ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

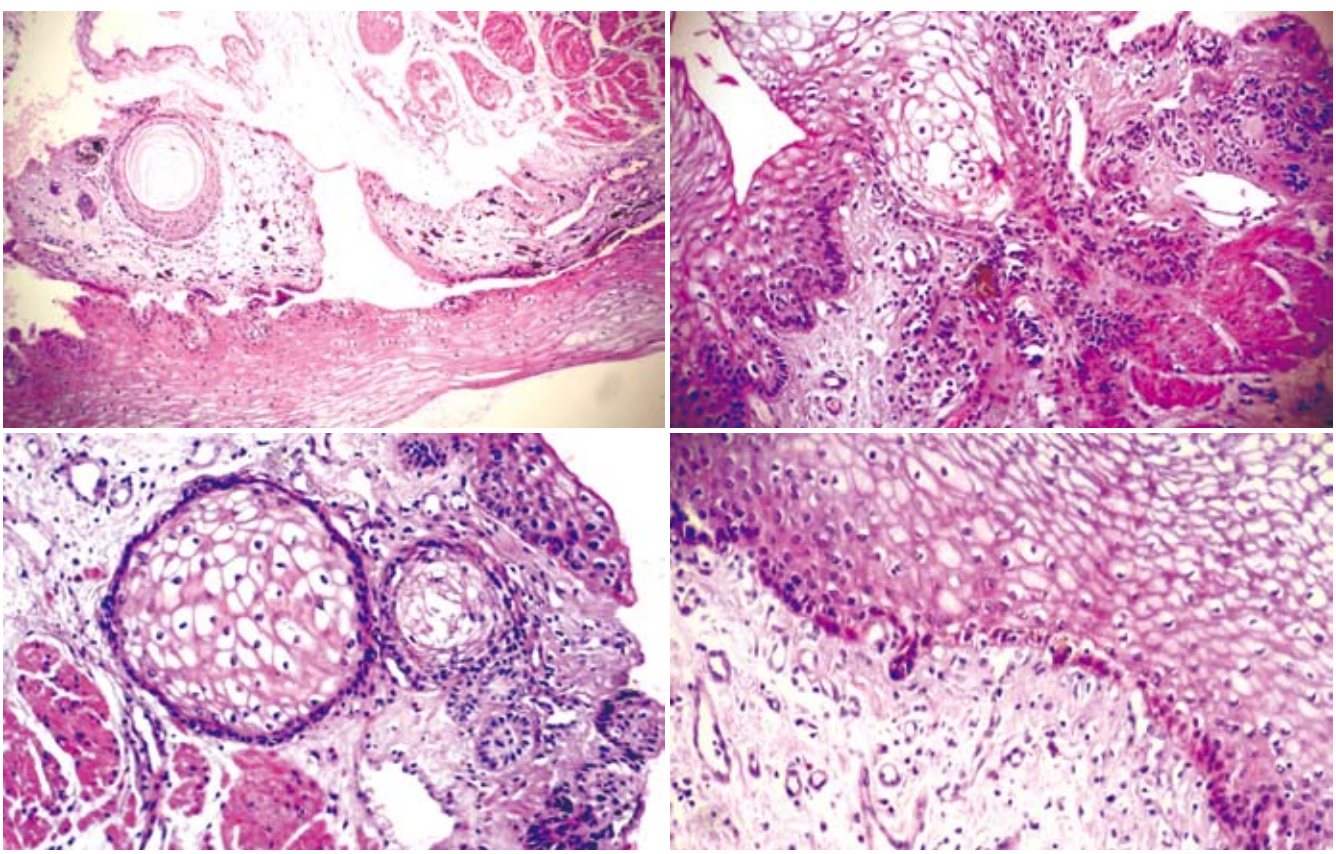
2008 年 8 月 8 日　　第 16 卷　　第 22 期　　(Volume 16 Number 22)

www.wjgnet.com

二零零八年八月八日

第十六卷

第二十二期



22 / 2008

ISSN 1009-3079

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

《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

wcjd@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
苌新明教授
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
唐芙爱教授
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
陈凛教授
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
邰升副教授
谭群友副教授
汤恢焕教授
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
钟德玠教授
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
陈红松副研究员
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
唐霓副研究员
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
杨林副研究员
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
杜群副研究员
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
刘彬彬副研究员
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
阴赖宏研究员
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 8 月 8 日　第 16 卷　第 22 期　(总第246期)

述　评

2443 老年胃癌药物治疗对策
龚继芳, 沈琳

基础研究

2448 聚合酶RNA干扰对小鼠体内乙型肝炎病毒的抑制作用
高海燕, 张建军, 杨向东, 王道理, 卞铁荣, 阳艾玲, 夏纪毅, 耿颖, 黄飞

2453 BMP2 mRNA在大鼠再生肝组织的表达与意义
冀文敏, 许翠萍

2458 hHGF转染HepG2细胞后基因表达谱差异筛选
张维燕, 张锦前, 李晓光, 成军, 李国力, 王琦, 张晨宇, 王晓春, 柴艳云

2464 大鼠骨髓间充质干细胞向类肝细胞体外诱导分化
何文艳, 刘树贤, 姜慧卿

临床研究

2470 胃癌及癌前病变中PTEN及微卫星不稳定的变化及二者的关系
李异玲, 田忠, 傅宝玉

2476 丙氨酸氨基转移酶低于2倍正常值的慢性乙肝患者肝组织学的改变
陈恩强, 何伶俐, 王丽春, 雷秉钧, 白浪, 刘聪, 雷学忠, 唐红

文献综述

2482 肝脏祖细胞的表型特征及生物学功能
陈珺明, 季光

2487 肝细胞癌的蛋白质组学研究进展
杨国欢, 代智, 周俭

2493 巨噬细胞与急性胰腺炎关系的研究进展
党胜春, 张建新

2497 炎症性肠病治疗新策略
蒋巍, 张顺财

研究快报

2503 槲皮素对食管癌细胞侵袭和中期生长因子基因表达的影响
钟锡明, 吴莺, 范钰

2507 丹参酮ⅡA磺酸钠对MKN-45胃癌裸鼠移植瘤增殖及血管生成的影响
陈坚, 钟良, 钱立平, 蒋蔚茹, 黄剑平, 邱冬妮

2512 达肝素钠对早期肝癌的生长抑制作用
闫钧, 郑起, 汪昱, 潘烨, 邱文才, 陆洪芬, 薛琼, 汤钊猷

2516 大鼠肝部分切除术的应用解剖及实施
史冀华, 朱盛兴, 张水军

2521 改良双袖套法大鼠原位肝移植500例
刘静, 陈福, 陈达丰, 刘旋, 杨爱国, 汪爽, 孙尔维

临床经验

2525 沈阳地区药物性肝损伤病因和损伤类型
陈昶铭, 常冰, 张岱, 向国卿, 贺晓虎, 王炳元

2529 延边地区朝鲜族乙型肝炎病毒感染者病毒基因型的检测与分析
韩学吉, 许顺姬, 偰光华, 崔鹤松, 朴红心

2533 HA树脂血液灌流治疗重型肝炎40例
罗玲, 袁春兰, 曾维群, 张大志

2537 肝癌发生过程中的差异基因表达
白阳秋, 丁光伟, 杨玉秀

2542 腔镜超声引导下腹腔镜肝段切除术的临床应用
马龙滨, 李文, 李宾, 何津, 王新元, 张大伟, 李博

2545 MMP-9、TIMP-1在胰腺癌组织中的表达及临床意义
滕晓丽, 马威, 杨家耀, 胡伟, 赵秋
2549 VEGF的表达与大肠癌组织生长、侵袭及转移的关系
朱云松, 杨大明, 姚登福, 钱俊波, 李玉明, 许利华
2553 CCND1基因A870G多态与结直肠癌遗传易感性的相关性
荆佳晨, 熊文坚, 金惠, 稽贝纳
2557 粪便钙卫蛋白检测诊断结直肠癌87例
岳林, 崔梅花, 牟方宏, 魏红, 杨桂彬

病例报告

2562 胃-食管重复癌并发胃内重复良性瘤1例
汪燕, 宋继伟

致　　谢

2564 致谢世界华人消化杂志编委

消　　息

2447 世界华人消化杂志标点符号用法
2457 第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知
2475 世界华人消化杂志英文摘要要求
2492 世界华人消化杂志修回稿须知
2496 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知
2502 世界华人消化杂志栏目设置
2511 世界华人消化杂作者贡献及同行评议公开政策
2515 世界华人消化杂志作者署名要求
2520 世界华人消化杂志正文要求
2528 世界华人消化杂志数字用法标准
2536 世界华人消化杂志参考文献要求
2541 世界华人消化杂志网络版的发表前链接
2544 世界华人消化杂志外文字符标准
2548 世界华人消化杂志名词术语标准
2556 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

封面故事

Wang DG, Li XG, Gao H, Sun XY, Zhou XQ. Coexistence of esophageal blue nevus, hair follicles and basaloid sqamous carcinoma: A case report. *World J Gastroenterol* 2008; 14(26): 4253-4256
http://www.wjgnet.com/1009-9327/14/4253.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

世界華人消化雜志

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 2008-08-08
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 每期24.00元 全年864.00元　广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

August 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 22

EDITORIAL

2443 Drug treatment of gastric cancer in elderly patients
Gong JF, Shen L

BASIC RESEARCH

2448 RNA interference targeting polymerase inhibits the expression and replication of hepatitis B virus in mice
Gao HY, Zhang JJ, Yang XD, Wang DL, Bian TR, Yang AL, Xia JY, Geng Y, Huang F

2453 Expression of BMP2 mRNA in regenerated liver tissue of rats and its significance
Ji WM, Xu CP

2458 Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with human hepatocyte growth factor
Zhang WY, Zhang JQ, Li XG, Cheng J, Li GL, Wang Q, Zhang CY, Wang XC, Chai YY

2464 Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro*
He WY, Liu SX, Jiang HQ

CLINICAL RESEARCH

2470 Changes of tumor suppressor gene PTEN and microsatellite instability in gastric cancer and precancerous lesion and their correlations
Li YL, Tian Z, Fu BY

2476 Change of liver histology in chronic hepatitis B patients with alanine aminotransferase less than two-time up limits of normal
Chen EQ, He LL, Wang LC, Lei BJ, Bai L, Liu C, Lei XZ, Tang H

REVIEW

2482 Hepatic progenitor cell surface markers and biological function
Chen JM, Ji G

2487 Advance in proteomic study of hepatocellular carcinoma
Yang GH, Dai Z, Zhou J

2493 Advances in the relationship between macrophage and acute pancreatitis
Dang SC, Zhang JX

2497 New strategies in therapy for inflammatory bowel disease
Jiang W, Zhang SC

RAPID COMMUNICATION

2503 Effects of Quercetin on invasion and midkine expression of human esophageal cancer cell
Zhong XM, Wu Y, Fan Y

2507 Anticancer effects and mechanisms of Tanshinone Ⅱ A sulfonic acid in nude mouse xenograft model bearing MKN-45 gastric cancer cells
Chen J, Zhong L, Qian LP, Jiang WR, Huang JP, Qiu DN

2512 Inhibitory effect of dalteparin sodium on the growth of early-stage hepatocellular carcinoma
Yan J, Zheng Q, Wang Y, Pan Y, Qiu WC, Lu HF, Xue Q, Tang ZY

2516 Applied anatomy of liver and partial hepatectomy in rats
Shi JH, Zhu SX, Zhang SJ

2521 Othotopic liver transplantation in 500 rats using a reformed two-cuff method
Liu J, Chen F, Chen DF, Liu X, Yang AG, Wang S, Sun EW

CLINICAL PRACTICE

2525 Etiology and injury types of drug-induced liver indury in Shenyang
Chen CM, Chang B, Zhang D, Xiang GQ, He XH, Wang BY

2529 Inspection and analysis of hepatitis B virus genotypes among the korean nationality of Yanbian area in China
Han XJ, Xu SJ, Xie GH, Cui HS, Piao HX

2533 Treatment of severe hepatitis by HA neutral macroporous resin hemoperfusion: an analysis of 40 cases
Luo L, Yuan CL, Zeng WQ, Zhang DZ

2537 Expression of differential genes during hepatocarcinogenesis

Bai YQ, Ding GW, Yang YX

2542 Anatomical segmental hepatectomy under the guidance of ultrasongraphy
Ma LB, Li W, Li B, He J, Wang XY, Zhang DW, Li B

2545 Expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in pancreatic carcinoma and their clinical significances
Teng XL, Ma W, Yang JY, Hu W, Zhao Q

2549 Expression of vascular endothelial growth factor expression and its relation with growth, invasion and metastasis of human colorectal cancer
Zhu YS, Yang DM, Yao DF, Qian JB, Li YM, Xu LH

2553 Relationship between CCND1 gene A870G polymorphism and genetic susceptibility to colorectal cancer
Jing JC, Xiong WJ, Jin H, Ji BN

2557 Diagnosis of colorectal cancer by faecal calprotectin: an analysis of 87 cases
Yue L, Cui MH, Mu FH, Wei H, Yang GB

CASE REPORT

2562 Synchronous esophageal and gastric cancer complicated by a duplicated benign tumor in the stomach: one-case analysis
Wang Y, Song JW

ACKNOWLEDGMENT

2564 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Wang DG, Li XG, Gao H, Sun XY, Zhou XQ. Coexistence of esophageal blue nevus, hair follicles and basaloid sqamous carcinoma: A case report.
World J Gastroenterol 2008; 14(26): 4253-4256
http://www.wjgnet.com/1009-9327/14/4253.asp

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Yan Jiang* Review Editor: *Jun-Liang Li* Electronic Page Editor: *Ji-Cai He*
Editor-in-Charge: *Jun-Liang Li* English Language Editor: *Hai-Ning Zhang*
Proof Editor: *Hai-Ning Zhang* Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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 August 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: wcjd@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: wcjd@wcjdnet.com
http://www.wcjdnet.com

OVERSEAS DISTRIBUTOR
Beijing Bureau for Distribution of Newspapers 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 reserved; 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, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT
All articles published in this journal represent 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*

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2443-2447
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

老年胃癌药物治疗对策

龚继芳, 沈 琳

龚继芳, 沈琳, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所消化肿瘤内科 北京市 100142
沈琳, 主任医师, 博士生导师, 主要从事消化道肿瘤内科工作, 专于胃癌、结直肠癌及胃肠道间质瘤的临床和基础研究.
通讯作者: 沈琳, 100142, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所消化肿瘤内科. lin100@medmail.com.cn
电话: 010-88196561 传真: 010-88140157
收稿日期: 2008-05-08 修回日期: 2008-07-20
接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-08-08

Drug treatment of gastric cancer in elderly patients

Ji-Fang Gong, Lin Shen

Ji-Fang Gong, Lin Shen, Department of Gastrointestinal Oncology, Peking University School of Oncology and Beijing Cancer Hospital and Institute, Beijing 100142, China
Correspondence to: Lin Shen, Department of Gastrointestinal Oncology, Peking University School of Oncology and Beijing Cancer Hospital and Institute, 52 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China. lin100@medmail.com.cn
Received: 2008-05-08 Revised: 2008-07-20
Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-08-08

Abstract
Gastric cancer is one of the most common and poor-prognosis malignancies worldwide. As the life expectancy increases, the incidence rate increases in patients abover 65 years old. Because of the physiological and psychological specialty, the general condition, cardiovascular and respiratory function, and complications of the elderly should be comprehensively evaluated when drug treatment was performed. In this article, we reviewed the chemotherapy-associated problems, therapeutic strategies and application of individulized treatment in clinics.

Key Words: Elderly patient; Gastric cancer; Chemotherapy

Gong JF, Shen L. Drug treatment of gastric cancer in elderly patients. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2443-2447

摘要
胃癌是恶性度高、发病率高、死亡率高的肿瘤之一, 发病率在65岁以后有明显升高. 由于老年患者具有独特的生理及心理特点, 接受药物治疗时应综合评估老年患者的一般状况、心肺功能及合并症等以估计化疗的耐受性. 本文围绕老年胃癌患者的化疗问题, 详细介绍化疗策略及注意事项, 同时深入探讨个体化治疗策略在老年胃癌治疗中的应用及价值.

关键词: 老年人; 胃癌; 化学治疗

龚继芳, 沈琳. 老年胃癌药物治疗对策. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2443-2447
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2443.asp

■背景资料
近年, 老年胃癌的发病率明显升高, 由于其独特的生理及心理特点, 患者在接受抗肿瘤药物治疗时必须给予特别的关注.

0 引言
我国是胃癌高发地区, 其死亡率居肿瘤相关死亡的第2位. 根据美国SEER的调查结果, 胃癌的发病率在65岁有明显的升高, 且随着年龄的增加而逐渐增加[1]. 现如今平均寿命越来越长, 我国老年胃癌的发病率也越来越高, 据吴春晓 *et al*[2]统计, 2002-2004年上海65岁以上的胃癌病例占62.79%, 且随年龄的增加而比例增大, 在80-84岁组达到高峰.

老年胃癌患者临床症状无明显特异性, 早诊困难, 诊断时多属进展期[3]. 化疗是老年患者必须面对的选择. 老年患者随着年龄的增加, 各脏器的储备功能越来越差, 且很多老人合并多种疾病, 需合用多种药物, 药物的吸收、分布及代谢都有明显的改变, 不良反应也有所增加; 这为药物治疗带来困难.

1 老年胃癌患者的药物治疗选择
1.1 姑息化疗 胃癌化疗全部来源于循证医学证据, 主要对象为晚期胃癌患者, 以缓解症状、提高生活质量为主要目的, 进而达到延长生存期的目的. 但诸多的临床研究并不包括老年患者, 所以目前国际上用于胃癌患者的化疗方案仅适用一般人群, 是否适用老年患者尚有待进一步确证, 但其他肿瘤像结直肠癌以及现在一些小样本的临床研究以及临床实践等经验和证据, 可以给

■同行评议者
陈公琰, 主任医师, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内一科

■研发前沿
目前, 年龄已不是限制化疗的唯一参考因素, 应综合评估老年患者的一般状况、心肺功能及合并症等以估计化疗的耐受性.

我们许多借鉴和依据.

1.1.1 联合化疗: 对于进展期胃癌, 只要患者情况允许, 多考虑联合化疗[4], 包括三药联合: 目前达成共识的方案有ECF、DCF以及相关的改良方案; 或二药联合: Folfox、TX、DX、CX等. (1)ECF方案: 已有多项III期临床试验显示ECF方案优势[5], 但他们均未对年龄进行亚组分析, 英国Bamias *et al*[6]在II期临床试验中应用ECF方案治疗中位年龄为59岁, 最高年龄达79岁, 毒副反应为轻-中度. 在此基础上, 考虑顺铂的肾毒性, 可以选用小剂量顺铂分次用的改良模式. REAL2随机对照临床研究[7]比较ECF、EOF、ECX和EOX四种方案, 发现卡培他滨与奥沙利铂替代5-FU和顺铂后(EOX方案), 比ECF的疗效更优安全性更好, 所以EOX方案可能更适于老年患者. 但这些方案都含有表阿霉素, 有一定的心脏毒性, 老年患者应用时应密切监测心电图及心功能变化, 必要时加用保护心脏的药物. 如合并心血管基础疾病, 应慎重选用此联合方案. (2)FP方案: 对于因为心脏原因而不能使用表阿霉素的老年患者, 也可以选择5-FU和CDDP的联合方案. 韩国和日本等临床试验[8-10], 发现年龄大于61岁与年龄≤60岁两组患者在近期有效率及中位生存期上无明显统计学差异. 大剂量顺铂具有耳、肾毒性, 需大量水化, 对心脏有一定负担; 而小剂量分次应用的顺铂耐受性好, 无须水化, 且对5-FU具有生化调节作用, 可以增强5-FU的作用, 而且临床医生可以根据患者的疗效及毒副反应, 随时调整, 或适当减低单次药物剂量, 避免对患者产生不必要的损害, 所以适于老年胃癌患者. (3)DCF方案: V325 III期试验[11], 发现多西他赛联合FP组成的DCF方案, 其有效率、TTP和OS均优于FP组, 该研究中老年患者(≥65岁)109人, 占24%, 但该方案显示了较严重的不良反应, 特别是3-4度的骨髓抑制和粒细胞减少相关性发热. 亚洲多个试验也得出了相似的结论, 所以对于老年患者要慎用. 但多西他赛是一很好的药物, 可以分别选择联合氟尿嘧啶类药物或顺铂, 如多西他赛30 mg/m^{2}第1天, 第8天分次用, 并联合卡培他滨的方案, 可以达到保证疗效的同时, 不增加毒性反应. (4)紫杉醇为基础的化疗方案: 紫杉醇与多西紫杉醇结构类似, 均作用于微管蛋白, 对胃癌的治疗很有前景, 目前虽无紫杉醇联合化疗的大规模研究, 但小剂量每周方案紫杉醇[12], 近期有效率可达50%以上, 毒副反应较轻, 与卡培他滨联合有协同作用. 对于老年胃癌患者, 除急性过敏反应外, 紫杉醇还需要特别关注心肌毒性和肺毒性(尤其慢性肺病患者)等, 虽然发生率很低, 但由于部分老年患者存在的基础疾病可能会加重这些严重反应, 所以应注意监测患者的心肺功能, 充分评估患者对化疗的耐受性, 并可通过适当减低剂量强度, 改变用药时间和方法等, 探索出适合老年患者的应用方法. (5)奥沙利铂为基础的化疗方案: 奥沙利铂与顺铂相比, 其水溶性好, 使用方便, 与5-FU联合应用组成的FOLFOX4、FLO方案具有协同作用. 在多个治疗老年胃癌的小样本II期临床研究中[13-14], 显示了很好的效果. 近期JCO报道了晚期胃癌化疗的FLO VS FLP(5-FU联合DDP)的III期多中心随机对照临床试验结果[15], 该试验入组220例晚期胃腺癌患者, 中位年龄64 岁, 特别对于>65岁的患者(共94例), FLO组的有效率(41.3% *vs* 16.7%; P = 0.012), 治疗失败时间(5.4 mo *vs* 2.3 mo; P<0.001)、PFS(6.0 mo *vs* 3.1 mo; P = 0.029)和OS(13.9 mo *vs* 7.2 mo)明显优于FLP组, 而不良反应相似. 这些结果显示, 奥沙利铂与5-FU/LV联合方案疗效确定, 毒副反应轻微, 适于老年患者, 但应注意老年患者脏器基础功能下降, 应激能力差, 应高度重视奥沙利铂所致的急性神经毒性, 严密监护, 及时治疗. (6)卡培他滨及S-1为基础的化疗方案: 对于老年患者, 由于静脉持续静点5-FU所需的深静脉置管出现血栓风险较高. 因此选择口服的氟尿嘧啶类药物治疗的安全性较好, 且患者无需住院, 提高了生活质量. 卡培他滨进入体内后, 先在肿瘤组织中转化为5-FU, 其代谢的重要酶是胸腺嘧啶核苷酸磷酸化酶(TP), 实验表明, 奥沙利铂、紫杉醇、多西紫杉醇可明显上调TP活性, 故联合应用这些药物可以增加卡培他滨的抗癌作用. Kang *et al*[16]及Jin *et al*[17]报道了XP(卡培他滨联合DDP) *vs* FP的研究结果, 证明卡培他滨与顺铂联合应用, 有效率高于5-FU联合DDP方案. Lee *et al*[18]用此方案一线治疗胃癌患者, 在进行亚组分析时, 有118例≥54岁的患者, 其TTP 6.7 mo, OS 10.9 mo, 与年轻患者无明显差异. 这些结果表明, XP方案近期疗效确切, 毒副反应轻微, 可应用于老年患者. TS-1(替吉奥胶囊)是一种氟尿嘧啶衍生物口服抗癌剂, 给药方便、安全, 他包括替加氟(FT)和以下两类调节剂: 吉美嘧啶(CDHP)及奥替拉西(Oxo). 常与顺铂联合应用. 目前只在在日本等少数国家上市, 单药治疗有效率30%左右, 中位生存期为10 mo左右[19]. 但与卡培他滨之间尚缺乏

大样本随机对照临床比较, 且TS-1还未在国内上市, 以TS-1为基础的联合治疗目前尚无大样本临床证据, 应用时应注意腹泻、乏力等副反应等. (7)依立替康为基础的化疗方案: 伊立替康是一种TOPO异构酶Ⅰ抑制剂, 对于老年患者, 目前缺乏充分的临床循证医学证据[20-21], 而且依立替康可导致迟发性腹泻等特殊的毒副反应, 老年患者应慎用.

1.1.2 *单药化疗*: 单药治疗胃癌的有效率较低, 毒副反应偏低, 推荐用于不能耐受常规剂量联合化疗时. 对进展期胃癌一般不用单药治疗. 但近年来一些新药的应用, 明显提高了近期有效率. 因此, 根据老年胃癌患者的身体情况, 参考药物的药代动力学及毒副反应谱, 选择合适的单药也可达到与联合化疗相似的效果. Kang *et al*[22]针对老年转移或复发的胃癌患者进行了多中心、随机Ⅱ期临床试验. 所有入组患者年龄均≥65岁, 中位年龄70.5-71岁, 其中卡培他滨组共46人, T-S1组45人, 疾病控制率分别为68.1%和68.9%, 中位生存期分别为10.0和7.9 mo. Ⅲ度以上中性粒细胞减少分别为6.8%和4.8%; 衰弱(0% *vs* 7.2%); 食欲减退(6.8% *vs* 9.5%); 腹泻(2.3% *vs* 0%); 手足综合征(6.8% *vs* 0%). 该研究结果提示针对老年胃癌患者两药单用能达到很好的疗效, 而且耐受性好. 其他如紫杉类药物的单独使用在老年患者中也可能有一定的疗效且安全性良好.

1.1.3 *分子靶向治疗*: 是近年来在治疗恶性肿瘤中出现的新治疗手段. 目前处于早期临床试验中, 尚未有充分的循证医学证据证实其在胃癌治疗领域中的作用. 对于老年胃癌患者临床试用期间, 应严密观察一些靶向药物特殊的毒副反应, 如Avastin可出现血管栓塞, 出血等.

1.2 *辅助化疗* 术后辅助治疗一直以来存在诸多争议, 但目前基本倾向是对局部进展期(Ⅱ-Ⅲ期)胃癌术后采用辅助化疗, 对于老年患者, 在选择化疗药物和方案时一定要特别关注安全性, 如不能保证安全, 宁可不做辅助化疗. 对Ⅱ期患者以单药为主, 可选择口服药物如卡培他滨, TS-1(替吉奥)等, Ⅲ期以上患者可以选择联合化疗方案, 具体可以参考姑息化疗方案, 但也多以两药联合为主, 而且在治疗过程中密切观察, 随时根据患者的不良反应和体力状况、各脏器功能状况来调节剂量和给药方法.

1.3 *新辅助化疗* 还没有大规模的临床试验结果, 但我们在临床实践中, 曾有部分患者在联合化疗后进行了手术治疗, 获得了长期生存. 但仅属小样本临床试验. 对于一般状况及各脏器功能较好的患者可在适当时机进行, 方案可选择毒副作用小、近期疗效高的药物联合治疗, 但一定要注意老年患者化疗后应激能力减低, 手术风险进一步增加的可能, 所以要特别慎重选择新辅助化疗.

2 不良反应的处理

恶心, 呕吐易导致老年人脱水, 电解质失衡, 营养状况下降, 引发恶性循环; 所以强调的是预防为主, 及时治疗, 同时注意止吐药物带来的不良反应, 如腹胀、便秘等. 骨髓抑制是许多化疗药物的毒副反应, 老年患者的骨髓储备功能往往明显下降, 特别是多程化疗或二线化疗, 应特别注意监测, 及时使用G-CSF及支持治疗. DDP等容易引起肾毒性, 老年人肾小球滤过率较年轻人下降, 化疗期间要特别注意避免应用具有肾毒性的头孢菌素, 氨基糖甙类抗生素及噻嗪类利尿剂. 阿霉素, 紫杉醇等易致心脏毒性, 老年人用药前须做心电图等检查, 注意隐匿性冠心病的可能; 化疗过程中要注意监护, 同时注意药物累积毒性, 急性超敏反应等, 应做好预处理, 糖尿病患者应注意激素引发的高血糖, 加强监护, 早预防早治疗.

3 治疗中存在的问题

目前老年胃癌治疗中存在的一些问题: (1)化学治疗实施过程中还要关注老年患者的心理特点及生活质量, 要选择副作用小, 对重要脏器功能影响小的药物, 必要时可以选择单药. 若联合用药应适当调整剂量. 老年人难以耐受多疗程足剂量的化疗. 另外, 老年人记忆力减退, 多需要家人照顾, 因此在化疗方案的选择上要注意安全性、耐受性和高效性之间的平衡, 以适应老年患者的身体状况和生活模式. (2)临床试验: 利用新药、设计新的高效低毒的治疗方案已成为老年晚期胃癌研究的热点. 虽然目前许多临床试验已不再将年龄作为限制条件, 但由于医生对新药安全性等方面的考虑, 老年患者接受临床试验用药的机会较小, 且老年人对于临床试验的理解度和接受度减低, 因此大部分的老年患者被排除在新药临床试验之外[23], 使得老年患者的临床数据较少. 实际上对于一般状况较好的老年患者, 只要在严密观察的情况下, 并仔细全面的评估患者脏器功能和患者的耐受性, 完全可以参加新药或新方案的临床试验, 为临床治疗提供高质量的用药参考, 当然最好是在获得一般人群的安全资料的前提下进行. (3)知情

■创新盘点

本文围绕老年胃癌患者的化疗问题, 详细介绍, 化疗策略, 注意事项. 并将国际共识与临床实践经验相结合, 探讨了联合方案及改良的两药联合方案和常用的单药方案治疗老年患者的可行性和临床利弊, 更加深入探讨了个体化治疗策略在老年胃癌治疗中的价值, 值得临床医师借鉴.

■应用要点
作者认为, 经过详细的评估、慎重的选择、细致的观察及积极的支持治疗, 老年胃癌患者完全可以和其他人群一样达到改善生活质量, 延长生存期的目的.

同意: 老年人对生活质量的要求较高, 而多数家属由于顾虑, 而要求医师向患者隐瞒病情, 由此患者的依从性明显降低. 因此建议临床医师多与患者及家属交流, 以期达到一致的意见, 有利于药物治疗的实施.

4 结论

老年胃癌的药物治疗还没有规范化的方案可供参考, 随着人们生活质量的提高, 平均寿命越来越长, 在化疗时首先考虑的应是各脏器的功能年龄而不单单是生理年龄. 故对于化疗应抱着谨慎而仍然积极的态度, 全面评估化疗副反应以及化疗相关死亡与获益的轻重, 制定个体化的治疗方案. 相信随着对老年胃癌诊治过程中存在问题的深入研究, 老年胃癌的药物治疗也将登上新的高度.

