、碳水化合物热卡含量分别为0.10、0.21、0.69。高脂饮食脂肪(主要是熟猪油)、蛋白质、碳水化合物热卡含量分别为0.59、0.20、0.21。小鼠随机分为2组, 高脂喂养组20只和正常对照组(NC)10只。NC组给予标准基础饲料, HF组给予高脂饲料喂养。动物饲养于华中科技大学同济医学院实验动物中心清洁级环境, 明暗周期为12 h, 室温22-26℃, 相对湿度50%-80%, 自由摄食、饮水。两组小鼠喂养8

wk后, 高脂喂养组分为单纯高脂组(HF, 10只)和白藜芦醇干预组(HR, 10只), 每日给予400 mg/kg白藜芦醇灌胃治疗, NC组和HF组(10只)均给予相同体积生理盐水灌胃。HR组和HF组均继续高脂饲料喂养16 wk。

1.2 方法 实验结束时小鼠禁食12 h, 眼眶取血法采血, 分离血清, 采用日本日立7600-020全自动生化分析仪, 测定血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG); 酶法测定FBG; ELISA法测定胰岛素(Fins)。次日称体质量, 戊巴比妥钠ip麻醉, 迅速取出肝脏称质量后, 一部分用生理盐水清洗后置于-80℃冰箱冻存; 一部分置于40 g/L甲醛液固定, 留待行病理检查。另取少量剪成小块, 置110℃烘至恒定质量, 精确称取干燥后的肝脏, 磨成细粉, 加氯仿: 甲醇(2:1, V/V), 再按上述测定血清脂质的方法测脂质含量。

1.2.1 肝组织COX-2 mRNA表达的测定: 按RNA抽提纯化操作方法提取肝组织总RNA。提取的RNA通过紫外分光光度计测定260和280 nm吸光度值, 计算RNA纯度和浓度。将RNA逆转录成cDNA, 再进行PCR扩增引物为Primer5.0软件自行设计。使用GAPDH作为内参照。引物序列: COX-2正义链5'-CTTAGCACAACAGA-3, 反义链5'-CGGAAGTGAGA-3; GAPDH正义链5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3, 反义链5'-AGATCCACAACGGATACATT-3。目的片段长度COX-2为253 bp; GAPDH为308 bp。反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 退火30 s, 72℃延伸60 s, 循环28-38次; 最后72℃延伸10 min。各基因退火温度和循环次数分别为: COX-2 55℃, 36个循环; GAPDH 55℃, 28个循环。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下拍照, 使用GAS凝胶图像处理系统分析吸光度值, 以GAPDH为内参照, 计算待测基因mRNA相对表达量。

1.2.2 肝脏COX-2蛋白表达的测定: 取-80℃保存的各组动物肝组织100 mg, 提取细胞膜蛋白, 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用兔抗小鼠的COX-2多克隆抗体(购自美国CST生物工程公司), 测定小鼠肝脏的COX-2蛋白水平, 一抗稀释度为1:1000, β -actin表达水平作为内对照, 利用图像分析系统扫描确定X光片上杂交条带的相对光密度值。

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计分析, 数据采用mean \pm SD表示。组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用q检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

■ 相关报道

Yu *et al*发现, 正常饮食的小鼠肝脏没有COX-2的表达, 而高脂饮食诱导的小鼠NASH肝组织COX-2的表达增加, 国内许树长 *et al*和刘晓璐 *et al*也有相同的发现。

■创新盘点

本文首次报道了白藜芦醇对NASH具有改善作用,部分与下调肝脏COX-2的表达有关。

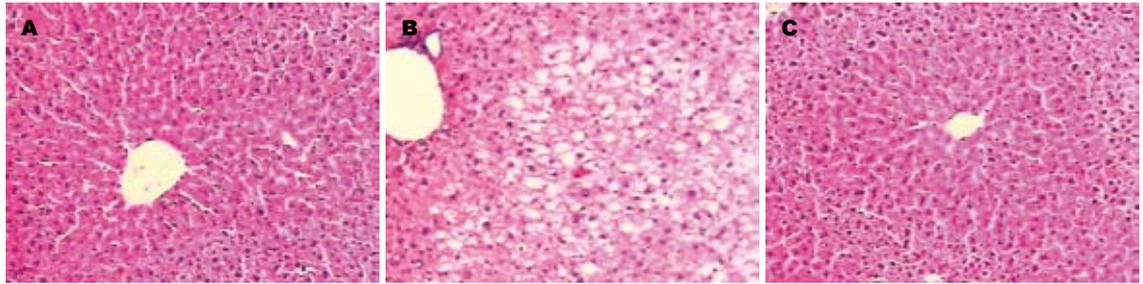


图1 小鼠肝脏组织学改变(HE × 200)。A: NC组; B: HF组; C: HR组。

表1 小鼠NAFLD血清TC, TG, FBG和Fins水平 ($n = 10$, mean ± SD)

分组	FBG (mmol/L)	Fins (mU/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
NC	5.21 ± 1.37	8.52 ± 2.36	0.59 ± 0.11	1.86 ± 0.36
HF	8.69 ± 1.85 ^b	18.75 ± 3.69 ^b	0.97 ± 0.07 ^b	4.23 ± 0.27 ^b
HR	5.73 ± 1.66 ^d	11.27 ± 4.37 ^d	0.61 ± 0.08 ^d	3.98 ± 0.34 ^b

^b $P < 0.01$ vs NC; ^d $P < 0.01$ vs HF.

2 结果

2.1 血清TC, TG, FBG和Fins水平 与NC组相比, HF组FBG、TG、TC明显升高, 同时Fins升高, 白藜芦醇治疗后, FBG、TG降至正常, TC略有下降, 但未降至正常(表1)。

2.2 肝组织学变化 大体形态观察, 正常组大鼠肝脏外观呈红褐色, 表面光滑; HF组大鼠肝脏体积明显增大, 呈黄褐色, 被膜紧张, 边缘饱满, 质地稍韧, 切面有油腻感, 严重者表面有细颗粒状隆起; HR组小鼠肝脏轻度肿大, 呈较浅淡的红褐色, 被膜较光滑, 边缘较锐利, 切面较光洁, 质地较正常组略差。HE染色光镜下观察, 正常组肝小叶结构完整, 肝细胞呈多边形, 围绕中央静脉呈放射状, 肝窦清晰可见, 肝索排列整齐, 未见异常; HF组小鼠肝组织弥漫性脂肪变, 小叶结构不清, 界限消失, 肝索排列紊乱, 小叶内和汇管区不同程度的炎症细胞浸润和坏死; HR组小鼠仍可见索条状排列的肝细胞, 脂变程度较模型组明显减轻, 且仅有轻微的炎性细胞浸润, 未见坏死灶(图1)。

2.3 体质量、肝质量和肝组织TG含量变化 与NC组相比, HF组体质量明显增加($P < 0.01$), 白藜芦醇治疗后体质量降至正常。HF组小鼠肝组织内TG较正常对照明显升高, HR组肝组织TG明显下降但未降至正常水平(表2)。

2.4 肝组织COX-2表达 正常对照组未见COX-2 mRNA和蛋白表达, HF组和HR组COX-2 mRNA

表2 小鼠体质量, 肝质量和肝脏TG水平 ($n = 10$, mean ± SD)

分组	体质量(g)	肝质量(g)	肝脏TG(mmol/g)
NC	33.2 ± 1.3	1.21 ± 0.11	0.083 ± 0.027
HF	42.1 ± 1.7 ^b	1.45 ± 0.24 ^b	0.216 ± 0.086 ^b
HR	34.3 ± 1.4 ^d	1.25 ± 0.23 ^d	0.122 ± 0.058 ^d

^b $P < 0.01$ vs NC; ^d $P < 0.01$ vs HF.

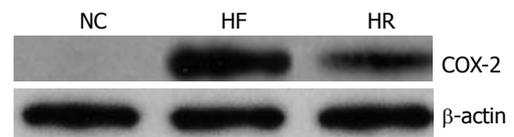


图2 小鼠肝脏内COX-2蛋白表达。

表达分别为1.48% ± 0.23%和0.76% ± 0.18%, 蛋白表达分别为27.9% ± 4.6%和11.2% ± 3.5%, 后两组与NC组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), HF和HR组之间差异亦有统计学意义($P < 0.01$, 图2)。

3 讨论

在脂肪肝的动物模型中, 主要有先天性、转基因动物和化学物质诱导以及高脂饲料诱导这4种实验性动物模型^[10]。用高脂饲料诱导的脂肪肝动物模型, 因其病理特征与人类相似, 且价格低廉、方法简单而广泛使用, 是诱导非乙醇性脂肪肝的常用方法^[2]。♂ C57BL/6J小鼠对NASH营养性肝损伤模型有显著易感性, 发生的病变最接近类似于人的组织学特征^[11-12]。本实验中C57BL/6J小鼠经过高脂喂养总共24 wk, 出现了明显的高血糖, 高脂血症, 肝脏内TG沉积增加, 肝脏大体观可见肝脏肿大, 颜色呈黄褐色, 严重者表面呈细颗粒状, 显微镜下观察肝组织弥漫性脂肪变, 小叶结构不清, 界限消失, 肝索排列紊乱, 小叶内和汇管区不同程度的炎症细胞浸润和坏死, 提示NASH诱导成功。

NASH是肝硬化和肝细胞癌的原因之一, 肝细胞TG的沉积产生脂肪浸润, 导致氧化应激和炎症等^[13-14]。COX是一种双功能酶, 具有环氧合

酶和过氧化氢酶活性, 是花生四烯酸分解为前列腺素的(prostaglandins, PGs)限速酶, 在人体内COX包括结构型COX-1和诱导型COX-2, 以及近几年新近发现的COX-3^[15]. 在COX的3种同工酶中, COX-2是经刺激迅速产生的诱导型酶, 正常情况下, COX-1呈原生性表达, 几乎分布于体内所有正常组织, COX-2在多数组织不表达或低表达, 而在炎症、肿瘤等病理状态其表达上调, 是有力的炎症介导因子^[16-17], 和炎症的程度以及纤维化的进展有高度相关^[18-19]. 高表达的COX-2使炎症介质PGE和TXB2等生成增加, 促进炎症细胞浸润, 同时还可通过调节NF- κ B释放多种炎症介质, 如TNF- α , IL-8, ICAM-1, E选择素(E-selectin)等^[20-21], 这些炎症介质又可进一步激活COX-2的表达, 形成一种正反馈环路, 扩大炎症反应, 延长炎症过程. Yu *et al*^[7]发现, 正常饮食的小鼠肝脏没有COX-2的表达, 而高脂饮食诱导的小鼠NASH肝组织COX-2的表达增加, 国内许树长 *et al*^[6]和刘晓珺 *et al*^[8]也有相同的发现. 本实验中正常对照组大鼠肝组织结构正常, RT-PCR检测无COX-2 mRNA表达, 经过24 wk高脂喂养的大鼠肝组织有明显COX-2 mRNA和蛋白的强表达, 表明COX-2在高脂饮食诱导的NASH中活动增强, 在脂肪性肝炎发生机制中具有重要作用.

目前认为, NASH小鼠肝组织COX-2的高表达是由于长期过量摄入高脂食物, 使脂肪大量贮积在肝细胞, 诱发脂质过氧化损伤, 导致库普弗细胞激活并释放炎症细胞因子和COX-2. Enomoto *et al*^[22]和Mohammed *et al*^[23]研究发现库普弗细胞等炎症浸润细胞是COX-2 mRNA的主要来源, 在炎症细胞浸润的肝组织中, COX-2表达明显升高, 而正常对照组库普弗细胞只表达COX-1. COX-2的产物前列腺素E2(PGE2)与肝细胞膜上的EP2/EP4受体结合后, 激活腺苷酸环化酶, 使肝细胞内的cAMP增多, 进一步引起TG在肝细胞内堆积, 进而导致脂肪肝及脂肪性肝炎的形成. 因此针对COX-2靶点的治疗措施将有助于NASH的改善.

白藜芦醇是一种多酚、非黄酮类植物抗毒素, 富含白藜芦醇的植物主要有葡萄、花生及中药虎杖等, 尤其在新鲜的葡萄皮中含量最高. 研究表明它具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗心血管疾病、诱导细胞凋亡、延长寿命等活性^[9,24-27]. 白藜芦醇的抗炎作用包括抑制炎症因子的合成和释放, 抑制某些活化的免疫细胞和

抑制COX-1和COX-2等^[24]. 既往的实验证明, 在急慢性结肠炎和 β 淀粉酶处理的神经胶质瘤细胞中, 白藜芦醇均可以抑制COX-2蛋白的表达水平, 具有明显的抗炎作用^[28-29]. 还有实验证明白藜芦醇可以使佛波醇诱导的小鼠皮肤COX-2的表达减少^[30], 并且是通过抑制IKK的活性起作用. Das *et al*^[24]的实验表明, 白藜芦醇主要是通过抑制转录因子NF- κ B和API的活性来下调COX-2表达. 我们的研究表明, 白藜芦醇可以明显改善NASH小鼠肝脏组织的炎症反应和脂肪变性, 降低血清TG和FBG, 同时肝脏COX-2的表达水平明显下降, 因此肝脏脂肪变性和炎症的改善至少部分与白藜芦醇下调肝脏局部的COX-2的表达有关. 由于NAFLD发病率在全球迅速增加, 而白藜芦醇在NASH的治疗中具有明显的作用, 值得进一步研究.

4 参考文献

- Deng XQ, Chen LL, Li NX. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Liver Int* 2007; 27: 708-215
- Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 1-16
- Mishra P, Younossi ZM. Current treatment strategies for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Curr Drug Discov Technol* 2007; 4: 133-140
- Ma X, Li Z. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 7-11
- Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Ma JX, Lu LG, Shi SL, Chen MH, Hu PJ. Prevalence of fatty liver disease and its risk factors in the population of South China. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6419-6424
- 许树长, 程琦, 张志强, 陈锡美, 杨文卓, 王胜兰, 王锋. 环氧合酶-2及肝细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝炎中的作用. *中华消化杂志* 2007; 27: 326-329
- Yu J, Ip E, Dela Pena A, Hou JY, Sessa J, Pera N, Hall P, Kirsch R, Leclercq I, Farrell GC. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* 2006; 43: 826-836
- 刘晓珺, 沈滨, 杜雅菊. 环氧合酶-2和基质金属蛋白酶-2在大鼠非酒精性脂肪性肝炎中的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 947-952
- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 493-506
- 倪鸿昌, 李俊, 金涌, 臧红梅, 彭磊. 大鼠实验性高脂血症和高脂血症性脂肪肝模型研究. *中国药理学通报* 2004; 20: 703-706
- Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, Kirsch RE, Hall Pde L. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1272-1282
- Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G871-G877
- Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G,

■应用要点
本文有助于了解NASH的发病机制并为白藜芦醇治疗NASH提供理论基础.

■同行评价

本研究分组合理,统计方法得当,结果可信,文笔流畅,具有较好的学术价值。

- Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med* 2008; 14: 72-81
- 14 Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, Vidali M. Review article: role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 Suppl 2: 71-73
- 15 Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13926-13931
- 16 Gilroy DW, Colville-Nash PR. New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med* 2000; 78: 121-129
- 17 Mann JR, Backlund MG, DuBois RN. Mechanisms of disease: Inflammatory mediators and cancer prevention. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 202-210
- 18 Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Okami J, Ito Y, Shimizu J, Eguchi H, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Matsuura N, Wakasa K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4005-4012
- 19 Cheng J, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Kubota A, Hada T. Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A(2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2002; 23: 185-195
- 20 Weinberg JB. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. *Immunol Res* 2000; 22: 319-341
- 21 Leclercq IA, Farrell GC, Sempoux C, dela Pena A, Horsmans Y. Curcumin inhibits NF-kappaB activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. *J Hepatol* 2004; 41: 926-934
- 22 Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Enomoto A, Nishiura T, Nishimura T, Brenner DA, Schemmer P, Bradford BU, Rivera CA, Zhong Z, Thurman RG. Kupffer cell-derived prostaglandin E(2) is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G100-G106
- 23 Mohammed NA, Abd El-Aleem SA, El-Hafiz HA, McMahon RF. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 350-354
- 24 Das S, Das DK. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007; 6: 168-173
- 25 Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, Zappia V, Della Ragione F. Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle* 2007; 6: 2495-2510
- 26 Stewart JR, Arttime MC, O'Brian CA. Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J Nutr* 2003; 133: 2440S-2443S
- 27 Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444: 337-342
- 28 Martin AR, Villegas I, Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 873-885
- 29 Kim YA, Lim SY, Rhee SH, Park KY, Kim CH, Choi BT, Lee SJ, Park YM, Choi YH. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells. *Int J Mol Med* 2006; 17: 1069-1075
- 30 Kundu JK, Shin YK, Kim SH, Surh YJ. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kappaB in mouse skin by blocking IkappaB kinase activity. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1465-1474

编辑 潘伯荣 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。(常务副总编辑:张海宁 2008-07-08)

菲立磁标记猪骨髓间充质干细胞自体肝内移植的MR成像

方亮, 施晓雷, 丁义涛

方亮, 施晓雷, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

方亮, 2005级南京大学硕士, 主要从事干细胞和生物人工肝的临床和基础研究。

作者贡献分布: 此课题由施晓雷与丁义涛设计; 研究过程由方亮操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由方亮提供; 数据分析由方亮与施晓雷完成; 本论文写作由方亮完成。

通讯作者: 丁义涛, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科。yitaoding@hotmail.com

电话: 025-83304616 传真: 025-83317016

收稿日期: 2008-03-08 修回日期: 2008-04-18

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-07-08

In vivo MRI of autologous swine Feridex-labeled mesenchymal stem cells transplanted into liver

Liang Fang, Xiao-Lei Shi, Yi-Tao Ding

Liang Fang, Xiao-Lei Shi, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yitaoding@hotmail.com

Received: 2008-03-08 Revised: 2008-04-18

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To label bone mesenchymal stem cells with Feridex and to evaluate the imaging of *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) of the labeled cells in swine liver.

METHODS: Mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from swine, cultured and expanded, then labeled with Feridex. Prussian blue staining was performed. Labeled MSCs group ($n = 6$) and unlabeled MSCs group ($n = 4$) were transplanted into swine liver via portal veins. MRI including T1WI, T2WI and T2*WI sequences was performed before and at 6 h, 3 d, 7 d after transplantation. MR imaging findings were analyzed histologically.

RESULTS: Prussian blue staining of Feridex-labeled MSCs showed approximately 100% labeling efficiency. Feridex labeling caused signal

intensity loss in liver on T2*WI sequences until day 7 after transplantation. Prussian blue staining of histological analysis showed homing of labeled MSCs in liver after 7 days, primarily distributed in hepatic sinusoids and liver parenchyma.

CONCLUSION: Feridex can be used to label MSCs *in vitro* successfully. MRI can monitor Feridex-labeled MSCs transplanted into liver.

Key Words: Mesenchymal stem cells; Feridex; Cell transplantation; Magnetic resonance imaging

Fang L, Shi XL, Ding YT. *In vivo* MRI of autologous swine Feridex-labeled mesenchymal stem cells transplanted into liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2097-2101

摘要

目的: 探索标记细胞肝内移植后磁共振成像技术。

方法: 获取猪自体骨髓间充质干细胞, 分离、培养。应用菲立磁(Feridex)标记细胞, 普鲁士蓝染色鉴定, 标记细胞组($n = 6$)和未标记细胞组($n = 4$)行经门静脉行肝内移植, 分别于移植前, 移植后6 h、3 d、7 d行磁共振T1WI, T2WI, T2*WI序列成像, 同时行组织切片普鲁士蓝染色。

结果: 普鲁士蓝染色表明MSCs的标记率达接近100%, 磁标记MSCs肝内移植后行磁共振T2*WI序列呈明显低信号改变, 并持续至细胞移植后7 d, 组织切片普鲁士蓝染色显示7 d后肝内仍有移植的磁标记细胞存在于肝实质及肝血窦中。

结论: 利用Feridex可以在体外成功标记猪骨髓间充质干细胞, 肝脏移植后行磁共振可以对标记细胞进行活体成像。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 菲立磁; 干细胞移植; 磁共振成像

方亮, 施晓雷, 丁义涛. 菲立磁标记猪骨髓间充质干细胞自体肝内移植的MR成像. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2097-2101

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2097.asp>

■背景资料

干细胞移植在治疗急性肝衰竭及遗传代谢性肝脏疾病方面具有很好的前景, 但移植细胞在活体内的转归、迁移却一直是研究难题。

■同行评议者

邱双健, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

■ 研发前沿

骨髓间充质干细胞可以作为种子细胞用于肝移植的替代治疗,建立无创伤的活体示踪技术可以解决干细胞移植后如何定位、迁移及转归。

0 引言

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)已被证实可在体内、外均能分化为具有正常功能的肝样细胞,因此干细胞移植在治疗急性慢性肝衰竭及遗传代谢性肝脏疾病方面具有很好的前景,但移植细胞在活体内转归、迁移却一直是研究难题。1999年Weissleder *et al*提出分子影像学(molecular imaging, MI)的概念^[1],现已成为影像医学和相关临床医学的研究热点,使得活体细胞示踪成为可能。我们采用菲立磁(Feridex)标记自体骨髓间充质干细胞,通过门静脉肝内移植后进行活体MR成像研究,探讨其在正常肝脏内的成像特点,为进一步动物肝衰模型进行细胞移植活体示踪研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康家猪10头,雌雄不限,20 kg左右,由南京大学附属鼓楼医院实验动物中心提供。Feridex购自美国Advanced Magnetics公司,L-DMEM培养液、特级胎牛血清、胰蛋白酶购自Gibco公司,淋巴细胞分离液购自TBD公司,台盼蓝,多聚赖氨酸(PLL, p1524)购自Sigma公司,普鲁士蓝染色试剂盒购自上海元象生物公司。

1.2 方法

1.2.1 MSCs的分离和培养: 实验家猪用氯胺酮(10 mg/kg)肌肉麻醉后,于髂后上棘穿刺,抽取骨髓液15 mL。将获取骨髓液按1:1比例缓慢加入到密度为1.077的淋巴细胞分离液中,以2200 r/min离心25 min,收集中间云雾状的界面层,L-DMEM重悬2次后,接种于25 mL的培养瓶中,培养液为90% L-DMEM,及10%胎牛血清,置于37°C, 50 mL/L CO₂环境中培养,24 h后首次换液弃去未贴壁悬浮细胞,以后根据细胞生长情况每3天换液,第7-10天细胞生长占瓶底面积超过90%形成融合时,用2.5 g/L的胰酶消化,按1:2进行传代,重复操作,传至第5代,培养过程中倒置相差显微镜下对培养中的细胞进行观察。

1.2.2 Feridex体外标记MSCs及普鲁士蓝染色鉴定: 将含铁浓度为11.2 mg/L的Feridex用L-DMEM稀释至50 μg/L,PLL用L-DMEM稀释至1.5 μg/L,两者混合振荡60 min形成耦联复合物^[2],即终浓度分别为含铁25 μg/L和含多聚赖氨酸0.75 μg/L的L-DMEM培养液。P5代MSCs加入此培养液接种于培养瓶及置有盖玻片的六孔培养板中,在37°C, 50 mL/L CO₂培养箱中孵育12 h进行细胞标记。普鲁士蓝染色: 上述接种于六孔

培养板的P5代细胞,取出盖玻片,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,40 g/L多聚甲醛4°C下固定30 min,蒸馏水冲洗2次,20 g/L酸性亚铁氰化钾(含6%盐酸)孵育染色20 min,蒸馏水冲洗2次,核固红复染,光学显微镜下观察。

1.2.3 Feridex标记MSCs后肝内移植: 所有动物均同室同条件下饲养,随机分为2组:对照组, $n = 4$,经门静脉移植未标记的自体MSCs; 实验组, $n = 6$,经门静脉移植Feridex标记的自体MSCs。

标记细胞及未标记细胞均用2.5 g/L胰酶消化, PBS洗涤3次,分别制成2 mL细胞悬液,含细胞数量约 1×10^7 。移植方法: 动物麻醉后,消毒腹部皮肤,分层进入腹腔,暴露肝脏,解剖肝门部,寻找门静脉,用头皮针斜行穿刺入门静脉,注射器在向门静脉内缓慢推注2 mL细胞悬液。拔针后局部按压止血,见无明显渗血后,生理盐水冲洗腹腔,逐层关腹。

1.2.4 MRI检查: 实验组与对照组分别于移植前、移植后6、3、7 d行MRI检查。动物麻醉后,采用Philips 1.5T超导磁共振扫描仪进行扫描,膝关节线圈检查。动物取仰卧位,四肢固定于塑料平板上。扫描序列: SE序列: T1WI, TR 120 s, TE 14 ms; 快速自旋回波序列(FSE): T2WI, TR 3000 ms, TE 96 ms; 梯度回波序列(GRE): T2*WI, TR 485 ms, TE 14 ms, 反转角18度。

1.2.5 组织学检查: MRI检查1 wk后处死动物,取出肝脏,随机取肝血管及周围组织,甲醛固定后制成石蜡切片,行普鲁士蓝染色。

2 结果

2.1 MSCs形态学特点: 接种后24 h后首次换液,可见少量类圆形细胞贴壁生长。原代培养3 d后,镜下可见单个或少量成集落生长贴壁细胞,形态大多呈短梭形,7-10 d后,细胞集落不断扩大并形成融合单层,细胞形态大多呈长梭形或多角形,传至第5代, MSCs逐渐纯化,类似成纤维细胞,呈均匀分布生长(图1), Feridex标记的MSCs与未标记的MSCs镜下观察形态上无明显区别。

2.2 普鲁士蓝染色: Feridex标记MSCs后普鲁士蓝染色可见几乎每个标记细胞内均有数量不等的蓝染颗粒(图2A), 镜下随机计数标记细胞,标记率接近100%,高倍视野下可见蓝染颗粒分布于胞质内,而未标记细胞内无蓝染颗粒(图2B)。

2.3 磁共振成像: 实验组磁标记MSCs经门静脉移植前磁共振图像(图3A), 6 h后行磁共振在T2*WI序列可见门静脉主干及分支内有明显的

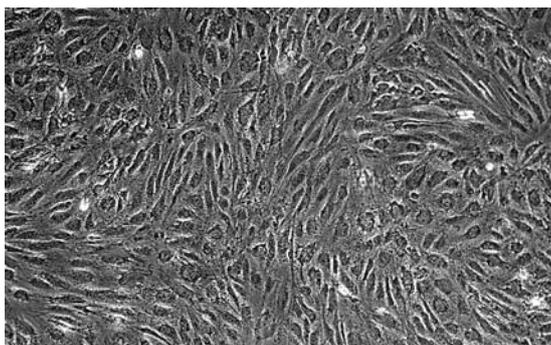


图 1 P5代猪骨髓间充质干细胞(×100).

低信号改变(图3B箭头所示), 随时间延长, 该处低信号强度逐渐减弱, 7 d后无明显低信号改变(图3C); 而T1WI和T2WI序列各时间点未见明显低信号变化(图3D-E). 对照组门静脉移植未标记的干细胞, 行磁共振各序列扫描均未见低信号变化.

2.4 组织学检查: 实验组可见点状蓝染细胞散在分布于肝血管及周围实质中(图4). 对照组普鲁士蓝染色未见蓝染阳性细胞.

3 讨论

近年来已发现MSCs在体内与体外均能诱导分化为具有正常功能的肝样细胞. 1999年, Petersen *et al*^[3]通过对不同性别、不同品系的大鼠骨髓移植后的肝细胞的研究发现, 接受骨髓移植的鼠肝内存在骨髓来源的肝细胞. Theise *et al*^[4]和Alison *et al*^[5]证实这种现象不仅出现在大鼠体内, 而且也存在于人体内. Theise *et al*^[6]进一步发现在接受骨髓移植和肝移植患者的体内, 约4%-43%的肝细胞和4%-38%的胆管细胞来源于骨髓干细胞的横向分化, 而这种细胞的转化量有随肝脏损伤的程度和时间的增加而增加的倾向. 国内有报道^[7]在体外诱导小鼠骨髓干细胞分化为肝样细胞, 并表达HNF-3 β 、ALB、CK-18、TTR、G-6-Pase和TAT等肝细胞特异性标志物. 以上体内及体外实验结果均表明骨髓干细胞是肝细胞的重要肝外来源, 在特定的条件下可分化为肝细胞, 参与肝脏的再生. 但是, 干细胞移植入肝内后, 是怎样的一个转归过程, 其定位、迁移、分裂及分化的过程是怎样的? 目前, 国内外的方法基本是通过离体状态下组织切片的分析, 无法进行动态的监测, 而建立无创伤的活体示踪技术不仅可以解决这些问题, 也可作为干细胞肝内移植的客观、安全的评估标准.

分子影像学提出后, 细胞活体示踪成为可

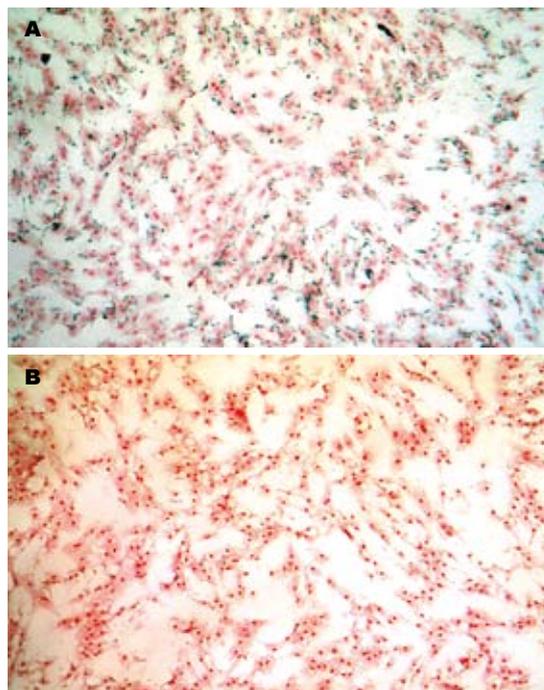


图 2 菲立磁标记MSCs后普鲁士蓝染色(×100). A: 标记细胞染色, 细胞内可见蓝染颗粒, 标记率99%以上; B: 未标记细胞染色, 细胞内未见蓝染颗粒.

能, 众多影像学技术中MRI有效成像时间长, 可观察细胞的动态迁徙过程, 且空间、时间分辨率高, 对比度好等特点, 适合用于研究活体细胞示踪. 应用MRI进行活体示踪需要先体外标记示踪剂, 超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)是目前研究最多, 最有前景的一类对比示踪剂, 其特点是粒径小, 一般直径在nm数量级, 穿透力及弛豫率强, 对外加磁场具有高敏感性, 在较弱的磁场中, 即可产生较大的磁性, 而撤除外加磁场后磁性也迅速消失.

SPIO类最初被用来标记淋巴细胞、白细胞等进行免疫研究^[8], 近年来由于干细胞移植的开展, 开始应用于标记干细胞后移植到动物心脏、肾脏等进行活体示踪^[9-11]. Feridex是美国FDA认可的一种临床上使用的SPIO对比剂, 基本结构是以葡聚糖包裹氧化铁颗粒, 进入人体后主要分布在肝脏的枯否细胞内, 被细胞代谢后进入正常血浆铁池, 参与体内铁的再利用^[12]. 由于细胞膜和Feridex表面都带有负电荷, 两者相互排斥, 所以未经修饰的Feridex不能有效标记细胞, 国内外多利用特异性抗体或转染剂介导进行细胞标记^[13-16], 我们采用PLL作为转染剂介导进行磁标记, 主要是通过静电相互作用, 带负电荷的Feridex与带正电荷的PLL形成耦联复合物, 刺激细胞膜内吞作用, 将铁颗粒转运至细

■创新盘点

本文首次研究猪骨髓间充质干细胞移植后在活体肝脏内细胞动态变化及其转归过程.

■名词解释

菲立磁: 是美国FDA认可的一种临床上使用的磁共振对比剂, 基本结构是以葡聚糖包裹氧化铁颗粒, 属于超顺磁性氧化铁, 可用于标记细胞进行磁共振活体示踪。

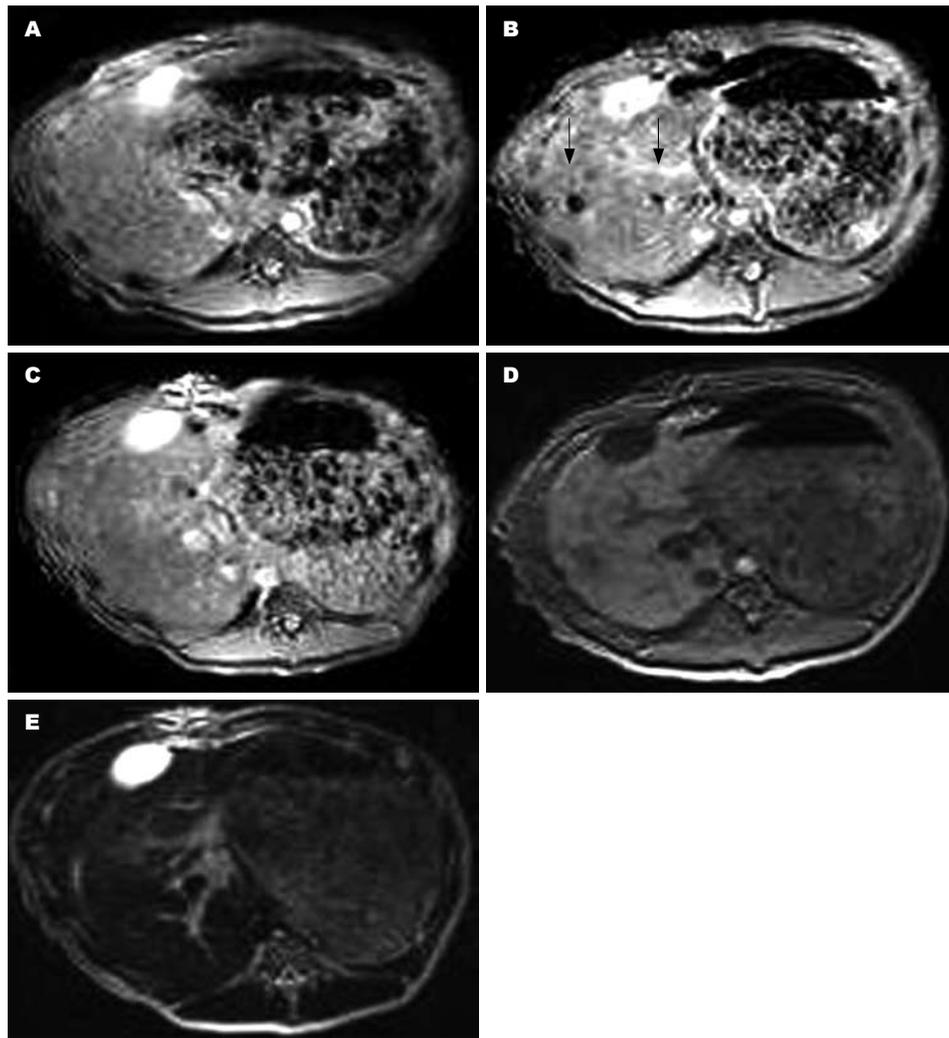


图3 猪肝脏MR图像. A: 实验组移植前T2*WI序列; B: 移植后6 h时序列, 箭头所示处有明显低信号改变; C: 7 d后T2*WI序列, 原箭头所示无明显低信号变化; D: 实验组移植后6 h T1WI序列; E: 实验组移植后6 h T2WI序列.

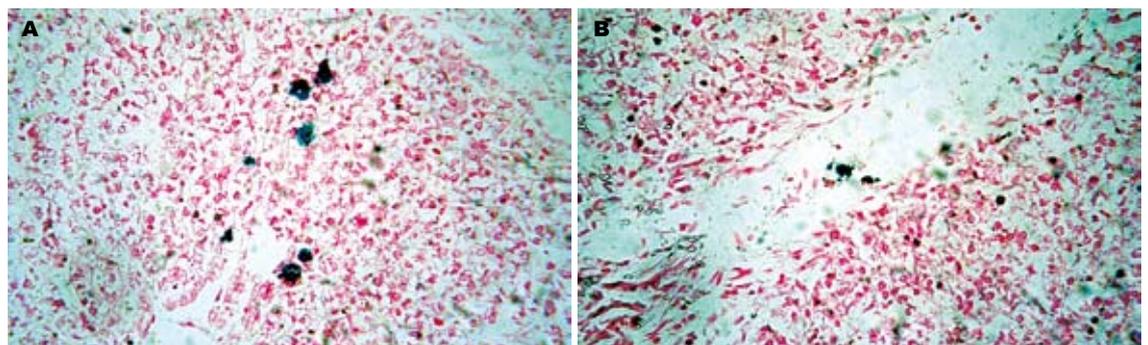


图4 肝脏组织切片行普鲁士蓝染色($\times 100$). A: 蓝染阳性细胞位于肝实质内; B: 蓝染阳性细胞位于肝血窦中.

胞内, 实验表明其标记有效率高达99%以上^[9]. Feridex作为临床常用的MR对比剂, 已证实对机体是安全的, 而作为细胞标记物, 研究也表明在一定浓度范围内, 对细胞增殖无明显影响^[2,17], 至于对细胞功能及分化有无影响, 则还需进一步研究证实.

由于SPIO类的特殊形态结构, 在磁共振成

像时主要是磁标记细胞起周围组织的质子弛豫时间改变, 即加速质子去相位的T2弛豫, 使组织信号降低, 故信号改变主要发生梯度回波T2*WI序列, 而在T1WI及T2WI无明显信号改变. 在我们的实验中, 磁标记细胞移植后6 h行磁共振显示门静脉主干及分支有明显低信号改变, 以后随着时间的延长, 低信号改变逐渐减弱, 1 wk后

基本不显影, 但此时处死动物行组织普鲁士蓝染色仍可发现少量蓝染的含铁颗粒细胞, 提示Feridex标记的干细胞移植后1 wk仍然在肝脏内有残留, 只是因为数量不足, 此时已不能在磁共振上引起低信号改变。有报道磁标记细胞被移植于心肌或脑等致密性组织器官^[18-19], 移植细胞多局限分布, 很少发生迁移, 活体MR成像表现为移植局部低信号影, 其余器官无信号改变, 本实验是经门静脉肝脏细胞移植, 故移植细胞有随血管迁移至肝外的可能, 从而信号改变逐渐降低; 同时考虑到正常肝脏内并无适合干细胞定植及生长增殖的微环境, 因此这种信号的减低亦有可能是因为移植的干细胞不断死亡, 铁颗粒弥散出细胞参与体内代谢而被清除导致的。这些都表明细胞数量变化与信号强度改变之间存在一定的关系, 因此是否可以根据信号的改变来监测移植细胞在肝内的增殖和分布还需要进一步实验研究。

本次实验的结果表明Feridex联合PLL可以有效地标记猪骨髓间充质干细胞, 细胞移植肝脏后在梯度回波T2*WI序列的低信号变化最明显, 在此基础上, 我们下一步将在动物急性肝衰竭模型中进行自体骨髓干细胞磁标记移植后的MRI动态示踪, 进一步研究干细胞在肝内的分布、迁移及转归。

4 参考文献

- Weissleder R. Molecular imaging: exploring the next frontier. *Radiology* 1999; 212: 609-614
- Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology* 2003; 229: 838-846
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- Shi XL, Qiu YD, Wu XY, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, Li L, Ding YT. In vitro differentiation of mouse bone marrow mononuclear cells into hepatocyte-like cells. *Hepatol Res* 2005; 31: 223-231
- Dodd CH, Hsu HC, Chu WJ, Yang P, Zhang HG, Mountz JD Jr, Zinn K, Forder J, Josephson L, Weissleder R, Mountz JM, Mountz JD. Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles. *J Immunol Methods* 2001; 256: 89-105
- Frank JA, Zywicke H, Jordan EK, Mitchell J, Lewis BK, Miller B, Bryant LH Jr, Bulte JW. Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents. *Acad Radiol* 2002; 9 Suppl 2: S484-S487
- Bos C, Delmas Y, Desmoulière A, Solanilla A, Hauger O, Grosset C, Dubus I, Ivanovic Z, Rosenbaum J, Charbord P, Combe C, Bulte JW, Moonen CT, Ripoche J, Grenier N. In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology* 2004; 233: 781-789
- Küstermann E, Roell W, Breitbach M, Wecker S, Wiedermann D, Buehrle C, Welz A, Hescheler J, Fleischmann BK, Hoehn M. Stem cell implantation in ischemic mouse heart: a high-resolution magnetic resonance imaging investigation. *NMR Biomed* 2005; 18: 362-370
- Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, Compton CC, White DL, Jacobs P, Lewis J. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol* 1989; 152: 167-173
- Josephson L, Tung CH, Moore A, Weissleder R. High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem* 1999; 10: 186-191
- Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, Herynek V, Jordan EK, Duncan ID, Frank JA. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 15256-15261
- Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, Weissleder R. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 410-414
- Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, Zywicke H, Miller B, van Gelderen P, Moskowitz BM, Duncan ID, Frank JA. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1141-1147
- Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Bulte JW, Frank JA. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation* 2003; 76: 1123-1130
- Hoehn M, Küstermann E, Blunk J, Wiedermann D, Trapp T, Wecker S, Föcking M, Arnold H, Hescheler J, Fleischmann BK, Schwindt W, Buehrle C. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16267-16272
- Hill JM, Dick AJ, Raman VK, Thompson RB, Yu ZX, Hinds KA, Pessanha BS, Guttman MA, Varney TR, Martin BJ, Dunbar CE, McVeigh ER, Lederman RJ. Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation* 2003; 108: 1009-1014

■同行评价

本研究充分利用分子影像学技术, 为进一步动物肝衰竭模型进行细胞活体示踪研究奠定基础, 具有一定的临床应用价值。

小檗碱对3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型PI-3K p85蛋白表达的影响

易屏, 陆付耳, 陈广, 徐丽君, 董慧, 王开富

■背景资料

小檗碱是从黄连等植物中提取的一种异喹啉类生物碱, 最初作为清热解毒药和抗炎药应用于临床。最新报道指出小檗碱还具有改善胰岛素抵抗, 降低血糖, 纠正脂质紊乱的作用。IR是指胰岛素信号转导能力的减低, 磷脂酰肌醇-3激酶(PI-3K)是胰岛素信号转导中的关键分子。那么小檗碱是否通过促进PI-3K p85蛋白的表达而改善胰岛素抵抗, 有待深入研究。

易屏, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中医科 湖北省武汉市 430030

陆付耳, 陈广, 徐丽君, 董慧, 王开富, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 湖北省武汉市 430030
易屏, 医学博士, 主要从事中西医结合消化和内分泌的临床与科研。

国家自然科学基金资助项目, No. 30371816

作者贡献分布: 易屏与陆付耳对此文所作贡献均等; 此课题由易屏和陆付耳设计; 研究过程由易屏, 陈广, 徐丽君, 董慧及王开富操作完成; 数据分析由易屏完成; 本论文写作由易屏完成。

通讯作者: 陆付耳, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所. felu@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83663237 传真: 027-83663237

收稿日期: 2008-04-01 修回日期: 2008-04-25

接受日期: 2008-05-05 在线发表日期: 2008-07-08

Effects of berberine on PI-3K p85 protein expression in insulin-resistant cell model in 3T3-L1 adipocytes

Ping Yi, Fu-Er Lu, Guang Chen, Li-Jun Xu, Hui Dong, Kai-Fu Wang

Ping Yi, Department of Traditional Chinese Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Fu-Er Lu, Guang Chen, Li-Jun Xu, Hui Dong, Kai-Fu Wang, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30371816

Correspondence to: Fu-Er Lu, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. felu@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2008-04-01 Revised: 2008-04-25

Accepted: 2008-05-05 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of berberine on PI-3K p85 protein expression in insulin-resistant cell model in 3T3-L1 adipocytes and its possible molecular mechanism.

METHODS: 3T3-L1 adipocytes were treated with 0.5 mmol/L palmitic acid or with 25 mmol/L glucose in combination with 0.6 nmol/L insu-

lin to induce insulin resistance. Berberine was used for treatment and aspirin was used for positive control. 2-deoxy- ^3H -D-glucose method was used for determination of glucose uptake. Western blot was performed to estimate protein expression of PI-3K p85.

RESULTS: After the intervention of palmitic acid for 24 h or 25 mmol/L glucose with 0.6 nmol/L insulin for 18 h, the insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes was inhibited by 67% and 60% respectively. Meanwhile, the expression of PI-3K p85 protein was significantly reduced compared with normal control group ($P < 0.01$). However, berberine reversed above phenomenon and significantly enhanced PI-3K p85 protein expression ($P < 0.01$). The expression rate of PI-3K p85 protein was time- and dose-dependent on berberine.

CONCLUSION: Insulin resistance induced by FFAs or high glucose in 3T3-L1 adipocytes can be improved by berberine and its molecular mechanism might be associated with the expression of PI-3K p85.

Key Words: Berberine; Insulin resistance; PI-3K p85; Free fatty acids; High glucose

Yi P, Lu FE, Chen G, Xu LJ, Dong H, Wang KF. Effects of berberine on PI-3K p85 protein expression in insulin-resistant cell model in 3T3-L1 adipocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2102-2106

摘要

目的: 研究小檗碱对3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型PI-3K p85蛋白表达的影响, 探讨小檗碱改善胰岛素抵抗的分子机制。

方法: 分别以0.5 mmol/L软脂酸与25 mmol/L葡萄糖加0.6 nmol/L胰岛素诱导3T3-L1脂肪细胞产生胰岛素抵抗, 予以小檗碱进行干预, 同时以阿司匹林作为阳性对照, 以2-脱氧- ^3H -D-葡萄糖摄入法观察葡萄糖的转运率, 用Western blot检测PI-3K p85蛋白的表达。

■同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

结果: 0.5 mmol/L软脂酸作用24 h或25 mmol/L葡萄糖加0.6 nmmol/L胰岛素作用18 h分别使3T3-L1脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运抑制67%和60%, Western blot显示PI-3K p85蛋白表达减少, 与正常对照组比较有统计学意义($P<0.01$); 同时加入小檗碱则可逆转上述效应使PI-3K p85蛋白表达增加, 与模型组比较有明显差异($P<0.01$), 并且PI-3K p85蛋白的表达与小檗碱的剂量和作用时间呈依赖关系。

结论: 小檗碱可以明显改善游离脂肪酸和高糖诱导的胰岛素抵抗, 其分子机制可能与小檗碱提高PI-3K p85蛋白的表达有关。

关键词: 小檗碱; 胰岛素抵抗; PI-3K p85; 游离脂肪酸; 高糖

易屏, 陆付耳, 陈广, 徐丽君, 董慧, 王开富. 小檗碱对3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型PI-3K p85蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2102-2106

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2102.asp>

0 引言

小檗碱(berberine, Ber)是从黄连等植物中提取的一种异喹啉类生物碱。新近研究表明小檗碱具有改善胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), 降低血糖, 纠正脂质紊乱的作用^[1-4]。在细胞水平, IR是指胰岛素信号转导能力的减低, 这种信号转导从胰岛素受体向下到达胰岛素作用的终末底物, 涉及到细胞功能的多种代谢和促有丝分裂方面。胰岛素通过胰岛素信号转导路径发挥其促进合成代谢、稳定血糖的生理作用, 其中磷脂酰肌醇-3激酶(PI-3K)是胰岛素信号转导中的关键分子。那么小檗碱是否通过促进PI-3K p85蛋白的表达而改善IR呢? 本研究分别以游离脂肪酸和高糖诱导3T3-L1脂肪细胞产生胰岛素抵抗, 观察小檗碱对3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型PI-3K p85蛋白表达的影响, 探讨小檗碱改善胰岛素抵抗的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 盐酸小檗碱、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、地塞米松、胰岛素、软脂酸(PA)、乙酰水杨酸钠(阿司匹林)、不含游离脂肪酸的BSA(FAF BSA)、DMSO和细胞松弛素B均购自Sigma公司; DMEM和胎牛血清(FBS)购自Gibco BRL公司; 2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖(北京原子高科股份有限公司), 3T3-L1前脂肪细胞(3T3-L1 preadipocyte)(中国医学科学院基础

医学研究所细胞中心), 兔PI-3K p85抗体(Santa Cruz公司), 兔 β -actin抗体(Lab Vision公司), 蛋白Marker(Fermentas公司), 辣根酶标记山羊抗兔IgG、BCA蛋白检测试剂盒和增强化学发光法(ECL)试剂盒(Pierce公司), 其他化学试剂均为分析纯。SH87261616型CO₂培养箱(美国Sheldon公司); 倒置相差显微镜(日本Olympus CHK公司); YJ-1450型医用净化工作台(苏州净化设备公司); Micro Beta 1540型液闪仪(美国PE公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及诱导分化: 在37°C、50 mL/L的CO₂的条件下, 3T3-L1前脂肪细胞在含100 mL/L FBS的高糖DMEM中培养, 待细胞融合2 d后, 加入含0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、1 μ mol/L地塞米松、10 mg/L胰岛素和100 mL/L FBS的高糖DMEM培养48 h, 然后换上含10 mg/L胰岛素和100 mL/L FBS的高糖DMEM再培养48 h, 随后以100 mL/L FBS的高糖DMEM继续培养, 2 d换培养液1次, 诱导分化8-12 d的3T3-L1细胞90%-95%呈脂肪细胞表型, 可用于实验^[5]。

1.2.2 高游离脂肪酸诱导的胰岛素抵抗细胞模型的建立与分组: 将诱导分化成熟的3T3-L1脂肪细胞换上含2 g/L BSA的DMEM无血清培养液培养12 h后, 分别换上含0.5 mmol/L软脂酸(PA)10 g/L FAF BSA的DMEM培养24 h(模型组, Mod); 含0.5 mmol/L PA, 10 μ mol/L Ber, 10 g/L FAF BSA的DMEM培养24, 48 h(小檗碱高剂量组, BH24, BH48); 含0.5 mmol/L PA, 1 μ mol/L Ber, 10 g/L FAF BSA的DMEM培养24, 48 h(小檗碱低剂量组, BL24, BL48); 含0.5 mmol/L PA, 5 mmol/L阿司匹林(Aspirine), 10 g/L FAF BSA的DMEM培养24, 48 h(阿司匹林组, As24, As48); 含10 g/L BSA的DMEM培养24 h(正常组, Nor)。

1.2.3 高糖诱导的胰岛素抵抗细胞模型的建立与分组处理: 将诱导分化成熟的3T3-L1脂肪细胞换上含2 g/L BSA的DMEM无血清培养液培养12 h后, 分别换上含25 mmol/L葡萄糖, 0.6 nmmol/L胰岛素, 10 g/L BSA的DMEM培养18 h(模型组, Mod); 含25 mmol/L葡萄糖, 0.6 nmmol/L胰岛素, 10 μ mol/L Ber, 10 g/L BSA的DMEM培养24, 48 h(小檗碱高剂量组, BH24, BH48); 含25 mmol/L葡萄糖, 0.6 nmmol/L胰岛素, 1 μ mol/L Ber, 10 g/L BSA的DMEM培养24, 48 h(小檗碱低剂量组, BL24, BL48); 含25 mmol/L葡萄糖, 0.6 nmmol/L胰岛素, 5 mmol/L阿司匹林(Aspirine), 10 g/L BSA的DMEM培养24 h, 48 h(阿司匹林组, As24, As48);

■ 研发前沿

小檗碱改善胰岛素抵抗(IR)的分子机制一直是人们研究的热点。近年来, IR的发病机制, 尤其是其分子靶点及其信号转导机制受到极大关注。

■相关报道

有研究显示, 2型糖尿病鼠(ob/ob小鼠和fa/fa鼠)肝细胞中PI-3K中的P85亚基较正常组降低一半左右, 而肌肉和脂肪中无明显改变; 高脂喂养的SD大鼠肌肉和脂肪中的PI-3K活性明显低于正常对照; 2型糖尿病患者的骨骼肌和脂肪细胞中PI-3K基因表达调控有缺陷. 以上证据说明IR时, 胰岛素靶细胞中的PI-3K的含量和活性均降低, 并存在对胰岛素刺激的敏感性缺陷. 此外, 多种致IR物质, 如FFA、TNF- α 等也可影响PI-3K活性, 说明PI-3K是这些物质导致IR的中介分子之一.

表 1 高游离脂肪酸与高糖模型各组3T3-L1脂肪细胞对CCK-8的影响 (mean \pm SD, $n = 9$)

分组	高游离脂肪酸模型CCK-8值	高糖模型CCK-8值
Nor	1.869 \pm 0.050	1.869 \pm 0.050
Mod	1.848 \pm 0.057	1.855 \pm 0.019
BH48	1.830 \pm 0.066	1.849 \pm 0.020
BL48	1.846 \pm 0.019	1.854 \pm 0.019
As48	1.819 \pm 0.141	1.837 \pm 0.023
BH24	1.836 \pm 0.047	1.856 \pm 0.025
BL24	1.852 \pm 0.050	1.854 \pm 0.021
As24	1.803 \pm 0.088	1.845 \pm 0.030

含10 g/L BSA的DMEM培养24 h(正常组, Nor).

1.2.4 葡萄糖转运实验: 将24孔板中诱导分化成熟的3T3-L1脂肪细胞以含2 g/L BSA的DMEM培养液培养12 h, 换以含2 g/L BSA的含药培养液孵育一定时间后, 移去培养液, 以KRP缓冲液(131.2 mmol/L NaCl, 4.71 mmol/L KCl, 2.47 mmol/L CaCl₂, 1.24 mmol/L MgSO₄, 2.48 mmol/L Na₃PO₄, 10 mmol/L HEPES, pH7.4)洗3次, 再以含或不含100 nmol/L 胰岛素的KRP 缓冲液37 $^{\circ}$ C孵育30 min, 加入1 mL含0.5 mCi/L 2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖的KRP缓冲液37 $^{\circ}$ C孵育10 min, 以预冷含10 mmol/L葡萄糖的PBS快速洗3次中止反应, 加1 mL 0.1 mol/L NaOH作用2 h, 取细胞裂解液, 用液闪仪计数其每分钟衰变数. 另设一组加10 μ mol/L细胞松弛素B作为2-脱氧-[³H]-D-葡萄糖的非特异摄取率, 所有数据减去此值, 作为各组细胞的葡萄糖摄取率^[6]. 每次实验设三复孔, 共重复3次实验. 另用CCK-8法监测细胞的数目和活力^[7].

1.2.5 Western blot: 分化成熟、软脂酸(0.5 mmol/L)、高糖(25 mmol/L)加胰岛素(0.6 nmmol/L)、小檗碱(10 μ mol/L, 1 μ mol/L)、阿司匹林(5 mmol/L)分别处理24、48 h的3T3-L1脂肪细胞用细胞裂解液裂解后提取总蛋白, 用BCA试剂盒测定蛋白浓度. 取等量的蛋白样品50 μ g用样品缓冲液处理, 蛋白变性、SDS-PAGE胶电泳分离蛋白、电转移法使蛋白转移至PDVF膜上, 用含5%脱脂奶粉的TBST(Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH7.4, 0.1% Tween-20)室温下封闭2 h以减少非特异性结合, 封膜后加入兔PI-3K p85抗体为特异性第一抗体, 4 $^{\circ}$ C过夜, TBST洗膜后以辣根过氧化化酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG作为二抗(1:3000)孵育, 室温下轻摇2 h, TBST洗膜后用ECL化学发光法曝光显影, 洗片后用Bio-Rad图像分析系统对Western blot目的条带进行扫描, 然后

用Quantity One软件进行分析.

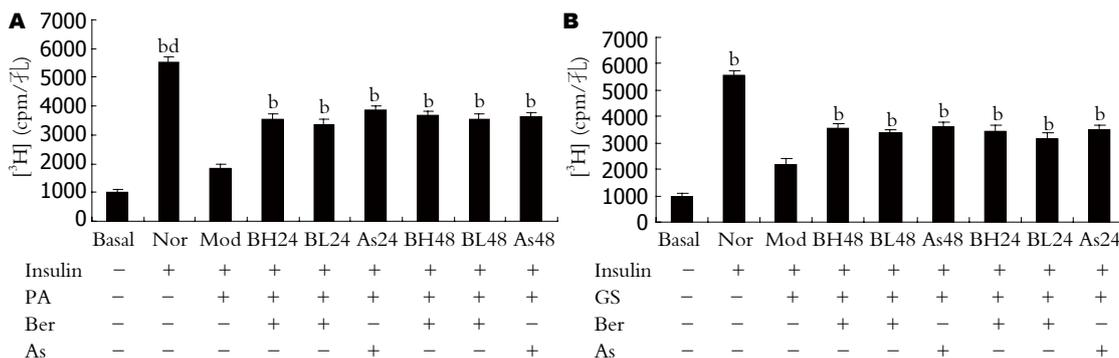
统计学处理 所有数据采用SPSS13.0软件包进行分析, 实验数据用mean \pm SD表示, 组间数据的比较采用两样本均值的 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 小檗碱对高游离脂肪酸诱导的3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型葡萄糖转运的影响 葡萄糖转运实验发现, 诱导分化成熟的3T3-L1脂肪细胞, 胰岛素刺激的葡萄糖转运较基础状态下明显增加, 是基础状态下的5.6倍, 0.5 mmol/L软脂酸作用24 h使3T3-L1脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运抑制67%; 加入1 μ mol/L, 10 μ mol/L小檗碱作用24 h后3T3-L1脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运分别增加82%、93%, 作用48 h后分别增加93%、101%, 呈剂量时间依赖效应; 加入5 mmol/L阿司匹林作用24 h后3T3-L1脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运增加109%, 作用48 h后增加97%, 这与阿司匹林作用48 h后对细胞产生一定的毒性作用使细胞活力和细胞数降低有关(图1A). CCK-8结果显示: 0.5 mmol/L软脂酸作用24 h或同时加入1 μ mol/L、10 μ mol/L小檗碱作用24、48h或同时加入5 mmol/L阿司匹林作用24 h对3T3-L1脂肪细胞的CCK-8值均无影响, 与正常组比较, $P > 0.05$; 加入5 mmol/L阿司匹林作用48 h脂肪细胞的CCK-8值有轻度下降, 但无统计学意义(表1).

2.2 小檗碱对高糖诱导的3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型葡萄糖转运的影响 5 mmol/L葡萄糖加0.6 nmmol/L胰岛素作用18 h使3T3-L1脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运抑制60%; 加入1 μ mol/L, 10 μ mol/L小檗碱作用24 h后3T3-L1脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运分别增加46%、56%, 作用48 h后分别增加52%、61%, 呈时间剂量依赖效应, 加入5 mmol/L阿司匹林作用24 h后3T3-L1脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运增加58%, 作用48 h后增加65%(图1B). CCK-8结果显示: 25 mmol/L葡萄糖加0.6 nmmol/L胰岛素培养18 h或同时加入1 μ mol/L、10 μ mol/L小檗碱作用24 h、48 h或同时加入5 mmol/L阿司匹林作用24 h, 48 h对3T3-L1脂肪细胞的CCK-8值均无影响, 与正常组比较, $P > 0.05$ (表1).

2.3 小檗碱对高游离脂肪酸诱导的3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型PI-3K p85蛋白表达的影响 采用Western blot检测3T3-L1脂肪细胞PI-3K p85蛋白的表达, 0.5 mmol/L软脂酸作用24 h可以明显



应用要点
 本实验通过研究小檗碱对3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型PI-3K p85蛋白表达的影响, 探讨了小檗碱改善胰岛素抵抗的分子机制, 为“糖尿病从毒论治”的假说和清热解毒法防治2型糖尿病的临床运用提供了实验依据。

图 1 高游离脂肪酸和高糖模型各组3T3-L1脂肪细胞对2-脱氧-³H-D-葡萄糖的摄取. A: 高游离脂肪酸模型; B: 高糖模型; Basal: 基础状态. ^b*P*<0.01 vs Mod; ^d*P*<0.01 vs Basal.

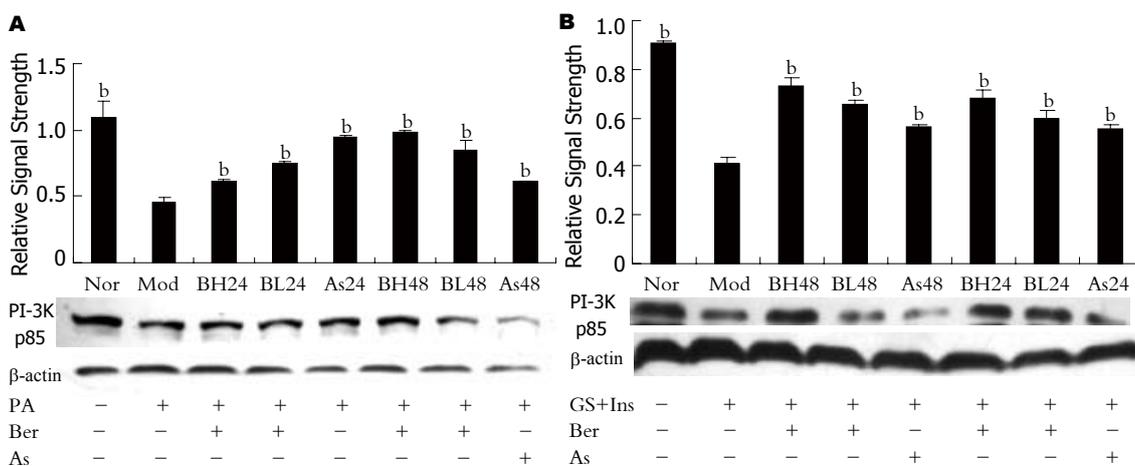


图 2 高游离脂肪酸和高糖模型各组3T3-L1脂肪细胞PI-3K p85蛋白的表达. A: 高游离脂肪酸模型; B: 高糖模型. ^b*P*<0.01 vs Mod.

抑制PI-3K p85蛋白的表达, 与正常对照组比较 *P*<0.01; 同时加入小檗碱或阿司匹林则可以逆转PA的作用, 使PI-3K p85蛋白的表达增加, 与模型组比较 *P*<0.01, 并且PI-3K p85蛋白的表达与小檗碱的剂量和作用时间呈依赖关系(图2A).

2.4 小檗碱对高糖诱导的3T3-L1胰岛素抵抗细胞模型PI-3K p85蛋白表达的影响 采用Western blot检测3T3-L1脂肪细胞PI-3K p85蛋白的表达, 结果显示: 25 mmol/L葡萄糖加0.6 nmmol/L胰岛素作用18 h可以明显抑制PI-3K p85蛋白的表达, 与正常对照组比较 *P*<0.01; 同时加入小檗碱或阿司匹林则可以逆转其作用, 使PI-3K P85蛋白的表达增加, 与模型组比较 *P*<0.05; 且其表达与小檗碱的作用时间和剂量呈依赖关系(图2B).

3 讨论

小檗碱是从黄连等植物中提取的一种异喹啉类生物碱, 最初作为清热解毒药和抗炎药应用于临床. 最近在《Diabetes》上报道小檗碱通过激活AMPK途径而增加胰岛素敏感性表明小檗碱具有改善IR, 降低血糖, 纠正脂质紊乱的作用^[1-4].

这与我们提出的“糖尿病从毒论治”的假说不谋而合, 那么小檗碱改善胰岛素抵抗作用的分子机制是什么呢?

本次实验分别以0.5 mmol/L软脂酸和25 mmol/L葡萄糖加0.6 nmmol/L胰岛素诱导3T3-L1脂肪细胞产生IR, 予以小檗碱进行干预, 同时以IKKβ抑制剂阿司匹林作为阳性对照, 观察到0.5 mmol/L软脂酸作用24 h或25 mmol/L葡萄糖加0.6 nmmol/L胰岛素作用18 h分别使3T3-L1脂肪细胞胰岛素刺激的葡萄糖转运抑制67%和60%, 若预先加入小檗碱或阿司匹林则可以逆转上述效应, 使葡萄糖转运增加46%-101%. 胰岛素刺激的葡萄糖转运是衡量胰岛素敏感性、判断胰岛素抵抗的重要指标, 这说明0.5 mmol/L软脂酸作用24 h或25 mmol/L葡萄糖加0.6 nmmol/L胰岛素作用18 h后3T3-L1脂肪细胞产生IR, 而小檗碱具有改善IR的作用. 此结果与国外报导高游离脂肪酸和高糖可诱导IR, 而小檗碱具有改善IR的结果一致^[1,5,8].