5 参考文献

1 Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program. SEER *Stat Database: Incidence -SEER 9 Regs Public-Use, 2007, Sub (1975-2005), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, based on the 2007 submission. National Cancer Institute serial online, 2008-04, cited 2008-05; 1(1): 24 screens. Available from: http://seer.cancer.gov/faststats/selections.php#Output

2 吴春晓, 郑莹, 鲍萍萍. 上海市胃癌发病流行现况与时间趋势分析. 外科理论与实践 2008; 13: 24-29

3 Medina-Franco H, Heslin MJ, Cortes-Gonzalez R. Clinicopathological characteristics of gastric carcinoma in young and elderly patients: a comparative study. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 515-519

4 Trumper M, Ross PJ, Cunningham D, Norman AR, Hawkins R, Seymour M, Harper P, Iveson T, Nicolson M, Hickish T. Efficacy and tolerability of chemotherapy in elderly patients with advanced oesophago-gastric cancer: A pooled analysis of three clinical trials. *Eur J Cancer* 2006; 42: 827-834

5 A randomized, comparative study of combination chemotherapies in advanced gastric cancer: 5-fluorouracil and cisplatin (FP) versus 5-fluorouracil, cisplatin, and 4'-epirubicin (FPEPIR). Kyoto Research Group for Chemotherapy of Gastric Cancer (KRGCGC). *Anticancer Res* 1992; 12: 1983-1988

6 Bamias A, Hill ME, Cunningham D, Norman AR, Ahmed FY, Webb A, Watson M, Hill AS, Nicolson MC, O'Brien ME, Evans TC, Nicolson V. Epirubicin, cisplatin, and protracted venous infusion of 5-fluorouracil for esophagogastric adenocarcinoma: response, toxicity, quality of life, and survival. *Cancer* 1996; 77: 1978-1985

7 Sumpter K, Harper-Wynne C, Cunningham D, Rao S, Tebbutt N, Norman AR, Ward C, Iveson T, Nicolson M, Hickish T, Hill M, Oates J. Report of two protocol planned interim analyses in a randomised multicentre phase III study comparing capecitabine with fluorouracil and oxaliplatin with cisplatin in patients with advanced oesophagogastric cancer receiving ECF. *Br J Cancer* 2005; 92: 1976-1983

8 Kim NK, Park YS, Heo DS, Suh C, Kim SY, Park KC, Kang YK, Shin DB, Kim HT, Kim HJ. A phase III randomized study of 5-fluorouracil and cisplatin versus 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin C versus 5-fluorouracil alone in the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer* 1993; 71: 3813-3818

9 Ohtsu A, Shimada Y, Shirao K, Boku N, Hyodo I, Saito H, Yamamichi N, Miyata Y, Ikeda N, Yamamoto S, Fukuda H, Yoshida S. Randomized phase III trial of fluorouracil alone versus fluorouracil plus cisplatin versus uracil and tegafur plus mitomycin in patients with unresectable, advanced gastric cancer: The Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9205). *J Clin Oncol* 2003; 21: 54-59

10 Graziano F, Santini D, Testa E, Catalano V, Beretta GD, Mosconi S, Tonini G, Lai V, Labianca R, Cascinu S. A phase II study of weekly cisplatin, 6S-stereoisomer leucovorin and fluorouracil as first-line chemotherapy for elderly patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 1428-1432

11 Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Risse ML, Ajani JA. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4991-4997

12 Kodera Y, Ito S, Mochizuki Y, Fujitake S, Koshikawa K, Kanyama Y, Matsui T, Kojima H, Takase T, Ohashi N, Fujiwara M, Sakamoto J, Akimasa N. A phase II study of weekly paclitaxel as second-line chemotherapy for advanced gastric Cancer (CCOG0302 study). *Anticancer Res* 2007; 27: 2667-2671

13 De Vita F, Orditura M, Matano E, Bianco R, Carlomagno C, Infusino S, Damiano V, Simeone E, Diadema MR, Lieto E, Castellano P, Pepe S, De Placido S, Galizia G, Di Martino N, Ciardiello F, Catalano G, Bianco AR. A phase II study of biweekly oxaliplatin plus infusional 5-fluorouracil and folinic acid (FOLFOX-4) as first-line treatment of advanced gastric cancer patients. *Br J Cancer* 2005; 92: 1644-1649

14 Nardi M, Azzarello D, Maisano R, Del Medico P, Giannicola R, Raffaele M, Zavettieri M, Costarella S, Falzea A. FOLFOX-4 regimen as fist-line chemotherapy in elderly patients with advanced gastric cancer: a safety study. *J Chemother* 2007; 19: 85-89

15 Al-Batran SE, Hartmann JT, Probst S, Schmalenberg H, Hollerbach S, Hofheinz R, Rethwisch V, Seipelt G, Homann N, Wilhelm G, Schuch G, Stoehlmacher J, Derigs HG, Hegewisch-Becker S, Grossmann J, Pauligk C, Atmaca A, Bokemeyer C, Knuth A, Jäger E. Phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil, leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1435-1442

16 Kang Y, Kang WK, Shin DB, Chen J, Xiong J, Wang J, Lichinitser M, Salas MP, Suarez T, Santamaria J. Randomized phase III trial of capecitabine/cisplatin (XP) vs. continuous infusion of 5-FU/cisplatin (FP) as first-line therapy in patients (pts) with advanced

gastric cancer (AGC): efficacy and safety results: 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings. *J Clin Oncol* 2006; 24: LBA4018
17 Jin M, Shen L, Hu B, Yu J, Wen Z, Su Y, Wang B, Chen L, Ying H, Chen L. Mature data on capecitabine (X) + fractionated cisplatin (P) as first-line therapy in patients (pts) with advanced gastric carcinoma (AGC): 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4075
18 Lee SS, Lee JL, Ryu MH, Chang HM, Kim TW, Kang HJ, Kim WK, Lee JS, Kang YK. Combination chemotherapy with capecitabine (X) and Cisplatin (P) as first line treatment in advanced gastric cancer: experience of 223 patients with prognostic factor analysis. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 30-37
19 Wasaburo K, Tanabe S, Higuchi K, Sasaki T, Nakayama N, Mihara S, Nakatani K, Nishimura K, Shimoda T, Azuma M, Katada C, Hanaoka N, Naruke A, Ryu T, Ishido K, Saigenji K. [Clinical development of S-1 (TS-1) for advanced gastric cancer] *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33 Suppl 1: 57-63
20 Moehler M, Eimermacher A, Siebler J, Höhler T, Wein A, Menges M, Flieger D, Junginger T, Geer T, Gracien E, Galle PR, Heike M. Randomised phase II evaluation of irinotecan plus high-dose 5-fluorouracil and leucovorin (ILF) vs 5-fluorouracil, leucovorin, and etoposide (ELF) in untreated metastatic gastric cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 2122-2128
21 Dank M, Zaluski J, Barone C, Valvere V, Peschel C, Wenczl M, Goker E, Risse M, Awad L, Bugat R. Randomized phase 3 trial of irinotecan (CPT-11) + 5FU/folinic acid (FA) vs CDDP + 5FU in 1st-line advanced gastric cancer patients: 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4003
22 Kang Y, Lee J, Min Y, Lee K, Zang D, Ryoo B, Kim J, Park S, Kang W, Shin D. A randomized multi-center phase II trial of capecitabine (X) versus S-1 (S) as first-line treatment in elderly patients with metastatic or recurrent unresectable gastric cancer: 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4546
23 Talarico L, Chen G, Pazdur R. Enrollment of elderly patients in clinical trials for cancer drug registration: a 7-year experience by the US Food and Drug Administration. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4626-4631

■同行评价
本文内容新颖, 信息量充足, 并符合伦理学要求, 具有较高的学术价值.

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 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2448-2452
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

聚合酶RNA干扰对小鼠体内乙型肝炎病毒的抑制作用

高海燕, 张建军, 杨向东, 王道理, 卞铁荣, 阳艾玲, 夏纪毅, 耿 颖, 黄 飞

■背景资料
虽然普及乙肝疫苗以来, 病毒携带者及急慢性肝炎患者数量已有明显下降, 但目前对于已携带有HBV的患者并无治疗良策. 自1990年发现RNA干扰(RNAi)这一现象以来, RNAi已被广泛应用于基因功能、抗病毒治疗和信号转导系统上下游分子相互关系的研究.

高海燕, 张建军, 杨向东, 卞铁荣, 阳艾玲, 夏纪毅, 耿颖, 黄飞, 四川泸州医学院附属医院中心实验室、感染病科 四川省泸州市 646000
高海燕, 江苏省南京市江宁医院 江苏省南京市 211111
王道理, 河南南阳医学专科学校附属医院 河南省南阳市 473001
高海燕, 泸州医学院2003级硕士, 主要从事感染性疾病基础与临床研究.
四川省科技厅资助项目, No. 05JY029-145
作者贡献分布: 此课题设计由张建军完成; 研究过程由高海燕, 杨向东, 王道理, 卞铁荣, 阳艾玲, 夏纪毅, 耿颖及黄飞完成; 数据分析高海燕; 写作由高海燕与张建军完成.
通讯作者: 张建军, 646000, 四川省泸州市, 四川省泸州医学院感染病科. zhangjianjun2535@163.com
收稿日期: 2007-06-22 修回日期: 2008-05-01
接受日期: 2008-05-08 在线出版日期: 2008-08-08

RNA interference targeting polymerase inhibits the expression and replication of hepatitis B virus in mice

Hai-Yan Gao, Jian-Jun Zhang, Xiang-Dong Yang, Dao-Li Wang, Tie-Rong Bian, Ai-Ling Yang, Ji-Yi Xia, Ying Geng, Fei Huang

Hai-Yan Gao, Jian-Jun Zhang, Xiang-Dong Yang, Tie-Rong Bian, Ai-Ling Yang, Ji-Yi Xia, Ying Geng, Fei Huang, Department of Infectious Diseases and Central Laboratory, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Hai-Yan Gao, Jiangning Hospital, Nanjing 211111, Jiangsu Province, China
Dao-Li Wang, the Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473001, Henan Province, China
Supported by: the Science and Technology Bureau of Sichuan Province, No. 05JY029-145
Correspondence to: Jian-Jun Zhang, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. zhangjianjun2535@163.com
Received: 2007-06-22 Revised: 2008-05-01
Accepted: 2008-05-08 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To develop a mouse model of hepatitis B virus (HBV) infection by hydrodynamic method and to observe the inhibition and replication of HBV induced by pSiHBV/P in the model.

METHODS: Hydrodynamic method was used to establish the model of HBV infection in Balb/c mice. pHBV1.3 was injected into the mice via tail veins together with pSiHBV/P, which could specifically target the P gene sequence of HBV by synthesizing small interfering RNA (siRNA) *in vivo*. On the 6th day of transfection, blood samples liver specimens were collected. Serum HBsAg were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the contents of HBsAg and HBcAg in liver specimens were measured by immunohistochemical staining. HBV DNA and mRNA levels were detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) and semi-quantitative RT-PCR.

RESULTS: The mean levels of serum HBsAg expression in the infected group, the irrelative interference group and the pSiHBV/P interfering group were 9.11 ± 3.34, 8.19 ± 5.41 and 1.94 ± 1.78, respectively. The HBV DNA loads were reduced by 33% in the pSiHBV/P interfering group, significantly lower than that in the infected group (2.91 ± 0.55 *vs* 4.32 ± 0.57, $P < 0.05$). The count of HbsAg- or HbcAg-positive cells in the pSiHBV/P interfering group was lower than that in the control groups. The levels of 3.5 kb mRNA and S-mRNA in the pSiHBV/P interfering group were reduced remarkably in comparison with those in the infected group and the irrelative interference group (0.48 ± 0.19 *vs* 1.06 ± 0.40, 0.88 ± 0.54; 0.46 ± 0.18 *vs* 1.05 ± 0.38, 0.90 ± 0.51; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: RNAi can inhibit HBV expression and replication effectively and specifically *in vivo*.

Key Words: Hepatitis B virus; Models; Animal; Gene therapy; RNA interference

Gao HY, Zhang JJ, Yang XD, Wang DL, Bian TR, Yang AL, Xia JY, Geng Y, Huang F. RNA interference targeting polymerase inhibits the expression and replication of hepatitis B virus in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2448-2452

摘要

目的: 利用流体动力学法构建小鼠HBV感染模型, 观察pSiHBV/P在体内对HBV的抑制作用.

方法: 以流体动力学法构建小鼠HBV感染

■同行评议者
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

模型, 将pSiHBV/P与pHBV1.3尾静脉共注射Balb/c小鼠. 转染后第6天, 用酶联免疫分析法检测小鼠血清乙肝表面抗原(HBsAg), 用荧光定量PCR检测血清HBV DNA的水平, 用免疫组织化学方法检测肝内HBsAg、乙肝病毒核心抗原(HBcAg)的表达, RT-PCR法半定量检测肝内HBV 3.5 kb mRNA、S-mRNA及0.7 kb mRNA的水平.

结果: 感染组和无关干扰组血清HBsAg表达量平均值分别为9.11±3.34和8.19±5.41, pSiHBV/P干扰组平均值1.94±1.78; pSiHBV/P干扰组血清中HBV DNA的含量较感染组明显下降(2.91±0.55 *vs* 4.32±0.57, $P<0.05$), 抑制率为33%; 干扰组肝细胞中HBsAg和HBcAg阳性细胞数较对照组明显减少; 干扰组3.5 kb mRNA、S-mRNA的水平较感染组和无关干扰组均有明显下降(0.48±0.19 *vs* 1.06±0.40, 0.88±0.54; 0.46±0.18 *vs* 1.05±0.38, 0.90±0.51, $P<0.05$).

结论: RNAi技术在体内能高效、特异地抑制小鼠体内HBV.

关键词: 肝炎病毒; 模型; 动物; 基因治疗; RNA干扰

高海燕, 张建军, 杨向东, 王道理, 卞铁荣, 阳艾玲, 夏纪毅, 耿颖, 黄飞. 聚合酶RNA干扰对小鼠体内乙型肝炎病毒的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2448-2452
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2448.asp

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个严重的公共卫生问题, HBV感染后不仅可以引起急、慢性肝炎, 而且与肝硬化、肝癌的发生、发展有密切的关系. HBV基因紧密而高效, 且易发生变异. 目前抗病毒治疗所使用的药物主要是干扰素和核苷类似物, 疗效尚不满意, 研究新的治疗方法仍是当前的难点和热点. RNA干扰技术的出现为抗HBV治疗的研究提供了新的选择. 在本实验室成功应用HBV P基因区特异的小干扰RNA质粒(pSiHBV/P)在体外抑制HBV的基础上, 本研究应用流体动力学法[1]建立小鼠HBV感染模型, 观察pSiHBV/P在体内对HBV复制和表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 3-4 wk龄Balb/c小鼠36只, ♂, 体质量18-22 g, 清洁级, 购于成都达硕生物科技有限公司. pHBV1.3为含1.3倍HBV ayw型全基因组真核表达载体, pSiGFP为针对绿色荧光蛋白GFP的siRNA转录载体, 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所惠赠. pSiHBV/P为针对HBV P基因的发夹状siRNA转录载体, 由本实验室构建, 作用靶位为P读码框起始密码子下游含19个碱基序列的寡核苷酸链CGCAGGATAACCACATTGT(1012-1030). 两条寡核苷酸链: 正义5'-TCGAGCGCAGGATAACCACATTGTTTCGACAATGTGGTTATCCTGCGTTTTT-3'; 反义链5'-CTAGAAAAACGCAGGATAACCACATTGTCGAAACAATGTGGTTATCCTGCGC-3'. HBsAg诊断试剂盒为上海实业科华生物技术有限公司产品. HBV DNA荧光定量PCR试剂盒为上海申友生物技术有限责任公司产品. 鼠抗-HBs mAb(其二抗为羊抗鼠IgG-HRP多聚体)、兔抗-HBc多克隆抗体(其二抗为羊抗兔IgG-HRP多聚体)、PV-6001/6002二步法免疫组化检测试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品. 小量不含DNA的总RNA抽提试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品. 逆转录试剂盒为Fermentas公司产品. iQ™ SYBR Green Supermix为Bio-Rad公司产品.

1.2 方法

1.2.1 模型建立及取材: 将Balb/c小鼠随机分为6组, 每组6只. A组为感染组, 注射pHBV1.3(20 μg); B组为pSiHBV/P干扰组, 共注射pSiHBV/P(7.5 μg)和pHBV1.3(20 μg); C组为无关干扰组, 共注射pSiGFP(7.5 μg)和pHBV1.3(20 μg); D组为空白对照组, 仅注射0.9%生理盐水(NS)2 mL; A-C各组质粒均用0.9% NS稀释, 总量为2 mL. 采用流体动力学法建立HBV小鼠感染模型, 其原理是: 快速注射的大剂量溶液, 其总量超过了心输出量, 溶液储积于上腔静脉, 产生高流体静脉压, 使质粒DNA较快到达全身各组织, 质粒DNA与血液的短时间接触避免了血液中核酸酶的降解, 而肝脏是机体最大的脏器, 组织结构疏松易于扩张, 基因表达产物最丰富. 流体动力学法是一种简便有效、安全的外源基因转移方法, 不需准备载体, 基因表达量较局部注射质粒DNA法高, 可广泛用于研究基因功能、基因调节、蛋白结构及功能等许多领域, 尤其对于嗜肝表达基因更显示出优越性. 本实验中操作要点: 将计算的溶液总量, 用45 mm头皮注射针经小鼠尾静脉6 s内注射完毕. 注射后第6天, 摘除小鼠眼球取血, 分离血清. 处死小鼠, 取出肝脏, 切取数个约30 mg的组织块立即冻存于液氮中; 切取5 mm×6 mm大小的组织块, 40 g/L多聚甲醛固定.

■研发前沿
RNAi抗HBV有显著的应用前景. HBV复制过程中有4种mRNA产生, 且4种之间具有重叠读码框. 因此, 应用RNAi技术抗HBV已成为RNAi抗病毒作用的研究热点, 多个研究小组已经在细胞水平或动物体内取得了一定成果.

■相关报道
2006年，潘金水*et al*在《世界华人消化杂志》发表了“RNA干扰抑制HepG2-N10细胞系中HBV基因表达及复制”. 该研究中涉及针对HBV S基因的siRNA，该位点同时也在P区. 在细胞实验中，观察到培养上清中HBsAg、HBeAg显著减少；也发现了RNA干扰对HBV转录产物mRNA的抑制.

表 1 RNA干扰对小鼠血清中HBV DNA的抑制作用 (n = 6, mean ± SD)

分组	DNA含量	抑制率(%)
感染组	4.32 ± 0.57	0
pSiHBV/P干扰组	2.91 ± 0.55	33[a]
无关干扰组	4.09 ± 0.83	5[b]

[a]P<0.05 *vs* 感染组; [b]P<0.05 *vs* pSiHBV/P干扰组.

1.2.2 血清HBsAg和HBV DNA的检测: 用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测, 用HBV DNA荧光定量PCR试剂盒检测, 具体方法见试剂盒说明书.

1.2.3 肝内HBsAg、HBcAg的检测: 肝组织常规石蜡包埋、切片, 采用北京中杉金桥生物技术有限公司PV-6001/6002二步法免疫组化检测试剂盒, 按照说明书操作, 二步法免疫组织化学法检测并进行二氨基联苯胺(DAB)染色, 苏木素复染. 用光学显微镜观察肝组织中HBsAg和HBcAg的着色情况: 每只小鼠取4张肝组织切片, 每张切片观察5个400倍视野, 每个视野计数100个细胞中的HBsAg和HBcAg阳性细胞数, 取其平均值.

1.2.4 肝内HBV mRNA的检测: 针对HBV 3.5 kb mRNA基因区(C区)的引物(预期产物186 bp): 上游引物为5'-CTGGGTGGGTGTTAATTTGG-3', 下游引物为5'-TAAGCTGGAGGAGTGCGAAT-3'; 针对HBV S基因区的引物(预期产物245 bp): 上游引物为5'-TTCCTAGGACCCCTTCTCGT-3', 下游引物为5'-AGCAGCAGGATGAAGAGGAA-3'; 针对HBV 0.7 kb mRNA基因区(X区)的引物(预期产物466 bp): 上游引物为5'-CATGGCTGCTAGGCTGT-3', 下游引物为5'-TTAGGCAGAGGTGAAAAAG-3'; 针对内部参照β-肌动蛋白基因的引物(预期产物294 bp): 上游引物为5'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGC-3', 下游引物为5'-TCATGAAGTGTGAGGTTGAC-3'. 提取肝组织总RNA, 用RT-PCR法, 插入SYBR Green荧光染料, 半定量检测肝内HBV 3.5 kb mRNA、S-mRNA及0.7 kb mRNA的水平. 逆转录以试剂盒中OligoT为引物, 40 μL体系, 在RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase作用下, 反应60 min. 各反应管放入iCycler荧光定量PCR仪(Bio-Rad), 按下列条件扩增: 95℃ 3 min→(95℃ 30 s→58℃ 30 s→72℃ 1 min)×40 cycles. 并在PCR循环第二步58℃时收集荧光信号, 由计算机软件自动分析计算出Ct值. 用比较阈值法计算出每个标本目的基因的相对表达量($2^{-\triangle\triangle Ct}$). 取5 μL PCR扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析.

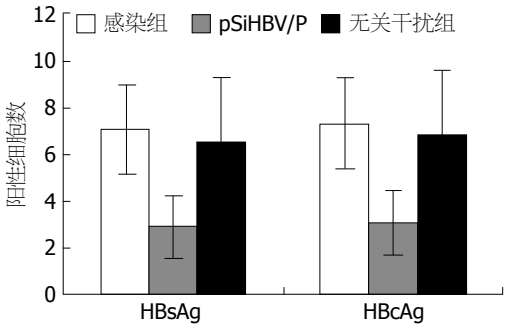


图 1 RNA干扰对小鼠肝内HBsAg和HBcAg的抑制作用.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 由SPSS 13.0统计软件处理, 采用完全随机设计的多组间方差分析得出P值. P<0.05为差异有显著性.

2 结果

2.1 RNA干扰对小鼠血清中HBsAg的抑制作用 HBsAg S/N值≥2.1为阳性. 感染组和无关干扰组血清HBsAg均为阳性, 表达量接近, 平均值分别为9.11±3.34、8.19±5.41; pSiHBV/P干扰组较以上两组明显降低(P<0.05), 平均值1.94±1.78; 空白对照组均为阴性. 以上结果说明pSiHBV/P能抑制血清HBsAg的表达.

2.2 RNA干扰对小鼠血清中HBV DNA的抑制作用 通过荧光定量PCR分析, 用HBV DNA拷贝数的log值进行统计. 抑制率 = [1-log(治疗组拷贝数)/log(感染组拷贝数)]×100%. 结果显示, pSiHBV/P干扰组血清中HBV DNA的含量较感染组明显下降(P<0.05), 抑制率为33%, 而无关干扰组则无明显抑制作用. 空白对照组未检测到HBV DNA(表1).

2.3 RNA干扰对小鼠肝内HBsAg、HBcAg的抑制作用 免疫组织化学检测结果显示, HBsAg在感染细胞胞质中呈弥漫性着色, 而HBcAg主要位于感染细胞的细胞核内, 核周胞质也有阳性着色. 感染组和无关干扰组肝内HBsAg、HBcAg的表达无明显差异, pSiHBV/P干扰组较感染组和无关干扰组均有明显下降(P<0.05), 空白对照组肝细胞内无HBsAg、HBcAg的表达(表2, 图1-3).

2.4 RNA干扰对HBV mRNA的抑制作用 RT-PCR结果示, 感染组和无关干扰组HBV 3.5 kb mRNA、S-mRNA、0.7 kb mRNA的水平无明显差异, pSiHBV/P干扰组3.5 kb mRNA、S-mRNA的水平较感染组和无关干扰组均有明显下降(P<0.05), 0.7 kb mRNA的水平与感染组和无

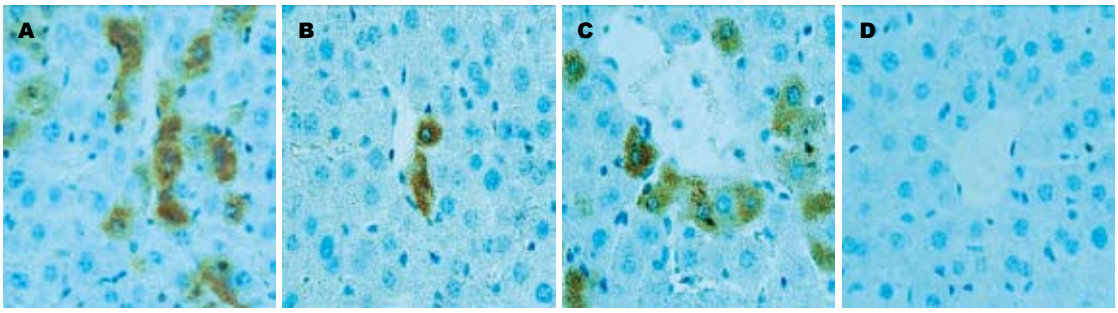


图 2 小鼠肝内HBsAg的表达情况(DAB × 400). A: 感染组; B: pSiHBV/P干扰组; C: 无关干扰组; D: 空白对照组.

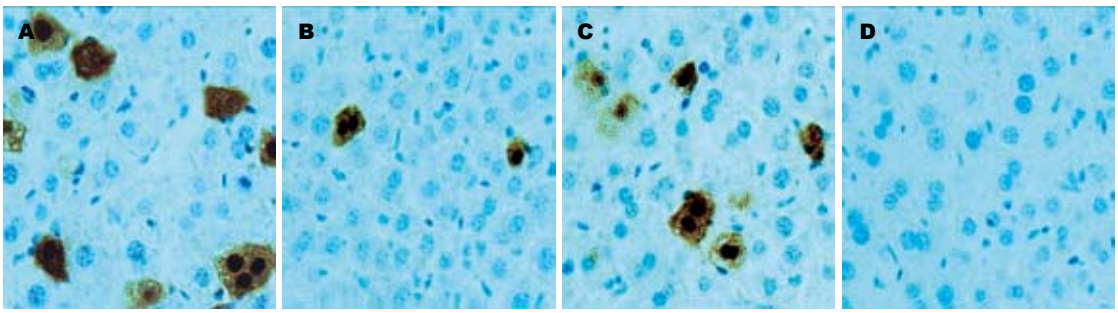


图 3 小鼠肝内HBcAg的表达情况(DAB × 400). A: 感染组; B: pSiHBV/P干扰组; C: 无关干扰组; D: 空白对照组.

■创新盘点
本研究为国内较早应用流体动力学法进行外源基因转移的研究, 尾静脉注射含1.3倍HBV ayw亚型的pHBV1.3质粒, 成功构建了小鼠HBV感染模型, 一定程度上解决了长期以来缺乏合适HBV感染动物模型的问题.

关干扰组无明显差异, 表明pSiHBV/P能明显抑制3.5 kb mRNA、S-mRNA, 对0.7 kb mRNA则无明显抑制作用. 空白对照组未检测到HBV mRNA(表3, 图4). RCR扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析结果(图5).

3 讨论

HBV基因组全长3.2 kb, 有S、C、P和X 4个重叠的开放读码框, P基因区是最大的一个读码框, 与前S、S、C和X区段均有重叠, 占HBV DNA基因序列的绝大部分. 其编码的DNA聚合酶与HBV DNA的复制、逆转录, 以及3.5 kb的前基因组RNA的消化分解功能有关. 此外, 病毒的DNA多聚酶为内源性的, 可以修补病毒基因组中的短链和缺口, 使之成为完整的双链DNA. P基因区的某些核苷酸的突变或断裂, 可以造成HBV DNA多聚酶的表达水平减少或完全终止, 导致复制缺陷或复制水平的降低. 因此, 我们选择P基因区作为RNAi抗HBV治疗的靶位.

本实验通过流体动力学法成功构建了小鼠HBV感染的动物模型, 为了排除宿主自身免疫系统的影响, 我们选择病毒复制和表达均稳定的时间点[2](注射后第6天)来观察siRNA对HBV的抑制作用. 实验结果表明, pSiHBV/P能有效抑制血清HBsAg和肝内HBsAg、HBcAg的表达; 显著抑制HBV DNA复制, 抑制率为33%; 明显

表 2 RNA干扰对小鼠肝内HBsAg、HBcAg的抑制作用 (n = 6, mean ± SD)

分组	HBsAg	HBcAg
感染组	7.08 ± 1.90	7.28 ± 1.95
pSiHBV/P干扰组	2.93 ± 1.31[a]	3.08 ± 1.37[a]
无关干扰组	6.53 ± 2.77[b]	6.86 ± 2.74[b]

[a]P<0.05 *vs* 感染组; [b]P<0.05 *vs* pSiHBV/P干扰组; HBsAg或HBcAg阳性细胞计数(%).

抑制HBV 3.5 kb mRNA、S-mRNA, 而无关干扰无论在DNA水平、RNA水平, 还是在蛋白质水平都没产生抑制作用, 说明siRNA的作用具有序列特异性. 另外, 实验结果提示pSiHBV/P能明显抑制3.5 kb mRNA、S-mRNA, 对0.7 kb mRNA则无明显抑制作用, 这与pSiHBV/P的靶位有关. HBV的生活史中可转录出4种mRNA, 即3.5、2.4、2.1和0.7 kb的mRNA. pSiHBV/P的靶序列位于HBV核苷酸(nt)1012-1030之间, 故对HBV 3.5、2.4、2.1 kb的mRNA均有抑制作用, 而对0.7 kb mRNA无直接抑制作用. 目前尚未见国内外以HBV P区基因为靶点的RNA干扰, 在活体动物的研究报道.

近年来RNAi抗HBV的治疗研究已取得了一定进展. McCaffrey *et al*的研究已证实RNAi技术在体内外均有抗HBV作用[3-7]. RNAi抗HBV

■同行评价
本文内容全面, 实用性较强, 实验设计合理, 学术价值尚可.

表 3 RNA干扰对HBV mRNA的抑制作用 (n = 6, mean ± SD)

分组	3.5 kb mRNA	S-mRNA	0.7 kb mRNA
感染组	1.06 ± 0.40	1.05 ± 0.38	1.06 ± 0.38
pSiHBV/P干扰组	0.48 ± 0.19[a]	0.46 ± 0.18[a]	0.76 ± 0.38
无关干扰组	0.88 ± 0.54[b]	0.90 ± 0.51[b]	0.89 ± 0.44

[a]P<0.05 *vs* 感染组; [b]P<0.05 *vs* pSiHBV/P干扰组.

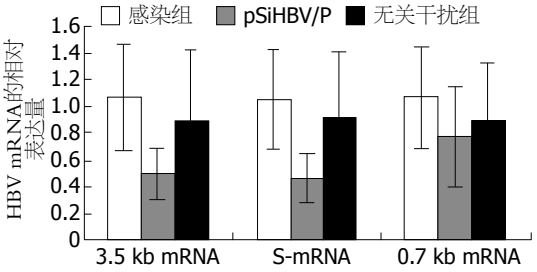


图 4 RNA干扰对HBV mRNA的抑制作用.

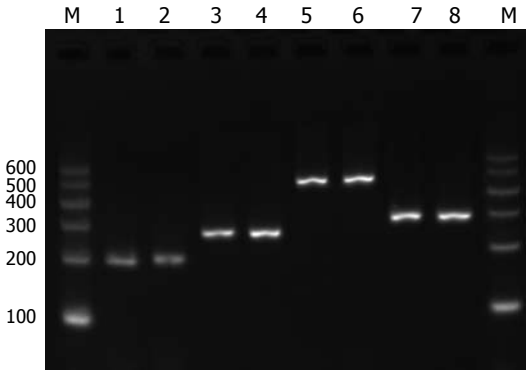


图 5 RT-PCR扩增产物电泳图. M: Marker; 1-2: 3.5 kb mRNA基因区(C基因区)扩增产物; 3-4: S基因区扩增产物; 5-6: 0.7 kb mRNA基因区(X基因区)扩增产物; 7-8: 参照β-肌动蛋白基因扩增产物.

具有很多优势: 第一, RNAi具有高度特异性, 即使仅有一个碱基错配亦可使干扰效应明显下降; 第二, RNAi具有高效性, 少量的siRNA就可起到抑制HBV的作用; 第三, 无明显副作用, siRNA本身片段短, 不会引起非特异性细胞免疫反应; 第四, HBV全长3.2 kb, 有3.5 kb、2.4 kb、2.1 kb和0.7 kb 4种转录本, 可提供数百个RNAi的作用位点, 在选择RNAi靶位时应考虑保守区域, 并可同时使用多个位点, 则可有效防止病毒变异株的出现; 第五, RNAi的作用不依赖病毒的复制, 可以弥补核苷类似物的不足, Li *et al*[8]用siRNA和拉米夫定联合抑制HepG2.2.15细胞中HBV的复制, 取得了比单独应用siRNA或拉米夫定更好的抑制效果.

RNAi作为一种新型的抗HBV治疗技术, 展示了良好的应用前景, 但RNAi要应用于临床, 其组织靶向性和表达效率、药代动力学及如何选择最有效的靶序列等问题仍有待解决, 比如本研究中所采用的质粒载体, 若具有肝器官靶向性, 则可能提高其效果.

4 参考文献

1 Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999; 6: 1258-1266
2 Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13825-13830
3 McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 639-644
4 Zhao ZF, Yang H, Han DW, Zhao LF, Zhang GY, Zhang Y, Liu MS. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference in HepG2.2.15. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6046-6049
5 Chen CC, Ko TM, Ma HI, Wu HL, Xiao X, Li J, Chang CM, Wu PY, Chen CH, Han JM, Yu CP, Jeng KS, Hu CP, Tao MH. Long-term inhibition of hepatitis B virus in transgenic mice by double-stranded adeno-associated virus 8-delivered short hairpin RNA. *Gene Ther* 2007; 14: 11-19
6 Ying RS, Zhu C, Fan XG, Li N, Tian XF, Liu HB, Zhang BX. Hepatitis B virus is inhibited by RNA interference in cell culture and in mice. *Antiviral Res* 2007; 73: 24-30
7 Weinberg MS, Ely A, Barichievy S, Crowther C, Mufamadi S, Carmona S, Arbuthnot P. Specific inhibition of HBV replication in vitro and in vivo with expressed long hairpin RNA. *Mol Ther* 2007; 15: 534-541
8 Li GQ, Xu WZ, Wang JX, Deng WW, Li D, Gu HX. Combination of small interfering RNA and lamivudine on inhibition of human B virus replication in HepG2.2.15 cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2324-2327

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2453-2457
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

BMP2 mRNA在大鼠再生肝组织的表达与意义

冀文敏, 许翠萍

冀文敏, 山西医科大学 山西省太原市 030001
许翠萍, 山西医科大学第一附属医院消化科 山西省太原市 030001
冀文敏, 2005级山西医科大学在读硕士, 主要从事肝病的基础与临床研究.
山西省归国留学人员基金资助项目, No. 200568
作者贡献分布: 此课题由许翠萍设计; 研究过程由冀文敏与许翠萍操作完成; 研究所用试剂及分析工具由冀文敏与许翠萍提供; 数据分析由冀文敏与许翠萍完成; 论文写作由冀文敏与许翠萍完成.
通讯作者: 许翠萍, 030001, 山西省太原市, 山西医科大学第一附属医院消化科. cuipingxu@hotmail.com
电话: 0351-4639511
收稿日期: 2008-04-24 修回日期: 2008-06-05
接受日期: 2008-06-12 在线出版日期: 2008-08-08

Expression of BMP2 mRNA in regenerated liver tissue of rats and its significance

Wen-Min Ji, Cui-Ping Xu

Wen-Min Ji, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Cui-Ping Xu, Department of Digestology, the First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Supported by: the Returned Overseas Foundation of Shanxi Province, No. 200568
Correspondence to: Cui-Ping Xu, Department of Digestology, the First Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. cuipingxu@hotmail.com
Received: 2008-04-24 Revised: 2008-06-05
Accepted: 2008-06-12 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To analyze the dynamic changes of BMP2 mRNA in liver regeneration process, and to investigate the effect of BMP2 mRNA on liver regeneration in combination with the characteristics of nuclear factor kappa B (NF-κB) expression.

METHODS: Fifty-four healthy adult male Wister rats were randomly divided into 3 groups: normal control group (NC, n = 6), sham operation group (SO, n = 24), partial hepatectomy group (PH, n = 24). Using *in situ* hybridization and immunohistochemistry method, we measured the expression of BMP2 mRNA and NF-κB in regenerated liver tissue, separately.

RESULTS: BMP2 mRNA was significantly different between the SO and PH group at 6, 12 and 24 (gray values: 99.74 ± 6.85 *vs* 114.41 ± 5.12, 130.59 ± 6.74, 113.74 ± 7.32; all P < 0.05). There was no significance between the SO group and NC group. NF-κB was negative in the NC group, and there was no specific staining at various postoperative time points in the SO group. NF-κB was weakly positive at the initial stage in the PH group, and it was increased at 6, 12 and 24 h (gray values: 96.22 ± 3.12, 89.59 ± 3.24, 83.72 ± 4.32) (P < 0.05).

CONCLUSION: BMP2 is expressed in normal liver tissue of rats, and it displays a trend of increase after an initial decrease in hepatic regeneration. NF-κB is not expressed in normal liver tissue, but its expression gradually increases in the process of liver regeneration. Therefore, BMP2 may inhibit liver regeneration.

Key Words: Liver regeneration; Bone morphogenetic protein; Nuclear factor-kappa B; *In situ* hybridization

Ji WM, Xu CP. Expression of BMP2 mRNA in regenerated liver tissue of rats and its significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2453-2457

摘要

目的: 在基因水平上观察BMP2在肝组织的表达和肝再生过程中的动态变化特征, 并结合NF-κB在肝再生过程中的表达变化特征, 探讨BMP2对肝再生的影响.

方法: 健康成年♂Wistar大鼠54只, 随机分为3组: 正常对照(NC)组, 即0 h组(n = 6), 假手术(SO)组(n = 24), 肝部分切除术(PH)组(n = 24). 采用原位杂交和免疫组化的方法分别测定大鼠再生肝脏组织中BMP2 mRNA和NF-κB的表达.

结果: BMP2 mRNA表达在SO组与PH组6、12、24 h时间点组间存在统计学差异(灰度值: 99.74±6.85 *vs* 114.41±5.12, 130.59±6.74, 113.74±7.32, 均P<0.05). SO组与NC组无统计

■**背景资料**
近年来对BMPs的作用进行了大量的研究, 目前在Medline中可检索到4900余条有关BMPs研究的文献, 其中大多数是关于BMPs与骨组织尤其是骨组织再生关系的研究. 然而, 除骨组织以外, BMPs还主要参与其他组织器官包括肝组织在内的发育与生长过程. 现代生物学发展领域的一个突出主题是相似的作用途径可能涉及多种系统, BMPs很有可能对肝脏发挥类似对骨组织的作用. 因肝脏类似于骨组织也具有强大再生能力, 其再生过程涉及基因表达, 生长因子产生及形态结构塑造等方面的变化.

■**同行评议者**
潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

■研发前沿
目前关于BMP2与肝脏的研究的重点是BMP2在肝脏中的作用及信号传导方式.

学意义. NC组肝组织内NF-κB阴性, SO组术后各时相点未见特异性染色. PH组NF-κB最初少量弱阳性表达, 术后6、12、24 h, NF-κB表达逐步增强, 灰度值降低(96.22±3.12, 89.59±3.24, 83.72±4.32), 有统计学差异(P<0.05).

结论: BMP2在正常大鼠肝组织中有表达且在肝再生过程中BMP2表达呈现先减弱后增强的趋势. NF-κB在正常大鼠肝脏组织中无表达, 在肝再生过程中NF-κB表达逐渐增强. BMP2可能抑制肝再生.

关键词: 肝再生; 骨形成蛋白; 核因子-κB; 原位杂交

冀文敏, 许翠萍. BMP2 mRNA在大鼠再生肝组织的表达与意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2453-2457
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2453.asp

0 引言

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)又名成骨蛋白(osteogenic proteins, OPs), 属于转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)超家族. BMPs可调节细胞增殖、分化、凋亡, 还对组织器官的形态发生, 维持起重要作用. BMPs除参与骨组织再生外, 还参与其他组织包括肝组织在内的发育与生长过程[1-2]. 因肝脏类似于骨组织也具有强大再生能力, BMPs很有可能对肝脏发挥类似对骨组织的作用. Xu *et al*[3]已用免疫组织化学方法在蛋白水平上初步证明BMP2在肝组织中有表达, 并且与肝再生有一定的关系, 但还需要进一步研究.

核因子-κB(NF-κB)是一类主要参与炎性分子表达调控的转录因子[4], 可被多种炎症刺激物激活[5]. 然后与靶基因启动子或增强子上的κB位点结合, 从而启动或增强这些基因的转录[6], 进而参与组织的损伤过程[7]. 2005年, Yang *et al*[8]提出经过70%门静脉分支结扎, 在肝脏中DNA结合NF-κB的活性部位大大增加, 在肝再生和凋亡中NF-κB起着重要作用. 以上研究结论说明NF-κB促进肝脏的再生. 本文旨在探讨BMP2与NF-κB对肝再生调控的联系及意义.

■相关报道
2006年, Xu *et al*应用免疫组织化学和免疫印迹分析BMP2蛋白在大鼠肝再生过程中变化趋势. 提示, 正常大鼠肝组织中有BMP2表达, BMP2可能是抑制肝细胞生长的因素, BMP2下调的表达方式可能在部分肝切除后肝再生过程中起重要作用.

1 材料和方法

1.1 材料 BMP2原位杂交试剂盒购于武汉博士德公司. NF-κB鼠单克隆抗体、山羊血浆封闭液、生物素羊抗鼠抗体购于Santa Crue试剂公司.

1.2 方法

1.2.1 肝再生模型的建立: 健康♂Wistar大鼠54只, 体质量180-220 g. 随机分为3组. 正常对照(NC)组即0 h组6只, 不施加任何处理因素; 假手术(SO)组24只. 于腹部正中施加3 cm切口暴露腹腔, 摆动肝脏左叶与中叶, 关闭腹腔; 肝部分切除术(PH)组24只. 依据Higgins创建的经典方法, 腹部正中切口进入腹腔, 轻轻挤出肝脏的左叶和中叶于肝蒂部结扎, 于结扎点远端切除肝脏的左叶和中叶(切除量约占全肝的68%-70%), 关闭腹腔.

1.2.2 标本处理: 分别予SO和PH术后0, 6, 12, 24, 48 h各时间点采用100 g/L戊巴比妥钠(30 mg/kg)ip麻醉动物, 并开腹取出动物肝右叶(每组于各个时间点分别处理6只动物). 取肝右叶部分组织以40 g/L多聚甲醛/0.1 mol/L PBS(pH7.0-7.6)固定1 h, 常规脱水、浸蜡、包埋, 6 μm切片, 供原位杂交方法检测用. 和取肝右叶取部分组织以40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μm切片, 供NF-κB免疫组织化学检测.

1.2.3 原位杂交: 石蜡切片常规脱蜡至水, 30 mL/L H_2O_2室温10 min, 滴加30 g/L柠檬酸稀释的胃蛋白酶, 37℃消化10 min, 10 g/L多聚甲醛/0.1 mol/L PBS(pH7.0-7.6), 室温10 min, 加预杂交液, 39℃放置4 h, 加杂交液, 39℃过夜. 37 ℃ 2×SSC, 0.5×SSC, 0.2×SSC充分梯度洗涤, 加封闭液37℃ 30 min. 加生物素化鼠抗地高辛37℃ 60 min. 加SABC 37℃ 30 min. 加生物素化过氧化物酶37℃ 30 min. PBS洗3 min 3次. DAB显色. 苏木素复染, 水洗. 酒精脱水. 二甲苯透明, 封片. 杂交前各步严防RNase污染.

同时设置空白对照(以PBS代替杂交液与预杂交液)、阳性对照(用已知有BMP2表达的颌骨牙骨质化纤维瘤中组织石蜡切片). 阳性标准为胞质或核周或胞外基质中有棕黄色颗粒状染色, 阴性标准为胞质或核周或胞外基质中均无棕黄色颗粒状染色.

1.2.4 SABC免疫组化: 石蜡切片常规脱蜡至水, 15 mL/L H_2O_2室温10 min, 10 mmol/L枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)煮沸10 min, 滴加正常山羊血浆封闭液, 室温20 min. 滴加鼠抗NF-κB mAb (1∶50), 4℃孵育过夜, 滴加生物素羊抗鼠抗体, 室温30 min, 滴加预先混合的SABC复合物, 室温30 min, DAB显色. 苏木素复染, 水洗. 酒精脱水. 二甲苯透明, 封片.

同时设置空白对照(以PBS代替第一抗体与第二抗体)、阳性对照(用已知有NF-κB表达的

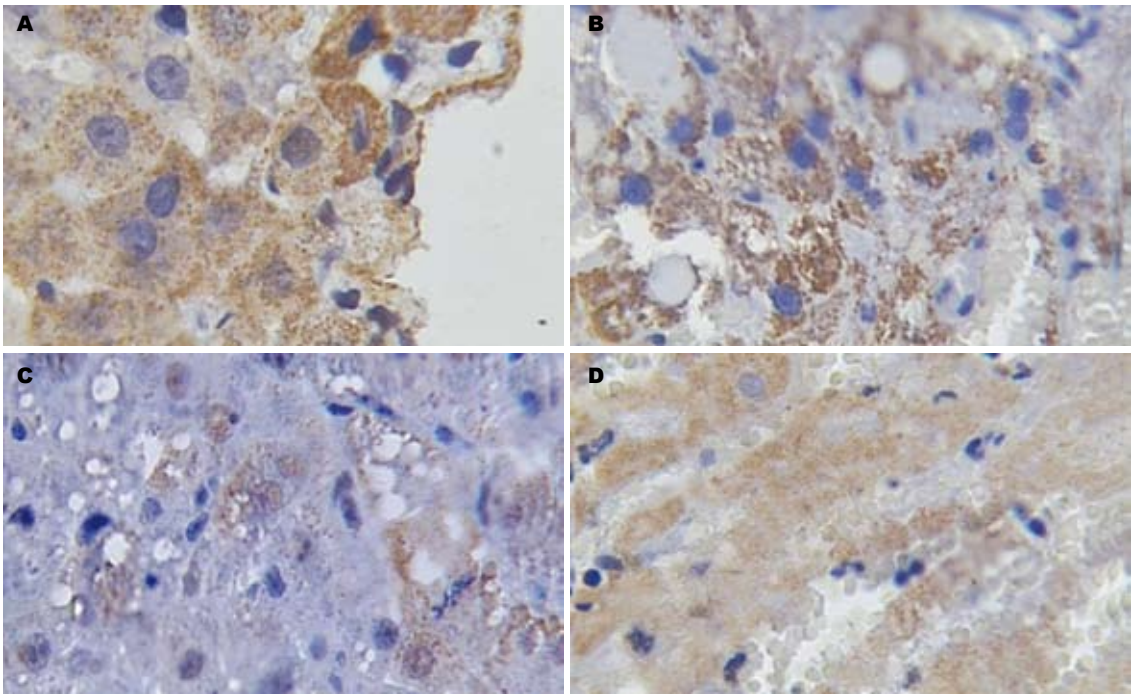


图 1 PH术后不同时间点BMP2 mRNA的表达变化图(×400). A: NC 0 h; B: PH 6 h; C: PH 12 h; D: PH 48 h.

■创新盘点
本研究采用原位杂交的方法, 进一步从基因水平上证实BMP2对肝再生的影响, 属首次报道.

溃疡性结肠炎大鼠模型小肠组织石蜡切片). 阳性标准为胞质或核周或核内中有棕黄色颗粒状染色, 阴性标准为胞质或核周或核内中均无棕黄色颗粒状染色.

1.2.5 对原位杂交: 免疫组化的片子进行图像灰度分析, 每张片子测3个视野取平均值.

统计学处理 使用SPSS13.0统计软件, 数值以mean±SD表示, 单因素方差分析, $P<0.05$有统计学意义.

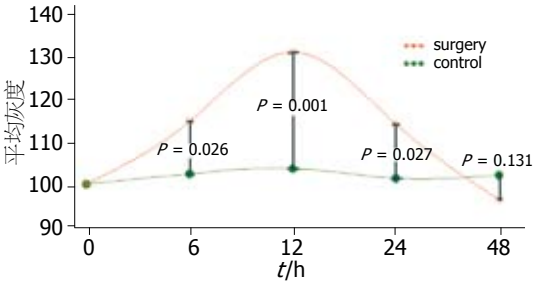


图 2 PH术后不同时间点BMP2 mRNA的表达灰度值线性变化图.

2 结果

2.1 BMP2 mRNA原位杂交检测结果 对于实验动物NC组肝脏组织中BMP2 mRNA在门静脉, 中央静脉, 汇管区的表达量较多(99.74±6.85), 细胞质中表达棕黄色颗粒. PH组术后BMP2 mRNA表达逐渐减少, 6 h为(114.41±5.12), 并在12 h时减少到最低(130.59±6.74). 随后BMP2 mRNA表达逐渐增多, 并在48 h表达量接近于NC组(96.16±6.52). SO组(99.74±6.85)与PH组6, 12, 24 h时间点组间存在统计学差异. SO组与NC组无统计学意义(图1-2)(BMP mRNA表达量越多灰度值越低).

2.2 NF-κB免疫组织化学检测结果 正常NC组肝组织内NF-κB阴性(99.74±3.85), 汇管区的棕色部位为非特异性着色. SO组(101.08±5.10)术后各时相点未见特异性染色. PH组NF-κB最初少量弱阳性表达于术后6 h(96.22±3.12)肝细胞质与肝细胞核; 12 h NF-κB表达增强(89.59±3.24), 主要出现在肝细胞质, 少数呈弱阳性表达分布于肝细胞核; 24 h NF-κB表达(83.72±4.32)进一步增强, 仍主要出现在肝细胞质, 少数呈弱阳性表达分布于肝细胞核; 48 h NF-κB多表达于肝细胞核且强度增加(77.18±3.52), 仍可见少量肝细胞核有NF-κB表达, 呈散在或小片状分布(图3)(蛋白表达量越多灰度值越低).

2.3 BMP2 mRNA与NF-κB的表达变化相关性分析 大鼠肝脏PH后12 h内NF-κB动态变化与BMP2动态变化经Pearson直线相关分析, r = -0.860($P<0.05$)呈负相关. PH后12 h到48 h内NF-κB动态变化与BMP2动态变化经Pearson直线相关分析, r = 0.821($P<0.05$)呈正相关.

3 讨论

本实验使用原位杂交的方法从基因水平进一步

■应用要点
研究BMP2对肝再生的影响, 对于以后肝硬化, 肝脏肿瘤, 肝移植等肝脏方面的疾病的诊断、治疗、以及药物的研究都有很深的影响.

■名词解释
骨形态发生蛋白(BMP): 一种能在啮齿类动物异位区诱导新骨形成的蛋白. 后来发现除骨组织以外, BMPs还主要参与其他组织器官包括肝组织在内的发育与生长过程.

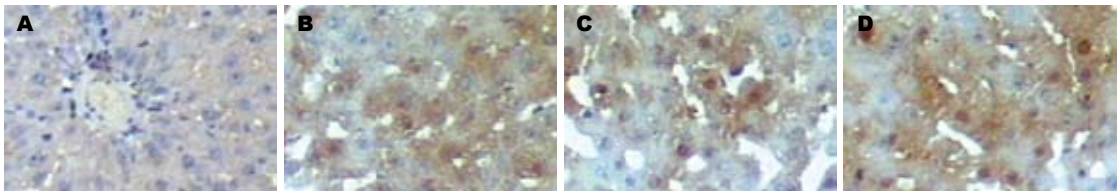


图 3 PH术后不同时间点NF-κB的表达(SABC × 200). A: NC NF-κB; B: PH 12 h NF-κB; C: PH 24 h NF-κB; D: PH 48 h NF-κB.

证实了BMP2 mRNA在肝再生过程中的变化情况. 对于实验动物肝脏再生过程中BMP2半定量检测结果是PH组BMP2 mRNA表达逐渐减少, 并在12 h后减少到最低. 随后BMP2 mRNA表达逐渐增多, 并在48 h表达量接近于NC组. SO组与PH组存在统计学差异. SO组与NC组无统计学意义. 与前期[3]的研究结果相一致. 再次提示BMP2信号负性调节肝细胞增殖.

实验PH后6 h残余肝组织可见NF-κB的表达及少量核移位的出现, 与细胞质中BMP2 mRNA表达水平下降的时间点一致; 12 h NF-κB表达增强, 主要出现在肝细胞质, 少数呈弱阳性表达分布于肝细胞核. 而12 h细胞质中BMP2 mRNA的表达呈现最低; 24 h NF-κB表达进一步增强, 仍主要出现在肝细胞质, 少数呈弱阳性表达分布于肝细胞核. 24 h BMP2 mRNA的表达开始增强; 48 h NF-κB多表达于肝细胞核且强度增加, 此阶段细胞质中BMP2 mRNA的表达已逐渐接近正常肝组织, 提示PH后残余肝组织在不同时间点出现NF-κB不同程度的激活, 通过比较PH后残余肝组织激活型NF-κB蛋白表达的动态变化与肝组织细胞质中BMP2 mRNA的表达动态变化, 可推测两者之间有一定的相关关系. BMP2 mRNA与NF-κB的表达率做相关性分析, 据此得出BMP2与NF-κB在肝再生初期即PH后12 h内呈负相关, 在肝再生后期即PH后12 h到48 h呈正相关. 在肝再生初期BMP2 mRNA的表达逐渐减少, 可能BMP2的减少促进肝再生, NF-κB的表达逐渐增强, 启动或增强相关基因的转录, 增强肝细胞的分化, 促进肝再生. 肝再生到一定程度即PH后12 h以后, BMP2 mRNA的表达开始逐渐增强, 可能BMP2开始逐渐抑制肝再生. 而NF-κB的表达继续增强且由胞质表达逐渐转为核内表达, 可能在肝再生后期NF-κB更多发挥着抑制肝细胞凋亡, 参与肝内炎症过程的作用.

目前关于BMP2和NF-κB对于肝再生的联合作用还没有明确的研究. NF-κB在肝再生过程中有可能是BMP2基因转录中的一种转录激活因子[9]. NF-κB是属于转录因子家族, 由5个亚基p65, c-Rel, RelB, p50和p52组成, 其中p50和p52早期两个高度同源的成员, 并且是最常见密切联系的成员. 通过凝胶电泳发现BMP2的nre 1基因结合了p50和p65的. 而在BMP2启动子中, 邻近nre 1位点, 有两个重叠sp1的位点被发现. 这可能的NF-κB的p50和p65和sp1的转录因子相互作用, 协调BMP2基因调控. 也可能在肝脏的中NF-κB的p50/p52存在的多余的调节BMP2表达的作用. 在肝脏NF-κB除了直接调节BMP2基因转录外. NF-κB还可能通过间接机制和其他转录因子调节BMP2基因表达.

以上是对BMP2信号传导的途径的初步研究, 但BMP2和NF-κB在肝脏再生过程中具体的调节机制及其信号传导途径尚待进一步研究.

4 参考文献

1 Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res* 2002: 4-10
2 Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528-1534
3 Xu CP, Ji WM, van den Brink GR, Peppelenbosch MP. Bone morphogenetic protein-2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation downregulated in the regenerating liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7621-7625
4 Zhang W, Yatskievych TA, Baker RK, Antin PB. Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling. *Dev Biol* 2004; 268: 312-326
5 Ader T, Norel R, Levoci L, Rogler LE. Transcriptional profiling implicates TGFbeta/BMP and Notch signaling pathways in ductular differentiation of fetal murine hepatoblasts. *Mech Dev* 2006; 123: 177-194
6 Knittel T, Fellmer P, Müller L, Ramadori G. Bone morphogenetic protein-6 is expressed in nonparenchymal liver cells and upregulated by transforming growth factor-beta 1. *Exp Cell Res* 1997; 232: 263-269
7 Miller AF, Harvey SA, Thies RS, Olson MS. Bone

morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem* 2000; 275: 17937-17945
8 Yang WJ, Zhang QY, Yu ZP, Song QT, Liang HP, Xu X, Zhu GB, Jiang FZ, Shi HQ. Effects of nuclear factor-kappaB on rat hepatocyte regeneration and apoptosis after 70% portal branch ligation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6775-6779
9 Feng JQ, Xing L, Zhang JH, Zhao M, Horn D, Chan J, Boyce BF, Harris SE, Mundy GR, Chen D. NF-kappaB specifically activates BMP-2 gene expression in growth plate chondrocytes in vivo and in a chondrocyte cell line in vitro. *J Biol Chem* 2003; 278: 29130-29135

■同行评价
本文内容新颖, 结果有一定参考意义, 具有较好的学术价值.

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 •

第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知

本刊讯 为满足全国专家、学者和临床一线医师对消化性病变介入/内镜新技术研究、探讨和交流的需求, 进一步提升国内消化系疾病尤其是消化道恶性病变介入/内镜诊治的技术水平, 上海同仁医院联合福建省肿瘤医院, 定于2008-11-7/12在福建省福州市举办第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会. 会议由福建省抗癌协会、福建省消化内镜学会和福建省放射学会介入学组具体承办. 中华消化内镜学杂志、中华放射学杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同参与协办. 会议将着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法, 为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台. 本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管和胃肠道等消化道管腔内支架治疗应用技术和发生的问题, 以及消化道病变的消化内镜、介入放射和内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨. 会议中还将安排疑难案例讨论及手术操作演示, 内容精彩. 参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分.

1 征稿内容

消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等; 消化系良性病变(如: 门静脉高压、胆道结石和消化道出血等)的内镜及介入新技术应用; 消化病诊治边沿交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验和个案报告等稿件.

2 征稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文; (2)论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果和结论四要素. 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内; (3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文. 优秀论文将安排在国家级杂志上发表; (4)邮寄稿件要求Word格式打印, 并附软盘, 特别鼓励E-mail投稿(以附件Word格式传送); (5)截稿日期: 2008-08-31.

3 联系方式

林海澜, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院介入科. hailan@pub2.fz.fj.cn; 手机: 13850171973, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

施宏, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院内镜科. endoshihong@hotmail.com; 手机: 13959105615, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2458-2463
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

hHGF转染HepG2细胞后基因表达谱差异筛选

张维燕, 张锦前, 李晓光, 成 军, 李国力, 王 琦, 张晨宇, 王晓春, 柴艳云

■背景资料
hHGF具有多种生物学功能, 其可以逆转肝纤维化及改善肝硬化、治疗脂肪肝、防止肺纤维化, 以及治疗血管性疾病、胃溃疡、糖尿病等多种疾病. 近年来, 在hHGF的信号转导途径及代谢方面的研究则更引人注目, 但相关的作用机制尚不明确.

张维燕, 张锦前, 李晓光, 成军, 李国力, 王琦, 张晨宇, 王晓春, 柴艳云, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
张维燕, 2006年北京大学医学部硕士, 主治医师, 主要从事肝脏疾病合并糖尿病的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30600524
北京市卫生局资助项目, No. 2004-局-051
作者贡献分布: 此课题由张锦前设计; 研究过程由张维燕, 张锦前, 李晓光, 成军, 李国力, 王琦, 张晨宇, 王晓春及柴艳云操作完成; 数据分析由张维燕, 张锦前及李晓光完成; 本论文写作由张维燕, 张锦前及成军完成.
通讯作者: 张锦前, 100011, 北京市东城区安定门外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所.
jingwanghou@yahoo.com.cn
电话: 010-64200407
收稿日期: 2008-05-12 修回日期: 2008-06-15
接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-08-08

Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with human hepatocyte growth factor

Wei-Yan Zhang, Jin-Qian Zhang, Xiao-Guang Li, Jun Cheng, Guo-Li Li, Qi Wang, Chen-Yu Zhang, Xiao-Chun Wang, Yan-Yun Chai

Wei-Yan Zhang, Jin-Qian Zhang, Xiao-Guang Li, Jun Cheng, Guo-Li Li, Qi Wang, Chen-Yu Zhang, Xiao-Chun Wang, Yan-Yun Chai, Insistute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600524; and the Health Bureau Foundation of Beijing Municipality, No. 2004-bureau-051
Correspondence to: Dr. Jin-Qian Zhang, Insistute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China. jingwanghou@yahoo. com.cn
Received: 2008-05-12 Revised: 2008-06-15
Accepted: 2008-06-17 Pubilshed online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To construct the eukaryotic expression vector of pcDNA3.1(-)-hHGF, and to screen the differentially expressed genes in HepG2 cells transfected with the vector.

METHODS: We constructed the expression vector of pcDNA3.1(-)-hHGF, which was confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing, and then transfected it into HepG2 cell line. The expression of HGF protein was observed by Western blotting. At last, we compared the differentially expressed genes between HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-hHGF and pcDNA3.1(-) respectively by cDNA microarray technique.

RESULTS: The expression vector was constructed successfully and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. The expression of hHGF protein was confirmed by Western blotting. High quality mRNA and cDNA had been prepared and successful microarray screening had been conducted. From the scanning results, we found 430 genes that were up-regulated and 88 genes down-regulated in HepG2 cells transfected with hHGF.

CONCLUSION: cDNA microarray technology is successfully used to screen the genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with hHGF, which brings some new clues for studying the regulatory mechanism of hHGF in liver cells.

Key Words: Human hepatocyte growth factor; HepG2 cell; Differential gene

Zhang WY, Zhang JQ, Li XG, Cheng J, Li GL, Wang Q, Zhang CY, Wang XC, Chai YY. Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with human hepatocyte growth factor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2458-2463

摘要

目的: 构建hHGF真核表达载体, 并在HepG2细胞中表达, 筛选其对HepG2细胞的差异表达基因.

方法: 构建pcDNA3.1(-)-hHGF载体, 测序鉴定; 转染HepG2细胞后蛋白免疫印迹检测; 运用基因表达谱芯片技术, 筛选pcDNA3.1(-)-hHGF和pcDNA3.1(-)载体分别转染HepG2细胞后, 提取mRNA并逆转录为cDNA, 经表达谱芯片分析差异表达基因.

结果: 构建的表达载体经酶切和测序确定; 转染HepG2细胞后hHGF表达经蛋白免疫印迹证实; 经20000个基因的表达谱芯片分析发现, 其中有430个基因表达水平显著上调, 88个基

■同行评议者
唐霓, 副研究员, 重庆医科大学教育部感染性疾病分子生物学重点实验室; 刘杞, 教授, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所

因表达水平显著下调.

结论: 筛选出HGF转染HepG2细胞后的差异表达基因, 对其在肝细胞中多种作用机制研究提供了重要依据.

关键词: 人肝细胞生长因子; HepG2细胞; 差异基因

张维燕, 张锦前, 李晓光, 成军, 李国力, 王琦, 张晨宇, 王晓春, 柴艳云. hHGF转染HepG2细胞后基因表达谱差异筛选. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2458-2463
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2458.asp

0 引言

人肝细胞生长因子(human hepatocyte growth factor, hHGF)具有多种生物学作用[1], 与其受体c-met介导信号传导, 是正常胚胎发育、多种组织器官(如肝、肾、肠、骨骼、神经系统、造血)发生过程中一个重要调控因子[2]. 近年来国内外对hHGF作用机制的研究涉及到hHGF在肺成纤维细胞、血管内皮细胞、肺癌细胞等多种细胞信号转导途径, 细胞凋亡机制和hHGF对糖类和脂类代谢的影响. 研究显示hHGF可阻止慢性肝炎向肝硬化发展, 减缓急性肝衰竭的发展, 改善肝硬化临床症状[3]. 但是目前hHGF促进肝细胞再生、改善肝纤维化及肝硬化的信号转导途径及其机制、其是否抑制细胞调亡、及其对糖类和脂类代谢的影响的机制研究较少, 尚无明确结论. 本研究应用基因芯片技术, 筛选hHGF对HepG2细胞差异表达的基因, 为进一步深入研究hHGF在肝细胞的多种作用机制提供了坚实的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 质粒pGEM-ThHGF由吉林大学第一医院惠赠, 真核表达质粒pcDNA3.1(-)质粒购自Invitrogen公司; HepG2细胞购自协和医院细胞中心, 细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂TRIzol均购自Gibco公司, 限制性内切酶*Apa* Ⅰ、*Bst*XⅠ购自Toyobo生物科技有限公司; T_4 DNA连接酶均购自MBI公司; 去内毒素质粒提取试剂盒购自Toyobo生物科技有限公司; 小鼠抗人HGF的抗体, 购自Simga公司. 基因芯片检测由上海联合基因有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 构建hHGF基因真核表达载体: 将质粒pGEM-T hHGF转化感受态菌X后, 提取该转化菌质粒pGEM-T hHGF并将该质粒用*Apa* Ⅰ、*Bst* XⅠ双酶切、PCR确定; 测序质粒pGEM-ThHGF测定其基因序列约为2200 bp, 结果与目的基因序列hHGF对照, 其序列长度一致且同源性为99.5%. 以pGEM-T hHGF为模板用*Apa* Ⅰ及*Sal* Ⅰ双酶切, 回收2.2 kb左右的目的片段, 与表达载体pcDNA3.1(-)连接, 再转化入宿主菌BL21(DE3)后提取质粒pcDNA3.1(-)-hHGF进行*Apa* Ⅰ及*Sal* Ⅰ双酶切鉴定.