为了进一步研究小檗碱改善胰岛素抵抗的作用机制, 我们应用Western blot检测胰岛素信号转导蛋白PI-3K p85的表达, 结果发现: 0.5

■同行评价

本文具有科学性、创新性和一定的可读性,但中医药特色相对缺乏。

mmol/L软脂酸作用24 h或25 mmol/L葡萄糖加0.6 nmmol/L胰岛素作用18 h可以明显抑制PI-3K p85蛋白的表达,同时加入小檗碱或阿司匹林则可以逆转其作用,使PI-3K p85蛋白的表达增加,并且PI-3K p85蛋白的表达与小檗碱的剂量和作用时间呈依赖关系。胰岛素信号转导途径是复杂多样的,胰岛素转导通路中任一位点的异常都可能最终阻碍靶组织转运葡萄糖,从而引起IR。目前认为胰岛素受体底物(IRS)-磷脂酰肌醇-3-激酶(PI-3K)-Akt途径是介导胰岛素刺激细胞摄取利用葡萄糖的主要途径^[9]。胰岛素结合于其受体后,受体 β 亚基特定部位酪氨酸自身磷酸化,进一步使受体底物1(IRS-1)上的酪氨酸残基磷酸化,磷酸化的IRS-1与PI-3K的p85调节亚单位结合,催化p110而激活PI-3K激酶,PI-3K激酶是GLUT4转位的关键酶,作用于PI-3K的下游分子Akt,其第308位苏氨酸和473位丝氨酸被磷酸化后激活,能使细胞膜的脂质双分子层磷酸化,从而促进GLUT4转位,使葡萄糖转运进入细胞内。由此可见PI-3K是胰岛素刺激葡萄糖摄取和GLUT4转位的重要介导分子^[9]。进一步研究显示,2型糖尿病鼠(ob/ob小鼠和fa/fa鼠)肝细胞中PI-3K中的P85亚基较正常组降低一半左右,而肌肉和脂肪中无明显改变^[10-11];高脂喂养的SD大鼠肌肉和脂肪中的PI-3K活性明显低于正常对照^[10];2型糖尿病患者的骨骼肌和脂肪细胞中PI-3K基因表达调控有缺陷^[12]。以上证据说明IR时,胰岛素靶细胞中的PI-3K的含量和活性均降低,并存在对胰岛素刺激的敏感性缺陷。此外,多种致IR物质,如FFA、TNF- α 等也可影响PI-3K活性,说明PI-3K是这些物质导致IR的中介分子之一^[9]。前期动物实验我们采用小剂量链脲佐菌素尾静脉注射加高脂高糖饲料喂养方法建立Wistar大鼠胰岛素抵抗模型,予以小檗碱干预治疗10 wk后,动物的空腹血糖和胰岛素水平明显降低,OGTT明显改善,同时脂肪、肌肉组织的PI-3K p85亚基的mRNA表达水平明显增高。说明小檗碱可能通过上调PI-3K p85亚基的mRNA改善IR,防治2型糖尿病^[13]。本实验从细胞水平进一步证实,小檗碱可能通过提高PI-3K p85蛋白的表达而改善IR。

总之,我们的研究结果表明:小檗碱可以明显改善高游离脂肪酸和高糖诱导的IR,而PI-3K作为胰岛素信号转导通路中的一个关键靶点可能在小檗碱改善IR的分子机制中起着一定的作用。同时这也为“糖尿病从毒论治”的假说和

清热解毒法防治2型糖尿病的临床运用提供了实验依据。

4 参考文献

- 1 Lee YS, Kim WS, Kim KH, Yoon MJ, Cho HJ, Shen Y, Ye JM, Lee CH, Oh WK, Kim CT, Hohnen-Behrens C, Gosby A, Kraegen EW, James DE, Kim JB. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes* 2006; 55: 2256-2264
- 2 Yin J, Hu R, Chen M, Tang J, Li F, Yang Y, Chen J. Effects of berberine on glucose metabolism in vitro. *Metabolism* 2002; 51: 1439-1443
- 3 Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 496-502
- 4 Ko BS, Choi SB, Park SK, Jang JS, Kim YE, Park S. Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from *Cortidis rhizoma*. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1431-1437
- 5 Nelson BA, Robinson KA, Buse MG. High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2000; 49: 981-991
- 6 Romero R, Casanova B, Pulido N, Suarez AI, Rodriguez E, Rovira A. Stimulation of glucose transport by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes: increased abundance of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter proteins. *J Endocrinol* 2000; 164: 187-195
- 7 Takeuchi A, Mishina Y, Miyaishi O, Kojima E, Hasegawa T, Isobe K. Heterozygosity with respect to Zfp148 causes complete loss of fetal germ cells during mouse embryogenesis. *Nat Genet* 2003; 33: 172-176
- 8 Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2024-2034
- 9 王军, 姜宏卫. 磷脂酰肌醇3激酶与2型糖尿病. 国外医学·内分泌学分册 2001; 21: 294-296
- 10 Anai M, Funaki M, Ogihara T, Kanda A, Onishi Y, Sakoda H, Inukai K, Nawano M, Fukushima Y, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. Enhanced insulin-stimulated activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the liver of high-fat-fed rats. *Diabetes* 1999; 48: 158-169
- 11 Kerouz NJ, Horsch D, Pons S, Kahn CR. Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (ob/ob) mouse. *J Clin Invest* 1997; 100: 3164-3172
- 12 Andreelli F, Laville M, Ducluzeau PH, Vega N, Vallier P, Khalfallah Y, Riou JP, Vidal H. Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Diabetologia* 1999; 42: 358-364
- 13 Jin D, Lu FE, Chen G, Sun H, Lu XH. [Effects of Huanglian Jiedu Decoction on phosphatidylinositol-3-kinase expression in target tissues of type 2 diabetic rats] *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2007; 5: 541-545

靶向5-LOX的siRNA诱导胰腺癌细胞的凋亡

张海峰, 周国雄, 丁晓凌, 沈勤, 杨江勇

张海峰, 周国雄, 丁晓凌, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

沈勤, 杨江勇, 南通大学医学院生化研究室 江苏省南通市 226001

张海峰, 2005级南通大学附属医院消化内科硕士, 主治医师, 主要从事胰腺癌研究。

江苏省自然科学基金资助项, No. BK2004049

江苏省重点医学人才项目资助, No. RC2007085

作者贡献分布: 此课题由张海峰, 周国雄及丁晓凌设计; 研究过程由张海峰与杨江勇操作完成; 研究用新试剂及分析工具由沈勤与杨江勇提供; 数据分析由张海峰, 周国雄与丁晓凌完成; 本论文写作由张海峰, 周国雄与丁晓凌完成。

通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科。zhouguoxiong@medmail.com.cn

电话: 0513-85119222

收稿日期: 2008-03-17 修回日期: 2008-05-01

接受日期: 2008-05-12 在线出版日期: 2008-07-08

Small interfering RNA targeted on 5-lipoxygenase induces apoptosis of pancreatic cancer cells

Hai-Feng Zhang, Guo-Xiong Zhou, Xiao-Ling Ding, Qin Shen, Jiang-Yong Yang

Hai-Feng Zhang, Guo-Xiong Zhou, Xiao-Ling Ding, Qin Shen, Jiang-Yong Yang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2004049; and the Key Medical Personnel Project of Jiangsu Province, No. RC2007085

Correspondence to: Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. zhouguoxiong@medmail.com.cn

Received: 2008-03-17 Revised: 2008-05-01

Accepted: 2008-05-12 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of siRNA (small interfering RNA) on cell proliferation, apoptosis in human pancreatic cancer cell line SW1990 through knockout of 5-lipoxygenase (5-LOX).

METHODS: The siRNA expression vectors targeted at 5-LOX gene were designed and DNA template was synthesized, then siRNA was obtained by *in vitro* transcription. After siRNA was transfected into cell line SW1990 with Lipofectamine-2000, the expression level of 5-LOX mRNA was detected using RT-PCR, SW1990 cell proliferation inhibition

was evaluated by MTT assay and apoptosis rate was measured by flow cytometry.

RESULTS: The sequence-specific siRNA effectively suppressed 5-LOX mRNA expression in cell line SW1990. The expression inhibition rates ($19.6\% \pm 1.9\%$, $55.4\% \pm 2.6\%$ and $55.2\% \pm 2.7\%$) of 5-LOX mRNA in group 1-3 were all higher than those in negative control groups (2.9%). At 24 h and 48 h after cell seeding, the proliferation inhibition rates ($5.37\% \pm 1.19\%$, $11.63\% \pm 1.25\%$ and $13.67\% \pm 1.04\%$; $16.13\% \pm 1.5\%$, $26.63\% \pm 1.22\%$ and $25.47\% \pm 1.67\%$) of cell line SW1990 in group 1-3 were significantly higher than those in blank control group and negative control group, respectively ($P < 0.05$). Apoptosis inhibition rates ($5.56\% \pm 1.05\%$, $11.45\% \pm 1.44\%$ and $12.13\% \pm 1.36\%$; $7.37\% \pm 1.23\%$, $18.75\% \pm 1.5\%$ and $22.02\% \pm 1.45\%$) of cell line SW1990 in group 1-3 were also higher than those in blank control group and negative control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: siRNA plasmid expression vectors targeted at 5-LOX *in vitro* effectively block 5-LOX gene expression, significantly inhibit cell proliferation, and induce cell apoptosis to some extent of cell line SW1990.

Key Words: RNA interference; 5-lipoxygenase; Pancreatic cancer; Cell apoptosis

Zhang HF, Zhou GX, Ding XL, Shen Q, Yang JY. Small interfering RNA targeted on 5-lipoxygenase induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2107-2111

摘要

目的: 采用RNA干扰技术(siRNA)阻断5-LOX基因的表达, 观察其抑制人胰腺癌细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用。

方法: 构建靶向5-LOX的siRNA质粒表达载体, 采用Lipofectamine-2000转染人胰腺癌细胞株SW1990, 采用RT-PCR检测RNA干扰后5-LOX mRNA表达, MTT法检测细胞的增殖抑制率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

背景资料

胰腺癌是一种恶性程度极高、预后极差的肿瘤, 发病率在国内外呈上升趋势。胰腺癌的治疗是临床一大难题, 其主要原因是缺乏早期诊断的方法, 手术机会少, 而现有各项非手术疗法的效果又极为不佳, 因此, 迫切需要进行胰腺癌相关基因的基础研究, 为临床诊治提供指导。目前对脂质代谢紊乱与肿瘤相关性的研究显示, 5-脂氧合酶(5-LOX)代谢途径异常是促进多种肿瘤发生发展的重要原因之一。

同行评议者

谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

■ 研发前沿

如何抑制5-LOX异常表达而达到治疗肿瘤的目的是该领域研究热点。

结果: 靶向5-LOX序列特异性的三条siRNA(组1、组2、组3)可以有效地抑制SW1990细胞5-LOX基因表达,其表达抑制率分别为 $19.6\% \pm 1.9\%$ 、 $55.4\% \pm 2.6\%$ 和 $55.2\% \pm 2.7\%$ 。转染靶向5-LOX siRNA的三个质粒表达载体可以显著抑制SW1990细胞的增殖,细胞接种24 h后,三组增殖抑制率分别为 $5.37\% \pm 1.19\%$ 、 $11.63\% \pm 1.25\%$ 和 $13.67\% \pm 1.04\%$;48 h后其增殖抑制率分别为 $16.13\% \pm 1.5\%$ 、 $26.63\% \pm 1.22\%$ 和 $25.47\% \pm 1.67\%$,各siRNA组增殖抑制率高于空白组和阴性对照组(均 $P < 0.05$)。转染后24 h和48 h三组细胞凋亡率分别为 $5.56\% \pm 1.05\%$ 、 $11.45\% \pm 1.44\%$ 、 $12.13\% \pm 1.36\%$ 和 $7.37\% \pm 1.23\%$ 、 $18.75\% \pm 1.5\%$ 和 $22.02\% \pm 1.45\%$,均高于空白对照组和阴性对照组($P < 0.05$)。

结论: 所构建的靶向5-LOX的siRNA质粒表达载体可以有效阻断SW1990细胞5-LOX基因表达,显著地抑制SW1990细胞增殖,并在一定程度上诱导其凋亡。

关键词: RNA干扰; 5-脂氧合酶; 胰腺癌; 细胞凋亡

张海峰, 周国雄, 丁晓凌, 沈勤, 杨江勇. 靶向5-LOX的siRNA诱导胰腺癌细胞的凋亡. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2107-2111

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2107.asp>

0 引言

胰腺癌是一种恶性程度极高、预后极差的肿瘤,发病率在国内外呈上升趋势.胰腺癌的治疗是临床一大难题,其主要原因是缺乏早期诊断的方法,手术机会少,而现有各项非手术疗法的效果又极为不佳,因此,迫切需要进行胰腺癌相关基因的基础研究,为临床诊治提供指导.目前对脂质代谢紊乱与肿瘤相关性的研究显示,5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)代谢途径异常是促进多种肿瘤发生发展的重要原因之一. RNA干扰(RNA interference, RNAi)是双链RNA介导的转录后基因沉默,具有高度的特异性和有效性,正在成为基因功能研究的有力工具.因此我们构建了靶向5-LOX的小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)质粒表达载体,并转染人胰腺癌细胞株SW1990,观察其抑制SW1990细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株SW1990为贴壁细胞,由上海交通大学附属第一人民医院消化内科王

兴鹏教授惠赠. RT试剂盒购自美国Fermentas公司、PCR试剂盒购自上海生物工程有限公司、PCR扩增仪购自美国ABI公司、流式细胞仪购自美国BD公司、CO₂细胞培养箱Series5400购自美国NAPCO公司。

1.2 方法

1.2.1 胰腺癌细胞株和培养: 采用含100 mL/L小牛血清、 1×10^5 U/L青霉素、0.1 g/L链霉素的DMEM培养基(Gibco)在37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度的条件下传代培养。

1.2.2 靶向5-LOX的siRNA质粒表达载体的构建: 由上海吉玛公司构建针对5-LOX基因的发夹状RNA的真核表达质粒pshRNA(含绿色荧光蛋白基因)3条,以及阴性对照1条. 阴性对照序列: 载体名称pGPU6/GFP/Neo-shNC, 正义链: 5-TTCTCCGAACGTGTACACGT-3; 反义链: 5-ACGTGACACGTTCCGGAGAA-3. 目的基因5-LOX siRNA的载体1: pGPU6/GFP/Neo-ALOX5-149, 正义链: 5-GCACTGACGACTACATCACCT-3; 反义链: 5-AGGTAGATGTAGTCGTCAGTGC-3. 载体2: pGPU6/GFP/Neo-ALOX5-315, 正义链: 5-GCGCAAGTACTGGCTGAATGAT-3; 反义链: 5-ATCATTCAGCCAGTACTTGCGC-3. 载体3: pGPU6/GFP/Neo-ALOX5-1021, 正义链: 5-GCTCCCATCTGCTTGCTGTATT-3; 反义链: 5-AATACAGCAAGCAGATGGGAGC-3.

1.2.3 SW1990细胞的转染: 常规消化收集细胞后,将细胞接种于24孔培养板,分为5组: (1)空白对照组; (2)阴性对照组; (3)靶基因5-LOX siRNA组1; (4)5-LOX siRNA组2; (5)5-LOX siRNA组3; 每组2个培养孔. 空白对照组转染时仅加入Lipofectamine™ 2000, 阴性对照组转染时使用Lipofectamine 2000+阴性对照质粒, 阳性实验组转染时使用Lipofectamine 2000+相应质粒. 转染前1 d换用不含抗生素、含有血清(100 mL/L)的培养基. 待细胞生长至密度为70%-80%时,进行转染. 用Opti-MEM将质粒1 μg、Lipofectamine 2000 3 μg分别稀释至50 μL,混匀后室温放置5 min,然后将二者混合均匀,室温放置20 min后加入培养孔中. 多孔转染,按上述比例批量制作转染混合物后进行转染. 转染后6 h,换用完全培养基,24 h后于倒置荧光显微镜下观察细胞增强绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.4 RT-PCR检测5-LOX基因mRNA表达的变化: 转染后24 h消化收集 1×10^6 个细胞,按TRIzol试剂说明书提取总RNA. 紫外分光光度

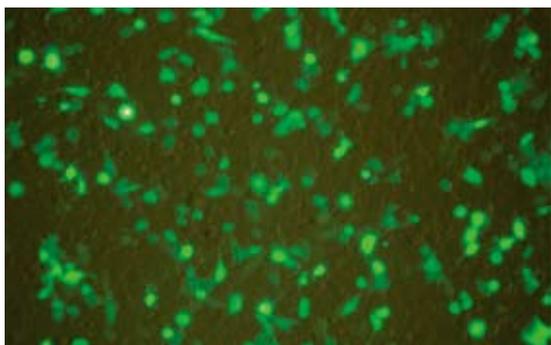


图 1 SW1990细胞转染后24 h绿色荧光表达.

计测定其浓度和纯度. RT-PCR反应采用两步法. (1)cDNA的合成: 采用RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒, 按操作说明书合成cDNA; (2)PCR反应: 采用一管便捷式PCR反应试剂盒. 内参照GAPDH的引物序列采用国际标准序列: 5'-CGAAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'(上游引物); 5'-AGCCTTCTCGGTGGTGAAGAC-3'(下游引物), 扩增产物大小为306 bp. 5-LOX的引物序列为: 5'-TCATCGTGGACTTTGAGCTG-3'(上游引物); 5'-AGAAGGTGGGTGATGGTCTG-3'(下游引物), 扩增产物大小为262 bp. 用凝胶成像分析仪进行摄像, 观察mRNA的表达.

1.2.5 MTT法检测对胰腺癌细胞增殖的抑制作用: 将细胞接种于6孔培养板中并进行转染, 分组及转染同上. 12 h后消化、收集细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/L, 分别将各组细胞接种于96孔培养板. 每组6孔, 每孔200 μ L. 另设对照孔调零, 每个检测时间点接种1板, 共3板. 于细胞接种后0、24、48 h分别采用MTT法检测SW1990细胞增殖抑制率. 增殖的抑制率(PI) = $(1 - \text{观察组} A_{490} \text{值} / \text{对照组} A_{490} \text{值}) \times 100\%$.

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡: 采用PI单染法检测SW1990细胞凋亡. 细胞接种于6孔培养板中并进行转染, 分组及转染同前. 分别于转染24、48 h后消化、收集细胞, 每次每组各取3孔细胞. PBS清洗2次, 用预冷的750 mL/L乙醇固定过夜, 1000 r/min, 5 min离心, 倾去上清液, PBS清洗2次, 加入0.05 g/L的RNA酶, 室温避光30 min, 去除细胞内的RNA, 加入0.06 g/L的PI, 室温避光30 min后上机检测. 实验重复至少3次.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 组间差异采用Stata软件进行方差分析或t检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 SW1990细胞转染的结果 SW1990细胞转染

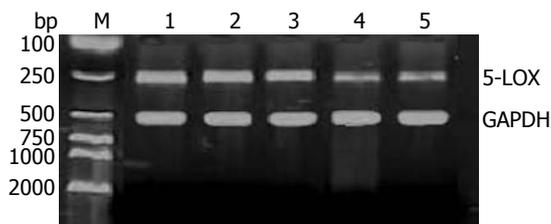


图 2 5-LOX基因mRNA 表达的变化. M: mark; 1: 空白组; 2: 对照组; 3: siRNA1组; 4: siRNA2组; 5: siRNA3组.

■ 相关报道

近年来研究发现, 5-LOX对肿瘤细胞的促增殖和抗凋亡作用是肿瘤发生发展的重要环节, 抑制5-LOX能使多种恶性肿瘤细胞增殖降低并诱导细胞凋亡, 且5-LOX抑制剂抑制肿瘤生长的作用比COX强.

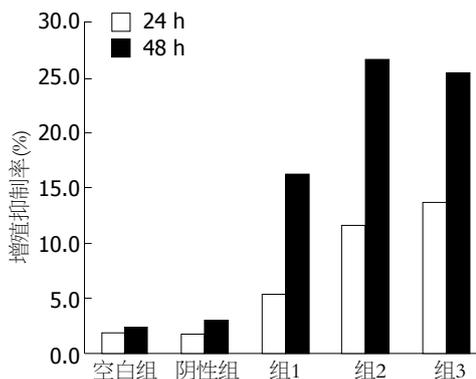


图 3 各组细胞增殖抑制率.

含有绿色荧光蛋白基因的pshRNA 12 h后, 于倒置荧光显微镜下观测可见到增强绿色荧光蛋白的表达, 24 h左右表达最强(图1), 荧光显微镜直接观察转染效率约70%.

2.2 RT-PCR检测5-LOX基因mRNA表达的变化 本研究中5-LOX基因mRNA在阴性对照组表达抑制率为 $2.9\% \pm 1.3\%$, 组1-组3表达抑制率分别为 $19.6\% \pm 1.9\%$ 、 $55.4\% \pm 2.6\%$ 和 $55.2\% \pm 2.7\%$. siRNA处理各组5-LOX mRNA水平有不同程度下调, 以2、3组最明显, 而在空白对照组和阴性对照组内5-LOX mRNA表达无明显改变, 表明5-LOX siRNA对SW1990细胞5-LOX基因mRNA的表达有明显的抑制效果(图2).

2.3 MTT法检测对胰腺癌细胞增殖的抑制作用 24 h增殖抑制率: 空白对照组 $1.80\% \pm 0.76\%$, 阴性对照组为 $2.30\% \pm 1.05\%$, 组1-组3分别为 $5.37\% \pm 1.19\%$ 、 $11.63\% \pm 1.25\%$ 和 $13.67\% \pm 1.04\%$; 48 h增殖抑制率: 空白对照组为 $2.40\% \pm 0.96\%$, 阴性对照组为 $2.70\% \pm 1.03\%$, 组1-组3分别为 $16.13\% \pm 1.5\%$ 、 $26.63\% \pm 1.22\%$ 和 $25.47\% \pm 1.67\%$ (图3). 空白组与阴性对照对照组之间两无显著差异($P > 0.05$), 各siRNA组增殖抑制率高于空白组、阴性对照组($P < 0.05$), 其中组2、组3增殖抑制率明显高于组1($P < 0.05$).

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 空白对照组和阴性对照组24 h凋亡率分别是 $1.14\% \pm 0.63\%$ 和

应用要点

构建的靶向5-LOX的siRNA质粒表达载体可以有效阻断SW1990细胞5-LOX基因表达,显著地抑制SW1990细胞增殖,并在一定程度上诱导其凋亡。

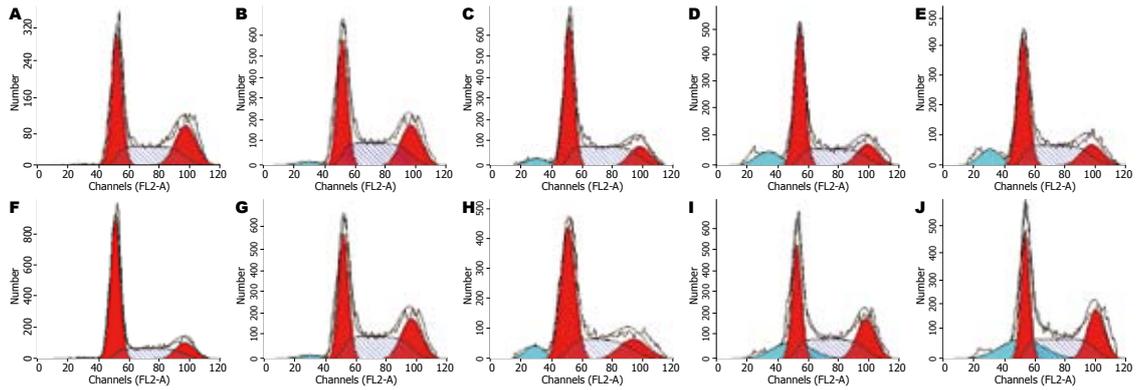


图4 流式细胞术检测细胞凋亡图。A: 空白组24 h; B: 对照组24 h; C: siRNA1组24 h; D: siRNA2组24 h; E: siRNA3组24 h; F: 空白组48 h; G: 对照组48 h; H: siRNA1组48 h; I: siRNA2组48 h; J: siRNA3组48 h。

1.98%±0.86%, 组1-组3的24 h凋亡率分别是5.56%±1.05%、11.45%±1.44%和12.13%±1.36%。空白对照组和阴性对照组48 h凋亡率为1.71%±0.95%、2.87%±1.03%, 组1-组3的48 h凋亡率分别为7.37%±1.23%、18.75%±1.5%和22.02%±1.45%(图4)。空白对照组与阴性对照组之间两无显著性差异($P>0.05$), 各siRNA组凋亡率高于空白对照组和阴性对照组($P<0.05$), 其中组2、组3凋亡率明显高于组1($P<0.05$)。

3 讨论

近年来研究发现, 5-LOX对肿瘤细胞的促增殖和抗凋亡作用是肿瘤发生发展的重要环节^[1]; 抑制5-LOX能使多种恶性肿瘤细胞增殖降低并诱导细胞凋亡, 且5-LOX抑制剂抑制肿瘤生长的作用比COX强^[15-17]。多聚不饱和脂肪酸代谢与肿瘤形成之间关系的分子学研究为肿瘤的发生和发展提供了新的理论, 也为肿瘤的预防和治疗提供了新的靶作用分子。RNA干扰是由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱导的在转录后mRNA水平关闭相应基因表达的过程, 导致序列特异性的基因沉默, 作为一种引起基因沉默的新技术, 能够快速、高效、特异地抑制靶基因表达, RNAi相关技术在肿瘤研究中涉及肿瘤发生发展、侵袭与转移、信号转导、周期调控、凋亡和治疗方面, 是研究肿瘤发生发展机制强有力的工具。目前有许多研究通过siRNA技术抑制胰腺癌的基因*K-ras*、*Survivin*、*bcl-2*等的表达, 使肿瘤细胞生长抑制并出现凋亡^[2-8]。我们以5-LOX作为靶点, 设计合成了高特异性的siRNA序列, 研究发现通过siRNA转染可显著下调5-LOX mRNA表达, 其表达抑制率分别为19.6%±1.9%、55.4%±2.6%和55.2%±2.7%。

细胞转染24和48 h后其增殖抑制率分别为5.37%±1.19%、11.63%±1.25%、13.67%±1.04%和16.13%±1.50%、26.63%±1.22%和25.47%±1.67%; 细胞凋亡率分别为5.56%±1.05%、11.45%±1.44%、12.13%±1.36%和7.37%±1.23%、18.75%±1.50%和22.02%±1.45%, 说明转染靶向5-LOX的siRNA质粒表达载体可以显著抑制SW1990细胞的增殖, 并诱导肿瘤细胞凋亡。这与我们先前报道的应用雷公藤内酯醇、齐留通等抑制5-LOX表达能抑制细胞生长, 诱导细胞凋亡是相符的, 提示采用基因技术封闭5-LOX蛋白表达, 可以达到治疗目的^[9-14]。RNA干扰的方法可以较好抑制SW1990细胞的5-LOX mRNA表达, 并能导致细胞的增殖抑制和凋亡, 为胰腺癌的临床诊治提供了新的思路。本实验中第二、三组抑制效果较一组更为明显, 提示RNA干扰技术抑制基因表达的效果与靶位点的选择密切相关。

本研究中我们采用靶向5-LOX的siRNA质粒表达载体抑制了细胞中5-LOX mRNA的表达, 而对GAPDH的表达却无抑制作用, 设计的阴性对照质粒转染细胞后未对胰腺癌细胞的生物活性产生影响, 说明RNA干扰具有高度特异性、安全性。在5-LOX表达抑制后, 细胞的生长增殖被明显抑制, 细胞凋亡显著增加。因此有理由相信可以通过抑制5-LOX表达来预防和治疗5-LOX高表达肿瘤。

总之, 通过构建靶向5-LOX的siRNA真核表达载体导入细胞可以有效特异地抑制人胰腺癌细胞中5-LOX的表达。应用RNA干扰的方法抑制5-LOX的表达来预防和治疗5-LOX高表达肿瘤的方法具有高效、特异、安全的特点, 值得深入研究。

4 参考文献

- 1 邹来玉, 李建英, 王小众. 5-脂氧合酶与消化系统肿瘤的关系. 国外医学·内科学分册 2006; 4: 177-180
- 2 Wang W, Wang CY, Dong JH, Chen X, Zhang M, Zhao G. Identification of effective siRNA against K-ras in human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2 by siRNA expression cassette. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2026-2031
- 3 张峰, 刘晔, 刘三光, 谢绍建, 李冬斌, 李荣琴, 蔡建辉. 基因枪转导突变特异性K-ras siRNA对胰腺癌细胞生长的抑制作用. 中华实验外科杂志 2006; 23: 28-30
- 4 Chen LM, Le HY, Qin RY, Kumar M, Du ZY, Xia RJ, Deng J. Reversal of the phenotype by K-rasval12 silencing mediated by adenovirus-delivered siRNA in human pancreatic cancer cell line Panc-1. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 831-838
- 5 管海涛, 薛兴欢, 王西京, 李昂, 秦兆寅. 靶向survivin的siRNA诱导胰腺癌细胞凋亡的实验研究. 南方医科大学学报 2006; 26: 169-173
- 6 Ocker M, Neureiter D, Lueders M, Zopf S, Ganslmayer M, Hahn EG, Herold C, Schuppan D. Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing antiapoptotic bcl-2 in pancreatic cancer. *Gut* 2005; 54: 1298-1308
- 7 Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Watanabe N. Introduction of a survivin gene-specific small inhibitory RNA inhibits growth of pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2005; 25: 3967-3972
- 8 Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Wada M, Miyatake S, Imamura M. Downregulation of survivin by siRNA diminishes radioresistance of pancreatic cancer cells. *Surgery* 2005; 138: 299-305
- 9 周国雄, 吴深宝, 丁晓凌, 黄介飞, 张弘, 魏群, 成建萍. 雷公藤内酯醇诱导胰腺癌细胞凋亡及对5-脂氧合酶和凋亡基因表达的影响. 胰腺病学 2007; 7: 113-115
- 10 吴深宝, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 魏群, 马鹏程, 鄂群. 雷公藤内酯醇调节5-脂氧合酶对胰腺癌细胞增殖的影响. 中国肿瘤临床 2005; 32: 328-331
- 11 周国雄, 吴深宝, 黄介飞, 张弘, 魏群, 鄂群. 5-脂氧合酶特异性抑制剂对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响. 中华消化杂志 2005; 23: 689-691
- 12 丁晓凌, 周国雄, 黄介飞. 5-脂氧合酶抑制TNF-alpha诱导的胰腺癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3685-3689
- 13 陈浩莉, 邹来玉, 李建英, 王小众, 陈治新, 黄月红. 联合抑制环氧合酶-2与5-脂氧合酶对胃癌细胞增殖凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 323-331
- 14 Zhou GX, Ding XL, Huang JF, Zhang H, Wu SB. Suppression of 5-lipoxygenase gene is involved in triptolide-induced apoptosis in pancreatic tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770: 1021-1027
- 15 Hennig R, Ding XZ, Tong WG, Schneider MB, Standop J, Friess H, Büchler MW, Pour PM, Adrian TE. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am J Pathol* 2002; 161: 421-428
- 16 Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, Knezetic JA, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 218-223
- 17 Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 942-948

■同行评价

本研究符合伦理学要求, 材料方法使用恰当, 结论可靠, 能够反映我国胃肠病学基础研究

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宇 2008-07-08)

肠炎宁糖浆对内脏高敏感大鼠脑、脊髓CRF表达的影响

晁冠群, 吕宾, 孟立娜, 张烁, 张璐, 郭赞

■背景资料

肠易激综合征是以大便习惯改变为主要特征的一种常见胃肠功能紊乱性疾病, 其病因复杂, 发病机制亦不十分明确, 目前认为可能与胃肠轴作用、免疫异常、胃肠激素与神经肽作用、肠道动力学异常、性激素水平变化有关。越来越多的证据表明IBS患者存在内脏高敏感状态。内脏高敏感性被认为是IBS的一个生物学指标。

晁冠群, 吕宾, 孟立娜, 张烁, 张璐, 郭赞, 浙江中医药大学附属第一医院消化内科 浙江省杭州市 310006

晁冠群, 浙江中医药大学消化专业硕士。

作者贡献分布: 此课题由吕宾, 晁冠群及张璐设计; 研究过程由晁冠群与郭赞操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孟立娜与张烁提供; 数据分析由晁冠群与张烁完成; 本论文写作由晁冠群完成。

通讯作者: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市邮电路54号, 浙江中医药大学附属第一医院消化科。lvbin@medmail.com.cn

收稿日期: 2008-02-01 修回日期: 2008-03-27

接受日期: 2008-04-04 在线出版日期: 2008-07-08

Effect of Changyanning Tangjiang on the expression of corticotropin releasing factor in spinal cord and brain of rats with visceral hypersensitivity

Guan-Qun Chao, Bin Lv, Li-Na Meng, Shuo Zhang, Lu Zhang, Yun Guo

Guan-Qun Chao, Bin Lv, Li-Na Meng, Shuo Zhang, Lu Zhang, Yun Guo, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Bin Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, 54 Youdian Road, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. lvbin@medmail.com.cn

Received: 2008-02-01 Revised: 2008-03-27

Accepted: 2008-04-04 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate the distribution and expression of corticotropin releasing factor in spinal cord and brain of rats with visceral hypersensitivity, and to explore the mechanism of Changyanning Tangjiang treating irritable bowel syndrome.

METHODS: Forty female SD rats were divided randomly into 3 groups: blank control group ($n = 8$), model 1 group ($n = 16$, sensitized with intraperitoneal injection of chicken ovalbumin) and model 2 group ($n = 16$, sensitized in turn with conditional stimulation and non-conditional stimulation). After the intestinal hypersensitivity was evaluated, the rats in the two model groups were divided into 2 subgroups: model control group ($n = 8$) and Changyanning group ($n = 8$).

■同行评议者

徐列明, 教授, 上海中医药大学附属曙光医院(东)肝二科

The rats in the blank control group and model group were treated with normal saline, and those in Changyanning group were intragastrically treated with Changyanning Tangjiang for 4 wk. Then spinal cord and brain were collected for immunohistochemical staining, and the distribution and expression of CRF were observed.

RESULTS: The visceral sensitivity of rats in the Changyanning groups was lower than that in the model groups ($P < 0.01$). Immunohistochemistry showed that CRF was obviously expressed in the lumbar intumescencia of spinal cord, hypothalamus and diaphragmatic surface of the third ventricle of cerebrum. The positive indexes in the model control groups were higher than those in the blank control group (hypothalamus: 0.037 ± 0.009 , 0.037 ± 0.024 vs 0.005 ± 0.001 ; diaphragmatic surface: 0.038 ± 0.009 , 0.040 ± 0.022 vs 0.005 ± 0.001 ; spinal cord: 0.028 ± 0.008 , 0.024 ± 0.004 vs 0.002 ± 0.001 ; all $P < 0.01$). The positive indexes in the Changyanning groups (hypothalamus: 0.012 ± 0.005 , 0.009 ± 0.005 ; diaphragmatic surface: 0.012 ± 0.005 , 0.011 ± 0.006 ; spinal cord: 0.010 ± 0.003 , 0.012 ± 0.005) were lower than that in the model groups. The positive index of CRF was also higher in the Changyanning groups than that in the blank control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: CRF plays an important role in the introduction of stimulation signal, while Changyanning Tangjiang can down-regulating the expression of CRF, which may be one of the mechanisms of Changyanning decreasing the visceral hypersensitivity in rats.

Key Words: Corticotropin releasing factor; Visceral hypersensitivity; Hypothalamus; The Third ventricle of cerebrum; Spinal cord

Chao GQ, Lv B, Meng LN, Zhang S, Zhang L, Guo Y. Effect of Changyanning Tangjiang on the expression of corticotropin releasing factor in spinal cord and brain of rats with visceral hypersensitivity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2112-2118

摘要

目的: 研究内脏高敏感大鼠的脊髓、脑部

CRF的分布和表达, 探讨CRF在肠易激综合征(IBS)内脏高敏感信号传导通路中的机制, 以及肠炎宁糖浆对IBS起效的可能作用机制。

方法: 清洁级成年♀SD大鼠40只, 随机分3组, 空白组($n = 8$), 模型一组(腹腔注射鸡卵清蛋白致敏, $n = 16$), 模型二组(条件刺激和非条件刺激交替致敏, $n = 16$), 评估肠道敏感性后, 模型一组和模型二组均随机分成2组, 即对照组和肠炎宁组, 每组8只。空白组和对照组给予生理盐水, 肠炎宁组给予肠炎宁, ig 4 wk, 取脑、脊髓进行免疫组化, 观察CRF的分布和表达情况。

结果: 肠炎宁组内脏敏感性较模型组明显降低($P < 0.01$)。免疫组化显示大鼠下丘脑、第三脑室下侧、脊髓腰膨大部可见CRF的明显表达, CRF阳性指数模型一对对照组和模型二对照组均高于空白对照组, 差异有统计学意义(下丘脑: 0.037 ± 0.009 , 0.037 ± 0.024 vs 0.005 ± 0.001 ; 第三脑室下侧: 0.038 ± 0.009 , 0.040 ± 0.022 vs 0.005 ± 0.001 ; 脊髓: 0.028 ± 0.008 , 0.024 ± 0.004 vs 0.002 ± 0.001 ; 均 $P < 0.01$)。模型一肠炎宁组(0.012 ± 0.005 , 0.012 ± 0.005 , 0.010 ± 0.003)较模型一对对照组高, 模型二肠炎宁组(0.009 ± 0.005 , 0.011 ± 0.006 , 0.012 ± 0.005)较模型二对照组高, 模型一肠炎宁组和模型二肠炎宁组较空白对照组高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: CRF在内脏刺激信号的传入过程中起重要作用, 肠炎宁可以降低其表达程度, 这可能是降低大鼠内脏高敏感的机制之一。

关键词: 促肾上腺皮质激素释放因子; 内脏高敏感; 下丘脑; 第三脑室; 脊髓

晁冠群, 吕宾, 孟立娜, 张烁, 张璐, 郭赞. 肠炎宁糖浆对内脏高敏感大鼠脑、脊髓CRF表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2112-2118
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2112.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是以大便习惯改变为主要特征的一种常见胃肠功能紊乱性疾患。其病因复杂, 据文献报道, 欧美等发达国家患病率达9%-22%^[1], 我国城市居民患病率为10.50%, 乡村为6.14%。该病进入成年后发病率上升, 在30-40岁达到高峰, 女性发病率明显高于男性, 比率为2:1^[2]。发病机制亦不十分明确, 目前认为可能与脑肠轴作用、免疫

异常、胃肠激素与神经肽作用、肠道动力学异常、性激素水平变化^[3]有关。越来越多的证据表明IBS患者存在内脏高敏感状态^[4-9]。内脏高敏感性可以被认为是IBS的一个生物学指标^[10]。国内外较一致的观点认为, IBS是在特殊的基质基础上, 以精神、免疫、内分泌系统为中介, 以社会心理因素刺激为扳机而触发的心身疾病, 被公认为了解地最差的疾病之一。我们建立直肠刺激联合心理应激、免疫引起的IBS内脏高敏感大鼠模型, 应用免疫组化染色技术观察不同刺激诱导的内脏高敏感大鼠的脊髓、脑部CRF的分布和表达, 寻找IBS内脏感觉传导异常的客观依据, 从而初步探讨IBS内脏高敏感的机制。并应用肠炎宁糖浆干预, 探讨其对内脏高敏感大鼠的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年♀SD大鼠40只, 体质量约200 g, 清洁级(由浙江中医药大学实验动物中心提供), 随机分3组, 空白对照组(A组)8只, 模型一组16只, 模型二组16只, 放置于室温22-24℃、湿度<60%、噪音<50 db的环境中, 分笼饲养, 正常饮水摄食。

1.2 方法 将鸡卵清蛋白(购自Sigma公司)30 mg加入浓度为10 g/L氢氧化铝凝胶1 mL中, 充分混匀, 注入模型组大鼠腹腔, 制备内脏高敏感大鼠模型。空白对照组给予1 mL生理盐水ip对照。正常进食饮水2 wk后, 观察大鼠情况, 进行直肠注水扩张试验评估肠道敏感性。采用樟脑丸特殊气味作条件刺激, 结直肠扩张压力>60 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)的刺激结合经典的肢体束缚作为非条件刺激, 建立动物模型。大鼠装入放有樟脑丸的应激笼, 用胶布固定四肢和躯干45 min, 限制自由运动, 但可作少许前后活动和回头。其间将不漏气的气囊扩张导管经肛门插入直肠, 气囊远端距肛门口1 cm, 并固定于鼠尾根部, 每次充气量1.6 mL(气囊内压力>60 mmHg), 持续60 s, 间断放空气囊3 min后重复充气10次, 完成1次应激程序。条件应激组第1天完成1次应激程序后放回原饲养环境, 第2天同一时间给予同样的应激; 第4天只给予条件刺激45 min; 第5天重复第1天的应激程序, 第6天重复第4天应激程序, 第8天给予条件应激45 min。完成后进行直肠注水扩张试验评估肠道敏感性。ig给药: 验证模型后2 d进行ig给药, 将两种模型组分别随机分为2组, 分别为模型一对对照组(B组)、模型一治

■ 研发前沿

自1973年Ritchie报导IBS患者结肠气囊扩张疼痛阈值下降以来, 内脏高敏感机制备受关注。

■相关报道

据文献报道, 欧美等发达国家患病率达9%-22%。美国的调查显示每年约有300万次的IBS患者就诊, 相应的处方达220万张, 每年约有96 000名IBS患者住院治疗; 中国的总体资料不详, 而香港、北京、广东地区的发病率分别为6.6%(Roma II)、7.26%(Manning)和11.5%(Manning)。

疗组(C组)和模型二对照组(D组)、模型二治疗组(E组), 每组各8只。肠炎宁糖浆(康恩贝集团生产)成人一日量为40 mL, 大鼠(200 g)与人(70 kg)比较, 折算系数是0.018, 按照体质量给药, 肠炎宁糖浆剂量为3.6 mL/(kg·d), 空白对照组及模型二对照组给予生理盐水3.6 mL/(kg·d)。

1.2.1 模型验证: 内脏敏感性评估采用国际通用的AWR(腹壁撤离反射)评分标准, 即大鼠的腹部收缩反射。大鼠腹部收缩反射(AWR)评分标准: 0分: 大鼠对结肠扩张无行为学反应; 1分: 结肠扩张时身体静止不动, 头部运动减少; 2分: 结肠扩张时腹肌收缩, 但腹部未抬离桌面; 3分: 结肠扩张时腹肌收缩并抬离桌面; 4分: 结肠扩张时骨盆抬起, 身体呈弓形。内脏敏感性评估具体操作: 将石蜡油润滑后的8F导尿管经肛门插入, 将球囊末端放在距离肛门1.0 cm左右, 用棉线把导尿管和大鼠尾巴根部固定。将其放在平台上, 待大鼠适应环境后, 逐渐注水使球囊扩张, 观察大鼠腹部抬起并且背部拱起时(AWR评分3分)所需的注水量。每次直肠扩张持续30 s, 重复进行3次, 数据取均值。

1.2.2 标本的获取: 在戊巴比妥钠50 mg/kg ip麻醉下, 开胸, 暴露心脏, 从左心室插管至升主动脉, 经升主动脉用500 mL生理盐水灌流冲洗血液, 并剪开右心耳, 至肝脏完全变白, 从右心耳流出无色的冲洗液后, 再用新鲜配置的固定液(含40 g/L多聚甲醛的0.1 mol/L磷酸缓冲液)500 mL灌流, 至四肢、脊柱变硬(时间约40 min), 立即取脑、脊髓背段, 放入福尔马林中固定。脱水, 包埋, 制腊块保存, 切片制片。

1.2.3 免疫组化: (1)常规脱腊水化: 将石蜡切片浸于二甲苯中5 min, 3次。取出切片置于1000 mL/L乙醇中3 min 2次; 依次置入900 mL/L-700 mL/L各级酒精各3 min, 取出置于蒸馏水中。(2)二步法: 取出蒸馏水中的切片, 甩掉并擦干切片上组织周围的液体, 平放于湿盒中, 滴加30 mL/L过氧化氢于组织上避光孵育15 min。蒸馏水冲洗, 再将切片置入PBS缓冲液中, 浸泡5 min, 3次。取出切片, 甩掉并擦干组织周围的液体(组织切勿干燥), 平放于湿盒中。抗原修复, 将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液(工作液)的切片盒, 置微波炉内80%火力加热, 使切片盒内液体温度保持在92-98℃之间并持续10-15 min。完成后置室温冷却。滴加50-100 mL一抗工作液于组织上, 室温孵育30 min。用TBS或PBS冲洗切片。将切片置入PBS缓冲液中, 浸泡5 min, 3次, 取出切片, 甩

表1 AWR = 3分时直肠注水量 (mL)

分组	n	mean ± SD
对照组	8	1.35 ± 0.08
模型一组	16	0.87 ± 0.14 ^b
模型二组	16	0.79 ± 0.12 ^b

^bP < 0.01 vs 对照组。

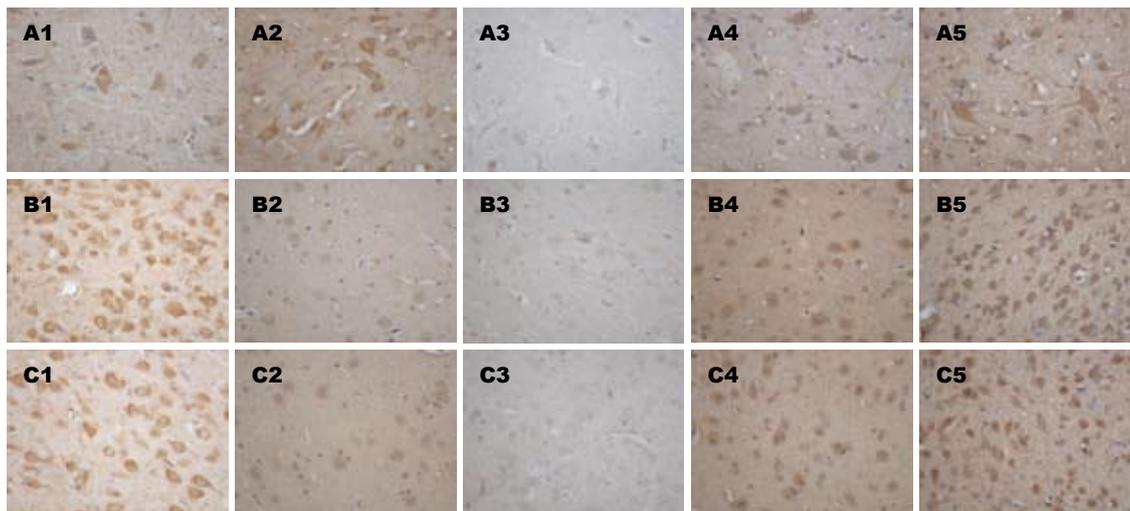
掉并擦干组织周围的液体, 平放于湿盒中。滴加适当比例稀释的生物素标记二抗(10 g/L BSA-PBS稀释), 室温孵育30 min。用PBS冲洗切片。将切片置入PBS缓冲液中, 浸泡5 min, 3次, 取出切片, 甩掉并擦干组织周围的液体, 平放于湿盒中。滴加预备好的显色剂DAB工作液50-100 μL, 室温孵育5-20 min, 显色完全后, 用蒸馏水冲洗终止显色。苏木精复染。850、900、950、1000、1000和1000 mL/L酒精上行逐级脱水, 每级3 min。取出切片置入二甲苯5 min, 3次。用封片胶封片。阴性对照用PBS代替一抗, 进行空白对照, 同步进行上述免疫组化染色, 结果为阴性。(3)结果分析方法: 每张切片所要分析的部位显微镜下拍摄3-5张照片, 进行图象分析。本研究运用计算机图像分软件(carl zeiss imaging systems, Carl Zeiss公司)分析免疫组化图像, 系统在40倍物镜下采集图像, 每张切片中选取有代表性的区域, 连续摄10个高倍(×400倍)视野, 分别对免疫组化切片中染色胞质中的阳性表达进行定量分析, 计算每视野阳性染色的吸光度以及总吸光度。

统计学处理 各组数据结果以mean ± SD表示。统计用SPSS软件包, 两样本均数比较用t检验, 显著性水准为P < 0.05。

2 结果

2.1 造模后动物大体变化 内脏高敏感模型完成后仔细观察大鼠的各方面情况, 日常行为无很大变化, 进食饮水如常, 当受惊吓或给予ig时, 造模组表现过度反应, 情绪激动甚至反抗和攻击, 其中以直肠刺激模型组更为明显。从大便性状来看, 各组之间没有明显的差异。

2.2 模型验证结果 首次评估各组大鼠肠道敏感性, 大鼠腹部撤离反射为3分时所需的注水量, 模型组明显低于对照组, 差异有统计学意义(P < 0.01), 提示模型组大鼠内脏敏感性较对照组明显增高。而ip白蛋白模型组与直肠刺激条件刺激模型组差异无统计学意义, 提示两种造模方法均能引起内脏高敏感, 但两者无敏感性高低差异(表1)。经



■创新盘点
 本文主要研究内脏高敏感大鼠脑和脊髓CRF的表达的改变, 验证了无论是外界应激还是通过免疫引起的内脏高敏感都需要通过CRF这一途径来实现, 并且证实了肠炎宁糖浆在治疗IBS中的作用和机制。

图 1 内脏高敏感模型不同组别镜下观(免疫组化×400)。A: 脊髓; B: 下丘脑; C: 第三脑室下侧; 1-5: 蛋白组对照组、蛋白组肠炎宁组、空白组、直刺组肠炎宁组和直刺组对照组。

表 2 内脏高敏感大鼠下丘脑CRF免疫阳性神经元比较 (mean ± SD, n = 8)

分组	阳性面积(μm ²)	总吸光度	阳性指数
A组	2622.41 ± 655.38	6472.61 ± 1549.48	0.005 ± 0.001
B组	12 480.47 ± 2290.70 ^a	45 931.12 ± 10787.41 ^a	0.037 ± 0.009 ^a
C组	4195.98 ± 1853.76 ^{db}	14 770.68 ± 6524.39 ^{db}	0.012 ± 0.005 ^{db}
D组	11 422.00 ± 6740.52 ^a	45 923.09 ± 29212.90 ^a	0.037 ± 0.024 ^a
E组	3443.96 ± 1912.41 ^{dc}	11 509.99 ± 6306.63 ^{dc}	0.009 ± 0.005 ^{dc}

^aP<0.05 vs A组; ^bP<0.01 vs B组; ^cP<0.05 vs C组; ^dP<0.01 vs A组。

用药4 wk后, 再次评估各组大鼠的肠道敏感性, 对照组仍明显高于模型组, 差异有统计学意义(P<0.01); ig 4 wk后AWR = 3分时直肠注水量A、B、C、D和E组分别为1.35 ± 0.08、0.88 ± 0.18、1.28 ± 0.12、0.79 ± 0.12和1.30 ± 0.08 mL。经过肠炎宁糖浆ig治疗后, 其注水量较模型对照组有明显增加, 差异有统计学意义(P<0.01)。而其余各组间比较均无统计学差异。

2.3 染色结果 用DAB显色的免疫组化切片阳性区域呈棕黄色。分别取脑、脊髓免疫组化切片, 镜下阳性区域表达明显部位分别为下丘脑、第三脑室下侧以及脊髓腰膨大部, 其余部位表达微弱。典型的CRF阳性神经元表现为胞质染色呈棕黄色, 胞核不着色, 不同部位的CRF阳性神经元其形态表现多样, 如梭形、椭圆形、多角形等。镜下下丘脑及第三脑室下侧CRF阳性神经元分布较为密集, 分布均匀, 胞质染色呈棕黄色颗粒样, 胞核不着色, 部分呈空泡状, 形状多为圆形、梭形、椭圆形等; 脊髓腰膨大段切片染色可见CRF阳性神经元分布较脑稀疏, 分布不均

匀, 胞质染色呈棕黄色颗粒样, 胞核不着色, 镜下以梭形较为多见, 也可见多角形, 未见圆形及椭圆形, 阳性神经元在相同倍数光镜下体积较脑片神经元大(图1)。

2.4 结果比较 实验结果主要通过阳性区域面积, 总吸光度以及阳性指数进行比较。阳性区域面积为图像分析所得的面积, 通过仪器可以测出图像分析的平均吸光度, 反映表达部位的阳性强度。一张照片的IA(总吸光度)表示照片内所有阳性表达部位的Area(阳性表达部位)×Density(该部位的平均吸光度)的和。阳性指数表示总吸光度均分到该照片的值, 即所拍摄照片的黄色度, 值越大, 照片越黄, 以此评价照片所对应的组织的阳性程度。在下丘脑空白对照组阳性区域不明显, CRF阳性神经元稀少, 而造模组阳性区域染色较深, 神经元密集, 药物治疗组阳性神经元数目减少, 但是阳性区域染色深度没有改变。经过统计分析, 下丘脑、第三脑室下侧和脊髓, B组及D组阳性面积、总吸光度及阳性指数均高于A组, 差异有统计学意义(P<0.01)。C组阳性面积、总吸光度及阳性指数较B组高, 差

应用要点

目前,在国内对内脏高敏感大鼠CRF的报道较少,本研究有助于IBS新型药物的开发.

表 3 内脏高敏感大鼠第三脑室下侧CRF免疫阳性神经元比较 (mean ± SD, n = 8)

分组	阳性面积(μm ²)	总吸光度	阳性指数
A组	2764.40 ± 435.14	6605.40 ± 1155.27	0.005 ± 0.001
B组	9816.24 ± 2393.63 ^a	46 399.50 ± 10 461.24 ^a	0.038 ± 0.009 ^a
C组	4906.71 ± 2568.88 ^{db}	14 770.68 ± 6524.39 ^{db}	0.012 ± 0.005 ^{db}
D组	11 792.77 ± 4782.24 ^a	49 083.76 ± 26768.68 ^a	0.040 ± 0.022 ^a
E组	3983.59 ± 2166.83 ^{dc}	13 808.96 ± 7363.04 ^{dc}	0.011 ± 0.006 ^{dc}

^aP<0.05 vs A组; ^bP<0.01 vs B组; ^cP<0.05 vs C组; ^dP<0.01 vs A组.

表 4 内脏高敏感大鼠脊髓CRF免疫阳性神经元比较 (mean ± SD, n = 8)

分组	阳性面积(μm ²)	总吸光度	阳性指数
A组	1154.93 ± 409.45	2671.58 ± 1222.93	0.002 ± 0.001
B组	7824.93 ± 1169.19 ^a	33 814.07 ± 9645.65 ^a	0.028 ± 0.008 ^a
C组	3128.50 ± 1232.01 ^{db}	11 861.96 ± 4084.87 ^{db}	0.010 ± 0.003 ^{db}
D组	6702.10 ± 1288.28 ^a	29 664.75 ± 29212.90 ^a	0.024 ± 0.004 ^a
E组	3321.73 ± 1015.25 ^{dc}	14 685.04 ± 6450.88 ^{dc}	0.012 ± 0.005 ^{dc}

^aP<0.05 vs A组; ^bP<0.01 vs B组; ^cP<0.05 vs C组; ^dP<0.01 vs A组.

异有统计学意义($P<0.01$). E组阳性面积、总吸光度及阳性指数较D组高,差异有统计学意义($P<0.01$). C组及E组阳性程度较A组高,差异有统计学意义($P<0.05$). B组与D组无统计学差异(表2-4).

3 讨论

IBS是多种因素引起的疾病,据文献报道,欧美等发达国家患病率达9%-22%^[1]. 美国的调查显示每年约有300万次的IBS患者就诊,相应的处方达220万张,每年约有96 000名IBS患者住院治疗;IBS患者分别占初级医疗和消化专科门诊就诊人数的12%和28%,每年耗去的医疗资源约80亿美元^[11]. 中国的总体资料不详,而香港、北京、广东地区的发病率分别为6.6%(Roma II)^[12]、7.26%(Manning)和11.5%(Manning)^[13]. 现有对其发病原因及发病机制的不同观点,包括肠道动力和肠道平滑肌功能障碍、内脏感觉异常、脑-肠轴学说、精神心理因素、消化道激素及全肠道感染等. 近年来,许多研究表明IBS与内脏的高敏感性异常现象有关^[14]. 自1973年Ritchie报导IBS患者结肠气囊扩张疼痛阈值下降以来,内脏高敏感机制备受关注. 内脏高敏感的可能机制包括以下几个方面: (1) 肠道感觉的异常,如IBS患者对机械刺激有高敏感. (2) 内脏感觉神经传导通路异常,如IBS患者内脏感觉的超敏反应已被感觉刺激的评

估所证实,他能反映感觉神经通路和认识过程的异常^[15]. (3) 免疫炎症和肠神经系统的联系, Barbara *et al*^[16]发现IBS患者结肠黏膜内T淋巴细胞增多,认为这些免疫细胞和肠神经系统的轴突纤维在解剖学上有着密切的联系. (4) 高级中枢参与内脏高敏感的形成, Accarino *et al*^[17]报道,在直肠扩张前或当时给予心理压力(听力分散)会增加直肠对扩张的敏感性.

促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin releasing factor, CRF)的主要作用为促进腺垂体合成与释放促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH). CRF是一种重要的神经内分泌肽^[18-19],主要分布在中枢神经系统中与应激相关的重要区域,作为应激反应中的关键调节因子,通过其受体产生一系列生物学效应,调动机体各系统以应答应激刺激,调节内分泌、自主神经、免疫和行为反应^[20]. CRF及CRF相关肽都能引起与应激状态下相似的胃肠蠕动改变^[21]. 有实验表明,向应激大鼠脑室内或外周静脉注射CRF均可对结肠产生刺激作用,使结肠的传输运动加速并促进粪便的排出^[22]. 所以,中枢注射CRF已经成功地模拟了应激情况下的动物胃肠道动力的改变,这都说明CRF在介导应激引起的胃肠道动力改变的重要作用,他能引起急性应激引起的相似的结肠改变. 应激通过CRF和肥大细胞影响脑-肠轴环路功能而导致胃肠功能紊乱^[23], Williams *et al*^[24]据此建立了应激诱导

的IBS模型. 国外文献也有报道, 正常人群静脉给予选择性CRF1受体激动剂可模拟应激引起的内脏反应^[25]. 选择性CRF1受体激动剂降低了结肠刺激引起的痛阈, 增强了结肠运动^[26-27]. 有研究显示, 外周注射CRF提高人对结肠气囊扩张的敏感性, 类似于IBS的内脏高敏感. 最近有学者报道应用非选择性CRF受体拮抗剂可改善IBS患者对直肠电刺激引起的结肠动力改变和疼痛反应^[28]. 另外, CRFR1信号途径与应激相关的结肠功能改变和内脏高敏性相关. 近年研究表明, IBS患者57%其结肠呈高敏感性, 本实验通过条件刺激与非条件刺激结合以及ip白蛋白建立内脏高敏感动物模型, 探讨CRF在内脏高敏感大鼠传导通路中的表达.

我们发现CRF在空白对照组大鼠脑、脊髓中表达微弱, 而在内脏高敏感大鼠模型中有较高的表达, 其阳性指数明显高于空白对照组. 脑片中我们发现, CRF阳性表达区域以下丘脑最为广泛, 第三脑室下侧也有较高程度的表达, 而脊髓片中, 阳性神经元也有显著表达, 但其CRF阳性神经元分布较脑片稀疏, 阳性表达面积与脑片相比有所减少. 由此可以证明, 内脏高敏感传导通路中CRF也可能存在关键的作用, IBS患者的脑-肠轴可能对CRF反应过度, 下丘脑是CRF促进结肠运动的作用点, 而不同部位的CRF对结肠的作用力存在差异. 因此可以推测下丘脑CRF的释放可以影响结肠的运动, 高敏感的结肠感觉感受器兴奋异常可引起下丘脑及其相关区域的CRF神经兴奋, 从而引起结肠的高运动以及腺体的分泌, 由此可以解释IBS与CRF的相关性. 我们可以设想, 通过对下丘脑以及相关区域的CRF释放的调节, 可以改善IBS患者症状.

肠炎宁糖浆是根据民间验方, 精选数味良药(黄毛耳草、地锦草、香薷、樟树根和枫树叶)研制而成的纯中药糖浆制剂, 具有清热、利湿和行气的作用. 药理上对小肠平滑肌有很好的松弛作用, 减弱小肠推进运动, 另外具有解毒、杀菌和镇痛作用. 对IBS及急慢性胃肠炎引起的腹泻、腹痛及细菌性痢疾、小儿消化不良等症疗效显著. 我们前期实验也表明肠炎宁糖浆可以用于治疗IBS, 可以降低高级神经中枢信息上行传导通路上CGRP、c-fos的过度表达, 进而降低内脏敏感性, 其作用机制可能是改变了脊髓背角神经元上送的刺激信号, 抑制信息的上行传导, 提高对疼痛等刺激的感觉阈值, 从而降低内脏敏感性.

我们发现经过肠炎宁糖浆治疗4 wk后, 内脏高敏感模型组CRF阳性指数明显低于模型对照组, 但仍高于空白对照组, 镜下发现肠炎宁治疗组CRF阳性表达面积较治疗前有明显减少, 但对于单个神经元, 其表达强度与治疗前无明显差异. 由此可见, 肠炎宁可以有效减少CRF的释放, 但不能在短期内达到与正常组相同的CRF释放水平, 因此, 在短期治疗后, 仍可存在部分临床症状. 我们的实验表明, 肠炎宁糖浆可以降低高级神经中枢信息上行传导通路上CRF的过度表达, 从而降低内脏敏感性, 其可能机制为肠炎宁糖浆改变了结肠感觉感受器的兴奋性, 从而减少了下丘脑以及相关区域的CRF神经元的兴奋, CRF释放减少, 影响了结肠的运动以及腺体的分泌, 从而降低内脏敏感性, 改善患者的症状.

通过实验我们认为, CRF可以作为研究内脏高敏感传导系统的一个关键因子. 两种模型成功建立内脏高敏感状态, 且可以相似水平的激发CRF的表达增高, 而治疗后CRF明显降低, 因此, 在今后的治疗中, CRF可以作为治疗IBS一个新的研究靶点, 同时也可用于评价治疗效果.

4 参考文献

- 1 许小幸, 李定国. 肠易激综合症的流行病学分布特征. *中华流行病学杂志* 2003; 24: 523-525
- 2 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 韩少梅, 郭慧平, 方秀才. 北京地区肠易激综合症的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查. *中华流行病学杂志* 2000; 21: 26-29
- 3 崔楠, 吴保平, 吴赛珠. 肠易激综合征患者外周血孕激素、睾酮激素含量分析. *现代消化及介入治疗* 2005; 10: 134-136
- 4 Rossel P, Drewes AM, Petersen P, Nielsen J, Arendt-Nielsen L. Pain produced by electric stimulation of the rectum in patients with irritable bowel syndrome: further evidence of visceral hyperalgesia. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 1001-1006
- 5 王艳梅, 李延青, 吕国苹, 顾晓萌, 郭玉婷, 左秀丽, 张海燕, 李君曼, 赵宪村. 肠易激综合征病人内脏高敏感性的研究. *中华腹部疾病杂志* 2002; 2: 420-422
- 6 Verne GN, Price DD. Irritable bowel syndrome as a common precipitant of central sensitization. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4: 322-328
- 7 Sarkar S, Hobson AR, Furlong PL, Woolf CJ, Thompson DG, Aziz Q. Central neural mechanisms mediating human visceral hypersensitivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1196-G1202
- 8 Drewes AM, Petersen P, Rossel P, Gao C, Hansen JB, Arendt-Nielsen L. Sensitivity and distensibility of the rectum and sigmoid colon in patients with irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 827-832
- 9 Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganiere M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002; 122:

■同行评价

本文总体质量较好, 研究设计较科学合理, 写作流畅, 具有较好的学术价值.