1.2.2 HepG2细胞的转染和筛选: HepG2细胞株用DMEM培养基(含有100 kU/L氨青霉素的100 mL/L小牛血清)常规培养, 待生长到50%-70%融合时, 采用Lipofectin脂质体法(转染程序参照Manitsans方法)将pcDNA3.1(-)及pcDNA3.1(-)-hHGF质粒转染细胞, 含G418的培养基继续培养48 h, 裂解细胞后留取上清, 用于表达产物Western blot检测. hHGF蛋白Western blot检测: 将上清于SDS-PAGE胶电泳, 于TPBS(30 g/L牛血清白蛋白)封闭液室温封闭2 h, 加入封闭液稀释过的抗体(小鼠抗人HGF的抗体, 1∶500稀释), 4℃孵育1 h, 用PBS液漂洗4-6次, 每次5 min, 再与封闭液稀释的酶标抗体(山羊抗鼠IgG-HRP, 1∶1000稀释)于30℃温育60 min, PBS漂洗4-5次后滤纸吸干残余液体, 加入ECL化学发光底物, 在X光片曝光, 显影、定影后可见结果.

1.2.3 总RNA提取及mRNA纯化: 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时分别将pcDNA3.1(-)及pcDNA3.1(-)-hHGF转染细胞3、6、12、24、48 h后收获细胞. 使用TRIzol试剂一步法提取细胞总RNA(对照组和实验组), 样品经分光光度计检测吸光度*A*值, 并行热稳定实验, 于-20℃和70℃保温1 h后, 经琼脂糖凝胶电泳检测28S、18S条带变化. 以Qiagen公司Oligotex mRNA Midi Kit纯化得mRNA. 操作按说明书进行, 并行电泳检测.

1.2.4 探针标记和芯片制备: 常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μg), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在20 μL 5×SSC+2 g/L SDS杂交液中. 芯片包含的20000个cDNA由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行PCR扩增, PCR产物长度为1000-3000 bp. 靶基因以0.5 g/L溶解于3×SSC溶液中, 用Cartesian公司的Cartesian 7500点样仪

■研发前沿
关于HGF生物学功能的相关机制研究热点逐渐深入并涉及到肿瘤发生、细胞凋亡、信号转导、物质代谢等领域, 而后两方面的研究则更为引人注目, 但这些作用机制仍不明确. 因此, 本研究筛选相关基因, 从而为相关机制的研究提供思路和方向.

■**创新盘点**
本研究应用基因芯片技术筛选HGF对HepG2细胞差异表达的基因, 发现了与多种生物学功能有关的多种基因都存在明显的表达差异, 其中部分是原有国内外研究工作中从未见文字报道的基因, 尤其在物质代谢和作用机制方面的新发现更具研究意义.

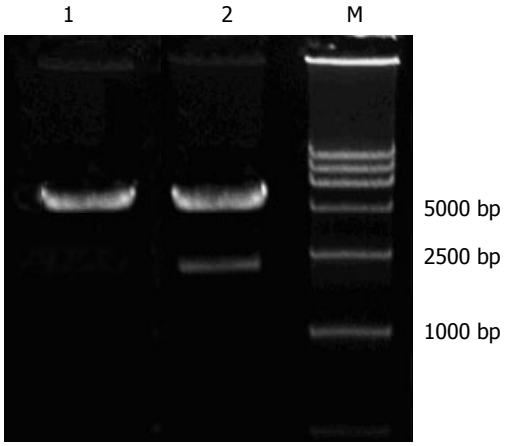


图 1 pcDNA3.1(−)−hHGF经*Apa* Ⅰ、*Bst* XI双酶切鉴定. 1: pcDNA3.1(−)质粒*Apa* Ⅰ及*Sal* Ⅰ双酶切鉴定结果; 2: pcDNA3.1(−)−hHGF *Apa* Ⅰ及*Sal* Ⅰ双酶切鉴定.

及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h), UV交联, 再分别用2 g/L SDS、水及2 g/L的硼氢化钠溶液处理10 min, 晾干备用.

1.2.5 *杂交及洗涤*: 将基因芯片和杂交探针在95℃水浴变性5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于60℃杂交15-17 h. 后用SSC及SDS混合液洗涤10 min, 室温晾干.

1.2.6 *检测与分析*: 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因点2个点, 共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正.用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值.阳性结果判断: Cy5/Cy3>1.8, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.6, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 *构建hHGF真核表达载体pcDNA3.1(-)-hHGF, 酶切鉴定* 将质粒pGEM-T hHGF转化感受态菌X后, 提取该转化菌质粒pGEM-T hHGF并将该质粒用*Apa* Ⅰ、*Bst* XI双酶切、PCR确定; 测序质粒pGEM-T hHGF测定其基因序列约为2 200 bp, 结果与目的基因序列hHGF对照一致; 以pGEM-T hHGF为模板用*Apa* Ⅰ及*Sal* Ⅰ双酶切, 回收2.2 kb左右的目的片段, 与表达载体pcDNA3.1(-)连接, 再转化入宿主菌BL21(DE3)后提取质粒pcDNA3.1(-)-hHGF进行*Apa* Ⅰ及*Sal* Ⅰ双酶切鉴定(图1).

2.2 *真核表达载体pcDNA3.1(-)和pcDNA3.1(-)-hHGF分别转染HepG2细胞后, 经蛋白免疫印迹检测* HepG2细胞株用DMEM培养基培养, 待生长到50%-70%融合时, Lipofectin脂质体法将pcDNA3.1(-)及pcDNA3.1(-)-hHGF质粒分别转染细胞, 培养48 h后裂解细胞后留取上清于SDS-PAGE胶电泳, Western blot检测(图2).

图 2 pcDNA3.1(−)质粒及pcDNA3.1(−)−hHGF质粒转染HepG2细胞后蛋白免疫印迹检测确定. 1: pcDNA3.1(−)质粒转染细胞培养后裂解细胞上清Western blot结果; 2: pcDNA3.1(−)−hHGF质粒转染细胞培养后裂解细胞上清Western blot结果.

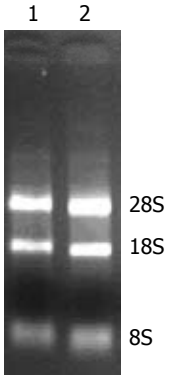


图 3 pcDNA3.1(−)质粒及pcDNA3.1(−)−hHGF质粒分别转染HeG2细胞后提取RNA结果. 1: SpcDNA3.1(−)质粒转染HepG2细胞后提取总RNA; 2.pcDNA3.1(−)−hHGF质粒转染HeG2细胞后提取总RNA.

2.3 *总RNA提取* 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时分别将pcDNA3.1(-)及pcDNA3.1(-)-hHGF转染细胞48 h后收获细胞, 使用TRIzol试剂一步法提取细胞总RNA, 琼脂糖凝胶电泳可见28S、18S及8S条带(图3).

2.4 *差异表达基因分析* 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因点2个点, 共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正. 用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>1.8, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.6, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

经20000个基因的表达谱芯片分析发现, 其中有430个基因表达水平显著上调, 88个基因表达水平显著下调. 表达增强的基因有信号传导子及转录激活子1(signal transducers and activators of transcription 1, STAT1)、蛋白酪氨酸激酶9(protein tyrosine kinase 9, PTK9)、促分裂原活化蛋白激酶4(mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4, MAPK4)、磷脂酰肌醇-3-磷酸相关蛋白、磷酯酰肌醇4-激酶、RAS癌基因家族成员等多个涉及Ras/MAP kinase和Jak-

■应用要点
本文的研究工作为hHGF在参与物质代谢和细胞凋亡、肿瘤发生等的相关机制提供了实验依据和方向, 极具研究价值和前景.

表 1 表达显著增强的主要基因

序号	GenBank	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_021033.4	RAS癌基因家族成员	2.78
2	NM_003722.3	肿瘤蛋白P73-like	4.89
3	NM_002940.1	ATP-结合盒	2.09
4	XM_371177.2	癌胚抗原相关细胞黏附因子1	2.01
5	NM_007315.2	(STAT1)信号传导子及转录激活子1	2.65
6	NM_005734.2	Fas相互作用丝氨酸-苏氨酸激酶3	3.65
7	NM_021970.2	促分裂原活化蛋白激酶激酶1相互作用蛋白1	2.84
8	NM_003930.3	scr家族相关磷酸蛋白2	2.08
9	NM_198974.1	蛋白酪氨酸激酶9	2.57
10	NM_145686.2	促分裂原活化蛋白激酶4	2.81
11	NM_019061.2	磷脂酰肌醇-3-磷酸相关蛋白	2.29
12	NM_018323.2	磷酯酰肌醇4-激酶	2.35
13	NM_182804.1	载脂蛋白B48受体	3.18
14	NM_000384.1	载脂蛋白B	2.54
15	NM_003234.1	转铁蛋白受体	2.57
16	NM_030777.3	葡萄糖转运蛋白10	2.08
17	NM_003852.3	转录中介因子1	2.01
18	NM_014739.1	Bcl-2相关转录因子1	2.51
19	NM_016205.1	血小板衍生的生长因子C	2.11

表 2 表达显著降低的主要基因

序号	GenBank	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_004292.1	Ras和Rab作用因子1	0.45
2	NM_001761.1	细胞周期调节蛋白	0.47
3	NM_000755.2	肉毒碱乙酰转移酶	0.43
4	NM_014266.3	造血细胞信号传导器	0.49
5	NM_031925.1	肿瘤坏死因子诱导跨膜蛋白	0.47
6	NM_004512.3	白细胞介素-11受体	0.41
7	NM_183075.1	细胞色素P450	0.45
8	NM_153486.2	乳酸脱氢酶D	0.45
9	NM_000579.1	趋化因子受体5	0.48

STAT通路相关的信号转导蛋白. 表达显著增强及减弱的主要基因见表1-2.

2.5 表达谱芯片聚类分析结果 对照组及hHGF转染组各时间点表达谱芯片结果, 用cluster 3.0软件进行聚类分析(图4).

3 讨论

HGF具有多种生物学功能, 其可以逆转肝纤维化及改善肝硬化的发生和发展; 可以用于治疗脂肪肝、防止肺纤维化; 也可以用于治疗血管性疾病、胃溃疡、糖尿病等多种疾病. 近年来, 对HGF生物学功能的相关机制研究也逐渐深入并涉及到了肿瘤发生、细胞凋亡、信号转导等领域, 尤其是在HGF的信号转导途径以及能量代谢方面的研究则是更为引人注目, 但HGF对肝细胞的作用机制仍然很不明确. 因此研究HGF转染HepG2细胞后的差异表达基因, 对深入研究相关的作用机制具有十分重要的意义. 本研究应用表达谱芯片技术筛选HGF转染HepG2细胞的差异表达基因, 并从20 000个基因中筛选出518个差异表达的基因, 其中涉及细胞信号转导、凋亡、能量代谢、肿瘤发生等多个领域, 这与HGF的多样化生物学功能密切相关.

首先, 在有关HGF的信号转导途径的相关研究领域中, Liang *et al*[4]早在1998年就进行了HGF和KGF(keratinocyte growth factor)促视网膜

■名词解释
hHGF: 一种多功能生长因子, 是一种在胚胎形成、器官发生和器官再生的过程中形成正常组织结构的关键因子. 他具有多种生物学作用, 与其受体c-met介导信号传导, 是正常胚胎发育、多种组织器官(如肝、肾、肠、骨骼、神经系统、造血)发生过程中一个重要调控因子.

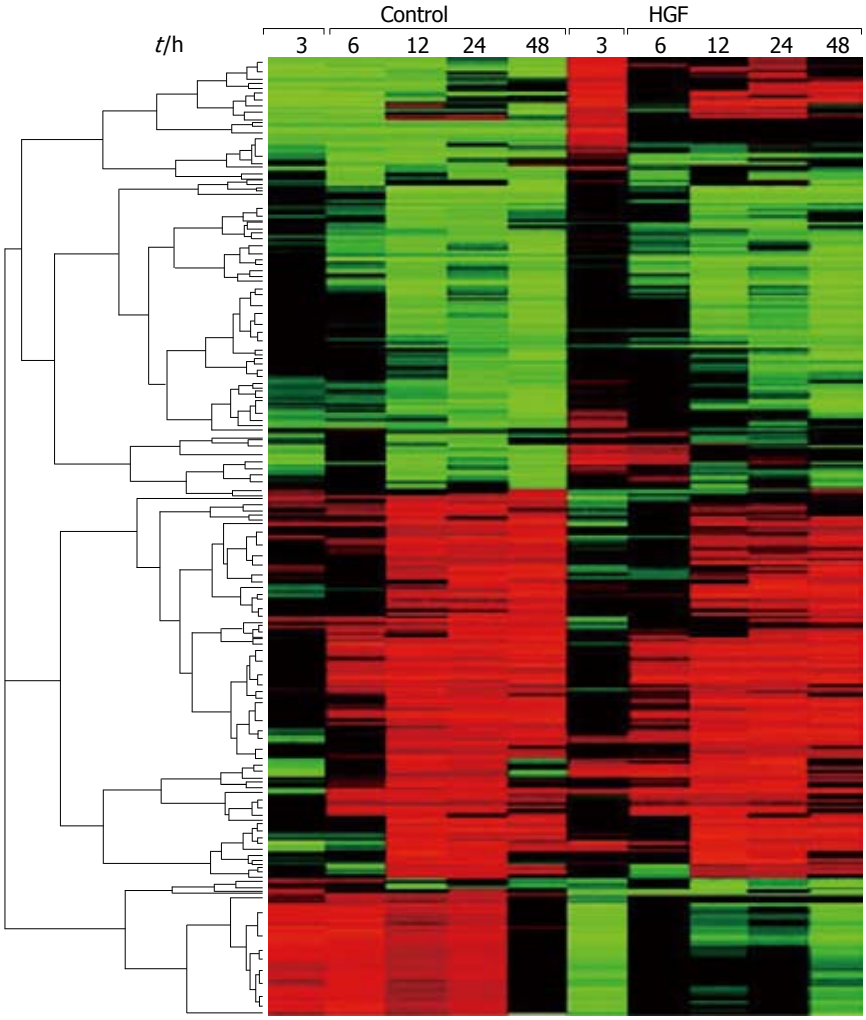


图4 pcDNA3.1(–)质粒(对照control)及pcDNA3.1(–)–hHGF质粒分别转染HeG2细胞后不同时间(3、6、12、24、48 h), 处理细胞提取RNA进行表达谱基因芯片检测后用cluster 3.0软件进行聚类分析结果.

上皮细胞再生时Ras/MAP kinase和Jak-STAT通路的研究, 并证实此信号转导途径的存在. 近来又有多位研究者进行了HGF在其他种类细胞中信号转导途径的研究: HGF在肺成纤维细胞通过激活促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路和基质金属蛋白酶1(matrix-metalloproteinase 1, MMP-1), 减少胶原和结缔组织生长因子[5]; 肺小细胞癌是激活MAPK等参与信号传导[6]; HGF还通过Ras信号途径调节卵巢癌的转移能力[7]; 而对凋亡的调控是通过磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)和促分裂原活化蛋白激酶激酶通路[8], 增强抗凋亡基因Bcl-2表达[9].

HGF在肝脏首先与肝细胞表面的c-met结合后通过后者将信号传导入胞内, 促进肝细胞的DNA合成导致肝细胞的增殖、有丝分裂, 促进肝细胞及肝脏再生. 而这些过程中相关的信号通路并不明确, 国内外尚未见有关研究报道. 本研究提示HGF作用于HepG2细胞表达增强的基因有信号传导子及转录激活子1(STAT1)、蛋白酪氨酸激酶9(PTK9)、促分裂原活化蛋白激酶4(MAPK4)、磷脂酰肌醇-3-磷酸相关蛋白、磷酯酰肌醇4-激酶、RAS癌基因家族成员等多个涉及Ras/MAP kinase和Jak-STAT通路相关的信号转导蛋白. 我们考虑HGF可能同时通过Ras和JAK-STAT两种信号转导途径调节肝细胞再生. 本研究中HGF显著上调Bcl-2相关转录因子, 提示HGF也可能通过增强抗凋亡基因Bcl-2表达抑制肝细胞凋亡, 从而减轻肝脏损害. 以上结果为相关研究提示了大量的研究方向和思路, 我们拟进一步深入研究确定.

HGF在上皮细胞中的作用研究较多, 在脂肪形成中的作用并不清楚. 对HGF转基因老鼠研究显示, 正常饮食时转基因老鼠血清微粒体甘油三酯转运蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)活性和载脂蛋白B(apolipoprotein B, ApoB)水平与甘油三酯同时升高, 在高脂饮食时MTP活性上调更加明显, HGF高表达显著改善高脂饮食导致的脂肪肝, 同时给予HepG2细胞系重组人HGF, 可以刺激MTP和ApoB表达, 同

时减少细胞内脂肪. 而这种HGF诱导的MTP和ApoB高表达可以显著被PD98059(MAPK抑制剂)抑制. HGF通过激活MTP和ApoB改善高脂饮食诱导的脂肪肝, 并且其信号转导途径也是Ras/MAP kinase[10]. 本研究显示HGF在HepG2细胞中上调ApoB和ApoB48受体, 提示HGF可能参与载脂蛋白的表达调控, 这可能与脂类代谢和脂肪肝也密切相关.

另外, HGF与糖代谢、肥胖和代谢综合征密切相关[11-12]. 肥胖患者HGF血清水平显著升高, 并随着体质量指数增加而增加[13]. 手术减肥后HGF水平显著下降[14], 提示HGF与肥胖密切相关. 在老鼠3T3-L1脂肪细胞中HGF刺激磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)依赖的蛋白激酶B活性、葡萄糖转运蛋白-4易位和糖摄取增加[15]. 胰腺β细胞C-met受体失活基因敲出小鼠出现轻度高血糖、胰岛素水平下降, 以及糖代谢失调和β细胞对糖摄入后的急性胰岛素分泌完全丧失、葡萄糖转运蛋白2下调等等, 这些提示HGF/c-met信号通路在调节B细胞功能和维持糖稳态具有重要意义[16].本研究显示HGF上调葡萄糖转运蛋白10, 说明HGF可能参与了肝细胞对糖类代谢的调节, 这一现象及其机制还需要进一步研究.

总之, 我们筛选了hHGF转染HepG2细胞的差异表达基因后发现, 参与多种生物学过程的多种基因都存在明显的表达差异, 其主要与细胞信号转导、细胞增殖与分化、能量代谢、细胞凋亡和肿瘤发生等密切相关. 本实验结果为进一步研究HGF在肝细胞中相关生物学过程及其信号转导机制提供了坚实的基础, 尤其在HGF与糖、脂类代谢相关性的方面则更具重要意义.

4 参考文献

1 Yang J, Chen S, Huang L, Michalopoulos GK, Liu Y. Sustained expression of naked plasmid DNA encoding hepatocyte growth factor in mice promotes liver and overall body growth. *Hepatology* 2001; 33: 848-859

2 Grassinger J, Mueller G, Zaiss M, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Hennemann B. Differentiation of hematopoietic progenitor cells towards the myeloid and B-lymphoid lineage by hepatocyte growth factor (HGF) and thrombopoietin (TPO) together with early acting cytokines. *Eur J Haematol* 2006; 77: 134-144

3 Arthur LG, Schwartz MZ, Kuenzler KA, Birbe R. Hepatocyte growth factor treatment ameliorates diarrhea and bowel inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 139-143; discussion 139-143

4 Liang Q, Mohan RR, Chen L, Wilson SE. Signaling by HGF and KGF in corneal epithelial cells: Ras/MAP kinase and Jak-STAT pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1329-1338

5 Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Highland KB, Hant F, Nietert PJ, Singleton CB, Silver RM. Down-regulation of collagen and connective tissue growth factor expression with hepatocyte growth factor in lung fibroblasts from white scleroderma patients via two signaling pathways. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 3468-3477

6 Ma PC, Tretiakova MS, Nallasura V, Jagadeeswaran R, Husain AN, Salgia R. Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion. *Br J Cancer* 2007; 97: 368-377

7 Ueoka Y, Kato K, Wake N. Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via ras mediated pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202: 81-88

8 Reveneau S, Paumelle R, Deheuninck J, Leroy C, De Launoit Y, Fafeur V. Inhibition of JNK by HGF/SF prevents apoptosis induced by TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 100-103

9 Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Yamasaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane. *Diabetes* 2002; 51: 2604-2611

10 Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, Ariyama Y, Otsuka T, Sohara N, Kakizaki S, Sato K, Mori M. HGF ameliorates a high-fat diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G204-G210

11 Bell LN, Ward JL, Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Jones R, Cacucci BM, Gupta CE, Sheridan C, Sheridan K, Shankar SS, Steinberg HO, March KL, Considine RV. Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E843-E848

12 Hiratsuka A, Adachi H, Fujiura Y, Yamagishi S, Hirai Y, Enomoto M, Satoh A, Hino A, Furuki K, Imaizumi T. Strong association between serum hepatocyte growth factor and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2927-2931

13 Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, Li J, Slavens CA, Jones RM, March KL. Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1408-1413

14 Swierczynski J, Korczynska J, Goyke E, Adrych K, Raczynska S, Sledzinski Z. Serum hepatocyte growth factor concentration in obese women decreases after vertical banded gastroplasty. *Obes Surg* 2005; 15: 803-808

15 Bertola A, Bonnafous S, Cormont M, Anty R, Tanti JF, Tran A, Le Marchand-Brustel Y, Gual P. Hepatocyte growth factor induces glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes through A Gab1/phosphatidylinositol 3-kinase/Glut4 pathway. *J Biol Chem* 2007; 282: 10325-10332

16 Roccisana J, Reddy V, Vasavada RC, Gonzalez-Pertusa JA, Magnuson MA, Garcia-Ocaña A. Targeted inactivation of hepatocyte growth factor receptor c-met in beta-cells leads to defective insulin secretion and GLUT-2 downregulation without alteration of beta-cell mass. *Diabetes* 2005; 54: 2090-2102

■同行评价

本研究有一定新意, 所得的结果对其他进行相关研究的人员有一定参考和借鉴价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2464-2469
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

大鼠骨髓间充质干细胞向类肝细胞体外诱导分化

何文艳, 刘树贤, 姜慧卿

■背景资料
肝细胞移植越来越受到重视, 寻找合适的肝细胞来源成为重要的研究课题. MSCs可以分化为肝细胞, 可以自体取材, 植入体内无免疫排斥反应, 体内外均有极强分化潜能. MSCs有希望成为治疗重症肝病的种子细胞.

何文艳, 姜慧卿, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000
何文艳, 中国石油天然气集团公司中心医院感染科 河北省廊坊市 065000
刘树贤, 河北医科大学第一医院肝病中心实验室 河北省石家庄市 050031
何文艳, 2007年河北医科大学硕士, 主治医师, 主要从事肝病及传染病的临床工作.
作者贡献分布: 本研究由姜慧卿指导, 刘树贤设计; 研究过程由何文艳操作完成; 数据分析及论文撰写由何文艳完成; 姜慧卿与刘树贤审阅.
通讯作者: 姜慧卿, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化科. huiqingjiang@yahoo.com.cn
电话: 0311-66002955
收稿日期: 2008-04-18 修回日期: 2008-06-27
接受日期: 2008-07-07 在线出版日期: 2008-08-08

Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro*

Wen-Yan He, Shu-Xian Liu, Hui-Qing Jiang

Wen-Yan He, Hui-Qing Jiang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Wen-Yan He, Department of Infection, Central Hospital of China National Petroleum Corporation, Langfang 065000, Hebei Province, China
Shu-Xian Liu, Center of Liver Diseases, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China
Correspondence to: Dr. Hui-Qing Jiang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping Western Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. huiqingjiang@yahoo.com.cn
Received: 2008-04-18 Revised: 2008-06-27
Accepted: 2008-07-07 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into hepatocyte-like cells.

METHODS: A total of 24 Wistar rats were randomly divided into 3 groups: normal group, hepatic fibrosis model group and Chinese medicine treatment group. The model of liver fibrosis was induced by subcutaneous injection of CCl_4. After the model was successfully developed, and the rats in Chinese medicine treatment group were fed with Danjin Shugan capsule. At the end of treatment, the rats were killed and the livers were obtained. Histopathological changes were evaluated by hematoxylin and eosin staining. MSCs were isolated by gradient density centrifugation and plastic adherence and then purified. The purified MSCs in each group were cultured with hepatocyte growth factor (HGF) and fibroblast growth factor-4 (FGF-4). The levels of alpha-fetoprotein (AFP) and albumin (Alb) in the supernatant were determined by radioimmunoassay on days 15, 21 and 27. On day 27, the cells were collected for glycogen staining and CK-18 immunocytochemical analysis.

RESULTS: Compared with those in the non-induced MSCs among the three groups, the levels of AFP in the induced-MSCs were higher on days 15, 21, and 27, and reached to the peak value on day 21 (hepatic fibrosis model group: 48.94 ± 0.08 *vs* 9.90 ± 0.09; Chinese medicine treatment group: 49.86 ± 0.29 *vs* 8.69 ± 0.62; normal group: 38.65 ± 0.33 *vs* 9.04 ± 0.11; all $P < 0.01$). There were significant differences in Alb levels on days 21 and 27 between the induced and non-induced MSCs (1.11 ± 0.08 *vs* 0.32 ± 0.00, 1.25 ± 0.04 *vs* 0.32 ± 0.00, 1.06 ± 0.03 *vs* 0.33 ± 0.00; 1.52 ± 0.02 *vs* 0.33 ± 0.00, 1.79 ± 0.01 *vs* 0.31 ± 0.03, 1.63 ± 0.04 *vs* 0.32 ± 0.01; all $P < 0.01$), but not on day 15; the peak level of Alb was on day 27. Both glycogen and CK-18 were positive on day 27 in the induced MSCs. According to AFP and Alb levels, the induced effects of Chinese medicine group were superior to those of the other two groups.

CONCLUSION: MSCs can differentiate into hepatocyte-like cells with hepatic phenotype and function in the presence of HGF and FGF-4, which may be used as a kind of cell resources to treat severe hepatic disease. Chinese medicine may optimize the induction of MSCs differentiation *in vitro*.

Key Words: Bone marrow; Mesenchymal stem cell; Hepatocyte-like cells; Rat; Radioimmunoassay; Immunocytochemistry; Hepatocyte growth factor; Fibroblast growth factor-4

He WY, Liu SX, Jiang HQ. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2464-2469

■同行评议者
朱传武, 副主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科

摘要

目的: 观察不同条件下骨髓间充质干细胞(MSCs)体外诱导分化为类肝细胞的差异.

方法: Wistar大鼠24只随机均分为3组, 分别为正常对照组、肝纤维化模型组、自拟中药干预组. 采用CCl_4乳剂皮下注射建立肝纤维化模型. 造模成功后中药干预组采用丹金舒肝胶囊药液灌胃治疗. 治疗结束后剖杀大鼠, 留取大鼠肝脏标本, HE染色观察各组病理改变. 采用密度梯度离心法和贴壁法分离各组大鼠的MSCs, 经培养传代获得纯化的MSCs. 各组纯化的MSCs采用HGF、FGF-4进行诱导培养. 留取15、21、27 d细胞培养液进行白蛋白(Alb)、甲胎蛋白(AFP)检测; 于27 d收集细胞爬片, 进行糖原染色和CK-18免疫细胞化学染色.

结果: 3组15、21和27 d各MSCs诱导组AFP水平均高于MSCs非诱导组(P<0.01), 其中21 d AFP水平最高(肝纤维化模型组: 48.94±0.08 *vs* 9.90±0.09; 中药干预组: 49.86±0.29 *vs* 8.69±0.62; 正常对照组: 38.65±0.33 *vs* 9.04±0.11, 均P<0.01); 3组15 d各MSCs诱导组与MSCs非诱导组白蛋白水平无统计学意义; 21 d、27 d各MSCs诱导组白蛋白水平均高于MSCs非诱导组(1.11±0.08 *vs* 0.32±0.00, 1.25±0.04 *vs* 0.32±0.00, 1.06±0.03 *vs* 0.33±0.00; 1.52±0.02 *vs* 0.33±0.00, 1.79±0.01 *vs* 0.31±0.03, 1.63±0.04 *vs* 0.32±0.01, 均P<0.01), 27 d最高. 27 d各MSCs诱导组糖原染色阳性, 免疫细胞化学染色CK-18均阳性, 而MSCs非诱导组糖原染色、CK-18均阴性.从AFP、Alb水平综合比较, 3组诱导效果发现自拟中药干预组优于其他2组.

结论: HGF、FGF-4可在体外诱导实验性大鼠的MSCs分化为具有肝细胞样细胞表型和功能的类肝细胞; 自体MSCs可以作为治疗临床重症肝病的一种细胞来源, 而临床联合中药复方治疗可能会使MSCs体外诱导的效果更为理想.

关键词: 骨髓; 间充质干细胞; 类肝细胞; 大鼠; 放射免疫法; 免疫细胞化学; 肝细胞生长因子; 成纤维细胞生长因子4

何文艳, 刘树贤, 姜慧卿. 大鼠骨髓间充质干细胞向类肝细胞体外诱导分化. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2464–2469
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2464.asp

0 引言

当前重症肝病患者的肝移植已取得重大成就, 但由于肝源紧张、费用昂贵等因素限制了肝移植的开展. 因此, 人体干细胞的研究越来越受到人们的重视. 骨髓间充质干细胞(MSCs)是骨髓干细胞的重要组成部分. 该细胞能在不同理化环境和细胞因子的诱导下分化为成骨细胞[1-2]、脂肪细胞[3-4]、神经元样细胞[5-6]、心肌细胞[7-8]和肝实质细胞[9-12]等组织细胞. 因此, MSCs有希望成为治疗重症肝病的理想选择. 本实验研究旨在观察实验性大鼠正常组、肝纤维化模型组和自拟中药干预组MSCs体外诱导分化为类肝细胞的差异, 为MSCs治疗临床重症肝病提供参考依据.

■研发前沿
MSCs在不同理化环境和细胞因子的诱导下可以分化为多种组织细胞, 研究MSCs定向分化为类肝细胞的诱导条件及所获细胞的功能和表型是目前的一个热点问题.

1 材料和方法

1.1 *材料* 清洁级Wistar大鼠24只(来自河北医科大学动物中心, 合格证编号; DK0512051), 体质量180-200 g, 雌雄各半. 丹金舒肝胶囊由河北医科大学第一医院制剂室提供(制剂号; 冀药试制字Z05000019), 主要由丹参、当归、莪术、三棱、鳖甲粉、郁金、水红花子、土鳖虫组成. 剂型; 胶囊, 0.5 g/粒. DMEM低糖培养基购于美国HyClone; 胎牛血清购于中美合资兰州民海生物工程有限公司; 细胞因子购于美国Pepro Tech; 淋巴细胞分离液购于上海恒信化学试剂有限公司; AFP放射免疫分析药盒购于北京北方生物技术研究所; 大鼠Alb放射免疫分析药盒购于北京市福瑞生物工程公司; CK-18 mAb购于北京中杉金桥生物公司.

1.2 *方法* 取丹金舒肝胶囊制成成人每日每公斤体质量用药剂量的20倍, 浓度为0.5 g/mL药液. Wistar大鼠24只, 普通饲养观察1 wk后, 随机分为3组, 每组8只, 雌雄各半. 分别为正常对照组、肝纤维化模型组、自拟中药干预组. 肝纤维化模型组、自拟中药干预组第1天sc 400 mL/L CCl_4乳剂 4 mL/kg, 以后每4 d sc 400 mL/L CCl_4乳剂2 mL/kg, 正常对照组每次应用等量生理盐水sc. 共注射13次, 每组随机抽取1只剖杀, 确定造模成功. 自拟中药干预组开始应用丹金舒肝胶囊药液ig治疗, 6 mL/(kg·d); 肝纤维化模型组、正常对照组每天给予等量蒸馏水ig. 共治疗42 d. 末次给药后, 将各组大鼠禁食不禁水24 h. 每组随机选取6只, 雌雄各半, 100 mL/L水合氯醛3 mL/kg麻醉, 切取部分肝脏左叶约1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm, 以40 g/L中性甲醛固定常规石蜡切片, 用于HE染色. 无菌条件下取大鼠胫骨、股骨, 除去骨表面附着的组织. 用肝素(200

■相关报道
近年的研究报道表明HGF、FGF-4在MSCs诱导分化为类肝细胞中起重要作用，所获类肝细胞具备肝细胞的功能和表型.

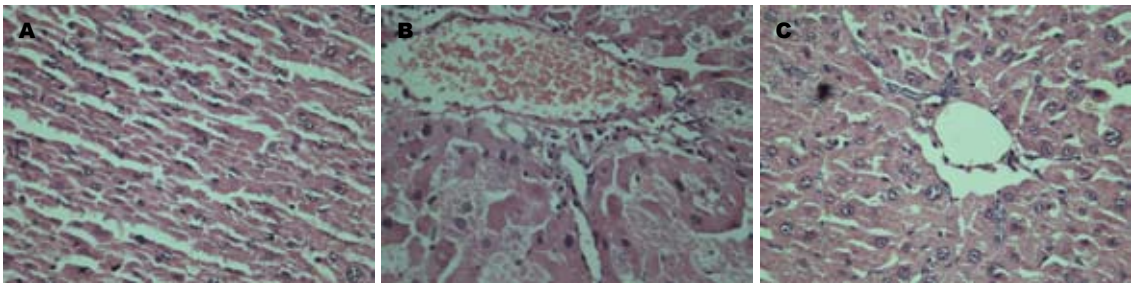


图 1 大鼠肝组织HE染色. A: 肝纤维化模型组(×100); B: 自拟中药干预组(×400); C: 正常组(×400).

U/mL)-PBS混合液冲出骨髓腔中的骨髓, 制成单细胞悬液至无菌离心管中, 将每组大鼠的细胞悬液混合; 室温1500 r/min离心10 min, 收集沉淀物用含200 mg/L胎牛血清DMEM重悬后加在等体积的淋巴细胞分离液(比重1.077 mg/L)上, 室温1500 r/min离心10 min; 取白膜层到无菌离心管中, 用含200 mg/L胎牛血清低糖DMEM重悬细胞, 1500 r/min离心10 min, 洗涤细胞1次, 最后弃上清. 取10 μL上述细胞悬液与100 μL 2%醋酸混匀, 进行细胞计数. 调整单个核细胞数为$1\times10^5/cm^2$, 接种到25 cm^2细胞培养瓶内. 加入5 mL低糖DMEM完全培养基(含200 mg/L胎牛血清、青霉素100 mg/L、链霉素100 mg/L), 置37℃、50 mL/L CO_2、饱和湿度的CO_2细胞培养箱中培养. 原代骨髓细胞培养48 h后进行首次换液弃掉悬浮细胞, 以后每3 d更换新鲜的低糖DMEM完全培养基. 在细胞接近90%汇合时, 进行消化传代, 在传至第3代时, 已完全去除非贴壁的球形骨髓造血细胞, 得到纯化的MSCs. 将每组纯化的MSCs按10^4/孔接种于24孔培养板, 加用含200 mg/L FBS的低糖DMEM+20 μg/L HGF+20 μg/L FGF-4, 进行培养和诱导, 以不加用HGF、FGF-4进行诱导培养组作为对照, 每3 d换液1次. 肝组织做5 μm连续切片, 按常规程序染色, 确认造模成功. 分别于细胞诱导分化的15、21、27 d收集细胞培养液, 采用放射免疫分析法进行AFP、白蛋白检测. 以未诱导的MSCs细胞培养液为阴性对照. 于诱导27 d收集诱导细胞爬片, 采用过碘酸希夫(PAS)实验进行糖原染色, 红紫色染色的积聚物看作糖原储存; 同时进行免疫细胞化学染色检测MSCs中CK-18, 按说明操作, 胞质内呈现棕黄色颗粒为阳性染色. 均以未诱导培养27 d的MSCs作阴性对照.

统计学处理 计量资料组间比较采用t检验、方差分析; 所有统计数据均采用SPSS13.0软件处理; $P<0.05$有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠肝脏标本HE染色结果 肝纤维化模型组肝脏广泛纤维组织增生, 肝小叶失去正常结构; 自拟中药干预组肝细胞索排列规则, 无假小叶形成; 正常组肝组织表现正常, 无肝纤维化(图1).

2.2 MSCs的显微镜观察 倒置显微镜下观察新鲜分离的骨髓干细胞大小均匀, 透光度好. 接种24-48 h后, 几乎所有的细胞都沉积于瓶底, 少部分细胞贴壁, 呈圆形. 72 h后, 贴壁细胞数增加, 呈小梭形, 并开始分裂增殖. 7 d后, 贴壁分裂细胞形成不同大小、分散的细胞集落, 细胞多呈梭形(图2A-C). 14 d后, 集落中细胞数量增多, 呈放射状向周围扩张, 集落间渐汇合成单层. 21 d左右细胞达90%汇合, 可以传代. 传代后细胞3-4 h开始贴壁, 24 h内完全贴壁, 展成梭形, 开始迅速增殖, 7 d左右可达90%汇合, 可继续传代; 经细胞因子诱导处理的细胞与非诱导细胞在最初1 wk细胞形态变化不大, 随诱导时间延长, 诱导细胞自梭形逐渐变成多角形, 且细胞数量逐渐增多(图2D-F). 而非诱导细胞仍为成纤维细胞样, 细胞密度增加, 局部有重叠交错(图2G-I).

2.3 放射免疫检测结果

2.3.1 各组细胞培养上清液AFP检测结果: 各组15、21、27 d的诱导细胞的培养上清液AFP水平均高于非诱导细胞($P<0.01$), 且21 d各诱导细胞培养上清液AFP水平最高15 d中药干预组AFP水平优于模型组和正常对照组($P<0.05$), 而模型组和正常对照组之间比较无统计学意义($P>0.05$); 21 d中药干预组和模型组的AFP水平均优于正常对照组($P<0.01$), 而中药干预组和模型组之间比较无统计学意义($P>0.05$); 27 d三组AFP水平比较无统计学意义(表1, $P>0.05$).

2.3.2 各组细胞培养上清液白蛋白检测结果: 15 d各组诱导细胞与非诱导细胞培养上清液白蛋白水平比较无统计学意义($P>0.05$), 而21、27 d诱导细胞培养上清液白蛋白水平均高于非诱导

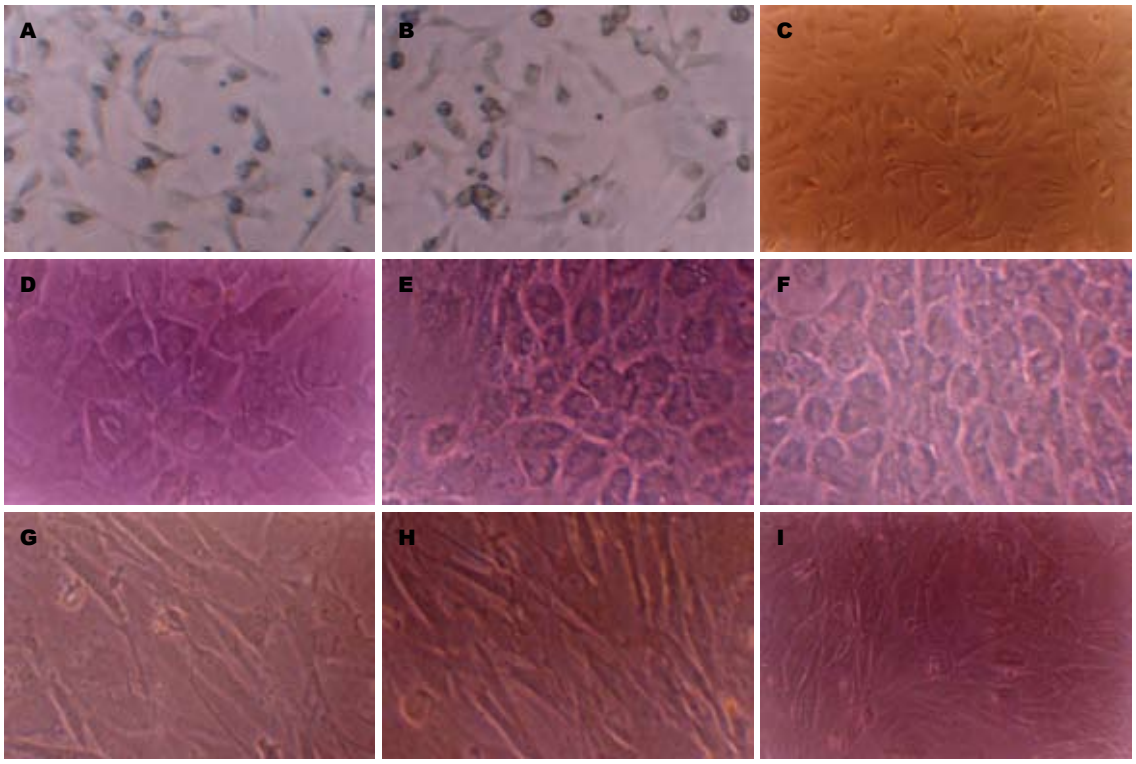


图 2 不同实验组MSCs的显微镜观察(×100). A−C: MSCs原代培养7 d; D−F: MSCs诱导培养21 d; G−I: MSCs非诱导培养21 d; A, D, G: 肝纤维化模型组; B, E, H: 中药干预组; C, F, I: 正常组.

■创新盘点
正常动物及人的MSCs在体外可诱导分化为类肝细胞, 但肝纤维化动物, 尤其是中药治疗肝纤维化动物MSCs在体外诱导分化为类肝细胞的情况报道很少.

表 1 各组细胞培养上清液AFP检测结果 (mean ± SD, μg/L)

分组	15 d		21 d		27 d	
	诱导组	非诱导组	诱导组	非诱导组	诱导组	非诱导组
肝纤维化模型组	16.79 ± 0.42	9.92 ± 0.06	48.94 ± 0.08[b]	9.90 ± 0.09	28.28 ± 0.56	9.89 ± 0.01
中药干预组	19.90 ± 0.87[a]	10.08 ± 0.06	49.86 ± 0.29[b]	8.69 ± 0.62	30.08 ± 0.22	10.42 ± 0.63
正常组	15.79 ± 0.20	9.49 ± 0.67	38.65 ± 0.33	9.04 ± 0.11	28.58 ± 0.41	9.48 ± 0.64

[a]$P<0.05$ *vs* 肝纤维化模型组、正常组; [b]$P<0.01$ *vs* 正常组.

表 2 各组细胞培养上清液白蛋白检测结果 (mean ± SD, μg/L)

分组	15 d		21 d		27 d	
	诱导组	非诱导组	诱导组	非诱导组	诱导组	非诱导组
肝纤维化模型组	0.36 ± 0.00	0.33 ± 0.01	1.11 ± 0.08	0.32 ± 0.00	1.52 ± 0.02	0.33 ± 0.00
中药干预组	0.35 ± 0.01	0.32 ± 0.00	1.25 ± 0.04	0.32 ± 0.00	1.79 ± 0.01[ab]	0.31 ± 0.03
正常组	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.01	1.06 ± 0.03	0.33 ± 0.00	1.63 ± 0.04	0.32 ± 0.01

[a]$P<0.05$ *vs* 正常组; [b]$P<0.01$ *vs* 肝纤维化模型组.

细胞, 27 d诱导细胞培养上清液白蛋白水平最高15、21 d时白蛋白水平三组间比较无统计学意义($P>0.05$); 27 d时中药干预组白蛋白水平优于模型组($P<0.01$)和正常对照组($P<0.05$), 而模型组和正常对照组之间比较无统计学意义(表2, $P>0.05$).

2.4 过碘酸希夫(PAS)实验糖原染色结果 27 d各组诱导MSCs糖原染色强阳性(图3).

2.5 免疫细胞化学染色检测CK-18的结果 27 d各组诱导MSCs CK-18均阳性. 非诱导MSCs CK-18均阴性(图4).

3 讨论

MSCs具有多向分化潜能, 是组织工程领域中重

■应用要点
HGF、FGF-4可在体外诱导肝纤维化状态、中药治疗状态下的大鼠MSCs分化为类肝细胞. 中药治疗状态下, MSCs的分化更有优势. MSCs联合中药复方治疗在临床应用更具前景.

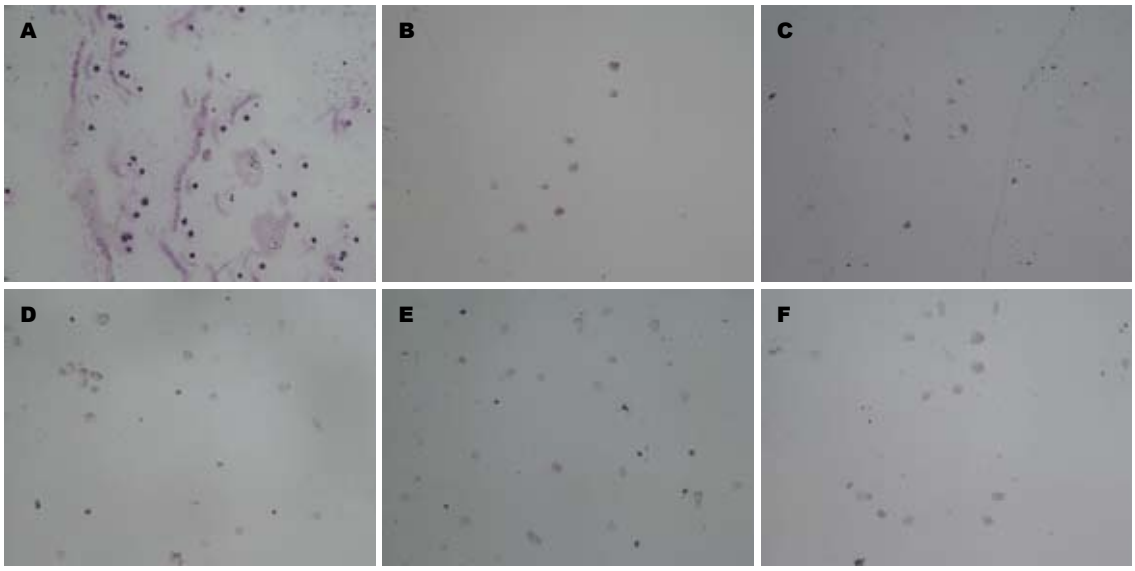


图 3 糖原染色(×100). A−C: 诱导组糖原染色阳性; D−F: 非诱导组糖原染色阴性; A, D: 肝纤维化模型组; B, E: 中药干预组; C, F: 正常组.

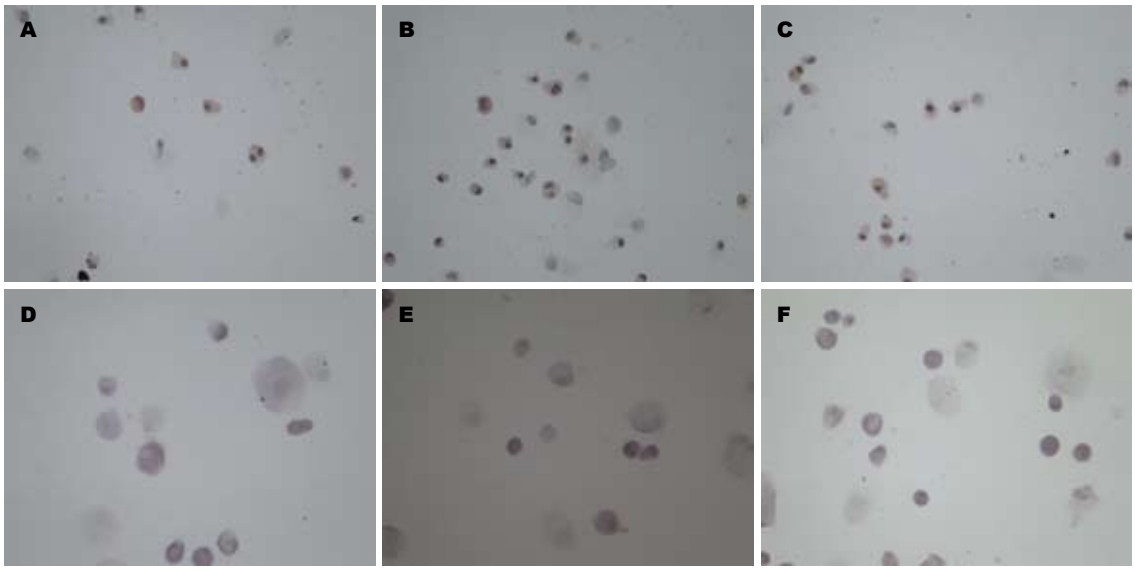


图 4 CK−18免疫细胞化学染色(×100). A−C: 诱导组CK−18阳性; D−F: 非诱导组CK−18阴性; A, D: 肝纤维化模型组; B, E: 中药干预组; C, F: 正常组.

要的种子细胞. MSCs来源充足, 可以自体取材, 植入体内无免疫排斥反应, 遗传背景稳定, 增殖能力强, 体内外均有极强分化潜能, 易于临床应用.

本研究采用梯度密度离心法, 得到含MSCs的骨髓单个核细胞, 再利用MSCs贴壁生长的特性加以纯化, 与此同时, 大量不贴壁的造血系细胞随着更换培养液得以除去. 再通过传代使其更加纯化. 此种方法操作简单, 很易得到纯化的MSCs. 这也是近年研究[13-15]多采用的MSCs分离方法.

本实验根据此前进行的诱导条件对大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导类肝细胞的研究[16], 确定采用200 mg/L胎牛血清和20 μg/L HGF、FGF-4在体外诱导MSCs的分化. HGF是肝细胞生长因子, 在肝脏的发育成熟和再生过程中发挥重要作用[17-19]. FGF-4在体内是一种重要的来源于中胚层和内胚层的信号分子, 可促进胚胎肝脏的形成和发育[20]. HGF、FGF-4在肝细胞的发育和再生中起着不可替代的作用[21]. 胎牛血清中也含有多种生长因子和促分化因子.

AFP、白蛋白、CK-18和糖原均为肝系细胞较为特异的标志. 本实验诱导分化后的3组MSCs均能够分泌AFP、白蛋白, 储存糖原, 表达CK-18肝细胞标记, 证明HGF、FGF-4成功诱导了肝纤维化模型组、自拟中药干预组和正常对照组大鼠MSCs向具有肝细胞表型和功能的类

肝细胞的分化. 说明HGF、FGF-4和胎牛血清为MSCs体外分化提供了微环境, 是MSCs分化的关键因素.

3组大鼠诱导情况的差异主要表现在不同诱导时间AFP、白蛋白水平不完全相同. AFP水平在诱导早期(15 d)即表现出中药干预组水平明显高于其他两组, 随诱导时间延长至21 d时(即AFP水平最高时), 中药组、肝纤维化模型组均优于正常对照组, 推测可能由于中药干预组和肝纤维化模型组大鼠肝脏处于病理状态, 加速激发MSCs作为肝细胞的祖细胞向肝细胞分化[22], 从而补充坏死的肝细胞; 中药干预组由于中药的复方具有多途径、多层次、多靶点的综合药理作用加速了MSCs向肝细胞的分化, 所以在诱导早期中药干预组首先在AFP水平上高于其他两组. 白蛋白水平的比较结果正好相反, 在诱导早(15 d)、中期(21 d)各组比较无统计学意义, 而在诱导末期(27 d白蛋白水平最高时)表现为中药干预组明显高于其他两组. 中药干预组由于药物的干预可能更进一步促进了MSCs向肝细胞分化、成熟. 通过上述分析, 提示了中药干预组由于药物的作用而在体外MSCs向肝细胞分化过程中占有一定优势.

总之, 肝纤维化状态、中药治疗状态及正常状态下的大鼠MSCs均可以在体外通过HGF、FGF-4诱导分化为具有肝细胞功能和表型的类肝细胞; MSCs可以作为人工肝和肝细胞移植的一种细胞来源, 为临床治疗重症肝病提供新的途径; 同时也提示了临床应用MSCs治疗重症肝病时, 联合药物治疗, 特别是中药复方治疗更应引起临床医学的重视.

4 参考文献

1 Chen TL, Shen WJ, Kraemer FB. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Biochem* 2001; 82: 187-199

2 Atmani H, Chappard D, Basle MF. Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. *J Cell Biochem* 2003; 89: 364-372

3 Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2003; 90: 13-22

4 Allan EH, Ho PW, Umezawa A, Hata J, Makishima F, Gillespie MT, Martin TJ. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem* 2003; 90: 158-169

5 Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 2005; 23: 392-402

6 Song S, Kamath S, Mosquera D, Zigova T, Sanberg P, Vesely DL, Sanchez-Ramos J. Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells. *Exp Neurol* 2004; 185: 191-197

7 Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 152-157

8 Heng BC, Haider HKh, Sim EK, Cao T, Ng SC. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 34-42

9 Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, Kahn A, Gilgenkrantz H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002; 35: 799-804

10 Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, Shao JZ, Xiang LX. Transdifferentiation of mouse BM cells into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy* 2006; 8: 381-389

11 Ong SY, Dai H, Leong KW. Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12: 3477-3485

12 Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, Luk JM. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 712-716

13 盛小刚, 冯建章, 吴书林, 靳立军, 余细勇, 张斌. 骨髓间充质干细胞的肌源性诱导分化及转染VEGF基因的表达. 第一军医大学学报 2004; 24: 290-294

14 Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3479-3484

15 王利霞, 法宪恩, 侯建峰. 人骨髓间充质干细胞体外培养特性的初步观察. 实用神经疾病杂志 2005; 8: 8-9

16 何文艳, 刘树贤, 姜慧卿. 不同诱导条件对大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导类肝细胞的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 473-478

17 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504

18 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302

19 Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 98-104

20 Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284: 1998-2003

21 Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258-264

22 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

■同行评价

本研究内容较新颖, 设计合理, 统计方法得当, 是一篇较好的文章.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2470-2475
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

胃癌及癌前病变中PTEN及微卫星不稳定的变化及二者的关系

李异玲, 田 忠, 傅宝玉

■背景资料
抑癌基因失活和微卫星不稳定(MSI)是肿瘤常见的遗传学改变之一，在肿瘤的形成中起重要作用，目前研究表明，PTEN与肿瘤的浸润转移关系密切，MSI与肿瘤的早期诊断、病理类型和预后等有关，PTEN可做为MSI作用的靶基因.

李异玲, 傅宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
田忠, 中国医科大学附属盛京医院微创外科 辽宁省沈阳市 110003
李异玲, 中国医科大学博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事胃癌相关基因学的研究.
辽宁省教育厅资助项目, No. 20061006
通讯作者: 李异玲, 110001, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科. lyl-72@163.com
电话: 024-83282199
收稿日期: 2008-04-27 修回日期: 2008-06-24
接受日期: 2008-06-30 在线出版日期: 2008-08-08

Changes of tumor suppressor gene PTEN and microsatellite instability in gastric cancer and precancerous lesion and their correlations

Yi-Ling Li, Zhong Tian, Bao-Yu Fu

Yi-Ling Li, Bao-Yu Fu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Zhong Tian, Department of Microinvasive Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China
Supported by: the Education Department Foundation of Liaoning Province, No. 20061006
Correspondence to: Dr. Yi-Ling Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lyl-72@163.com
Received: 2008-04-27 Revised: 2008-06-24
Accepted: 2008-06-30 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate the changes of tumor suppressor gene PTEN and microsatellite instability (MSI) in gastric cancer and precancerous lesion as well as the relationship between them.

METHODS: Samples of gastric cancer and precancerous lesion were collected from endoscopy center and oncology surgery department of China Medical University. There were 30 cases in each group. PCR-SSCP silver staining was used to analyze the loss of heterozygosity (LOH) in PTEN gene and MSI. PTEN mutations were detected by PCR-SSCP and sequencing, and PTEN protein expression was detected by S-P immunohistochemistry.

RESULTS: The percentages of PTEN LOH in atrophic gastritis without intestinal metaplasia, atrophic gastritis with intestinal metaplasia, atypical hyperplasia, early-stage gastric cancer, and advanced gastric cancer were 10%, 10%, 13.3%, 20%, and 30%; meanwhile, the proportions of MSI were 13.3%, 16.7%, 23.3%, 36% and 40%, separately. The protein expression of PTEN in normal gastric mucosa was 100%, in chronic superficial gastritis, and it was 96.7%, 90.0%, 76.7%, 73.3%, 63.3%, 60.0% and 43.3% in chronic superficial gastritis, chronic atrophic gastritis without intestinal metaplasia, atrophic gastritis with intestinal metaplasia, moderate atypical hyperplasia, severe atypical hyperplasia, early-stage gastric cancer, and advanced gastric cancer, separately. PTEN mutation was detected in 3 cases, all of whom were found with advanced gastric cancer and positive for MSI.

CONCLUSION: Loss and mutation of PTEN gene are closely associated with the invasion and metastasis of gastric cancer. PTEN protein expresion is down-regulated during the pathogenesis of gastric cancer, and MSI is a early molecular marker in the pathogenesis of gastric cancer. PTEN mutation is commonly occurred in MSI-positive gastric cancer.

Key Words: PTEN; Mutation; Microsatellite instability; Gastric cancer; Precancerous lesion

Li YL, Tian Z, Fu BY. Changes of tumor suppressor gene PTEN and microsatellite instability in gastric cancer and precancerous lesion and their correlations. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2470-2475

摘要

目的: 探讨胃癌及癌前病变中抑癌基因PTEN和微卫星不稳定(MSI)的变化以及二者的关系.

方法: 胃癌及癌前病变标本取自中国医科大

■同行评议者
房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科

学附属第一医院内窥镜中心和肿瘤外科手术后, 每组30例, PTEN杂合性缺失(LOH)和MSI应用PCR-SSCP银染色方法检测, PTEN 基因突变通过PCR-SSCP ABI测序方法检测, S-P免疫组化检测PTEN蛋白质表达.

结果: 在萎缩性胃炎无肠化、萎缩性胃炎伴肠化、不典型增生、早期胃癌、进展期胃癌中PTEN LOH率和MSI率分别为10%、10%、13.3%、20%、30%和13.3%、16.7%、23.3%、36%、40%. PTEN蛋白质表达在正常胃黏膜为100%, 在慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎无肠化、慢性萎缩性胃炎伴肠化、中度不典型增生、重度不典型增生、早期胃癌、进展期胃癌中PTEN蛋白质的表达分别为96.7%、90.0%、 76.7%、73.3%、63.3%、60.0%、43.3%. 所有病例共检测到3例PTEN突变, 这3例均为MSI阳性的进展期胃癌.

结论: PTEN缺失及突变与胃癌的浸润转移关系密切, 在胃癌的发病过程中, PTEN蛋白呈下调性表达, MSI是胃癌发生的早期分子标志, PTEN基因突变常发生在MSI阳性的进展期胃癌中.

关键词: 胃癌; 癌前病变; PTEN; 突变; 微卫星不稳定

李异玲, 田忠, 傅宝玉. 胃癌及癌前病变中PTEN及微卫星不稳定的变化及二者的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2470-2475

http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2470.asp

0 引言

胃癌的发生是一个多步骤、多阶段的过程, 他涉及到多种癌基因、抑癌基因、错配修复基因、端粒端粒酶、细胞黏附因子等的异常和积累. PTEN是1997年美国3个实验室先后在$10q^{23}$位点发现的一个新的肿瘤抑制基因, 他是迄今发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因. 迄今研究发现, 机体多种肿瘤中存在PTEN基因突变、缺失或甲基化等遗传学改变[1], 本研究将探讨胃癌及癌前期病变中PTEN的缺失和失活. 在肿瘤分子生物学研究上另一个受到高度重视的基因变异类型是DNA错配修复基因功能的失活, 主要表现为微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI), 胃癌是MSI发生率较高的恶性肿瘤[2], 但由于微卫星位点的选择及结果判定标准的不同, 使得MSI阳性率有很大差异, 本研究将根据国际MSI工作站的要求, 选择同样的微卫星标记点, 用同样的判定标准来探讨从癌前期病变到胃癌的发生过程中MSI的变化. 由于PTEN第7, 第8外显子的编码序列存在$(A)_6$重复单位, 他可作为MSI作用的靶位点[3], 本项研究将会探讨胃癌及癌前期病变中PTEN基因突变与MSI的关系, 从而明确PTEN可否作为MSI作用的靶基因.

■创新盘点

本文应用PCR-SSCP和免疫组化方法, 探讨胃黏膜癌变过程中PTEN LOH和蛋白表达的变化, 应用国际MSI工作站推荐的标准来判定MSI的动态变化, 结果表明PTEN缺失及突变与胃癌的浸润转移关系密切, 在胃癌的发病过程中, PTEN蛋白呈下调性表达, MSI是胃癌发生的早期分子标志, PTEN基因突变常发生在MSI阳性的进展期胃癌中.

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国医科大学附属一院2006-2007年胃镜中心活检标本及肿瘤外科术后大体标本胃癌及癌前病变和相对应的正常胃黏膜各30例, 经OCT包埋固定, 立即置于液氮罐中, -70℃冰箱中永久保存. PTEN LOH引物 D10S215, D10S541, D10S2491以及MSI微卫星标记位点BAT26, D2S123, D5S346, D17S799, D18S34引物序列均由www.gdb.org上查询获得; Exon5和Exon8引物序列由参考文献中获得, 上述引物均由北京奥科公司合成. PCR所用Taq DNA聚合酶、缓冲液、dNTP、Marker、一次性耗材等均购自大连宝生物公司. 免疫组化S-P试剂盒、鼠抗人mAb浓缩液(1∶200)购自福州迈新公司. 2400 PCR扩增仪、BIO-RAD垂直电泳槽: 美国PE公司. 琼脂糖电泳仪: 北京分析仪器厂. TG-16台式离心机: 上海分析仪器厂. 恒温水浴箱: 南京化学仪器厂.

1.2 方法

1.2.1 提取组织DNA: 采用饱和氯化钠法提取组织DNA.

1.2.2 PCR-SSCP变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测PTEN杂合性缺失: 反应体积为20 μL, 含引物0.4 μmol/L, 10×Buffer 2 μL(含Mg^{2+} 2.0 μmol/L), dNTP 200 mmol/L, Taq DNA聚合酶1单位, 基因组DNA 200 ng. 反应条件为: 95℃预变性5 min, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 60 s, 进行35个循环, 72℃延伸10 min. PCR产物按1∶5与变性缓冲液混合, 97℃变性10 min后立即置于冰水中, 160 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳4 h, (丙烯酰胺: 甲叉丙烯酰胺29∶1, 含7 mol/L尿素), 电泳后银染, 观察结果. 若肿瘤组织较正常组织相比, 条带缺失或减弱75%以上者可判定为杂合性缺失.

1.2.3 PCR银染-ABI测序系统检测PTEN基因突变: PCR反应体积为20 μL, 含引物2.5 μmol/L, 10×Buffer 2 μL(含Mg^{2+} 2.0 mmol/L), dNTP 200 mmol/L, Taq DNA聚合酶1单位, 基因组DNA 200 ng. 反应条件为: 95℃预变性5 min, 94℃ 45 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s, 进行35个循环, 72℃延伸10 min, PCR产物经120 g/L聚丙烯酰胺电泳, 银染,

■应用要点
通过检测PTEN与MSI, 可以早期诊断胃癌, 判断预后.

表 1 胃癌及癌前期病变中PTEN杂合性缺失 (%)

病变	D10S215	D10S541	D10S2491	总缺失率
萎缩性胃炎	3.3(1/30)	3.3(1/30)	6.7(2/30)	10.0
肠上皮化生	3.3(1/30)	3.3(1/30)	3.3(1/30)	10.0
不典型增生	6.7(2/30)	3.3(1/30)	6.7(2/30)	13.3
早期胃癌	6.7(2/30)	10(3/30)	6.7(2/30)	20.0
进展期胃癌	13.3(4/30)	6.7(2/30)	13.3(4/30)	30.0

表 2 PTEN在胃癌中的突变

病例	外显子	LOH	密码子	碱基改变	临床分期	病理
11	5	+	91	GAA to CAA	Ⅲ$_a$	印戒细胞癌
19	8	+	335	CGA to TGA	Ⅱ	低分化腺癌
22	8	+	329	Del 4 bp	Ⅲ$_b$	未分化癌

突变带通过ABI测序系统进行测序.