- 1771-1777
- 10 Mayer EA, Naliboff BD, Chang L, Coutinho SV. V. Stress and irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G519-G524
- 11 American Gastroenterological Association medical position statement: irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1997; 112: 2118-2119
- 12 Kwan AC, Hu WH, Chan YK, Yeung YW, Lai TS, Yuen H. Prevalence of irritable bowel syndrome in Hong Kong. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1180-1186
- 13 Xiong LS, Chen MH, Chen HX, Xu AG, Wang WA, Hu PJ. A population-based epidemiologic study of irritable bowel syndrome in Guangdong province. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2004; 84: 278-281
- 14 Dunlop SP, Spiller RC. Nutritional issues in irritable bowel syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001; 4: 537-540
- 15 Lawal A, Kern M, Sidhu H, Hofmann C, Shaker R. Novel evidence for hypersensitivity of visceral sensory neural circuitry in irritable bowel syndrome patients. *Gastroenterology* 2006; 130: 26-33
- 16 Barbara G, Stanghellini V, Berti-Ceroni C, De Giorgio R, Salvioli B, Corradi F, Cremon C, Corinaldesi R. Role of antibiotic therapy on long-term germ excretion in faeces and digestive symptoms after Salmonella infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1127-1131
- 17 Accarino AM, Azpiroz F, Malagelada JR. Attention and distraction: effects on gut perception. *Gastroenterology* 1997; 113: 415-422
- 18 Bittencourt JC, Sawchenko PE. Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *J Neurosci* 2000; 20: 1142-1156
- 19 高翔, 胡品津. 肠道神经肽类激素促皮质激素释放激素与物质相互关系的研究. *实用医学杂志* 2005; 21: 2610-2612
- 20 Bakshi VP, Kalin NH. Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene-environment interactions. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 1175-1198
- 21 Heinrichs SC, Tache Y. Therapeutic potential of CRF receptor antagonists: a gut-brain perspective. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10: 647-659
- 22 Monnikes H, Raybould HE, Schmidt B, Tache Y. CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates colonic motor activity in fasted rats. *Peptides* 1993; 14: 743-747
- 23 Castagliuolo I, Lamont JT, Qiu B, Fleming SM, Bhaskar KR, Nikulasson ST, Kornetsky C, Pothoulakis C. Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am J Physiol* 1996; 271: G884-G892
- 24 Williams CL, Villar RG, Peterson JM, Burks TF. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1988; 94: 611-621
- 25 Tache Y, Martinez V, Wang L, Million M. CRF1 receptor signaling pathways are involved in stress-related alterations of colonic function and viscerosensitivity: implications for irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 1321-1330
- 26 Lembo T, Plourde V, Shui Z, Fullerton S, Mertz H, Tache Y, Sytnik B, Munakata J, Mayer E. Effects of the corticotropin-releasing factor (CRF) on rectal afferent nerves in humans. *Neurogastroenterol Motil* 1996; 8: 9-18
- 27 Fukudo S, Nomura T, Hongo M. Impact of corticotropin-releasing hormone on gastrointestinal motility and adrenocorticotrophic hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 1998; 42: 845-849
- 28 Sagami Y, Shimada Y, Tayama J, Nomura T, Satake M, Endo Y, Shoji T, Karahashi K, Hongo M, Fukudo S. Effect of a corticotropin releasing hormone receptor antagonist on colonic sensory and motor function in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2004; 53: 958-964

编辑 师忠芳 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验; (2) 采集数据; (3) 分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章; (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析; (2) 获取研究经费; (3) 行政、技术或材料支持; (4) 指导; (5) 支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-08)

S100A2基因及其蛋白在食管癌中的表达及其临床意义

尹玉, 张洪福

尹玉, 张洪福, 安徽医科大学病理解剖学教研室 安徽省合肥市 230032

尹玉, 2004年安徽医科大学硕士, 讲师, 主要从事消化系统肿瘤病理学研究。

作者贡献分布: 此课题由张洪福与尹玉设计; 在张洪福指导下, 实验操作与论文写作由尹玉完成; 研究所用试剂由张洪福提供。

通讯作者: 张洪福, 230032, 安徽省合肥市梅山路81号, 安徽医科大学基础医学院病理解剖学教研室. fyinyu@sohu.com

收稿日期: 2008-04-02 修回日期: 2008-04-23

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-07-08

Expression of S100A2 mRNA and protein and its clinical significance in esophageal cancer

Yu Yin, Hong-Fu Zhang

Yu Yin, Hong-Fu Zhang, Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Correspondence to: Hong-Fu Zhang, Department of Pathology, Anhui Medical University, 81 Meishan Road, Hefei 230032, Anhui Province, China. fyinyu@sohu.com

Received: 2008-04-02 Revised: 2008-04-23

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of S100A2 mRNA and its protein in esophageal squamous cell cancer (ESCC) and their relationship with clinicopathologic features, and explore their roles in carcinogenesis and progression of esophageal cancer and to evaluate their clinicopathologic significance.

METHODS: Immunohistochemical staining (S-P method) was performed to detect S100A2 protein expression in 40 ESCC samples and 40 samples from normal esophageal mucosa. *In situ* hybridization (ISH) was performed to detect the expression of S100A2 mRNA.

RESULTS: The positive rates of S100A2 mRNA and S100A2 protein in ESCC samples were both markedly lower than that in normal mucosa (77.5% vs 100%, 72.5% vs 100%, both $P < 0.01$). The differences were both significant among the well differentiated, the moderately differentiated and the lowly differentiated groups (all $P < 0.05$). The expression levels of S100A2 mRNA and

S100A2 protein were significantly higher in well and moderately differentiated groups than that in lowly differentiated group (93.3% vs 85.7%, 86.7% vs 85.7%, both $P < 0.05$). There was significant difference between the lymph node-positive group and the lymph node-negative group (92% vs 53.3%, 92% vs 40%, both $P < 0.01$). A positive correlation was found between the expression of S100A2 mRNA and S100A2 protein ($r = 0.607$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: S100A2 plays an important role in ESCC carcinogenesis. S100A2 might be an important reference biomarker for ESCC biological behavior.

Key Words: Esophageal neoplasm; S100A2; *In situ* hybridization; Immunohistochemistry

Yin Y, Zhang HF. Expression of S100A2 mRNA and protein and its clinical significance in esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2119-2124

摘要

目的: 观察S100A2 mRNA及其蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其与食管癌临床病理特征之间的关系, 并探讨其在食管癌发生、发展中的作用及临床应用价值。

方法: 收集40例手术切除的食管鳞状细胞癌标本, 同时取40例手术切缘食管正常黏膜组织。应用免疫组织化学S-P法检测其中S100A2蛋白的表达, 原位分子杂交技术检测S100A2 mRNA的表达。

结果: S100A2 mRNA及S100A2蛋白在食管鳞状细胞癌组织中阳性表达率均明显低于正常食管黏膜(77.5% vs 100%, 72.5% vs 100%, 均 $P < 0.01$); 其中高、中、低分化三组间差异均有显著性(均 $P < 0.05$), 并且高、中分化组S100A2 mRNA的阳性表达率均明显高于低分化组(分别为93.3% vs 85.7%, 86.7% vs 85.7%, 均 $P < 0.05$); 无淋巴结转移组S100A2 mRNA阳性表达率均明显高于有淋巴结转移组(分别为92% vs 53.3%, 92% vs 40%, 均 $P < 0.01$)。食管鳞状细胞癌组织中S100A2 mRNA和S100A2

背景资料

目前尚未找到食管癌的特异性肿瘤标志, 尚无任何一种分子生物学指标可作为食管癌筛查、早期诊断和预后的指标。作为候选抑癌基因, S100A2与肿瘤发生发展之间的关系已逐渐引起人们的关注, 而S100A2在食管癌发生发展中所起到的作用, 及与生物学行为之间的关系, 人们尚知之甚少。

同行评议者

施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科; 刘占举, 教授, 郑州大学第二附属医院消化内科

■ 研发前沿

S100A2在许多恶性肿瘤中的表达情况已引起人们的关注,已有文献显示其在乳腺癌、黑色素瘤、前列腺癌、肺癌、胃癌等组织中均表达明显降低或缺失,因此被看作是候选抑癌基因,但具体机制目前尚不清楚,亟待更深入的研究。

蛋白的表达呈明显正相关($r = 0.607, P < 0.001$)。

结论: S100A2在食管癌的发生发展中具有重要作用,并可能作为判断食管癌生物学行为的重要参考指标。

关键词: 食管肿瘤; S100A2; 原位分子杂交; 免疫组织化学

尹玉, 张洪福. S100A2基因及其蛋白在食管癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2119-2124
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2119.asp>

0 引言

S100A2基因是一个肿瘤相关基因,定位于人染色体1q21^[1],其编码的蛋白质为97个氨基酸所组成的一个钙结合蛋白^[2]. 研究结果提示在S100A2存在时,因其能够结合钙离子而使钙离子浓度降低,致使细胞增生活性得到控制,从而抑制肿瘤的生成^[1]. 作为S100家族成员之一,与其他成员相比,S100A2具有其独特性. 首先,相对于其他S100蛋白定位于胞质,S100A2蛋白主要定位于胞核. 另外,相对于其他大多数S100家族成员对肿瘤的发生发展起促进作用,S100A2对肿瘤所起的主要是抑制作用,他在许多恶性肿瘤中表达明显降低或缺失,因此被看作是候选抑癌基因^[3]. 关于S100A2在食管癌组织中的表达及其与临床病理学因素之间的关系,目前国内外研究较少. 本研究应用免疫组织化学S-P法检测40例食管癌组织和40例正常食管黏膜组织中S100A2蛋白的表达情况;运用原位分子杂交技术检测食管癌组织和正常食管黏膜组织中S100A2 mRNA的表达,观察他们之间及其与食管癌临床病理因素之间的关系,并探讨他们在食管癌发生和发展中的作用,以期对食管癌早期诊断、早期治疗和判断其生物学行为提供新的参考指标。

1 材料和方法

1.1 材料 收集安徽医科大学第一附属医院病理科2005-2006年住院食管癌手术切除标本40例,患者术前均未作放疗、化疗及免疫治疗,术后病理诊断为食管鳞状细胞癌. 其中,男31例,女9例. 年龄49-76(中位年龄62)岁. 上段食管癌5例,中段食管癌18例,下段食管癌17例;溃疡型29例,髓质型5例,蕈伞型5例,缩窄型1例;有淋巴结转移者15例,无淋巴结转移者25例. 按组织学分级:高分化15例,中分化14例,低分化11例. 按国际抗癌

联合会(UICC)1997年标准临床病理分期: I期1例, II期30例, III期8例, IV期1例. 所有标本组织经40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm厚连续切片,分别进行HE染色、免疫组化染色和原位杂交染色. 染色结果均由两位病理医生阅读诊断核实. 同时取40例距癌灶边缘5 cm以上切缘的正常黏膜组织作为对照组,并分别作上述各种染色. 兔抗人S100A2多克隆抗体购自Neomarker公司(1:100稀释), SP免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司, DAB显色试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司. S100A2原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司(产品编号: MK2639-h). DEPC由美国Sigma公司生产; DAB显色试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司.

1.2 方法 采用预实验反复多次证实均呈阳性的正常食管黏膜组织切片为阳性对照,用PBS代替一抗或杂交液作为阴性对照. 具体实验步骤参照试剂盒说明进行. S100A2蛋白免疫组织化学和S100A2 mRNA原位分子杂交阳性信号均为黄色或棕黄色颗粒,定位于细胞核或细胞核和细胞质^[4-5]. 每张切片选择10个高倍视野($\times 40$),根据阳性细胞数占视野中总细胞数的百分比判定:阳性细胞比例 $< 10\%$ 为阴性(-),阳性细胞比例 $\geq 10\%$ 为阳性(+)^[6].

统计学处理 应用SPSS13.0软件包进行统计分析. 计量资料采用 χ^2 检验,对行列表资料含有理论频数小于5者采用蒙特卡罗模拟方法(Monte Carlo)计算确切概率值. 等级资料的相关性分析采用非参数Spearman等级相关分析法检验.

2 结果

2.1 S100A2 mRNA和S100A2蛋白在食管癌组织和正常食管黏膜组织中的表达 S100A2 mRNA和S100A2蛋白阳性信号均为黄色或棕黄色颗粒,定位于细胞核或细胞核和细胞质. 在正常食管黏膜中S100A2 mRNA和S100A2蛋白的表达水平高(图1A,图2A);而在食管鳞状细胞癌中表达明显降低(图1B-D,图2B-D). 40例正常食管黏膜中S100A2 mRNA和蛋白的阳性率均为100%(40/40); 40例鳞状细胞癌组织中S100A2 mRNA阳性率为77.5%(31/40), S100A2蛋白阳性率为72.5%(29/40). S100A2 mRNA和蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达与正常食管黏膜相比,差异有显著性($P < 0.01$,表1).

2.2 食管鳞状细胞癌中S100A2 mRNA和S100A2蛋白表达与临床病理因素间的关系 S100A2

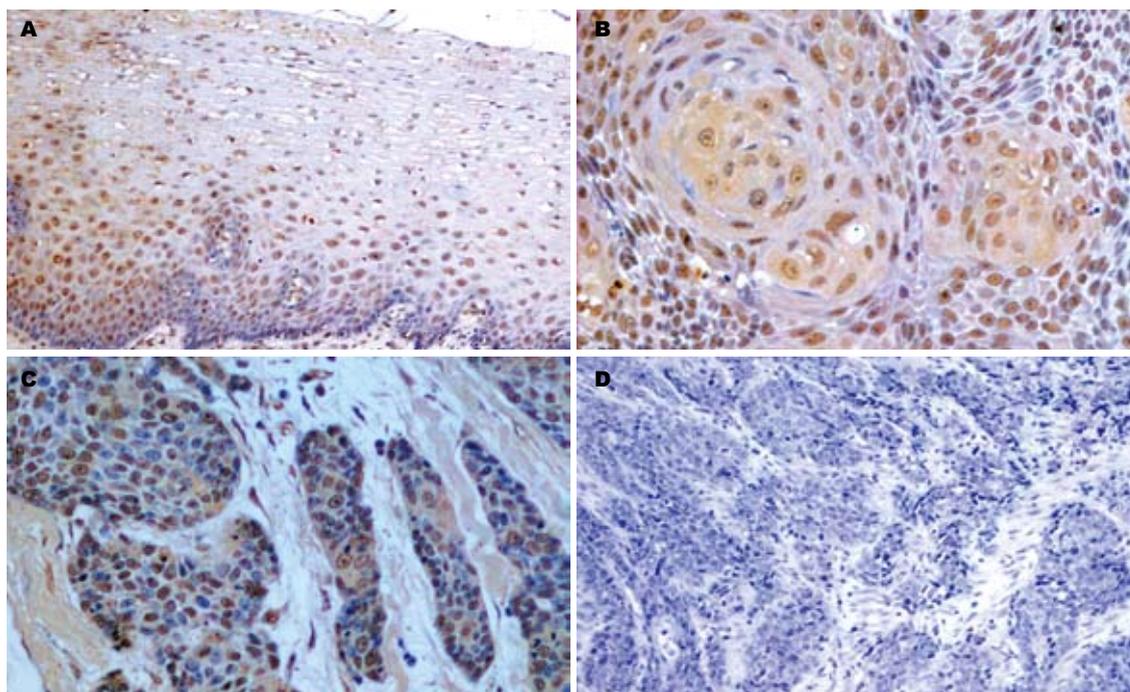


图 1 S100A2 mRNA的表达. A: 正常黏膜(+)(ISH $\times 100$); B: 高分化鳞状细胞癌(+)(ISH $\times 200$); C: 中分化鳞状细胞癌(+)(ISH $\times 200$); D: 低分化鳞状细胞癌(-)(ISH $\times 100$).

■创新盘点
本文首次利用原位杂交技术在食管鳞癌和相应正常食管黏膜中检测S100A2基因的表达情况,同时利用免疫组化方法检测S100A2蛋白的表达情况,从而在基因和蛋白水平上探讨S100A2与食管癌的发生发展及各项临床病理参数之间的关系,为S100A2作为判断食管癌生物学行为的重要参考指标提供理论依据.

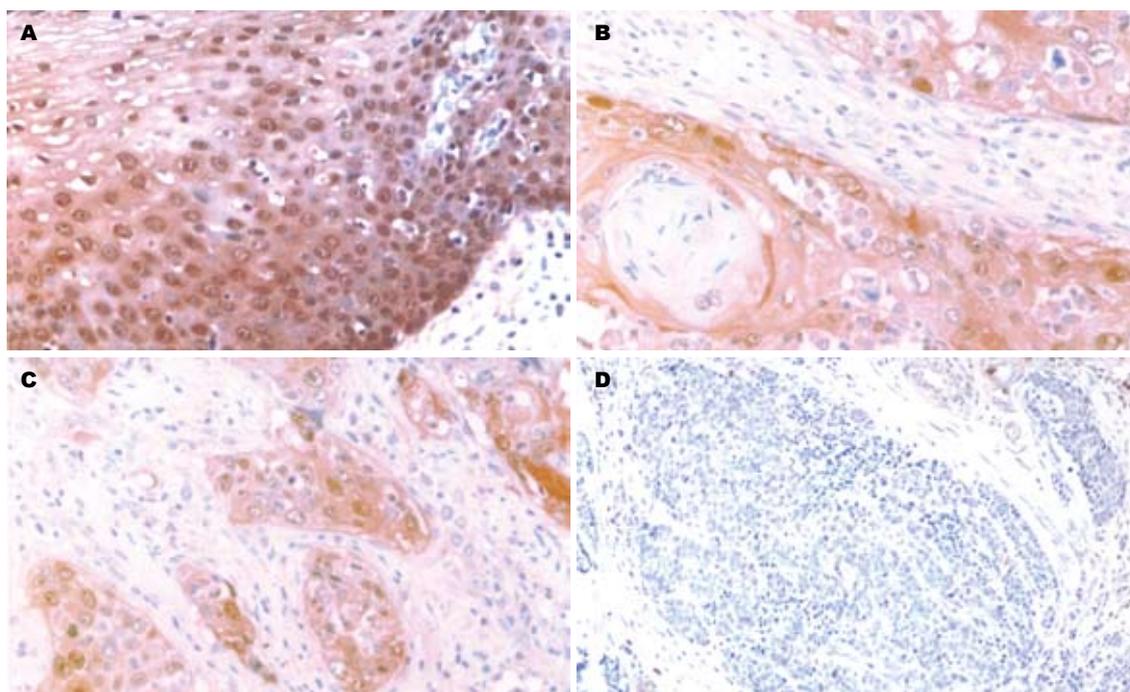


图 2 S100A2蛋白表达. A: 正常黏膜(+)(S-P $\times 200$); B: 高分化鳞状细胞癌(+)(S-P $\times 200$); C: 中分化鳞状细胞癌(+)(S-P $\times 200$); D: 低分化鳞状细胞癌(-)(S-P $\times 100$).

mRNA在高、中、低分化鳞状细胞癌中的阳性表达率分别是93.3%(14/15)、85.7%(12/14)、45.5%(5/11),三组间差异有显著性($P < 0.05$),并且高、中分化组S100A2 mRNA的阳性表达率均高于低分化组($P < 0.05$);无淋巴结转移组其阳性表达率为92.0%(23/25),而有淋巴结转移组

S100A2 mRNA阳性表达率为53.3%(8/15),两者之间差异有显著性($P < 0.01$). S100A2蛋白在高、中、低分化鳞状细胞癌中的阳性表达率分别是86.7%(13/15)、85.7%(12/14)、36.4%(4/11),三组间比较,差异有显著性($P < 0.01$),并且高、中分化组S100A2蛋白的阳性表达率均高于低分

■应用要点

本文同时在基因和蛋白水平上探讨S100A2与食管癌的发生发展及各项临床病理参数之间的关系,为S100A2作为判断食管癌生物学行为的重要参考指标提供理论依据。以期为食管癌早期诊断、早期治疗和判断预后提供新的参考指标。

表 1 S100A2 mRNA和S100A2蛋白在正常食管黏膜和食管癌组织中的表达 ($n = 40$)

分组	S100A2 mRNA的表达		阳性率 (%)	S100A2蛋白的表达		阳性率 (%)
	-	+		-	+	
正常食管黏膜	0	40	100	0	40	100
食管鳞状细胞癌	9	31	77.5 ^b	11	29	72.5 ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常食管黏膜组。

表 2 食管癌组织中S100A2 mRNA和S100A2蛋白的表达与临床病理因素间的关系

分组	n	S100A2 mRNA的表达		阳性率 (%)	S100A2蛋白的表达		阳性率 (%)
		-	+		-	+	
性别							
男	31	7	24	77.4	8	23	74.2
女	9	2	7	77.8	3	6	66.7
年龄(岁)							
<62	21	4	17	81	4	17	81
≥62	19	5	14	73.7	7	12	63.2
临床分期							
I + II期	31	5	26	83.9	6	25	80.7
III + IV期	9	4	5	55.6	5	4	44.4
肿瘤部位							
上+中段	23	3	20	87	5	18	78.3
下段	17	6	11	64.7	6	11	64.7
肿瘤大小(cm)							
<3.5	16	3	13	81.3	4	12	75
≥3.5	24	6	18	75	7	17	70.8
浸润深度							
未及浆膜	20	4	16	80	4	16	80
侵及浆膜	20	5	15	75	7	13	75
分化程度							
高	15	1	14	93.3	2	13	86.7
中	14	2	12	85.7 ^c	2	12	85.7 ^c
低	11	6	5	45.5 ^b	7	4	36.4 ^b
淋巴结转移							
无	25	2	23	92	2	23	92
有	15	7	8	53.3 ^d	9	6	40 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 高、中分化组; ^c $P < 0.05$ vs 高分化组; ^d $P < 0.01$ vs 无淋巴结。

化组($P < 0.05$); 无淋巴结转移组其阳性表达率为92.0%(23/25), 而有淋巴结转移组S100A2蛋白阳性表达率为40.0%(6/15), 两者之间差异有显著性($P < 0.01$)。S100A2 mRNA和S100A2蛋白的表达与患者性别、年龄、临床分期、肿瘤部位、肿瘤大小及浸润深度均无关($P > 0.05$, 表2)。

2.3 S100A2 mRNA与S100A2蛋白在食管癌组织中表达之间的关系 在40例食管鳞状细胞癌中, S100A2 mRNA和S100A2蛋白表达均阳性的27例, 均阴性的7例, 前者阳性而后者阴性的4例,

前者阴性而后者阳性的2例。经统计学处理, 两者表达呈正相关($r = 0.607$, $P = 0.000$, 表3)。

3 讨论

S100A2基因全长为8670 bp, 定位于人染色体1q21的250-300 kb之间。1991年由Lee *et al*^[7]利用抑制性消减杂交技术, 将正常细胞NMECS(76株, 从乳腺成形术中分离出的二倍体细胞)和肿瘤细胞TMECS(21MT-2, 从胸膜渗出液中分离出的非整倍体细胞)的mDNA和cRNA经二轮杂交

表 3 食管癌组织中S100A2蛋白与mRNA表达间的关系

S100A2蛋白	S100A2 mRNA		合计
	+	-	
+	27	2	29
-	4	7	11
合计	31	9	40

$r = 0.607, P = 0.000$.

后, 筛选并鉴定了S100A2基因全长cDNA(当时命名为Clone19)。

S100A2基因是S100基因家族成员之一, S100基因家族共有S100A1-S100A11、S100B、S100C、S100P等21个成员, 其编码的蛋白均为钙结合蛋白。此蛋白由两个与钙离子有高亲和力的EF-手型结构组成。现已发现, 某些肿瘤的发生、发展与钙离子密切相关^[8], 还发现钙离子拮抗剂能够抑制肿瘤细胞的生长和转移。钙离子依赖与钙结合蛋白结合, 从而发挥其信使作用。S100蛋白通过对钙离子的调节及与靶蛋白的相互作用, 在体内发挥多种生物学功能。另有研究发现, S100家族中有15个成员其基因均定位于稳定性差的1号染色体长臂2区1带(1q21)^[8], 该区易发生各种染色体质量排, 如杂合性缺失、易位、重叠等; 同时发现, 定位于1q21的15个S100家族成员、SPRR及其他一些基因共同构成了表皮分化复合体(EDC), 该复合体与上皮的分化及上皮源性肿瘤的发生发展关系密切; 且有多种S100蛋白在多种肿瘤中表达异常, 并与肿瘤的浸润、转移有关, 因此S100家族与肿瘤的发生发展关系密切。目前已知的对肿瘤可能起促进作用的S100家族成员主要是S100A4、S100A6、S100A8、S100A9、S100B、S100P等, 可能起抑制作用的主要是S100A2等。

作为候选抑癌基因, 已有研究表明S100A2在许多恶性肿瘤中表达明显降低, 如乳腺癌^[9]、黑色素瘤^[10]、前列腺癌^[11]、肺癌^[12]和胃癌^[4]等, 并可能与肿瘤的发生发展及预后^[13]密切相关。

Ji *et al*^[14]用半定量RT-PCR法检测62例食管鳞癌和正常食管黏膜组织中S100A2及其他15种S100家族成员的表达, 结果显示54.8%(34/62)的肿瘤组织S100A2表达比正常组织显著下调, 并显示S100A2的表达失调分别与S100A8、S100A14、S100P的失调显著相关。

我们首次采用原位分子杂交方法对食管癌和正常食管黏膜中S100A2 mRNA的表达进行了

检测, 实验结果显示, S100A2 mRNA在食管癌组织中的阳性表达率(77.5%)显著低于正常食管黏膜(100%)。表明食管癌组织具有S100A2的低表达特性, 这与Ji *et al*的研究结果一致。但本实验中S100A2 mRNA在食管癌组织中的阳性表达率(77.5%)高于Ji *et al*的研究结果(54.8%), 分析原因可能为: (1)肿瘤组织病例数不一致(40例和62例)。 (2)检测S100A2 mRNA的方法不同(原位杂交技术和半定量RT-PCR技术)。

本实验进一步探讨了S100A2 mRNA的表达与食管癌临床病理因素之间的关系, 发现S100A2 mRNA在食管癌中的表达与患者性别、年龄、临床分期、肿瘤部位、肿瘤大小及浸润深度无关, 但与肿瘤分化程度及淋巴结转移显著相关, 发现在低分化组、有淋巴结转移组S100A2 mRNA表达较低。提示S100A2基因在肿瘤细胞分化过程中可能起着重要的作用, 并可能作为判断食管癌生物学行为的重要参考指标。我们由此推测S100A2可能是通过抑制肿瘤的转移从而发挥抑癌作用, 为S100A2对肿瘤抑制机制的研究提供线索。

Kyriazanos *et al*^[15]利用免疫组化技术检测116例食管鳞癌标本中S100A2表达的临床意义。结果显示S100A2阳性表达率为42.2%(49/116), 并且体积大、分化好的肿瘤阳性表达率显著高于其他肿瘤。T期相同时, 淋巴结阳性的肿瘤相对于阴性的肿瘤, S100A2蛋白低表达, 但只有在T1b期差别有显著性。淋巴结阴性的病例中, S100A2成为独立的预后指标。淋巴结阴性且不表达S100A2的食管鳞癌患者, 可能是低生存率的高风险群体, 有必要进一步采用适当的辅助治疗。

我们用免疫组化S-P法检测了40例食管癌和40例正常食管黏膜中S100A2蛋白的表达。结果发现, 食管癌组S100A2蛋白表达阳性率(72.5%)明显低于正常食管黏膜组(100%), 表明在食管癌中存在S100A2蛋白表达的减少, 提示食管癌的发生可能与S100A2基因表达产物减少有关。另外S100A2蛋白在不同分化程度食管癌中表达不同, 高、中分化癌组S100A2蛋白表达阳性率显著高于低分化癌组。这表明S100A2蛋白表达的减少与食管癌分化程度有关, 这与Kyriazanos *et al*的实验结果一致。本实验还发现有淋巴结转移组S100A2蛋白表达阳性率显著低于无淋巴结转移组, 说明S100A2蛋白表达与食管癌淋巴结转移有关。S100A2蛋白的表达与患者性别、年

■名词解释

S100A2: 基因全长为8670 bp, 定位于人染色体1q21的250-300 kb之间。1991年由Lee *et al*利用抑制性消减杂交技术筛选并鉴定了S100A2基因全长cDNA。其编码的蛋白质为97个氨基酸所组成的一个钙结合蛋白。在许多恶性肿瘤中均表达明显降低或缺失, 被看作候选抑癌基因。

■同行评价

本研究设计合理, 结论可靠, 无伦理问题, 具有一定的科学性和参考价值.

龄、临床分期、肿瘤部位、肿瘤大小及浸润深度均无关. 以上结果说明S100A2蛋白的低表达在食管癌的发生、发展及侵袭转移中具有重要作用. 本实验结果可能为食管癌的基因诊断和基因治疗提供一个新的理论依据.

本研究显示S100A2 mRNA与S100A2蛋白在食管癌中的表达均降低, 呈正相关, 提示S100A2蛋白表达的调控主要在转录水平, S100A2通过降低转录活性, 促进蛋白质表达水平的下调. 我们另外发现, S100A2 mRNA与S100A2蛋白在食管癌中的表达同临床病理特征之间的关系比较: S100A2 mRNA和蛋白表达与患者性别、年龄、临床分期、肿瘤部位、肿瘤大小及浸润深度均无关, 均与肿瘤分化程度及淋巴结转移显著相关, 两者观察结果一致.

本实验结果显示食管癌组织中S100A2 mRNA、S100A2蛋白的表达下调, 并与肿瘤分化程度及淋巴结转移有关, 提示他们在食管癌的发生发展中具有重要作用, 并可能作为判断食管癌生物学行为的重要参考指标. 食管癌组织中S100A2 mRNA、S100A2蛋白的表达呈正相关, 提示S100A2蛋白表达的调控主要在转录水平, S100A2蛋白表达水平的降低主要是相应转录水平下调的结果.

4 参考文献

- Engelkamp D, Schäfer BW, Mattei MG, Erne P, Heizmann CW. Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6547-6551
- Nakayama S, Kretsinger RH. Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1994; 23: 473-507
- Wicki R, Franz C, Scholl FA, Heizmann CW, Schäfer BW. Repression of the candidate tumor suppressor gene S100A2 in breast cancer is mediated by site-specific hypermethylation. *Cell Calcium* 1997; 22: 243-254
- 刘迎福, 贺修胜, 徐刚, 邓敏, 曾超, 赵帅. S100A2蛋白

表达与胃癌分化程度的关系研究. *南华大学学报(医学版)* 2005; 33: 1-12

- Tsai ST, Jin YT, Tsai WC, Wang ST, Lin YC, Chang MT, Wu LW. S100A2, a potential marker for early recurrence in early-stage oral cancer. *Oral Oncol* 2005; 41: 349-357
- 王玉萍, 楚天骄, 岳秀云, 雷冬梅, 党秋红, 郝志伟, 张曦. S100A2、S100A4、ER和PR在子宫肉瘤中的表达及其相关性研究. *中国妇幼保健* 2006; 21: 535-537
- Lee SW, Tomasetto C, Sager R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2825-2829
- Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 637-668
- Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A, Barraclough R. Expression of calcium-binding protein S100A2 in breast lesions. *Br J Cancer* 2000; 83: 1473-1479
- Maelandsmo GM, Flørenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O. Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer* 1997; 74: 464-469
- Gupta S, Hussain T, MacLennan GT, Fu P, Patel J, Mukhtar H. Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 106-112
- Matsubara D, Niki T, Ishikawa S, Goto A, Ohara E, Yokomizo T, Heizmann CW, Aburatani H, Moriyama S, Moriyama H, Nishimura Y, Funata N, Fukayama M. Differential expression of S100A2 and S100A4 in lung adenocarcinomas: clinicopathological significance, relationship to p53 and identification of their target genes. *Cancer Sci* 2005; 96: 844-857
- Lauriola L, Michetti F, Maggiano N, Galli J, Cadoni G, Schäfer BW, Heizmann CW, Ranalletti FO. Prognostic significance of the Ca(2+) binding protein S100A2 in laryngeal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 89: 345-349
- Ji J, Zhao L, Wang X, Zhou C, Ding F, Su L, Zhang C, Mao X, Wu M, Liu Z. Differential expression of S100 gene family in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 480-486
- Kyriazanos ID, Tachibana M, Dhar DK, Shibakita M, Ono T, Kohno H, Nagasue N. Expression and prognostic significance of S100A2 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol Rep* 2002; 9: 503-510

编辑 李军亮 电编 何基才

散发性结直肠癌中hMSH2与PTEN的表达及临床意义

宋伟庆, 范占彬, 王 烨, 袁虎方, 杨彦林, 王利伟, 韩彩丽

宋伟庆, 范占彬, 王烨, 袁虎方, 杨彦林, 王利伟, 河北医科大学第二医院胃肠外科 河北省石家庄市 050000
韩彩丽, 河北医科大学病理教研室 河北省石家庄市 050017
宋伟庆, 主任医师, 教授, 主要从事胃肠外科的研究。
河北省自然科学基金资助项目, No. C2008001116
通讯作者: 韩彩丽, 050017, 河北省石家庄市中山路361号, 河北医科大学病理教研室, bljysh1@163.com
电话: 0311-86265724
收稿日期: 2008-03-17 修回日期: 2008-05-07
接受日期: 2008-05-12 在线出版日期: 2008-07-08

Expression of hMSH2 and PTEN protein in sporadic colorectal carcinoma and their clinical significances

Wei-Qing Song, Zhan-Bin Fan, Ye Wang,
Hu-Fang Yuan, Yan-Lin Yang, Li-Wei Wang,
Cai-Li Han

Wei-Qing Song, Zhan-Bin Fan, Ye Wang, Hu-Fang Yuan, Yan-Lin Yang, Li-Wei Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Cai-Li Han, Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2008001116
Correspondence to: Cai-Li Han, Department of Pathology, Hebei Medical University, 361 Zhongshan Eastern Road, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China. bljysh1@163.com
Received: 2008-03-17 Revised: 2008-05-07
Accepted: 2008-05-12 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate expression alteration of human mut-s homologue 2 (hMSH2) and PTEN in sporadic colorectal carcinoma (SCC) and thereby to elucidate their relationship and clinical significance.

METHODS: Expression levels of hMSH2 and PTEN were detected using immunohistochemistry in 42 cases of SCC, its corresponding adjacent tissues (3 cm away from cancerous tissues), distal tissues (from cancer > 10 cm) and 15 cases of normal colorectal tissues. The expression levels of hMSH2 and PTEN protein were analyzed using Western blot in 42 cases of SCC and its corresponding distal controls.

RESULTS: Both negative expression of hMSH2 and PTEN were higher in SCC than in adjacent tissues, distal tissues or normal colorectal tissues ($\chi^2_{\text{hMSH2}} = 7.967$, $\chi^2_{\text{PTEN}} = 11.667$, both $P < 0.05$). PTEN protein expression was positively correlated with tumor differentiation ($r_s = 0.727$, $P < 0.05$) and negatively correlated with Dukes stage, invasive depth, lymph node metastasis and liver metastasis ($r_s = -0.727, -0.718, -0.718, -0.535$, all $P < 0.05$). No significant correlation was observed between hMSH2 protein expression and SCC pathological features. There was a positive correlation between of the hMSH2 and PTEN protein in SCC ($r_s = 0.679$, $P < 0.05$). Compared with the corresponding distal tissues, there were 25 cases of (59.52% 25/42) lower expression of hMSH2 protein and 19 cases (45.24% 19/42) of lower expression of PTEN protein in SCC.

CONCLUSION: PTEN protein expression is correlated with clinic and pathological features. The expression deletion of mismatch repair protein hMSH2 accompanied by down-regulated PTEN protein expression occur in SCC development.

Key Words: Sporadic colorectal carcinoma; hMSH2; PTEN; Immunohistochemistry; Western blotting

Song WQ, Fan ZB, Wang Y, Yuan HF, Yang YL, Wang LW, Han CL. Expression of hMSH2 and PTEN protein in sporadic colorectal carcinoma and their clinical significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2125-2130

摘要

目的: 研究错配修复蛋白hMSH2与PTEN在散发性结直肠癌的表达变化及两者之间的关系, 以进一步探讨其临床意义。

方法: 采用SP免疫组织化学两步法对42例散发性结直肠癌、相应近端癌旁组织(距癌组织3 cm)和远端癌旁组织(距癌组织>10 cm)及15例正常结直肠组织进行hMSH2与PTEN蛋白表达检测。同时Western blot法检测42例散发性结直肠癌、相应远端对照组织hMSH2与PTEN蛋白表达。分析散发性结直肠癌发病机

背景资料

结直肠癌发病率呈上升趋势, 在西方发达国家结直肠癌仅次于肺癌位于恶性肿瘤发病的第2位, 在我国居第3位。在发病率上升的同时, 其发病年龄趋于年轻化, 发病部位趋于低位直肠。本研究进一步探讨散发性结直肠癌发病机制及hMSH2与PTEN蛋白表达与临床病理之间的关系。

同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■ 研究前沿

近10余年来,结直肠癌发生分子模型的提出、遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)发病机制的阐明和APC- β -catenin-Tcf通路改变在结直肠癌发生中作用的确定是结直肠癌研究具有影响的三大进展。

制及hMSH2与PTEN蛋白表达与临床病理之间的关系。

结果: 结直肠癌组织中, hMSH2与PTEN蛋白失表达率(阴性率)均低于正常结直肠组织及近端癌旁组织、远端癌旁组织 ($\chi^2_{\text{hMSH2}} = 7.967$, $\chi^2_{\text{PTEN}} = 11.67$, 均 $P < 0.05$)。PTEN蛋白表达与肿瘤分化程度呈正相关($r_s = 0.727$, $P < 0.05$), 与Dukes分期、浸润深度、淋巴结转移、肝转移均呈负相关($r_s = -0.727$, -0.718 , -0.718 , -0.535 , 均 $P < 0.05$)。hMSH2蛋白表达与上述临床病理特征未见明显相关。hMSH2与PTEN蛋白表达在散发性结直肠癌中呈正相关($r_s = 0.679$, $P < 0.05$)。与远端对照组织相比42例胃癌组织中hMSH2蛋白低表达率为59.52%(25/42), PTEN低表达率为45.24%(19/42)。

结论: PTEN表达与其临床病理特征相关; 在散发性结直肠癌发生、发展过程中错配修复蛋白hMSH2表达缺失伴有PTEN蛋白表达下调。

关键词: 散发性结直肠癌; hMSH2; PTEN; 免疫组织化学; 免疫印迹法

宋伟庆, 范占彬, 王辉, 袁虎方, 杨彦林, 王利伟, 韩彩丽. 散发性结直肠癌中hMSH2与PTEN的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2125-2130

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2125.asp>

0 引言

结直肠癌发病率呈上升趋势, 在西方发达国家结直肠癌仅次于肺癌位于恶性肿瘤发病的第2位, 在我国居第3位。在发病率上升的同时, 其发病年龄趋于年轻化, 发病部位趋于低位直肠。有关错配修复蛋白hMSH2、hMLH1及微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)、PTEN多有报道, 但hMSH2和PTEN之间的关联报道鲜见。错配修复(mismatch repair, MMR)基因是广泛存在于原核及真核生物细胞内高度保守的看家基因。错配修复基因功能缺陷与多种肿瘤尤其是结直肠癌的发生关系密切。目前人类的MMR系统含有9个基因: hMLH1, hMLH3, hPMS1, hPMS2, hMSH2, hMSH3, hMSH4, hMSH5, hMSH6。其中hMLH1和hMSH2是人类MMR系统中功能最重要的两个基因^[1]。PTEN为一新发现的抑癌基因, 位于10q23.3, 转录产物为515 kb mRNA, 他在细胞凋亡、迁移和肿瘤演进中具有重要作用^[2]。本研究采用SP免疫组织化学两步法对42例散发性结直

肠癌、相应近端癌旁组织(距癌组织3 cm)和远端癌旁组织(距癌组织>10 cm)及15例正常结直肠组织进行hMSH2与PTEN蛋白表达的检测。采用Western blot检测42例散发性结直肠癌、相应远端对照组织(距癌组织>10 cm)进行hMSH2与PTEN蛋白表达的检测。进一步探讨散发性结直肠癌发病机制及hMSH2与PTEN蛋白表达表达与临床病理之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 研究对象为2006-01/2007-12在河北医科大学第二医院外科接受治疗的原发性结直肠癌的患者42例, 取患者癌组织、相应近端癌旁组织(距癌组织3 cm)和远端癌旁组织(距癌组织>10 cm)及15例正常结直肠组织(为外伤、息肉、溃疡病需手术切除的正常结直肠组织)所取标本备2份。1份迅速放入-80℃冰箱中以保持标本的新鲜备用, 另1份经40 g/L甲醛溶液固定、石蜡包埋、4 μm 连续切片备用。癌组织均经病理医师确诊。其中男性23例, 女性19例。年龄38-75(平均年龄58.31 \pm 1.28)岁。结肠癌23例, 直肠癌19例。高度分化癌和中度分化癌27例, 低分化癌和未分化癌15例。hMSH2兔抗人多克隆抗体购自Biolegend公司, 工作浓度1:100, PTEN兔抗人多克隆抗体购自Biolegend公司, 工作浓度1:50, SP免疫组化试剂盒、DAB试剂盒均购于北京中山生物技术公司。Tris-HCl工作浓度50 mmol/L; NP40购自华美生物工程公司, 工作浓度1%; 脱氧胆酸钠工作浓度0.5%; SDS工作浓度0.1%; PMSF购自Promega公司, 工作浓度1 mmol/L; Aprotinin购自Amrcsco公司工作浓度10 mg/L; 预染蛋白标准购自美国Fermentas公司; 考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒购自南京建成生物试剂公司; 蛋白酶K购自拜昂生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测方法: 将收集的标本经100 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋后制成3-4 μm 连续切片, 按试剂盒说明书进行免疫组织化学染色, DAB显色, 苏木素复染后, 中性树脂封片。取已知阳性组织作阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照。hMSH2、PTEN蛋白均定位在胞质, 胞质中出现棕黄色颗粒为阳性表达。阳性细胞计数方法: 高倍镜下(400倍)每张组织切片记数5个视野, 每个视野计数100个细胞, 取阳性细胞数百分比的平均值。阳性细胞数占11%-50%时为低表达, 阳性细胞数占51%-100%

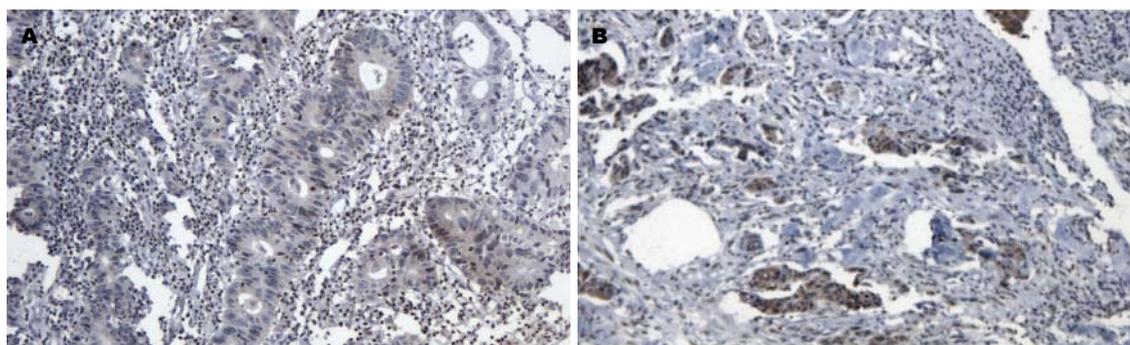


图 1 免疫组织化学检测hMSH2与PTEN在散发性结直肠癌中低表达($\times 100$). A: hMSH2; B: PTEN.

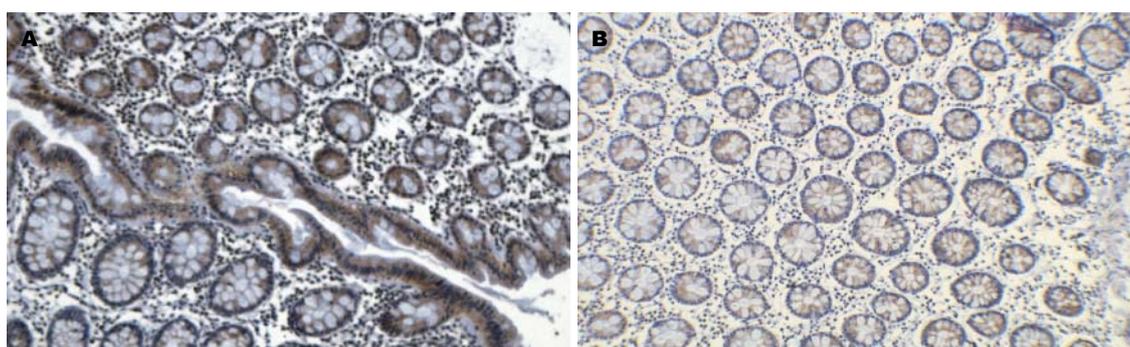


图 2 免疫组织化学检测hMSH2与PTEN在正常结直肠组织表达($\times 100$). A: hMSH2; B: PTEN.

为高表达, 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 时则视为失表达(阴性).

1.2.2 Western blot检测方法: (1)提取组织总蛋白: 剪碎组织, PBS漂洗2遍. 加裂解缓冲液作用10 min, 制成匀浆. 离心取上清液, 用考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒定量分析, 每次检测前用 β -actin抗体标准化监测. (2)配置SDS-PAGE, 标本上样. (3)10 mA稳流条件电泳3 h. (4)转膜, 5%脱脂奶粉封闭过夜. (5)加一抗, 4°C 过夜; TTBS漂洗3次; 加二抗, 37°C 1 h, TTBS漂洗3次. (6)DAB显色, 采用凝胶分析系统进行照相、分析. 凝胶成像系统(UVP, 美国)LabWorks4.5软件对蛋白表达行半定量分析, 以积分吸光度(LA)值表示. 以相对LA值比较蛋白表达高低. 相对LA值=hMSH2和PTEN蛋白的LA值/相应 β -actin蛋白的LA值. 判定标准: 以正常组织相对LA值作为参照标准, 计算95%参考值范围, 对癌组织相对LA值进行判断, 低于下限则判为低表达, 高于上限则判为高表达.

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件进行统计学数据处理, 计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义. 应用非参数统计中Spearman等级相关对二者在结直肠癌中表达及相互间关系进行分析.

2 结果

2.1 免疫组织化学检测hMSH2与PTEN蛋白表达特征 hMSH2失表达率(阴性率)在癌组织为30.95%(13/42)(图1A), 在近端癌旁组织为19.05%(8/42), 在远端癌旁组织为16.67%(7/42), 在正常结直肠组织为6.67%(1/15)(图2A). hMSH2在癌组织中失表达率高于近端癌旁组织、远端癌旁组织及正常结直肠组织($\chi^2 = 7.967, P < 0.05$), 而近端癌旁组织、远端癌旁组织和正常组织失表达率无显著差异. PTEN失表达率在癌组织为42.86%(18/42)(图1B), 在近端癌旁组织为23.81%(10/42), 在远端癌旁组织为16.67%(7/42), 在正常结直肠组织为6.67%(1/15)(图2B). PTEN在癌组织中失表达率高于近端癌旁组织、远端癌旁组织及正常结直肠组织($\chi^2 = 11.67, P < 0.05$), 而近端癌旁组织、远端癌旁组织和正常组织失表达率无显著差异(表1).

hMSH2及PTEN低表达及失表达与患者年龄、性别、肿瘤发生的部位、组织学类型、大体类型均未见明显关系, PTEN低表达及失表达与肿瘤分化程度、浸润深度、Dukes分期、淋巴结转移及肝转移有统计学意义($P < 0.05$, 表2), hMSH2低表达及失表达与肿瘤分化程度、浸润深度、Dukes分期、淋巴结转移及肝转移未见

■ 相关报道

赵勇 *et al* 研究结直肠癌survivin, PTEN表达及其与细胞增殖、凋亡的关联性结果显示PTEN阳性率与分化程度正相关.

■应用要点

在散发性结直肠癌发生、发展过程中错配修复蛋白hMSH2表达缺失伴有PTEN蛋白表达下调,二者联合与散发性结直肠癌发生、发展关系密切.联合检测二者的表达可能会有助于结直肠癌预防及诊断.

表 1 hMSH2、PTEN蛋白在各组组织中的表达

分组	n	hMSH2			PTEN		
		阴性	低表达	高表达	阴性	低表达	高表达
正常组	15	1	5	9	1	6	8
远端癌旁	42	7	16	19	7	13	22
近端癌旁	42	8	14	20	10	20	12
结直肠癌	42	13	18	11	18	9	15

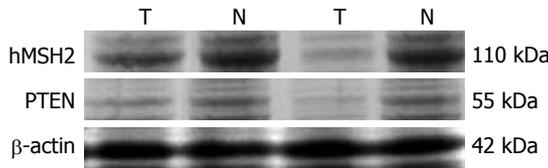


图 3 蛋白印迹检测hMSH2与PTEN在散发性结直肠癌和远端对照组织中的表达.

明显相关($P>0.05$,表2).

PTEN表达与肿瘤分化程度正相关($r_s = 0.727, P<0.05$),与浸润深度、Dukes分期、淋巴结转移、肝转移均负相关(分别为: $r_s = -0.727, r_s = -0.718, r_s = -0.718, r_s = -0.535, P<0.05$,表3).

hMSH2与PTEN蛋白表达在散发性结直肠癌中呈正相关($r_s = 0.679, P<0.05$),错配修复蛋白hMSH2表达缺失伴有PTEN蛋白表达下调(表4).

2.2 Western blot检测结果 β -actin、hMSH2、PTEN蛋白分子量分别为42 kDa、110 kDa、55 kDa, Western杂交后在42 kDa、110 kDa、55 kDa位置出现相应阳性条带.采用凝胶成像分析系统对杂交条带进行半定量分析,蛋白含量以IA表示,以相对积分吸光度比较蛋白表达高低,每次检测蛋白时均检测 β -actin蛋白,以其为标准对所检测hMSH2、PTEN蛋白进行定量.与对照组织相比,42例结直肠癌组织中25例hMSH2蛋白低表达,其低表达率为59.52%(25/42),19例PTEN蛋白低表达,其低表达率为45.24%(19/42),两种蛋白表达水平均明显低于对照组织($P<0.05$);16例两种蛋白均低表达. hMSH2与PTEN蛋白表达在散发性结直肠癌中呈正相关($r_s = 0.816, P<0.05$)(图3).

3 讨论

近10余年来,结直肠癌发生分子模型的提出、遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)发病机制的阐明和APC- β -catenin-Tcf通路改变在结直肠癌发生中作用的确定是结直肠癌研究具有影响

表 2 hMSH2和 PTEN蛋白表达与临床病理特征之间的关系

对比项目	n	hMSH2			PTEN		
		阴性	低表达	高表达	阴性	低表达	高表达
年龄(岁)							
≤55	22	6	10	6	10	4	8
>55	20	7	8	5	8	5	7
性别							
男	23	9	8	6	12	3	8
女	19	4	10	5	6	6	7
部位							
直肠	19	5	10	4	7	6	6
结肠	23	8	8	7	11	3	9
分化程度							
高中	27	11	8	8	8	5	14
低末	15	2	10	3	10	4	1
浆膜浸润							
有	15	4	6	5	14	1	0
无	27	9	12	6	4	8	15
Dukes分期							
A+B	22	5	10	7	1	8	13
C+D	20	8	8	4	17	1	2
淋巴结转移							
无	22	5	10	7	1	8	13
有	20	8	8	4	17	1	2
肝转移							
无	35	11	16	8	11	9	15
有	7	2	2	3	7	0	0
组织类型							
腺癌	31	8	14	9	14	5	12
黏液	8	3	3	2	3	3	2
腺癌							
印戒	3	2	1	0	1	1	1
细胞癌							
大体类型							
隆起型	10	4	4	2	3	4	3
溃疡型	28	8	12	8	13	4	11
缩窄型	4	1	2	1	2	1	1

的三大进展.自1993年Thibodeau *et al*在HNPCC中证实有微卫星不稳定(microsatellite instable MSI)存在以来,在HNPCC发生中非常明确,由于错配修复基因的突变引起MSI而发生结直肠癌. hMSH2基因在其中起重要作用. MMR功能缺陷的表现型是高度的微卫星不稳定(high level microsatellite instability, MSI-H),又称之为复制错误(replication error, RER)阳性^[3].复制错误阳性的散发性结直肠癌与复制错误阴性者相比,较少发生淋巴结转移,生物学行为较好^[4].研究发现, hMSH2蛋白的表达变化结果可很好的识别MSI-H肿瘤和预示MMR功能缺陷的存在^[5].

表 3 PTEN蛋白表达与肿瘤分化程度、浸润深度、Dukes分期、淋巴结转移及肝转移相关性分析

对比项目	n	PTEN			r _s 值
		阴性	低表达	高表达	
分化程度					
高中	27	8	5	14	0.727
低未	15	10	4	1	
浆膜侵犯					
有	15	14	1	0	-0.727
无	27	4	8	15	
Dukes分期					
A+B	22	1	8	13	-0.718
C+D	20	17	1	2	
淋巴转移					
无	22	1	8	13	-0.718
有	20	17	1	2	
肝转移					
无	35	11	9	15	-0.535
有	7	7	0	0	

表 4 hMSH2与PTEN蛋白表达相关性分析

		hMSH2			r _s 值	P
		阴性	低表达	高表达		
PTEN	阴性	6	7	5	0.679	<0.05
	L	4	3	2		
	H	3	8	4		

突变率可高达50%^[11]。

本研究结果显示: PTEN蛋白表达阴性率高于正常组织; 此结果与刘振华 *et al*^[12]研究结果相一致。PTEN蛋白表达水平与mRNA水平结果一致, PTEN抑制肿瘤作用主要通过脱去多种促瘤生长因子介导的细胞内信号转导途径中的关键激酶的磷酸根, 降低其磷酸化水平, 阻断信号传导通路, 以抑制细胞生长、转化、黏附、铺展及迁移, 促进凋亡, 对肿瘤生长、侵袭和转移起负性调控作用。当PTEN基因失活, 促瘤生长因子磷酸化, 导致肿瘤形成。PTEN蛋白表达与肿瘤分化程度呈正相关, 与Dukes分期、浸润深度、淋巴结转移均呈负相关与孟冬月 *et al*研究结果一致^[13]。孟冬月探讨结直肠癌中PTEN、E-cad、MMP-2表达情况显示: 淋巴结转移组PTEN、E-cad低表达, PTEN蛋白在高分化、中分化、低分化表达逐步降低, 与本实验结果符合。PTEN表达缺失通过intergrin介导的MAPK信号转导途径, 促进瘤细胞的迁移和扩散。赵勇 *et al*^[14]研究结直肠癌survivin, PTEN表达及其与细胞增殖、凋亡的关联性结果显示PTEN阳性率与分化程度正相关。PTEN表达缺失可以增强肿瘤细胞整合素与配体结合强度, 将信号传递进入细胞核内, 调节细胞内信号通道、控制细胞骨架变形和能量代谢, 从而改变细胞的形态、移行从而使细胞的恶性度增加^[15]。

在Western blot结果显示: 42例结直肠癌与对照组织相比, hMSH2蛋白低表达率为59.52%; PTEN蛋白低表达率为45.24%; 两种蛋白表达水平均明显低于对照组织。hMSH2蛋白低表达说明hMSH2蛋白与结直肠癌发生关系密切, 错配修复缺陷可通过增加癌基因和/或抑癌基因的突变率^[16]导致结直肠癌发生或通过微卫星不稳定使某些决定性基因如TGF-β型受体基因突变^[17], 促使肿瘤形成。同样在结直肠癌组织中PTEN蛋白低表达也说明PTEN蛋白与结直肠癌发生关系密切, PTEN基因失活, 导致PTEN蛋白生成减少, 通过FAK途径^[7]或MAPK途径^[9]进而导致结

■同行评价

错配修复蛋白hMSH2、hMLH1和PTEN表达变化与大肠癌发病的关系, 已写进教科书, 但两者之间相关性的研究较少, 国内曾在胃癌、子宫内膜癌和肺癌中对hMSH2和PTEN表达变化的相关性作过研究, 尚未见大肠癌中hMSH2和PTEN表达变化的相关性研究, 故该文有一定的参考价值。

本研究结果显示: 在42例散发性结直肠癌病例中, 有13例hMSH2失表达, 占28.3%(13/42)此结果与Gafa *et al*^[4]研究结果相一致。hMSH2蛋白失表达率高于正常组织, 与肿瘤分化程度、Dukes分期、浸润深度、淋巴结转移位未见明显相关, 这与史恩溢 *et al*^[6]研究结果一致。说明在结直肠癌发生、发展过程中, 错配修复基因hMSH2是遗传易感基因, 此基因的突变或缺失与散发性结直肠癌密切相关。目前认为, 单独hMSH2基因缺陷不足以引起肿瘤, 错配修复基因缺陷可能主要通过三条途径促进肿瘤的发生与发展: (1)增加癌基因和/或抑癌基因的突变率。(2)使一些重要的功能基因发生遗传不稳定。(3)通过化学物质使细胞损伤导致肿瘤发生。

PTEN/MMAC1/TEP1基因是1997年由3个研究组分别发现和命名的一种抑癌基因。PTEN的抑癌作用可通过以下途径来完成: (1)FA K途径^[7]。(2)三磷酸脂酸肌醇(P13)激酶途径^[8]。(3)丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)途径^[9]。关于PTEN与肿瘤之间的关系已有较多报道。Cowden(CD)综合征是一种常染色体隐性遗传性肿瘤综合征, 对其家系进行的研究发现存在着PTEN基因的生殖细胞突变。这充分说明, PTEN是一个典型的抑癌基因^[10]。其他恶性肿瘤如恶性胶质瘤、前列腺癌、子宫内膜癌及卵巢癌中, 也发现了较高频率的PTEN等位基因杂合性缺失和突变, 其中子宫内膜癌的

直肠癌发生。

本研究结果显示: hMSH2与PTEN在散发性结直肠癌的表达呈正相关。提示二者在细胞增殖调控可能存在正反馈调节机制, PTEN抑癌基因失活容易出现微卫星不稳定, 基因的多点突变和DNA复制错误, 使hMSH2基因表达代偿性上调, 但增多的基因产物仍不足以修复已发生损伤的基因, 使细胞向恶性转化。错配修复蛋白hMSH2与PTEN在散发性结直肠癌中呈失表达及低表达, 在正常结直肠组织呈显著表达。一定比例的散发性结直肠癌中存在PTEN表达与其临床病理特征相关。在散发性结直肠癌发生、发展过程中错配修复蛋白hMSH2表达缺失伴有PTEN蛋白表达下调。二者联合与散发性结直肠癌发生、发展关系密切。联合检测二者的表达可能会有助于结直肠癌预防及诊断。

4 参考文献

- 1 Yu Z, Chen J, Ford BN, Brackley ME, Glickman BW. Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagen* 1999; 33: 3-20
- 2 Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* 2001; 114: 2375-2382
- 3 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257
- 4 Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, Lanza G. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 2000; 89: 2025-2037
- 5 Shia J, Ellis NA, Klimstra DS. The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchows Arch* 2004; 445: 431-441
- 6 史恩溢, 杨雄华, 谭云山, 许建芳, 宿杰阿克苏. 散发性结直肠癌中hMLH1及hMSH2基因与p53、PCNA表达关系的研究. *中国临床医学* 2005; 12: 475-477
- 7 Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res* 1999; 59: 442-449
- 8 Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998; 95: 29-39
- 9 Achiwa Y, Hasegawa K, Udagawa Y. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and the mitogen-activated protein kinase pathways by ursolic acid in human endometrial cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 31-37
- 10 Alvarez-Breckenridge CA, Waite KA, Eng C. PTEN regulates phospholipase D and phospholipase C. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 1157-1163
- 11 An HJ, Lee YH, Cho NH, Shim JY, Kim JY, Lee C, Kim SJ. Alteration of PTEN expression in endometrial carcinoma is associated with down-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor, p27. *Histopathology* 2002; 41: 437-445
- 12 刘振华, 钱群, 樊利芳, 江从庆, 袁玉峰. PTEN、MMP-9在直肠癌组织中的表达意义及临床意义. *武汉大学学报* 2006; 27: 577-579
- 13 孟冬月, 张祥宏. 结直肠癌中PTEN蛋白的表达. *肿瘤防治研究* 2006; 33: 183-184
- 14 赵勇, 高建飞, 章必成, 杜光祖. 直肠癌中survivin, PTEN表达及其与细胞增殖、凋亡的关联性. *第四军医大学学报* 2006; 27: 1325-1327
- 15 Liotta LA, Kohn E. Cancer invasion and metastases. *JAMA* 1990; 263: 1123-1126
- 16 Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 5059-5063
- 17 Rhyu MS. Molecular mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 240-251

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具有科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。(常务副总编辑: 张海宁 2008-07-08)

白介素21的生物学功能与炎症性肠病的研究进展

张峰, 张雪莉, 刘冬, 王玮, 柳巨雄

张峰, 张雪莉, 刘冬, 王玮, 柳巨雄, 吉林大学畜牧兽医学院基础兽医学系 吉林省长春市 130062
国家自然科学基金资助项目, No. 30671535
通讯作者: 柳巨雄, 130062, 吉林省长春市, 吉林大学畜牧兽医学院基础兽医学系, juxiongliu@sina.com.cn
电话: 0431-87836163 传真: 0431-87836163
收稿日期: 2008-03-19 修回日期: 2008-04-16
接受日期: 2008-04-21 在线出版日期: 2008-07-08

Advances in biological function of interleukin-21 and inflammatory bowel disease

Feng Zhang, Xue-Li Zhang, Dong Liu, Wei Wang, Ju-Xiong Liu

Feng Zhang, Xue-Li Zhang, Dong Liu, Wei Wang, Ju-Xiong Liu, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30671535
Correspondence to: Ju-Xiong Liu, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China. juxiongliu@sina.com.cn
Received: 2008-03-19 Revised: 2008-04-16
Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-08

Abstract

Interleukin-21 (IL-21) is a recently discovered cytokine. Once combined with its receptor, IL-21 can regulate B cell proliferation, promote proliferation and differentiation of T cells and NK cells and enhance killing activity of NK cells. Inflammatory bowel disease (IBD) is a kind of autoimmune disease. Its pathogenesis is not clear yet and many factors may participate in it. Immunological derangement plays a significant role in IBD development which involves alteration of several cytokines. IL-21 is just one of them. This article reviewed IL-21 and its relationship with IBD.

Key Words: Interleukin-21; B-cell; T-cell; NK-cell; Inflammatory bowel disease

Zhang F, Zhang XL, Liu D, Wang W, Liu JX. Advances in biological function of interleukin-21 and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2131-2136

摘要

白介素21(interleukin-21, IL-21)是一种新近发现的细胞因子, 与其受体结合后可以调节B细胞的增殖, 促进T细胞、NK细胞的增殖、分化并能提高NK细胞杀伤活性。炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种自身免疫性疾病, 其发病机制尚不明确, 可能有多种因素共同参与, 免疫紊乱在IBD发生发展中起着重要作用, 多种细胞因子的变化与IBD有关。IL-21就是其中的一种。本文就IL-21及其与IBD关系的研究进展作一综述。

关键词: 白介素21; B细胞; T细胞; NK细胞; 炎症性肠病

张峰, 张雪莉, 刘冬, 王玮, 柳巨雄. 白介素21的生物学功能与炎症性肠病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2131-2136
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2131.asp>

0 引言

2000年美国华盛顿大学的Parrish-Novak *et al*^[1]通过构建一个具有预测信号肽和两性分子螺旋的表达序列时发现一段编码I类细胞因子受体的cDNA序列, 将其编码的蛋白质正式命名为白介素21受体(interleukine 21 receptor, IL-21R), 随后从活化的人CD3⁺ T细胞中成功克隆出白介素21(interleukine 21, IL-21)的基因^[1-5]。

1 IL-21结构

人IL-21基因定位于4q26-q27, 与IL-2、IL-15在同一染色体上, 距IL-2基因大约180 kb, 距IL-15则较远^[2]。Asao *et al*^[6]报道人IL-21cDNA(GenBank号: AF254069)共642个核苷酸, 其中自42位至535位核苷酸为编码区。美国国立医学图书馆的注解组(NCBI annotation project)报道的IL-21 cDNA(GenBank号: XM-011082)为617位核苷酸, 去除了最后25个核苷酸。其中第280位核苷酸为C, 而Mehta *et al*^[2]报道的为T, 但两者编码的蛋白质并无区别, 皆为Cys。鼠IL-21(GenBank号: AF254070)定位于3号染色体上, 共有3071个碱

■背景资料

IBD在国外极为常见, 患病率达40-100/10万。国内该病近年有明显增多的趋势。专家预测, 随着人们生活方式的改变, 21世纪IBD的患病率必将进一步增加。

■同行评议者

高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科; 陈贻胜, 教授, 福建省立医院消化内科

■ 研发前沿

IBD的病因和发病机制尚不清楚, IL-21可能在IBD中发挥重要作用, IL-21有望有效控制发作、维持缓解, 提高IBD患者的生存质量。

基对, 其中第54至494为编码区。人IL-21开放阅读框编码162个氨基酸的多肽前体。在31位Gly处被酶切后表达131个氨基酸成熟的IL-21蛋白质。IL-21有4个螺旋和IL-2、IL-4、IL-15高度同源。其中和IL-15有两对相同的Cys位点残基: 一对是IL-21和IL-15独有的, 另一对也表达在IL-2、IL-4、GM-CSF上。鼠IL-21由一段引导肽和122个氨基酸的成熟多肽组成, 与人的IL-21有57%的同源性。鼠和人的IL-21在表达 α 螺旋A和D区域时特别保守。其他 γ c家族细胞因子的这些区域在配受体识别过程中都发挥着重要作用。鼠和人的IL-21成熟多肽上都有一些配-受体相互识别的关键氨基酸: 如IL-21第13位点的Asp酸性氨基酸与IL-4上9号位点的Glu残基相似; 第114位点的Gln与IL-2的第141位点的Gln残基相同。Parrish-Novak *et al*, Mehta *et al*用Northern法在正常组织中并未检测到IL-21的表达, 但在乙酰肉豆蔻佛波酯(PMA)加上伊屋诺霉素活化的外周T细胞中可测得IL-21 mRNA的表达^[1-2]。在一系列对CD4⁺T细胞的刺激实验中, 以16 h的抗-CD3单抗加抗-CD28单抗刺激表达效果最佳, 其次为3.5 h的抗-CD3单抗刺激, PMA加上伊屋诺霉素的刺激表达水平一般, CD8⁺T细胞表达量较少, CD19⁺B细胞和CD14⁺单核细胞基本无表达^[7]。

2 IL-21R结构

已证实人IL-21R是一个由独有的IL-21R亚单位和 γ c(γ -chain)组成的复合体。其中IL-21R亚单位为配体识别结合部位, γ c为信号传导单位^[9]。Alves *et al*^[10]利用GenScan和BLAST通过套式RT-PCR鉴定出了一种新的细胞因子受体(novel interleukin receptor), 后来命名为IL-21R。人IL-21R亚单位(GenBank号: AF254067)位于16p12, 距IL-4R α 基因仅39 kb。而Julla *et al*^[11]报道的人IL-21R亚单位位于16p11。人IL-21R亚单位基因共2887个核苷酸, 有9个外显子, 可编码538个氨基酸。鼠IL-21R(GenBank号: AF254068)共1735个核苷酸, 可编码529个氨基酸。人与鼠IL-21R在DNA水平上一致性为72%。IL-21R亚单位分子属于典型的 γ c家族细胞因子受体。共有538位氨基酸, 前14位为引导序列。胞外区有细胞因子信号识别模块, 有两对保守的Cys残基和一个WSXWS基序, 5个N-糖基化位点和若干个O-糖基化位点。胞内区有典型的Box1, Box2信号传导区。C端有STAT3的结合位点。人IL-21R亚单位与IL-2R β 有27%的同源性^[6], 和IL-4R α 、IL-

9R^[11]有高度同源性。鼠IL-21R亚单位共有529位氨基酸, 与人IL-21R亚单位有62%同源性, 并含有所有的结构和功能基序。IL-21R亚单位主要表达在正常的淋巴组织包括脾、胸腺、淋巴结、外周血淋巴细胞等和纤维化肺组织中。细胞类型主要有外周静息CD23⁺B细胞、CD56⁺NK细胞(NK-92)、Raji(人Burkitt淋巴瘤细胞系)、Jurkat(人T细胞白血病细胞系)、IM-9(人B细胞系细胞系)、HS Sultan(人B细胞系细胞系)、A20(鼠B细胞淋巴瘤细胞系)。不表达于CD3⁺T细胞、CD14⁺单核细胞、EL4(鼠胸腺瘤细胞系)、K562(人T细胞白血病细胞系)^[12]。

3 IL-21的信号转导

IL-21被认为是IL-2细胞因子超家族成员。IL-2家族包括IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21共6个细胞因子, 他们共用受体亚单位 γ 链, 在促进和维持T淋巴细胞群中起主要作用。由这些细胞因子介导的详细的分子信号传递途径尚未完全澄清。然而JAK/STAT, MAPK和PI3这三个主要的途径已经清楚^[13-14]。IL-21R以同源二聚体形式存在, 其胞内区可能有STAT5锚定位点, 且 γ 链是IL-21R复合物的必需亚单位, 参与IL-21R的信号转导, 可激活STAT蛋白(参与蛋白质包括JAK1, JAK2, JAK3, STAT3和STAT5), 引发细胞增殖。当 γ 链与相应的配体如IL-21结合后, 引起JAK3的活化, 并将信号传导给下游效应分子发挥作用^[15]。共同 γ 链和JAK3在胞质区作用, 并通过JAK3的磷酸化作用转导信号至胞内。另外, 猪IL-21诱导的NK细胞的增殖和IFN- γ 的产生均可被JAK-3特异的抑制剂所抑制, 表明猪IL-21刺激JAK3信号途径引发NK细胞增殖和IFN- γ 产生^[15]。

4 IL-21的生物学功能

IL-21R的广泛表达引导学者在多种免疫细胞包括B淋巴细胞、T淋巴细胞和NK细胞中研究, 探讨IL-21的生物学功能。

在人类原始的B细胞, IL-21可增强抗CD40介导的增殖而抑制抗免疫球蛋白M(IgM)和IL-4诱导的增殖^[1]。在检测IL-21对鼠的原始B细胞作用时, 发现抗免疫球蛋白M(IgM)和IL-4诱导的增殖也被抑制, 但是IL-21不能增强或抑制抗CD40介导的增殖^[16-18]。已确定IL-21通过下调抗凋亡因子如Bcl-xL和Bcl-2诱导休眠和活化的B细胞凋亡。IL-21诱导凋亡的能力使其成为 γ c细胞因子家族中独特的一员^[19-21], 更详细的研究显

示IL-21诱导抗CD40活化的B细胞凋亡的同时, 也促使其增殖反应. 这种双重作用可能解释了IL-21为什么不能影响所有抗CD40活化的小鼠B细胞增殖的原因. 所有这些反应都是IL-21的直接作用, 而在IL-21R基因敲除鼠没有显示对IL-21介导的凋亡或抗增殖信号的敏感性^[22].

IL-21是作用于B细胞的一类免疫抑制因子, 可以抑制B细胞淋巴瘤细胞亚群的增殖, IL-21也可能在调节B细胞肿瘤发生方面具有作用^[23-25]. 但是, 在许多急性B细胞白血病没有发现IL-21R, 也可能IL-21在免疫应答时通过旁路发挥抗增殖作用^[7]. 相反, IL-21也显示是骨髓瘤细胞生长和生存的因子. IL-21在鼠的原始B细胞可诱导Stat1和Stat3的磷酸化. Stat3在变异细胞的增殖和存活中起关键作用, 而Stat1则是一种肿瘤抑制因素. Stat1缺失鼠对致癌物所致肿瘤有高度的易感性^[26], 因此, IL-21可能依赖Stat蛋白的不同比例发挥促增殖和抗增殖的作用. 有资料显示: IL-21是B细胞产生IgG1的另一重要调节因子, IL-21反应性的丧失可导致内在性B细胞的缺陷, 进而广泛影响免疫球蛋白的合成. 在IL-21上调IgG1时, 抑制IgE的合成. 在免疫的IL-21R缺失小鼠可见到IgE产物的显著上调, 而在IL-4、IL-21R缺失小鼠这种上调完全消失, 证实IgE的合成完全依赖于IL-4信号^[11]. IL-21对IgG1的诱导和对IgE抑制的这种双重作用的一种可能解释是IL-21抑制了IgG1向IgE连续的转换. IL-21对B细胞呈现变化的、有时相反的作用, 在体内IL-21对B细胞刺激的生理作用可能高度依赖于细胞共同刺激的环境^[1,15].

NK细胞作为先天性免疫系统的一部分在获得性免疫反应形成时, 成为对抗病原体和肿瘤的第一道屏障. NK细胞不需要预刺激或抗原特异性, 可以破坏异常的细胞, 产生细胞因子如干扰素(IFN- γ)、淋巴细胞毒素 β 、肿瘤坏死因子(TNF)和GM-CSF, 既介导细胞毒性作用又为获得性免疫系统的激活做准备. NK细胞的发育和激活本质上依赖于I类细胞因子受体的活性. NK细胞在 γ c, IL-2R β 或Jak3基因缺失的小鼠中不发育, 因为这些都是IL-15和IL-2信号的成分^[27]. 已证实IL-15和IL-2可促进来自BM的NK前体细胞的生长和发育, 认为二者对NK细胞的发育是必需的^[28].

IL-21R在幼稚和激活的NK细胞都有表达, IL-21有调节NK细胞的增殖和功能的作用^[15,29-31]. 在体外, IL-21抑制IL-15或IL-2介导的NK细胞的

增殖, 当将IL-21与鼠休眠的NK细胞单独培养时, 既没有产生NK细胞的生长也没有出现NK细胞的激活. IL-21对细胞生长发育的拮抗作用通过Bcl-2的异位表达可得到恢复. IL-21处理也可致鼠休眠NK细胞大小和颗粒增加, 上调NK细胞表面与活化有关的标记. 这些资料显示IL-21与其相近的IL-15和IL-2不同, 在促进休眠细胞的生存或活化时不是必需的, 仅参与了终末分化或成熟程序的诱导^[32-33]. IL-21对鼠活化的NK细胞有显著的作用, 用IL-21再次刺激已活化的NK细胞可增强NK细胞对YAC-1靶细胞和IFN- γ 产物的细胞毒性. 在IL-21提高活化的NK细胞效应子功能的同时, 他也同时降低了这些细胞在IL-15存在或缺乏时的发育能力^[29].

T淋巴细胞IL-21来源于激活的CD4⁺细胞尤其是Th2效应细胞^[1,29]. 在CD4⁺和CD8⁺ T细胞亚群, 都可检测到IL-21R的表达^[13,29]. 基于IL-21R在T细胞亚群的表达以及大量T细胞来源的细胞因子对T细胞功能的影响, IL-21对T淋巴细胞功能的作用也倍受关注.

关于IL-21在TCR介导增殖方面的作用, 最初认为他是T细胞辅助刺激因子. IL-21可增强各类由抗CD3诱导的T细胞增殖, 包括鼠胸腺细胞和浓缩的外周T细胞, 人类幼稚T细胞^[32,38-39]. IL-21可增强特异病毒效应细胞的生长, 说明他在特异抗原时具有辅助刺激的特性. 另外, IL-21能促进人TCR γ/δ T细胞在应答非肽微生物抗原时的生长^[32]. 但是, 由于缺失IL-21R的淋巴细胞可通过TCR刺激引起增殖, 因此TCR驱动的增殖不需要内源性IL-21^[27,32]. 另外, 与其他 γ c细胞因子如IL-2, IL-7和IL-15不同, IL-21不能克服辅助刺激阻断剂^[33-34].

已知在体内和体外IL-21优先由Th2效应细胞产生, Th细胞来源的细胞因子可直接影响Th细胞的发育这一概念已被广泛接受. 检测IL-21在体外对Th细胞发育的作用, 发现IL-21不能直接促进Th2细胞的分化, 但是在高纯化的幼稚Th前体细胞中, 可使Th1细胞的标志因子IFN- γ 的产生减少. 内源性IL-21在体内对Th1应答的限制作用已被证实. 在IL-21R缺陷鼠, 大量的I型迟发型超敏反应显著增强, 并与IFN- γ 产物的增加有关, 尤其是来自免疫鼠淋巴结的纯化CD4⁺细胞IFN- γ 增加^[34,40-41]. 但是, IL-21R缺陷鼠感染病原微生物产生强烈的Th1应答后, IFN- γ 的血清水平并没有增加^[27]. 这些结果强调了在各种免疫背景下检查IL-21反应的重要性, 因为IL-21在免疫应答

■ 相关报道

Parrish-Novak *et al*, Mehta *et al* 用Northern法在正常组织中并未检测到IL-21的表达, 但在乙酰肉豆蔻佛波酯(PMA)加上伊屋诺霉素活化的外周T细胞中可测得IL-21 mRNA的表达.

同行评价

本文选题先进,文笔流畅,可读性较好,具有较好的学术价值。

中的依赖性可能根据免疫环境的变化而不同。

与在Th细胞观察到的结果不同, IL-21在CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)中成为IFN- γ 产物和效应细胞功能的诱导物^[28,34-37]。在体外, CTLs在IL-21的参与下,同种脾细胞的2次刺激后, IFN- γ 产物增加。同时, IL-21与IL-15协同作用增强了这些细胞的溶解活性^[34,42]。

在体内IL-21能增强CD8⁺ CTLs的应答能力,已在多个分泌IL-21的肿瘤细胞模型中得到证实^[36,44-46]。将分泌IL-21的黑色素瘤细胞株注入小鼠,显著诱导了NK细胞和CD8⁺ T细胞的产生,对肿瘤完全排斥。伴随IL-21的表达,肿瘤特异性T细胞四聚体染色显示肿瘤特异性CD8⁺细胞的生长和产生IFN- γ 细胞数目的增加。注射了表达IL-21细胞的小鼠,其脾细胞显示CTLs的活性增强^[38,43]。这一结果支持以前的观察, IL-21对活化前的NK细胞和CTL功能是较有效的诱导剂。肿瘤特异性CTL的激活和IFN- γ 产物,在产生IL-21的鼠乳腺癌和结肠癌细胞也有类似的增加^[36]。这些结果显示了IL-21在CTLs应答中的重要作用,而且为肿瘤的免疫治疗提供了新的可能。

TCR γ/δ T细胞通过识别非肽复合物,在对许多病原微生物的免疫应答中,发挥着重要的作用。这些细胞的激活不但依赖于抗原的识别,而且高度依赖于细胞因子的环境。IL-21显示可抑制Th1细胞和TCR γ/δ T细胞产生IFN- γ ,而增加CD8⁺ T细胞对IFN- γ 的产生。已知Th1细胞产生的IFN- γ 是一重要的自身免疫调节因子,令人产生兴趣的是IL-21在自身免疫中有怎样的调节作用以及如何发挥作用的。例如, IL-21在自身免疫反应中可抑制依赖CD4⁺细胞产生IFN- γ ,最终抑制自身免疫性疾病。但是在自身免疫应答启动后如自身免疫性糖尿病, IL-21由于诱导了CTLs的活性,促进了组织的破坏,使病情恶化^[47-49]。

5 IL-21与CD

IBD是近年来在我国及欧美诸多国家极为普遍的一种自身免疫性疾病。IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(crohn's disease, CD),以肠道炎症和肠黏膜损伤为主要特征。免疫紊乱在IBD发生发展中起着重要作用^[50-55],多种细胞因子的变化与IBD的有关, IL-21是新近发现的一种细胞因子,是与众多细胞因子紧密相关的一个核心因子。

T细胞介导的免疫反应在IBD组织破坏的发病机制中发挥着中心的作用^[56-57]。T细胞在IBD

中如何介导组织破坏至今尚不清楚,但有证据显示T细胞衍生的细胞因子IL-21刺激人类的成纤维细胞合成分泌间质金属蛋白酶(MMP)-1, MMP-2, MMP-3和MMP-9,这种酶能直接降解黏膜。在IBD中IL-21的表达水平也是增高的,他可能促进消化道组织的破坏^[56]。此外,在从自身免疫和炎症性CD患者孤立的整个黏膜和固有层单核细胞中IL-21蛋白产量的研究显示与健康的对照组相比较在发病部位IL-21高表达,表明IL-21在CD中促进慢性进行性黏膜炎症^[56]。

已证明黏膜免疫细胞与非免疫细胞相互作用的活跃共同促进组织破坏,而细胞因子是必须调节者。IL-21是其中的一员,在CD组织中是过度表达的,支持帮助Th1细胞反应进行性炎症。这表明,在消化道IL-21能调节除增强Th1细胞免疫反应外的其他的炎症路径^[57-60]。用IL-21刺激肠内上皮细胞引起了ERK1/2和p38磷酸化的增强,增加了MIP-3 α (T细胞的化学诱导物)的合成^[61-62]。

总之, IL-21刺激成纤维细胞分泌细胞外基质降解酶,刺激上皮细胞分泌T细胞化学诱导物MIP-3 α ,且是一种致炎因子。这些共同表明IL-21在UC和CD的慢性炎症中起调节作用,并提示我们IL-21可能成为IBD的治疗方法。

6 结论

IBD在国外极为常见,患病率达40-100/10万。国内该病近年有明显增多的趋势^[55]。专家预测,随着人们生活方式的改变,21世纪IBD的患病率必将进一步增加。IBD的病因和发病机制尚不清楚, IL-21可能在IBD中发挥重要作用, IL-21有望有效控制发作、维持缓解,提高IBD患者的生存质量。IBD的临床表现多样,发病过程复杂,可能牵涉许多因素, IL-21与IBD之间的相互作用尚有待进一步研究。

7 参考文献

- 1 Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Rayond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD, Foster D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; 408: 57-63
- 2 Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunol Rev* 2004; 202: 84-95
- 3 孙稳平, 李云岗, 王会波. 白细胞介素21及其研究进展.

- 动物医学进展 2007; 28: 74-77
- 4 纪玉强, 杨筱君. 白细胞介素21研究进展. 上海免疫学杂志 2003; 23: 422-432
 - 5 徐蔚晶. 人白细胞介素家族的新成员-IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23. 国外医学·分子生物学分册 2001; 23: 193-196
 - 6 Asao H, Okuyama C, Kumaki S, Ishii N, Tsuchiya S, Foster D, Sugamura K. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 2001; 167: 1-5
 - 7 Bird S, Zou J, Kono T, Sakai M, Dijkstra JM, Secombes C. Characterisation and expression analysis of interleukin 2 (IL-2) and IL-21 homologues in the Japanese pufferfish, Fugu rubripes, following their discovery by synteny. *Immunogenetics* 2005; 56: 909-923
 - 8 Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young PR, Leonard WJ. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11439-11444
 - 9 Asano K, Ikegami H, Fujisawa T, Kawabata Y, Noso S, Hiromine Y, Ogihara T. The gene for human IL-21 and genetic susceptibility to type 1 diabetes in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1079: 47-50
 - 10 Alves NL, Arosa FA, van Lier RA. Common gamma chain cytokines: dissidence in the details. *Immunol Lett* 2007; 108: 113-120
 - 11 Brandt K, Singh PB, Bulfone-Paus S, Rückert R. Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 223-232
 - 12 Muneta Y, Kikuma R, Uenishi H, Hoshino T, Yoshihara K, Tanaka M, Hamashima N, Mori Y. Molecular cloning, chromosomal location, and biological activity of porcine interleukin-21. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 269-275
 - 13 Sivori S, Cantoni C, Parolini S, Marcenaro E, Conte R, Moretta L, Moretta A. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3439-3447
 - 14 Mehta DS, Wurster AL, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ. IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. *J Immunol* 2003; 170: 4111-4118
 - 15 Jin H, Malek TR. Redundant and unique regulation of activated mouse B lymphocytes by IL-4 and IL-21. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1416-1423
 - 16 Burgess SJ, Marusina AI, Pathmanathan I, Borrego F, Coligan JE. IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *J Immunol* 2006; 176: 1490-1497
 - 17 Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandrini L, Biancone L, Naccari GC, MacDonald TT, Pallone F. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 687-694
 - 18 许晓群. 白细胞介素21免疫学效应研究进展. 国际免疫学杂志 2006; 29: 34-37
 - 19 Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, Mackay CR. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* 2004; 173: 68-78
 - 20 Logan TF, Robertson MJ. Interleukins 18 and 21: biology, mechanisms of action, toxicity, and clinical activity. *Curr Oncol Rep* 2006; 8: 114-119
 - 21 Pelletier M, Girard D. Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 1715-1735
 - 22 Habib T, Nelson A, Kaushansky K. IL-21: a novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T, and natural killer cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 1033-1045
 - 23 Nutt SL, Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ. Interleukin 21: a key player in lymphocyte maturation. *Crit Rev Immunol* 2004; 24: 239-250
 - 24 Asao H. [Analysis of gammac-dependent cytokines-mediated immunoregulation] *Rinsho Byori* 2007; 55: 51-58
 - 25 Brenne AT, Ro TB, Waage A, Sundan A, Borset M, Hjorth-Hansen H. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. *Blood* 2002; 99: 3756-3762
 - 26 Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, Morse HC 3rd, Liu C, Schwartzberg PL, Leonard WJ. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 2002; 298: 1630-1634
 - 27 Grunebaum E, Sharfe N, Roifman CM. Human T cell immunodeficiency: when signal transduction goes wrong. *Immunol Res* 2006; 35: 117-126
 - 28 Muench MO, Humeau L, Paek B, Ohkubo T, Lanier LL, Albanese CT, Bárcena A. Differential effects of interleukin-3, interleukin-7, interleukin 15, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the generation of natural killer and B cells from primitive human fetal liver progenitors. *Exp Hematol* 2000; 28: 961-973
 - 29 Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, Johnson KA, Witek JS, Senices M, Konz RE, Wurster AL, Donaldson DD, Collins M, Young DA, Grusby MJ. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 2002; 16: 559-569
 - 30 Wendt K, Wilk E, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology* 2007; 122: 486-495
 - 31 Fina D, Sarra M, Caruso R, Del Vecchio Blanco G, Pallone F, MacDonald TT, Monteleone G. Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut* 2008; 57: 887-892
 - 32 Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* 2004; 172: 2048-2058
 - 33 Niess JH, Leithäuser F, Adler G, Reimann J. Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions. *J Immunol* 2008; 180: 559-568
 - 34 Strengell M, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 416-422
 - 35 Deenick EK, Tangye SG. Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 503-505
 - 36 Liu S, Lizée G, Lou Y, Liu C, Overwijk WW, Wang

- G, Hwu P. IL-21 synergizes with IL-7 to augment expansion and anti-tumor function of cytotoxic T cells. *Int Immunol* 2007; 19: 1213-1221
- 37 Caprioli F, Sarra M, Caruso R, Stolfi C, Fina D, Sica G, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes. *J Immunol* 2008; 180: 1800-1807
- 38 Di Carlo E, Comes A, Orenge AM, Rosso O, Meazza R, Musiani P, Colombo MP, Ferrini S. IL-21 induces tumor rejection by specific CTL and IFN-gamma-dependent CXC chemokines in syngeneic mice. *J Immunol* 2004; 172: 1540-1547
- 39 施华秀, 任建林, 董卫国. 炎症性肠病与免疫学关系研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 399-405
- 40 Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 688-698
- 41 孙可敬, 李永哲. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞与炎症性肠病研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 547-549
- 42 Sivakumar PV, Foster DC, Clegg CH. Interleukin-21 is a T-helper cytokine that regulates humoral immunity and cell-mediated anti-tumour responses. *Immunology* 2004; 112: 177-182
- 43 Ma HL, Whitters MJ, Konz RF, Senices M, Young DA, Grusby MJ, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN-gamma. *J Immunol* 2003; 171: 608-615
- 44 何相宜, 陈维雄. 调节性T细胞在炎症性肠病中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3015-3019
- 45 van Driel IR, Ang DK. Role of regulatory T cells in gastrointestinal inflammatory disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 171-177
- 46 Ugai S, Shimozato O, Kawamura K, Wang YQ, Yamaguchi T, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 187-192
- 47 Marleau AM, Sarvetnick N. T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 575-584
- 48 Piao WH, Jee YH, Liu RL, Coons SW, Kala M, Collins M, Young DA, Campagnolo DI, Vollmer TL, Bai XF, La Cava A, Shi FD. IL-21 modulates CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell homeostasis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol* 2008; 67: 37-46
- 49 Ikegami H, Fujisawa T, Makino S, Ogihara T. Congenic mapping and candidate sequencing of susceptibility genes for Type 1 diabetes in the NOD mouse. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1005: 196-204
- 50 Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D, Khan N, Veldman G, Jacobs KA, Valge-Archer VE, Collins M, Carreno BM. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 2003; 170: 711-718
- 51 Eberl M, Engel R, Beck E, Jomaa H. Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell Immunol* 2002; 218: 1-6
- 52 Yoon JS, Newton SM, Wysłocka M, Troxel AB, Hess SD, Richardson SK, Lin JH, Benoit BM, Kasprzycka M, Wasik MA, Rook AH. IL-21 enhances antitumor responses without stimulating proliferation of malignant T cells of patients with Sézary syndrome. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 473-480
- 53 张静, 韩英, 王继恒. 炎症性肠病与肠道细菌研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1406-1410
- 54 白爱平. 炎症性肠病发病机制的微生物因素. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 645-649
- 55 李娟, 高翔, 胡品津. IL-23及其受体IL-23R与克罗恩病的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 392-398
- 56 Fina D, Caruso R, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-21 (IL-21) controls inflammatory pathways in the gut. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007; 7: 288-291
- 57 Sartor RB, Muehlbauer M. Microbial host interactions in IBD: implications for pathogenesis and therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 497-507
- 58 Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 390-400
- 59 Fantini MC, Monteleone G, Macdonald TT. New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1419-1423
- 60 吕小平, 詹灵凌, 姜海行, 唐国都. 炎症性肠病肠上皮细胞基质金属蛋白酶对NAP-2的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2510-2515
- 61 Pelletier M, Bouchard A, Girard D. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* 2004; 173: 7521-7530
- 62 Caruso R, Fina D, Peluso I, Stolfi C, Fantini MC, Gioia V, Caprioli F, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G. A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3alpha, by gut epithelial cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 166-175

编辑 李军亮 电编 何基才

TGF- β /CTGF在肠纤维化机制中的作用

安彩萍, 马晓芑, 吴焕淦, 刘慧荣, 施征

安彩萍, 马晓芑, 吴焕淦, 刘慧荣, 施征, 上海市针灸经络研究所 上海市 200030

国家自然科学基金资助项目, No. 30400609

上海市重点学科(针灸推拿学)资助项目, No. T0302

上海市青年科技启明星资助项目, No. 06QA14049

作者贡献分布: 本文由安彩萍负责撰写; 马晓芑确定本文的研究方向及文章的修改; 吴焕淦审校; 刘慧荣与施征对本文进行了修改和补充。

通讯作者: 马晓芑, 200030, 上海市, 上海市针灸经络研究所。

pengpengma@163.com

电话: 021-64382181

收稿日期: 2008-04-03 修回日期: 2008-04-19

接受日期: 2008-04-21 在线出版日期: 2008-07-08

Roles of TGF- β /CTGF in intestinal fibrosis

Cai-Ping An, Xiao-Peng Ma, Huan-Gan Wu, Hui-Rong Liu, Zheng Shi

Cai-Ping An, Xiao-Peng Ma, Huan-Gan Wu, Hui-Rong Liu, Zheng Shi, Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30400609; the Key Subject Fund of Shanghai, No. T0302; and the Shanghai Science and Technology Development Funds, No. 06QA14049

Correspondence to: Xiao-Peng Ma, Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China. pengpengma@163.com

Received: 2008-04-03 Revised: 2008-04-19

Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-08

Abstract

Intestinal fibrosis is a serious complication of many inflammatory bowel diseases and is mainly caused by excessive proliferation of intestinal mesenchymal cells and abnormal deposition of extracellular matrix (ECM). Transforming growth factor beta (TGF- β) plays a key role in the development of intestinal fibrosis. Connective tissue growth factor(CTGF) is the specific downstream mediator in many of the important fibroproliferative effects of TGF- β . TGF- β -induced CTGF expression is mediated through several signaling pathways. This paper reviewed the current knowledge about the formation mechanism of intestinal fibrosis and discussed roles of TGF- β /CTGF in this progression.

Key Words: Intestinal fibrosis; Transforming growth

factor- β ; Connective tissue growth factor; Signal transduction

An CP, Ma XP, Wu HG, Liu HR, Shi Z. Roles of TGF- β /CTGF in intestinal fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2137-2143

摘要

肠纤维化是多种炎症肠病比较棘手的并发症, 主要因肠间质细胞的过度增殖及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的异常沉积所致, 转化生长因子(transforming growth factor-beta, TGF- β)在此过程中起了关键作用. 结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)作为TGF- β 致纤维化作用的特异性下游介质, TGF- β 的促肠纤维化作用可通过多种信号途径诱导CTGF的表达来完成, 本文根据国内外研究资料, 就肠纤维化的形成机制及TGF- β /CTGF在此进程中的作用和调控机制作一简要综述.

关键词: 肠纤维化; 转化生长因子- β ; 结缔组织生长因子; 信号转导

安彩萍, 马晓芑, 吴焕淦, 刘慧荣, 施征. TGF- β /CTGF在肠纤维化机制中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2137-2143
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2137.asp>

0 引言

肠纤维化是克罗恩病(crohn's disease, CD)、放射性肠炎等多种慢性肠病较严重的并发症, 主要因慢性炎症与肠间质细胞、细胞因子及炎症细胞间复杂的相互作用, 使肠间质细胞过度增殖及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常沉积所致. 在肠纤维化的形成过程中有多种细胞因子参与, 如TGF- β 、CTGF、IGF-1、IL、TNF- α 、Ang II、bFGF、PDGF和VEGF等. 这些细胞因子通过旁分泌介导细胞-细胞间的作用, 或通过自分泌的形式作用于自身, 形成复杂的细胞因子网络, 对成纤维细胞(fibroblasts, FB)等间质细胞的过度增殖和ECM的异常沉积都有显著影响, 在肠纤维化的发生、发展过程中起着

■背景资料

肠纤维化及狭窄是多种慢性肠病比较棘手的并发症, TGF- β /CTGF在此形成过程中起重要作用, 本文探讨TGF- β /CTGF及其通路在肠纤维化形成机制中的作用.

■同行评议者

陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第211医院中医科

■ 研发前沿

肠纤维化及狭窄的发病率呈上升趋势, 而TGF- β /CTGF是参与肠纤维化形成的重要细胞因子, 肠壁组织中TGF- β /CTGF表达的失调是导致肠间质细胞过度增殖、ECM沉积的重要原因, 合理调节TGF- β /CTGF分子表达水平有望成为干预肠纤维化的有效途径。

非常重要的作用。其中TGF- β 是参与肠纤维化形成过程中的一种关键性细胞因子, 近年新发现TGF- β 的下游效应分子CTGF能够介导TGF- β 的许多生物学效应, 包括促纤维化效应, 并且其作用可通过多种信号途径诱导CTGF的表达来完成, 本文根据国内外研究资料, 就TGF- β 、CTGF及TGF- β -CTGF信号通路在肠纤维化形成中的作用和调控机制作一综述。

1 肠纤维化机制

肠纤维化被认为是对于慢性炎症和损伤活动过度的, 不可逆的伤口愈合反应^[1]。伤口愈合反应对于受损肠道黏膜的组织修复及结构重塑来说是必不可少的, 但大量慢性炎性细胞的反复浸润会导致ECM聚集, 细胞增殖而形成肠纤维化。纤维化是CD、放射性肠炎等多种肠病较严重的并发症, 其中约1/3的CD患者并发肠狭窄^[2], 其病理表现为肠道肌层过度生长, 胶原组织过度沉积, 间质细胞异常增殖^[1], 从而使肠壁变厚、肠腔变窄、弹性降低, 形成纤维化及狭窄, 进一步发展可导致肠梗阻^[3]。针对肠纤维化及狭窄, 目前国际较为公认的为外科手术干预, 但因其易复发, 频繁的肠切除术易造成短肠综合征(short bowel syndrome, SBS)^[4]。因而, 研究肠纤维化的发生机制及探索有效而副作用少的防治措施成为该领域关注的焦点。

1.1 间质细胞与肠纤维化 长期以来, 间质细胞被认为是“纤维原性细胞”, 广泛的分布于整个肠壁, 自上皮下、固有层、黏膜层、黏膜下层直到肌层^[5], 其在肠纤维化发生机制中的作用是近年的研究重点。主要有FB V⁺/A⁺/D⁺ (V: vimentin, 波形蛋白; A: actin, 肌动蛋白; D: desmin, 结蛋白)、上皮肌纤维细胞(subepithelial myofibroblasts, SEMF)V⁺/A⁺D⁺、平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)V⁺/A⁺/D⁺)构成。在正常肠道内, FB和SEMF见于黏膜下层, 浆膜层和肌间结缔组织, 是胶原mRNA和蛋白表达的主要场所, SMC则位于黏膜层及肌层^[6]。此外, 还有肠星形细胞(interstitial cells of cajal, ICCs)、肥大细胞(mast cell)、肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IEC)等在肠纤维化形成中也起作用。肠间质细胞在肠壁上分泌产生大量胶原^[7], 是合成和分泌ECM的主要来源, 研究表明纤维化肠段间质细胞倍增时间增快, 并且产生和收缩胶原的能力增强^[8]。其中FB是疏松结缔组织的主要细胞成分, 且在CD等肠纤维化患者狭窄肠段中的含量最多, 因

此, FB被认为是肠壁各层纤维化和狭窄形成的主要细胞类型^[9]。在炎症初期, 大量间质细胞被激活时, 其表型和功能发生很大的改变, 转化为表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFB), MFB是活化的FB, 兼有SMC和FB的特性, 既具有收缩功能, 又能产生、分泌ECM, 并且其合成ECM的能力显著增强^[10], 因而, 肠间质细胞表型和数量的变化与肠纤维化及狭窄的形成密切相关。

1.2 ECM与肠纤维化 ECM的积聚过度和降解不足可促进肠纤维化形成, 且ECM异常收缩可导致瘢痕形成、组织畸形, 进一步导致肠梗阻发生。胶原蛋白是ECM中含量最丰富的结构蛋白, 与纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)等构成ECM主要成分。目前认为, 肠壁组织中胶原成分主要由I、III型胶原及少量IV、V、VI型胶原组成^[11], 其中, 正常肠壁组织含有丰富的I型胶原, 约占胶原总成分的70%, III型胶原和V型胶原分别约占20%和12%^[12]。I型、III型胶原常相伴分布, 有利于保持肠壁组织的弹性及灵活性。在正常的发育过程中, 胶原有助于组织和器官的形成, 而在病理情况下参与创伤修复及器官纤维化。因而, 在组织生理和病理状态, I、III型胶原的绝对和相对比例变化极大, III型:I型胶原比率增加率与炎症浸润程度相一致^[11]。纤维化肠组织中, 过度表达的纤维原性胶原可能沉积在固有层、黏膜层、黏膜下层、肌层及浆膜层^[6,13], 并发现自CD狭窄肠段分离、培养的FB合成III型胶原的能力显著增加^[14], 1995年, Graham证实肠纤维化狭窄肠段中含有丰富的III型胶原^[15]。进一步研究显示, 胶原主要由FB等间质细胞合成, 间质细胞可通过改变胶原的新陈代谢而诱导黏膜层、黏膜下层I、III、IV、V型胶原在肠壁组织异常沉积而形成肠纤维化^[7]。肠纤维化患者的黏膜层, 黏膜基层或固有层I、III、IV和V型胶原蛋白和mRNAs表达均升高^[3,16]。可见, I、III、IV、V型胶原与肠纤维化病理改变直接相关, 促进I、III、IV和V型胶原的降解或抑制、阻断其过度沉积, 可有效防治肠纤维化发生、发展。

2 TGF- β 与肠纤维化

TGF- β 是一种多效细胞因子, 有很强的抗炎作用也促进纤维化形成。在肠纤维化的发生中具有双重作用, 正常表达时能抑制炎症反应和细胞增殖、调节细胞的生长、分化和免疫功能而起正面作用^[17]; 而过度表达则起推进肠纤维化进程的负作用^[12]。TGF- β 被认为是启动间质细

胞增殖和ECM产生并抑制其降解的关键因子。TGF- β 及其受体在CD患者肠壁组织及狭窄肠段处分离、培养的间质细胞中均过度表达, TGF- β 刺激狭窄处FB等间质细胞过度增殖, 增强间质细胞收缩能力并增强其合成及识别胶原的能力, 诱导其表型变异, 刺激其生长活性而转化为MFB^[8,18]。体内外试验均证实纤维化肠壁组织中TGF- β 表达较正常肠壁组织显著增高, 其持续过度表达导致肠道中ECM的积聚、重塑。肠壁黏膜中的TGF- β 不仅可以直接刺激黏膜层、黏膜下层、固有层间质细胞对FN、I、III、IV、V、VI等多型胶原的mRNA表达增高^[7-8,19], 而且刺激肠间质细胞过度表达黏附分子及VEGF、CTGF等促纤维化因子^[20-21]; 还可通过抑制胶原酶和蛋白酶如MMPs的产生, 以及促进组织抑制因子如TIMPs的生成使ECM降解减少, 从而导致大量的ECM沉积于肠壁, 最终形成纤维化, 甚至狭窄^[11,22-23]。同时, TGF- β 与IGF-1等细胞因子具有协同效应, 能够共同趋使肠道MFB移至上皮层导致肠纤维化^[11,24]。此外, 有研究显示活化的TGF- β 1腺病毒基因及TGF- β 1基因转移至小鼠结肠组织均可促使TGF- β 1过度表达而形成广泛肠纤维化^[25]。不难看出, TGF- β 与ECM的变化、肠纤维化及狭窄的发生、防治密切相关。

TGF- β 是一个大家族, 多功能、多向调节的细胞因子, 一向有“双刃剑”之称, 抑制他的表达虽可能对抑制肠纤维化有益, 但也有导致免疫性疾病甚至肿瘤的可能。因此, 单纯干扰TGF- β 的正面效应限制了抗TGF- β 抗体的应用, 可能引起许多难以预料的副作用, 故不能成为临床上抗肠纤维化的有效措施。寻找TGF- β 下游的效应分子作为治疗的靶点将更具有实用价值。CTGF正是我们寻找的TGF- β 下游的效应分子, 他受TGF- β 诱导表达, 在生理条件下表达水平很低, 生物学效应较单一, 可能仅介导TGF- β 的促纤维化效应。

3 CTGF与肠纤维化

CTGF为近年来发现的新的致纤维化因子, 是一种富含半胱氨酸的多肽, 属即刻早期基因CCN (CTGF、Cyr61、nov)家族成员之一, 其组织来源丰富, 存在于成年哺乳动物心、脑、肺、肾、肝、胎盘等组织器官内。CTGF能被数种因子转录激活, 其中以TGF- β 最引人注目^[26], 仅作用1 h至少可诱导24 h的CTGF表达^[27], 另外PDGF、EGF、FGF也被证实可以引起CTGF的

表达, 但是其作用微弱和短暂^[28]。CTGF的主要作用是: 促进细胞增殖、合成胶原; 介导细胞黏附和趋化作用; 诱导细胞凋亡; 促进血管和肉芽组织形成等, 此外, 在正常生理过程中, 如胚胎发生、移植与机体组织的创伤修复等的ECM代谢中, 也起了重要作用。

随着对CTGF结构生物学功能研究的加深, 其在组织、器官纤维化中的作用逐渐引起了人们的重视, 临床和实验研究均已证实CTGF的表达与纤维化程度积分呈显著正相关^[29]。作为TGF- β 的特异性下游分子, TGF- β 对CTGF基因转录有明显的调控作用^[30]。研究表明, 如在结缔组织纤维化、病理性瘢痕形成, 肝、肾、肺、心、脊髓等多种组织器官纤维化疾病中, TGF- β 与CTGF大多协同表达增加^[31]。同时, CTGF对TGF- β 的生物效应起介导和加强作用, 介导TGF- β 的促ECM聚集和组织纤维化效应, CTGF的存在可提高低浓度TGF- β 与其受体的结合力, 提升TGF- β 的促纤维化效应; 而在缺少CTGF时, TGF- β 不能单独促进组织纤维化进程^[32]。CTGF与TGF- β 具有许多相似的生物学活性, 但不同的是CTGF不能刺激FB悬浮生长或抑制内皮细胞生长, 显示出CTGF不具备TGF- β 的所有生物学活性, 故认为CTGF作为TGF- β 的特异性下游效应分子, 仅针对TGF- β 在间质细胞增生和ECM的产生中发挥促纤维化作用^[33-34]。

CTGF主要集中在肠黏膜下层FB内、淋巴结周围及接近肠腔表面的一些严重损伤区域内, 由FB、SMC等间质细胞分泌合成^[35]。CTGF对急性肠黏膜损伤有修复作用, 其表达水平与炎症程度密切相关, 同时在患者肠纤维化进程中也被发现, CTGF不仅刺激间质细胞的增殖, 而且可以直接诱导胶原的生成, 介导以FN为代表的ECM的沉积、促进间质细胞与I型胶原黏着, 诱发肠纤维化, 甚至狭窄形成^[8,31]。CTGF在正常组织中, 无或极低表达^[36], 而在CD和放射诱导的纤维化肠壁组织中, 有很高的特异性表达^[31,37]。研究显示, 在纤维化狭窄肠段FB中的CTGF蛋白和mRNA明显过度表达, CD组织样本与正常对照组比较, 89% CD患者CTGF mRNA表达是正常组5倍以上^[35], 且在放射性肠纤维化进程中, 随着FB/MFB增生和胶原沉积, CTGF蛋白和mRNA表达水平也增高^[37]。说明CTGF表达水平与肠纤维化病变有直接相关性; 狭窄肠段以FB为主的间质细胞CTGF的持续高表达成为肠纤维化形成的基础^[31,38]。

■应用要点

通过阻断CTGF可能减轻TGF- β 诱导组织纤维化的效应, 同时保留TGF- β 有利的抗炎症和抗肿瘤细胞增生的效应, 可为防治肠纤维化提供新的思路。

■名词解释

CTGF: 是一种富含半胱氨酸的多肽, 属即刻早期基因CCN (CTGF、Cyr61、nov) 家族成员之一, 为TGF- β 致纤维化作用的特异性下游介质, TGF- β 的促肠纤维化作用可通过多种信号途径诱导CTGF的表达来完成。

因而, 阻断CTGF不会出现阻断TGF- β 后可能产生的不良临床反应. 通过阻断CTGF可能减轻TGF- β 诱导组织纤维化的效应, 同时保留TGF- β 有利的抗炎症和抗肿瘤细胞增生的效应. 故阻断CTGF表达或抑制其活性, 可能是一种更特异、更有效地防治肠纤维化的新靶点、新方法.

4 TGF- β /CTGF致肠纤维化作用信号通路调控机制

TGF- β /CTGF信号通路在组织器官纤维化发病机制中的作用已成为人们研究的热点. TGF- β 可诱导多种细胞分泌合成CTGF, 反过来, CTGF又可作用于这些细胞, 发挥TGF- β 的促纤维化作用. 在肠纤维化进程中, CTGF的作用与Smads、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)及蛋白激酶C(the protein kinase C, PKC)的活化有关. TGF- β 主要通过Smads信号途径、MAPK及PKC信号途径等多条通路诱导CTGF的产生^[7,39].

4.1 Smads信号途径 TGF- β /Smads信号通路在器官发生、肿瘤形成、炎症性疾病、组织修复和纤维化过程中起重要作用^[40-42]. TGF- β 可刺激多种细胞分泌CTGF, 其诱导CTGF表达的机制虽尚未完全明了, 但研究发现, TGF- β 主要在转录水平调节CTGF表达, Smads途径在其中起重要作用^[43-44].

在肠纤维化中, TGF- β 通过CTGF启动子上-175到-168位的一个Smads反应元件(SRE)来诱导CTGF的表达, 该位点突变可消除TGF- β 诱导的CTGF表达或减少基础CTGF表达, 此作用可被Smad7明显抑制. 另外, 在CTGF启动子的-157到-145位有一个TGF- β 反应元件(TGF- β response element, T β RE), 可影响CTGF启动子对TGF- β 刺激的反应活性. T β RE紧邻SRE下游, 两者位置相近, 可能协调TGF- β 诱导的CTGF表达^[40-43].

通过观察Smads途径对CTGF mRNA和蛋白表达的影响, 也证实TGF- β 可通过Smads途径诱导CTGF表达^[45]. 用Smad3基因敲除小鼠与野生型小鼠进行比较, 发现大约40%的Smad3裸鼠肠道明显膨胀, 肠间质细胞显著减少或缺失^[40], 免疫组化结果显示Smad3裸鼠小肠和大肠黏膜中CD3⁺ T细胞, TGF- β 1和Smad7表达比野生型鼠显著增加^[46]. 提示在炎症肠病和肠纤维化中, Smad3裸鼠是研究TGF- β /Smads信号通路是研究活体外肠间质细胞的形成、分化及其与肠道炎症、修复和纤维化形成的一种有用模型, 并

为防治肠纤维化提供了思路.

4.2 PKC和ERK-1/2MAPK信号途径 Smads通路虽是TGF- β 诱导CTGF表达必要的, 但在TGF- β 刺激引起CTGF分泌过程中, 其最大刺激效应尚需要PKC/Ras/MEK/ERK信号通路的协同参与^[47], 并且实验证实, TGF- β 活化的ERK-1/2MAPK通路有促纤维化作用.

MAPKs是细胞内的一类丝氨酸和(或)苏氨酸蛋白激酶, 是细胞应激和损伤反应的主要信号通路, TGF- β 能够活化多条MAPK通路. 在真核细胞中, 目前已确定有4条MAPK通路, 即: (1)细胞外信号调节激酶(extmcellular signal-regulated kinases, ERKs); (2)C-jun氨基端激酶(C-jun N-terminal kinase, JNK)/应激活化的蛋白激酶(stress activated protein kinase, SAPK); (3)P38丝裂原活化的蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinase, P38MAPK); (4)巨丝裂原活化蛋白激酶1(big mitogen - activated protein kinase 1, ERK5/BMK1). ERK-1/2是最早被发现的MAPK系统主要的通路, 其信号转导通路的大致模式为: 多种生长因子 \rightarrow Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK-1/2 \rightarrow 有丝分裂、分化^[48-49]. ERK-1/2被激活后, 可以磷酸化一系列胞质蛋白, 包括磷脂酶A2、c-Raf-1和MEK; 转移至胞核后可以磷酸化一系列转录因子, 如ELK-1、SAP-1和STAT等^[50]. ERK-1/2的活化不仅启动有丝分裂信号, 促进细胞增殖, 而且拮抗TGF- β 促进凋亡、抑制增殖的效应, 抑制CTGF的诱导作用, 是纤维化形成的关键因素, 如参与ECM的合成. 有研究^[51]显示CTGF刺激细胞能明显诱导细胞内ERK-1/2磷酸化, CTGF通过ERK-1/2信号通路促进TGF- β 1诱导的MFB增殖. 此外, ERK-1/2MAPK信号通路是与多种疾病的病理性纤维化有关的一种级联, 如硬皮病皮肤FB中, PKC和ERK-1/2 MAPK是对于TGF- β 细胞信号必需的^[52]. ERK-1/2通路激活通过以PKC依赖或非依赖方式或信号磷酸化来调节核基因转录^[8], 而PKC的同工酶可通过不同的机制调节ERK-1/2的活性.

近年来, 利用MAPK抑制剂进行抗纤维化治疗的研究日益引起人们的兴趣, 成为药物开发的一个新热点, 此通路已被急性炎症引入, 并且其抑制剂在临床试验上取得了预期的效果^[53-54]. 此外, Molsow *et al*^[8]将FB自CD患者狭窄肠段浆膜层和结肠直肠癌患者浆膜层分离、培养, 分别用TGF- β 1、ERK-1/2MAPK刺激, 结果发现PKC

的抑制作用导致了基底部胶原表达减少及肠FB收缩力降低, 并使TGF- β 1对FB、CTGF、FN、I型胶原的表达及FB收缩能力的影响衰退。用ERK-1/2抑制剂使TGF- β 1对CTGF、FN表达有与PKC相似的效应。说明在CD中TGF- β 1的促肠纤维化效应可能是由PKC和ERK-1/2MAPK细胞信号介导的, 这些通路为治疗复发型及肠狭窄CD患者呈现了新颖靶点^[8]。

5 结论

肠纤维化是一种复杂的进展性病理生理过程, 涉及多种细胞因子及细胞内信号分子网络, FB等间质细胞活化、增殖, 各种ECM基因表达上调等。目前, 肠纤维化确切的发病机制虽尚未完全清楚, 但TGF- β 、CTGF与肠纤维化发生发展密切相关, 被认为是诱导纤维化病变的总开关^[39], 协同作用促进肠纤维化形成。TGF- β 被认为是形成结缔组织的主要生长因子和许多进行性纤维化疾病的主要驱动力, 但是由于TGF- β 作用的靶细胞种类繁多、生物学效应复杂, 因此完全阻断其表达或活性的后果是难以预料的。现在人们对纤维化研究的焦点逐渐转移到CTGF这种TGF- β 的特异性直接下游效应介质上及TGF- β -CTGF信号通路上, TGF- β 能活化多条信号通路产生促进增殖, 抑制凋亡的总效应, 除Smads、MAPK及PKC信号通路外, 有研究^[55-56]显示Rho/Rho信号通路与放射所致的肠纤维化发展密切相关, 此外, cAMP/PKA(蛋白激酶A)等多条信号通路均参与了TGF- β 诱导CTGF的表达, 并在其他器官纤维化中得到证实, 这些信号通路与肠纤维化的关系有待进一步探讨, 因此, 深入研究CTGF发挥生物活性的受体及TGF- β -CTGF信号通路调控机制及其各分支途径间的相互联系, 将可能为临床抗肠纤维化策略提供新的思路。

6 参考文献

- Theiss AL, Fruchtman S, Lund PK. Growth factors in inflammatory bowel disease: the actions and interactions of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 871-880
- Regan MC, Flavin BM, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Stricture formation in Crohn's disease: the role of intestinal fibroblasts. *Ann Surg* 2000; 231: 46-50
- Geboes KP, Cabooter L, Geboes K. Contribution of morphology for the comprehension of mechanisms of fibrosis in inflammatory enterocolitis. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 371-376
- Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P. Medical therapy for Crohn's disease strictures. *Inflamm*

- Bowel Dis* 2004; 10: 55-60
- Fiocchi C. Tissue response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12 (Supp 2): S6
- Pucilowska JB, Williams KL, Lund PK. Fibrogenesis. IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G653-G659
- Lund PK, Zuniga CC. Intestinal fibrosis in human and experimental inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 318-323
- Mulsow JJ, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Transforming growth factor-beta promotes pro-fibrotic behavior by serosal fibroblasts via PKC and ERK1/2 mitogen activated protein kinase cell signaling. *Ann Surg* 2005; 242: 880-887, discussion 887-889
- Pucilowska JB, McNaughton KK, Mohapatra NK, Hoyt EC, Zimmermann EM, Sartor RB, Lund PK. IGF-I and procollagen alpha1(I) are coexpressed in a subset of mesenchymal cells in active Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G1307-G1322
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JJ, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999; 277: C183-C201
- Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 16-26
- Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, Docherty NG, Watson RW, O'Connell PR. Fibrogenesis in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 439-448
- Haydont V, Vozenin-Brotans MC. Maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis: cellular and molecular features. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2675-2683
- Stallmach A, Schuppan D, Riese HH, Matthes H, Riecken EO. Increased collagen type III synthesis by fibroblasts isolated from strictures of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992; 102: 1920-1929
- Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1995; 1: 220-227
- Assche GV. Can we influence fibrosis in Crohn's disease? *Acta Gastroenterol Belg* 2001; 64: 193-196
- Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309
- McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C172-C182
- Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 226-236
- Brannigan AE, Watson RW, Beddy D, Hurley H, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Increased adhesion molecule expression in serosal fibroblasts isolated from patients with inflammatory bowel disease is secondary to inflammation. *Ann Surg* 2002; 235: 507-511
- Beddy D, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Increased vascular endothelial growth factor production in fibroblasts isolated from strictures

■同行评价

肠纤维化的发病机制及临床治疗虽已取得较大进展, 但目前国内肠纤维化相关研究甚少, 本文选题新颖, 为临床治疗肠纤维化提供了很好的方向和思路。

- in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* 2004; 91: 72-77
- 22 von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47: 63-73
- 23 McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 2003; 162: 1355-1360
- 24 Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G809-G818
- 25 Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B, Bercik P, Van Kampen C, Galeazzi F, Sime PJ, Gaudie J, Collins SM. TGF-beta1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G116-G128
- 26 Razaque MS, Foster CS, Ahmed AR. Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of conjunctival scarring in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1998-2003
- 27 Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE. Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 2697-2713
- 28 Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 637-645
- 29 Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 681-685
- 30 Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 469-480
- 31 Beddy D, Mulsow J, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Expression and regulation of connective tissue growth factor by transforming growth factor beta and tumour necrosis factor alpha in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* 2006; 93: 1290-1296
- 32 Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 599-604
- 33 Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 171-179
- 34 Leask A, Denton CP, Abraham DJ. Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1-6
- 35 di Mola FF, Di Sebastiano P, Gardini A, Innocenti P, Zimmermann A, Büchler MW, Friess H. Differential expression of connective tissue growth factor in inflammatory bowel disease. *Digestion* 2004; 69: 245-253
- 36 Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm* 2005; 70: 69-103
- 37 Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, François A, Lasser P, Morice P, Haie-Meder C, Lusinchi A, Antoun S, Bourhis J, Mathé D, Girinsky T, Aigueperse J. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 561-572
- 38 Dammeier J, Brauchle M, Falk W, Grotendorst GR, Werner S. Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 909-922
- 39 Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3056-3062
- 40 Vetuschi A, Sferra R, Latella G, D'Angelo A, Catitti V, Zanninelli G, Continenza MA, Gaudio E. Smad3-null mice lack interstitial cells of Cajal in the colonic wall. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 41-48
- 41 马松林, 赵秋, 龚勇. 纤维化胰腺组织中TGF-β1、Smad3、Smad7的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 185-188
- 42 林寿宁, 王振常, 何磊. 壮肝逐瘀煎对肝纤维化大鼠TβR I / II、Smad3、Smad4和Smad7表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1105-1109
- 43 Leask A, Sa S, Holmes A, Shiwen X, Black CM, Abraham DJ. The control of ccn2 (ctgf) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *Mol Pathol* 2001; 54: 180-183
- 44 Ulloa L, Tabibzadeh S. Lefty inhibits receptor-regulated Smad phosphorylation induced by the activated transforming growth factor-beta receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 21397-21404
- 45 Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001; 276: 10594-10601
- 46 Zanninelli G, Vetuschi A, Sferra R, D'Angelo A, Fratticci A, Continenza MA, Chiamonte M, Gaudio E, Caprilli R, Latella G. Smad3 knock-out mice as a useful model to study intestinal fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1211-1218
- 47 Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ, Leask A. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* 2002; 62: 1149-1159
- 48 Xia W, Cheng CY. TGF-beta3 regulates anchoring junction dynamics in the seminiferous epithelium of the rat testis via the Ras/ERK signaling pathway: An in vivo study. *Dev Biol* 2005; 280: 321-343
- 49 Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7686-7689
- 50 Adachi T, Kar S, Wang M, Carr BI. Transient and sustained ERK phosphorylation and nuclear translocation in growth control. *J Cell Physiol* 2002; 192: 151-159
- 51 黄海长, 杨敏, 李惊子, 王海燕. 结缔组织生长因子通过活化Erk-1/2信号通路促成肌纤维细胞生成. *中华医学杂志* 2005; 85: 1322
- 52 Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming

- growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 2003; 278: 13008-13015
- 53 Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2002; 168: 5342-5351
- 54 Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 7-14
- 55 Haydont V, Bourgier C, Pocard M, Lusinchi A, Aigueperse J, Mathé D, Bourhis J, Vozenin-Brotans MC. Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats. *Clin Cancer Res* 2007; 13(18 Pt 1): 5331-5340
- 56 Haydont V, Bourgier C, Vozenin-Brotans MC. Rho/ROCK pathway as a molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity. *Br J Radiol* 2007; 80 Spec No 1: S32-S40

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

北京百世登生物医学科技有限公司 第二期编辑培训纪要

本刊讯 2007-12-29下午2时,北京百世登生物医学科技有限公司第二期编辑培训班在北京召开,此次培训由北京大学博士,农业部规划设计研究院《农业工程学报》编辑部副主编王应宽编审授课,世界胃肠病学杂志社全体员工参加培训。此次培训课程分为两大部分:第一部分以“中国科技学术期刊的开放存取出版研究”为主题,从中国科技期刊的发展现状研究中国科技期刊实现“开放存取”运动的可行性,探讨中国期刊实现开放存取(Open Access, OA)的利弊,展望中国科技期刊实施OA出版模式的前景;第二部分通过对国外BioMed Central的OA背景、标准、特点、会员制度及商业模式的分析,阐述OA出版模式的可持续发展性,建议中国期刊应走自主创新,适应中国国情的科技期刊的OA出版模式。

值得一提的是,王博士在培训课开始将自己的成长经历分享给参加培训的各位编辑。他从学士到博士,从农村到城市,期间经历的一些令人感动的小故事,从侧面激励各位编辑不要安于现状,要不断学习才能在这一领域获得一片天地。

王博士讲到BioMed Central刊物的在线电子提交系统及开放评审系统,读者可针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足,作者也可以随时修改完善自己发表的论文,使文章的发表成为一个编者、审者、读者、作者互动的动态过程。王博士还就自己做为《农业工程学报》的审稿人,工作中的审稿程序与《世界华人消化杂志》的编辑进行沟通交流,他讲到稿件的COVER LETTER里一般都有作者对研究背景,基金项目,参考文献的简要概述。科学编辑可以先筛选出一批不符合要求的稿件,如:一稿多投,研究相关结果已经发表或实验数据简单,毫无创新性的文章。对于不能决定的文章,可以通过定期的定稿会,与专家教授一起探讨文章发表的可行性。最后对一些优秀的创新性文章,再交由同行评议专家评议。科学编辑首先充当“把关人”的角色,帮助作者,科学家完善论文写作及科学价值。其次科学编辑工作责任重大,可以定期或不定期对一些稿件述评,还可以通过吸收同行评议的审稿意见不断在工作中提高自己的学识能力。

世界胃肠病学杂志社副总编辑张海宁也与王博士交流了《世界华人消化杂志》和《世界胃肠病学杂志》(英文版)的审稿过程:由科学编辑通过每周的定稿会对稿件进行反复商酌,最终对优秀的稿件录用。

培训课结束时,各位编辑都纷纷表示在做编辑之余学到很多经营期刊方面的知识,并深入了解到OA的出版模式。王应宽博士最后讲到,此次来讲课一方面是共享OA出版模式,另一方面也是进行交流学习。世界胃肠病学杂志社能有如此好的成就,与马社长的英明领导和及早实行OA的出版模式分不开,同时也少不了各位编辑的协同协作和努力工作,是各个期刊社学习的榜样。(编务 江艳 2008-07-08)

苷类中药肠道细菌生物转化的研究进展

李咏梅, 李晓眠, 朱泽

■背景资料

苷类中药生物利用度低, 摄入后需经肠道细菌代谢成苷元发挥其药理作用. 人群中不同个体肠道菌群对同一苷类中药成分的生物转化作用不同, 及不同菌株的生物转化底物和代谢产物亦不相同, 是苷类中药药效个体差异的原因.

李咏梅, 李晓眠, 朱泽, 天津医科大学微生物学教研室 天津市 300070

国家自然科学基金资助课题, No. 30772483

作者贡献分布: 本文由李咏梅综述, 李晓眠审校, 朱泽进行指导并审校.

通讯作者: 朱泽, 300070, 天津市和平区气象台路22号, 天津医科大学微生物学教研室. zhuze@tjmu.edu.cn

电话: 022-23542649

收稿日期: 2008-04-08 修回日期: 2008-04-30

接受日期: 2008-05-05 在线出版日期: 2008-07-08

Advances in biotransformation of glycosides from Chinese medicinal by human intestinal bacteria

Yong-Mei Li, Xiao-Mian Li, Ze Zhu

Yong-Mei Li, Xiao-Mian Li, Ze Zhu, Research Unit of Medical Microbiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772483

Correspondence to: Dr. Ze Zhu, Research Unit of Medical Microbiology, Tianjin Medical University, 22 Qixiangtai Road, Heping District, Tianjin 300070, China. zhuze@tjmu.edu.cn

Received: 2008-04-08 Revised: 2008-04-30

Accepted: 2008-05-05 Published online: 2008-07-08

Abstract

The bioavailability of glycosides from Chinese medicinal is low. Glycosides are metabolized into aglycons in presence of intestinal bacteria before they are absorbed. As there is individual difference in bioavailability of glycoside, and there are also difference in substrate and metabolite among bacterial strains, drug effect difference is thus observed among individuals. Therefore, screening the specific bacterial genus or strains and using them as additive of glycosides should remove individual difference in bioavailability of glycosides. This article reviewed the recent advances in relationships, features and application in biotransformation of glycosides from Chinese medicinal.

Key Words: Glycoside; Chinese medicinal; Biotransformation; Bioavailability

Li YM, Li XM, Zhu Z. Advances in biotransformation of

glycosides from Chinese medicinal by human intestinal bacteria. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2144-2148

摘要

苷类中药生物利用度低, 摄入后需经肠道细菌代谢成苷元而发挥其药理作用. 由于人群中不同个体的肠道菌群对同一苷类中药成分具有不同的生物转化作用, 不同菌株的生物转化底物及代谢产物亦不相同, 造成不同个体苷类中药的药效差异. 因此, 筛选出具有生物转化苷类中药活性的特异性肠道细菌菌属和菌株, 将之与苷类中药同时摄入, 将有助于消除苷类中药在人群中应用的个体差异. 本文就苷类中药生物转化与肠内吸收的关系、特点及应用的研究进展加以综述.

关键词: 苷类; 中药; 生物转化; 生物利用度

李咏梅, 李晓眠, 朱泽. 苷类中药肠道细菌生物转化的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2144-2148

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2144.asp>

0 引言

苷(glycosides), 又称配糖体, 是由糖或糖的衍生物, 如氨基酸、糖醛酸等与另一非糖物质通过糖的端基碳原子连接而成的化合物, 其中非糖部分称为苷元(aglycone)或配基. 苷的药效由苷元决定的, 苷元与糖结合成苷后, 其理化性质改变, 影响了药代动力学过程、药效强度和持续时间. 药代动力学研究证明, 苷类成分肠道内难以吸收、生物利用度低、肠内滞留时间较长而易受到肠道菌群的作用. 苷经肠道细菌代谢后被水解, 生成苷元而发挥其药理作用^[1-4]. 因此, 将苷类中药转化成苷元, 提高其生物利用度的研究是有效提高其药效的一个重要方法, 此方面研究已经成为国内外研究热点.