1.2.4 PCR-SSCP变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测MSI: 具体方法同2. 与正常组织相比, 胃癌及癌前期病变组织有额外的DNA等位片段或出现等位片段泳动, 即可判断为MSI. 其中1个位点发生MSI为MSI-L, 2个或2个以上位点发生MSI为MSI-H, 没有MSI发生为MSS.

1.2.5 S-P免疫组化法检测PTEN蛋白表达: 细胞质内见清晰棕褐色颗粒者为PTEN表达阳性细胞. 每例切片选5个高倍视野, 按阳性细胞数占同类计数细胞的百分比, 将免疫组化结果分为: 阴性(-), <5%; 弱阳性(+), 5%-25%; 中度阳性(++), 25%-50%; 强阳性(+++), >50%.

统计学处理 实验结果数据资料以mean±SD表示, 差异显著性采用t检验, 应用Spearman分析等级资料.

2 结果

2.1 PTEN杂合性缺失 PCR-SSCP银染法检测结果表明, 在胃癌癌前期病变萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生中, PTEN的杂合性缺失率分别为10%、10%、13.3%, 在早期胃癌中, PTEN的杂合性缺失率为20%, 进展期胃癌中PTEN的杂合性缺失率为30%, 而PTEN基因突变在癌前期病变及早期胃癌中无1例出现, 在进展期胃癌中出现比率为10%(表1).

2.2 PTEN基因突变 在所有的癌前期病变及早期癌中均未出现PTEN基因突变, 在进展期胃癌中, Exon5检测到1例突变, Exon8检测到2例突变(表2).

2.3 PTEN蛋白的表达 通过S-P免疫组化方法测定PTEN编码产物的表达, 结果表明, 在胃黏膜癌变过程中, PTEN编码产物的阳性表达率逐渐降低, 缺失率逐渐升高, 具体表达强度及表达率见表3.

表 3 PTEN蛋白在胃癌发生各阶段的表达情况 (n = 30)

病理学特征	PTEN表达				阳性率(%)
	−	+	++	+++	
正常胃黏膜	0	1	2	27	100.0
慢性浅表性胃炎	1	2	7	20	96.7
慢性萎缩性胃炎(无肠化)	3	3	3	21	90.0
慢性萎缩性胃炎(伴肠化)	7	4	3	16	76.7
中度不典型增生	8	5	6	11	73.3
重度不典型增生	11	7	2	10	63.3
早期胃癌	12	11	4	3	60.0
进展期胃癌	17	8	3	2	43.3

表 4 胃癌及癌前期病变中MSI的检出率 (n = 30)

病变	BAT26	D2S123	D5S346	D17S799	D18S34
萎缩性胃炎	1	1	0	1	2
肠上皮化生	2	0	1	1	2
不典型增生	3	2	2	2	1
早期胃癌	7	6	6	6	5
进展期胃癌	6	5	4	7	9

2.4 胃癌及癌前期病变中MSI在所选位点的检出率 由于应用PCR-SSCP技术检测MSI的方法简单, 结果可靠, MSI目前已经成为基因领域预测肿瘤发生, 早期诊断, 判定分期及预后的有效手段, 但由于不同研究选择标志物的数量及位点的不同, MSI-H, MSI-L判定标准的不同, 使得研究结果有很大的差异. 目前国际MSI工作站推荐一组检测微卫星标志物至少应为5个, 本实验根据国际MSI工作站推荐的位点进行检测, 结果见表4.

2.5 胃癌及癌前期病变中MSI阳性率 根据国际MSI工作站推荐的判定标准, 其中有≥2个标志物发生MSI时为MSI-H, 1个标志物发生MSI时为MSI-L, 没有MSI发生为MSS, 胃癌及癌前期病变中MSI的表达情况见表5.

2.6 MSI与PTEN基因突变的关系 检出的3例PTEN基因突变的胃癌病例, 均为MSI阳性病例, 1例为1个位点MSI(BAT26), 另外2例为2个位点MSI(分别为D2S123、D17S799; BAT26、D18S34).

3 讨论

PTEN作为抑癌基因的候选基因, 其蛋白产物与张力蛋白, 辅助蛋白及酪氨酸磷酸酯酶有同源性. 目前研究发现, PTEN有如下功能: (1)参与胚胎的正常发育, 因此胚系PTEN基因突变常可以引发3种罕见的常染色体显性遗传肿瘤综合征[4-5]. (2)通过G_1期阻滞或诱导细胞凋亡机制, 抑制细胞生长[6]. (3)抑制端粒酶活性[7]. (4)抑制细胞迁移、铺展和局部黏附[8]. PTEN在机体多种肿瘤中存在缺失或失活, 其基因失活表现为突变或(和)缺失, PTEN mRNA或蛋白表达降低, 甚至不表达. 目前的研究发现PTEN基因突变可见于脑胶质瘤, 子宫内膜癌, 乳腺癌以及恶性黑色素瘤等, 最早发现PTEN基因存在的是恶性胶质瘤, 其$10q^{23}$ LOH率为70%-80%, PTEN基因突变率为27%-39%[9]; 在前列腺癌中, PTEN LOH率为32%-63%, PTEN基因突变率为12%-25%[10]; 在子宫内膜癌中, PTEN LOH率为28%-43%, PTEN基因突变率为21%-27%, 而在子宫内膜增生中, PTEN基因突变率为19%[11]; 对卵巢癌的研究发现, PTEN LOH率为27.3%-42.1% PTEN基因突变率为8.3%-21%, 在卵巢良性病变卵巢囊肿中, PTEN LOH率为56.3%, PTEN基因突变率为20.6%[12]; 另据报道, PTEN LOH率在肺癌为27%-50%, 乳腺癌48%, 黑色素瘤48%, 头颈癌40%, 胰腺癌为37%, 甲状腺癌35%. 关于PTEN与消化道肿瘤的关系, 目前认为在具有遗传倾向的结直肠肿瘤如青少年多发性息肉病中发病率较高, 而在散发性结直肠癌中发病率较低[13]. 关于PTEN与胃癌发生的关系, 本研究结果表明, 在胃癌癌前期病变萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生中, PTEN的杂合性缺失率分别为10%、10%、13.3%, 在早期胃癌中, PTEN的杂合性缺失率为20%, 进展期胃癌中PTEN的杂合性缺失率为30%, 而PTEN基因突变在癌前期病变及早期胃癌中无1例出现, 在进展期胃癌中出现比率为10%, 这说明PTEN基因缺失或失活与胃癌的发生有关, 尤其与胃癌的浸润和转移关系更密切. 其中在出现PTEN基因突变的3个病例中, 1例肿瘤位于贲门处, 累及食管下段, 病理提示为印戒细胞癌; 1例肿瘤位于胃体, 未穿透浆膜, 伴有腹腔动脉周围淋巴结转移, 病理提示未分化癌; 1例肿瘤位于胃窦部, 侵及肌层, 肿瘤边缘5 cm以内有淋巴结转移, 病理提示低分化腺癌.

Correan *et al*认为, 肠型胃癌的发生, 存在着从慢性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型性增生-癌变的-系列变化, 本实验结果表明, PTEN蛋白在正常胃黏膜中为100%表达, 在慢性浅表性胃炎中的表达率为96.7%, 与正常胃黏膜相比, 无显著差异. 在无肠化的萎缩性胃炎中的表达率为90.0%, 而在伴有肠化的萎缩性胃炎中表达率为76.7%, 两者之间差异显著($P<0.05$), 说明抑癌基因PTEN对于增生性萎缩性胃炎向恶性转化过程中作用明显, 不典型增生组PTEN缺失率较萎缩性胃炎伴肠化高, 且有显著差异($P<0.05$), 但对于中度、重度不典型增生PTEN缺失频率之间无显著差异, 但Spearman分析结果显示表达强度有差异, 说明随着增生程度的增加, 抑癌基因的缺失也越来越明显. 在从不典型增生向癌的发生过程中, PTEN呈持续性缺失, 并且随着肿瘤恶性程度的增加, PTEN的缺失率增高. 综合以上研究结果, 我们认为抑癌基因PTEN蛋白在胃癌的发生过程中进行性下调, 其缺失在癌前期病变萎缩性胃炎阶段就开始出现, 一直持续到进展期胃癌, 并且随着恶性程度的增加, PTEN蛋白缺失率增高, 其机制可能与抑制细胞生长、迁移、铺展和局部黏附, 促进血管形成等有关, 结合基因学检测结果, PTEN蛋白表达的缺失一方面由于基因突变所致, 另一方面也可以发生在mRNA和蛋白质水平.

MSI是肿瘤常见的遗传改变之一, 在肿瘤的形成中起重要作用, 是肿瘤形成的一个机制. 从基因水平看, MS做为基因变异和重排的来源, 可能在肿瘤-基因调控中起重要作用[14-16]. 目前研究结果表明, MSI与肿瘤的早期诊断、浸润、分期、转移、病理类型、预后等有关, MSI阳性表达见于肺癌, 乳腺癌, 胃癌, 结肠癌, 泌尿系统肿瘤, 白血病, 子宫内膜癌, 胶质瘤等多种肿瘤中[17-20]. 目前国际MSI工作站推荐一组检测微卫星标志物至少应为5个, 其中有≥2个标志物发生MSI时为MSI-H, 1个标志物发生MSI时为MSI-L, 没有

表 5 胃癌及癌前期病变中MSI的表达情况

病例	MSS	MSI-L(%)	MSI-H(%)	总MSI率(%)
萎缩性胃炎(30)	26	10(3/30)	3.3(1/30)	13.3
肠上皮化生(30)	25	13.3(4/30)	3.3(1/30)	16.7
不典型增生(30)	23	13.3(4/30)	10.0(3/30)	23.3
早期胃癌(30)	19	10.0(3/30)	26.0(8/30)	36.0
进展期胃癌(30)	18	10.0(3/30)	30.0(9/30)	40.0
高中分化腺癌(32)	15	15.6(5/32)	37.5(12/32)	53.1
低分化腺癌(12)	8	16.6(2/12)	16.6(2/12)	33.3

■同行评价

本研究分析了胃癌及癌前病变中抑癌基因PTEN及微卫星不稳定(MSI)的变化以及二者的关系, 有一定的理论意义, 选用方法恰当, 结果可信, 具有较好的学术价值.

MSI发生为MSS[21]. 随着标志物的选择和判定标准的统一, MSI与肿瘤发生的关系也将进一步明确. 目前研究表明, MSI阳性与MSI阴性的肿瘤可能存在不同的机制, 其中胃癌发生MSI变异频率是最高的, 高于其他任何一种散发性癌, 具体原因不清[22]. 关于MSI与胃癌的关系国内外研究的较多, 结果也很不一致, Vauhkonen *et al*[23]研究认为MSI阳性的胃癌具有低浸润、预后好的特点, 并且在肠型胃癌的阳性率高于弥漫型胃癌. Hasuo *et al*[24]研究发现早期胃癌行内镜下切除术后, MSI的检测可作为评判肿瘤复发的标志. 关于MSI 与癌前病变的关系, 国内外相关研究较少, Roa *et al*[25]研究表明在慢性胃炎无癌变的肠化组织中MSI的表达率为59%, 本研究根据国际MSI工作站的推荐选择5个MSI标志物, 根据上述的标准进行判定, 其结果表明, 萎缩性胃炎MSI总的阳性率为13.3%, 其中10%为MSI-L; 肠上皮化生中MSI阳性率为16.7%, 13.3%为MSI-L; 不典型增生组MSI总的检出率为23.3%, 其中13.3%为MSI-L; 在胃癌患者中, MSI总的阳性率为40%, 10%为MSI-L, 30%为MSI-H; 上述研究结果表明MSI在萎缩性胃炎及肠上皮化生等癌前期病变阶段就开始出现, 说明MSI是胃癌发生的早期事件之一. 关于MSI与胃癌分化的关系, 文献报道不尽一致, Tajima *et al*[26]研究发现MSI的表达与HGM, MUC6相一致, 在高分化腺癌中的阳性率显著高于低分化腺癌. Mizoshita *et al*[27]发现低分化腺癌MSI发生率高于高分化腺癌, MSI与胃癌的浸润转移关系密切. 本研究结果表明, 高分化腺癌中MSI的阳性率明显高于低分化腺癌($P<0.05$), 提示MSI阳性胃癌恶性程度可能相对较低.

以MSI为特征的错配修复系统异常, 通过增加癌相关基因的突变率而在肿瘤的发生中占有重要地位, 但哪个基因是MSI作用的靶基因尚未明确, 目前研究认为TGFβⅡR, IGF-ⅡR可作为MSI作用的靶基因,由于PTEN第7, 第8外显子的编码序列存在$(A)_6$重复单位, 而单核苷酸的重复序列常常是伴有MSI肿瘤发生基因突变的靶位点, 因此目前认为PTEN也可以作为MSI的靶基因[28-29], Konopka *et al*[30]通过对56例子宫内膜癌患者PTEN及MSI关系的研究, 其结果提示PTEN在MSI阳性的病例中突变率为77.8%, 在MSI阴性的病例中突变率为39.5%, 二者之间有显著差异,而且MSI及PTEN均阳性的子宫内膜癌具有低分化、预后差的特点. 本研究结果表明, 在胃癌的发生中, PTEN的突变率为10%, 而发生PTEN突变的病例均为MSI阳性的病例, 由此提示PTEN突变与MSI阳性的胃癌关系更密切, 上述结果有待于选择更多的病例, 更深入的研究来进一步证实.

4 参考文献

1 Maehama T. PTEN: its deregulation and tumorigenesis. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 1624-1627

2 Bacani J, Zwingerman R, Di Nicola N, Spencer S, Wegrynowski T, Mitchell K, Hay K, Redston M, Holowaty E, Huntsman D, Pollett A, Riddell R, Gallinger S. Tumor microsatellite instability in early onset gastric cancer. *J Mol Diagn* 2005; 7: 465-477

3 Söreide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 395-406

4 Devi M, Leonard N, Silverman S, Al-Qahtani M, Girgis R. Testicular mixed germ cell tumor in an adolescent with cowden disease. *Oncology* 2007; 72: 194-196

5 Teresi RE, Zbuk KM, Pezzolesi MG, Waite KA, Eng C. Cowden syndrome-affected patients with PTEN promoter mutations demonstrate abnormal protein translation. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 756-767

6 Martelli AM, Cocco L, Capitani S, Miscia S, Papa S, Manzoli FA. Nuclear phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and PTen: emerging key regulators of anti-apoptotic signaling and carcinogenesis. *Eur J Histochem* 2007; 51 Suppl 1: 125-131

7 Bae JJ, Rho JW, Lee TJ, Yun SS, Kim HJ, Choi JH, Jeong D, Jang BC, Lee TY. Loss of heterozygosity on chromosome 10q23 and mutation of the phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 tumor suppressor gene in Korean hepatocellular carcinoma patients. *Oncol Rep* 2007; 18: 1007-1013

8 Leslie NR, Yang X, Downes CP, Weijer CJ. The regulation of cell migration by PTEN. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 1507-1508

9 Yang Y, Shao N, Luo G, Li L, Nilsson-Ehle P, Xu N. Relationship between PTEN gene expression and differentiation of human glioma. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66: 469-475

10 Pourmand G, Ziaee AA, Abedi AR, Mehrsai A, Alavi HA, Ahmadi A, Saadati HR. Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urol J* 2007; 4: 95-100

11 Sobczuk A, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Pertyński T. MMAC/PTEN gene expression in endometrial cancer: RT-PCR studies. *Pol J Pathol* 2006; 57: 137-140

12 Cirpan T, Aygul S, Terek MC, Kazandi M, Dikmen Y, Zekioglu O, Sagol S. MMAC tumor supressor gene expression in ovarian endometriosis and ovarian adenocarcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2007; 28: 278-281

13 Kim DK, Myung SJ, Yang SK, Hong SS, Kim KJ, Byeon JS, Lee GH, Kim JH, Min YI, Lee SM, Jeong JY, Song K, Jung SA. Analysis of PTEN gene mutations in Korean patients with Cowden syndrome and polyposis syndrome. *Dis Colon*

Rectum 2005; 48: 1714-1722
14 Shao J, Washington MK, Saxena R, Sheng H. Heterozygous disruption of the PTEN promotes intestinal neoplasia in APCmin/+ mouse: roles of osteopontin. *Carcinogenesis* 2007; 28: 2476-2483
15 Woerner SM, Kloor M, von Knebel Doeberitz M, Gebert JF. Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient tumors. *Cancer Biomark* 2006; 2: 69-86
16 Cervantes A, Rodríguez Braun E, Pérez Fidalgo A, Chirivella González I. Molecular biology of gastric cancer. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 208-215
17 Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, French AJ, Laurie JA, Goldberg RM, Thibodeau SN, Witzig TE. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* 2006; 131: 729-737
18 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
19 Rosen DG, Cai KQ, Luthra R, Liu J. Immunohistochemical staining of hMLH1 and hMSH2 reflects microsatellite instability status in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 1414-1420
20 Sawhney MS, Farrar WD, Gudiseva S, Nelson DB, Lederle FA, Rector TS, Bond JH. Microsatellite instability in interval colon cancers. *Gastroenterology* 2006; 131: 1700-1705
21 Pizzi C, Di Maio M, Daniele S, Mastranzo P, Spagnoletti I, Limite G, Pettinato G, Monticelli A, Cocozza S, Contegiacomo A. Triplet repeat instability correlates with dinucleotide instability in primary breast cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 193-199
22 Ashktorab H, Smoot DT, Farzanmehr H, Fidelia-Lambert M, Momen B, Hylind L, Iacosozio-Dononue C, Carethers JM, Goel A, Boland CR, Giardiello FM. Clinicopathological features and microsatellite instability (MSI) in colorectal cancers from African Americans. *Int J Cancer* 2005; 116: 914-919
23 Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 651-674
24 Hasuo T, Semba S, Li D, Omori Y, Shirasaka D, Aoyama N, Yokozaki H. Assessment of microsatellite instability status for the prediction of metachronous recurrence after initial endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 89-94
25 Roa JC, Villaseca MA, Roa I, Araya JC. [Genetic changes in chronic gastritis: study of microsatellite instability and loss of heterozygosity] *Rev Med Chil* 2003; 131: 1365-1374
26 Tajima Y, Yamazaki K, Makino R, Nishino N, Aoki S, Kato M, Morohara K, Kaetsu T, Kusano M. Gastric and intestinal phenotypic marker expression in early differentiated-type tumors of the stomach: clinicopathologic significance and genetic background. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6469-6479
27 Mizoshita T, Tsukamoto T, Cao X, Otsuka T, Ito S, Takahashi E, Nakamura S, Nakamura T, Yamamura Y, Tatematsu M. Microsatellite instability is linked to loss of hMLH1 expression in advanced gastric cancers: lack of a relationship with the histological type and phenotype. *Gastric Cancer* 2005; 8: 164-172
28 Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784: 150-158
29 Fan W, Yanase T, Morinaga H, Okabe T, Nomura M, Daitoku H, Fukamizu A, Kato S, Takayanagi R, Nawata H. Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor. *J Biol Chem* 2007; 282: 7329-7338
30 Konopka B, Janiec-Jankowska A, Czapczak D, Paszko Z, Bidziński M, Olszewski W, Goluda C. Molecular genetic defects in endometrial carcinomas: microsatellite instability, PTEN and beta-catenin (CTNNB1) genes mutations. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 361-371

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. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2476-2481
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

丙氨酸氨基转移酶低于2倍正常值的慢性乙肝患者肝组织学的改变

陈恩强, 何伶俐, 王丽春, 雷秉钧, 白 浪, 刘 聪, 雷学忠, 唐 红

■背景资料
乙型肝炎病毒(HBV)感染呈全球性分布, 是导致慢性肝脏疾病最常见的原因, 严重危及公众健康. 我国是HBV高感染地区, 慢性HBV感染者有1.2亿. 如果不积极进行治疗, 25%-30%的患者将发展为终末期肝病, 并死于肝衰竭和/或肝细胞癌. 目前认为, 抗病毒治疗是阻止乙肝疾病进展的关键, 而抗病毒治疗的时机需要在免疫清除期, 其指征是ALT≥2×ULN或组织学炎症≥G_2.

■同行评议者
吴君, 主任医师, 贵州省贵阳医学院附属医院感染科

陈恩强, 何伶俐, 王丽春, 雷秉钧, 白浪, 刘聪, 雷学忠, 唐红, 四川大学华西医院感染疾病中心, 生物治疗国家重点实验室(四川大学)感染性疾病研究室 四川省成都市 610041
陈恩强, 2007级四川大学华西医院感染性疾病中心硕士, 主要从事病毒性肝炎的基础与临床研究.
国家重点基础研究计划(973)资助项目, No. 2007CB512902, No. 2006CB504302
作者贡献分布: 本文撰写由陈恩强完成; 文章思路由唐红提出并提供基金支持; 唐红, 雷秉钧及王丽春对文章进行审阅并提出修改意见; 白浪, 刘聪及雷学忠提供病例资料; 陈恩强与何伶俐对病例资料进行整理和分析.
通讯作者: 唐红, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院感染疾病中心. htang6198@hotmail.com
电话: 028-8542264
收稿日期: 2008-05-15 修回日期: 2008-06-04
接受日期: 2008-06-12 在线出版日期: 2008-08-08

Change of liver histology in chronic hepatitis B patients with alanine aminotransferase less than two-time up limits of normal

En-Qiang Chen, Ling-Li He, Li-Chun Wang, Bing-Jun Lei, Lang Bai, Cong Liu, Xue-Zhong Lei, Hong Tang

En-Qiang Chen, Ling-Li He, Li-Chun Wang, Bing-Jun Lei, Lang Bai, Cong Liu, Xue-Zhong Lei, Hong Tang, Center of Infectious Diseases, West China Hospital, Sichuan University; Molecular Biology Division of Infectious Diseases, State Key Laboratory of Biotherapy (Sichuan University), Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by: the National Basic Research Program (973 Program) of China, No. 2007CB512902, No. 2006CB 504302
Correspondence to: Hong Tang, Center of Infectious Disease, West china Hospital Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. htang6198@hotmail.com
Received: 2008-05-15 Revised: 2008-06-04
Accepted: 2008-06-12 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To analyze the change of hepatic histology in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection whose alanine aminotransferase (ALT) level is lower than two-time up limit of normal (ULN) and discuss the factors affecting the change of liver histology.

METHODS: According to ALT ≤ 0.5 × ULN, 0.5 × ULN < ALT ≤ 1 × ULN and 1 × ULN < ALT < 2 × ULN, 170 patients were divided into group Ⅰ (n = 39), group Ⅱ (n = 87) and group Ⅲ (n = 44). We retrospectively analyzed whether the change of liver histology was related to ALT level, HbeAg status, HBV DNA duplication and the age of patients.

RESULTS: The rates of grade 2 or 2+ inflammation in group Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ were 43.6%, 56.4% and 65.9%, respectively, and the rates of stage 2 or 2+ fibrosis were 38.4%, 48.3% and 61.3%, respectively. There were 5.1%, 8.1% and 18.2% patients with liver cirrhosis (stage 4) in the three groups. The activity of liver inflammation and degree of fibrosis were related to ALT level (F = 4.162, 3.992; both P < 0.05) and the age of patients (F = 32.831, 20.084; both P < 0.05), while the degree of liver fibrosis was related with HbeAg positive rate (χ^2 = 7.839, P < 0.05).

CONCLUSION: Of the patients with chronic HBV infection, 55.9% have grade 2 or 2+ inflammation even if ALT level is less than 2 × ULN. Thus for the patient with a long medical history, especially those over 40 years old, conventional liver biopsy should be performed, which may help us decide whether to start antiviral therapy.

Key Words: Chronic hepatitis B; Alanine aminotransferase; Histology; Liver biopsy

Chen EQ, He LL, Wang LC, Lei BJ, Bai L, Liu C, Lei XZ, Tang H. Change of liver histology in chronic hepatitis B patients with alanine aminotransferase less than two-time up limits of normal. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2476-2481

摘要

目的: 分析丙氨酸氨基转移酶低于2倍正常值上限(upper limits of normal, ULN)的慢性乙肝患者肝组织学改变情况, 并探讨影响肝脏组织学改变的因素.

方法: 根据ALT≤0.5×ULN、0.5×

ULN<ALT≤1×ULN和1×ULN<ALT<2×ULN将170患者分成Ⅰ(n = 39)、Ⅱ(n = 87)、Ⅲ组(n = 44), 对肝组织学改变是否同ALT水平、HBeAg状态、HBV DNA复制水平及年龄存在相关性进行回顾性分析.

结果: 共纳入170例患者, Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组炎症活动度为G_2及G_2以上者分别为43.6%、56.4%和65.9%; 纤维化分期为S_2及S_2以上者分别为38.4%、48.3%和61.3%, 三组中分别有5.1%、8.1%和18.2%的患者组织学表现为肝硬化(S_4). 炎症活动度及纤维化程度与ALT均有关(F = 4.162, 3.992, 均P<0.05), 炎症活动度及纤维化程度与年龄有关(F = 32.831, 20.084, 均P<0.05), 纤维化程度与HBeAg阳性率有关(χ^2 = 7.839, P<0.05).

结论: 慢性HBV感染者即使ALT<2×ULN, 也有55.9%的患者肝组织炎症活动度在G_2或G_2以上, 因此对于病史较长, 特别是年龄在40岁以上的患者建议常规进行肝组织活检, 根据肝组织活检病理结果决定是否对其进行抗病毒治疗.

关键词: 慢性乙型肝炎; 丙氨酸氨基转移酶; 组织学; 肝活检

陈恩强, 何伶俐, 王丽春, 雷秉钧, 白浪, 刘聪, 雷学忠, 唐红. 丙氨酸氨基转移酶低于2倍正常值的慢性乙肝患者肝组织学的改变. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2476-2481
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2476.asp

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈全球性分布, 是导致慢性肝脏疾病最常见的原因, 严重危及公众健康. 我国是HBV高感染地区, 慢性HBV感染者有1.2亿. 如果不积极进行治疗, 25%-30%的患者将发展为终末期肝病, 包括肝硬化, 失代偿性肝硬化, 肝细胞癌, 并死于肝衰竭和/或肝细胞癌[1]. 目前认为, 抗病毒治疗是阻止乙肝疾病进展的关键, 而抗病毒治疗的时机需要在免疫清除期, 其指征是ALT≥2×ULN或组织学炎症≥G_2[1]. 有文献报道在ALT持续正常的慢性HBV感染者中有相当一部分患者存在显著的肝脏组织学改变[2-4]. 为进一步了解与肝组织学改变相关的因素, 我们对肝活检前6 mo内血清ALT<2×ULN的170例慢性HBV感染者的ALT水平、HBeAg状态、HBV DNA复制水平及年龄等因素与肝组织学改变程度间的关系进行了分析.

1 材料和方法

1.1 材料 华西医院传染科2006-04/2008-01行肝穿刺活检的慢性HBV感染者, 诊断标准依据2005年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》[1]. 患者行肝穿刺前未曾接受过抗病毒药物[核苷(酸)类似物或干扰素]治疗, 肝穿前6 mo内血清ALT持续低于2×ULN, 影像学检查无肝硬化及肝癌, 无丙肝(hepatitis C virus, HCV)、戊肝(hepatitis E virus, HEV)及艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)合并感染, 无自身免疫性肝病, 无药物性肝炎及长期酗酒史, 患者在肝穿前具有完整的肝功能, HBV DNA及乙肝标志物定性检测结果, 共170例患者纳入分析.

1.2 方法 血清ALT采用日本Olympus AU5400型全自动生化分析仪检测, 其正常值上限(ULN)男为55 IU/L, 女为38 IU/L; 乙型肝炎标志物采用ELISA检测(试剂购自厦门英科新创科技有限公司); 血清HBV DNA采用实时荧光定量PCR检测法(ABI 7500实时PCR定量检测仪, 试剂购自中山大学达安基因股份有限公司). 超声定位引导下局部麻醉, 用16G肝穿刺针获取肝组织, 长度均在1 cm以上, 标本置40 g/L甲醛缓冲液固定, 常规石蜡包埋、切片、HE及网状纤维染色. 由本院病理科医师读片, 病理学诊断按炎症活动度分级(G_0-G_4)、纤维化分期(S_1-S_4), 具体标准参照2000年修订的《病毒性肝炎防治方案》[5]. 收集肝活检病理结果及穿刺前血清ALT、HBV DNA和乙肝标志物定性检测结果. 将纳入的患者按照ALT≤0.5×ULN、0.5×ULN<ALT≤1×ULN和1×ULN<ALT<2×ULN分成Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组, 对ALT水平、HBeAg状态、HBV DNA水平及年龄等因素同肝组织学改变的关系进行对比分析.

统计学处理 采用SPSS13.0软件对研究数据进行统计学分析. 计量资料采用mean±SD表示, 正态分布的多组均数比较采用方差分析; 计数资料用例数和百分比表示, 率和构成比的比较采用卡方检验, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 ALT水平与肝组织学改变的关系 符合本研究纳入标准的患者共170例, 其中Ⅰ组39例, Ⅱ组87例, Ⅲ组44例. Ⅰ组中, 仅2.6%(1例)的患者肝组织学无炎症改变(G_0), 53.8%(21例)的患者达G_1, G_2及G_2以上患者达43.6%(17例); Ⅱ组中, 1.1%(1例)的患者为G_0, 42.5%(37例)的患者为

■研发前沿
对于ALT低于2倍正常值的慢性HBV感染者是否需要抗病毒治疗是目前国内外学者研究的热点、难点

■相关报道
2007年美国肝病学会关于慢性乙肝的临床实践指南指出，对于ALT波动或ALT轻度升高(1-2倍正常值)的患者应考虑肝活检，尤其是年龄大于40岁者. 上海交通大学附属瑞金医院谢青教授通过对ALT持续正常的慢乙肝患者的组织学改变进行研究后发现23.7%的患者存在显著肝脏组织学改变，认为这部分患者也应该是抗病毒治疗的适应人群.

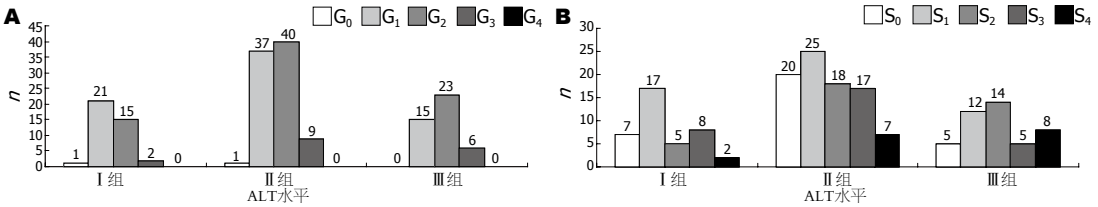


图 1 各组患者不同ALT水平肝组织炎症活动度以及纤维化程度的分布. A: 炎症活动度; B: 纤维化程度.

表 1 不同ALT水平研究人群的特征

特征	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
性别(男：女)	29：10	68：19	33：11
年龄(岁)	31.18±10.94	33.45±9.97	32.84±8.82
HBeAg阳性(*n*, %)	11(28.2)	24(27.6)	19(43.2)
HBV DNA载量 (log copies/mL)	5.18±1.85	5.37±1.90	5.23±1.63
炎症活动度(级)	1.46±0.64	1.66±0.68	1.80±0.67
纤维化程度(期)	1.51±1.17	1.61±1.26	1.98±1.27

G_1, G_2及G_2以上患者达56.4%(49例); Ⅲ组中所有患者肝组织学均有不同程度的炎症，其中G_1占34.1%(15例), G_2及G_2以上患者占65.9%(29例)(图1A).

Ⅰ组中18%(7例)的患者肝组织学无纤维化(S_0), 43.6%(17例)的患者为S_1, S_2及S_2以上患者达38.4%(15例)，其中有5.1%的患者组织学表现为肝硬化; Ⅱ组中，23%(20例)的患者肝组织学无纤维化表现，28.7%(25例)的患者表现为S_1, S_2及S_2以上患者达48.3%(42例)，其中有8.1%(7例)的患者组织学表现为肝硬化; Ⅲ组中，11.4%(5例)的患者肝组织学无纤维化表现，27.3%(12例)的患者表现为S_1, S_2及S_2以上患者达61.3%(27例)，其中有18.2%(8例)的患者组织学表现为肝硬化(图1B).