目前研究的转化方法主要有化学法, 如日本Hayashibara橙皮研究所^[5]采用糖基化方法制成糖基化橙皮苷. 在强烈的化学反应中苷类物质的结构和构型会发生改变, 导致其产物不稳

■同行评议者

赵平, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

定或药效消失. 酶解法, 如瑞士雀巢研究中心^[6]采用酶修饰方法, 用橙皮苷酶水解橙皮苷获得橙皮素-7-糖苷. 但酶解法转化苜蓿类中药是以苷提取物为作用底物, 使用糖苷水解酶作为催化剂, 工艺过程复杂, 不利于工业化生产. 生物转化法的本质是由微生物产生的一种或几种特殊胞外或胞内酶作为生物催化剂对外源性底物进行的一种或几种化学反应. 生物转化既可增加目标产物产量, 克服化学合成的缺点, 又因其大多数是在室温、中性环境中作用, 减少了产物分解、异构、消旋和重排反应, 因此具有位置选择性和立体选择性, 和无毒、无污染、低成本、高收率、环境友好等特点^[7-8]. 本文将围绕苜蓿类中药生物转化与肠内吸收的关系、特点及应用加以综述.

1 生物转化定义

生物转化也称生物催化(biocatalysis), 是指利用酶或有机体(细胞、细胞器)作为催化剂实现化学转化的过程, 是生物体系(包括细菌、真菌、植物组织、动物组织培养体系或生物体系)的酶制剂对外源性底物进行结构性修饰所发生的化学反应. 微生物因其培养简单、种类繁多、酶系丰富而成为生物转化中最常见的有机体^[9-12].

2 苜蓿类中药肠道细菌生物转化

2.1 概述 苜蓿类中药生物利用与肠道细菌的相互作用已经被很多学者所重视, 做了大量的工作. 大多数中药是通过口服在消化道吸收发挥局部或全身作用, 因此脂溶性扩散是药物在消化道内跨膜转运的主要方式. 但是大多数苷因亲脂性低而不易转运到靶部位, 造成消化道对苷类成分吸收较差、较慢. 而苷由特异肠道菌群分泌的酶水解为苷元后脱去糖基, 极性减小, 脂溶性增加, 使苷元在人体内吸收快于苷的吸收. 苷元能迅速经小肠吸收入血液循环, 较快达到所需血药浓度, 发挥其药效作用^[13]. 如芍药苷具有抗炎、镇痛、免疫调节及抗原发性肝癌等作用^[14-16], 而其口服吸收率极低. 经口服摄入的芍药苷需在肠道细菌分泌的 β -葡萄糖苷酶和酯酶的催化下转化成其相应苷元Paeonimetabolin^[17]才能发挥生理作用. 在Caco-2细胞上的转运研究^[2]亦发现芍药苷的生物利用度比其苷元低40倍.

人体肠道内存在大量微生物^[18], 约占人体微生物总量的80%, 其中厌氧菌为需氧菌的100-1000倍. 肠道正常微生物群类型包括三类:

一是致病性类型, 主要包括韦荣球菌、葡萄球菌、变形杆菌及假单胞菌, 菌量少, 在病理条件下可大量繁殖而致病. 二是互生性类型, 主要包括双歧杆菌、类杆菌、真杆菌和消化球菌, 数量多, 具有维生素合成、生物拮抗、促进蛋白质消化吸收和免疫刺激等生理作用. 三是中间性类型, 主要包括乳杆菌、大肠埃希菌、链球菌和韦荣球菌. 数量介于前两者之间, 既有生理作用, 也有致病作用. 健康人肠道菌群的平衡是相当稳定的. 内因或外因, 如感染、胃肠功能紊乱、外科手术、精神应激、使用抗菌素、衰老等原因均会影响肠道菌群的平衡, 但造成的变动是非特异性的. 如我国糖尿病患者调查发现, 糖尿病患者肠道菌群紊乱, 肠道内互生性类型细菌显著减少^[19]. 由于粪便中含有肠道内所有菌株, 所以苜蓿类中药肠道细菌生物转化的研究工作常以新鲜粪便为标本, 从中筛选具有生物转化苜蓿类中药能力的特异性菌株.

2.2 苜蓿类中药肠道细菌生物转化特点 研究发现同一种苜蓿类中药不同个体间的药效存在差别. 苜蓿类中药体内代谢研究^[20]发现人群中不同个体肠道菌群对同一苜蓿类中药成分具有不同生物转化作用. 大豆异黄酮是目前研究较多的保健中药苜蓿类, 对于与激素有关的癌症(前列腺癌和乳腺癌)^[21-23]、心血管疾病^[24-26]和骨质疏松^[27-28]等疾病均有预防作用. 大豆异黄酮中含量占优势的是大豆苷和染料木苷两种. 肠道细菌对大豆异黄酮在宿主体内的降解和利用起着关键作用^[29]. 大豆苷体内代谢研究发现, 其被肠道细菌代谢为雌马酚和O-脱甲基安哥拉紫檀素(O-demethylangolensin, ODMA)^[30-34], 但人群中大约只有1/3到1/2人摄入大豆苷后体内能生成雌马酚^[35-36]. Hedlund *et al*^[37]调查了白种人男性将大豆苷分解代谢为雌马酚的情况, 结果发现有的人能将大豆苷彻底分解为雌马酚, 而有的人体内未检测到雌马酚产生. 大豆苷体内代谢差异还与人种有关^[38], 对比调查韩裔美国人(Korean American, KA)和美国白人(Caucasian American, CA)体内大豆苷代谢方式. 结果发现大豆苷在KAs体内的代谢产物多是雌马酚, 而在CAs体内多为ODMA. Rafii *et al*^[32]观察了取自4份人粪便标本中的肠道细菌对大豆异黄酮的代谢情况, 其中一份标本中检测到双氢大豆黄酮苷元; 另一份中检测到双氢大豆黄酮苷元和雌马酚; 其他两份标本中检测到ODMA和雌马酚. 说明人群中不同个体肠道菌群对同一中药成分的生物

■ 相关报道

Hein *et al*从刚处死的猪盲肠中分离猪肠道微生物菌群, 采用荧光素原位杂交法(FISH)分析分离的猪肠道菌群特征, 结果证实此猪肠道菌群体外模型适用于人类肠道菌群代谢的研究, 从而为研究苜蓿类中药的肠道细菌生物转化拓宽了研究方法.

■创新盘点

本文根据国内外最新资料,介绍苜蓿类中药肠道细菌生物转化的最新进展,提出将具有生物转化苜蓿类中药活性的特异性肠道细菌菌株与苜蓿类中药同时摄入,将有助于消除苜蓿类中药人群中应用的个体差异。

转化产物存在差异,而正由于此差异导致了不同个体的苜蓿药效差异。

同时,苜蓿类中药体内代谢研究结果亦发现不同肠道细菌的生物转化作用不同。Wang *et al*^[39]从人粪便标本中分离出一株G⁺性、厌氧杆菌Julong 732。此株细菌能将双氢大豆黄酮苜蓿元转化为S-雌马酚,却不能对大豆苜蓿元发挥同样作用。Tamura *et al*^[40]从粪便标本中分离到一株与Coproccillus cateniformis(AB030218)有93%相似性的肠道菌株TM-40。此菌株将大豆苜蓿及其苜蓿元分解为双氢大豆黄酮苜蓿元,但不能将分解产物进一步转化为雌马酚。由此可见,不同菌株的生物转化底物及代谢产物均不相同,说明不同个体药效差异是由于不同个体肠道菌群组成差异。

肠道细菌菌株生物转化作用底物的选择性是由不同细菌产生的水解酶活性决定的。这种选择性除了与苜蓿元结构、与苜蓿结合的糖基种类有关外^[41],还与糖基连接到药物化学结构基本骨架上的位置有关。由于单糖有 α 及 β 两种端基异构体,因此形成的苜蓿分为 α -苜蓿及 β -苜蓿。由D型糖衍生的苜蓿为 β -苜蓿(如 β -D-葡萄糖苜蓿),由L型糖衍生的苜蓿,多为 α -苜蓿(如 α -L-鼠李糖苜蓿)。芒果苜蓿是知母等16种植物性药物的主要成分,具有抗氧化、抗细菌、抗病毒、免疫调节及抗肿瘤等多方面的生理活性和药理作用^[42-45]。Sanugul *et al*^[46]从人粪便标本中分离出一细菌新种MANG,具有将芒果苜蓿生物转化为其苜蓿元的能力。此菌株分泌的酶能够裂解C-糖基,其活性完全不同于其他裂解O-糖基的葡糖苜蓿酶活性。

2.3 苜蓿类中药肠道细菌生物转化应用 Marotti *et al*^[47]以黄豆(*Phaseolus vulgaris* L.)果实和苗中的苜蓿类为作用底物,观察5种人源双歧杆菌菌株的 β -葡萄糖苜蓿酶活性。研究结果发现观察菌株均能够将山柰酚3-O-葡萄糖苜蓿(kaempferol 3-O-glucoside)、大豆苜蓿、染料木苜蓿和黄豆黄苜蓿代谢为相应的苜蓿元。认为在摄入豆类时,此5株双歧杆菌可作为添加剂来提高豆类中苜蓿类的保健作用。

Decroos *et al*^[48]从人粪便标本中分离到一种将大豆苜蓿有效转化为雌马酚的混合细菌培养物(a mixed microbial culture, EPC4),此EPC4由4个菌株组成,即*Enterococcus faecium* EPI1, *Lactobacillus mucosae* EPI2, *Fingoldia magna* EPI3和*Veillonella* sp. 相关菌株EP。将EPC4加入人类肠道微生物系统模拟装置(the human intestinal mi-

crobial ecosystem, SHIME)后,在SHIME中共孵育大豆苜蓿粉末和体内不能产生雌马酚者的粪便标本,结果在SHIME中结肠末端小室检测到了雌马酚。且未观察到加入EPC4对肠道菌群组成和活性产生明显影响,认为在饮食中摄入EPC4是一种使体内不能产生雌马酚者产生雌马酚的新方法。

研究发现*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*等菌株均可生物转化豆奶中的各种大豆异黄酮成分^[49-51]。Tsangalis *et al*^[52]在绝经后妇女中进行了摄入双歧杆菌发酵豆奶的初步实验,以尿中雌马酚排出量为观察指标,发现双歧杆菌的摄入可影响尿中雌马酚的排出量,摄入双歧杆菌组体内雌马酚排出量比不摄入组略高。

2.4 目前研究中存在的问题 人肠道细菌转化活性研究目前还存在着许多问题。如何更好地模拟肠内环境,建立良好的试验模型是十分必要,也是亟待解决的问题。常用体外模型包括肠液中药成分生物转化模型、粪便培养基模型以及厌氧性连续培养系统^[53-55]。前者是取肠道内容物用厌氧培养基预培养,再与药物成分共孵育一段时间后,取样分析;后者是利用新鲜粪便含有的细菌来代表肠内细菌组成。体外模型存在温育时间长的限制。在温育过程中,因无肠道内生物和非生物条件的束缚,细菌在缓冲液以及培养基中放置时间稍长,感受态细菌丧失,其他细菌增加,其结果必然导致菌群组成、转化活性发生变化,从而不能反映体内真实情况。而悉生动物模型被称为在隔离器内饲养的整体人肠道菌群模型,代表性好,但技术要求高,在一般实验室中难以实现。另外,当分离肠道细菌时,由于肠道细菌数目众多,其中约60%-80%的细菌目前尚无法培养,存在难以得到所需要的功能菌株的缺陷。同时人体肠道微生态系统存在定位、定性及定量的动态平衡,具有特异性功能的肠道细菌摄入体内后由于增殖数量受到限制而很难发挥作用。

3 结论

由于肠道菌群组成的个体差异导致了苜蓿类中药个体应用的差异,从而影响了苜蓿类中药的药效发挥。因此为了提高苜蓿类中药的生物利用度,可从肠道生理状态的肠道菌群的生物活性入手,鉴别出具有生物转化苜蓿类中药活性的特异性肠道细菌菌株和菌株,将之与苜蓿类中药同时摄入,

将有助于将苜转化为苜元, 消除苜类中药人群中应用的个体差异, 提高苜类中药的生物利用度, 进而提高苜类中药的药效。

4 参考文献

- Kanaze FI, Bounartzi MI, Georarakis M, Niopas I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61: 472-477
- Liu ZQ, Jiang ZH, Liu L, Hu M. Mechanisms responsible for poor oral bioavailability of paeoniflorin: Role of intestinal disposition and interactions with sinomenine. *Pharm Res* 2006; 23: 2768-2780
- 徐萌萌, 王建芳, 徐春, 白家峰, 何晨, 薛慧玲, 孙启玲. 微生物转化苜类中药的机理及应用. *世界科学技术-中医药现代化* 2006; 8: 24-27
- Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003; 42: 29-42
- Yamada M, Tanabe F, Arai N, Mitsuzumi H, Miwa Y, Kubota M, Chaen H, Kibata M. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 1386-1394
- Nielsen IL, Chee WS, Poulsen L, Offord-Cavin E, Rasmussen SE, Frederiksen H, Enslin M, Barron D, Horcajada MN, Williamson G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J Nutr* 2006; 136: 404-408
- 于荣敏. 天然药物活性成分的生物合成与生物转化. *中草药* 2006; 37: 1281-1289
- Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 2001; 409: 241-246
- Giri A, Dhingra V, Giri CC, Singh A, Ward OP, Narasu ML. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol Adv* 2001; 19: 175-199
- Demain AL, Adrio JL. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol Biotechnol* 2008; 38: 41-55
- Rao SR, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2002; 20: 101-153
- 杨红亚, 吴少华, 王兴红, 彭谦. 开展中药生物转化研究意义深远. *中草药* 2004; 35: 1321-1324
- Silberberg M, Morand C, Mathevon T, Besson C, Manach C, Scalbert A, Remesy C. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur J Nutr* 2006; 45: 88-96
- 刘皈阳, 闫旭, 李外, 刘萍. 白芍不同炮制品中芍药苷含量及镇痛作用. *解放军药学报* 2005; 21: 167-170
- 刘陶世, 赵新慧, 段金彪, 狄留庆, 黄耀洲. 芍药甘草汤总苷抗炎镇痛作用的配伍研究. *中药新药与临床药理* 2007; 18: 427-430
- 晏雪生, 李瀚曼. 彭亚琴, 明安萍. 芍药苷对人肝癌细胞HepG-2凋亡及其调控基因的影响. *中华中医药学刊* 2007; 25: 1346-1347
- He JX, Goto E, Akao T, Tani T. Interaction between Shaoyao-Gancao-Tang and a laxative with respect to alteration of paeoniflorin metabolism by intestinal bacteria in rats. *Phytomedicine* 2007; 14: 452-459
- 姚孟晖, 贾文祥. 医学微生物学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 107-108
- 孙艳, 刘波, 赵静玫, 王海岩, 徐和利, 李雪妮. 大连地区糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 863-865
- Possemiers S, Bolca S, Eeckhaut E, Depypere H, Verstraete W. Metabolism of isoflavones, lignans and prenylflavonoids by intestinal bacteria: producer phenotyping and relation with intestinal community. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 61: 372-383
- Branca F, Lorenzetti S. Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutr* 2005: 100-111
- Kang NJ, Lee KW, Rogozin EA, Cho YY, Heo YS, Bode AM, Lee HJ, Dong Z. Equol, a metabolite of the soybean isoflavone daidzein, inhibits neoplastic cell transformation by targeting the MEK/ERK/p90RSK/activator protein-1 pathway. *J Biol Chem* 2007; 282: 32856-32866
- Magee PJ, Raschke M, Steiner C, Duffin JG, Pool-Zobel BL, Jokela T, Wahala K, Rowland IR. Equol: a comparison of the effects of the racemic compound with that of the purified S-enantiomer on the growth, invasion, and DNA integrity of breast and prostate cells in vitro. *Nutr Cancer* 2006; 54: 232-242
- Kurzer MS. Phytoestrogen supplement use by women. *J Nutr* 2003; 133: 1983S-1986S
- Jackman KA, Woodman OL, Sobey CG. Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2824-2830
- Jackman KA, Woodman OL, Chrissobolis S, Sobey CG. Vasorelaxant and antioxidant activity of the isoflavone metabolite equol in carotid and cerebral arteries. *Brain Res* 2007; 1141: 99-107
- Setchell KD, Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 593S-609S
- Frankenfeld CL, McTiernan A, Thomas WK, LaCroix K, McVarish L, Holt VL, Schwartz SM, Lampe JW. Postmenopausal bone mineral density in relation to soy isoflavone-metabolizing phenotypes. *Maturitas* 2006; 53: 315-324
- 张逊, 姚文, 朱伟云. 肠道大豆异黄酮降解菌研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 973-978
- Cassidy A, Brown JE, Hawdon A, Faughnan MS, King LJ, Millward J, Zimmer-Nechemias L, Wolfe B, Setchell KD. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr* 2006; 136: 45-51
- Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 2000; 468: 166-170
- Rafii F, Davis C, Park M, Heinze TM, Beger RD. Variations in metabolism of the soy isoflavonoid

■名词解释

人类肠道微生物系统模拟装置 (SHIME): 是一种模拟人体肠道微生物生态系统、类似于人体肠道微生物生态系统孵化过程的5步反应器。前2步模拟小肠的微生物生态环境, 后3步模拟大肠的微生物生态环境, 可用于分析肠道微生物多样性及活性, 获得的数据具有良好的体内外相关性。

同行评价

本文阐述全面, 重点明确, 层次清晰, 具有很好的学术价值。

- daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Arch Microbiol* 2003; 180: 11-16
- 33 Setchell KD, Clerici C, Lephart ED, Cole SJ, Heenan C, Castellani D, Wolfe BE, Nechemias-Zimmer L, Brown NM, Lund TD, Handa RJ, Heubi JE. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1072-1079
- 34 Atkinson C, Berman S, Humbert O, Lampe JW. In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production. *J Nutr* 2004; 134: 596-599
- 35 Yuan JP, Wang JH, Liu X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora-implications for health. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 765-781
- 36 Setchell KD, Cole SJ. Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians. *J Nutr* 2006; 136: 2188-2193
- 37 Hedlund TE, Maroni PD, Ferucci PG, Dayton R, Barnes S, Jones K, Moore R, Ogden LG, Wähälä K, Sackett HM, Gray KJ. Long-term dietary habits affect soy isoflavone metabolism and accumulation in prostatic fluid in caucasian men. *J Nutr* 2005; 135: 1400-1406
- 38 Song KB, Atkinson C, Frankenfeld CL, Jokela T, Wähälä K, Thomas WK, Lampe JW. Prevalence of daidzein-metabolizing phenotypes differs between Caucasian and Korean American women and girls. *J Nutr* 2006; 136: 1347-1351
- 39 Wang XL, Hur HG, Lee JH, Kim KT, Kim SI. Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 214-219
- 40 Tamura M, Tsushida T, Shinohara K. Isolation of an isoflavone-metabolizing, Clostridium-like bacterium, strain TM-40, from human faeces. *Anaerobe* 2007; 13: 32-35
- 41 Knaup B, Kahle K, Erk T, Valotis A, Scheppach W, Schreier P, Richling E. Human intestinal hydrolysis of phenol glycosides - a study with quercetin and p-nitrophenol glycosides using ileostomy fluid. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1423-1429
- 42 黄潇, 彭志刚. 芒果苷药理作用研究概况. *中国药师* 2007; 10: 73-74
- 43 García D, Escalante M, Delgado R, Ubeira FM, Leiro J. Anthelmintic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components Vimang and mangiferin. *Phytother Res* 2003; 17: 1203-1208
- 44 Rivera DG, Balmaseda IH, León AA, Hernández BC, Montiel LM, Garrido GG, Cuzzocrea S, Hernández RD. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 385-392
- 45 McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity of South African herbal teas: rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*). *Phytother Res* 2007; 21: 1-16
- 46 Sanugul K, Akao T, Li Y, Kakiuchi N, Nakamura N, Hattori M. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1672-1678
- 47 Marotti I, Bonetti A, Biavati B, Catizone P, Dinelli G. Biotransformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flavonoid glycosides by bifidobacterium species from human intestinal origin. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 3913-3919
- 48 Decroos K, Eeckhaut E, Possemiers S, Verstraete W. Administration of equol-producing bacteria alters the equol production status in the Simulator of the Gastrointestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *J Nutr* 2006; 136: 946-952
- 49 Chien HL, Huang HY, Chou CC. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* 2006; 23: 772-778
- 50 Donkor ON, Shah NP. Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *J Food Sci* 2008; 73: M15-M20
- 51 Wei QK, Chen TR, Chen JT. Using of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* to product the isoflavone aglycones in fermented soymilk. *Int J Food Microbiol* 2007; 117: 120-124
- 52 Tsangalis D, Wilcox G, Shah NP, McGill AE, Stojanovska L. Urinary excretion of equol by postmenopausal women consuming soymilk fermented by probiotic bifidobacteria. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61: 438-441
- 53 Yang XW. [Key foundational science problem in experimental medicine study of Chinese materia medica: ascertainment of active and toxic constituents from Chinese materia medica] *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2005; 3: 154-159
- 54 李亦德. 微生态制剂发展方向的讨论. *上海预防医学* 2004; 16: 235-237
- 55 Macfarlane GT, Macfarlane S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 156-162

编辑 李军亮 电编 何基才

中医中药配合化疗治疗大肠癌术后患者的临床新进展

钱金方

钱金方, 浙江湖州师范学院医学院 浙江省湖州市 313000
通讯作者: 钱金方, 浙江省湖州市学士路1号, 浙江湖州师范学院
医学院. exyqjf@hutc.zj.cn
收稿日期: 2008-04-11 修回日期: 2008-05-09
接受日期: 2008-05-20 在线发表日期: 2008-07-08

New clinical advances in treatment of postoperative large intestinal cancer through Chinese medicinal in combination with chemotherapy

Jin-Fan Qian

Jin-Fan Qian, Medical School of Zhejiang Huzhou Normal College, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Jin-Fan Qian, Medical School of Zhejiang Huzhou Normal College, 1 Bachelor Road, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China. exyqjf@hutc.zj.cn
Received: 2008-04-11 Revised: 2008-05-09
Accepted: 2008-05-20 Published online: 2008-07-08

Abstract

Recently, there has been a big advance in treatment of large intestinal cancer with Chinese medicinal, especially integrated Chinese-Western therapy for patients with later and advanced stage large intestinal cancer has shown its unique superiority in raising survival rate and in reducing poisonous side effects of chemotherapy, etc. Establishment of effective Chinese medicinal injection, compound formula of Chinese medicinal and syndrome differential treatment for large intestinal cancer reduced side effects of chemotherapy, enhanced life quality of the patients and prevented postoperative relapse and metastasis.

Key Words: Integrated Chinese-Western therapy; Large intestinal cancer; Chemotherapy

Qian JF. New clinical advances in treatment of postoperative large intestinal cancer through Chinese medicinal in combination with chemotherapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2149-2153

摘要

近年来中医药治疗大肠癌的研究取得了很大

进展,特别是中西医结合治疗中晚期患者,在提高生存率,改善化疗后毒副作用等方面,中医药显示出独特优势.确立有效的中药针剂、中药复方方剂和中医辨证分型施治等结合化疗治疗大肠癌手术后的研究,对于改善化疗的不良反应,提高患者生存质量,防治术后复发转移等方面都取得了较好的疗效.

关键词: 中西医结合; 大肠癌; 化疗

钱金方. 中医中药配合化疗治疗大肠癌术后患者的临床新进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2149-2153
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2149.asp>

0 引言

近10年来我国大肠癌的发生率呈上升趋势,各大城市的发生率由第7-8位上升至第3-4位,病死率也升至第4-5位.目前手术仍是治疗大肠癌的主要方法,大肠癌患者根治术后2年是转移的高峰时间,65%-80%发生在术后2年之内,有6%-8%发生在术后5年以上^[1].大肠癌术后化疗是目前有效的综合治疗方法,由于化疗中的毒性反应给患者的生活质量及临床疗效带来严重影响,化疗药物毒性大,在抗肿瘤的同时,对机体旺盛的骨髓、胃肠道黏膜细胞等有一定的损伤,因此有效剂量的应用受到限制.中西医结合是治疗恶性肿瘤的一种有效方法,中医药在围手术期的运用,特别是配合化疗减毒增效方面的研究,是当前中西医结合治疗大肠癌的热点.现将近几年中医药配合抗癌药治疗大肠癌术后的研究作一综述.

1 中药制剂配合化疗

1.1 艾迪注射液 有效成分为黄芪、刺五加、人参和去甲斑蝥素.有健脾和胃,补气养血,增强NK细胞活性,刺激T淋巴细胞产生干扰素、肿瘤坏死因子等淋巴因子,提高免疫功能,减轻化疗毒性.张静文 *et al*^[2]将大肠癌患者根治性手术后随机分为治疗组和对照组.治疗组53例,艾迪注射液配合HLF方案化疗.对照组50例单纯HLF(甲

■背景资料

大肠癌是常见的消化系肿瘤之一,手术和化疗是大肠癌当今的主要治疗手段,配合中医中药治疗,在增效减毒、改善化疗的不良反应,提高患者生存质量,防治术后复发转移等方面都有较好的疗效.

■同行评议者

刘宝瑞,教授,南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

■ 研发前沿

大肠癌手术后化疗配合有效的抗肿瘤中药针剂、中药方剂和中医辨证分型施治等治疗, 大肠癌各期患者取得了满意的临床效果。

酰四氢叶酸钙+氟尿嘧啶+羟基喜树碱)化疗. 结果通过对患者体质量、体力、睡眠、精神状态及食欲等13项指标进行评价, 两组化疗后生存质量均有改善, 治疗组有效率54.7%, 白细胞计数下降不明显, 不良反应较轻. 对照组有效率28.0%, 两组有显著性差异($P=0.006$).

1.2 复方苦参注射液 由苦参、白土苓等中药制备而成, 有较强的抗癌作用, 抑杀肿瘤细胞, 促进肿瘤细胞凋亡, 诱导分化, 阻止癌细胞扩散, 对癌肿疼痛有非常显著的止痛效果, 改善造血功能, 增强机体免疫力. 陈静 *et al*^[3]将50例结肠癌术后患者分为对照组(常规化疗)和治疗组(常规化疗加复方苦参注射液)各25例. 对照组于术后第14天给予丝裂霉素+5-FU. 治疗组在上述化疗方案联合复方苦参注射液20 mL加生理盐水250 mL静滴连续28 d, 2 mo后应用1个化疗疗程进行疗效评定. 结果治疗组化疗后毒副反应比对照组明显减轻($P<0.01$), 生活质量评分明显提高($P<0.05$).

1.3 参麦注射液 由红参、麦冬组成, 有益气固脱、养阴生津作用, 能减轻细胞免疫的抑制状态, 提高细胞免疫功能, 防治化疗致白细胞减少, 减少机体对感染的易感性, 抑制化疗所致恶性呕吐, 保护骨髓造血功能, 降低心肝受损程度. 朱伟嵘 *et al*^[4]将大肠癌根治术后患者随机分成对照组(22例)和治疗组(36例). 对照组腹腔化疗(5-FU+顺铂), 治疗组加用参麦针剂, 4 wk为1个疗程, 共4-6个疗程. 结果治疗组近期总有效率83.33%, 对照组为63.64%, 两组比较有统计学意义($P<0.05$); 认为参麦注射液能改善临床症状, 维持血白细胞的稳定, 提高NK细胞活性和CD4/CD8的比值, 与对照组比较, 有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$).

1.4 参芪扶正注射液 由党参、黄芪为主要原料提取成分配制. 按中医理论具有健脾、补气提高机体免疫力, 益肾促进骨髓造血功能. 参芪扶正注射液与化疗相配合, 有较明显的减毒作用, 明显减轻化疗引起的胃肠道反应, 减少骨髓抑制引起的白细胞减少, 提高化疗的完成率. 敬新蓉 *et al*^[5]将化疗的大肠癌患者用单盲法分对照组(单用化疗)及研究组(化疗加用参芪扶正注射液). 结果研究组有效率57.14%, 对照组有效率53.13%, 无统计学意义($P>0.05$); 骨髓抑制、恶心、呕吐等反应较对照组轻($P<0.05$); 化疗后研究组CD3、CD4、CD4/CD8、NK细胞明显高于对照组, 有统计学意义($P<0.05$). 王昆 *et al*^[6]将大

肠癌患者随机分为治疗组(参芪扶正注射液加化疗)30例和对照组(单纯化疗)28例. 结果治疗组的胃肠道反应和白细胞减低均明显低于对照组($P<0.05$), 治疗组的化疗完成率明显高于对照组($P<0.05$).

1.5 复方丹参滴丸 主要由丹参、三七提取物配制. 丹参对肿瘤细胞生长和增殖有显著抑制作用, 有诱导肿瘤细胞凋亡和细胞毒杀伤作用, 有一定的抗黏附和肿瘤转移作用, 能产生扩血管效应, 降低血液黏稠度, 改善肿瘤局部血液循环及血氧状态, 提高肿瘤对化疗药的敏感性. 陈小东 *et al*^[7]将中晚期大肠癌患者随机分为滴丸化疗组47例, 用复方丹参滴丸加LLF方案治疗; 单纯化疗组46例单纯LLF(奥沙利铂+亚叶酸钙+5-FU)化疗. 结果两组有效率分别为51.1%和41.3%($P>0.05$); 临床获益率分别为80.8%和58.7%($P<0.05$); 滴丸化疗组治疗前后T淋巴细胞亚群中的CD4/CD8比值有明显提高($P<0.01$), 单纯化疗组治疗前后无明显变化($P>0.05$); 生存质量滴丸化疗组高于单纯化疗组($P<0.05$); 恶心呕吐、感觉神经毒性、腹泻、白细胞减少及黏膜炎, 单纯化疗组高于滴丸化疗组($P<0.05$).

1.6 中药扶正胶囊和祛邪胶囊 扶正胶囊由人参、白术、茯苓、甘草、肉豆蔻、陈皮、木香、炒麦芽、鸡内金等组成, 有健脾益气、开胃醒脾之功. 祛邪胶囊由巴豆、吴茱萸、干姜、官桂、川乌、半夏、橘红等组成, 有燥湿化痰、行气活血, 健脾消食之品. 两药并用, 对大肠癌术后患者脾胃虚弱余邪尚存的病机特点有较好的治疗效果. 雒琳 *et al*^[8]对大肠癌根治术及化疗放疗后II、III期患者同期队列对照, 治疗组53例, 用扶正胶囊及祛邪胶囊治疗; 对照组48例, 不加特殊干预, 只定期随访, 结果治疗组1、2、3年复发转移率分别为0%、2.7%、14.8%, 对照组为6.2%、24.2%、30.8%, 两组比较2年复发转移率差异有显著性($P<0.05$); 1年、3年复发转移率差异无显著性; 治疗组复发转移的平均时间为 26.2 ± 4.5 mo, 对照组 14.2 ± 4.2 mo, 有显著性差异($P<0.05$).

2 中药方剂配合化疗

2.1 肠复方 由党参、黄芪、白术、云苓、广香、陈皮、苏木、莪术、花粉、蒲公英、败酱草、制鳖甲、蚤休、甘草等组成, 有健脾益气、活血散结、解毒抗癌之功效. 现代中药药理研究表明, 有抑制癌细胞增殖的活性, 对多种

肿瘤有不同程度的杀伤作用. 梁松岳^[9]将晚期大肠癌患者随机分为治疗组(肠复方加化疗)和对照组(单纯化疗), 结果治疗组1、2、3年生存率分别为78%、60%、43%, 对照组分别为50%、40%、20%, 两组比较差异有显著性($P<0.05$). 治疗组CEA检测转阴率为70%, 对照组为41%, 两组比较有显著性差异($P<0.05$). 治疗组治疗前后NK细胞活性为 $13.50\% \pm 7.30\%$ 、 $60.20\% \pm 7.4\%$, 对照组为 $14.40\% \pm 3.5\%$ 、 $40.70\% \pm 5.1\%$. 两组比较差异均有显著性($P<0.05$).

2.2 扶正祛邪汤 由薏苡仁、生晒参、灵芝、三七、黄芪、白术、苦荞头、无花果、猪苓、山慈姑、北豆根、丹参、败酱草组成. 随证加味, 有扶正固本、清热解毒、理气散结、养血活血的治疗法则.

牛春风 *et al*^[10]将大肠恶性肿瘤患者随机分治疗组(中药结合化疗)34例和对照组(单纯化疗)31例, 两组术后15 d内开始化疗, 采用5-FU、甲环亚硝脒、长春新碱, 治疗组加用中药治疗. 结果体力状况: 治疗组的卡氏评分由治疗前的65分到治疗后的68分, 对照组由治疗前的66分降至51分, 两组比较有显著性差异($P<0.01$). 治疗组中位生存时间为32.2 mo, 对照组为18.3 mo; 生存率: 所有病例随访1年, 治疗组1、3、5年生存率分别为100%、82.4%、66.7%, 对照组为89.7%、61.2%、41.4%($P<0.05$); 治疗组3年内复发率23.5%, 对照组为48.38%($P<0.05$).

2.3 复方四物汤 由当归、生地、白芍、川芎、藤梨根、水杨梅根、野葡萄根、黄芪组成, 有提高化疗药的敏感性, 减轻化疗药毒性, 清热化湿解毒, 直接杀伤癌细胞, 保护骨髓, 减轻化疗药的毒副作用, 预防肿瘤的复发转移作用. 孙在典 *et al*^[11]用复方四物汤加5-FU、四氢叶酸钙, 4 wk为1个疗程, 共3个疗程, 治疗48例晚期大肠癌患者. 结果近期疗效总有效率45.8%; 白细胞轻度下降8例(16.7%), 恶心呕吐6例(12.5%), 腹泻3例(6.3%); 治疗前癌胚抗原(CEA) $85.53 \pm 1.36 \mu\text{g/L}$ 、糖类抗原-199(CA-199) $12.37 \pm 0.82 \text{万U/L}$, 治疗后CEA $18.31 \pm 0.75 \mu\text{g/L}$ 、CA-199 $3.92 \pm 0.32 \text{万U/L}$, 均有显著性差异($P<0.05$).

2.4 健脾消癌饮 由党参、白术、茯苓、黄芪、灵芝、薏苡仁、仙灵脾、丹参、白花蛇舌草、七叶一枝花、半枝莲、石见穿、莪术、法夏、广木香、甘草组成. 有健脾益气, 提高机体免疫功能; 活血化瘀, 降低血液黏稠度, 改善微循环, 防止癌细胞着床转移; 清热解毒, 直接抑制

癌细胞的作用. 蒋益兰 *et al*^[12]用健脾消癌饮加5-FU+CF治疗大肠癌术后40例, 与单纯化疗40例进行对比. 结果: 治疗组1、3、5年生存率分别为92.5%、77.5%、67.5%, 高于单纯化疗组, 有显著差异($P<0.05$). 治疗组患者的毒副作用明显低于对照组, 术后复发率亦低于对照组, 有显著差异($P<0.05$).

2.5 健脾消积汤 由党参(或太子参)、白术、茯苓、甘草、陈皮、白花蛇舌草、薏苡仁、枳壳、黄芪、麦芽组成. 有增强机体免疫功能、改善临床症状、降低化疗药物的不良反应、维护机体造血及免疫功能的作用. 黄智芬 *et al*^[13]将晚期大肠癌患者随机分成治疗组31例和对照组30例, 均采用5-FU+CF方案化疗, 治疗组加用健脾消积汤治疗, 疗程28 d. 结果: 治疗组与对照组总缓解率分别为35%和17%, 临床征候改善率分别为81%和50%, 生存质量改善率分别为77%和53%, 两组比较有显著性差异($P<0.01$), 治疗组毒副作用发生率小于对照组($P<0.01$). 认为健脾消积汤配合化疗可提高晚期大肠癌的机体免疫功能, 提高生存质量, 延长生存期, 治疗恶性肿瘤有一定优势和作用.

2.6 益气活血中药 由生黄芪、太子参、生白术、茯苓、法半夏、当归、鸡血藤、赤芍、生薏苡仁、土茯苓、藤梨根等组成. 有减低血液高凝状态、提高细胞免疫功能、缓解化疗药物的不良反应、改善生活质量. 张青 *et al*^[14]将晚期大肠癌患者随机分为治疗组38例(益气活血中药联合化疗)和对照组30例(单纯化疗). 结果: 临床受益率(CR+PR+SD)分别为78.9%、53.3%($P<0.05$); 1年生存率分别为73.7%、46.7%($P<0.05$).

2.7 中药脾肾方 由黄芪、党参、白术、云苓、陈皮、女贞子、枸杞、补骨脂、菟丝子、甘草等组成. 有益气养血, 调理脾肾, 滋肾养肝, 提高免疫功能的作用. 刘静安 *et al*^[15]将大肠癌手术后154例用MFA(丝裂霉素+5-FU+阿霉素)化疗, 治疗组96例加服中药脾肾方加味. 结果: 治疗组化疗完成率92.7%, 血象下降及消化道反应者7例; 对照组完成率62%, 22例由于血象下降或消化道反应过重终止化疗, 两组比较有明显差异($P<0.01$). 消化道反应: 对照组出现毒副作用明显重于治疗组. 治疗组化疗后外周血象的变化明显好于对照组, 两组比较有明显差异. 生存期观察: 治疗组1、3、5年生存率分别93.7%、67%、60.4%, 对照组生存率为84%、53%、

■创新盘点

大肠癌手术后应用中西医结合治疗, 在增效减毒作用、延长生存期、改善化疗后毒副作用、提高患者生存质量、防治术后复发转移、抗耐药性等方面, 显示出独特而明显的效果.

■应用要点

目前大肠癌手术后应用抗肿瘤中药成药的研究以及实验研究方面取得了满意的效果,但缺乏中医药治疗大肠癌更深入的理论及系统化的研究,应从分子水平及基因水平来探索中药抗癌机制的实验研究,为临床应用中药治疗大肠癌提供理论依据。

48.3%。

2.8 中药健脾康复方 由党参30 g、白术15 g、茯苓15 g、仙鹤草15 g、卷柏15 g、甘草5 g组成。在改善临床症状和提高免疫功能方面有确切疗效。杨传标 *et al*^[16]将中晚期大肠癌患者随机分治疗组30例,在对症支持治疗的基础上口服健脾康复方,每日1剂;对照组15例,对症支持治疗,疗程为2mo。结果治疗组患者外周血*K-ras*基因突变率治疗后为26.7%,较治疗前的73.3%显著下降($P<0.05$);治疗组患者血清突变型*p53*基因蛋白含量治疗后(0.82 ± 0.24 ng/L)较治疗前(0.89 ± 0.22 ng/L)显著下降($r = 2.34, P<0.05$);对照组以上两项指标治疗前后差异无显著意义。认为中药健脾康复方具有抑制*K-ras*和*p53*基因突变的作用,可能是对大肠癌脾虚证治疗作用的分子机制。

3 单纯针灸

中医治疗肿瘤,主要在整体观念和辨证论治,依据扶正祛邪、调整阴阳和病情的寒热差异和肿瘤细胞生长的适宜温度条件,因时因地因人制宜的治疗原则选用相应的治疗。针刺对胃肠道反应具有良好的调节作用;中脘和天枢可调理肠胃,疏通胃气,清热利湿,疏理胃肠气机;足三里有调理气血、疏通经络,增强或调节胃肠道消化功能,改善消化不良症状的功能,可提高痛阈,抑制中枢神经和外周神经的痛觉传导,有明显的镇痛作用,并能调理全身的免疫功能;内关调理中焦之气。金哲秀^[17]将针灸组用针灸两步法(先针刺二间、阳溪,再艾灸)治疗大肠癌27例,对照组用CAF方案(环磷酰胺+阿霉素+氟尿嘧啶)治疗39例。结果:针灸组的总有效率为77.78%,对照组58.97%;针灸组的腹痛、便秘(或腹泻)、疲乏无力等症状的缓解率均高于对照组,针灸组无明显的不良反应。穆立新 *et al*^[18]将大肠癌术后患者随机分为治疗组和对照组各30例,对照组用促菌生药物口服治疗,治疗组采用针灸治疗。结果:治疗组总有效率达96.67%,显效率为90%,对照组有效率为40%,治疗组效果明显高于对照组。

4 中医辨证药物配合化疗

中医学把大肠癌称作“肠覃”、“积聚”、“肠风”、“脏毒”、“锁肛痔”等。基本病机为正气不足、湿毒瘀滞,两者互为因果,本虚标实,早期湿热、瘀毒偏盛,晚期则脾肾阴阳气血俱虚,治疗当标本兼顾,辨证为主。应用中医

辨证论治联合化疗的方法治疗晚期大肠癌,充分发挥化疗效果及中医药在改善患者的症状、减轻化疗药物不良反应的优势,对提高患者的化疗耐受性、保证化疗的顺利进行、提高生活质量具有积极的意义。贾小强 *et al*^[19]认为中西医结合方法治疗大肠癌在改善患者生活质量和减轻化疗毒副作用方面明显优于单用西医治疗方法。用前瞻、对照、随机方法将大肠癌患者分为观察组28例,应用手术、辅助化疗和中医辨证分型给予中药煎剂口服治疗,对照组29例仅用手术及辅助化疗。结果:观察组生活质量评分较好率为75%,与对照组比较有显著差异($P<0.05$);观察组化疗毒副反应分度低于I度为64.29%,与对照组比较有显著差异;两组1、2、3年生存率比较均无显著差异。曾小粤 *et al*^[20]认为中西医结合治疗中晚期大肠癌有明显优势,明显减轻化疗副作用的功效。将86例中晚期大肠癌患者采用手术+化疗(5-FU+MMC, CF+5-FU, 5-FU+DDP, MMC+5-FU+VCR)+免疫(白介素-2)+中药治疗(中药归脾汤加减口服治疗)。结果:治疗后1年、3年、5年生存率分别为87.2%、79.1%、47.7%,对术后降低CEA、CA-199有明显的效果($P<0.05$),明显减轻化疗副作用。杨祖贻 *et al*^[21]认为中药能提高III期大肠癌术后患者对化疗的耐受能力和化疗间歇期的生活质量。对60例III期大肠癌术后患者随机分对照组30例(5-FU+CF+草酸铂);试验组30例(化疗+血塞通注射液、黄芪注射液、参麦注射液、口服中药),结果:试验组在化疗过程中对化疗的耐受能力比对照组强,生活质量提高,两组比较差异有显著性($P<0.01$)。胡爱民 *et al*^[22]将晚期大肠癌患者随机分为治疗组28例(中医辨证分型施治联合化疗治疗),对照组22例单纯化疗,两组均采用(奥沙利铂+亚叶酸钙+5-FU)化疗2个周期。结果:治疗组与对照组有效率分别为39.3%和36.4%,无显著性差异($P>0.05$);两组患者生活质量改善率分别为85.7%和50.0%,有显著性差异;治疗组不良反应发生率低于对照组,有显著性差异。

5 结论

中西医结合治疗大肠癌手术后是临床研究的热点,近年来取得较大的进展,中医中药与抗癌药合用,在增效减毒作用、延长生存期、改善化疗后毒副作用、提高患者生存质量、防治术后复发转移、抗耐药性等方面,显示出独特而明显的效果。虽然在抗肿瘤中药成药的研究以及

实验研究方面取得了满意的成果,但是还缺乏中医药治疗大肠癌更深入的理论及系统化的研究,所以应加强多学科的合作,应用最新的现代医学技术,从分子水平的基因水平来探索中药抗癌机制的实验研究,为临床应用中药治疗大肠癌提供理论依据.随着人们对肿瘤研究的不断深入,特别是中医药对大肠癌病因机制等方面更深层次的认识,以及有效的单味中药和中药复方抗大肠癌研究,相信中医药在大肠癌的综合治疗中,将占据重要的位置.

6 参考文献

- 1 汤钊猷,朱世能,曹世龙.现代肿瘤学.第1版.上海:上海医科大学出版社,1993:546
- 2 张静文,王继栓.艾迪注射液配合大肠癌术后辅助化疗的临床观察.中国综合临床 2004;20:999-1000
- 3 陈静,曲文志,谢强,孙玉华,刘红波.复方苦参注射液在结肠癌术后的作用.中国中西医结合外科杂志 2006;12:36-38
- 4 朱伟嵘,郑岚,郭元彪,袁建明,沈小珩.参麦剂剂协同腹腔化疗治疗进展期大肠癌的临床观察.中西医结合学报 2005;3:266-269
- 5 敬新蓉,陈健,闵敏,钟国成,岳伦莉,廖浩,王跃蓉.参芪扶正注射液配合化疗治疗大肠癌的临床观察.现代肿瘤医学 2007;15:384-386
- 6 王昆,覃建雄,农云.参芪扶正注射液配合化疗治疗大肠癌30例临床观察.云南中医中药杂志 2007;28:20-21
- 7 陈小东,梁启廉,李小英,张英,李建文,梁柱.复方丹参滴丸联合化疗治疗47例大肠癌.中国中西医结合外科杂志 2005;11:300-302
- 8 雒琳,杨宇飞,李培红,吴煜,张建伟,吴显文,高书棣,

- 刘端祺.中药扶正胶囊和祛邪胶囊减少Ⅱ、Ⅲ期大肠癌术后复发转移的队列研究.中国中西医结合杂志 2006;26:677-680
- 9 梁松岳.肠复方合并化疗治疗大肠癌40例总结.湖南中医杂志 2005;21:33-34
- 10 牛春风,王徐来,王保华.扶正祛邪汤配合化疗治疗大肠癌术后34例疗效观察.中国老年学杂志 2003;23:865-866
- 11 孙在典,张爱琴.复方四物汤合化疗治疗晚期大肠癌48例.浙江中医杂志 2005;6:250
- 12 蒋益兰,潘博,仇湘中.健脾消痞饮配合化疗治疗大肠癌术后40例总结.湖南中医杂志 2001;17:9-10
- 13 黄智芬,黎汉忠,刘俊波,黄常江,施智严.健脾消积汤配合化疗治疗晚期大肠癌疗效观察.现代中西医结合杂志 2005;14:1281-1282
- 14 张青,赵文硕,于洁,王笑民.益气活血中药联合化疗治疗晚期大肠癌的临床研究.中国中医药信息杂志 2006;13:17-18
- 15 刘静安,张悦红.中西医结合治疗大肠癌术后154例临床观察.中草药 2000;31:367-368
- 16 杨传标,薛军,张德春,徐克成,左建生.中药健脾复元方对大肠癌脾虚证患者K-ras和p53基因突变的抑制作用.世界华人消化杂志 2004;12:2764-2765
- 17 金哲秀.针灸两步法治疗大肠癌27例临床分析.上海中医药杂志 2003;37:48-49
- 18 穆立新,姜军作,范杰华.针灸治疗大肠癌术后30例疗效观察.大连大学学报 2006;27:100-106
- 19 贾小强,杜永宏,张丽娟.中西医结合治疗大肠癌疗效分析.辽宁中医杂志 2005;32:703-704
- 20 曾小粤,韩炳生.中西医结合治疗中晚期大肠癌86例.中医研究 2006;19:37-38
- 21 杨祖贻,刘超,罗洁,徐琳.中药联合化疗治疗Ⅲ期大肠癌术后患者的临床研究.中国肿瘤临床与康复 2005;12:190-192
- 22 胡爱民,解传勇,黎治平.中药联合化疗治疗晚期大肠癌的疗效观察.实用癌症杂志 2006;21:74-76

■同行评价

本文较真实的反映目前中药治疗肿瘤的基本现状,文笔很流畅,但学术价值一般.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

本刊讯 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策,具体格式如:(1)作者贡献分布:陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等;此课题由陈湘川,庞丽娟,陈玲,杨兰,张金芳,齐妍及李洪安设计;研究过程由陈玲,杨兰,张金芳,蒋金芳,杨磊,李锋及曹秀峰操作完成;研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供;数据分析由陈湘川,杨兰及庞丽娟完成;本论文写作由陈湘川,庞丽娟及李洪安完成。(2)同行评议者:房静远教授,上海交通大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所;韩新巍教授,郑州大学第一附属医院放射科;匡安仁教授,四川大学华西医院核医学科。(常务副总编辑:张海宁 2008-07-08)

IL-10对TGF- β_1 诱导的大鼠肝星状细胞CTGF表达的影响

杨悦杰, 黄芬, 胡静, 马力, 李智伟

■背景资料

肝纤维化是由众多因素参与复杂的病理过程。肝星状细胞(HSC)的活化在肝纤维化过程中起核心作用, 在各种因素刺激下, HSC增殖, 移行, 表达各种细胞外信号转导通路蛋白, 产生大量以胶原为主的细胞外基质(ECM)成分和细胞因子, 促进肝纤维化的发生发展。TGF- β_1 是强有力的致纤维化的细胞因子, 促进HSC增殖活化, 合成大量ECM, 在纤维化进程中起重要作用。目前, 抗纤维化药物仍存在其局限性, 进一步研究肝纤维化的机制, 有助于开发研究新药物控制或延缓肝纤维化的发展。

■同行评议者

党双锁, 副教授, 西安交通大学第二医院感染科; 张明辉, 副主任医师, 河北医科大学第一医院肝病中心(传染病)

杨悦杰, 黄芬, 胡静, 马力, 李智伟, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 此实验由杨悦杰与黄芬设计; 研究过程由杨悦杰, 胡静及马力操作完成; 研究方法指导及分析工具由马力提供; 数据分析由杨悦杰, 黄芬, 胡静及李智伟完成; 本论文写作由杨悦杰, 黄芬及李智伟完成。

通讯作者: 黄芬, 110004, 辽宁省沈阳市, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科。

hfzyq1962@sina.com

电话: 024-83956429

收稿日期: 2008-02-28 修回日期: 2008-04-17

接受日期: 2008-04-21 在线出版日期: 2008-07-08

Effect of interleukin-10 on TGF- β_1 -induced CTGF expression in hepatic stellate cells

Yue-Jie Yang, Fen Huang, Jing Hu, Li Ma, Zhi-Wei Li

Yue-Jie Yang, Fen Huang, Jing Hu, Li Ma, Zhi-Wei Li, Department of Infectious Diseases, Shengjing Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Fen Huang, Department of Infectious Diseases, Shengjing Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. hfzyq1962@sina.com

Received: 2008-02-28 Revised: 2008-04-17

Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of interleukin-10 (IL-10) on the expression of connective tissue growth factor (CTGF) in hepatic stellate cells (HSC) and its possible antifibrogenic mechanism.

METHODS: Hepatic stellate cells (rHSC-99) cultured in vitro was exposed to various concentrations of IL-10 and/or TGF- β_1 for 48 h and then expression level of CTGF mRNA was measured by semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The expression level of CTGF mRNA, compared with control group, markedly increased when HSC was only exposed to TGF- β_1 ($P < 0.05$); when HSC was only exposed to various concentrations of IL-10, target gene expression showed no significance; the expression level of CTGF mRNA markedly decreased when HSC was exposed to TGF- β_1 in combina-

tion with different concentrations of IL-10 ($P < 0.05$).

CONCLUSION: IL-10 remarkably inhibits TGF- β_1 -induced CTGF mRNA expression, which is thought to be one possible antifibrogenic mechanism.

Key Words: Interleukin-10; Transforming growth factor; Hepatic stellate cell; Connective tissue growth factor

Yang YJ, Huang F, Hu J, Ma L, Li ZW. Effect of interleukin-10 on TGF- β_1 -induced CTGF expression in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2154-2157

摘要

目的: 探讨IL-10对大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)表达CTGF的影响及其抗纤维化的可能机制。

方法: 体外培养大鼠肝星状细胞系rHSC-99, 分别用不同浓度的IL-10、TGF- β_1 干预和两者共同干预48 h后, 采用半定量 RT-PCR法检测各组肝星状细胞中CTGF mRNA表达水平。

结果: TGF- β_1 单独干预HSC, CTGF mRNA表达水平与对照组比较均明显增强($P < 0.05$); 不同浓度的IL-10单独干预HSC, 各目的基因表达与对照组比较无明显统计学意义; 不同浓度的IL-10与TGF- β_1 共同干预HSC, CTGF mRNA表达水平与TGF- β_1 组比较均明显降低($P < 0.05$)。

结论: IL-10可显著抑制由TGF- β_1 诱导的CTGF mRNA的表达, 这可能是其抗纤维化的机制之一。

关键词: 白介素-10; 转化生长因子; 肝星状细胞; 结缔组织生长因子

杨悦杰, 黄芬, 胡静, 马力, 李智伟. IL-10对TGF- β_1 诱导的大鼠肝星状细胞CTGF表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2154-2157

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2154.asp>

0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝纤维化时细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过多产生和沉积的主要细胞来源, HSC的激活、增殖在肝纤维化过程中起核心作用. 转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)是强有力的致纤维化的细胞因子, 在肝纤维化时表达明显增多, 促进HSC增殖活化, 合成大量ECM, 在纤维化进程中起重要作用^[1]. 结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是近年来新发现的一种细胞因子, 肝纤维化时肝组织内与血清中CTGF明显增高, 其程度与肝纤维化的病理进展水平呈平行相关关系, CTGF可能是TGF β 的下游效应介质, 可以介导TGF β 的促细胞外基质效应, 而不影响TGF β 免疫抑制和抗细胞增殖效应, 是具有多种生理功能的细胞因子, 近年来成为研究热点之一^[2]. 白介素-10(interleukin-10, IL-10)是一种炎症抑制因子, 临床和动物实验表明, IL-10可减轻肝脏炎症, 抑制肝纤维化的发展, 可望发展为抗肝纤维化药物, 但其作用机制尚未明确. 我们用IL-10及TGF β_1 干预和共干预体外培养的大鼠肝星状细胞系 γ -HSC99, 采用半定量RT-PCR法检测各组CTGF mRNA表达, 进一步探讨IL-10抗肝纤维化的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 γ -HSC99细胞系^[3], 为活化的大鼠肝脏星状细胞, 由北京大学附属医院人民医院肝胆外科实验室冷希圣教授惠赠; TGF β_1 及重组大鼠IL-10购自Peprotech公司; 逆转录试剂盒和Taq酶购自大连宝生物公司; 引物由Invitrogen公司合成; 总RNA提取试剂(TRIZOL)购自Invitrogen公司; DEPC和琼脂糖购自Sigma公司; DNA marker购自MBI公司; DMEM培养基购自Gibco公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将 γ -HSC99细胞复苏后接种于25 cm²培养瓶中, 每瓶加入5 mL含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液, 置37℃、50 mL/L恒温CO₂培养箱中, 细胞为贴壁生长, 每1-2 d以2.5 g/L胰蛋白酶消化传代.

1.2.2 实验分组: A: 对照组加磷酸盐缓冲液; B: TGF β_1 8 μ g/L组; C: IL-10 10 μ g/L组; D: IL-10 20 μ g/L组; E: IL-10 40 μ g/L组; F: TGF β_1 8 μ g/L+IL-10 10 μ g/L组; G: TGF β_1 8 μ g/L+IL-10 20 μ g/L组; H: TGF β_1 8 μ g/L+IL-10 40 μ g/L组.

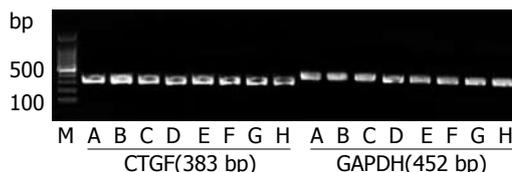


图1 HSC CTGF/GAPDH mRNA RT-PCR产物电泳图.

1.2.3 RT-PCR法检测CTGF mRNA的表达: 用TRIzol试剂提取细胞总RNA; 用分光光度法测定RNA含量及纯度, $A_{260} : A_{280}$ 比值均在在1.8-2.0之间. 采用两步法RT-PCR技术, 设置GAPDH为内参照. 引物序列: CTGF 5'-CTAAGACCTGTGGAATGGGC-3'(上游), 5'-CTCA AAGATGTCATTGTCCCC-3'(下游); GAPDH 5'-TGGGACGATATGGAGAAGAT-3'(上游), 5'-ATTGCCGATAGTGATGACCT-3'(下游). 用RNA PCR Kit(AMV)Ver. 310试剂盒进行逆转录聚合酶链式反应, cDNA合成和预变性: 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min进行1次循环, CTGF PCR扩增条件: 94℃ 2 min进行1次循环, 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 50 s进行32次循环. 取RT-PCR产物在12 g/L琼脂糖凝胶上电泳(100 V, 30 min), 用GDS凝胶成像系统拍摄电泳结果, 各带用计算机图像分析系统扫描定量.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 各组之间是否存在显著性差异分析采用One-way ANOVA分析. 进一步各实验组与对照组的比较采用最小显著差值法LSD-*t*检验. $P < 0.05$ 确定差异有无显著意义.

2 结果

2.1 目的基因PCR扩增结果 以细胞总RNA为模板, 进行RT-PCR反应, 扩增产物经凝胶电泳可见分别于383 bp(CTGF)及452 bp(GAPDH)处的清晰扩增条带(图1).

2.2 灰度分析结果 A-H组CTGF/GAPDH分别为1.02 \pm 0.12, 1.38 \pm 0.07, 1.05 \pm 0.09, 1.01 \pm 0.10, 1.01 \pm 0.11, 0.82 \pm 0.03, 0.72 \pm 0.04, 0.62 \pm 0.06. TGF β_1 组HSC细胞CTGF mRNA表达明显升高, 与空白对照组(A组)比较, 差别有统计学意义($P < 0.05$); IL-10各浓度组(C-E组)与空白对照组比较, 基因表达差别无明显统计学意义; 同时加入TGF β_1 及不同浓度的IL-10(F-H组)与TGF β_1 组(B组)比较, CTGF mRNA表达均明显降低, 差别有统计学意义($P < 0.05$), 并呈剂量依赖效应, 说明IL-10对TGF β_1 诱导的CTGF表达有明显的抑制作用(图2).

■ 研发前沿

采用CCl₄构建肝纤维化模型, IL-10基因敲除小鼠较野生型小鼠肝纤维化程度明显加重, 提示内源性IL-10对肝纤维化起抑制作用. 临床试验显示外源性IL-10可减轻患者及动物模型的肝纤维化程度, 但其作用机制尚不明确.

■ 相关报道

最近研究显示, IL-10与慢性肝损害发生发展关系密切, 且具有抗纤维化效应, 可望成为治疗肝纤维化的药物, 但其作用机制尚不明确. CTGF是近年来新发现的一种细胞因子, 可能是TGF- β 下游信号效应分子, 特异地介导TGF- β 促纤维化效应, 而不影响TGF- β 免疫抑制和抗细胞增殖效应. 因此, 作为组织器官纤维化形成过程中的重要介质, CTGF的发现可能为防治肝纤维化提供一个新的靶标.

应用要点

本研究发现IL-10可显著抑制由TGF- β_1 诱导的CTGF mRNA的表达,这可能是IL-10抗纤维化作用机制之一,有助于进一步指导IL-10的临床应用。

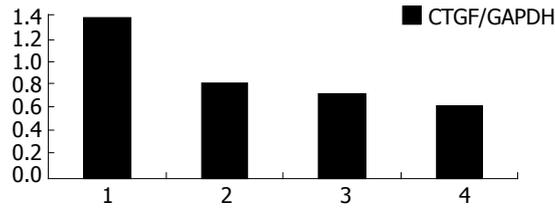


图2 IL-10对CTGF表达抑制作用. 1: TGF β_1 ; 2: TGF β_1 +IL-10 10 μ g/L; 3: TGF β_1 +IL-10 20 μ g/L; 4: TGF β_1 +IL-10 40 μ g/L;

3 讨论

肝纤维化是肝组织内ECM过度增生和沉积,降解相对不足的病理过程, HSC的激活和增殖在肝纤维化过程中起核心作用,以HSC为靶向的研究是近年来抗纤维化机制方面的研究热点. 多项研究表明, TGF β_1 是强有力的致纤维化细胞因子,在肝纤维化是表达明显增多,可促进HSC的增殖和活化,使ECM成分合成增多,降解减少,并存在正反馈放大效应,促进肝纤维化的进程^[4-7]. CTGF是近年来新发现的一种细胞因子,是具有高度保守性的即刻早期基因CNN家族成员之一. CTGF与肝纤维化有密切的关系^[8]. 人类慢性肝病、肝纤维化及实验性肝纤维化发生发展过程中均与CTGF表达有关,主要是HSC-CTGF mRNA的表达上调, Crean *et al*^[9]用抗CTGF的中和抗体可阻断TGF β_1 引起的促纤维化效应. Mori *et al*^[10]在小鼠皮肤纤维化模型中, TGF β_1 可引起短期纤维组织增生,若同时注射CTGF则可引起持续稳定的纤维组织增生. 进一步研究发现, CTGF启动子中存在TGF- β 反应元件,提示这可能是TGF- β 选择性上调CTGF基因表达的分子基础. CTGF可能是TGF- β 下游信号效应分子,特异地介导TGF- β 促纤维化效应^[11-12],而不影响TGF- β_1 免疫抑制和抗细胞增殖效应. 因此,作为组织器官纤维化形成过程中的重要介质,CTGF的发现可能为防治肝纤维化提供一个新的靶标. 目前,抗纤维化药物仍存在其局限性,进一步研究肝纤维化的机制,有助于开发研究新药物控制或延缓肝纤维化的发展. 最近文献资料显示, IL-10与慢性肝损害发生发展关系密切,且具有抗纤维化效应,可望成为治疗肝纤维化的药物. IL-10是由Th2细胞、巨噬细胞和活化的B细胞产生一种细胞因子. 是一类抑制性免疫调节因子,具有强大的抑制炎症和巨噬细胞功能的作用. 采用CCl₄构建肝纤维化模型, IL-10基因敲除小鼠较野生型小鼠肝纤维化程度明显加重^[13-14],提示内源性IL-10对肝纤维

化起抑制作用. Nelson *et al*^[15]临床试验显示外源性IL-10可减轻患者及动物模型的肝纤维化程度,但其作用机制尚不明确. 我们建立了TGF β_1 与IL-10干预和共干预体外培养的HSC细胞模型,采用半定量RT-PCR法检测CTGF mRNA的表达,结果显示HSC经TGF β_1 进一步诱导活化,表达CTGF mRNA明显增多,这与以往的研究结果一致; IL-10单独干预, IL-10各浓度组与空白对照组比较,差别无统计学意义,说明单用IL-10对HSC CTGF mRNA表达无明显作用; IL-10与TGF β_1 共同干预,与TGF β_1 组比较, CTGF mRNA表达明显减少,且以IL-10 40 μ g/L+TGF β_1 8 μ g/L组抑制作用最明显,差别有统计学意义,说明IL-10对TGF β_1 诱导的CTGF mRNA表达有明显的抑制作用. 因此我们推断, IL-10可通过抑制TGF β_1 诱导的CTGF基因表达而发挥抗纤维化效应,这可能是IL-10抗纤维化机制之一.

4 参考文献

- Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, Takigawa M, Takehara K. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 2005; 203: 447-456
- 冷希圣, 翁山耕, 李涛, 魏玉华, 彭吉润, 杜如昱. 大鼠肝星状细胞系的建立及其生物学特性的研究. *解剖学杂志* 2003; 34: 272-277
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2572-2576
- Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Buschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1059-G1068
- Schnur J, Olah J, Szepesi A, Nagy P, Thorgeirsson SS. Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 127-133
- Hayashi N, Kakimura T, Soma Y, Grotendorst GR, Tamaki K, Harada M, Igarashi A. Connective tissue growth factor is directly related to liver fibrosis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 133-135
- Crean JK, Finlay D, Murphy M, Moss C, Godson C, Martin F, Brady HR. The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor

- induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 44187-44194
- 10 Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999; 181: 153-159
- 11 Williams EJ, Gaca MD, Brigstock DR, Arthur MJ, Benyon RC. Increased expression of connective tissue growth factor in fibrotic human liver and in activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 32: 754-761
- 12 Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2002; 82: 767-774
- 13 Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28: 1607-1615
- 14 Thompson KC, Trowern A, Fowell A, Marathe M, Haycock C, Arthur MJ, Sheron N. Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation In vitro. *Hepatology* 1998; 28: 1518-1524
- 15 Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; 118: 655-660

■同行评价

本研究方法合理可行, 结果有价值, 对临床基础研究的突破有意义. 如果进一步探讨IL-10与TGF β_1 的最佳搭配浓度, 结合机体本身病例状态下观察则更有价值.

编辑 潘伯荣 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-07-08)

不同压力二氧化碳气腹对大鼠胃肠动力的影响

孟凌新, 牟峰, 朱玉梅

■背景资料

腹腔镜手术以其微创的特点被广泛应用, 随着手术适应范围的拓宽, CO₂气腹对机体所产生的各种病理生理学改变受到众多学者的重视。恶心呕吐是腹腔镜术后常见的并发症, 其可能与CO₂气腹的时间和气腹的压力有关。

孟凌新, 朱玉梅, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110004

牟峰, 沈阳市第六人民医院 辽宁省沈阳市 110006

作者贡献分布: 此课题由孟凌新设计; 研究过程由孟凌新, 牟峰及朱玉梅操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孟凌新提供; 数据分析由牟峰与朱玉梅完成; 本论文写作由孟凌新完成。

通讯作者: 孟凌新, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学盛京医院麻醉科。meng_lingxin@hotmail.com

电话: 024-83955042 传真: 024-23891793

收稿日期: 2008-03-30 修回日期: 2008-05-22

接受日期: 2008-06-02 在线出版日期: 2008-07-08

Effects of different intra-abdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum on gastrointestinal motility in rats

Ling-Xin Meng, Feng Mu, Yu-Mei Zhu

Ling-Xin Meng, Yu-Mei Zhu, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Feng Mu, the Sixth People's Hospital, Shenyang 110006, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Ling-Xin Meng, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. meng_lingxin@hotmail.com

Received: 2008-03-30 Revised: 2008-05-22

Accepted: 2008-06-02 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To determine the effects of different intra-abdominal pressure of CO₂ pneumoperitoneum on gastrointestinal motility in rats.

METHODS: Eighteen rats were randomly assigned to three groups based on pneumoperitoneum pressure (0 mmHg group, 10 mmHg group, 15 mmHg group) and each group received 2 h pneumoperitoneum duration management. Small intestinal propulsion rate and gastric emptying rate under different pneumoperitoneum pressure were observed.

RESULTS: After 2 h pneumoperitoneum, compared with 0 mmHg group, gastric residual rate was significantly raised (78.15% ± 5.20% vs 69.68% ± 7.16%, $P < 0.05$) and small intestinal propulsion rate was markedly decreased in 10 mmHg group (37.08% ± 7.78% vs 46.68% ± 8.07%,

$P < 0.05$). Even more significant changes were observed in 15 mmHg group (84.75% ± 6.26%, 28.28% ± 6.43%, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Gastrointestinal motility is inhibited during pneumoperitoneum. Manifestations include enhanced gastric residual rate and decreased small intestinal propulsion rate.

Key Words: Pnenmoperitoneum; Gastrointestinal motility; Carbon dioxide

Meng LX, Mu F, Zhu YM. Effects of different intra-abdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum on gastrointestinal motility in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2158-2160

摘要

目的: 建立大鼠CO₂气腹模型, 观察不同CO₂气腹压力条件下, 气腹2 h大鼠胃肠动力指标。

方法: 将18只大鼠按不同气腹压力随机分3组: 0 mmHg组(正常腹压); 气腹压10 mmHg; 气腹压15 mmHg, 各组大鼠均接受2 h气腹, 观察不同气腹压力下胃排空率及小肠推进比的变化趋势。

结果: 气腹2 h时, 气腹压10 mmHg组比0 mmHg组胃残留率显著升高(78.15% ± 5.20% vs 69.68% ± 7.16%, $P < 0.05$)、小肠推进比显著下降(37.08% ± 7.78% vs 46.68% ± 8.07%, $P < 0.05$); 气腹压15 mmHg组各指标变化更为显著(84.75% ± 6.26%, 28.28% ± 6.43%, 均 $P < 0.01$)。

结论: CO₂气腹抑制胃肠运动。表现CO₂气腹使胃残留率增加、小肠推进比下降, 随着气腹压力的增高, 这种表现更加明显。

关键词: 气腹; 胃肠动力; 二氧化碳

孟凌新, 牟峰, 朱玉梅. 不同压力二氧化碳气腹对大鼠胃肠动力的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2158-2160
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2158.asp>

0 引言

腹腔镜手术术后常发生恶心呕吐(post operative

■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

nausea and vomiting, PONV), 其发生机制不十分清楚. 本研究观察了不同CO₂气腹压力对大鼠胃肠传输功能的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠18只(中国医科大学盛京医院实验动物中心提供), 体质量180-220 g. 随机分为3组, 每组6只: 气腹压0 mmHg I组; 气腹压力10 mmHg II组; 气腹压力15 mmHg III组, 在指定的压力下气腹2 h.

1.2 方法

1.2.1 大鼠CO₂气腹模型的制备: 实验前大鼠禁食24 h、禁水2 h, 动物称质量后, ip水合氯醛300 mg/kg麻醉, 动物固定于手术台, 加热灯照调节体温在37℃. 气管切开插管, 接小动物呼吸机(TKR200C型, 江西省特力麻醉呼吸设备公司)辅助呼吸, 调整潮气量1-2 mL/100 g, 呼吸频率30-40次/min. 腹部酒精消毒, 于脐上将气腹针插入腹腔内, 5 mL注射器外套管内装水, 接在气腹针上, 水自由落下, 证明在腹腔内, 然后接气腹机充入CO₂, 气腹机(德国Stroz公司、型号20 L)气体流量初始为0.1 L/min, 逐渐缓慢调整气体流量, 使气腹压力维持在预定值(气腹机显示压力值). 气腹结束时经气腹针排除气体.

1.2.2 大鼠胃肠动力指标的测定: 半固体糊制备^[1]: 羧甲基纤维素钠(中国医药集团上海化学试剂公司)2.5 g, 溶于72.5 mL蒸馏水中, 然后分别加入4 g奶粉、2 g糖、2 g淀粉, 每加1次搅拌均匀, 最后加入1 mL碳素墨水混成75 mL约75 g的半固体糊状物, 冰箱冷藏保存, 用前2 h取出, 恢复至室温. 气腹结束后ig半固体糊2 mL/只, 30 min后脱颈椎处死, 立即剖开腹腔取胃肠, 计算小肠推进比及胃内残留率. 结扎胃贲门和幽门, 从贲门处至回肠末端轻轻剥离胃肠, 将其自然拉直铺平, 分别测量从幽门至半固体糊前端及幽门至回盲部的小肠长度, 计算两者的百分比(小肠推进比). 取胃, 滤纸拭干后称质量, 沿胃大弯剪开胃体, 洗去胃内容物后拭干、称质量, 以胃全质量和胃净质量的差值为胃残留物质量, 计算胃内残留物占所灌半固体糊(约2.0 g)的质量百分比(胃内残留率)^[2-3].

统计学处理 应用SPSS V 10.0专业统计学软件进行数据处理, 数据mean±SD以表示, 组间比较采用t检验, P<0.05有统计学差异.

2 结果

不同压力的CO₂气腹对大鼠胃肠动力的影响, 气

表 1 CO₂气腹2 h后大鼠胃肠动力的变化 (mean ± SD, %)

分组	胃残留率	小肠推进比
I组	69.68 ± 7.16	46.68 ± 8.07
II组	78.15 ± 5.20 ^a	37.08 ± 7.78 ^a
III组	84.75 ± 6.26 ^b	28.28 ± 6.43 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs I组.

腹2 h后, II组胃残留率明显升高、小肠推进比下降, 与I组比较差异有统计学意义(P<0.05); III组胃残留率升高更为显著, 小肠推进比则进一步下降, 与I组比差异非常显著(P<0.01, 表1).

3 讨论

腹腔镜手术以其微创的特点被广泛应用, 随着手术适应证范围的拓宽, CO₂气腹对机体所产生的各种病理生理学改变受到众多学者的重视^[6]. 恶心呕吐是腹腔镜术后常见的并发症, 其可能与CO₂气腹的时间和气腹的压力有关. 本实验发现无论气腹压力是10 mmHg、15 mmHg 2 h均使胃残留率增加、小肠推进比下降, 其可能的原因(1)腹腔内压力增高可导致内脏血管收缩、静脉回流减少, 致使心脏的前负荷降低^[4-7]. 同时, 腹内压力机械性压迫胃肠道毛细血管床, 反射性引起血管血流阻力增高, 导致胃肠道血流灌注不足、胃肠道淤血水肿, 抑制了胃肠平滑肌活动. (2)由于腹膜吸收、CO₂弥散入血, 动脉血CO₂分压升高, 易形成高碳酸血症和酸中毒, 增加交感神经的兴奋性, 导致血管紧张素及儿茶酚胺等活性物质分泌增加; 激活的交感神经纤维不仅可通过抑制胃肠神经丛的兴奋神经元抑制胃肠动力, 还可以通过其释放的儿茶酚胺直接与胃肠平滑肌细胞膜上的α、β受体结合^[8], 抑制平滑肌细胞收缩. (3)随着气腹CO₂蓄积速度增加和持续时间的延长, 气腹对迷走神经末梢的刺激和牵拉作用也使得迷走神经张力改变, 刺激并激活迷走神经末梢的5-HT₃受体, 从而影响胃肠动力.

本实验随着气腹压力的升高, CO₂气腹对胃肠运动的抑制作用越明显, 这也可能是腹腔镜CO₂气腹术后PONV高发的原因之一. 因此, 腹腔镜手术麻醉过程中, 在保证手术操作的前提下, 尽量将气腹压力调至较低水平, 以减轻对胃肠道活动的影响.

4 参考文献

1 魏良洲, 杨林, 王利华, 张民生, 李新华, 田宇彬. 替加色罗对糖尿病大鼠胃排空功能及Ghrelin、P物质表

■**研发前沿**
腹腔镜手术术后常发生恶心呕吐(PONV), 其发生机制不十分清楚.

■同行评价

本文实验设计总体思路较好,具有临床指导意义.

- 达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2825-2830
- 2 Francis J, Critchley D, Dourish CT, Cooper SJ. Comparisons between the effects of 5-HT and DL-fenfluramine on food intake and gastric emptying in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 50: 581-585
- 3 吴春福, 陈多. 小鼠胃排空模型的探讨. 中国药理学通报 1997; 13: 271-2
- 4 Yokoyama Y, Alterman DM, Sarmadi AH, Baveja R, Zhang JX, Huynh T, Clemens MG. Hepatic vascular response to elevated intraperitoneal pressure in the rat. *J Surg Res* 2002; 105: 86-94
- 5 Gutt CN, Schmandra TC. Portal venous flow during CO(2) pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 1999; 13: 902-905
- 6 Schmandra TC, Kim ZG, Gutt CN. Effect of insufflation gas and intraabdominal pressure on portal venous flow during pneumoperitoneum in the rat. *Surg Endosc* 2001; 15: 405-408
- 7 Lindberg F, Bergqvist D, Björck M, Rasmussen I. Renal hemodynamics during carbon dioxide pneumoperitoneum: an experimental study in pigs. *Surg Endosc* 2003; 17: 480-484
- 8 Dunn D, Nair R, Fowler S, McCloy R. Laparoscopic cholecystectomy in England and Wales: results of an audit by the Royal College of Surgeons of England. *Ann R Coll Surg Engl* 1994; 76: 269-275

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008-11在上海市召开第二十次全国中西医结合消化系统疾病学术会议,并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)新技术新理论继续教育学习班.学习班招收对象:中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等.参加学习班者授予国家级1类继续教育学分;大会论文报告者另授继续教育学分6分.

1 征稿内容

消化内镜技术及其中西医结合临床应用;脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究;消化道肿瘤中西医结合诊疗;脾胃学说及其临床应用;其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编.稿件请附800字论文摘要,尽可能以电子信件的形式将稿件传送,截稿日期:2008-09-30.

3 联系方式

刘成海, 201203, 上海市浦东新区张衡路528号上海中医药大学附属曙光医院肝病所, 传真: 021-51324445或51328500, shxhhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com

HO-1 mRNA在砷暴露肝损伤小鼠肝组织中的表达

罗天永, 吴君, 张韵, 欧兵, 程明亮, 杨勤

罗天永, 吴君, 张韵, 欧兵, 程明亮, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004
杨勤, 贵阳医学院病理生理学教研室 贵州省贵阳市 550004
中国肝炎防治基金会“王宝恩肝纤维化研究基金”经费资助项目, No. 20070013
科技部国际科技合作与交流专项经费资助项目, No. 2005DFA30640(A类)
国家自然科学基金资助项目, No. 30471592
作者贡献分布: 罗天永与吴君对此文所作贡献均等; 此课题由罗天永, 吴君, 张韵, 欧兵, 程明亮及杨勤设计; 研究过程由罗天永, 吴君, 张韵及欧兵操作完成; 研究用试剂及分析工具由吴君与程明亮提供; 数据分析由张韵与欧兵完成; 杨勤对操作给予指导性支持; 本论文写作由罗天永, 吴君及张韵完成。
通讯作者: 吴君, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院感染科, wuwuj@21cn.com
电话: 0851-6855119
收稿日期: 2008-04-07 修回日期: 2008-05-31
接受日期: 2008-06-02 在线发表日期: 2008-07-08

Expression of HO-1 mRNA in hepatic tissues in arsenic exposed mice

Tian-Yong Luo, Jun Wu, Yun Zhang, Bing Ou, Ming-Liang Cheng, Qin Yang

Tian-Yong Luo, Jun Wu, Yun Zhang, Bing Ou, Ming-Liang Cheng, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Qin Yang, Research Unit of Pathophysiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Supported by: the “Wang Bao-En Liver Fibrosis Research Foundation” with Chinese Foundation for Hepatitis Prevention and Control, No. 20070013; the Special Fund for International Cooperation and Exchange, No. 2005DFA30640 (Type A); and National Natural Science Foundation of China, No. 30471592
Correspondence to: Jun Wu, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wuwuj@21cn.com
Received: 2008-04-07 Revised: 2008-05-31
Accepted: 2008-06-02 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To study the expression of Heme oxidase-1 (HO-1) mRNA and its significance in hepatic tissues in arsenic exposed mice.

METHODS: Forty male mice were randomly assigned to control group and sodium arsenite group (iAs³⁺ group). The iAs³⁺ group was given sodium arsenite per day. The mice were

sacrificed after 10 mo for liver function and pathologic examination. The RNA was extracted by the TRIzol-Phenol-Chloroform method from the other part of the liver tissues. Then, its density and purity was determined using ultraviolet spectrophotometric method. The expression of HO-1 mRNA was detected using real time fluorescence quantitative PCR, and the result was controlled with 18S gene.

RESULTS: The serum levels of ALT, AST and GLB in the iAs³⁺ group were higher than those of the control group (61.5 ± 5.5 U/L vs 38.0 ± 5.6 U/L, 530.9 ± 39.0 U/L vs 118.3 ± 9.1 U/L, 27.15 ± 4.1 g/L vs 20.9 ± 0.6 g/L, all *P* < 0.05). Pathologic examination indicated notable inflammatory cell invasion and liver cell necrosis involved in arsenic group. The mRNA expression of HO-1 increased in the iAs³⁺ group compared with the control group and a statistically significant difference was detected (*t* = 5.393, *P* < 0.05).

CONCLUSION: High expression of HO-1 induced by long-term exposure to sodium arsenite may lead to excessive stress response, thereby participate in liver injury and liver fibrosis.

Key Words: Arsenic exposed; Liver fibrosis; Heme oxidase-1

Luo TY, Wu J, Zhang Y, Ou B, Cheng ML, Yang Q. Expression of HO-1 mRNA in hepatic tissues in arsenic exposed mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2161-2165

摘要

目的: 探讨血红素氧化酶-1 mRNA(HO-1 mRNA)在砷暴露肝损伤小鼠肝组织中表达的意义。

方法: 40只♂小鼠被随机分成对照组和亚砷酸钠组(iAs³⁺组)。10 mo后处死小鼠, 肝功能检查血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、球蛋白(GLB); 部分肝组织作HE染色观察病理变化; TRIzol-酚-氯仿一步法提取肝组织总RNA, 紫外分光光度法测定总RNA及纯度, 实时荧光定量PCR法测定

背景资料

砷可引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌, 未完全阐明的发病机制已成为关注的热点。慢性砷暴露肝损伤肝纤维化动物模型的建立, 对肝损伤机制的理论解释极为重要。HO-1的研究在多病因肝损伤中具有保护作用, 慢性砷暴露所导致肝损伤时HO-1的表达研究甚少。

同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科

■研发前沿

尚未完全阐明的慢性砷中毒肝损伤发病机制的研究已成为重点,HO-1在慢性砷暴露肝损伤氧化应激过程中所发挥作用正在被认识中。

肝组织中HO-1 mRNA的表达,以18S基因作为质控。

结果: iAs³⁺组小鼠血清ALT、AST、GLB值高于对照组(61.5±5.5 U/L vs 38.0±5.6 U/L, 530.9±39.0 U/L vs 118.3±9.1 U/L, 27.15±4.1 g/L vs 20.9±0.6 g/L, 均P<0.05); 肝组织病理检查有明显的炎症细胞浸润和肝细胞坏死,纤维组织增生;小鼠肝组织HO-1 mRNA基因表达在iAs³⁺组增高,与对照组比较有统计学意义($t = 5.393, P < 0.05$)。

结论: 小鼠亚砷酸钠长期暴露诱导的HO-1高表达,可能参与了肝损伤肝纤维化发生机制。

关键词: 砷暴露; 肝损伤; 血红素氧化酶-1

罗天永, 吴君, 张韵, 欧兵, 程明亮, 杨勤. HO-1 mRNA在砷暴露肝损伤小鼠肝组织中的表达. 世界华人消化杂志. 2008; 16(19): 2161-2165

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2161.asp>

0 引言

砷是一种严重危害人类健康的环境毒物和已知的人类致癌物^[1-2]。砷中毒是一种地球化学性疾病^[3],慢性砷中毒以皮肤病变为主要累及机体诸多器官和组织,近年来动物实验和人群流行病学调查均表明砷进入机体后,主要蓄积于肝脏,他可引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌^[4-9],严重危害人体健康。尽管砷中毒导致的肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌的防治研究已逐渐成为目前国内外研究的热点,但仍缺乏长期、系统、多中心、大规模的人群流行病学研究及成熟的砷中毒肝损伤、尤其是慢性肝损伤肝纤维化动物模型,对其肝脏损伤机制亦尚无成熟完善的理论解释^[10]。血红素氧化酶(HO)是血红素降解的限速酶,其同工酶HO-1是诱导型血红素氧化酶,是一种应激反应蛋白,对于氧化应激十分敏感,能够被多种刺激或应激因素所诱导,如重金属、内毒素、细胞因子等,该诱导作用被认为是机体对各种氧化应激刺激的一种适应性保护反应^[11-12],目前对长期水砷暴露肝损伤与HO-1的关系研究甚少。本实验拟建立慢性水砷暴露小鼠肝脏损伤的动物模型,并探讨HO-1在慢性水砷暴露所导致肝损伤中表达的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 iAs³⁺(亚砷酸钠, NaAsO₂, iAs³⁺)(购自美

国Sigma公司; HO-1及18S引物、SYBR Green I 荧光染料、TRIzol试剂、随机引物(Oligo dT)、4种脱氧核苷(dNTPs)、RNA酶抑制剂(RNase Inhibitor)、MMLV逆转录酶、PCR引物(根据美国国立生物技术信息中心基因银行中鼠的HO-1、PCNA、18S cDNA序列进行设计)均由美国国立卫生研究院癌症/环境卫生研究所刘杰博士惠赠。紫外分光光度仪(Mastecycler gradient、德国Eppendorf公司), 5700荧光定量PCR仪(Applied Biosystems美国ABI公司), 核酸蛋白分析仪(Ultrospec 2100 pro、美国Amersham Biosciences公司), 台式冷冻离心机(5810R、德国Eppendorf公司), 全自动生化分析仪(AEROSET2000、美国Abbott公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: ♂昆明种小白鼠40只, 体质量20±3 g, 由贵阳医学院实验动物中心提供。将小鼠随机分成对照组和iAs³⁺组, $n = 20$ 。对照组饮用自来水, iAs³⁺组饮用NaAsO₂水(300 mg/L)。两组小鼠自由饮用, 食用普通饲料。在本次实验前, 我们采用iAs³⁺砷溶液150 mg/L以自由饮用的方式喂养小鼠, 17 wk后小鼠未出现死亡。根据该实验结果, 本研究砷溶液浓度调整为300 mg/L。造模10 mo后, 两组小鼠因自然因素和/或不能耐受实验而死亡, 但死亡只数不等。两组小鼠随机选用各10只, 采用眼球取血方式处死。取血清送生化科查肝功能; 肝组织100 mg, 迅速放入1 mL TRIzol试剂中, 立即提取肝组织总RNA; 余肝组织放100 g/L中性甲醛溶液中固定, 石蜡包埋、切片、HE染色。

1.2.2 血清肝功能生化指标检测: 血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、球蛋白(GLB)测定采用全自动生化分析仪。

1.2.3 实时荧光定量PCR检测: (1)引物: HO-1 GenBank Accession Number: M33203; 上游引物5'-CCTCACTGGCAGGAAATCATC-3', 下游引物5'-CCTCGTGGAGACGCTTTACATA-3'; 内参18S GenBank Accession Number: X56974; 上游引物5'-CGAACGTCTGCCCTATCAACTT-3', 下游引物5'-CCGGAATCGAACCCCTGATT-3'。(2)总RNA的提取: 取小鼠肝组织100 mg, 加入TRIzol试剂1 mL中, 用小玻璃研磨器捣匀肝组织, 用标准TRIzol-酚-氯仿一步法提取小鼠肝组织总RNA, 紫外分光光度法测定总RNA浓度及纯度。(3)逆转录酶合成cDNA: 经MMLV逆转录酶催化合成cDNA, 以此为模板在PCR扩增仪

■相关报道

苏丽琴 *et al*报道砷中毒发病率、严重程度与砷暴露时间及水砷含量等多种因素呈正相关; Santra *et al*给低浓度砷水造模15 mo见少许肝纤维化; 吴刚等报道HO-1能通过以急性应激反应为主的多环节发挥肝脏保护作用; Kitamuro *et al*报道, 组织细胞HIF-1与Bach-1的特异性可决定HO-1的表达, 并认为增高表达的HO-1可催化血红素分解出高浓度胆红素、CO和铁具有细胞毒性作用。在慢性砷暴露肝损伤中, HO-1对肝脏保护作用还是损伤作用有待进一步研究。

表 1 小鼠肝功能检测结果 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	GLB(g/L)
对照组	38.0 \pm 5.6	118.3 \pm 9.1	20.9 \pm 0.6
iAs ³⁺ 组	61.5 \pm 5.5 ^a	530.9 \pm 39.0 ^a	27.15 \pm 4.1 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

上完成PCR扩增. 逆转录反应体系100 μ L: 包括总RNA 1000 ng, 25 mmol/L MgCl₂ 22 μ L, 10 \times PCR Buffer II 10 μ L, 10 mmol/L dNTPs 20 μ L, 10 μ mol/L OligodT 5 μ L, 20 \times 10¹² U/L RNase Inhibitor 2 μ L, 50 \times 10¹² U/L MMLV逆转录酶 2.5 μ L, RNase-free-H₂O补充体积(18.5 μ L). 循环参数设置: 25 $^{\circ}$ C 10 min, 48 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存, 置-20 $^{\circ}$ C 备用. (4)实时荧光定量PCR(RT-PCR)扩增检测HO-1 mRNA的表达: PCR反应体系20 μ L, 包括逆转录产物4 μ L, 100 μ mol/L上、下游引物各0.5 μ L, 2 \times Buffer SYBR Green 10 μ L, RNase-free-H₂O 5 μ L. PCR扩增条件: 预变性94 $^{\circ}$ C 5 min, 然后执行如下反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性45 s, 退火55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸60 s, 共30个循环, 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min.

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, 各组间比较采用 t , 应用SPSS11.5统计学软件处理数据.

2 结果

2.1 小鼠肝功能 iAs³⁺组血清ALT、AST、GLB均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1).

2.2 肝组织病理 对照组小鼠肝脏病理见肝小叶结构完整, 无变性、坏死、炎性细胞浸润及纤维组织增生(图1A). iAs³⁺组见肝细胞水样变性, 脂肪样变性, 气球样变性, 肝细胞液化坏死, 炎性细胞浸润, 肝细胞再生, 汇管区纤维增生, 纤维条索形成(图1B).

2.3 HO-1 mRNA的测定结果 HO-1 mRNA的测定: 对照组为29.80 \pm 10.54, iAs³⁺组为236.19 \pm 84.55, 两组比较, iAs³⁺组HO-1 mRNA表达增高($t = 5.393$, $P < 0.05$).

3 讨论

有资料显示, 人群长期水砷暴露造成的砷中毒发病率、严重程度, 与砷暴露时间及水砷含量等多种因素呈正相关^[13-14]. 砷的慢性肝损伤模型报道较少, 曾有报道自由饮水的肝损伤动物模型, 给予的水砷浓度较低, 造模周期较长, 大多

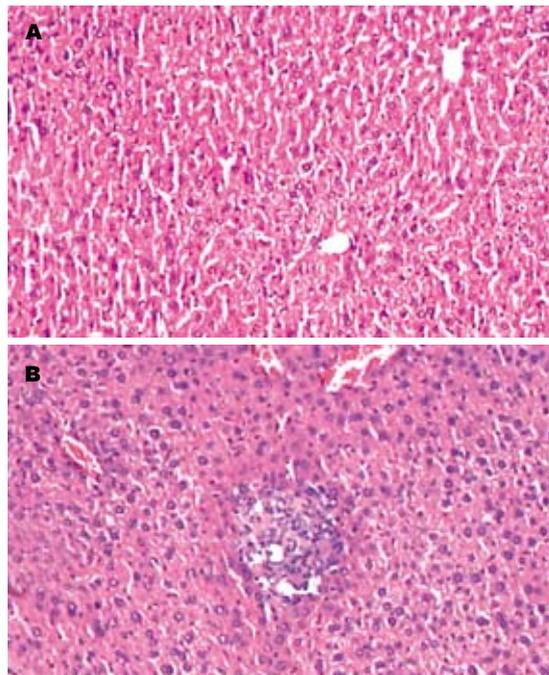


图 1 光镜下肝组织病理观(HE \times 40). A: 对照组肝小叶正常结构; B: iAs³⁺组肝组织病理结构.

在造模6 mo才出现轻度肝细胞损伤, 15 mo才可见少许肝纤维化^[15]. 本研究前预实验选用iAs³⁺溶液150 mg/L自由饮用的方式喂养小鼠, 17 wk小鼠未死亡. 因此, 结合给药方式、实验目的和小鼠耐受情况, 我们选定300 mg/L亚砷酸钠溶液作为本次实验的染毒溶液, 结果显示水砷暴露小鼠血清学检测: ALT、AST、GLB: iAs³⁺组较对照组均升高; 肝组织病理: iAs³⁺组肝细胞有变性, 坏死, 再生, 汇管区纤维增生, 纤维条索形成. 说明成功建立了亚砷酸钠慢性水砷暴露小鼠肝损伤动物模型.

国内外动物实验和人群流行病学调查均表明砷进入人体后, 主要在肝组织中蓄积, 通过甲基化过程、脂质过氧化、基因损伤、直接损伤肝细胞等多种途径引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌. 砷的毒理作用机制与其诱发活性氧自由基(ROS)的产生以及抑制抗氧化物的活力从而导致氧化损伤关系密切^[16-17].

HO-1是一种急性应激反应蛋白, 对机体有保护作用^[18-19]. 在肝缺血再灌注, 酒精性非酒精性脂肪性肝炎, 梗阻性黄疸等多种损伤因素所致的急性、亚急性肝损伤文献中, HO-1能以急性应激反应为主的多环节发挥肝脏保护作用^[20-26]. HO-1在砷对肝损伤方面的研究少有报道, 有动物实验研究显示, NaAsO₂是HO-1蛋白的强烈和特异性诱导剂, 能够诱导大鼠和小鼠

■ 创新点

本研究成功建立慢性砷暴露肝损伤肝纤维化模型, 并进一步探讨了HO-1在慢性砷中毒肝损伤氧化应激反应中可能的损伤机制.

■应用要点

HO-1在慢性砷暴露肝损伤肝纤维化发生机制的进一步阐明必将为防治提供重要的科学依据。

肝脏、肾脏HO-1高表达,与组织中的无机砷含量具有高度相关性^[27]。本实验显示,HO-1 mRNA在iAs³⁺组肝组织中表达明显升高,iAs³⁺暴露对肝细胞HO-1 mRNA的诱导很可能也表现为砷介导的一种特异性细胞应激反应。该应激反应在慢性砷暴露中的是否也是应激保护作用,有待进一步探索。在我们系列研究中发现,砷暴露肝损伤纤维化过程中促炎症因子TNF- α 、IL-6、COX-2和促肝纤维化因子Col-I、Col-III均有高表达,缺乏MT保护作用,GSH-Pi表达低下、GSH-Px无明显变化导致抗氧化系统失衡等^[28-31],与本实验中iAs³⁺组肝组织明显损伤,同时HO-1 mRNA也高表达的结果,用应激保护作用不好完美解释。该实验模型为长期暴露亚砷酸钠水所致慢性肝损伤动物模型,HO-1 mRNA呈持续高表达,在肝组织应激反应中可能发挥了损伤作用而非保护作用,有可能参与了砷致肝损伤、肝纤维化的发生机制。曾有文献报道,组织细胞HIF-1与Bach-1的特异性可决定HO-1的表达,并认为增高表达的HO-1可催化血红素分解出高浓度胆红素、CO和铁具有细胞毒性作用^[32-33];另有文献报道,慢性阻塞性肺病患者肺泡巨噬细胞中HO-1表达下降^[34]。抑制小鼠HO-1的高表达,可减少肺部反应铁和铁相关蛋白的生成,降低NAD-PH细胞色素P450还原酶的活性,使肺过氧化物酶的活性也有所下降,从而减轻氧化应激造成的肺损伤^[35]。

总之,砷暴露肝损伤纤维化过程中,早期HO-1的表达,作为急性应激反应可能发挥保护作用;慢性砷暴露后,砷介导特异性诱导的HO-1持续高表达,可能参与了肝损伤、肝纤维化的过程,成为其可能的机制之一,有待进一步研究。

4 参考文献

- Brown KG, Ross GL. Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American Council on Science and Health. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 36: 162-174
- 黄晓欣, 张爱华, 杨大平, 洪峰, 张碧霞, 罗鹏, 董学新, 郭渝成. 燃煤型砷中毒患者临床特征、多系统损害及其意义. *中国地方病学杂志* 2002; 21: 490-493
- 张爱君, 吴占河. 细胞凋亡与氟中毒. *中国地方病防治杂志* 2003; 18: 31-34
- 吴君. 砷对肝脏毒性的研究进展. *中国药物与临床* 2005; 5: 645-647
- 吴君, 陆彤, 程明亮. 汉丹肝乐胶囊对贵州地区20例砷暴露肝损伤患者的治疗作用. *中国地方病学杂志* 2006; 25: 86-89
- Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes MP. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 2000; 55: 460-467
- 黎平, 刘铭, 李达圣, 王述全. 燃煤污染型砷中毒临床症状体征分析. *中国地方病学杂志* 2000; 19: 139-141
- 吴君. 砷与肝损伤及发生机制. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2327
- 罗天永, 梁耀东, 吴君. 砷与肝损伤. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2328-2329
- 周晓倩, 何云, 吴君. 砷中毒所致氧化应激与肝脏损伤. *中国地方病防治杂志* 2007; 26: 114-116
- 李瑶, 王小明, 吴其夏. 缺氧与血红素氧化酶-1的表达. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 2005; 25: 238-241
- 宋靖. 血红素氧化酶-1在氧化应激状态下的作用. *中国航天医药杂志* 2003; 5: 77-78
- 靳翠红, 翟城, 戴国钧. 饮高砷水致地方性砷中毒的现状调查及其对人血清巯基含量的影响. *工业卫生与职业病* 2002; 28: 80-82
- 苏丽琴, 金银龙. 现场流行病学研究对慢性砷中毒判定的意义. *卫生研究* 2005; 34: 636-639
- Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty SK, Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- 熊传龙, 张秀丽, 蔡生花, 王菊, 党洪祥, 潘爱玉, 王虎. 高砷水对机体氧化与抗氧化能力的影响. *中国地方病学杂志* 2004; 23: 365-366
- 蒋玲, 陆爽, 吴君. 砷对肝脏的毒性及氧化损伤. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2334-2336
- 刘烈刚, 严红, 邹立君, 姚平, 章锡平, 宋方方, 郝丽萍, 杨雪锋. 诱导血红素氧化酶表达对乙醇所致人原代肝细胞氧化损伤的保护作用. *中国药理学与毒理学杂志* 2004; 18: 203-207
- 宋方方, 姚平, 周绍良, 李珂, 孙秀发, 刘烈刚. 银杏叶提取物预防大鼠酒精性肝损伤的机制研究. *营养学报* 2005; 27: 122-125
- 岳媛媛, 冯志杰, 王阳阳. 血红素氧合酶对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时钙离子-ATP酶及细胞间粘附因子-1的影响. *中华消化杂志* 2007; 27: 187-188
- 吴刚, 梁健, 成东华, 赵宁, 刘永锋. HSP-70和HO-1诱导对鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用. *中国医科大学学报* 2004; 33: 125-127
- 冯志杰, 陈湘萍. 血红素氧合酶对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. *中华医学会第七次全国消化病学术会议论文汇编(下册)* 2007: 844
- 黄庆科, 林菊生, 陈必成. 血红素加氧酶1对大鼠急性酒精性肝损害保护作用的实验研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 490-491
- 宋育林, 甘惠中, 胡乃中, 许建明, 潘敏. 非酒精性脂肪肝炎大鼠血红素加氧酶-1的表达与氧应激的关系. *肝脏* 2007; 12: 486-487
- 丁佑铭, 程邦昌, 戴峰, 谭海燕. 梗阻性黄疸鼠肝脏血红素氧化酶-1及一氧化碳含量的研究. *中华实验外科杂志* 2003; 12: 1081-1082
- 王阳阳, 冯志杰, 岳媛媛, 宋梅, 宋文杰. 血红素氧合酶对大鼠肝脏缺血在灌注损伤细胞凋亡及相关基因的影响. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 922-925
- Hirano S, Cui X, Li S, Kanno S, Kobayashi Y, Hayakawa T, Shraim A. Difference in uptake and toxicity of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in rat heart microvessel endothelial cells. *Arch Toxicol* 2003; 77: 305-312
- 张韵, 吴君, 李玲, 欧兵, 蒋玲, 李诚秀, 程明亮, 杨勤. 促炎症因子基因表达与长期水砷暴露小鼠肝损伤的关系. *中国地方病学杂志* 2008; 27: 15-18
- 欧兵, 吴君, 李玲, 张韵, 蒋玲, 李诚秀, 程明亮, 杨勤. 促肝纤维化因子在水砷暴露小鼠肝组织中表达. *中国*

- 公共卫生 2008; 24: 254-256
- 30 张韵, 吴君, 李玲, 欧兵, 蒋玲, 李诚秀, 程明亮, 杨勤. 金属硫蛋白基因在长期水砷暴露小鼠肝组织中的表达. 环境与健康杂志 2007; 24: 755-758
- 31 蒋玲, 李玲, 吴君, 欧兵, 张韵, 李诚秀, 程明亮, 杨勤. 氧化应激致慢性水砷暴露小鼠肝损伤作用. 中国公共卫生杂志 2008; 24: 593-595
- 32 Kitamuro T, Takahashi K, Ogawa K, Udono-Fujimori R, Takeda K, Furuyama K, Nakayama M, Sun JY, Fujita H, Hida W, Hattori T, Shirato K, Igarashi K, Shibahara S. Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 9125-9133
- 33 Udono-Fujimori R, Takahashi K, Takeda K, Furuyama K, Kaneko K, Takahashi S, Tamai M, Shibahara S. Expression of heme oxygenase-1 is repressed by interferon-gamma and induced by hypoxia in human retinal pigment epithelial cells. *Eur J Biochem* 2004; 271: 3076-3084
- 34 Maestrelli P, Paska C, Saetta M, Turato G, Nowicki Y, Monti S, Formichi B, Miniati M, Fabbri LM. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *Eur Respir J* 2003; 21: 971-976
- 35 Dennery PA, Visner G, Weng YH, Nguyen X, Lu F, Zander D, Yang G. Resistance to hyperoxia with heme oxygenase-1 disruption: role of iron. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 124-133

■同行评价
本研究设计合理, 得出了有参考价值的结论, 可读性能反映我国胃肠病学基础研究的先进水平。

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中华医学会第八次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2008-10-09/12在西安市召开第八次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下:

1 征文内容

与消化系统疾病有关的流行病学、基础及临床研究. 根据以下分类请在论文摘要右下角标明: 功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); 幽门螺杆菌及其相关疾病; 胰腺疾病; 肝胆疾病; 胃肠道肿瘤; 炎症性肠病; 胃肠激素; 消化疾病介入治疗; 青年委员会专场(全部用英文交流).

2 征文要求

(1)报送的论文要求800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者姓名、单位及邮编. 投青年会专场的论文必须附相应的英文摘要, 第一作者年龄须在45周岁以下(1963-11后出生). (2)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, 不予受理. (3)报送的论文要求电脑打印稿, 经所在单位审查盖章, 通过本次会议专用网站报送电子文稿及报名注册, 会议将不再接受书面投稿. (4)截稿日期: 2008-07-15(以当地邮戳为准), 文责自负. 会议网址: <http://www.csgd.org.cn>.

希望各省、自治区、直辖市医学会消化病学分会委员积极、认真组织所在地区的相关医生踊跃投稿并参会.

大鼠胰腺上皮内瘤变和胰腺癌模型血清蛋白质谱的差异表达

王磊, 刘海林, 廖萍, 王文静, 袁平

■背景资料

表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(SELDI-TOF MS)技术,是近年来引起广泛关注的一种新的蛋白质组学研究方法,具有大规模、超微量、高通量、全自动等其他方法所无法比拟的优越性,成为多种研究领域的技术热点。

王磊, 刘海林, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化内科 上海市 200011

廖萍, 王文静, 上海市疾病预防控制中心公共卫生分子生物研究室 上海市 200336

袁平, 上海交通大学医学院附属瑞金医院病理科 上海市 200025

上海市科委登山计划资助项目, No. 06JC14047

作者贡献分布: 此课题由王磊与刘海林设计; 动物模型制作和蛋白芯片检测分析由王磊, 廖萍及王文静操作完成; 病理分析由袁平完成; 论文写作由王磊与刘海林完成。

通讯作者: 刘海林, 200011, 上海市, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化内科. liuhailin@medmail.com.cn

电话: 021-63138341-5134

收稿日期: 2008-03-24 修回日期: 2008-04-20

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-07-08

Differential expression of serum proteomic spectra in rat model of pancreatic intraepithelial neoplasia and dimethylbenzanthracene-induced pancreatic carcinoma

Lei Wang, Hai-Lin Liu, Ping Liao, Wen-Jing Wang, Ping Yuan

Lei Wang, Hai-Lin Liu, Department of Gastroenterology, the Ninth People's Hospital Affiliated to the School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China

Ping Liao, Wen-Jing Wang, Department of Molecular Biology for Public Health, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China

Ping Yuan, Department of Pathology, Ruijin Hospital Affiliated to the School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Supported by: the Mountaineering Program of Shanghai Science and Technology Commission, No. 06JC14047

Correspondence to: Hai-Lin Liu, Department of Gastroenterology, the Ninth People's Hospital Affiliated to the School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China. liuhailin@medmail.com.cn

Received: 2008-03-24 Revised: 2008-04-20

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate relationship between differential expression of serum proteomic spectra in rat model of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and dimethylbenzanthracene-induced pancreatic carcinoma (PC) using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF

MS) technology.

METHODS: Forty male SD rats were implanted with DMBA into the pancreas to induce rat model of PanIN and PC. Histopathology was evaluated according to PanIN classification system. And normal control group of twenty-six male SD rats was established. The serum protein spectra were detected using IMAC-Cu²⁺ proteinchip and SELDI-TOF MS. The data were analyzed using Biomarker Wizard 3.0 Software of Ciphergen Biosystem Co.

RESULTS: DMBA was implanted into pancreas of rats in PC group ($n = 11$) and PanIN group ($n = 18$). Compared with the normal control group, there were significant differences ($P < 0.001$) of 30 protein peaks in PanIN and PC of which 19 protein peaks were up-regulated and 11 down-regulated. The expression of 9 protein peaks, with a ratio of mass to charge (M/Z) of 5835.2, 4087.3, 4786.5, 4800.5, 3932.2, 5765.9, 5924.8, 5001.9, 3913.7 gradually increased from normal to PanIN and PC group, and 4 protein peaks with a M/Z ratio of 1096.9, 1478.9, 8572.9, 1007.1 gradually decreased.

CONCLUSION: Serum proteomic spectra were differentially expressed in rat model of PanIN and PC. Identification and function of these differentially expressed proteins necessitate further investigation.

Key Words: Pancreatic intraepithelial neoplasia; Pancreatic carcinoma; 7, 12-dimethyl-1, 2-benzanthracene; Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry technology

Wang L, Liu HL, Liao P, Wang WJ, Yuan P. Differential expression of serum proteomic spectra in rat model of pancreatic intraepithelial neoplasia and dimethylbenzanthracene-induced pancreatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2166-2170

摘要

目的: 利用表面增强激光解析离子化飞行时间质谱(SELDI-TOF MS)技术,分析由7, 12-二甲基苯并蒽(DMBA)诱导建立的大鼠胰腺上

■同行评议者

殷正丰, 教授, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

皮内瘤变(PanIN)和胰腺癌(PC)模型血清蛋白质谱的差异表达。

方法: 40只♂清洁级SD大鼠为模型组, DMBA胰腺局部种植建立PanIN和PC模型, 根据PanIN标准进行病理学分级. 26只♂清洁级SD大鼠为正常对照组. 采用SELDI-TOF MS和铜离子螯合芯片(IMAC-Cu²⁺芯片)检测大鼠血清蛋白质谱, Biomarker Wizard 3.0软件分析比较对照组、PanIN组和PC组之间的差异表达蛋白。

结果: DMBA胰腺局部种植后共获得PC 11例, PanIN 18例. 与对照组比较, PanIN组和PC组表达强度显著上调($P<0.001$)的蛋白质峰有19个, 显著下调($P<0.001$)的蛋白质峰有11个; 其中质荷比分别为5835.2、4087.3、4786.5、4800.5、3932.2、5765.9、5924.8、5001.9、3913.7的9个蛋白质峰表达强度在对照组、PanIN组和PC组呈逐级递增趋势, 质荷比分别为1096.9、1478.9、8572.9、1007.1的4个蛋白质峰表达强度呈逐级递减趋势。

结论: 与正常大鼠比较, PanIN和PC模型大鼠血清蛋白质谱表达发生显著变化, 这些差异表达蛋白在胰腺癌中的作用值得进一步深入研究。

关键词: 胰腺上皮内瘤变; 胰腺癌; 7, 12-二甲苯并蒽; 表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术

王磊, 刘海林, 廖萍, 王文静, 袁平. 大鼠胰腺上皮内瘤变和胰腺癌模型血清蛋白质谱的差异表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2166-2170
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2166.asp>

0 引言

近年来, 胰腺癌的发病率呈明显升高趋势, 且其5年生存率不足4%, 是目前预后最差的恶性肿瘤^[1-2]. 由于胰腺癌起病隐匿, 缺乏特异性临床表现, 因此早期诊断困难, 确诊时大多已处于晚期. 寻找有效的早期诊断方法被认为是提高胰腺癌诊治水平的重要出路之一. 80%-90%的胰腺癌为起源于胰腺导管上皮的胰腺导管腺癌, 胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)为胰腺导管腺癌的癌前病变^[3-4]. 前期研究利用7, 12-二甲苯并蒽(7, 12-dimethyl-1, 2-benzanthracene, DMBA)成功建立了大鼠PanIN和胰腺导管腺癌化学诱癌模型, 该模型与人胰腺癌的病理生物学特性相近, 可以模拟

由正常胰腺逐级癌变的过程^[5-8]. 表面增强激光解析离子化飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF MS)技术, 是近年来发展起来一种新的蛋白质组学研究方法, 具有大规模、超微量、高通量、全自动等方面的特点^[9-13]. 本研究拟利用SELDI-TOF MS技术, 对大鼠PanIN、胰腺癌模型与正常大鼠外周血清蛋白质谱进行比较分析, 探讨DMBA诱导的胰腺癌形成过程中外周血清蛋白质差异表达的动态变化情况。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级♂SD大鼠66只, 体质量100-110 g, 购自中科院上海实验动物中心, 生产许可证号为SCXK(沪)2003-0003, 使用许可证号为SYXK(沪)2007-0007, 在标准饲养条件下进行饲养. DMBA颗粒购于Sigma公司. SELDI-TOF MS仪(PBS II -C型)和铜离子螯合芯片(IMAC-Cu²⁺芯片)为美国CIPHERGEN公司产品. 主要试剂乙腈(ACN)、三氟乙酸(TFA)、白芥子酸(SPA)、醋酸钠(NaAC)等均购自Sigma公司。

1.2 方法 模型组大鼠40只采用DMBA胰腺局部包埋种植的方法建立PanIN和胰腺癌化学诱癌模型^[14], 分别在手术后1 mo(模型1组, $n = 20$)和2 mo(模型2组, $n = 20$)处死, 取胰腺组织由专业胰腺病理医师单盲进行病理学分级鉴定, 正常对照大鼠26只与模型2组同时处死. 所有大鼠处死前于下腔静脉采集全血3-4 mL, 3000 r/min离心5 min, 取上清再次3000 r/min离心5 min, 取30 μ L血清分装在0.5 mL离心管中, 于-80℃冰箱保存, 使用时取出分装的血清样品, 于冰上融化。

IMAC-Cu²⁺芯片活化用100 mmol/L的CuSO₄溶液10 μ L/孔10 min, 去离子水冲洗3次, 共计2次; 50 mmol/L的NaAC溶液(pH4.0)10 μ L/孔2-3 min, 去离子水冲洗3次. 芯片平衡用500 mmol/L的NaCl磷酸盐缓冲液(PBS)溶液(pH7.2), 200 μ L/孔震荡5 min, 共计2次. 取12 μ L血清样品, 用500 mmol/L NaCl的PBS溶液(pH7.2)1:20稀释. 取200 μ L/孔上样, 常温孵育1.5 h. 500 mmol/L NaCl的PBS溶液(pH7.2)200 μ L/孔震荡洗脱2次, 每次5 min; 去离子水300 μ L/孔冲洗1次. 滴加SPA饱和溶液(100% ACN+1% TFA等体积混合溶解)0.5 μ L/孔, 共计2次. 将芯片置入SELDI-TOF MS仪(PBS II -C型)进行阅读, 设定激光强度为190, 敏感度为8, 通过CIPHERGEN proteinchip software

■研发前沿
寻找灵敏度高、特异性好的早期诊断标志物是解决胰腺癌早期诊断困难的关键出路之一, 蛋白质组学的发展进一步拓展了此方面的研究空间, SELDI-TOF MS技术作为一种新兴技术成为新的研究热点。

■创新亮点

本研究利用 SELDI-TOF MS 技术分析胰腺癌前病变和早期胰腺癌动物模型的血清蛋白质谱表达, 可以动态观察正常胰腺逐级癌变时蛋白质的差异表达情况。

表 1 表达强度随胰腺癌变程度逐级递增的蛋白质峰 (mean ± SD)

质荷比	对照组	PanIN组	PC组	P值
5835.2	1.8 ± 0.8	5.1 ± 2.5	6.2 ± 3.3	2.4 × 10 ⁻⁸
4087.3	1.2 ± 0.8	4.7 ± 2.7	5.1 ± 2.8	1.7 × 10 ⁻⁷
4786.5	3.8 ± 3.1	21.7 ± 11.7	24.4 ± 14.8	2.8 × 10 ⁻⁷
4800.5	1.7 ± 1.2	10.6 ± 6.8	13.4 ± 8.5	4.2 × 10 ⁻⁷
3932.2	1.0 ± 0.8	5.7 ± 3.8	6.3 ± 4.2	2.1 × 10 ⁻⁶
5765.9	1.8 ± 1.8	5.1 ± 2.6	6.2 ± 3.3	2.6 × 10 ⁻⁶
5924.8	1.2 ± 0.7	2.5 ± 1.0	2.7 ± 1.0	7.1 × 10 ⁻⁶
5001.9	1.7 ± 0.7	2.8 ± 0.9	2.9 ± 1.1	5.0 × 10 ⁻⁵
3913.7	1.3 ± 0.9	3.1 ± 2.5	3.4 ± 1.8	3.9 × 10 ⁻⁴

表 2 表达强度随胰腺癌变程度逐级递减的蛋白质峰 (mean ± SD)

质荷比	对照组	PanIN组	PC组	P值
1096.9	8.4 ± 4.7	3.2 ± 1.8	2.9 ± 2.4	8.4 × 10 ⁻⁶
1478.9	3.8 ± 2.7	1.3 ± 2.2	0.7 ± 0.7	2.3 × 10 ⁻⁵
8572.9	4.5 ± 2.6	2.0 ± 1.5	1.5 ± 1.2	1.2 × 10 ⁻⁴
1007.1	6.6 ± 4.9	2.9 ± 2.5	2.2 ± 1.3	9.8 × 10 ⁻⁴

3.11版本分析软件采集数据. 优化分子量范围为1-20 kDa, 并进行蛋白质峰标准化校准, 设立有效蛋白质峰的最低信噪比为5, 最低出现频率阈值为10%.

统计学处理 采用Biomarker Wizard 3.0软件对数据进行处理, 共设立对照组、PanIN组和PC组三组, 同一质荷比(M/Z)蛋白质峰平均值进行3组间方差分析, $P < 0.001$ 为统计学有显著性。

2 结果

2.1 病理组织学 模型组大鼠在胰腺DMBA植入部位形成直径0.3-0.6 cm的球形包块, 镜下可见胰腺组织中均有明显的炎性细胞浸润和广泛的间质结缔组织增生, 胰腺导管上皮不同程度增生, 部分异形增生突破基底膜. 经病理分级证实共形成PanIN 18例, PC 11例, 其中PanIN-1级4例, PanIN-2级5例, PanIN-3级9例。

2.2 外周血清蛋白质谱检测和分析 正常对照组($n = 26$)、PanIN组($n = 18$)和PC组($n = 11$)大鼠外周血清经SELDI-TOF MS仪检测后, 在分子量1-20 kDa范围内, 共检测出有效蛋白质峰131个. 以 $P < 0.001$ 为具有显著差异, 三组之间表达强度具有显著差异的蛋白质峰共有30个. 与对照组比较, PanIN组和PC组表达强度显著上调的蛋白质峰有19个, 显著下调的蛋白质峰有11个; 其中对照组、PanIN组和PC组表达强度呈逐级递增趋势的蛋白质峰9个, 蛋白质质荷比分别为5835.2、4087.3、4786.5、4800.5、3932.2、5765.9、5924.8、5001.9、3913.7(表1), 表达强度呈逐级递减趋势的蛋白质峰有4个, 蛋白质质荷比分别为1096.9、1478.9、8572.9、1007.1(表2)。

3 讨论

胰腺癌起病隐匿, 确诊时大多已处于晚期, 建立

有效的早期诊断方法成为胰腺癌研究的热点, 但长期以来这一问题始终没有得到有效解决, 特别是缺乏无创性、灵敏性特异性较高的肿瘤标志物. 近年来随着蛋白质组学的兴起, 研究者利用这一新的研究方法, 试图寻找能够早期诊断胰腺癌的肿瘤标志物。

与传统的以双向凝胶电泳(2D-PAGE)结合质谱为代表的蛋白质组学技术方法相比, SELDI-TOF MS技术对待测标本要求低, 标本需要量小, 可以直接检测微量的血清^[15-16]、尿液^[17-19]、组织液^[20]等, 检测过程相对简便, 具有临床检测所要求的大规模、自动化等方面的优点. Koopmann *et al*^[21]利用此技术分析胰腺癌患者、其他胰腺疾病(胰腺炎、壶腹腺癌等)和健康对照组的血清样品, 获得了特异性蛋白质: PC-A、PC-B和CA19-9. 国内研究者使用SELDI蛋白芯片检测了胰腺癌患者的血清蛋白质谱, 从中选择了6种标志物建立了一种胰腺癌鉴别体系, 并证明其灵敏度达到80%, 特异度达到84.6%^[22]. Rosty *et al*^[20]用SELDI蛋白芯片技术对胰腺癌和其他胰腺疾病患者的胰液进行比较研究, 发现67%胰腺癌患者胰液样品中有分子质量为16 570的蛋白表达, 并确定这种蛋白为HIP/PAP- I. 也有研究者利用SELDI-TOF MS技术对胰腺癌组织标本进行胰腺癌相对特异性蛋白质的筛选, 结果表明有13种蛋白质峰在胰腺癌和癌旁组织表达显著差异, 8种在胰腺癌和胰腺良性疾病表达显著差异, 12种在胰腺癌和正常组织表达显著差异^[23]。

目前已经明确胰腺癌的发生也是一个多阶段发展的过程, PanIN为胰腺导管腺癌的癌前病变, 经进一步发展可形成胰腺导管腺癌^[3-4]. 即往研究的局限性在于所使用的临床标本多为晚期胰腺癌, 而缺乏PanIN及早期胰腺癌的病例标本. 如果能够借助动物模型动态观察PanIN和早期胰腺癌的蛋白质谱, 将可以更好的揭示胰腺癌发生早期的蛋白质谱表达变化规律. 既往研究证明DMBA胰腺局部种植诱导的方法可以建立

大鼠PanIN和早期胰腺癌模型, 弥补了临床标本多为晚期胰腺癌的研究局限. 所诱导的胰腺癌表达细胞角蛋白19、20等导管细胞标志物, 而不表达腺泡细胞标志物糜蛋白酶, 表明DMBA诱导的胰腺癌为导管起源^[7]. 此外该模型具有较高的*K-ras*基因突变发生率, 并且不诱导其他脏器肿瘤. 我们在前期研究中采用DMBA 10 mg/100 g体质量的剂量诱导可得到效率较高、级别丰富的PanIN和胰腺癌大鼠模型, 能够较好地反映早期胰腺癌发生发展的动态变化过程^[14].

在本研究中, 我们利用SELDI-TOF MS技术, 采用铜离子螯合芯片(IMAC-Cu²⁺芯片)对正常大鼠、PanIN大鼠和PC大鼠模型的外周血清蛋白质谱进行比较分析, 结果发现DMBA诱导后的早期胰腺癌模型血清蛋白质谱表达发生明显改变. 与对照组比较, PanIN组和PC组表达强度显著上调的蛋白质峰有19个, 显著下调的蛋白质峰有11个; 其中质荷比分别为5835.2、4087.3、4786.5、4800.5、3932.2、5765.9、5924.8、5001.9、3913.7的9种蛋白质表达强度随癌变程度呈逐级递增趋势, 质荷比分别为1096.9、1478.9、8572.9、1007.1的4种蛋白质表达强度随癌变程度呈逐级递减趋势. 因此推断这些差异蛋白质可能与早期胰腺癌发生的病理生理学机制紧密相关. 但是本研究尚未对这些差异蛋白质峰进行鉴定, 目前还不能明确其确切的性质和功能, 此外利用早期胰腺癌模型所筛选出的差异蛋白质峰与人胰腺癌是否密切相关, 他们在早期胰腺癌诊断中的作用如何, 这些问题均需要在后续实验中进一步深入研究.

4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-130
- 郭晓钟. 重视我国胰腺癌的研究现状及发展趋势. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3161-3162
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 579-586
- Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Shimizu M, Yonezawa S. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 977-987
- Rivera JA, Graeme-Cook F, Werner J, Z'graggen K, Rustgi AK, Rattner DW, Warshaw AL, Fernández-del Castillo C. A rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma: targeting chemical carcinogens. *Surgery* 1997; 122: 82-90
- Z'graggen K, Warshaw AL, Werner J, Graeme-Cook F, Jimenez RE, Fernández-Del Castillo C. Promoting effect of a high-fat/high-protein diet in DMBA-induced ductal pancreatic cancer in rats. *Ann Surg* 2001; 233: 688-695
- Jimenez RE, Z'graggen K, Hartwig W, Graeme-Cook F, Warshaw AL, Fernández-del Castillo C. Immunohistochemical characterization of pancreatic tumors induced by dimethylbenzanthracene in rats. *Am J Pathol* 1999; 154: 1223-1229
- Osvaldt AB, Wendt LR, Bersch VP, Backes AN, de Cássia A Schumacher R, Edelweiss MI, Rohde L. Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. *Surgery* 2006; 140: 803-809
- Jr GW, Cazares LH, Leung SM, Nasim S, Adam BL, Yip TT, Schellhammer PF, Gong L, Vlahou A. Proteinchip(R) surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1999; 2: 264-276
- Paweletz CP, Trock B, Pennanen M, Tsangaris T, Magnan C, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. *Dis Markers* 2001; 17: 301-307
- Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinis S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright Jr GL Jr. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001; 158: 1491-1502
- Henderson NA, Steele RJ. SELDI-TOF proteomic analysis and cancer detection. *Surgeon* 2005; 3: 383-390, 422
- 王磊, 刘海林. SELDI-TOF MS技术在胰腺癌早期诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2679-2683
- 王磊, 刘海林, 袁平, 徐林芳. DMBA诱导建立大鼠胰腺上皮内瘤变和胰腺癌模型. 上海交通大学学报(医学版) 2008; 28: 145-147
- Drake RR, Cazare LH, Semmes OJ, Wadsworth JT. Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 93-100
- Purohit S, Podolsky R, Schatz D, Muir A, Hopkins D, Huang YH, She JX. Assessing the utility of SELDI-TOF and model averaging for serum proteomic biomarker discovery. *Proteomics* 2006; 6: 6405-6415
- Roelofsen H, Alvarez-Llamas G, Schepers M, Landman K, Vonk RJ. Proteomics profiling of urine with surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Proteome Sci* 2007; 5: 2
- Traum AZ, Wells MP, Aivado M, Libermann TA, Ramoni MF, Schachter AD. SELDI-TOF MS of quadruplicate urine and serum samples to evaluate changes related to storage conditions. *Proteomics* 2006; 6: 1676-1680
- Schaub S, Wilkins J, Weiler T, Sangster K, Rush D,

■应用要点
SELDI-TOF MS技术本身的特点为研究成果向临床应用的转化奠定了基础, 具有广阔的应用前景.

■同行评价

本文采用SELDI-TOF MS先进技术对大鼠胰腺癌相关模型的外周血清蛋白质谱进行比较分析,研究目的和实验设计值得肯定,但全文提供的信息量较少。

- Nickerson P. Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Kidney Int* 2004; 65: 323-332
- 20 Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemo K, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002; 62: 1868-1875
- 21 Koopmann J, Zhang Z, White N, Rosenzweig J, Fedarko N, Jagannath S, Canto MI, Yeo CJ, Chan DW, Goggins M. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 860-868
- 22 Yu Y, Chen S, Wang LS, Chen WL, Guo WJ, Yan H, Zhang WH, Peng CH, Zhang SD, Li HW, Chen GQ. Prediction of pancreatic cancer by serum biomarkers using surface-enhanced laser desorption/ionization-based decision tree classification. *Oncology* 2005; 68: 79-86
- 23 Scarlett CJ, Smith RC, Saxby A, Nielsen A, Samra JS, Wilson SR, Baxter RC. Proteomic classification of pancreatic adenocarcinoma tissue using protein chip technology. *Gastroenterology* 2006; 130: 1670-1678

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*)》,是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志,旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章,使其成为一种公众资源,同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文,了解其领域的所有的关键的进展,更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务,为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外,《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾,即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲,包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤,食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学,以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章,为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究者提供转换平台,更新知识,为患者康复服务。(常务副总编辑:张海宁 2008-07-08)

卡巴胆碱对烫伤大鼠口服补液时小肠TNF- α 及水通道蛋白-1的影响

包呈梅, 胡森, 耿世佳, 吴静, 车晋伟, 田易军, 陆江阳, 武彦, 盛志勇

包呈梅, 胡森, 耿世佳, 吴静, 车晋伟, 田易军, 盛志勇, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所北京市100037
陆江阳, 中国人民解放军总医院第一附属医院病理科北京市100037

武彦, 内蒙古医学院第一附属医院病理科 内蒙古自治区呼和浩特市010059

军队十一五专项课题资助项目, No. 06Z055

作者贡献分布: 此课题由胡森, 车晋伟, 耿世佳及吴静设计; 研究过程由车晋伟, 耿世佳, 吴静, 包呈梅及田易军操作完成; 研究所用试剂及分析工具由胡森提供; 免疫组化由武彦及陆江阳提供技术支持; 数据分析由包呈梅完成; 本论文写作由包呈梅, 胡森及盛志勇完成。

通讯作者: 胡森, 100037, 北京市阜成路51号, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室. hs304@yahoo.com.cn

电话: 010-66867397 传真: 010-68989391

收稿日期: 2008-03-07 修回日期: 2008-04-16

接受日期: 2008-04-21 在线出版日期: 2008-07-08

Effect of carbachol on expression of TNF- α and aquaporin-1 in small intestine during enteral resuscitation of scald injury in rats

Cheng-Mei Bao, Sen Hu, Shi-Jia Geng, Jing Wu, Jin-Wei Che, Yi-Jun Tian, Jiang-Yang Lu, Yan Wu, Zhi-Yong Sheng

Cheng-Mei Bao, Sen Hu, Shi-Jia Geng, Jing Wu, Jin-Wei Che, Yi-Jun Tian, Zhi-Yong Sheng, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

Jiang-Yang Lu, Department of Pathology, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

Yan Wu, Department of Pathology, the First Hospital Affiliated to the Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Supported by: the Special Foundation of the 11th Five-year Plan for Military Medical Project, No. 06Z055

Correspondence to: Sen Hu, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, 51 Fucheng Road, Beijing 100037, China. hs304@yahoo.com.cn

Received: 2008-03-07 Revised: 2008-04-16

Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of carbachol (a cholinergic agent) on expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and aquaporin-1 (AQP-1) water channels in small intestine of

scalded rats.

METHODS: Wistar rats were randomly assigned to five groups: shame scald (N), scald without fluid resuscitation (S), scald resuscitated with enteral GES alone (GES), scald resuscitated with enteral carbachol alone (CAR) and scald resuscitated with enteral carbachol plus GES (GES/CAR) ($n = 10$). About 35% TBSA of scald injury was formed with boiling water on back of rats in all groups except the shame scald group. N, GES and GES/CAR groups were enterally administered 30 min after scald injury. The specimens of jejunum of all groups were harvested and analyzed. AQP-1 expression in intestines was evaluated using immunohistochemical method, TNF- α was measured using ELISA and the liquid absorption rate was determined using phenol red.