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组患者均以男性为主，三组间性别构成无明显差异(χ^2 = 0.288, P>0.05); 各组年龄分布无明显差异(F = 0.902, P>0.05); 各组间HBeAg阳性率差异无统计学意义(χ^2 = 3.575, P>0.05); 各组间HBV DNA对数值差异亦无统计学意义(F = 0.310, P>0.05). 三组患者肝组织炎症分布存在差异(F = 4.162, P<0.05)，纤维化分布亦存在差异(F = 3.992, P<0.05, 表1)，肝组织炎症和纤维化程度均随ALT水平升高而逐渐加重(图2).

2.2 HBV DNA复制水平与肝组织学改变的关系 按照HBV DNA<10^5、10^5≤HBV DNA<10^7和HBV DNA≥10^7(copies/mL)，将纳入患者分成level 1、level 2和level 3三组(表2). 其中level 1组78例，炎症活动度(G)为1.69±0.73，纤维化程度(S)为1.81±1.35; level 2组40例，炎症活动度为1.65±0.66，纤维化程度为1.70±1.26; level 3组52例，炎症活动度为1.42±0.50，纤维化程度为1.48±1.06. 三组间肝脏炎症活动度差异无统计学意义(F = 0.454, P>0.05)，三组间纤维化程度亦无差别(F = 1.078, P>0.05)，但三组患者年龄分布存在显著差异(F = 12.736, P<0.001).

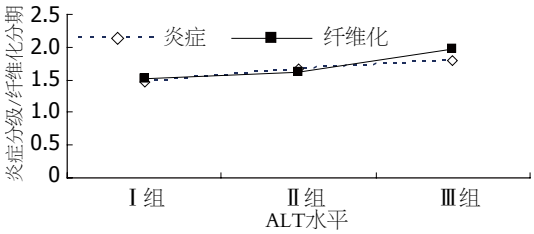


图 2 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组患者的肝组织炎症和纤维化数值大小分别为各组患者相关指标的均数，肝组织炎症和纤维化程度随ALT水平增高而呈逐渐加重的趋势.

2.3 HBeAg状态与肝组织学改变的关系 170例的患者中，仅2例患者炎症活动度表现为G_0，将G_0和G_1合并组成G_{0-1}，合并后的G_{0-1}共有75例患者，其中38.7%(29例)的患者HBeAg阳性; G_2患者78例，其中26.9%(21例)的患者HBeAg阳性; G_3患者17例，其中23.5%(4例)的患者HBeAg阳性. G_{0-1}、G_2和G_3三组HBeAg阳性率分布差异无统计学意义(χ^2 = 0.217, P>0.05, 图3A).

170例患者中S_0期32例，其中56.2%(18例)的患者HBeAg阳性; S_1期54例，37.0%(20例)的

■创新盘点
本文分析了ALT在半年内持续低于2倍正常值的患者组织学特征及与其改变相关因素.

表 2 不同HBV DNA复制水平肝组织学的分布特征 (mean ± SD)

HBV DNA	*n*	年龄	G	S
level 1	78	35.19 ± 10.44	1.69 ± 0.73	1.81 ± 1.35
level 2	40	32.83 ± 9.85	1.65 ± 0.66	1.70 ± 1.26
level 3	52	29.09 ± 7.96	1.58 ± 0.61	1.48 ± 1.06
F		12.736	0.454	1.078
P		<0.001	>0.05	>0.05

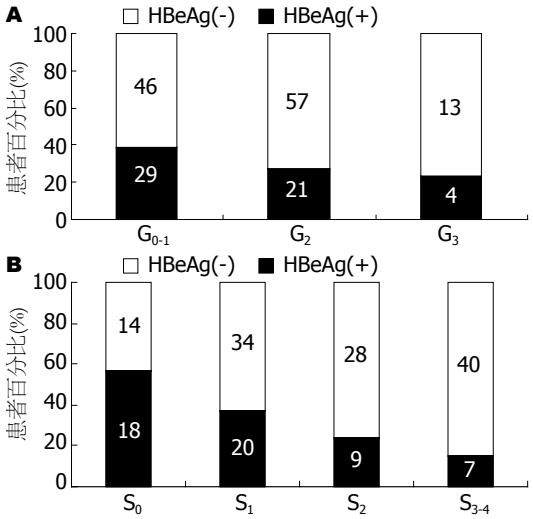


图 3 HBeAg状态在不同炎症活动以及纤维化分期中的分布. A: 炎症活动(χ^2 = 0.217, *P*>0.05); B: 纤维化分期(χ^2 = 7.839, *P*<0.05).

表 3 不同年龄段肝组织学改变的特征 (mean ± SD)

年龄(岁)	*n*	G(级)	S(期)
<30	62	1.39 ± 0.55	1.23 ± 1.07
30–39	62	1.66 ± 0.75	1.82 ± 1.32
≥40	46	1.98 ± 0.58	2.11 ± 1.18
F		32.831	20.084
P		<0.001	<0.001

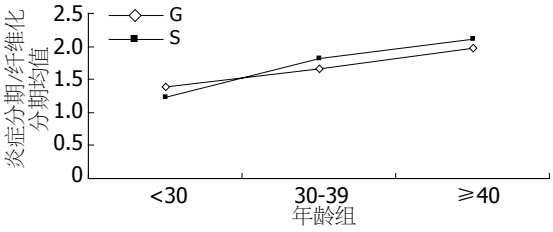


图 4 肝组织炎症和纤维化随年龄的增长呈加重的趋势.

患者HBeAg阳性; S_2期37例, 24.3%(9例)的患者HBeAg阳性; S_{3-4}期47例患者, 14.9%(7例)的患者HBeAg阳性. HBeAg阳性率有随纤维化程度增高而呈递减的趋势, 且该差异具有统计学意义(χ^2 = 7.839, *P*<0.05, 图3B).

2.4 年龄与肝组织学改变的关系 按照年龄水平将170例患者分成三组(表3). 年龄<30岁组62例, 其炎症活动度平均为1.39±0.55, 纤维化分期平均为1.23±1.07; 30-39岁组62例, 其炎症活动度平均为1.66±0.75, 纤维化分期平均为1.82±1.32; 年龄≥40岁组46例, 其炎症活动度平均为1.98±0.58, 纤维化分期平均为2.11±1.18, 肝组织炎症有随年龄增加而呈加重的趋势(图4), 且这种差异具有统计学意义(*F* = 32.831, *P*<0.001), 肝纤维化亦随年龄增加呈加重趋势(图4), 这种差异亦具有统计学意义(*F* = 20.084, *P*<0.001).

3 讨论

ALT是肝细胞膜损伤或细胞溶解坏死时释放入血的一种肝细胞胞质酶, 他的升高通常认为是肝脏炎症坏死的指示性标志物[5]. 2005年版《慢性乙型肝炎防治指南》将ALT≥2×ULN或组织学炎症≥G_2做为抗病毒治疗的重要指征. 在临床实际工作中, 相当一部分处于免疫清除期的慢乙肝患者, 他们的血清ALT水平并不高于2×ULN, 对这部分患者我们通常的处理原则是定期随访而并不考虑抗病毒治疗.

纳入的170例患者中仅2例肝组织活检完全正常(G_0S_0), 55.9%(95/170)的患者炎症分级≥G_2, 符合抗病毒治疗原则, 故对这部分患者如不进行肝穿刺活检, 可能延误治疗时机. 我国慢乙肝患者多系母婴垂直传播或儿童时期感染所致, 故我国慢乙肝患者病史绝大多数较长, 本研究纳入的170例患者平均年龄约为35岁, 而肝组织学改变是一个逐渐发展和累积的过程, 因此这可以解释为什么本研究结果中有55.9%的患者肝组织炎症活动度在G_2或G_2以上, 49.4%的患者纤维化分期在S_2或S_2以上.

有学者通过对139例ALT水平持续正常且可检测到病毒载量的患者进行了肝活检, 发现23.7%的患者存在显著的肝脏组织学改变(≥G_2

■应用要点
对ALT<2倍正常值, 特别是年龄在40岁以上的患者, 建议常规行肝组织活检, 以便及时进行合理的抗病毒治疗.

或≥S_2), 其中有13例(9.4%)患者已经发展到肝硬化阶段[2]. 有文献报道称ALT正常或轻度异常的慢性HBV感染者的肝组织检查可有显著的纤维化[4,7-8], 本研究共纳入170例患者中约有50%的患者纤维化分期≥S_2. 对于这样的患者如果能及时的行肝组织活检, 进行及时有效的抗病毒和(或)抗纤维化治疗, 可以有效控制疾病的进展[9-12].

有文献报道称ALT水平同肝组织学改变存在相关性[2,13]. 本研究发现Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ组肝组织炎症分布存在差异(P<0.05), 纤维化分布亦存在差异(P<0.05), 这与以往报道的结果基本一致, 但ALT水平受多种非肝脏独立因素影响, 比如年龄、性别、体质量、血脂血糖代谢异常等, 且在ALT不是很高的慢性HBV感染者中可存在合并丙型肝炎和非酒精性脂肪肝等肝病, 因此个体间可存在明显差异[6]. 近年有学者认为现行标准无法正确评价ALT是否正常, 建议将男性ALT正常值上限定为30 IU/L,女性为19 IU/L[6]. 本研究是一项回顾性研究, 只收集并分析了患者行肝穿刺活检前6 mo内的病史资料, 而对6 mo前的这些患者的ALT是否一直低于2×ULN, 是否有过波动(>2×ULN)及通过保肝降酶等辅助治疗使之正常的情况, 我们没有确切证据, 因此本研究不排除在病例资料的纳入上存在选择性偏倚的可能. 通过对Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ组患者肝组织炎症及纤维化改变进行两两比较后发现, Ⅰ组与Ⅲ组肝组织炎症分布存在差异(P<0.05), 纤维化改变存在差异(P<0.05), Ⅱ组与Ⅲ组纤维化改变存在差异(P<0.05), 而Ⅰ组与Ⅱ组肝组织炎症及纤维化改变均无差异(P>0.05), 因本研究纳入的研究对象仅为ALT<2×ULN的患者, ALT水平差异并不大, 故ALT<2×ULN的患者ALT水平与肝组织学改变的相关性有待进一步研究证实.

本研究结果提示HBV DNA复制水平与肝组织炎症及纤维化无关, 与文献报道一致[2,14-16]. 血清HBV DNA水平可反映HBV的复制情况, 并在一定程度上间接反映机体的免疫状态, 但不能反映肝组织炎性损伤程度和纤维化程度, 不能仅凭HBV DNA水平判断肝炎是否活动及其程度. HBV主要是通过引起宿主自身的免疫反应造成肝细胞的损伤, 宿主的免疫功能特别是细胞的免疫功能对HBV感染后的临床转归有重要作用[15-16]. 从本研究显示的数据, HBV DNA复制水平虽与肝组织炎症及纤维化无关, 但存在负相关的趋势, 通过对不同DNA复制水平患者的年龄进行分析后发现, 三组患者年龄分布存在差别(P<0.05), HBV DNA复制水平高者, 年龄偏小. 这种现象可能与免疫耐受有关, 符合病毒高复制期及轻度炎症活动的内涵, 亦可能与病程有关, 因为随着时间的推移, 病毒复制能力逐步减弱[17].

以往多篇文献报道肝组织学炎症分级和纤维化分期均与HBeAg状态无明显相关性[3,14], 然亦有研究表明肝纤维化程度高者以HBeAg阴性者居多[16-18]. 本研究发现HBeAg阳性率与肝纤维化程度有关(P<0.05), 随着纤维化程度的增加, 血清HBeAg阳性率有逐渐减少的趋势, 这种现象可能与患者体内HBV DNA preC/C区变异及病程长等有关[19-21]. 故HBeAg状态是否与肝纤维化分期之间存在关系, 尚需进一步研究证实. 对于长期HBeAg阴性的慢性HBV感染者, 要定期随访, 必要时行肝活检, 以便及时治疗[22-23].

有文献报道年龄>40岁的持续ALT正常或轻微异常患者发生肝脏显著组织学改变者的比例明显增高, 本研究亦显示40岁以上人群肝组织学显著改变者较其他年龄段明显增多[2,24,28]. 这可能与这部分患者不太可能还处于免疫耐受期有关[28]. 当然这种现象亦可能与患者病程较长及既往有过隐匿性炎症反应有关. 有研究提示随着病程延长, 肝脏炎症及纤维化程度加重, 以10年病程为主, 年龄是纤维化进展的独立预测因素[15-16]. 2007年AASLD指南推荐对于年龄在40岁以上, ALT正常或轻微异常的患者建议常规行肝穿刺活检[22], 此举可为是否进行抗病毒治疗提供可靠证据, 进而控制病情的发展[25-26].

通过本次研究, 我们认为对于可检测到HBV DNA的, ALT<2×ULN, 特别是年龄在40岁左右的患者, 应考虑肝穿刺活检活检, 从而决定是否对其进行抗病毒治疗.

4 参考文献

1 中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华传染病杂志 2005; 23: 421-431

2 桂红莲, 俞红, 谢青, 王晖, 蔡伟, 林之莓, 姜山, 许蓓, 周霞秋, 郭清. 丙氨酸氨基转移酶持续正常的慢性乙型肝炎病毒感染者的肝脏组织学改变. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 881-885

3 魏倪, 杨栋, 杨方, 王颖, 赵兵, 吕大刚. 慢性乙型肝炎病毒携带者肝组织学特点与临床特征的关系. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 330-333

4 Kumar M, Sarin SK, Hissar S, Pande C, Sakhuja P, Sharma BC, Chauhan R, Bose S. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus-infected asymptomatic patients with persistently

normal ALT. *Gastroenterology* 2008; 134: 1376-1384
5 Kew MC. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet* 2000; 355: 591-592
6 Kim HC, Nam CM, Jee SH, Han KH, Oh DK, Suh I. Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases: prospective cohort study. *BMJ* 2004; 328: 983
7 Bataller Sifré R, Gómez García MA, Bataller Alberola RB, Bataller Alberola R, Alberola García MD. [Viral replication, histologic damage and enzymatic activity in chronic hepatopathies caused by B virus] *Rev Esp Enferm Apar Dig* 1989; 75: 620-624
8 Wang CC, Lim LY, Deubner H, Tapia K, Lau AW, Manansala J, Krows M, Shuhart MC, Kowdley KV. Factors Predictive of Significant Hepatic Fibrosis in Adults With Chronic Hepatitis B and Normal Serum ALT. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 820-826
9 Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, Wright TL. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: an update. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 936-962
10 Andriulli A, Festa V, Leandro G, Rizzetto M. Usefulness of a liver biopsy in the evaluation of patients with elevated ALT values and serological markers of hepatitis viral infection: an AIGO study. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1409-1415
11 Guido M, Rugge M. Liver biopsy sampling in chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 89-97
12 Saleh HA, Abu-Rashed AH. Liver biopsy remains the gold standard for evaluation of chronic hepatitis and fibrosis. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007; 16: 425-426
13 王莹, 甄真, 高峰, 刘俊茹, 王冬. 166例慢性乙型肝炎病毒感染者丙氨酸转氨酶水平与肝组织病理的关系. 临床荟萃 2007; 16: 1189-1190
14 柳龙根, 方国平, 马春明, 翟德芳, 钱梅云. 乙肝患者HBeAg含量与其临床、病理及HBV DNA的关系. 苏州大学学报(医学版) 2004; 24: 775-776
15 吴赤红, 斯崇文, 田庚善, 于岩岩, 徐小元, 王泰龄. 慢性乙型肝炎病毒携带者的病理与临床及预后分析. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 577-581
16 张春兰, 杨湛, 范慧敏, 李文, 张健珍, 易俊卿. 62例慢性HBV携带者肝脏组织学改变与临床的关系. 热带医学杂志 2005; 5: 148-150
17 Shao J, Wei L, Wang H, Sun Y, Zhang LF, Li J, Dong JQ. Relationship between hepatitis B virus DNA levels and liver histology in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2104-2107
18 姜湘宁, 王功遂, 尹建军. 慢性乙型肝炎患者血清HBeAg和HBV DNA水平与肝组织病理关系的探讨. 实用肝脏病杂志 2004; 7: 86-88
19 Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Hui CK, Wong DK, Doutreloigne J, Wong BC, Chan AO, Lai CL. Relationship between the development of precore and core promoter mutations and hepatitis B e antigen seroconversion in patients with chronic hepatitis B virus. *J Infect Dis* 2002; 186: 1335-1338
20 Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, Wong WM, Chan AO, Wong BC, Lai KC, Lai CL. Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1610-1614
21 Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2000; 7: 258-267
22 Aguilar Reina J. [Chronic hepatitis B: treatment candidates. Need for liver biopsy.] *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29 Suppl 2: 20-22
23 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539
24 Lai M, Hyatt BJ, Nasser I, Curry M, Afdhal NH. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2007; 47: 760-767
25 Lefkowitch JH. Liver biopsy assessment in chronic hepatitis. *Arch Med Res* 2007; 38: 634-643
26 Theise ND. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. *Mod Pathol* 2007; 20 Suppl 1: S3-S14
27 Tsang PS, Trinh H, Garcia RT, Phan JT, Ha NB, Nguyen H, Nguyen K, Keeffe EB, Nguyen MH. Significant prevalence of histologic disease in patients with chronic hepatitis B and mildly elevated serum alanine aminotransferase levels. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 569-574
28 Andreani T, Serfaty L, Mohand D, Dernaika S, Wendum D, Chazouillères O, Poupon R. Chronic hepatitis B virus carriers in the immunotolerant phase of infection: histologic findings and outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 636-641

■同行评价

本研究选题新颖, 实验方法合理, 结果客观, 书写层次较分明, 文献引用尚恰当, 对临床有指导应用价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2482-2486
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

肝脏祖细胞的表型特征及生物学功能

陈珺明, 季 光

■背景资料
对于终末期慢性肝病的积极治疗方法是肝移植, 但由于肝脏供源短缺等问题, 使人们不得不寻求可替代的疗法. 目前肝脏祖细胞相关治疗很有希望成为替代疗法.

陈珺明, 季光, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科; 上海中医药大学脾胃病研究所; 上海高校中医内科E研究院 上海市 200032
教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目, No. NCET07-0563
上海市教委重点学科资助项目, No. J50305
作者贡献分布: 本文由陈珺明负责撰写, 季光指导.
通讯作者: 季光, 200032, 上海市, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科; 上海中医药大学脾胃病研究所; 上海高校中医内科E研究院. jiliver@vip.sina.com
电话: 021-51322045 传真: 021-51322045
收稿日期: 2008-05-24 修回日期: 2008-06-26
接受日期: 2008-06-30 在线出版日期: 2008-08-08

Hepatic progenitor cell surface markers and biological function

Jun-Ming Chen, Guang Ji

Jun-Ming Chen, Guang Ji, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Spleen-Stomach Institute, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; E-institute of Traditional Chinese Medicine Internal Medicine, Shanghai Universities, Shanghai 200032, China
Supported by: the Program for New Century Excellent Talents in University, No. NCET07-0563, and the Leading Academic Discipline Project of Shanghai Municipal Education Commission, No. J50305
Correspondence to: Guang Ji, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Spleen-Stomach Institute, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; E-institute of Traditional Chinese Medicine Internal Medicine, Shanghai Universities, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com
Received: 2008-05-24 Revised: 2008-06-26
Accepted: 2008-06-30 Pubilshed online: 2008-08-08

Abstract
Hepatic progenitor cells have the bipotential capable of differentiation into mature hepatocytes and biliary epithelial cells when hepatocyte proliferation is inhibited and liver regeneration compromised. This review focuses on the surface markers and biological function of hepatic progenitor cells and the existed questions in this field are also discussed.

Key Words: Hepatic progenitor cell; Phenotype; Biological function

Chen JM, Ji G. Hepatic progenitor cell surface markers and biological function. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2482-2486

摘要
肝脏祖细胞有双向分化潜能, 在肝细胞严重受损和分裂增生受抑制时可向肝细胞和胆管上皮细胞分化. 本文介绍了近年来肝脏祖细胞的表型特征和生物学功能研究进展, 并对存在的问题进行讨论.

关键词: 肝脏祖细胞; 表型特征; 生物学功能

陈珺明, 季光. 肝脏祖细胞的表型特征及生物学功能. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2482-2486
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2482.asp

0 引言
肝脏是一个结构与功能相对复杂、再生能力极强的器官, 即使切除2/3的肝组织, 数周之内肝脏可再生并恢复到正常水平[1-2]. 肝脏的大小和体积也受到严格控制并与个体的大小相适应, 若将体积较小者的肝脏移植到体积较大者体内后, 其大小可长到与受者相适应的体积[3-4]. 估计正常肝脏可耐受80%-90%肝组织切除, 一个正常肝脏的细胞至少具有再生50个相同大小的肝脏的能力[5]. 但是, 在临床上常见的肝损伤并不是创伤或肝组织切除, 而是病毒、乙醇、毒性物质、代谢异常和其他未知因素, 导致的大量肝细胞变性、坏死, 随后发展为慢性肝纤维化、肝硬化等, 最终导致肝细胞的再生能力丧失, 病程难以逆转, 对于这类终末期慢性肝病, 药物治疗难以恢复肝脏的结构与功能, 唯一可能的治疗方法是肝移植. 由于器官供源短缺、免疫排斥、伦理、治疗费用昂贵等问题, 只有极少数患者接受肝移植[6]. 这种现状需要可以替代的治疗策略. 细胞治疗可能会在将来成为一种可替代肝移植的疗法. 由于祖细胞既可分化为肝细胞,又可分化为胆管细胞, 具有双向分化的潜能[7], 其一般处于静息状态, 不易分化, 分裂缓慢, 只有在环境刺激性因素作用下, 才能快速启

■同行评议者
朱传武, 副主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科

动, 这些特点使其相对易于调控, 也使其可能成为细胞治疗理想的候选者.

1 肝脏祖细胞的生物学功能

肝脏祖细胞(hepatic progenitor cells, HPCs)的概念主要基于细胞培养、肝癌形成的动物模型和化学损伤后的肝细胞再生[8-10]. 相似的情况在人类肝脏祖细胞(相当于鼠的椭圆形细胞)也有类似描述[11]. HPCs是小上皮细胞, 细胞体积较小, 约为正常肝细胞的1/4至1/2大小, 整个细胞大部分为卵圆形胞核所占据, 核染色质分散而均匀, 以常染色质为主, 核仁小, 细胞质少, 内质网、线粒体和核糖体不发达, 表现为原始幼稚未分化细胞的超微结构特点[12]. 当肝细胞和/或胆道细胞的损伤或丢失合并成熟细胞类型参与的修复损伤时祖细胞被激活. 正常人肝组织中, 肝脏祖细胞位于门静脉区的胆小管和Hering管内[13-15]. 这些祖细胞有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的双向潜能[16-17]这些细胞区间在肝实质严重受损后可发生增殖、分化为成熟的肝细胞, 替代肝细胞发挥再生功能[18-19]. 在这些模型中, 一种门静脉周围小的原始上皮细胞组成的细胞群, 其增殖与肝细胞增殖相关或者在肝细胞增殖之前, 这些细胞根据其形状被称为卵圆细胞[20-23].

2 肝脏祖细胞的表型标志

随着对肝脏祖细胞研究的不断深入, 已经确立了一些肝脏祖细胞高度表达的标志物, 可分为以下5类: 受体类、连接蛋白、细胞黏附分子、表面抗原及其他.

2.1 受体 内皮素受体A、B(endothelin receptor type A and B, Edna and Ednrb)和胰泌素受体(secretin receptor, Sctr)表达在胆管细胞上, 与胆管分泌功能有关[24]. Edna、Ednrb和Sctr在祖细胞中强表达, 有维护上皮细胞的完整性, 极性, 上皮细胞与细胞外基质的黏附作用. γ-氨酪酸A型受体(gamma-aminobutyrate, type A receptor π. Gabrp)是γ-氨基丁酸受体亚群新类型. 在多种组织中可检测到这种亚型转录[25]. 在肝脏相关检查中Gabrp mRNA只在祖细胞中表达, 是一种祖细胞特异性标志[26]. 盘状结构域受体(discoidin domain receptor family, Ddr)是一类带有盘状结构域的受体型酪氨酸激酶, 这类激酶在哺乳类动物体内有两种, 分别为Ddr1、Ddr2. 这类激酶广泛分布, 与某些肿瘤的转移相关, 其中Ddr1表达于肿瘤组织细胞而Ddr2表达于间质细胞, 在大鼠肝脏内发现了Ddr1在祖细胞和胚肝细胞中表达, 可能与肝脏肿瘤有关. Smo为7次跨膜蛋白, 与G蛋白偶联型受体同源, 是Hedgehog信号级联放大系统中的一个下游片. Smo可在祖细胞, 胚肝细胞和肝细胞瘤细胞中表达, 可作为一些潜在的肝细胞癌的标志[26-27]. Mavier *et al*[28]研究了基质细胞衍生因1(stromal cell-derived facter-1, SDF-1)和其受体CXCR4在卵圆细胞激活中的作用. 他们证明卵圆细胞表达CXCR4, 在大块肝损伤中肝细胞上调SDF-1的表达. 体外趋化分析证明卵圆细胞沿着SDF-1梯度迁移, SDF-1/CXCR4的相互作用是卵圆细胞被激活的机制之一. SDF-1及其受体CXCR4是通过自分泌/旁分泌途径刺激肝卵圆细胞增殖的. CX3CR1是炎性内皮细胞表达的一种趋化因子Fractalkine的受体, CX3CR1在正常胆管和未完全发育胆管的祖细胞上表达[29], 可能与胆管上皮细胞与细胞外基质黏附作用有关. 整合素是异二聚体跨膜细胞表面受体, 由α和β亚单位组成, 这些亚单位的结合依赖于肝细胞种类和他们结合的底物.整合素α4和β6一起形成一个二聚体在祖细胞中明显上调. 在细胞外基质和细胞基底膜相互作用中有重要作用[26].

2.2 连接蛋白 间隙连接蛋白43(connexin-43, CX43)可构成细胞间的通道, 小分子成分可以借此在细胞间扩散. CX43是祖细胞的表面标志. 星形细胞、成纤维细胞、平滑肌和肾等组织也有表达CX43. CX43翻译后水平调节和信号转导机制异常可能与肝癌的发生密切相关[30]. Claudin-4在肝脏2/3切除后10 d的肝脏、胎肝和成体祖细胞中表现出低活性, 而Claudin-7只在成体祖细胞中表达. 用原位杂交确定了Claudin-7是祖细胞的一个特异性标志[26].

2.3 细胞黏附分子 在祖细胞和胎肝细胞中有两种钙黏素表达上调. 钙黏素3或P钙黏素在胎盘中发现[31]. 钙黏素22或PB钙黏素在垂体前叶和脑中优先表达[32], 这两种钙黏素均与祖细胞的发育及分化有关.用原位杂交方法证实钙黏素22在卵圆细胞中特异性的表达[26]. 上皮细胞黏附分子(Ep-CAM)或者肿瘤相关钙信号转导1是一种Ⅰ型跨膜糖蛋白, 在除少数上皮细胞外的所有细胞中表达[33]. 在对人肝脏的研究中发现上皮细胞黏附分子不在肝细胞中表达, 而在小胆管细胞和早期胎肝中表达[33-34]. Ep-CAM是祖细胞的一种特异性表面标志, 与祖细胞的成熟与分化以及肿瘤的形成有关[26]. 神经细胞黏附分

■**研发前沿**
虽然肝脏祖细胞有巨大的利用价值, 但目前对其认识距临床应用差距较大, 目前对肝脏祖细胞表型和生物学功能、肝脏祖细胞的调控机制成为研究热点.

■**相关报道**
美国杜克大学研究表明肝脏祖细胞的调控与Hedgehog信号有关, 但这一信号系统只是其调控机制的一部分.

■**创新盘点**
本文比较全面的介绍了目前对于肝脏祖细胞表型特征及生物学功能.

子1(N-CAM1)是人类肝脏祖细胞的标志[35], 但在大鼠肝脏的研究中未见表达. 说明了人与大鼠的祖细胞中其表型不同, 显示了肝祖细胞基因表达中存在种属差异性[26].

2.4 *表面抗原* 据报道, MUC1在人类胎肝大小胆管中表达, 在婴儿期其表达降低[36]. MUC1 mRNA在大鼠肝祖细胞中大量表达, 并表现出幼稚的胆管细胞样表型, 可能与肝脏祖细胞向胆管细胞分化有关. 癌蛋白v-ros(Ros1)是一种受体型酪氨酸激酶, 最初在鸟类的UR2肉瘤病毒中发现, 他只在祖细胞中上调, 可作为祖细胞的特异性表面标志[26]. CD24是一种表面唾液酸糖蛋白, 依靠糖基磷脂酰肌醇链锚定在细胞膜上, 据报道CD24是包括肝细胞癌的肿瘤细胞上的一个P选择素配基[37], 在祖细胞、胎肝细胞及大鼠肝细胞瘤上CD24高水平表达, 也是祖细胞表面标志之一. CD44是一种多功能跨膜糖蛋白, 其功能包括: 与透明质酸、纤黏连蛋白及胶原结合, 介导细胞与细胞外基质之间的黏附; 参与细胞对透明质酸的摄取及降解; 参与淋巴细胞归巢; 参与T细胞的活化; 促进细胞迁移. CD44在多种肿瘤细胞的表达比相应正常组织为高, 并与肿瘤细胞的成瘤性、侵袭性及淋巴结转移性有关. 也是祖细胞的一种特异性标志[26]. CD133抗原是有五个跨膜区的糖蛋白, 被认为是一个造血干细胞的标志[38]. 已经证实CD133有两个亚型, 短的一个在胎肝干细胞及骨髓源肝干细胞中表达[39]. CD133是一个特异性的大鼠肝脏祖细胞的表面标志, 可用于大鼠成体祖细胞的分离[26]. CD34是一个高度糖基化的膜蛋白, 是造血干细胞的一个特异的表面标志. Malcolm *et al*发现, 卵圆细胞表面表达较高水平的CD34分子. 由于细胞的分化程度越高, CD34在细胞膜表面的表达越低[40], 可用于卵圆细胞的分离[41]. AFP是一种糖蛋白, 在胚胎肝细胞、肝癌细胞中都有表达, 是肝祖细胞的标志物之一, 是原始化肝细胞的特征性标志[42]. OV-6是鉴定大鼠卵圆细胞和人肝脏祖细胞最好的指标[43]. 但其并非卵圆细胞特异性, 能与大鼠和人的部分正常胆管上皮细胞反应[43-44], 而另有研究表明人正常胆管上皮不表达OV-6[45].

2.5 *其他* 水通道5(aquaporin 5, AQP5)是七种水通道中的一种, 在胆管细胞中检测到AQP5m-RNA表达[46]. 在大鼠祖细胞中也诱导出AQP5, 可能与肝脏祖细胞向胆管细胞分化有关. 同样, 电压依赖型钙通道Cacna2d1(alpha2/delta subunit1, Cacna2d1), 在祖细胞和胚肝细胞中过度表达, 可能与祖细胞的分化有关[26]. DLK1(delta-like protein/preadipocyte factor1)是表皮生长因子(EGF)家族的成员之一, 其结构特征为蛋白的细胞外区域拥有6串在结构及氨基酸序列上与表皮生长因子高度同源的重复结构. DLK1基因为父系表达的印记基因, 定位于人类染色体14q32, 是真正的祖细胞表面标志[47-48]. 黄健 *et al*发现人类印迹基因DLK1在胚胎肝脏高表达, 同时也在肝脏特殊的原始干/祖细胞中表达, DLK1可能是非常有效的肝癌治疗新靶点[49]. Thy-1能够刺激细胞内Ca^{2+}释放和胞质蛋白质磷酸化, 并参与细胞的识别、黏附和T细胞的激活. Thy-1不在成年肝脏正常表达, 但在胎肝中表达, 而且在被损害肝脏的表达仅限于肝脏中被激活的卵圆细胞, 有人用Thy-1抗体分离到纯度为95%-97%的Thy-1卵圆细胞种群. Thy-1抗体可作为一种鉴别卵圆细胞新的标志物[50]. 干细胞因子(stem cell factor, SCF)是祖细胞的表面标志之一[51]. SCF和其他细胞因子一起诱导引起祖细胞激活、增生及延长其存活期[52]. 角蛋白属中间丝的一种, 特异表达于上皮细胞中. 不同上皮细胞保持其特定的角蛋白组成, 因此角蛋白可作为鉴别分子应用于临床诊断, 包括各种肿瘤的鉴别诊断和早期微小转移灶的检测, 临床病理学分析中也将CKl9作为肝细胞癌和肝内胆管细胞癌的鉴别标志分子[53]. HBV感染引起的肝炎和肝硬化、液氮局部冻伤及四氯化碳所致的肝损伤情况下, 会出现肝细胞CK19的异常表达[54]. 祖细胞可表达CK19, 提示CK19阳性的肝脏祖细胞可能与肝脏癌症的发生有关[55].