RESULTS: Compared with the shame scald group, AQP-1 expression in small intestine was significantly decreased in scalded animals (90.3 ± 18.4 vs 4851.6 ± 654.5 , $P < 0.01$), but significantly increased in CAR, GES and GES/CAR groups (1806.1 ± 110.1 , 2272.3 ± 113.8 , 3322.0 ± 595.9 vs 90.3 ± 18.4 , all $P < 0.01$). TNF- α level in intestinal tissues of GES/CAR and CAR groups were markedly suppressed compared with those in S and GES groups (0.9 ± 0.3 , 1.0 ± 0.47 vs 1.8 ± 0.3 , 1.9 ± 0.2 , $P < 0.05$). TNF- α expression level was negatively correlated with AQP-1 of small intestine in GES/CAR, CAR and S groups ($r = -0.9030$, -0.9602 , -0.9866 , all $P < 0.05$). Liquid absorption rate of small intestine in GES/CAR group was significantly increased compared with GES group ($21.0\% \pm 0.1\%$ vs $12.7\% \pm 0.1\%$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Carbachol have significant effects on improving the liquid absorption by inhibiting TNF- α and up-regulating AQP-1 expression in small intestine.

Key Words: Burns; Carbachol; Aquaporin-1; Tumor necrosis factor- α

■背景资料

AQP-1在消化系统分布广泛,是介导胃肠道水分子跨膜转运的重要物质.烧伤休克时肠缺血缺氧、肠动力下降、肠道对水吸收障碍,影响口服补液的复苏效果.因此在烧伤休克口服补液时减少炎症反应抑制炎症因子,改善AQP-1的表达,增加肠道水吸收,将有助于提高口服补液效果.卡巴胆碱是一种胆碱能受体激动剂,可促进胃肠动力、扩张血管、减轻炎症,对减轻烧伤休克时炎症反应抑制炎症因子,改善AQP-1的表达,增加肠道水吸收有重要意义,是值得关注的能提高烧伤休克口服补液疗效的一种药物.

■同行评议者

吴志勇,教授,上海交通大学医学院附属仁济医院普外科

■ 研发前沿

水通道蛋白是跨膜水转运的重要通道,是近几年的研究热点.

Bao CM, Hu S, Geng SJ, Wu J, Che JW, Tian YJ, Lu JY, Wu Y, Sheng ZY. Effect of carbachol on expression of TNF- α and aquaporin-1 in small intestine during enteral resuscitation of scald injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2171-2174

摘要

目的: 研究拟胆碱药卡巴胆碱对烫伤大鼠口服补液时小肠TNF- α 及水通道蛋白-1(AQP-1)表达的影响.

方法: δ Wistar大鼠50只,随机分为假烫(N)、单纯烫伤(S)、肠内葡萄糖-电解质液(GES)、肠内卡巴胆碱组(CAR)和肠内葡萄糖-电解质液+卡巴胆碱组(GES/CAR)5组($n = 10$).大鼠背部用沸水造成35% TBSA烫伤. N, GES和GES/CAR组于伤后30 min开始补液.免疫组化法测定肠组织AQP-1的表达, ELISA法检测肠组织TNF- α 含量,酚红法测定大鼠小肠对水的吸收率.

结果: S组大鼠小肠AQP-1与N组比明显降低(90.3 ± 18.4 vs 4851.6 ± 654.5 , $P < 0.01$); CAR, GES和GES/CAR组AQP-1与S组相比均显著增加(1806.1 ± 110.1 , 2272.3 ± 113.8 , 3322.0 ± 595.9 vs 90.3 ± 18.4 , 均 $P < 0.01$).给予卡巴胆碱组(CAR, GES/CAR)与未给予卡巴胆碱组(S, GES)相比肠组织TNF- α 含量明显下降(0.9 ± 0.3 , 1.0 ± 0.47 vs 1.8 ± 0.3 , 1.9 ± 0.2 , $P < 0.05$).GES/CAR, CAR及S组AQP-1表达量与TNF- α 含量成负相关($r = -0.9030$, -0.9602 , -0.9866 , 均 $P < 0.05$).GES/CAR组水吸收率较GES组明显升高($21.0\% \pm 0.1\%$ vs $12.7\% \pm 0.1\%$, $P < 0.05$).

结论: 卡巴胆碱可抑制促炎因子TNF- α 的释放,上调小肠AQP-1表达,改善大鼠烫伤早期肠道对水的吸收.

关键词: 烫伤; 卡巴胆碱; 水通道蛋白-1; 肿瘤坏死因子- α

包呈梅, 胡森, 耿世佳, 吴静, 车晋伟, 田易军, 陆江阳, 武彦, 盛志勇. 卡巴胆碱对烫伤大鼠口服补液时小肠TNF- α 及水通道蛋白-1的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2171-2174
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2171.asp>

0 引言

水通道蛋白对水有高度选择性,是跨膜水转运的重要通道,其中水通道蛋白-1(AQP-1)在消化系分布广泛,是介导胃肠道水分子跨膜转运的重要物质^[1-2].烧伤休克时肠道处于严重缺血缺氧及炎症状态、肠动力下降、肠道水吸收障碍,

严重影响着补液的复苏效果^[3].我们假设如果在烧伤肠内补液中加入能减少炎症反应抑制炎症因子,改善AQP-1的表达,增加水吸收的药物,将有助于提高补液效果.卡巴胆碱是一种胆碱能受体激动剂,有促进胃肠动力、扩张血管、减轻炎症等作用^[4].本研究的目的是观察在烫伤休克早期肠内补液时卡巴胆碱对小肠TNF- α 及水通道蛋白-1表达的影响,为提高烫伤休克早期肠内补液疗效提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠50只(230 ± 20 g)60-70日龄,购自中国医学科学院动物中心. GES配方:每1L水中溶解3.5 g NaCl、2.5 g NaHCO₃、1.5 g KCl和20 g葡萄糖,使用前置于37℃恒温水浴箱预热.酚红溶液:100 mL含2 mg酚红.卡巴胆碱:美国Sigma公司产品.兔抗鼠AQP-1多克隆抗(1:100):购自美国Santa Cruz公司.非生物素二步法免疫组化检测试剂盒(内含内源性过氧化物酶阻断剂、二抗HRP-多聚体)北京中杉金桥生物技术有限公司产品.大鼠TNF- α 检测试剂盒:美国Doclone公司产品. ZNB-XB型输液泵:北京科力丰科技发展有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 动物模型: δ Wistar大鼠在万级动物室适应性饲养1 wk,术前18-20 h禁食,4 h禁水.烫伤组大鼠用乌拉坦im麻醉,背部脱毛,沸水(100℃, 15 s)造成35% TBSA III度烫伤.取腹正中切口,自十二指肠起始段幽门下5 cm和盲肠上5 cm各剪开一个小口,向十二指肠远端向下和回肠近端向上各插入直径为0.5 cm的无菌硅胶管,扎紧固定,用37℃生理盐水将小肠内容物冲洗干净.循环液置于37℃恒温水浴箱预热30 min,将两硅胶管游离端置于循环液中形成闭合环路.用输液泵控制十二指肠游离端液体流速,输液泵速度按4 mL 1% TBSA/kg设定.

1.2.2 分组处理: 动物随机分为假烫(N, $n = 10$)、单纯烫伤(S, $n = 10$)、肠内卡巴胆碱组(CAR, $n = 10$)、肠内葡萄糖-电解质液(GES, $n = 10$)和肠内葡萄糖-电解质液+卡巴胆碱组(GES /CAR, $n = 10$)等5组. N、GES和GES/CAR组于伤后30 min开始补液, CAR组给予卡巴胆碱.各组烫伤后四和经腹主动脉抽血处死,取空肠标本,甲醛固定.

1.2.3 检测及方法: (1)AQP-1免疫组化.将石蜡切片脱蜡水化,一抗为兔抗鼠AQP-1多克隆抗(1:100).非生物素二步法免疫组化检测试剂

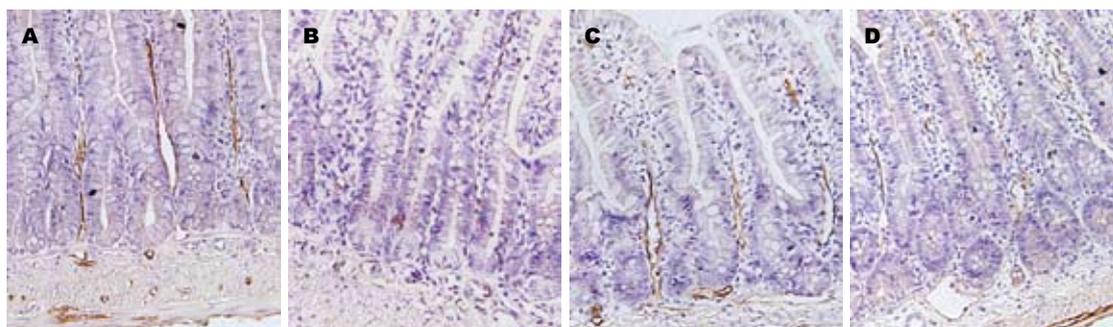


图1 AQP-1的表达(SABC \times 200). A: 假烫组; B: 单烫组; C: GES/CAR组; D: GES组.

■应用要点

卡巴胆碱可增加小肠水吸收率, 对维持机体内平衡, 增加机体对烫伤休克的耐受能力有重要作用, 对于提高口服液体复苏效果具有潜在的应用价值.

表1 小肠AQP-1的表达 ($n = 10$, mean \pm SD, 总IA值)

分组	总IA值
N组	4851.6 \pm 654.5
S组	90.3 \pm 18.4 ^d
CAR组	1806.1 \pm 110.1 ^{ab}
GES组	2272.3 \pm 113.8 ^{ab}
GES/CAR组	3322.0 \pm 595.9 ^b

^a $P < 0.05$ vs GES/CAR组; ^b $P < 0.01$ vs S组; ^d $P < 0.01$ vs N组.

盒(内含内源性过氧化物酶阻断剂、二抗HRP-多聚体). 正常羊血清封闭液阻断非特异性染色, 胃蛋白酶抗原修复, DAB显色, 苏木素复染, 脱水、透明、干燥, 中性树脂封固, 光镜下观察. 用Image-Pro Plus 6.0图象分析系统, 进行AQP-1半定量检测; 每组3张切片每张切片随机选取7个视野, 计算各视野的整合吸光度(IA)值. (2)肠组织TNF- α 含量测定. 取空肠起始段测肠组织中TNF- α , 操作严格按大鼠TNF- α ELISA检测试剂盒说明书要求进行. (3)肠吸收功能: 由于酚红不被小肠吸收, 可用于测定肠道水吸收率. 配制的溶液每100 mL含2 mg酚红. 每组开始补液后每30 min取循环液0.5 mL, 分别加入0.2 mol/L NaOH 5 mL, 摇匀, 以0.2 mol/L NaOH调零, 在550 nm测定吸收度, 绘制标准曲线.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 实验数据采用SPSS11.0统计软件进行 t 检验及相关性分析, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义.

2 结果

2.1 AQP-1的表达 假烫组AQP-1免疫组化结果显示, AQP-1大量表达于肠道毛细血管、小血管及中央乳糜管内皮细胞(棕色为阳性表达); 单纯烫伤组AQP-1表达显著低与假烫组($P < 0.01$); GES组和GES/CAR组AQP-1表达量与单烫组相比均有所增加($P < 0.01$); GES/CAR组AQP-1表达增加

表2 GES/CAR, CAR和S组AQP-1与TNF- α 相关性

	相关系数	P 值
GES/CAR组	-0.9030	0.005
CAR组	-0.9602	0.001
S组	-0.9866	0.002

较GES组明显($P < 0.05$, 表1, 图1).

2.2 肠组织TNF- α 含量 卡巴胆碱可明显抑制烫伤休克大鼠小肠促炎因子TNF- α 的表达, 给予卡巴胆碱的CAR组和GES/CAR大鼠肠组织TNF- α 含量(1.0 ± 0.5 , 0.9 ± 0.1)与单纯烫伤组及GES组(1.8 ± 0.3 , 1.9 ± 0.5)比较明显减少($P < 0.05$). GES/CAR, CAR及S组AQP-1表达量与TNF- α 含量成负相关(表2).

2.3 水吸收率 与假烫组比较烫伤休克大鼠小肠水吸收率明显下降, 假烫组 $21.5\% \pm 0.1\%$, GES组 $12.7\% \pm 0.1\%$ ($P < 0.05$); GES/CAR组肠道水吸收率为 $21.0\% \pm 0.1\%$; GES/CAR组各时间点水吸收值均明显高于GES组($P < 0.05$).

3 讨论

正常生理情况下, 水透过细胞膜分2种过程: (1)通过磷脂双层的简单扩散; (2)通道介导的跨膜转运. 后者受水通道蛋白表达水平的影响. 水通道蛋白在哺乳动物各组织器官中分布广泛^[5], 其中AQP-1在消化系统大量表达, 参与肠道对水的分泌、吸收及细胞内外水的平衡. 本实验对大鼠小肠AQP-1的免疫组化染色显示AQP-1主要表达于小肠毛细血管、小血管及中央乳糜管内皮细胞. 进一步说明了AQP-1与小肠水吸收密切相关.

烫伤休克早期肠内补液作为一种紧急救助措施^[6], 虽然血流动力学恢复滞后于静脉补液, 但在提高血容量和尿量、降低死亡率等方面可以达到与静脉补液相似的效果^[7-8]. 本实验结果显示, 烫伤休克大鼠小肠AQP-1表达显著降低,

■同行评价

本研究设计方法较合理,结果可信,讨论条理分明,具有潜在的临床应用价值。

使水跨膜转运减少,小肠水吸收率明显下降。葡萄糖-电解质溶液可通过糖酵解途径产生ATP供胃肠上皮细胞利用,改善受损细胞功能,促进钠和水的吸收,但其改善小肠AQP-1表达及水吸收的作用并不显著,给予葡萄糖-电解质溶液后小肠TNF- α 较单烫组有所增加,可能由于烫伤休克肠内补液所制的缺血再灌注引起的炎症因子增加。本实验结果显示卡巴胆碱可明显抑制小肠促炎因子TNF- α 的表达,在葡萄糖-电解质溶液中加入卡巴胆碱可明显增加烫伤休克大鼠小肠AQP-1表达量及水吸收率,其作用机制可能为:(1)卡巴胆碱兴奋M受体可增加肠蠕动、改善肠血流,增强AQP-1活性。文献报道也显示,乙酰胆碱通过M3受体可使水通道蛋白在细胞内囊泡与顶质膜间穿梭^[9-10],提高水的通透性;(2)卡巴胆碱有兴奋N受体抑制肠道缺血再灌注时TNF- α 等炎症因子释放,减轻缺血缺氧状态下的肠组织炎症反应的作用^[11-12]。烧伤休克时肠道处于严重缺血缺氧状态,导致肠组织过度炎症损伤。TNF- α 是烧伤休克时重要的促炎因子,可下调水通道基因表达^[13]。实验结果显示GES/CAR, CAR及S组AQP-1表达量与TNF- α 含量成负相关性。烫伤休克后随着肿瘤坏死因子的大量释放,AQP-1表达迅速减少,给予卡巴胆碱可明显抑制肠组织中TNF- α 释放^[14-15],从而改善AQP-1的表达增强肠道对水的吸收。但卡巴胆碱增加小肠AQP-1表达的具体机制尚不清楚,有待进一步研究。烫伤休克早期肠内补液时在葡萄糖-电解质溶液中加入卡巴胆碱可增加小肠水吸收率,对维持机体内平衡,增加机体对烫伤休克的耐受能力有重要作用,对提高肠内液体复苏的效果具有潜在的应用价值。

4 参考文献

- 1 Sogami M, Era S, Murakami M, Seo Y, Watari H, Uyesaka N. Application of the transition state

- theory to water transport across cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1511: 42-48
- 2 Ma T, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol* 1999; 517 (Pt 2): 317-326
- 3 曹卫红, 柴家科, 胡森, 杨红明, 孙天骏, 邹晓防, 盛志勇. 卡巴胆碱对烧伤后肠道功能障碍影响的研究. *中华烧伤杂志* 2006; 22: 168-172
- 4 Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384-388
- 5 梁棋, 徐三荣, 严唯力, 邓丽贤, 孙大裕. 水通道蛋白-1在消化系统的研究进展. *国外医学·消化系疾病分册* 2003; 23: 245-247
- 6 车晋伟, 胡森, 盛志勇. 烧(创)伤休克战地液体复苏研究进展. *解放军医学杂志* 2007; 32: 271-273
- 7 Ramakrishna BS. Towards a better oral rehydration fluid. *Indian J Pediatr* 2001; 68: 41-43
- 8 任清华, 赵晓晏, 胡森, 郝波, 陈廷秀, 黎君友, 吕艺, 杨国兴, 王国强, 周国勇, 盛志勇. 烧伤后早期口服液体复苏与静脉液体复苏的对比研究. *华北国防医药* 2006; 18: 305-307
- 9 Ishikawa Y, Eguchi T, Skowronski MT, Ishida H. Acetylcholine acts on M3 muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin5 water channel via cytosolic Ca²⁺ elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 835-840
- 10 Emeth-Cahalan KL, Kalman K, Hall JE. Molecular basis of pH and Ca²⁺ regulation of aquaporin water permeability. *J Gen Physiol* 2004; 123: 573-580
- 11 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-462
- 12 胡森, 姜小国, 石德光, 吕艺, 黎君友, 孙丹, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血-再灌注损伤时肠道局部炎症反应的影响. *中国危重病急救医学* 2003; 15: 748-750
- 13 Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, Menon AG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18657-18664
- 14 吕艺, 姜小国, 曹卫红, 白玉梅, 孙丹, 胡森, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血再灌注动物脏器功能的保护作用. *中华急诊医学杂志* 2006; 15: 228-231
- 15 胡森, 周国勇, 吕艺, 宋琪, 邹晓防, 盛志勇. 卡巴胆碱对脂多糖刺激巨噬细胞释放炎症细胞因子的影响及其受体研究. *中国药理学通报* 2007; 23: 1575-1579

编辑 潘伯荣 电编 郭海丽

干扰素诱导抗病毒蛋白基因多态性与慢性丙型肝炎疗效的相关性

邹梦娜, 黄雁翔, 李卓, 马丽娜, 林尊慧, 郭向华, 曹振环, 陈新月

邹梦娜, 马丽娜, 曹振环, 陈新月, 首都医科大学附属北京佑安医院国际医疗部 北京市 100069
黄雁翔, 李卓, 林尊慧, 郭向华, 首都医科大学附属北京佑安医院, 北京市卫生局肝炎研究所 北京市 100069
首都医学发展科研基金资助项目, No. 2005-3057
通讯作者: 陈新月, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院国际医疗部. chenxy6350639@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-02-20 修回日期: 2008-04-09
接受日期: 2008-04-16 在线出版日期: 2008-07-08

Association between single nucleotide polymorphism of IFN-induced antiviral protein genes and curative effect of antiviral treatment in chronic hepatitis C patients

Meng-Na Zou, Yan-Xiang Huang, Zhuo Li, Li-Na Ma, Zun-Hui Lin, Xiang-Hua Guo, Zhen-Huan Cao, Xin-Yue Chen

Meng-Na Zou, Li-Na Ma, Zhen-Huan Cao, Xin-Yue Chen, International Medical Department, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
Yan-Xiang Huang, Zhuo Li, Zun-Hui Lin, Xiang-Hua Guo, Institute of Hepatitis, Bureau of Beijing Health, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Supported by: the Capital Medical Development Science Research Program, No. 2005-3057
Correspondence to: Xin-Yue Chen, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China. chenxy6350639@yahoo.com.cn
Received: 2008-02-20 Revised: 2008-04-09
Accepted: 2008-04-16 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate effects of single nucleotide polymorphism (SNP) of interferon-induced antiviral protein on therapeutic effects of antiviral therapy for hepatitis C.

METHODS: A total of 168 chronic hepatitis C (CHC) patients were enrolled into the randomized trial of both interferon and pegylated interferon in combination with ribavirin antiviral treatments for 52 wk, with a 26-week follow-up. Sustained virological response (SVR) was

evaluated then. Peripheral blood samples were collected at base line. Viral genotype was determined using PCR and viral load was determined using fluorescent quantitative PCR. And SNP in antiviral protein MxA gene promoter at nt-88, nt-123 and PKR-activated eIF-2 α -reg2 sites were examined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

RESULTS: There were significant differences in curative effect between CHC patients with GT or TT genotype and those with GG genotype ($\chi^2 = 6.862, P = 0.012; \chi^2 = 12.941, P = 0.001$, respectively). No significant difference was found between GT and TT genotypes. The curative effect in CHC patients with either CA genotype or AA genotype was better than those with CC genotype ($\chi^2 = 5.818, P = 0.020; \chi^2 = 4.498, P = 0.046$). No significant difference was found between CA and AA genotypes. Statistic analysis revealed no significant difference in curative effect between genotype of regulatory region 2 of the eIF-2 α gene (A/G) and AG or GG genotypes.

CONCLUSION: Patients who carry MxA gene with TT or GT genotype at promoter nt-88 have better curative effect than those with GG genotype when treated with IFN. AA or AC genotype at MxA -123 is better than CC genotype. Genotype at of eIF-2 α -reg2 site is not correlated with IFN treatment response in CHC patients.

Key Words: Chronic hepatitis C; Interferon; Single nucleotide polymorphism; Myxovirus resistance; Eukaryotic initiation factor-2 alpha

Zou MN, Huang YX, Li Z, Ma LN, Lin ZH, Guo XH, Cao ZH, Chen XY. Association between single nucleotide polymorphism of IFN-induced antiviral protein genes and curative effect of antiviral treatment in chronic hepatitis C patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2175-2180

摘要

目的: 探讨干扰素(IFN)诱导抗病毒蛋白基因多态性对慢性丙型肝炎抗(CHC)病毒治疗疗效的影响。

背景资料

丙型肝炎呈世界性流行, 目前我国慢性丙型肝炎(CHC)患者约有3600万. HCV感染是我国乃至全球重要的健康问题之一. 目前, 干扰素(IFN)是丙型肝炎抗病毒治疗唯一有效的药物, 利巴韦林可协同作用. 然而, 同样应用IFN治疗的患者往往应答差异很大. 近年随着对HCV研究的开展, HCV基因型, 病毒载量和肝纤维化程度被认为与IFN治疗的疗效有关. 但除以上因素外, 宿主遗传因素如细胞信号转导通路上众多基因的单核苷酸多态性(SNP)也是影响IFN应答的重要因素.

同行评议者

唐霓, 副研究员, 重庆医科大学; 曹洁, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

■相关报道

人类基因组计划研究提示:人类基因的同源性为99.9%,仅0.1%的差异就决定了人们遗传性状的不同、对某些疾病易感性的不同以及对某些药物治疗反应效果的不同,而这些差异集中表现在“SNP”的差异。通过对SNP的研究,可从基因水平揭示不同个体间生物活性物质的功能及效应存在差异的本质,为临床与遗传相关的疾病提供基因诊断依据,还可以预测不同个体对某些药物疗效的反应性,并用来指导个体化治疗。

方法: 168例CHC患者给予IFN:包括聚乙二醇IFN(PEGIFN)和普通IFN,联合利巴韦林治疗52 wk,随访26 wk,评价持续病毒学应答(SVR)情况。于基线时留取患者外周血标本,应用多聚酶链反应(PCR)检测病毒基因型,荧光定量聚合酶链反应法测定病毒载量,同时采用多聚酶链反应-限制片段长度多态性(PCR-RFLP)的分析方法,检测患者抗病毒蛋白的MxA-88, -123位点及eIF-2 α -reg2的SNP。

结果: CHC患者中GT型、TT型与GG型疗效比较,差异均有统计学意义($\chi^2 = 6.862, P = 0.012; \chi^2 = 12.941, P = 0.001$)。GT型与TT型的比较,差异不显著。CA型和AA型与CC型患者疗效比较,差异均有统计学意义($\chi^2 = 5.818, P = 0.020; \chi^2 = 4.498, P = 0.046$)。但CA型与AA型的比较,差异不显著。eIF-2 α -reg2位点(A/G),基因型AA与基因型为AG或GG的患者IFN疗效比较,差异没有统计学意义。

结论: MxA-88为TT或GT型比GG型患者对IFN反应性好, MxA-123为AA或AC型比CC型疗效好。eIF-2 α -reg2位点基因型与CHC IFN疗效无相关性。

关键词: 慢性丙型肝炎; 干扰素; 单核苷酸多态性; 黏病毒抵抗蛋白A; 真核细胞起始因子

邹梦娜, 黄雁翔, 李卓, 马丽娜, 林尊慧, 郭向华, 曹振环, 陈新月. 干扰素诱导抗病毒蛋白基因多态性与慢性丙型肝炎疗效的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2175-2180
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2175.asp>

0 引言

干扰素(interferon, IFN)是目前治疗慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)的主要药物,但同样应用IFN治疗的个体存在应答差异。近年HCV基因型,病毒载量和治疗方案等因素被认为与IFN治疗的疗效有关。但除以上因素外,宿主遗传因素如抗病毒蛋白基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)也是影响IFN应答的重要因素^[1]。双链RNA激活的蛋白激酶(double strand RNA activated protein kinase, PKR)和黏病毒抵抗蛋白A(myxovirus resistance A, MxA)就是IFN诱导产生的抗病毒蛋白^[2], MxA蛋白的抗病毒机制是其在与病毒的核糖核蛋白体中的核蛋白紧密结合后活化,活化的MxA发挥对病毒核衣壳的水解作用^[3]。PKR是一种RNA依赖性蛋白激酶,他可使真核细胞翻译起始因子-2 α (eukaryotic initiation factor-2 α , eIF-2 α)磷

酸化失活,而使病毒蛋白质的翻译不能进行,从而起到抗病毒的作用^[4]。因此,我们选择IFN诱导的MxA启动子和PKR活化的真核细胞翻译起始因子(eIF)基因作为研究切入点,探讨IFN种类、病毒因素和宿主遗传因素对CHC疗效的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 按知情同意原则,开放非随机选择于2004-12/2006-07在我院住院的CHC患者,入组211例,年龄16-70岁,均为汉族。诊断标准符合2004年《丙型肝炎防治指南》^[5]诊断的慢性丙型肝炎,且荧光定量PCR检测HCV RNA $>8 \times 10^7$ copies/L。并通过血清学检测排除其他肝炎病毒所致的慢性肝炎、失代偿期肝硬化等。Taq DNA酶、dNTP、DNA marker购自北京鼎国生物工程有限公司。限制性核酸内切酶Hha I、Pst I、Ssp I均购自北京友谊中联公司代售的NEB公司产品。

1.2 方法

1.2.1 治疗方案: 所有患者均用IFN联合利巴韦林(ribavirin, RBV)治疗, RBV的用法均为800 mg/d, po。其中使用PEGIFN者为PEGIFN组,使用普通IFN α 者为普通IFN组。PEGIFN组应用PEG IFN α 180 μ g或135 μ g, 1次/wk, sc; 普通组应用IFN α 5 MIU, 隔天一次, sc。疗程52 wk, 停药随访26 wk。持续病毒学应答(sustained virological response, SVR): 即治疗结束并随访26 wk时定量HCV RNA $<8 \times 10^7$ copies/L。非持续病毒学应答(non-sustained virological response, NSVR): 除SVR外任意一种情况。

1.2.2 检测方法: 患者外周静脉抗凝血2 mL, 采用常规的酚-氯仿法提取患者外周静脉血白细胞基因组DNA^[6]。通过美国国家生物信息中心(NCBI)的GenBank获取eIF-2 α -reg 2和MxA启动子基因序列及相应位点的SNP信息,应用primer5.0设计合适的引物序列,引物由赛百盛生物工程有限公司合成。eIF-2 α -reg 2引物序列F: 5'-tgcttgct agttgtttccac-3', R: 5'-gccatgtacatcacaggttactg-3'。MxA启动子-88和-123引物序列相同F: 5'-acacacccgtttccaccctggagagccag-3', R: 5'-tgcgcagtgtgg agtgcggcctccgctct-3'。取上述不同患者的DNA提取液5 μ L, 上下游引物各1.2 μ L(10 pmol/L), 10 mmol/L dNTPs 2.4 μ L, MgCl₂ 2.4 μ L(25 mmol/L), 10 \times PCR缓冲液3 μ L, Taq DNA酶1 μ L(2×10^6 U/L), 补去离子水至总体积30 μ L, 按下列条件进行PCR扩增: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30

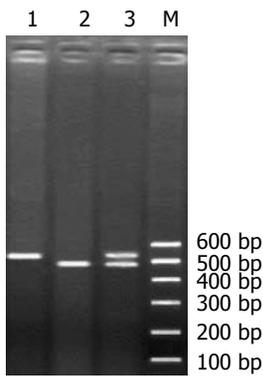


图1 MxA启动子-88位点基因多态性分析. M: DNA marker; 1: TT纯合型; 2: GG纯合型; 3: GT杂合型.

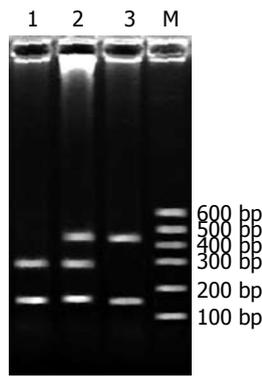


图2 MxA启动子-123位点基因多态性分析. M: DNA marker; 1: CC纯合型; 2: CA杂合型; 3: AA纯合型.

■创新盘点
本文选择IFN诱导的MxA启动子和PKR活化的真核细胞翻译起始因子(eIF)基因作为研究切入点,探讨IFN种类、病毒因素和宿主遗传因素对CHC疗效的影响.

s, 58°C(eIF)或60°C(MxA)退火30 s, 72°C延伸1 min, 循环数为35, 最后72°C延伸7 min. 取PCR产物8 μL, 20 g/L的琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下鉴定预期PCR产物片段大小. PCR产物10 μL, 10×缓冲液2 μL, 限制性内切酶(MxA-88: *Hha* I; MxA-123:*Pst* I; eIF-2α-reg 2: *Ssp* I) 1 μL(2×10⁶ U/L), 10×BSA 2 μL, 6×染料3 μL, 补去离子水构成总体积20 mL反应体系. 该反应体系在37°C酶切4 h. 酶切产物20 μL用20 g/L的琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下参照DNA marker鉴定酶切片段.

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件, 采用χ²检验. 用Logist回归进行多因素分析. 统计学显著性检验为双侧, P<0.05为统计学显著性.

2 结果

2.1 治疗情况 入组的211例CHC患者中有168例患者完成预定疗程及随访计划, 按照预定标准判定疗效如下: 获得SVR者为79例(47.0%), 非持续病毒学应答(NSVR)有89例(53.0%).

2.2 IFN种类对疗效的影响 根据患者应用的IFN种类不同, 分为PEGIFN组59例(35.1%), 普通IFN组109例(64.9%). PEGIFN组和普通组SVR率分别为59.3%(35/59)和40.4%(44/109), 差异有统计学意义(P = 0.023).

2.3 病毒因素(HCV基因型、HCV病毒载量)对疗效的影响 于基线检测病毒载量和病毒基因型, HCV为1型的为48.2%(81例), 均为1b型; 2型为30例(20.9%), 其中2a型28例, 2b型2例, 型别未知57例(33.9%). 1型SVR 24例(29.6%)与2型SVR19例(63.3%)比较, 差异有统计学意义(P = 0.002). 本文中病毒载量≤10⁷ copies/L定义为低病毒载量(low viral load, LVL)组, 以病毒载量>10⁷ copies/L定义为高病毒载量(high viral load, HVL)组, 其中LVL有61例(36.3%), HVL有107例(63.7%). HVL组SVR 35例(32.7%)与LVL组SVR 44例(72.1%)比较, 差异有统计学意义(P = 0.000). 对

病毒基因型和病毒载量之间的相关性进行分析: 病毒基因1b型中HVL占82.7%, 2型患者中HVL仅占43.3%, 差异有统计学意义(P = 0.000), 提示1型患者较2型患者容易合并高病毒载量.

2.4 宿主抗病毒蛋白基因多态性对疗效的影响

2.4.1 MxA启动子-88位点SNP及其与IFN疗效的关系: *Hha* I限制性酶切MxA启动子扩增产物的结果如图1. 168例CHC患者中MxA启动子-88位点基因型频率: GG型56例(33.3%); TT型36例(21.4%); GT型76例(45.2%)(表1). 三组基因型(GG、TT、GT)患者IFN疗效比较, 总体上差异有统计学意义(P = 0.001), 将不同基因型对疗效的影响进行两两比较: GT型与GG型疗效比较差异有统计学意义(χ² = 6.862, OR: 2.635, 95% CI: 1.265-5.489, P = 0.012); TT型与GG型患者疗效比较, 差异有统计学意义(χ² = 12.941, OR: 5.000, 95% CI: 2.026-12.341, P = 0.001); 但GT型与TT型的疗效比较, 差异无统计学意义(χ² = 2.339, OR: 0.527, 95% CI: 0.231-1.204, P = 0.155).

2.4.2 MxA启动子-123位点SNP及其与IFN疗效的关系: *Pst* I限制性酶切MxA启动子扩增产物的结果见图2. MxA启动子-123位点基因型频率: CC型60例(35.7%); AA型16例(9.5%); CA型92例(54.8%)(表1). 三组基因型患者疗效比较, 总体而言, 差异有统计学意义(P = 0.024). 各基因型之间两两比较IFN应答效果显示: CA型、AA型患者分别与CC型患者疗效比较, 差异均有统计学意义(χ² = 5.818, OR: 2.279, 95% CI: 1.160-4.477, P = 0.020; χ² = 4.498, OR: 3.333, 95% CI: 1.060-10.482, P = 0.046). 但CA型与AA型的比较, 差异无统计学意义(χ² = 0.469, OR: 1.463, 95% CI: 0.491-4.358, P = 0.155).

2.4.3 eIF-2α-reg 2位点SNP及其与IFN疗效的关系: *Pst* I限制性酶切eIF-2α-reg 2扩增产物的结果见图3. eIF-2α-reg 2位点基因型频率: AA型146例(86.9%); GG型4例(2.4%); AG型18例

■应用要点

本研究为CHC预后判断及基因治疗提供了理论依据和新的思路。

表1 各检测基因型与IFN疗效的关系

Promoter site	Type	n	SR(%)	NSR(%)	χ^2	P
MxA启动子-88	GG	56	16(28.6)	40(71.4)	13.792	0.001
	TT	36	24(66.7)	12(33.3)		
	GT	76	39(51.3)	37(48.7)		
MxA启动子-123	CC	60	20(33.3)	40(66.7)	7.489	0.024
	AA	16	10(62.5)	6(37.5)		
	CA	92	49(53.3)	43(46.7)		
eIF-2 α -reg 2	AA	146	69(47.3)	77(52.7)	0.025	1.000
	GG	4	3(75.0)	1(25.0)		
	AG	18	14(58.3)	10(41.67)		
MxA启动子-88/123	GG/CC	48	12(25.0)	36(75.0)	11.257	0.004
	TT/AA	14	9(64.3)	5(35.7)		
	GT/AC	69	36(52.2)	33(47.8)		

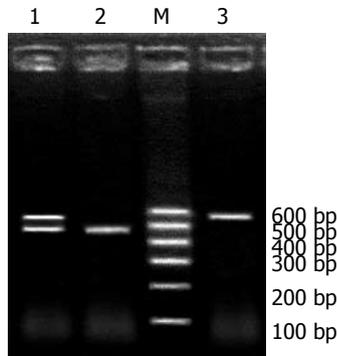


图3 eIF-2 α -reg 2位点基因多态性分析. M: DNA marker; 1: AG杂合型; 2: AA纯合型; 3: GG纯合型.

(10.7%)(表1). 因GG例数少, 对统计的准确性有影响. 因此将GG与AG合并, 与AA进行统计学分析, 基因型AA与基因型为AG或GG的患者IFN疗效比较, 差异没有统计学意义($P>0.05$).

2.4.4 MxA启动子上-123, -88连锁不平衡与SVR的关系: MxA-88, -123两个SNPs存在连锁不平衡, 连锁不平衡是指特殊等位基因的优先联合, 一个等位基因与其相邻近基因座上特异等位基因联合的频率要高于偶然发生的预测值. MxA-88位为GG, 其-123位为CC的占85.7%; -88位为GT, -123位点为AC的占87.1%; -88位为TT, 则-123位点为AA的占39.9%, 均高于偶然发生的预测值. 因此MxA-88/-123联合位点为GG/CC、TT/AA、AC/GT的是连锁不平衡的优先联合. 将这优先联合(GG/CC、TT/AA、AC/GT)与SVR相关性进行分析: 总体上差异有统计学意义($P = 0.004$, 表1). 对存在连锁不平衡的MxA-88/-123不同基因型联合之间两两比较IFN应答效果显示: GT/CA、TT/AA患者分别与GG/CC患者疗效比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 8.640$, $OR: 3.273$, 95% CI: 1.461-7.329, $P = 0.004$; $\chi^2 = 7.468$, $OR:$

5.400, 95% CI: 1.511-19.297, $P = 0.010$). GT/CA与TT/AA患者疗效比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.688$, $OR: 1.650$, 95% CI: 0.502-5.429, $P = 0.558$).

2.5 多因素Logist回归分析 用Logist回归分析病毒基因型、病毒载量、IFN种类、MxA-88, MxA-123, MxA-88/-123基因型联合对CHC疗效的影响. MxA-88与MxA-123存在连锁不平衡, 同时入方程会出现回归系数反常等现象, 因此可只将MxA-88做为遗传易感性的代表因素纳入方程, 结果显示: HCV基因型($OR: 3.814$, 95% CI: 1.337-10.883, $P = 0.012$)、IFN种类($OR: 2.744$, 95% CI: 1.133-6.647, $P = 0.025$)、及MxA-88基因型($OR: 2.471$, 95% CI: 1.284-4.757, $P = 0.007$)对SVR的独立影响具有统计学意义. 病毒载量对SVR的独立影响无统计学意义($OR: 2.254$, 95% CI: 0.812-6.260, $P = 0.119$).

3 讨论

为探索疗效的影响因素, 我们对病毒基因型、病毒载量、IFN种类和宿主遗传易感性等诸多因素进行分析. 本文168例CHC患者经IFN联合利巴韦林治疗有79例(47.0%)获得持续病毒学应答, 另89例(53.0%)未达到持续病毒学应答.

Reddy *et al*报道^[7], PEGIFN治疗CHC的疗效优于普通IFN, 本研究结果与此类似. 聚乙二醇组SVR显著高于普通IFN组($P = 0.023$), 因为普通IFN半衰期短, 存在“峰-谷”效应. 而PEGIFN是在IFN分子上交联了大分子PEG, 半衰期增加了大约10倍, 造成对病毒的持续抑制, 因而可以提高疗效. 所以是PEGIFN较普通IFN疗效好, 并且用Logist回归分析得, PEGIFN是SVR的独立影

响因素.

HCV病毒因素对丙肝治疗的疗效也有显著影响. Hadziyannis *et al*^[8]报道CHC患者基因1型的SVR率显著低于基因2型的患者. 本研究中SVR率在1型和2型中分别为29.6%和63.3%, 都有显著差异, 且Logist回归分析提示基因型是独立的影响因素. 文献[9]报道HCV对IFN无应答是因为HCV某些区域与IFN敏感性相关, 如位于丙肝病毒NS5A蛋白区的IFN敏感决定区(ISDR)可与IFN诱导的抗病毒蛋白PKR结合, 使之失去抗病毒的能力, 从而影响IFN反应性. 且1型HCV的E2蛋白内的PKR-eIF2 α 磷酸化同源区域(PePHD)也可使PKR失活^[10], 抗病毒作用减弱, 从一定程度上解释了基因型为1型的患者IFN疗效差的原因.

本研究比较不同病毒载量与疗效的关系, 在高病毒载量组的SVR率低于低病毒载量组, 差异有统计学意义. 将病毒载量纳入Logist回归方程, 病毒载量不是SVR的独立影响因素, 可能是因为基因型和病毒载量有显著相关性, 基因型1型患者中高病毒载量者显著多于2型患者, 在一定程度上HCV基因型减弱了病毒载量对SVR的影响. 宿主的遗传易感性方面, 本研究选择了IFN诱导的抗病毒蛋白PKR和MxA蛋白, 作为研究切入点, 结果表明168例患者MxA-88基因型(GG、TT、GT)与IFN疗效比较: GT型CHC患者IFN治疗后出现SVR的几率是GG型患者的2.26倍($P<0.05$), TT型患者IFN治疗后出现SVR的几率是GG型患者的5.00倍($P<0.01$). 提示GT型或TT型的CHC患者对IFN治疗反应性好于GG型患者. 国外Hijikata *et al*^[11]、Suzuki *et al*^[12]以及Knapp *et al*^[13]分别研究慢性丙型肝炎患者MxA启动子-88的SNP与IFN疗效的关系时得出的结论均与本研究结果一致. 检测MxA启动子-123位点基因型, CA型出现SVR的几率是CC型患者的2.28倍($P<0.05$), AA型出现SVR的几率是CC型患者的3.33倍($P<0.05$). 提示CA型或AA型的CHC患者对IFN治疗反应性好于CC型患者. 且MxA-88、-123两个SNPs存在连锁不平衡: MxA-88/-123为GT/CA型出现SVR的几率是GG/CC型患者的3.27倍($P<0.01$), TT/AA型出现SVR的几率是GG/CC型患者的5.4倍($P<0.05$). 提示GT/CA型或TT/AA型的CHC患者对IFN治疗反应性好于GG/CC型患者. 因MxA-123与-88有连锁不平衡, 因此这两个位点的SNP有高度相关性, 所以MxA-123对疗效的影响原因, 可能与MxA-88连锁有关.

King *et al*^[14]报告在82例台湾汉族CHB患者中eIF-2 α -reg 2的SNP与IFN疗效有相关关系, AG杂合基因型CHB患者IFN疗效差($P<0.01$). 而本研究在CHC患者中, 未见eIF-2 α -reg 2的SNP与IFN疗效有相关性($P>0.05$). 可能是因为病种不同, 并且样本量不同, 本研究样本量168例大于King的82例.

本研究显示, 汉族人群的基因多态性MxA-88为TT或GT基因型, MxA-123为AA或AC基因型, MxA-88/-123基因型联合为TT/AA或GT/AC的CHC患者易获得SVR. MxA-88基因型是SVR的影响因素, 可作为干扰素疗效的预测指标.

影响慢性IFN疗效的因素还有很多^[15], 上述抗病毒蛋白基因多态性仅是从宿主遗传因素的功能及效应存在差异, 因此, 有待进一步研究, 为CHC预后判断及基因治疗提供更多的理论依据和新思路.

4 参考文献

- Fortunato G, Calcagno G, Bresciamorra V, Salvatore E, Filla A, Capone S, Liguori R, Borelli S, Gentile I, Borrelli F, Borgia G, Sacchetti L. Multiple sclerosis and hepatitis C virus infection are associated with single nucleotide polymorphisms in interferon pathway genes. *J Interferon Cytokine Res* 2008; 28: 141-152
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285: 1-24
- 杨吉成. MxA抗病毒蛋白的研究进展. *苏州医学院学报* 2000; 20: 499-504
- Tokumoto Y, Hiasa Y, Horiike N, Michitaka K, Matsuura B, Chung RT, Onji M. Hepatitis C virus expression and interferon antiviral action is dependent on PKR expression. *J Med Virol* 2007; 79: 1120-1127
- 中华医学会肝病学会、中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. *中华医学杂志* 2004; 84: 775-780
- 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第2版. 北京: 北京协和医科大学出版社, 2001: 398-400
- Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP 3rd, Jensen D, Smith C, Lee WM, Boyer TD, Lin A, Pedder S, DePamphilis J. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33: 433-438
- Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-355
- He Y, Katze MG. To interfere and to anti-interfere:

■同行评价

本文主要从干扰素诱导蛋白基因多态性入手, 探索与HCV疗效的相关性, 内容比较新颖, 病例数较多, 研究手段和设计思路也比较巧妙, 是难得的一项临床研究.

- the interplay between hepatitis C virus and interferon. *Viral Immunol* 2002; 15: 95-119
- 10 Lo S, Lin HH. Variations within hepatitis C virus E2 protein and response to interferon treatment. *Virus Res* 2001; 75: 107-112
- 11 Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. *Intervirology* 2000; 43: 124-127
- 12 Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Takagi K, Satoh J, Kumada H. Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 271-276
- 13 Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Hennig BJ, Hellier S, Zhang L, Wright M, Chiaramonte M, Graves M, Thomas HC, Hill AV, Thursz MR. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun* 2003; 4: 411-419
- 14 King JK, Yeh SH, Lin MW, Liu CJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS, Chen PJ. Genetic polymorphisms in interferon pathway and response to interferon treatment in hepatitis B patients: A pilot study. *Hepatology* 2002; 36: 1416-1424
- 15 Heathcote EJ. Antiviral therapy: chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2007; 14 Suppl 1: 82-88

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按 ●、○、■、□、▲、△ 顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5 \text{ cm} \times 4.5 \text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(常务副总编辑: 张海宁 2008-07-08)

早期误诊为肝性脑病患者的临床分析21例

隆莉, 张继万

隆莉, 张继万, 武警四川总队医院感染科 四川省乐山市 614000

作者贡献分布: 此课题由隆莉与张继万设计; 研究过程由隆莉与张继万共同完成; 数据分析和论文写作由隆莉完成。

通讯作者: 隆莉, 614000, 四川省乐山市市中区柏杨路, 武警四川总队医院感染科. lsllili-2001@163.com

电话: 0833-2452779 传真: 0833-2452778

收稿日期: 2008-03-18 修回日期: 2008-04-24

接受日期: 2008-05-12 在线出版日期: 2008-07-08

Clinical analysis of 21 cases with early misdiagnosis as hepatic encephalopathy

Li Long, Ji-Wan Zhang

Li Long, Ji-Wan Zhang, Department of Infectious Diseases, Sichuan Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Leshan 614000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Long Li, Department of Infectious Diseases, Sichuan Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Baiyang Road, Shizhong District, Leshan 614000, Sichuan Province, China. lsllili-2001@163.com

Received: 2008-03-18 Revised: 2008-04-24

Accepted: 2008-05-12 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate underlying causes for early misdiagnosis as hepatic encephalopathy and thereby to gain a better understanding of hepatic encephalopathy.

METHODS: Twenty-one cases misdiagnosed as hepatic encephalopathy were retrospectively analyzed, including their possible causes and clinical features.

RESULTS: Final diagnosis included hyponatraemia encephalopathy, alcohol withdrawal syndrome, chronic alcoholism Wernicke encephalopathy, hypoglycemic coma, cerebral hemorrhage and uremia acidosis. The underlying causes for misdiagnosis may be: narrow clinical diagnosis thinking; lack of complete understanding of pathogenic condition; undetailed inquiry and check-up and failure to master differential diagnosis of hepatic encephalopathy.

CONCLUSION: When patients with liver diseases

es present with mental disorders, detailed and complete inquiry and check-up are required, and relevant laboratory tests and causal analysis from perspective of diagnostic thinking should be done to avoid a misdiagnosis.

Key Words: Hepatic encephalopathy; Early diagnosis; Misdiagnosis

Long L, Zhang JW. Clinical analysis of 21 cases with early misdiagnosis as hepatic encephalopathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2181-2183

摘要

目的: 研究早期误诊为肝性脑病的原因, 提高对肝性脑病的认识。

方法: 采用回顾性调查方法, 分析21例误诊为肝性脑病患者的早期误诊原因及临床特点。

结果: 确诊为低钠性脑病、酒精戒断综合征、慢性酒精中毒Wernicke脑病、低血糖昏迷、脑出血和尿毒症酸中毒, 误诊原因: 临床诊断思维狭隘, 先入为主; 对病情缺乏全面分析; 问诊不仔细, 查体不全面; 对肝性脑病诊断及鉴别诊断不熟悉。

结论: 临床医师对肝病患者出现神经精神症状, 应全面询问病史及仔细查体, 及早进行相关的实验室检查, 从诊断思维入手进行病因分析, 避免误诊。

关键词: 肝性脑病; 早期诊断; 误诊

隆莉, 张继万. 早期误诊为肝性脑病患者的临床分析21例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2181-2183

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2181.asp>

0 引言

肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)在我科是常见的危重症, 是严重肝病引起的、以代谢紊乱为基础的中枢神经系统功能失调的综合征, 其主要临床表现包括神经和精神方面的异常, 如意识障碍、行为失常和昏迷。但临床也常遇

■背景资料

肝性脑病是临床常见的危重症, 是严重肝病引起的、以代谢紊乱为基础的、以代谢紊乱为基础的中枢神经系统功能失调的综合征。但肝病患者临床出现的神经精神方面异常, 也常遇见误诊为肝性脑病。

■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

■同行评价

本文具有临床诊疗参考价值,但误诊病例临床资料分析过于简单,学术价值一般。

见误诊为HE病例^[1],现将1999-01/2007-12我科收治的早期误诊为肝性脑病的21例病例分析如下。

1 材料和方法

1.1 材料 21例患者均为住院患者,男15例,女6例,年龄30-75(中位年龄44)岁,均为慢性肝病患者,其中肝炎肝硬化7例,酒精性肝硬化7例,原发性肝癌2例,重型肝炎5例。所有患者均出现精神症状,早期被误诊为HE。

1.2 方法 慢性肝病诊断标准依据2000-09中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订标准^[2]。HE主要诊断依据为:严重肝病和(或)广泛门体侧枝循环分流;精神紊乱、昏睡或昏迷;HE的诱因;明显肝功能损害或血氨增高。扑击样震颤和典型的脑电图改变有重要参考价值^[1]。本组患者均慢性肝病患者,临床表现均有肝功能受损表现:如乏力、纳差、厌油、肝区不适,其中腹水、双下肢水肿12例;黄疸10例;14例有肝掌或蜘蛛痣,7例有皮肤瘀点、瘀斑或牙出血、鼻出血;2例出现呕血、黑便。肝功检查均有不同程度损害,胃镜检查16例有不同程度的食道、胃底静脉曲张。均出现神经精神症状:嗜睡4例、昏睡2例、昏迷3例、谵妄2例,躁狂2例,晕厥1例、抽搐1例,偏瘫2例。采用回顾性研究方法。

2 结果

2.1 确诊 早期均诊断为并发HE,经系统检查或按肝性脑病治疗无效,后被确诊并发低渗性脑病9例,酒精戒断综合征4例,慢性酒精中毒Wernicke脑病2例,低血糖昏迷3例,脑出血2例,尿毒症酸中毒昏迷1例。

2.2 治疗及转归 确诊为低渗性脑病9例,基础疾病为肝硬化5例,重型肝炎3例,肝癌1例,血Na<115 mmol/L、OSM<250 mmol/L,补钠后低渗性脑病治愈。补钠量=(142-实测血钠值)×体重(kg)×0.2。但1例重型肝炎因肝功能衰竭住院1 mo后死亡。确诊为酒精戒断综合征4例,予纳洛酮治疗,慢性酒精中Wernicke脑病2例,予维生素B1、烟酸治疗,基础疾病均为酒精性肝硬化,治疗后神经精神症状消失。确诊为低血糖昏迷患者,系肝癌1例,重型肝炎1例,肝硬化出现肝源性糖尿病1例,血糖均<2.8 mmol/L,予高渗葡萄糖治疗后意识回复。确诊为脑出血2例,系肝硬化失代偿期1例,重型肝炎1例,均经头颅CT确诊,1例重型肝炎并发脑出血死亡。确诊为尿

毒症酸中毒昏迷1例,基础疾病为肝炎肝硬化、乙肝相关肾,按尿毒症予透析、纠酸等综合治疗,无效,死亡。

3 讨论

HE是肝病患者常见的并发症和死亡原因,其诊治标准应该为临床医师掌握、熟悉,更应注意其鉴别诊断。肝硬化、重型肝炎患者肝功能不全,易发生水钠潴留,其形成机制较为复杂,与有效循环血量减少、肾血管收缩和血流重分配、RAAS激活、AVP/ADH分泌增加和灭活减少、前列腺素分泌减少等均有密切关系^[3]。因此予低盐饮食,利尿等治疗,但因长期低盐饮食、稀释性低钠血症、腹泻、利尿剂等造成钠丢失出现低钠血症,进一步发展低渗性脑病,脑细胞水肿,脑缺血缺氧,出现一系列神经系统症状,易误诊为HE,如继续限钠、利尿治疗,低渗性脑病病死率可高达100%^[4]。本文9例误诊患者均有腹水,均存在上述诱因。酒精性肝硬化为临床肝硬化常见病因之一。长期饮酒者中枢神经系统处于抑制状态,突然戒酒或骤然减量,则失去抑制作用,导致交感神经系统被激活,引起酒精戒断综合征:如明显震颤及出汗,幻觉及意识障碍,并有定向力和近期记忆力障碍,易与HE混淆。本组误诊病例经详细询问病史,都有突然戒酒或骤然减量诱因,纳洛酮治疗症状迅速缓解。注意酒精戒断综合征患者的手震颤与HE的扑翼样震颤鉴别:前者是双上肢甚至四肢、全身的抖动,后者是举起双上肢时特异的掌指关节的扑翼样震动^[5]。Wernicke脑病首先Cal Wernicke于1881年报道,是维生素B1缺乏所致的营养缺乏性疾病。临床以“眼肌瘫痪、共济失调、精神及意识障碍”三联症为主要表现^[6]。患者可突发自知力、定向力障碍,焦虑不安,精神错乱,意识障碍,也可能与HE混淆。2例误诊病例经医师详细检查均有共济失调表现,予维生素B1、烟酸治疗后症状消失。肝病患者出现低血糖昏迷,一是肝源性糖尿病使用胰岛素过程中,一是重型肝炎、肝癌患者。肝源性糖尿病多继发于慢性肝炎、肝硬化,是指继发于肝实质损害的糖尿病,临床表现以高血糖,葡萄糖耐量减低为特征^[7]。治疗原则上禁用口服降糖药,主要是因为多数药物存在肝损害,应尽量早用胰岛素^[8]。在用胰岛素过程中容易出现低血糖昏迷,患者可能有躁动不安等表现,易与HE混淆,但注意测血糖<2.8 mmol/L,既能明确诊断。重型肝炎患者,当肝细胞损害超过80%

时, 几乎均伴有糖代谢异常, 其中70%表现为低血糖^[9]. 是因肝细胞大面积坏死, 致使肝糖原耗竭, 肝糖原合成和糖异生作用减弱, 对胰岛素的分解作用降低导致. 肝癌患者, 肿瘤组织过多利用葡萄糖, 还可以分泌异常激素或类胰岛素样物质, 亦能导致低血糖^[10]. 后两类患者出现肝源性低血糖症与肝病经过相平行, 肝病改善低血糖的好转, 预后往往取决于肝病的病情. 严重肝病造成合成凝血因子功能严重障碍, 凝血酶原时间显著延长, 容易发生自发性出血, 当颅内出血时, 临床出现神志改变与肝衰竭后期的HE的症状十分相似, 易于误诊、漏诊^[11]. 此2例患者经全面分析均有颅内出血表现: 如头痛、呕吐、神志改变、偏瘫等, 神经系统检查有定位体征, 均未引出扑翼样震颤, CT证实为颅内出血. 因颅内出血病情凶险, 常突然致脑疝形成, 临床医师应特别重视. 代谢性酸中毒昏迷, 病因常是肾功衰、糖尿病酮症酸中毒、酒精中毒等, 因有特殊病因, 且有明确的实验室检查依据, 一般不易与HE混淆, 此例误诊病例基础疾病为肝炎肝硬化、乙肝相关肾, 早期误诊系临床医师先入为主, 只想到患者有肝硬化, 未想到有乙肝相关肾, 已经是尿毒症期.

误诊原因, 临床诊断思维狭隘, 先入为主: 所有病例均为慢性肝病患者, 且多数为肝硬化, 患者一旦出现神经精神症状, 受习惯思维的影响, 易先入为主, 考虑为HE. 对病情缺乏全面分析: 所有病例均有神经精神症状, 临床医师只局限于HE的诊断, 未考虑到脑部疾病、慢性酒精中毒、低血糖、代谢性酸中毒等其他可引起相同症状的疾病. 且HE应该有明确的诱因: 如上消化道出血、高蛋白饮食、感染、大量排钾利尿、放腹水、便秘等, 而误诊病例往往缺乏明确诱因. 问诊不仔细, 查体不全面: 低渗性脑病9例均有长期严格限制钠盐摄入, 且在治疗中都应用了利尿剂, 从而诱发低渗性脑病; 酒精戒断综合征病例, 都有近期突然中断饮酒, 而问诊时忽视对近期饮酒史的询问; 慢性酒精中毒Wernicke脑病查体均有共济失调表现, 但早期误诊时未详细查体; 脑出血昏迷患者的神经系统检查不仔细, 出现一侧肢体活动障碍后才认真检查. 对肝性脑病诊断及鉴别诊断不熟悉: 注意肝硬化患者, 如无明确发生肝性脑病诱因, 大多

应考虑其他疾病, 即应该注意HE的鉴别诊断. 本文误诊病例中有一点值得注意: 患者大多数都有血氨轻度升高, 这可能也是误诊原因之一. 氨中毒学说是HE的重要发病机制^[12], 但血氨升高并不是HE确诊依据, 特别是基础疾病为肝硬化的, 血氨的含量与病情不一定呈平行关系^[13], 临床中我们也可看见有的患者已深昏迷, 血氨含量却不高, 而有的肝硬化患者血氨含量 $\geq 200 \mu\text{mol/L}$, 神志却较清醒. 因为肝硬化患者, 常伴有门脉高压, 门体侧支循环建立, 以致来自肠道的氨不经肝脏解毒而直接进入体循环, 致使血氨增高; 加上肝硬化患者肝脏解毒能力减弱, 清除血氨的能力也不足, 也致血氨进一步增加. 个别肝硬化患者的血氨很高却不发生肝性脑病, 考虑个体“氨耐受”或“氨适应”差异有关.

临床医师应该重视肝性脑病诊断及鉴别诊断, 对肝病患者出现神经精神症状, 应全面询问病史及仔细查体, 及早进行相关的实验室检查, 从诊断思维入手进行病因分析, 避免误诊.

4 参考文献

- 1 陈灏珠, 廖履坦, 杨秉辉. 实用内科学. 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 2026, 2031
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- 3 Cárdenas A, Arroyo V. Mechanisms of water and sodium retention in cirrhosis and the pathogenesis of ascites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 607-622
- 4 刘军, 夏荣, 刘冰. 肝硬化低钠血症与相关合并症的治疗. *中国老年学杂志* 2005; 28: 973-97
- 5 李娟, 梁颖茵, 李鸣, 王莺, 林红征, 徐雅. 酒精性肝病合并酒精性戒断综合征32例临床分析. *临床误诊误治* 2006; 19: 37
- 6 韩顺昌, 蒲传强, 黄旭升, 郎森阳, 吴卫平, 王培福. Wernicke脑病的临床、影像学及病理特点. *临床神经病学杂志* 2006; 19: 167-169
- 7 Sibley SD, Palmer JP, Hirsch IB, Brunzell JD. Visceral obesity, hepatic lipase activity, and dyslipidemia in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3379-3384
- 8 姜丽萍, 赵金满. 肝源性糖尿病的诊断与治疗. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 617-621
- 9 陈萍. 血糖水平对重型肝炎患者预后影响的分析. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 572-573
- 10 麦泉云, 杨新疆. 低血糖昏迷31例误诊分析. *右江民族医学院学报* 2005; 27: 389-390
- 11 黄国栋, 曹红, 崇雨田, 麦丽, 赵志新. 肝衰竭并发颅内出血13例临床特点及误诊分析. *广东医学* 2006; 27: 404-405
- 12 Lu LG. [Pathogenesis of hepatic encephalopathy] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 304
- 13 周镇先. 血氨水平与肝性脑病关系的再认识. *江苏医药* 2003; 29: 560

编辑 李军亮 电编 何基才

终末期肝病肾脏损坏的临床与病理关系

董建平, 田国保, 谢雯, 张维燕, 张黔英, 曾争

■背景资料

部分终末期肝病
患者发生肾功能
不全后, 临床上根
据病史及临床特
点多诊断为肝肾
综合征, 即肾脏功
能性变化, 但病理
学证据并不充分。

董建平, 田国保, 北京市海淀区医院感染科 北京市 100080
谢雯, 张维燕, 北京地坛医院内科 北京市 100011
张黔英, 北京地坛医院病理科 北京市 100011
曾争, 北京大学第一医院感染疾病科, 北京市 100034
作者贡献分布: 此课题由谢雯与董建平设计; 研究过程由董建
平, 田国保, 张维燕及张黔英完成; 数据分析由董建平与田国保
完成; 本论文写作由董建平, 田国保及曾争完成。
通讯作者: 谢雯, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13
号, 北京地坛医院内科, xiewen6218@sohu.com
电话: 010-64211031-2457 传真: 010-64227308
收稿日期: 2008-04-09 修回日期: 2008-05-18
接受日期: 2008-05-27 在线出版日期: 2008-07-08

Relationship between clinical renal dysfunction and renal pathology in patients with end-stage liver disease

Jian-Ping Dong, Guo-Bao Tian, Wen Xie,
Wei-Yan Zhang, Qian-Yin Zhang, Zheng Zeng

Jian-Ping Dong, Guo-Bao Tian, Department of Infectious
Diseases, Haidian Hospital, Beijing 100080, China
Wen Xie, Wei-Yan Zhang, Department of Internal Medi-
cine, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Qian-Yin Zhang, Department of Pathology, Beijing Ditan
Hospital, Beijing 100011, China
Zheng Zeng, Department of Infectious Diseases, Peking
University First Hospital, Beijing 100034, China
Correspondence to: Wen Xie, Department of Internal
Medicine, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai
Avenue, Dongcheng District, Beijing 100011,
China. xiewen6218@sohu.com
Received: 2008-04-09 Revised: 2008-05-18
Accepted: 2008-05-27 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship of clinical renal dysfunction and renal pathology in patients with end-stage liver disease (ESLD).

METHODS: Clinical and autopsy data were retrospectively analyzed of 45 patients who died of ESLD in Beijing Ditan Hospital and the relationship of clinical renal dysfunction and renal pathology in ESLD patients was studied.

RESULTS: All 45 patients presented with no definite urinary systemic diseases and had no history of systemic diseases such as hypertension, diabetes mellitus, etc. Of 45 patients, 30 patients had renal dysfunction was and almost

all the patients suffered from ascites of variable degree. Risk of renal dysfunction increased significantly in patients complicated with intra-abdominal infection while renal dysfunction was not correlated with alimentary tract hemorrhage or hepatic encephalopathy. ($\chi^2 = 8.332, P = 0.004, OR = 7.2, 95\% CI: 1.75-29.6$). Irrespective of renal dysfunction, renal pathological alterations were observed in most of the patients (41/45, 91.1%), for example, renal failure (68.9%), chronic glomerular nephritis(15.6%), and suppurative nephritis(4.4%), only 5 (11.1%) cases showed no significant renal dysfunctional alteration.

CONCLUSION: When renal dysfunction occurs in ESLD patients, it's complicated with prerenal and/or renal factors, and usually organic alterations are observed.

Key Words: End-stage liver disease; Renal failure; Pathology

Dong JP, Tian GB, Xie W, Zhang WY, Zhang QY, Zeng Z. Relationship between clinical renal dysfunction and renal pathology in patients with end-stage liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2184-2187

摘要

目的: 探讨终末期肝病患者的肾脏损坏的临床与肾脏病理学改变之间的联系。

方法: 回顾性分析45例在北京地坛医院住院期间死于终末期肝病患者的临床与尸解资料, 研究肾脏损坏临床与肾脏病理学改变之间的联系。

结果: 45例患者均无明确的泌尿系统疾病和高血压、糖尿病等全身性疾病病史, 其中30例(66.7%)有肾功能不全表现, 几乎所有患者均有不同程度的腹水(44/45, 98%), 其中合并有腹腔感染的患者发生肾功能不全的风险明显增高($\chi^2 = 8.332, P = 0.004, OR = 7.2, 95\% CI: 1.75-29.6$), 而消化道出血、肝性脑病与肾功能不全的发生无相关性。临床无论是否有肾功能不全表现, 绝大多数患者(41/45, 91.1%)均有不同程度的肾脏病理学改变, 其中表现为肾

■同行评议者

吴君, 主任医师,
贵州省贵阳市贵
阳医学院附属医
院感染科

功能衰竭的有31例(68.9%), 慢性肾小球肾炎的有7例(15.6%), 化脓性肾炎的有2例(4.4%), 无明显病理学改变5例(11.1%)。

结论: 终末期肝病患者发生肾衰竭后, 病情危重、进展快, 可能同时合并有肾前性及肾性病因及诱因, 且病理学多有器质性改变。

关键词: 终末期肝病, 肾衰竭, 病理学

董建平, 田国保, 谢雯, 张维燕, 张黔英, 曾争. 终末期肝病肾脏损坏的临床与病理关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(19): 2184-2187

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2184.asp>

0 引言

终末期肝病是指各种原因(包括病毒性肝炎、自身免疫性肝炎等)所致肝脏功能急剧恶化, 包括肝硬化失代偿期、慢性重型肝炎等, 其往往伴有肾脏病理和功能变化^[1]. 本研究回顾性的分析近些年来45例死于肝衰竭患者的临床与尸解资料, 重点探讨终末期肝病肾脏损害的临床特点与病理联系, 为临床治疗提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 材料 北京地坛医院住院期间(1998-2007)死于终末期肝病的患者45例, 按照2000年(西安)全国病毒性肝炎会议诊断标准, 经病理诊断为肝硬化28例(包括乙肝26例, 乙肝并酒精肝1例, 酒精肝1例), 男性26例, 女性2例, 年龄 57.8 ± 14.1 岁, 慢性重型肝炎16例(包括乙肝14例, 乙肝并丙肝1例, 自免肝1例), 男性14例, 女性2例, 年龄 56.3 ± 7.6 岁, 亚急性重型肝炎1例(戊肝), 男性, 62岁. 所有患者均无明确的泌尿系统疾病和高血压、糖尿病等全身性疾病病史, 治疗中亦无明确的肾毒性药物应用史。

1.2 方法 45例患者中, 几乎所有患者有不同程度的腹水, 其中31例(69%)合并有腹腔感染, 均使用过利尿剂(螺内酯, 氢氯噻嗪, 呋塞米等), 且伴有电解质紊乱, 如低钠血症, 高钾血症等, 13例肝硬化和所有的慢重肝及亚重肝病例临床上表现有肾功能不全, 如少尿(<400 mL/d), 肌酐及尿素氮持续升高(>1.5 g/L, 24 h肌酐清除率 <40 mL/min), 水电解质酸碱平衡紊乱等。

所有尸解病理分析均由北京地坛医院病理科完成, 肾活检标本均行HE、PAS等染色, 光镜下观察肾小球、肾间质和肾小管、肾小血管病变的性质及程度. 肾脏病理诊断标准为, 如肾小

球及肾小管水肿变性, 部分坏死机化, 部分可见蛋白管型、颗粒管型、透明管型等诊断为肾功能衰竭; 部分($>50\%$)肾小球固缩($>50\%$), 肾小管上皮细胞变性、水肿, 诊断为慢性肾小球肾炎; 肾脏出现化脓性病灶, 诊断为化脓性肾炎; 仅有肾小球及肾小管水肿变性则诊断为功能性改变。

统计学处理 采用SPSS10.0统计学软件包, 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验。

2 结果

2.1 临床资料 45例患者中, 其中30例(66.7%)有肾功能不全表现, 15例(33.3%)无肾功能不全表现, 几乎所有患者均有不同程度的腹水(44/45, 98%), 其中合并有腹腔感染的患者发生肾功能不全的风险明显增高($\chi^2 = 8.332, P = 0.004 < 0.01, OR = 7.2, 95\% CI: 1.75-29.6$), 而是否同时合并有消化道出血($\chi^2 = 1.8, P = 0.18 > 0.05$)、肝性脑病($\chi^2 = 2.205, P = 0.138 > 0.05$)与肾功能不全的发生与否, 两者之间差异无统计学意义(图1). 而合并有感染中毒性休克的两例患者均发生了急性肾衰竭. 尽管本组资料临床上多数发生肾功能不全的患者被诊断为肝肾综合征, 但是根据国际腹水协会诊断肝肾综合征的标准, 本资料不足以除外由于进行性加重的细菌感染、失血、失液等所致肾衰竭。

2.2 肾脏病理 所有病例均无明确泌尿系统疾病和高血压、糖尿病等全身性疾病, 然而临床无论是否有肾功能不全表现, 绝大多数病例(40/45, 89.9%)均有不同程度的肾脏病理学改变, 其中, 表现为肾功能衰竭的有31例(68.9%), 表现为慢性肾小球肾炎的有7例(15.6%), 表现为化脓性肾炎的有2例(4.4%), 无明显病理学改变的5例(11.1%, 图2)。

2.3 临床与病理关系 无论临床上是否有肾功能不全的表现, 而实际中绝大多数患者均有不同程度的肾脏病理学改变, 其中, 15例患者尽管临床上没有肾功能不全表现, 13例患者均表现为部分肾小球及肾小管坏死、机化等急性肾衰竭表现, 主要合并症有消化道出血(第1位)、腹水(腹腔感染)及肺部感染等, 而30例患者临床上表现为肾功能不全, 且18例病理学表现为肾衰竭, 主要合并症为腹水(腹腔感染, 第1位)、消化道出血及肺部感染等; 尽管所有患者均无明确肾脏病史, 但是病理学显示7例为慢性肾小球肾炎, 其中6例临床表现为肾功能不全; 2例临床上表现为感染中毒性休克的患者, 肾脏病理示为化

■ 相关报道

国内外有报道终末期肝病肾脏多有器质性改变, 但未结合临床特点分析其原因及可能机制。

■创新盘点

本文系统回顾分析终末期肝病患者的尸解肾脏病理资料与临床特点,探讨两者之间的联系,为肝病患者出现肾功能损坏后的诊治提供参考。

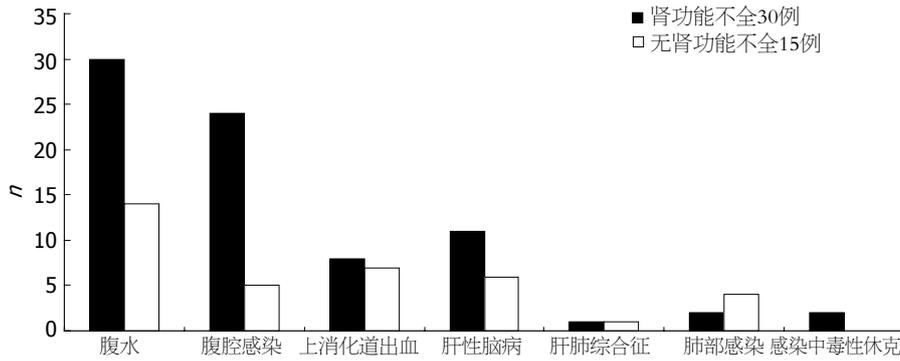


图 1 45例患者的临床并发症.

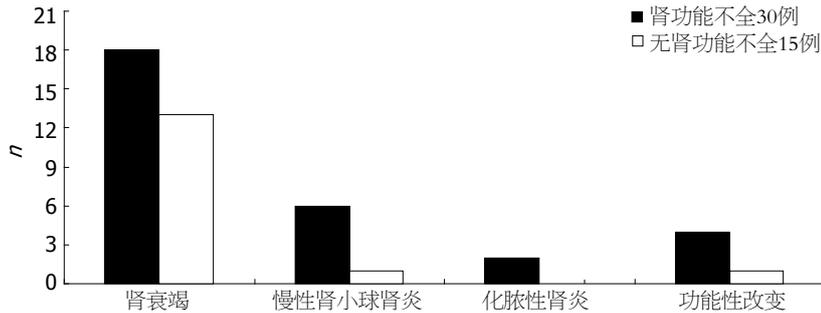


图 2 45例患者肾脏病理学表现.

脓性肾炎; 尽管临床上绝大多数患者诊断为肝肾综合征, 但实际仅4例病例病理学表现为肾小球及肾小管变性、水肿等功能性变化, 即可确诊为肝肾综合征。

3 讨论

急性肾衰竭是终末期肝病常见的并发症之一, 其原因可分为三类: 肾前性、肾性及肾后性. 肾前性的原因包括体液丧失、药物诱发的肾素-血管紧张素系统的激活、有效循环血容量的减少以及持续的低血压等, 例如食管胃底静脉曲张破裂大出血、大量腹水伴液体摄入不足、利尿剂的大量应用及口服大量乳果糖导致腹泻等; 肾性的原因主要包括肾缺血(感染中毒性休克)及肾毒性药物(两性霉素B和氨基糖甙类抗生素)的应用所致的急性肾小管坏死, 药物超敏反应所致的间质性肾炎, 常见药物包括环丙沙星、左氧氟沙星、头孢菌素、NSAIDs及各种利尿剂(氢氯噻嗪、呋塞米、氨苯喋啶及布美他尼), 各种肾小球肾炎, 如慢性肾小球肾炎、膜性肾小球肾炎等; 肾后性的原因包括各种原因所致尿路梗阻及肾盂肾炎等^[2]. 针对特定患者来说, 导致肾衰竭的原因可能是多个因素综合作用的结果, 因此, 有必要仔细分析导致肾衰竭的诱因及病因, 从而积极祛除诱因及病因, 预防和治疗肾衰竭^[3].

本组资料中有30例患者临床上出现了肾功能不全表现, 分析临床特点提示由于合并大

量腹水(和腹腔感染)而给予反复大量放腹水、利尿及大剂量抗生素抗感染治疗是最主要的诱发因素, 其次是消化道大出血及肺部感染, 而且肾脏病理提示绝大多数患者表现有部分肾小球及肾小管变性坏死等肾衰竭, 部分患者表现为慢性肾小球肾炎及化脓性肾炎表现, 提示终末期肝病发生肾衰竭后, 同时多有病理学上急性肾衰竭表现, 其中尽管临床无典型肾小球肾炎表现及肾脏病史, 但部分病例可能同时合并有肾小球肾炎等器质性肾脏疾病, 与国内学者^[4-5]的研究基本一致, 值得一提的是其中4例病例病理学表现为肾小球及肾小管变性、水肿等功能性变化, 即病理学上可确诊为肝肾综合征^[6], 分析这4例患者特点后提示, 相对年轻(40-47岁)、肝硬化病史短及肝功能Child-Pugh A级的患者临床上出现肾衰竭后, 肾脏病理学可表现为功能性变化. 从而也提示终末期肝病发生肾功能不全后, 对于绝大多数患者, 特别是年龄大、病史长及肝功能较差的患者, 应该积极严格按急性肾衰竭治疗原则来进行治疗, 如祛除病因及诱因, 严格“量入为出”, 限制水钠摄入, 纠正电解质酸碱平衡紊乱及低蛋白高热量等治疗, 而不仅仅是扩容、使用血管活性药物等治疗^[7].

本组资料中有15例患者临床上没有肾功能不全表现, 但13例患者肾脏均有部分肾小球及肾小管坏死、机化等急性肾衰竭表现, 提示肾

功能损害与肾脏病理学改变并不一致, 并且根据尿量、肌酐及尿素氮水平、肌酐清除率、肾小球滤过率(根据Cockcroft-Gault公式计算)等来判断终末期肝病患者肾脏功能变化的方法并不敏感, 可能与终末期肝病患者体重指数下降、低蛋白饮食、严重的高胆红素血症、肝脏合成肌酐能力下降、骨骼肌产生肌酐减少以及大量液体输注等所致血清肌酐水平偏低有关, 从而高估肌酐清除率^[8], 国外学者^[9-10]以肝硬化代偿期患者为对象, 以菊糖清除率为标准评估肾功能, 研究发现血清肌酐水平、肾小球滤过率、肌酐清除率的敏感性分别为18.5%、51%及74%, 另外可能与肾脏有较强的代偿功能有关, 有研究表明当50%肾小球发生变性坏死后, 血肌酐才开始升高, 也有研究表明老年人少尿的标准应为700-900 mL^[11], 而且血清肌酐轻微升高与慢性肾脏损害的肾脏功能急剧恶化有关^[12], 提示临床上针对年龄大、病史长及肝功能较差的患者, 特别是尿量较前减少(<900 mL), 血肌酐已有轻度升高的患者, 应该积极预防急性肾衰竭的发生, 如谨慎放腹水、利尿, 监测血容量变化以及尿量变化, 慎用或减量应用肾毒性药物. 其中一例年轻肝病入院时无腹水等并发症表现, 住院期间发生上消化道大出血后经抢救无效死亡, 肾脏病理学表现为急性肾衰竭表现, 提示可能为肾前性肾衰竭.

总之, 尽管无明确的肾脏病、糖尿病、高血压等病史, 终末期肝病发生肾衰竭后, 病情危重、进展快, 分析可能同时合并有肾前性及肾性病因及诱因, 而且病理学多有器质性改

变, 因此, 有必要研究新的早期评估肾功能指标, 积极祛除诱因及病因, 预防和治疗肾衰竭^[13].

4 参考文献

- 1 刘德恭, 郭雁宾, 王贞彪, 俞雁平, 孟忻. 乙型肝炎肝硬化肾脏损害的免疫病理与临床关系探讨. 中华实验和临床病毒学杂志 1995; 9: 221-223
- 2 Pham PT, Pham PC, Rastogi A, Wilkinson AH. Review article: current management of renal dysfunction in the cirrhotic patient. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 949-961
- 3 Betrosian AP, Agarwal B, Douzinas EE. Acute renal dysfunction in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5552-5559
- 4 王贞彪, 刘德恭, 郭雁宾, 朗振为, 孟忻. 急性亚急性重型肝炎46例尸检与临床关系的分析. 中华实验和临床病毒学杂志 1998; 12: 188-189
- 5 崔世昌, 金瑞, 朗振为, 庞永立, 吴改娥. 肝功能衰竭并发黄疸肾68例分析. *肝脏* 2000; 12: 250-251
- 6 王静艳, 刘沛. 肝肾综合症的发病机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2668-2670
- 7 张斌, 万谟彬, 王灵台. 肝肾综合症的治疗进展. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 330-333
- 8 DA Distant, TA Gonwa. The kidney in liver transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 129-136
- 9 Caregaro L, Menon F, Angeli P, Amodio P, Merkel C, Bortoluzzi A, Alberino F, Gatta A. Limitations of serum creatinine level and creatinine clearance as filtration markers in cirrhosis. *Arch Intern Med* 1994; 154: 201-205
- 10 Sherman DS, Fish DN, Teitelbaum I. Assessing renal function in cirrhotic patients: problems and pitfalls. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 269-278
- 11 蹇在金, 韩卓辉, 莫正生, 伍汉文, 谢景超, 陈学杰. 老年人少尿标准的探讨. *中华肾脏病杂志* 1992; 8: 282-283
- 12 张路霞, 王梅, 王海燕. 慢性肾脏病基础上的急性肾功能衰竭. *中华肾脏病杂志* 2003; 19: 78-81
- 13 施晓松, 石永兵, 沈华英, 宋镭. 慢性肾病患者肾功能指标与肾脏病理变化的关系研究. *中国实用内科杂志* 2007; 27: 213-214

■同行评价

本文选题对临床有指导意义, 文字质量较好, 但新颖性不够, 学术价值一般.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录.(常务副总编辑: 张海宁 2008-07-08)

遗传性胰腺炎临床和遗传特点分析13例

骆休, 吴志雄, 刘奇才, 陈志东

■背景资料

自1952年Comfort *et al*报告首例HP家系以来, 全世界已累计报告约100余家系, 500余患者, 主要集中在北美及欧洲地区, 日本亦有报告, 我国仅见个案报告, 北京大学第一医院外科2001年诊治HP 2例, 虽有明确家族史, 但未行遗传学检测。

骆休, 华中科技大学同济医学院 湖北省武汉市 430030
吴志雄, 刘奇才, 福建医科大学附属第一医院检验科 福建省福州市 350005
刘奇才, 福建医科大学基因诊断研究室 福建省福州市 350005
陈志东, 福建医科大学附属第一医院消化科 福建省福州市 350005
通讯作者: 刘奇才, 350005, 福建省福州市茶中路20号, 福建医科大学附属第一医院检验科, lqc673@yahoo.com.cn
电话: 0591-87982327
收稿日期: 2007-09-06 修回日期: 2008-06-11
接受日期: 2008-06-13 在线出版日期: 2008-07-08

Clinical and hereditary characteristics of hereditary pancreatitis: an analysis of 13 cases

Xiu Luo, Zhi-Xiong Wu, Qi-Cai Liu, Zhi-Dong Chen

Xiu Luo, Tongji Medical College, Huazhong University of Science, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Zhi-Xiong Wu, Qi-Cai Liu, Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China
Qi-Cai Liu, Department of Genetic Diagnosis, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China
Zhi-Dong Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China
Correspondence to: Dr. Qi-Cai Liu, Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, 20 Chazhong Road, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. lqc673@yahoo.com.cn
Received: 2007-09-06 Revised: 2008-06-11
Accepted: 2008-06-13 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To study the clinical manifestations and genetic characteristics of hereditary pancreatitis (HP).

METHODS: We retrospectively reviewed the clinical data of 13 HP patients (10 from 3 families, and 3 sporadic cases).

RESULTS: The ages of the 10 patients from 3 families ranged from 8 to 48 years old (7 cases less than 20 years old and 3 cases more than 20 years old), and the mutation of protease serine 1 (PRSS1) gene occurred frequently. The clinical manifestations were various and recurrent ab-

dominal pain was an important sign. Dominant heredity was the genetic character, and HP occurred earlier in the next generation. The 3 sporadic cases were all above 25 years old.

CONCLUSION: HP has various clinical manifestations and genetic anticipation characteristic.

Key Words: Hereditary pancreatitis; Pancreatic disease; Clinical character

Luo X, Wu ZX, Liu QC, Chen ZD. Clinical and hereditary characteristics of hereditary pancreatitis: an analysis of 13 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2188-2190

摘要

目的: 研究遗传性胰腺炎(hereditary pancreatitis, HP)的临床表现和遗传特征。

方法: 回顾性分析3个家系的10例HP患者和3例散发病例的临床资料并随访观察。

结果: 3个家系的HP患者起病年龄为8-46岁(平均23.8)岁, <20岁起病7例, >20岁起病3例, 以胰蛋白酶原基因(protease serine 1, PRSS1)突变多见。临床表现复杂多样, 反复腹痛是该病的重要体征, 为常染色体显性遗传。散发病例起病年龄均>25岁。其中1个两代成员发病的家系中, 均有随代数延续、发病年龄提前的现象。

结论: 遗传性胰腺炎具有临床异质性、遗传异质性及遗传早现的特征。

关键词: 遗传性胰腺炎; 胰腺疾病; 临床特征

骆休, 吴志雄, 刘奇才, 陈志东. 遗传性胰腺炎临床和遗传特点分析13例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2188-2190
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2188.asp>

0 引言

遗传性胰腺炎(hereditary pancreatitis, HP)是一种罕见的胰腺疾病, 1952年由Comfort和Steinberg详细论述^[1]. HP是临床表现和遗传学特点复杂多样的疾病. 其主要特征为反复腹痛、腹泻, 与急

■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

表 1 HP患者的实验室检测结果

	空腹血糖 (mmol/L)	糖基化血红蛋白 蛋白(%)	乳酸 (mmol/L)	胰抑制素C (mmol/L)	糖类抗原 (mmol/L)
家系1	9.03	6.35	3.00	1.21	260.32
家系2	5.12	3.95	2.73	1.10	17.58
家系3 ^N	6.32	-	-	-	31.23
散发病例	8.14	7.11	4.01	1.24	56.42
参考范围	3.89-6.11	3.8-5.8	1.0-2.1	0.00-1.00	0-27

^N问卷调查的结果.

表 2 HP患者PRSS1突变形式

PRSS1基因突变	氨基酸变化	n
3号外显子136位碱基C→T	leucine(Leu) →phenylalanine(Phe)	2 ^M
3号外显子171位碱基C→T	glycine(Gly) →glycine (Gly)	1 ^M
3号外显子240位碱基A→G	Trp→UAG	2

^M同一家系先证者的胰蛋白酶原基因出现多位点突变, 为中性突变.

性胰腺炎症状类似, 但是其发病的年龄较早(可在10岁前发病), 呈家族聚集性、常染色体显性遗传, 有80%的表型外显率, 见于不同人种. 研究表明, HP是导致胰腺癌的重要因素^[1-3]. 还可合并其他异常表现, 如糖尿病和高脂血症等. 国内报道较少, 现将我院收治的来自3个家系的10例患者和3例散发病例的临床资料报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院收治的HP患者13例, 其中男7例, 女6例, 男:女=1:1, 来自3个家系的10例, 散发病例3例.

1.2 方法 经患者知情同意后, 取胰腺炎患者的外周5 mL EDTA抗凝, 用Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit(promega公司)提取DNA, 按使用说明操作. 应用Primer Express软件自行设计引物, 上游引物: 5'-GGT CCT GGG TCT CAT ACC TT-3'; 下游引物: 5'-GGG TAG GAG GCT TCA CAC TT-3'(由上海生工生物技术公司合成), 该引物扩增产物长度为818 bp. PCR反应体积为50 μL, 含50 ng样品DNA, 0.06 mol/L引物, 0.2 mmol/L dNTP, 10×PCR缓冲液2.5 μL, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 1 U Taq酶(Promega公司). 在PE9700热循环仪上94℃ 60 s→55℃ 60 s→72℃ 60 s, 循环35次, 72℃延长7 min. 15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 观察结果. 使用Tiangen公司胶回收试剂盒, 按使用说明

操作, 回收产物, 产物直接测序由上海生工生物技术公司完成.

2 结果

HP患者起病年龄8-46(平均23.8)岁, 小于20岁起病7例(1-9岁2例, 10-20岁5例), 大于20岁起病3例, 散发病例的发病年龄均大于30岁. 病情反复, 且每次发病均较普通胰腺炎病程长, 达1-6 mo. 在观察的3年中, 1例患者均因胰腺癌死亡. 7例HP患者行腹部磁共振(MRI)检查3例出现胰管扩张, 结石, 其实验室检测结果见表1. HP患者胰蛋白酶原基因(cationic trypsinogen gene, PRSS1)突变形式(表2).

3个家系的父母均为非近亲婚配, 有阳性家族史的家系2个, 共6例患者. 其中, 连续两代均有患病者1个家系, 有2个家系目前仅发现一代发病, 男2例, 女2例. 散发病例3例, 在已知两代以上成员发病的家系中, 有随代数延续, 发病年龄提前, 病情加重的现象.

3 讨论

自1952年Comfort *et al*^[2]报告首例HP家系以来, 全世界已累计报告约100余家系, 500余患者, 主要集中在北美及欧洲地区, 日本亦有报告^[2-5], 我国仅见个案报告^[6], 北京大学第一医院外科2001年诊治HP 2例, 虽有明确家族史, 但未行遗传学

应用要点

HP的研究有助于深化对急、慢性胰腺炎发病机制的认识, 为构建胰腺炎动物模型提供新的思路, 并有可能提出急性慢性胰腺炎防治方法的新举措.

■同行评价

本研究表明遗传性胰腺炎具有临床异质性、遗传异质性及遗传早现的特征, 具有较好的先进性和临床应用价值。

检测. 近期HP渐成为研究热点, HP的研究有助于深化对急、慢性胰腺炎发病机制的认识, 为构建胰腺炎动物模型提供新的思路, 并有可能提出急慢性胰腺炎防治方法的新举措。

家族HP属常染色体显性遗传, 往往在幼年时发病, 反复发作后成慢性胰腺炎, 引起糖尿病、脂肪泻及胰腺钙化. 遗传性胰腺炎的诊断主要依靠病史、家族史和X线检查, 其中以阳性家族史最重要. ERCP是本病最主要的辅助诊断手段, 可帮助了解胰管阻塞部位和性质, 发现胰管扩张及典型的扩张合并狭窄的“湖链样”(chain of lakes)改变, 判断是否需要进行外科手术等, 但ERCP对于遗传性和非遗传性胰腺炎的鉴别无多大帮助. CT检查亦可显示胰管、胆道系统等异常, 如胰腺增大、钙化、假性囊肿等, 但无特异性. 由于基因异常, 导致胰腺的自我保护(防止自我消化)能力降低, 胰酶在胰腺腺体内即被激活, 造成胰腺长期的自我消化和急、慢性炎症. 遗传性胰腺炎主要有3大特点: (1)家族性; (2)儿童及少年就开始发病, 常为反复发作的不同程度的急性胰腺炎, 最后发展为慢性胰腺炎; (3)胰腺导管内的结石常比较大, 大于普通慢性胰腺炎的胰腺导管结石^[6]. 反复的胰腺炎引起的胰实质的反复性或持续性炎性病变, 致使胰腺组织损害, 胰腺部分或广泛纤维化或钙化, 腺泡萎缩, 胰导管内结石形成, 假囊肿形成, 有不同程度的胰腺内、外分泌功能受损。

我们通过分析HP 3个家系发现他们具有以下几个共同特征: (1)呈常染色体显性遗传, 两个家系中均存在男女患者; (2)两个家系中胰腺炎患者均存在PRSSI基因突变. 突变均表现为杂合突变, 突变表现为多种形式, 其一: 胰蛋白酶原基因3号外显子136位碱基存在G→A杂合性突变, 与国际上报道的R122H突变在同一外显子^[7], 表达的氨基酸从亮氨酸(Leu)→苯丙氨酸(Phe), 三维构像与R122H相似^[8], 突变改变识别位点, 不改变胰蛋白酶原的三级结构, 也不改变其催

化活性, 而是在三维立体构像中的精氨酸位于胰蛋白酶催化活性部位及其抑制物结合位点的背面; 其二: 胰蛋白酶原基因3号外显子240位碱基存在G→A杂合性突变, 表达的氨基酸从色氨酸(Trp)→终止密码UAG, 同样也是杂合性突变, 患者的发病年龄与国际上报道的相仿^[4], 但未发现糖尿病症状。

HP的发病年龄、临床表现及病情严重程度差异很大, 癌变率高, 频发的腹痛、腹泻对患者的生存质量影响很大. 本病基因的最终克隆将有助于部分患者的基因诊断, 从而弥补临床诊断的缺陷. 因此, 开展本病分子生物学研究, 探索分子发病机制, 寻求症前诊断及有效的治疗措施具有重要意义。

4 参考文献

- 1 Applebaum-Shapiro SE, Finch R, Pfützer RH, Hepp LA, Gates L, Amann S, Martin S, Ulrich CD 2nd, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis in North America: the Pittsburgh-Midwest Multi-Center Pancreatic Study Group Study. *Pancreatology* 2001; 1: 439-443
- 2 Comfort MW, Steinberg AG. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 1952; 21: 54-63
- 3 Pandya A, Blanton SH, Landa B, Javaheri R, Melvin E, Nance WE, Markello T. Linkage studies in a large kindred with hereditary pancreatitis confirms mapping of the gene to a 16-cM region on 7q. *Genomics* 1996; 38: 227-230
- 4 Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14: 141-145
- 5 Creighton JE, Lyall R, Wilson DI, Curtis A, Charnley RM. Mutations of the cationic trypsinogen gene in patients with hereditary pancreatitis. *Br J Surg* 2000; 87: 170-175
- 6 胡罗建, 杨明方, 郭书本. 遗传性胰腺炎一例. *中华放射学杂志* 2000; 34: 869
- 7 刘奇才, 程祖建, 杨艳, 欧启水. 一个遗传性胰腺炎家系中新发现的胰蛋白酶原基因突变. *遗传* 2007; 29: 341-344
- 8 刘奇才, 郜峰, 许幼仕, 王凤清, 潘云振, 欧启水. 遗传性胰腺炎胰蛋白酶原基因突变分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3514-3517

编辑 李军亮 电编 何基才

采用基因芯片技术筛选黑斑息肉综合征相关基因

戴益琛, 宋于刚, 谢军培, 曾伟

戴益琛, 谢军培, 曾伟, 中国人民解放军174医院消化科 福建省厦门市 361003

宋于刚, 南方医科大学南方医院消化科 广东省广州市 510515

作者贡献分布: 此课题由戴益琛, 宋于刚设计; 研究过程由戴益琛, 宋于刚, 谢军培及曾伟操作完成; 数据分析由戴益琛, 宋于刚, 谢军培及曾伟完成; 本论文写作由戴益琛完成。

通讯作者: 戴益琛, 361003, 福建省厦门市, 中国人民解放军174医院消化科. dyichen@sina.com

电话: 0592-6335542

收稿日期: 2008-03-14 修回日期: 2008-04-23

接受日期: 2008-05-05 在线出版日期: 2008-07-08

Screening and annotation of genes associated with Peutz-Jeghers syndrome using gene chip technique

Yi-Chen Dai, Yu-Gang Song, Jun-Pei Xie, Wei Zeng

Yi-Chen Dai, Jun-Pei Xie, Wei Zeng, Department of Gastroenterology, the 174th Hospital of Chinese PLA, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Yu-Gang Song, Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yi-Chen Dai, Department of Gastroenterology, the 174th Hospital of Chinese PLA, Xiamen 361003, Fujian Province, China. dyichen@sina.com

Received: 2008-03-14 Revised: 2008-04-23

Accepted: 2008-05-05 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To explore the genes associated with Peutz-Jeghers syndrome (PJS) using gene chip technique.

METHODS: Differentially expressed genes of PJS polyps and colorectal adenoma tissues were identified using DNA microarray. Part of differentially expressed genes were identified by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: In comparison with normal mucosa and adenoma, 270 genes were differentially expressed in PJS polyps, of which 166 were up-regulated and 104 were down-regulated. PJS-specific differently expressed genes included EPHB4, EPHB3, EPHB1, EFNB2, EFNA1, COL4A1, COL4A2, COL6A3 and COL6A2.

CONCLUSION: Ephrin, COL4A1, COL4A2, COL6A2 and COL6A3 are the novel genes associated with PJS, and they may play important roles in the pathogenesis of PJS polyps.

Key Words: Peutz-Jeghers syndrome; Microarray; Gene; Reverse transcription polymerase chain reaction

Dai YC, Song YG, Xie JP, Zeng W. Screening and annotation of genes associated with Peutz-Jeghers syndrome using gene chip technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2191-2194

摘要

目的: 探索黑斑息肉综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)特异性相关基因。

方法: 用基因芯片技术研究PJS息肉和大肠腺瘤的基因表达谱, 筛选出两者的差异表达基因, 通过比较, 建立和研究PJS特异的差异基因表达谱, 并以RT-PCR对部分差异表达基因进行检测来验证芯片结果。

结果: 大肠PJS息肉组的270个特异性差异表达的基因, 基因上调166个, 下调104个。PJS息肉部分特异差异表达基因分别为: EPHB4、EPHB3、EPHB1、EFNB2、EFNA1、COL4A1、COL4A2、COL6A3和COL6A2。

结论: Ephrin、COL4A1、COL4A2、COL6A2和COL6A3基因可能是PJS特异性相关基因。

关键词: 黑斑息肉综合征; 微阵列; 基因; 逆转录聚合酶链式反应

戴益琛, 宋于刚, 谢军培, 曾伟. 采用基因芯片技术筛选黑斑息肉综合征相关基因. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2191-2194

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2191.asp>

0 引言

本研究用基因芯片技术研究黑斑息肉综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS)息肉和大肠腺瘤

■背景资料

PJS患者在不同的时期可能存在着不同的基因突变, 即PJS病变是一个多因素作用、多基因参与、多阶段进展的过程。

■同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科; 管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验中医教研室; 李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■ 研发前沿

选择LKB1/STK11基因无突变的大家系,进一步作定位分析,发现新的位点,克隆新的致病基因是当前研究的热点.

表 1 基因差异表达结果

差异表 达基因	腺瘤特 异性变化	PJS息肉特 异性变化	两者相 似的变化
总数	432	270	141
上调	93	166	31
下调	339	104	110

表 2 PJS部分特异差异表达基因

GenBank	Function	Tag	腺瘤	PJS息肉
AI261660	EphB4	EPHB4	1.01	0.48
AA456088	EphB3	EPHB3	0.93	0.40
R48320				
AI732309	EphB1	EPHB1	0.88	0.38
AA461108	ephrin-B2	EFNB2	1.49	0.38
AA857015	ephrin-A1	EFNA1	0.75	0.48
	collagen, type			
AA150402	IV, alpha 1	COL4A1	0.95	2.37
	collagen, type			
AA430540	IV, alpha 2	COL4A2	0.82	2.61
	collagen, type			
R62603	VI, alpha 3	COL6A3	0.92	2.86
	collagen, type			
AA633747	VI, alpha 2	COL6A2	0.87	2.38

的基因表达谱,筛选出两者的差异表达基因,通过比较,建立和研究PJS特异的差异基因表达谱,为PJS形成机制研究及PJS的防治提供的实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠PJS息肉组织3例,大肠腺瘤组织3例,正常大肠黏膜组织7例.留取的新鲜组织标本,用Rnase-Free生理盐水漂洗,以去除血渍和污物,锡纸包裹并标记后迅速冻存于液氮中备用.含有8064个人类靶基因的基因表达谱芯片两张,由深圳微芯生物公司提供,产品编号为CSC-GE-80.用于大肠腺瘤性息肉与正常大肠黏膜组织比较的芯片编号为A,用于大肠PJS息肉与正常大肠黏膜组织比较的芯片编号为B.

1.2 方法 按TRIzol一步法提取样品组织总RNA,经质量检测后,将各组的RNA样品等量混合,进行反转录荧光标记,用Cy3-dUTP标记大肠腺瘤组和大肠PJS息肉组的cDNA,用Cy5-dUTP

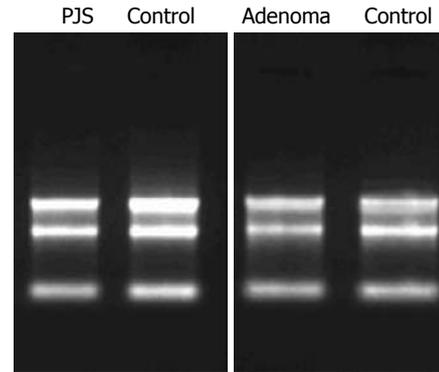


图 1 RNA 15 g/L琼脂糖凝胶电泳.

标记正常大肠黏膜组的cDNA.将已标记的样品cDNA探针与深圳微芯生物公司提供的含有8064个人类靶基因的基因表达谱芯片进行杂交,经清洗、扫描仪扫描荧光图像、提取杂交信号、经转换后以数据形式输出、对数据进行标准化处理后用生物信息学软件进行生物信息学分析.以芯片中密度值在 5×10^8 以上的数据点为有效数据,同时把比值大于2或小于0.5的数据点作为存在显著性表达差异基因点的筛选标准,筛选各组间差异表达基因.

为验证芯片的结果,选取基因在芯片检测中高表达的MYC基因、COL6A3,低表达的KRT8基因、CDKN1A基因和MAPK1基因,与ACTG基因对照,应用半定量RT-PCR的方法检测其在大肠PJS息肉、大肠腺瘤和正常大肠黏膜组织中的表达情况.

2 结果

2.1 总RNA抽提 样品进行总RNA提取并且进行过柱纯化,挑选的四个样品总RNA有清晰的28S和18S条带且没有明显的降解现象,符合芯片实验的要求(图1).

2.2 芯片杂交 杂交后芯片荧光信号强度高,背景较为均一,符合芯片结果的预期和分析的标准(图2).

2.3 基因差异表达 设定的数据筛选标准为以芯片中密度值(Density)在 5×10^8 以上的数据点为有效数据,同时比值(Ratio)大于2或小于0.5的数据点为存在显著性表达差异的基因点,按以上标准,大肠腺瘤与大肠PJS息肉基因差异表达情况见表1. PJS息肉部分特异差异表达基因见表2.

2.4 RT-PCR检测 所有目标基因都有明显的特异性扩增产物,与芯片的结果相比,通过RT-PCR检测的大部分目标基因在两组样品间的表达差异与芯片实验的结果有较好的重复性(表3),从而

表 3 芯片实验结果与RT-PCR实验结果

基因	Tag	腺瘤/对照		息肉/对照	
		芯片数据	RT-PCR数据	芯片数据	RT-PCR数据
Keratin 8	KRT8	0.12	0.11	0.26	0.56
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A(p21, Cip1)	CDKN1A	0.37	0.27	0.68	0.64
V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	MYC	2.85	1.73	1.09	1.11
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	0.20	0.90	0.27	0.02
Collagen, type VI, alpha 3	COL6A3	0.92	0.75	2.86	3.45

■应用要点

本研究找到的PJS相关基因, 为临床干预提供新的靶点.

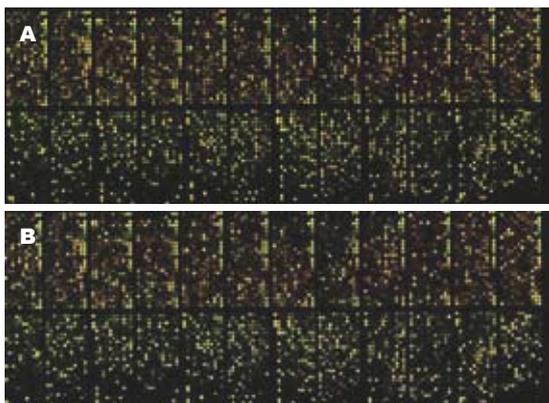


图 2 芯片杂交扫描图. A: 大肠腺瘤; B: PJS息肉.

验证基因芯片结果析可靠性.

3 讨论

PJS患者丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因(LKB1/STK11)突变率在10%-70%^[1-2], 可能还存在遗传异质性, 除了LKB1/STK11外, 可能还有其他未知致病基因^[3-4]. 因此, 选择LKB1/STK11基因无突变的大家系, 进一步作定位分析, 发现新的位点, 克隆新的致病基因是当前研究的热点. 本实验应用8064个人类靶基因点制的基因表达谱芯片研究比较大肠腺瘤和大肠PJS息肉与正常肠黏膜组织的基因差异表达情况, 筛选和分析各组间的差异表达基因. 筛选出的PJS的差异基因表达谱, 为全面了解PJS和大肠腺瘤在分子水平上的变化提供了有价值的生物学信息.

PJS患者在不同的时期可能存在着不同的基因突变, 即PJS病变是一个多因素作用、多基因参与、多阶段进展的过程. 从本组基因芯片结果分析, PJS患者有多个基因的表达发生明显变化, 部分基因表达发生上调, 部分基因表达下调. 比较特征性的变化的有Ephrin通路基因, 胶原成份基因, 肿瘤相关基因, 及细胞因子基因, 这此差异表达的基因, 可能存在PJS患者致病的相关病理基因.

以往的研究表明, Ephrin基因与组织的空

间结构有关^[5,8]. 本研究行基因芯片检查用的PJS息肉为错构瘤性息肉, 其EPHB4、EPHB3、EPHB1、EFNB2、EFNA1的表达均下调, 而腺瘤组织的相应基因表达与正常黏膜相比, 均未明显变化. 表明在PJS患者的胃肠道中, 可能因Ephrin通路调整机体发育的进程受到干扰, 胃肠道黏膜与胃肠道肌层发生错乱, 黏膜下肌层过度生长, 伸入到黏膜组织中, 产生错构瘤样的病理结构, 表明Ephrin基因是错构瘤性息肉的特征性基因.

以往的研究表明, COL4A1和COL4A2与基底膜的生长有关^[9-10]. 本研究结果显示, 在错构瘤中, IV型 α 1基因COL4A1的表达为正常肠道黏膜的2.37倍, 而在腺瘤组织中, COL4A1的表达是正常肠黏膜的0.95倍. IV型 α 2基因COL4A2的表达为正常肠道黏膜的2.61倍, 而在腺瘤组织中, COL4A2的表达是正常肠黏膜的0.82倍. PJS错构瘤的IV型胶原基因表达水平明显比正常肠黏膜增高, 表明PJS错构瘤不仅存在黏膜上皮的过度生长, 也可能有基底膜的过度增殖. 以往的研究表明, COL6A3, COL6A2基因突变与肌肉生长发育有关^[11-12]. PJS错构瘤的VI型胶原基因表达水平明显比正常肠黏膜增高, 其过度表达可能是导致PJS患者胃肠道平滑肌过度发育生长的原因.

PJS患者因Ephrin基因的表达异常, 导致胃肠道黏膜、平滑肌、基底膜的生长的空间结构发生异常, 而COL4A1、COL4A2基因的高表达, 显示细胞的基底膜也出现过度生长, COL6A3, COL6A2基因可能与PJS错构瘤平滑肌的过度增殖有关, 以上多个基因的共同作用, 进而出现错构瘤性改变.

4 参考文献

- 1 Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Loff S, Back W, Pagenstecher C, McLeod DR, Graham GE, Mangold E, Santer R, Propping P, Friedl W. High proportion of large genomic STK11 deletions in Peutz-Jeghers

■同行评价

本文具有较强的创新性,科学性和可读性,对指导临床具有重要意义.

- 2 syndrome. *Hum Mutat* 2005; 26: 513-519
- 2 Scott RJ, Crooks R, Meldrum CJ, Thomas L, Smith CJ, Mowat D, McPhillips M, Spigelman AD. Mutation analysis of the STK11/LKB1 gene and clinical characteristics of an Australian series of Peutz-Jeghers syndrome patients. *Clin Genet* 2002; 62: 282-287
- 3 de Leng WW, Keller JJ, Luiten S, Musler AR, Jansen M, Baas AF, de Rooij FW, Gille JJ, Menko FH, Offerhaus GJ, Weterman MA. STRAD in Peutz-Jeghers syndrome and sporadic cancers. *J Clin Pathol* 2005; 58: 1091-1095
- 4 Hearle N, Lucassen A, Wang R, Lim W, Ross F, Wheeler R, Moore I, Shipley J, Houlston R. Mapping of a translocation breakpoint in a Peutz-Jeghers hamartoma to the putative PJS locus at 19q13.4 and mutation analysis of candidate genes in polyp and STK11-negative PJS cases. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41: 163-169
- 5 Brückner K, Pasquale EB, Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 1997; 275: 1640-1643
- 6 Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 1999; 400: 77-81
- 7 Hafner C, Meyer S, Langmann T, Schmitz G, Bataille F, Hagen I, Becker B, Roesch A, Rogler G, Landthaler M, Vogt T. Ephrin-B2 is differentially expressed in the intestinal epithelium in Crohn's disease and contributes to accelerated epithelial wound healing in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4024-4031
- 8 Hafner C, Meyer S, Hagen I, Becker B, Roesch A, Landthaler M, Vogt T. Ephrin-B reverse signaling induces expression of wound healing associated genes in IEC-6 intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4511-4518
- 9 Gould DB, Phalan FC, Breedveld GJ, van Mil SE, Smith RS, Schimenti JC, Aguglia U, van der Knaap MS, Heutink P, John SW. Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. *Science* 2005; 308: 1167-1171
- 10 Pasco S, Brassart B, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma cell invasion by type IV collagen. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 260-266
- 11 Lampe AK, Dunn DM, von Niederhausern AC, Hamil C, Aoyagi A, Laval SH, Marie SK, Chu ML, Swoboda K, Muntoni F, Bonnemann CG, Flanigan KM, Bushby KM, Weiss RB. Automated genomic sequence analysis of the three collagen VI genes: applications to Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *J Med Genet* 2005; 42: 108-120
- 12 Baker NL, Murgelin M, Peat R, Goemans N, North KN, Bateman JF, Lamandy SR. Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 279-293

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

PNS 与 WJG 论坛会议 - 朱作言院士访问 WJG 纪实

本刊讯 2008-02-18下午15:30-19:30国家自然科学基金朱作言院士参观World Journal of Gastroenterology(WJG)办公室并召开PNS与WJG论坛会议. 随同人员有自然科学基金杂志社祖广安主任, 任胜利博士, 梁平博士及WJG副总编辑, 北京肿瘤医院吕有勇教授.

此次论坛会议主要由WJG主编马连生社长就WJG 14年的成长历程发言. 马社长从国际化期刊崛起的五大要素, 即从主编是期刊的心脏, 编委是期刊的质量, 员工是期刊的后勤, 作者是期刊的母亲, 读者是期刊的上帝五个方面报告了办刊经验, 并深化了办刊指导思想, 即WJG旨在推广世界各地的胃肠病学和肝病专家临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助. 并将实践经验上升到理论的高度. 同时, 马社长还介绍如何组织策划约稿, 栏目以及WJG走到现在所经历的挫折.

此外, 吕有勇副总编辑还就“学术期刊是科学发现和技术创新的源泉”为题作简要报告. 报告中特别指出如何才能做好一个同行评议审稿人的工作, 并强调同行评议对文章的录用与否起决定性的作用.

会议之余WJG常务副总编辑张海宇陪同朱作言院士参观WJG办公室, 朱作言院士随即考察员工实际的工作情况, 与员工深入交流, 了解同行评议的过程, 电子编辑的排版工作. 会后他表示: 中国需要国际化的期刊杂志, 在当今新的发展形势下, 应加强交流和学习. WJG取得的成功为更多的杂志起了领头羊的作用, 我们会根据各位的介绍适时消化, 希望通过学习, 改进工作, 也希望WJG早日实现IF为6的目标. (编务: 江艳 2008-07-08)

小肠淋巴管扩张症合并病毒性肝炎2例

林香春, 吴静, 高炳霞, 沈文斌

林香春, 吴静, 高炳霞, 北京世纪坛医院消化科 北京市 100038

沈文斌, 北京世纪坛医院淋巴外科 北京市 100038

作者贡献分布: 林香春与吴静对本文贡献均等; 此课题由林香春与吴静设计; 研究过程由林香春, 吴静, 高炳霞及沈文斌操作; 论文写作由林香春与吴静完成。

通讯作者: 林香春, 100038, 北京市海淀区铁医路10号, 北京世纪坛医院消化科, xiangchunlin77@sohu.com

电话: 010-63926370

收稿日期: 2008-03-19 修回日期: 2008-04-15

接受日期: 2008-04-21 在线出版日期: 2008-07-08

Intestinal lymphangiectasia complicated by viral hepatitis: an analysis of 2 cases

Xiang-Chun Lin, Jing Wu, Bing-Xia Gao, Wen-Bin Shen

Xiang-Chun Lin, Jing Wu, Bing-Xia Gao, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Wen-Bin Shen, Department of Lymph Surgery, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Correspondence to: Xiang-Chun Lin, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, 10 Teyi Road, Haidian District, Beijing 100038, China. xiangchunlin77@sohu.com

Received: 2008-03-19 Revised: 2008-04-15

Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-08

Abstract

Two patients in our hospital diagnosed as intestinal lymphangiectasia were studied. The two patients had chronic intestinal lymphangiectasia complicated by virus hepatitis. They presented with edema, abdominal distension and diarrhea. Serological finding indicated hypoproteinemia (including albumin and globulin) and significantly decreased peripheral lymphocytes. Enteroscopy showed that the normal intestinal villous morphology were lost and there were diffuse generalized white-yellowish nodular changes, villous edema and lengthways erosion. Pathological observation revealed the presence of dilated lymphatic vessels without evidence of inflammatory cell infiltration and granuloma.

Key Words: Intestinal lymphangiectasia; Protein-losing enteropathy; Virus hepatitis

Lin XC, Wu J, Gao BX, Shen WB. Intestinal lymphangiectasia

complicated by viral hepatitis: an analysis of 2 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2195-2197

摘要

我院收治小肠淋巴管扩张症2例, 均为慢性病程, 合并病毒性肝炎, 表现浮肿、腹胀、腹泻。辅助检查提示低蛋白血症, 白蛋白及球蛋白均显著降低, 外周血淋巴细胞降低。内镜检查发现小肠黏膜肿胀, 皱襞增粗, 绒毛水肿, 表面可见乳白色乳糜样物质附着, 并可见绒毛顶端乳白色囊泡样改变。2例均发现纵行糜烂。病理见黏膜下淋巴管扩张, 未见炎症细胞浸润及肉芽肿。

关键词: 小肠淋巴管扩张症; 蛋白丢失性肠病; 病毒性肝炎

林香春, 吴静, 高炳霞, 沈文斌. 小肠淋巴管扩张症合并病毒性肝炎2例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2195-2197

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2195.asp>

0 引言

小肠淋巴管扩张症是一种临床少见的蛋白丢失性肠病, 因小肠淋巴管扩张造成淋巴回流受阻, 淋巴乳糜渗漏至肠腔导致蛋白长期丢失。临床表现为水肿、低蛋白血症、腹泻、胸水、腹水。本文报道2例小肠淋巴管扩张症, 并复习相关文献。

1 病例报告

例1: 女性, 55岁, 主因“间断腹泻、乏力12年, 伴腹胀4年”于2007-08-28收住院。患者12年前开始无明显诱因出现腹泻, 大便3-4次/d, 糊状样, 每次大便量多, 伴乏力, 不能正常工作。查血清白蛋白19 g/L, 给予间断补充白蛋白治疗。4年前开始出现腹胀、进食减少, 乏力加重, 在当地医院就诊时发现腹水, 腹水检查为“乳白色”, 并同时发现HCV-Ab阳性, 考虑为“丙肝后肝硬化”予以保肝、利尿等治疗, 病情未见明显好转。2年前在外院行淋巴管造影提示“左侧淋巴管损伤”, 经低脂饮食及中链脂肪酸治疗, 腹水一度减少, 但病情仍有反复。为进一步治疗来我院, 行核素消化道蛋白丢失试验结果为阳性, 以“蛋白丢失性肠病”收入院。既往史: 无特殊。

■背景资料

小肠淋巴管扩张症是一种少见的蛋白丢失性肠病, 表现为水肿、低蛋白血症、腹泻和胸腹水。本文报道2例合并病毒性肝炎的小肠淋巴管扩张症, 结合内镜检查及手术病理, 探讨了小肠淋巴管扩张症的临床表现。

■同行评议者

程爱国, 教授, 华北煤炭医学院临床医学系

同行评价

本病例报道少见,参考文献确切,讨论切题,结论对临床有指导价值.

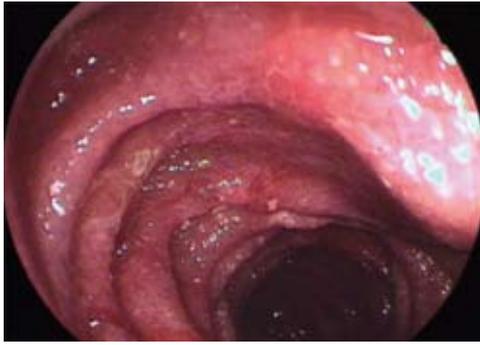


图 1 小肠绒毛肿胀,表面大量乳糜样物质附着,绒毛顶端见乳白色囊泡.

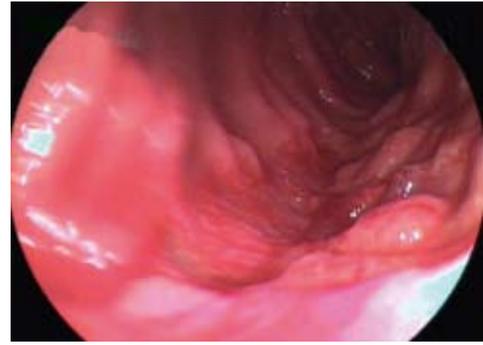


图 2 纵行糜烂,糜烂表面红,边界清楚,周边充血不明显.

入院查体:发育正常,营养差,浅表淋巴结无肿大.心肺未见异常.腹软,无压痛,未及包块,肝脾肋下未触及,腹水征阴性,肠鸣音无减弱及亢进.四肢未见异常.辅助检查:血常规:WBC $8.7 \times 10^9/L$,中性粒细胞86.3%,淋巴细胞5.8%,Hb 11.4 g/L,PLT $166 \times 10^9/L$.尿常规:未见异常.便常规:可见脂肪球,潜血阳性.肝功能:ALT 126 U/L,AST 115 U/L,T-Bil 10.9 $\mu\text{mol/L}$,D-Bil 6.9 $\mu\text{mol/L}$,TP 36.3 g/L,ALB 23.1 g/L.血脂:Tc 3.3 mmol/L,TG 0.37 mmol/L,血钙1.95 mmol/L,血磷0.75 mmol/L. B超检查提示:肝实质弥漫性病变,腹水(少量),双侧胸腔积液. CT检查结果:肝硬化,慢性胆囊炎.于2007-09-19行“术中肠镜检查、小肠部分切除术”.手术中见小肠壁肿胀明显,浆膜下淋巴管扩张.术中肠镜检查提示:距屈氏韧带约20 cm开始可见小肠黏膜水肿,绒毛肿胀,表面有大量直径约2-3 mm的乳白色乳糜附着,并可见绒毛顶端乳白色囊泡样改变,用水不能冲洗干净(图1).距屈氏韧带约40 cm开始见一纵行糜烂,长度约4 cm,宽约1厘米,糜烂表面红,边界清楚,周边充血不明显(图2).距回盲瓣约4 m以下绒毛形态未见异常.因患者回肠有约4 m相对正常而行“空肠部分切除术”.病理提示“黏膜慢性炎,固有层淋巴细胞浸润,黏膜下水肿,淋巴管高度扩张,并可见浆膜下淋巴管扩张,病变符合淋巴管扩张症”(图3).术后恢复良好.出院时血清总蛋白50.3 g/L,白蛋白33.5 g/L.

例2:男性,50岁,主因“间断双下肢浮肿5年,腹胀、腹泻3年”于2007-10-12收住院.患者5年前开始无明显诱因出现双下肢浮肿,在当地查HBsAg阳性,血清白蛋白18 g/L,考虑“肝硬化”给予间断静脉注射白蛋白治疗后,下肢浮肿消失.3年前开始出现腹胀、腹泻,大便3-4次/d,乳白色稀水样,每次大便约300 mL.在当地医

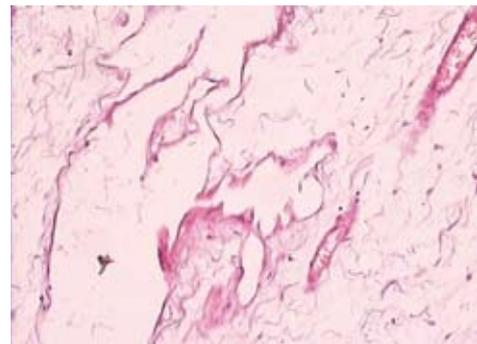


图 3 黏膜下水肿,淋巴管高度扩张.

院就诊发现腹水,血清白蛋白为12 g/L, B超未见肝硬化.5 mo前开始腹胀、腹泻加重,腹水检查提示“乳糜腹水”,肝穿刺未见肝硬化,胃镜及结肠镜检查未见异常,以“蛋白丢失性肠病”收入院.既往史:2型糖尿病5年,乙型肝炎“小三阳”5年.入院查体:发育正常,营养差,浅表淋巴结无肿大.心肺未见异常.腹软,无压痛,未及包块,肝脾肋下未触及,腹水征阳性,肠鸣音无减弱及亢进.四肢未见异常.辅助检查:血常规:WBC $6.7 \times 10^9/L$,中性粒细胞74.9%,淋巴细胞15.6%,Hb 10.6 g/L,PLT $103 \times 10^9/L$.尿常规:未见异常.便常规:未见异常.肝功能:ALT 10 U/L,AST 15 U/L,T-Bil 3.0 $\mu\text{mol/L}$,TP 36.6 g/L,ALB 22.5 g/L,球蛋白11.1 g/L.血脂:Tc 2.96 mmol/L,TG 0.44 mmol/L,血钙1.89 mmol/L,血磷0.75 mmol/L.腹水检查:比重1.033,蛋白46.0 g/L,瑞氏反应阳性,单核细胞98%,多核细胞2%. B超:肝脏未见异常,腹水(少量).全消化道造影:小肠黏膜皱襞增粗,雪片征阳性.淋巴管造影:左髂淋巴管结构紊乱,余未见异常.2007-10-20行“术中结肠镜、小肠部分切除术”.术中肠镜检查发现:距屈氏韧带约50 cm开始可见小肠黏膜水肿明显,绒毛肿胀,表面有较大量约2-3 mm大小的乳白色乳糜附着.距屈氏韧带约170 cm开始见一糜烂,长度约10 cm,宽约2 cm,

糜烂表面红, 边界清楚, 周遍充血不明显. 病变较弥漫, 距回盲瓣15 cm以下绒毛形态未见异常. 行“空肠及部分回肠切除术”. 病理结果提示“黏膜下层结构疏松、水肿, 大量淋巴管扩张、积液. 浆膜疏松, 水肿, 有灶性淋巴细胞浸润”. 术后恢复良好. 出院时血清总蛋白63.0 g/L, 白蛋白38.6 g/L.

2 讨论

小肠淋巴管扩张症是由Waldmann *et al*^[1]于1961年首先报道, 表现为黏膜及黏膜下淋巴管扩张. 本病在临床较少见, 由于小肠淋巴管回流受阻, 小肠绒毛内乳糜管和小肠壁内淋巴管扩张而影响乳糜颗粒的吸收及大量蛋白丢失, 造成低蛋白血症、黏膜及组织水肿、皱襞增粗^[2-3]. 临床表现主要为水肿及腹泻, 约半数患者可有胸腔或腹腔乳糜性积液. 脂肪泻导致患者脂溶性维生素吸收不良、低钙血症. 由于淋巴细胞的溢漏造成外周血淋巴细胞减少是小肠淋巴管扩张症的特征性表现^[4]. 本病分为原发性淋巴管扩张症和继发性淋巴管扩张症. 原发性淋巴管扩张症多见于幼年及青年, 90%在30岁以下发病, 无明显性别差异, 多为散发. 也有文献报道存在遗传倾向. 除小肠淋巴管扩张之外, 还可表现为突额、鼻梁低平、眼距增宽等畸形^[5]. 原发性淋巴管发育不良同时累及其他部位的淋巴管, 临床以浮肿、腹泻为主要症状. 浮肿开始可间断出现, 呈不对称性, 逐渐发展为持续性、对称性. 因此在幼年出现不对称性浮肿, 应高度警惕原发性淋巴管扩张症. 继发性小肠淋巴管扩张症常见于腹部肿瘤、腹膜后淋巴瘤、腹膜后纤维化、慢性胰腺炎、肠系膜结核、结节病、克罗恩病、心功能不全、肝硬化门脉高压症、Whipple病、腹部外伤或手术等. 本病临床少见2例患者均存在浮肿、腹泻及腹胀等典型的临床症状, 辅助检查均存在低蛋白血症, 血清白蛋白及球蛋白均显著下降, 血常规检查发现淋巴细胞减少. 尤其是检查到乳糜腹水, 应考虑本病的可能. 但由于这两例患者均合并肝炎病毒感染, 易与慢性肝病混淆. 肝硬化失代偿期可以表现浮肿、腹泻、腹胀、低蛋白血症、腹水等, 但由于发病机制不同, 表现为白蛋白降低而球蛋白升高, 即白/球蛋白降低. 而小肠淋巴管扩张症是由于包括免疫球蛋白在内的少量蛋白丢失, 导致血清白蛋白与球蛋白均降低. 因此, 血清白蛋白与球蛋白比例是鉴别这两种疾病的重要指标之一.

本病在影像学上有一定的特征性表现, 表现为小肠黏膜弥漫分布的小白点、小息肉样改变, 绒毛肿胀、斑片状或点状黄白色改变等, 病理检查存在黏膜下淋巴管扩张^[8-9]. 我院发现的这两例小肠淋巴管扩张症均进行了术中小肠镜检查, 发现小肠黏膜弥漫肿胀, 皱襞增厚, 绒毛变粗, 可见黄白色乳糜样物质附着, 绒毛顶端白色囊泡样改变, 与文献报道相似. 值得一提的是这两例均在上述表现的基础上存在黏膜糜烂, 糜烂形态为纵行, 长度不一, 边界清楚, 周围未见明显的炎症表现, 复习文献未见相关报道. 病理检查提示黏膜下淋巴管扩张, 未见明显炎症细胞浸润及黏膜下肉芽肿, 可以与克罗恩病相鉴别. 我们推测黏膜下淋巴管严重扩张、破溃可能是形成糜烂的原因. 这种糜烂可能与小肠淋巴管扩张症并发出血^[10]有关.

2例小肠淋巴管扩张症均合并肝炎病毒感染, 患者出现浮肿、低蛋白血症、腹泻等症状时, 要考虑到存在小肠淋巴管扩张症的可能性, 需要关注白蛋白及球蛋白比例, 有必要进一步进行小肠形态学检查以明确诊断.

3 参考文献

- 1 Waldmann TA, Steinfeld JL, Dutcher TF, Davidson JD, Gordon RS Jr. The role of the gastrointestinal system in "idiopathic hypoproteinemia". *Gastroenterology* 1961; 41: 197-207
- 2 Marshak RH, Hazzi C, Lindner AE, Maklansky D. Small bowel in immunoglobulin deficiency syndromes. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1974; 122: 227-240
- 3 Shimkin PM, Waldmann TA, Krugman RL. Intestinal lymphangiectasia. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1970; 110: 827-841
- 4 van Tilburg AJ, van Blankenstein M, Verschoor L. Intestinal lymphangiectasia in systemic sclerosis. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 1418-1419
- 5 黄文柱, 张亚历, 张振书, 但汉雷. 现代小肠病学. 第1版. 北京: 军事医学科学出版社, 2003: 516-517
- 6 Asakura H. Endothelial lamina in intestinal lymphangiectasia. *Gastroenterology* 1987; 92: 1097
- 7 Chen CP, Chao Y, Li CP, Lo WC, Wu CW, Tsay SH, Lee RC, Chang FY. Surgical resection of duodenal lymphangiectasia: a case report. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2880-2882
- 8 王玉环, 黄瑛, 梁英杰, 邵彩虹. 原发性小肠淋巴管扩张症2例并文献复习. *中国循证儿科杂志* 2007; 11: 434-437
- 9 杨爱明, 蔡华聪, 陆星华, 钱家鸣, 麦灿荣, 柯美云, 孙钢, 刘晓红, 方秀才. 小肠淋巴管扩张症的诊断与治疗. *临床消化病杂志* 2007; 19: 80-82
- 10 Herfarth H, Hofstadter F, Feuerbach S, Jurgen Schlitt H, Scholmerich J, Rogler G. A case of recurrent gastrointestinal bleeding and protein-losing gastroenteropathy. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 288-293

编辑 李军亮 电编 郭海丽

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授

南昌大学第一附属医院消化内科

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

曹秀峰 主任医师

南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈立波 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

陈亚军 主任医师

首都医科大学附属北京儿童医院普外科

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

程爱国 教授

华北煤炭医学院临床医学系

龚国忠 教授

中南大学湘雅二医院肝病研究中心

郝纯毅 主任医师

北京肿瘤医院肿瘤外科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

李健丁 教授

山西医科大学第一医院放射科CT室

梁力建 教授

中山大学附属第一医院肝胆外科

刘云鹏 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤内科

吕明德 教授

中山大学附属第一医院肝胆外科

倪润洲 教授

南通大学附属医院消化内科

钱睿 哲教授

复旦大学上海医学院生理与病理生理学系血管分子生物学实验室

谭德明 教授

中南大学湘雅医院感染病科

唐文富 副主任医师

四川大学华西医院中西医结合科

唐晓鹏 教授

中南大学肝病研究所, 中南大学湘雅二医院感染科

王健生 副教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

王学美 研究员

北京大学第一医院中西医结合研究室

吴君 主任医师

贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

吴云林 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院消化科

熊斌 教授

武汉大学中南医院肿瘤科

徐德忠 教授

中国人民解放军第四军医大学流行病学教研室

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

许文燮 教授

上海交通大学生命科学院生物医学工程系

周士胜 教授

大连大学医学院医学研究中心

朱传武 副主任医师

江苏省苏州市第五人民医院传染科