肝脏祖细胞近来已被列为细胞移植和基因治疗的靶细胞. 在体外将肝脏祖细胞基因修饰后移植给相应基因缺陷的肝脏, 使其转变为正常的肝细胞, 这可用来治疗肝代谢性疾病和病毒性疾病; 获得大量的肝脏祖细胞可用于肝移植的替代疗法和生物人工肝的细胞来源; 体外培养肝脏祖细胞使其分化为成熟肝细胞, 可进行药物毒理学和药物代谢动力学的评价. 但目前对肝脏祖细胞的研究尚处于基础研究阶段, 应用于临床仍有较大的距离, 对其来源、表型、增殖、调控分化及其与肝疾病的关系仍缺乏明确的了解, 今后有关研究还将集中研究肝脏祖细胞的生物学特征、增生机制以及定向分化的调节机制, 以求阐明肝脏发育及各种病变

的发生机制, 还将寻找特异性更高的表面标志物, 明确他的演化过程, 从而达到体外肝脏祖细胞的大规模扩增、保存、建立细胞系以及定向诱导分化. 肝脏祖细胞的激活、分离、培养、筛选、鉴定等方法还需进一步完善, 以提高细胞产量和纯度.

总之, 肝脏祖细胞的研究具有广阔的前景, 他不仅为终末期肝病以及先天性肝病的治疗提供细胞来源, 更重要的是为体外克隆肝脏打下基础, 解决细胞移植和器官移植供体不足、免疫排斥的问题. 相信随着研究的不断深入, 肝脏祖细胞在肝脏多种生理及病理生理中的作用会逐渐明确, 为进一步的临床应用奠定基础.

3 参考文献

1 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66

2 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487

3 Van Thiel DH, Gavaler JS, Kam I, Francavilla A, Polimeno L, Schade RR, Smith J, Diven W, Penkrot RJ, Starzl TE. Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Gastroenterology* 1987; 93: 1414-1419

4 Mangnall D, Bird NC, Majeed AW. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver Int* 2003; 23: 124-138

5 Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 836-847

6 潘兴华, 庞荣清 张步振. 干细胞与肝脏功能重建的研究现状与展望. 世界华人消化杂志 2005; 13: 823-830

7 陈谦, 李强. 肝脏神经内分泌区室的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2954-2957

8 Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 201-204

9 Qin AL, Zhou XQ, Zhang W, Yu H, Xie Q. Characterization and enrichment of hepatic progenitor cells in adult rat liver. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1480-1486

10 He YF, Liu YK, Gao DM, Chen J, Yang PY. An efficient method of sorting liver stem cells by using immuno-magnetic microbeads. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3050-3054

11 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

12 Libbrecht L, Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 389-396

13 Santoni-Rugiu E, Jelnes P, Thorgeirsson SS, Bisgaard HC. Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS* 2005; 113: 876-902

14 Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 385-396

15 Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003; 120: 117-130

16 Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 343-359

17 Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 2008; 47: 636-647

18 Alison M, Sarraf C. Hepatic stem cells. *J Hepatol* 1998; 29: 676-682

19 Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 385-396

20 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4497-4504

21 Lange C, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2394-2397

22 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

23 Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346: 738-746

24 Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology* 2000; 31: 555-561

25 Hedblom E, Kirkness EF. A novel class of GABAA receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J Biol Chem* 1997; 272: 15346-15350

26 Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology* 2007; 45: 139-149

27 Symmans WF, Fiterman DJ, Anderson SK, Ayers M, Rouzier R, Dunmire V, Stec J, Valero V, Sneige N, Albarracin C, Wu Y, Ross JS, Wagner P, Theriault RL, Arun B, Kuerer H, Hess KR, Zhang W, Hortobagyi GN, Pusztai L. A single-gene biomarker identifies breast cancers associated with immature cell type and short duration of prior breastfeeding. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 1059-1069

28 Mavier P, Martin N, Couchie D, Préaux AM, Laperche Y, Zafrani ES. Expression of stromal cell-derived factor-1 and of its receptor CXCR4 in liver regeneration from oval cells in rat. *Am J Pathol* 2004; 165: 1969-1977

29 Buisine MP, Devisme L, Degand P, Dieu MC, Gosselin B, Copin MC, Aubert JP, Porchet N. Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. II. Duodenum and liver, gallbladder, and pancreas. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 1667-1676

30 马向东, 马兴, 隋延仿, 王文亮. 肝细胞肝癌和正常肝细胞间隙连接蛋白Connexin32, Connexin43蛋白质酪氨酸磷酸化分析. 中华肝胆外科杂志 2002; 8: 491-493

31 Nose A, Takeichi M. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with

■名词解释

肝脏祖细胞: 人肝脏中与啮齿类动物卵圆细胞相似, 体积小, 卵圆形核, 胞核大、胞质少, 有双向分化潜能的小上皮细胞.

■同行评价
本文比较全面地综述了肝脏祖细胞的表型特征及其生物学功能，内容新颖，层次清楚，行文流畅，可读性强，具有较高的科学性和实际应用前景.

implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* 1986; 103: 2649-2658
32 Sugimoto K, Honda S, Yamamoto T, Ueki T, Monden M, Kaji A, Matsumoto K, Nakamura T. Molecular cloning and characterization of a newly identified member of the cadherin family, PB-cadherin. *J Biol Chem* 1996; 271: 11548-11556
33 Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* 2006; 24: 1852-1858
34 de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 1999; 188: 201-206
35 Van Den Heuvel MC, Slooff MJ, Visser L, Muller M, De Jong KP, Poppema S, Gouw AS. Expression of anti-OV6 antibody and anti-N-CAM antibody along the biliary line of normal and diseased human livers. *Hepatology* 2001; 33: 1387-1393
36 Sasaki M, Nakanuma Y, Terada T, Kim YS. Biliary epithelial expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC5/6 apomucins during intrahepatic bile duct development and maturation. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 1995; 147: 574-579
37 Lim SC. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 2: S351-S354
38 Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 715-719
39 Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J. AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem* 2002; 277: 20711-20716
40 Alison MR, Poulsom 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
41 Petersen BE, Grossbard B, Hatch H, Pi L, Deng J, Scott EW. Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology* 2003; 37: 632-640
42 Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* 1991; 51: 2611-2620
43 Strain AJ, Crosby HA, Nijjar S, Kelly DA, Hubscher SG. Human liver-derived stem cells. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 373-384
44 Roskams T, De Vos R, Van Eyken P, Myazaki H, Van Damme B, Desmet V. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatol* 1998; 29: 455-463
45 Crosby HA, Hubscher SG, Joplin RE, Kelly DA, Strain AJ. Immunolocalization of OV-6, a putative progenitor cell marker in human fetal and diseased pediatric liver. *Hepatology* 1998; 28: 980-985
46 Masyuk AI, LaRusso NF. Aquaporins in the hepatobiliary system. *Hepatology* 2006; 43: S75-S81
47 Tanimizu N, Tsujimura T, Takahide K, Kodama T, Nakamura K, Miyajima A. Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver. *Gene Expr Patterns* 2004; 5: 209-218
48 Jensen CH, Jauho EI, Santoni-Rugiu E, Holmskov U, Teisner B, Tygstrup N, Bisgaard HC. Transit-amplifying ductular (oval) cells and their hepatocytic progeny are characterized by a novel and distinctive expression of delta-like protein/preadipocyte factor 1/fetal antigen 1. *Am J Pathol* 2004; 164: 1347-1359
49 Huang J, Zhang X, Zhang M, Zhu JD, Zhang YL, Lin Y, Wang KS, Qi XF, Zhang Q, Liu GZ, Yu J, Cui Y, Yang PY, Wang ZQ, Han ZG. Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1094-1103
50 Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8078-8083
51 Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology* 1999; 30: 112-117
52 Olweus J, Terstappen LW, Thompson PA, Lund-Johansen F. Expression and function of receptors for stem cell factor and erythropoietin during lineage commitment of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 88: 1594-1607
53 Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 110-122
54 苏勤, 刘彦仿, 魏正乾. 三种大鼠肝损伤模型中细胞角蛋白异常表达及其机制-免疫组化及免疫电镜研究. 中国组织化学与细胞化学杂志 1994; 3: 155-160
55 Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; 95: 9-20

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2487-2492
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

肝细胞癌的蛋白质组学研究进展

杨国欢, 代 智, 周 俭

杨国欢, 代智, 周俭, 复旦大学肝癌研究所, 复旦大学附属中山医院 上海市 200032
国家高技术研究发展计划(863计划), No. 2007AA02Z479
作者贡献分布: 此课题由杨国欢, 代智及周俭设计, 本文写作由杨国欢完成.
通讯作者: 周俭, 200032, 上海市医学院路136号, 复旦大学肝癌研究所, 复旦大学附属中山医院. zhou.jian@zs-hospital.sh.cn
电话: 021-64041990 传真: 021-64037181
收稿日期: 2008-05-14 修回日期: 2008-06-24
接受日期: 2008-06-30 在线出版日期: 2008-08-08

Advance in proteomic study of hepatocellular carcinoma

Guo-Huan Yang, Zhi Dai, Jian Zhou

Guo-Huan Yang, Zhi Dai, Jian Zhou, Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China
Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Project), No. 2007AA02Z479
Correspondence to: Jian Zhou, Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital, Fudan University, 136 Yixueyuan Road, Shanghai 200032, China. zhou.jian@zs-hospital.sh.cn
Received: 2008-05-14 Revised: 2008-06-24
Accepted: 2008-06-30 Pubilshed online: 2008-08-08

Abstract
At present, studies of hepatocellular carcinoma focus on investigating the molecular mechanism of carcinogenesis, development, metastasis and reccurrence and seeking biological markers for early diagnosis and metastasis prediction and targets for interfering therapy. In the post-genome era, proteomics provides novel insights into the research of hepatocellular carcinoma, which is controlled by multi-genes and multi-proteins. In this paper we reviewed the recent progress in proteomic study of hepatocellular carcinoma.

Key Words: Proteomics; Hepatocellular carcinoma

Yang GH, Dai Z, Zhou J. Advance in proteomic study of hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2487-2492

摘要
探讨肝癌发生发展和转移复发的分子机制, 寻找早期诊断肝癌、预测转移的生物标记和干预治疗的靶点, 已成为当今肝癌研究的热点. 随着后基因组时代的来临, 蛋白质组学为涉及多基因、多蛋白的肝细胞癌研究创造了新的契机. 本文就肝细胞癌的蛋白质组学研究进展作简要综述.

关键词: 蛋白质组学; 肝细胞癌

杨国欢, 代智, 周俭. 肝细胞癌的蛋白质组学研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2487-2492
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2487.asp

0 引言
原发性肝癌(绝大部分是肝细胞癌)在全球癌症死亡率中居第三位, 在我国为第二位的癌症死因[1]. 由于肝癌起病隐匿, 绝大部分患者就诊时已界中、晚期, 预后很差. 早期发现是提高外科干预和远期疗效的前提. 手术切除和肝移植虽已被认为是肝癌获得根治的最好手段[2], 但转移和复发仍是影响肝癌术后生存的最大障碍. 探讨肝癌发生发展和转移复发的分子机制, 寻找早期诊断肝癌、预测转移的生物标志和干预治疗的靶点, 已成为当今肝癌研究的热点. 随着后基因组时代的来临, 蛋白质组学给涉及多基因、多蛋白的肝细胞癌研究创造了新的契机. 本文就肝细胞癌的蛋白质组学研究进展作简要综述.

1 蛋白质组学概述
蛋白质组(proteome)由PROTEins和GenOME两词组合而成, 最早见于1995-07的《Electrophoresis》杂志, 意思是proteins expressed by a genome, 即基因组表达的蛋白质[3]. 蛋白质组是一个在空间和时间上动态变化着的整体[4].

蛋白质组学(proteomics)研究是从整体的角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态, 了解蛋白质之间相互作

■背景资料
肝细胞肝癌是世界上病死率最高的恶性肿瘤之一. 蛋白质组学是以生物体系整体蛋白为研究对象, 其研究以双向凝胶电泳和质谱技术为核心, 旨在研究蛋白质表达谱和蛋白质与蛋白质之间相互作用的新领域, 其已被广泛应用于疾病的相关研究.

■同行评议者
刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

■研发前沿
探讨肝癌发生发展和转移复发的分子机制, 寻找早期诊断肝癌、预测转移的生物标志和干预治疗的靶点, 已成为当今肝癌研究的热点.

用与联系, 揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律. 由于对“全部蛋白质”进行研究存在一定的难度, 因此, “功能蛋白质组学”(functional proteomics)的概念便应运而生[5], 其研究对象是功能蛋白质组, 从局部入手研究蛋白质的各个功能亚群体, 以便将来把多个群体组合起来, 逐步描绘出接近于生命细胞的“全部蛋白质”的蛋白质图谱. 狭义上讲, 蛋白质组学是指不同条件下细胞内蛋白质的变化, 比如正常细胞和异常细胞之间、细胞用药和不用药之间的蛋白质表达谱的区别, 这在疾病研究和药物筛选上很有意义, 是目前蛋白质组学在应用研究方面最具前景的领域[6]. 当然, 随着蛋白质组研究的不断发展, 蛋白质组学的概念也将不断发展和深化.

2 肝细胞癌的蛋白质组学研究进展

肝肿瘤是蛋白质组研究应用的领域之一. 研究者运用蛋白质组学研究手段, 通过比较正常和病理情况下肝癌细胞或组织中蛋白质在表达数量、表达位置和修饰状态上的差异, 发现与病理改变有关的蛋白质和疾病特异性蛋白质, 从而为疾病发病机制的研究提供线索, 也可作为疾病诊断的分子标志、疾病治疗和药物开发的靶标. 国内外不少学者在细胞、组织样品和血清等不同水平对肝细胞癌进行了研究, 并初显成效.

2.1 细胞水平 对不同肝癌细胞系进行蛋白质组学研究, 通过体外实验了解蛋白质功能, 从而间接揭示肝细胞癌发病和转移机制. Cui *et al*[7]用双相凝胶电泳及液相色谱-电喷雾电离-质谱(LC-ESI-MS)的方法比较了具有不同转移潜能人肝细胞癌细胞系Hep3B、MHCC97L和MHCC97H的蛋白质组, 结果发现与没有转移潜能的Hep3B细胞系相比, 在MHCC97H和MHCC97L中有16个蛋白质过表达, 10个蛋白质表达下调. 进一步的验证试验则提示, 结合蛋白家族成员的差异蛋白S100A4通过调节基质金属蛋白酶-9的分泌和增强细胞侵袭力来促进HCC的侵袭和转移[8]. Ding *et al*[9-10]在MHCC97-H和MHCC97-L细胞系间差异表达的56个蛋白质点中成功鉴定出14种蛋白质, 在高转移细胞系MHCC97-H中丙酮酸激酶M2、S100 A4及CK19等蛋白质高表达, 而Mn-SOD、钙网蛋白前体和组织蛋白酶D等表达量下调. 有趣的是这些被鉴定出来的蛋白质大部分和肿瘤的转移有关. 他们还将反义EGFR的cDNA序列转染肝癌细胞, 发现肿瘤细胞生长受抑, 与对照相比有40个蛋白质表达发生了变化, 其中3个蛋白质的表达向正常细胞趋化. Lee *et al*[11]研究了人肝癌细胞HepG2中高丰度蛋白质表达情况, 并与另一种非常相近的肝癌细胞Hep3B进行了比较, 发现差异两倍以上的蛋白质有16个, 特别是热休克蛋白(Hsp)的成员和不均一核糖核蛋白(hnRNP)家族. 该差异为进一步描绘这两种蛋白家族间的相互作用及修饰提供基础.

甲胎蛋白(AFP)被认为是肝癌诊断和判断预后的标志物, 肝细胞癌组织的诸多特征都与之有关, 体内多种蛋白质与AFP协同发挥作用. 为了鉴定这些蛋白质, Yokoo *et al*[12]采用荧光双相凝胶电泳方法比较研究了9种能产生AFP的肝癌细胞系(JHH-5、HuH-1、PLC/PRL/5、Hep3B、HT-17、JHH-7、HuH-7、HepG2和Li-7)和7种不产生AFP的肝细胞系(HLE、JHH-6、Sk-Hep-1、JHH-4、HLF、RBE和SSP-25)之间蛋白质表达的变化情况, 发现在产生AFP的细胞系中6个蛋白质上调, 5个蛋白质下调. Srisomsap *et al*[13]通过比较胆管细胞癌细胞系HuCCA-1、肝细胞癌细胞系(HepG2和HCC-S102)以及人乳腺上皮癌细胞系(MCF-7)的蛋白质表达谱, 发现CK7、CK19、U2/2和galectin-3可作为鉴别胆管细胞癌和肝细胞癌的潜在标志物. Yuan *et al*[14]比较了人肝癌细胞系逆转株(revertant)CL1及其源细胞系SMMC7721的蛋白质表达情况, 发现19个蛋白质在表达上有明显差异(P<0.01). 与SMMC7721细胞相比, 逆转株CL1中一些与肿瘤抑制相关的蛋白质如maspin表达上调, 而与肿瘤生长相关的蛋白质如组织蛋白酶D(cathepsin D)表达下调. 在肝癌发生相关蛋白质组学的研究中, Fujii *et al*[15]比较了9个HCC细胞系和5个正常肝细胞系, 发现鉴定出来的蛋白质参与细胞周期调节、与抑癌基因产物结合、与脂肪酸结合及翻译调节等环节. Western blot显示HCC组织中PCNA、EB1和 E-FABP过表达, 后二者的异常表达为首次在肝细胞癌进展的研究中涉及. 果蝇zeste基因增强子同源物2(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)在肝癌发生中发挥重要作用, 在此基础上, Chen *et al*[16]对EZH2下游通路进行功能蛋白质组学研究, 发现敲除EZH2组中60s酸性核糖体蛋白P0(L10E)表达上调, 而在EZH2过表达的肝细胞内表达下调, 提示L10E是EZH2作用的下游靶标.

2.2 组织样本水平 为提高和改善肝细胞癌诊断

及预后, 亟待探索和鉴定有效的分子标志物. 对肝细胞癌组织进行蛋白质组学研究是最直接和最有说服力的途径[17]. Park *et al*[18]在肝癌组织铁蛋白轻链(tissue ferritin light chain, T-FLC)的蛋白质组学及分子机制的研究中发现, HCC患者的贮铁蛋白T-FLC表达明显抑制或减少到不可检测的水平, 而转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)呈过度表达. 有趣的是, T-FLC相对应的mRNA水平与正常组织中的水平几乎一致, 这表明T-FLC基因的翻译和翻译后修饰可能是引起T-FLC表达抑制的原因. 而且, 利用PCR为基础的杂合子丢失分析研究发现, 19例HCC患者中只有1例显示T-FLC所处的19q13.3-q13.4染色体缺乏, 表明由结构基因改变而引起T-FLC表达抑制的可能性不大, 这在一定程度上回答了HCC形成过程中铁缺失的问题. Melle及其同事[19]对显微切割的非肝癌组织、肝癌中央组织及肿瘤边缘组织进行比较研究, 首次确定铁蛋白轻链亚基(ferritin light subunit, FLS)及腺苷酸激酶-3在肝肿瘤组织中低表达, 而胆绿素还原酶B高表达. Yoon *et al*[20]用双相电泳技术对11例HCC肝组织及其对应的非肿瘤组织核基质蛋白组分进行对比分析, 发现钙网织蛋白在HCC的核基质中大量存在, 但两种组织中钙网织蛋白总量相似. 钙网织蛋白-核基质的形成和扩展可能与细胞生长的激活有关. Yi *et al*[21]运用双向凝胶电泳发现, 致死蛋白Mortalin(基因HSPA9)在HCC组织中过表达, 同时肿瘤早期复发者的致死蛋白水平高于无瘤生存组. 因此, 致死蛋白有望成为肝癌根治性切除术后预测早期复发的肿瘤标志物. Zeindl-Eberhart *et al*[22]将人 HCC样品经2-D分离, 切取分子质量约30 000-40 000/PI 612-718的区域中, 大约90个点进行肽质量指纹图谱分析, 找到6个变异体蛋白, 其中人的醛糖还原酶样蛋白-1(hARLP-1)是人肝癌中检测到的最主要的醇醛酮还原酶超家族成员. hARLP拥有4种异构体(hARLP-1、hARLP-2、hARLP-3和hARLP-4). 经免疫印迹和免疫组化分析, 95%的HCC样品对hARLP家族反应呈阳性, 因此可作为HCC免疫组化诊断的标志物. Yang *et al*[23]在研究通过注射肿瘤细胞到肝左叶而得到的肝癌模型的蛋白质组时, 发现脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和他的受体在肿瘤组织和肝癌细胞系中能特异性地表达, 而在非肿瘤肝组织和正常细胞系中没有表达, 该因子能以Hsp90依赖的方式促进肿瘤细胞的增殖.

肝癌的发生与病毒感染密切相关, 为阐释感染HCV后肝癌发生的机制, Yokoyama *et al*[24]比较了感染HCV患者的肿瘤和非肿瘤组织间蛋白质表达的情况, 结果表明, 超过50%的患者中有11个蛋白质在HCC组织中表达下调. Takashima *et al*[25]用双相凝胶电泳和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析HCV相关性HCC样本, 发现与癌旁组织相比, 有9个蛋白质在癌组织中表达上调, 其中GRP78、GRP75和HSP70.1明显上调, HSC70趋向过表达. 表明这4种蛋白质在HCV相关性HCC的致病过程中起重要作用, 有可能成为诊断和治疗的分子靶标. Kim *et al*[26]比较HBV阳性、HCV阳性及HBV和HCV同时阴性的三组HCC患者的组织样品各7例, 发现癌组织与癌旁组织相比共有60个蛋白质表达发生了变化, 其中14个差异蛋白质为三组HCC患者所共有, 而另外46个差异蛋白质各组表达均不相同, 提示其与病毒感染相关, 且HBV与HCV诱发肝癌的机制可能不同. Sun *et al*[27]用荧光双向差异凝胶电泳(2D-DIGE)的方法分析了12例HBV相关性HCC标本, 结果提示共有61个位点显著上调、158个位点下调. Western blot及免疫组化证实Hsp70和Hsp90家族的蛋白质及不均一核糖核蛋白C1/C2过度表达, 这些蛋白可能是潜在的肿瘤标志物. Ward *et al*[28]提出假说认为HCV相关性HCC的蛋白质组学特征在成功治疗后会像AFP一样“正常回归”, 但结果显示部分SELDI峰未如期回复, 说明HCC的蛋白质组学特征和肿瘤负荷并不成直接的线性关系, 而可能和肝脏本身的病变或癌前病灶有关. Li *et al*[29]运用激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)获取HCC和癌旁组织, 并通过同位素亲和标签和二维液相色谱串联质谱技术进行分析, 共有644个蛋白得到定性, 261个蛋白得到定量. LCM技术可在不损伤细胞结构的情况下, 从异质性的肿瘤组织内切割或分离出特定的细胞或组织, 该技术联合同位素亲和标签和二维液相色谱串联质谱技术, 可大规模的对HCC组织进行定性和定量分析.

■相关报道
Takashima *et al*对15组HCC组织和非肝癌组织、5例正常肝组织进行蛋白质组学及重组cDNA表达文库血清学分析法的研究, 找到在HCC血清中免疫反应明显增高的三种自身抗体, 这三种特异性抗体可作为HCC诊断的候选标志物.

2.3 血清水平

血清作为临床研究中最易获得的标本, 具有创伤小、易监测等特点, 而被广泛用于比较肿瘤与非肿瘤患者血清的蛋白质组学差异及肿瘤候选标志物的检测[30]. Steel *et al*[31]用蛋白质组学方法, 从处于疾病不同阶段的个体中采集血清, 经双相电泳及基质辅助激光解吸附飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析来鉴

■名词解释

1 蛋白质组(proteome): 源于蛋白质(PROTEin)与基因组(genOME)两个词的结合, 指细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式, 后引申为一种基因组所表达的全套蛋白质, 即"proteins expressed by a genome", 而一种基因组可包括一种细胞乃至一种生物. 这是一动态概念, 他不仅在一个机体的不同组织和细胞中不同, 而且在同一机体的不同发育阶段、不同生理状态及不同外界环境下也有不同.

2 蛋白质组学(proteomics): 蛋白质组为研究对象, 大规模、有系统地研究蛋白质的特征及结构, 包括蛋白质的表达水平、翻译后修饰、蛋白质间的相互作用等, 并由此获得对疾病过程、细胞生理生化特征和调控网络的广泛完整的认识.

定随病程变化的蛋白质多肽, 证实HCC患者血清中有两种多肽(补体C3的羧基端和载脂蛋白A1的异形体)水平较健康对照明显降低. Paradis *et al*[32]用表面加强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)研究了82个肝硬化患者的血清(其中44例有肝癌, 38例无肝癌), 并比较了这两组样品的蛋白质表达情况, 发现玻璃体结合蛋白(vitronectin)的催化片段(catalytic fragment)可作为合并慢性肝病的HCC患者新的血清标志物. Poon *et al*[33]比较了20例慢性肝病(AFP<500 g/L)和38例肝癌患者的血清, 发现在2384个共有的血清蛋白质表达谱中, 250个点蛋白质的表达有明显差异. Lee *et al*[34]通过对HCC患者与肝硬化及正常人的血清蛋白质组学研究, 发现补体C3a在慢性丙肝和HCV相关性肝癌患者中差异表达. Yang *et al*[35]联合应用2-DE和钠升电喷离子质谱法(nano-HPLC-ESI-MS/MS)比较了5例HCC患者和正常对照的血清, 发现在差异表达的14种蛋白质中12种表达上调, 2种表达下调. 在鉴定的317种蛋白中有29种的蛋白可信度较高, 其中6种仅出现在HCC患者中, 可作为HCC的生物学标志.

不少研究者致力于探寻早期诊断HCC的标志物的蛋白质组学研究. Ward *et al*[36]对182例丙肝肝硬化患者的血清进行蛋白质组学研究, 发现有2个SELDI峰HCC组较非HCC组平均升高50%(P<0.001), 经鉴定他们分别为kappa和lamda免疫球蛋白的轻链, 这为单独或联合应用上述蛋白进行早期诊断HCC 提供了新的途径. Zinkin *et al*[37]运用蛋白质组学方法对HCC患者和丙肝肝硬化患者进行比较研究, 发现SELDI-TOF-MS 诊断HCC的敏感度和特异度分别为79%和86%, 优于AFP、PIVKA-Ⅱ等传统指标. Le Naour *et al*[38]分析了37例HCC患者、31例慢性HBV/HCV感染而无HCC的患者、143例对照(116例其他肿瘤患者, 3例SLE患者, 24例健康人)的血清, 发现8种蛋白质的抗体在超过10%的HCC患者血清中检出, 而健康个体中没有(P<0.05). 其中4种抗体在慢性肝炎患者血清中有相对较高的检出率, 而另4种抗体则主要在HCC患者血清中检出. 这些抗体可用于合并慢性肝炎的HCC患者的早期诊断. Takashima *et al*[39]对15组HCC组织和非肝癌组织、5例正常肝组织进行蛋白质组学及重组cDNA表达文库血清学分析法(serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX)的研究, 找到在HCC血清中免疫反应明显增高的三种自身抗体(HSP70、peroxiredoxin和Mn-SOD), 这三种特异性抗体可作为HCC诊断的候选标志物.

3 结论

从细胞、组织及血清等不同水平进行蛋白质组学研究, 为揭示肝细胞癌的发病机制及发现肿瘤标记物提供了新的途径. 由于蛋白组成复杂、性质不稳定, 易发生相互作用, 因此, 对于不同来源的样品, 选取正确的制备方法、合适的研究策略, 可以使研究取得事半功倍的效果[40]. 人类蛋白组组织(HUPO)提出制定相对统一的样品制备及处理方案将有助于提高结果的稳定性和可比性[41].

总之, 蛋白质组作为连接基因组与临床应用之间的桥梁, 为从整体水平研究肝细胞癌开辟了更广阔的前景, 但面临的主要问题是检测的敏感性不高, 低丰度蛋白通常被高丰度蛋白掩盖而很难分离, 因而丢失许多重要的蛋白质信息. 目前正致力于发展高分辨率、高敏感性和高通量的蛋白质分离和鉴定技术. 可以相信, 随着研究技术的进一步发展, 生物信息学工具的完善, 蛋白质组研究数据的不断积累, 蛋白质组学最终将成为攻克肝细胞癌的强有力武器.

4 参考文献

1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108

2 Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-1917

3 Kahn P. From genome to proteome: looking at a cell's proteins. *Science* 1995; 270: 369-370

4 Nowak R. Entering the postgenome era. *Science* 1995; 270: 368-369, 371

5 Abbott A. And now for the proteome... *Nature* 2001; 409: 747

6 Humphery-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP. Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* 1997; 18: 1217-1242

7 Cui JF, Liu YK, Pan BS, Song HY, Zhang Y, Sun RX, Chen J, Feng JT, Tang ZY, Yu YL, Shen HL, Yang PY. Differential proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cell line metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 615-622

8 Cui JF, Liu YK, Zhang LJ, Shen HL, Song HY, Dai Z, Yu YL, Zhang Y, Sun RX, Chen J, Tang ZY, Yang PY. Identification of metastasis candidate proteins among HCC cell lines by comparative proteome and biological function analysis of S100A4 in metastasis in vitro. *Proteomics* 2006; 6: 5953-5961

9 Ding SJ, Li Y, Shao XX, Zhou H, Zeng R, Tang ZY, Xia QC. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. *Proteomics* 2004;

4: 982-994
10 Ding SJ, Li Y, Tan YX, Jiang MR, Tian B, Liu YK, Shao XX, Ye SL, Wu JR, Zeng R, Wang HY, Tang ZY, Xia QC. From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 73-81
11 Lee CL, Hsiao HH, Lin CW, Wu SP, Huang SY, Wu CY, Wang AH, Khoo KH. Strategic shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines. *Proteomics* 2003; 3: 2472-2486
12 Yokoo H, Kondo T, Fujii K, Yamada T, Todo S, Hirohashi S. Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in liver cancer cells. *Hepatology* 2004; 40: 609-617
13 Srisomsap C, Sawangareetrakul P, Subhasitanont P, Panichakul T, Keeratichamroen S, Lirdprapamongkol K, Chokchaichamnankit D, Sirisinha S, Svasti J. Proteomic analysis of cholangiocarcinoma cell line. *Proteomics* 2004; 4: 1135-1144
14 Yuan Q, An J, Liu DG, Sun L, Ge YZ, Huang YL, Xu GJ, Zhao FK. Proteomic analysis of differential protein expression in a human hepatoma revertant cell line by using an improved two-dimensional electrophoresis procedure combined with matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2004; 25: 1160-1168
15 Fujii K, Kondo T, Yokoo H, Yamada T, Iwatsuki K, Hirohashi S. Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye. *Proteomics* 2005; 5: 1411-1422
16 Chen Y, Lin MC, Wang H, Chan CY, Jiang L, Ngai SM, Yu J, He ML, Shaw PC, Yew DT, Sung JJ, Kung HF. Proteomic analysis of EZH2 downstream target proteins in hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2007; 7: 3097-3104
17 Li C, Yi-Hong, Tan YX, Ai JH, Zhou H, Li SJ, Zhang L, Xia QC, Wu JR, Wang HY, Zeng R. Analysis of microdissected cells by two-dimensional LC-MS approaches. *Methods Mol Biol* 2008; 428: 193-208
18 Park KS, Kim H, Kim NG, Cho SY, Choi KH, Seong JK, Paik YK. Proteomic analysis and molecular characterization of tissue ferritin light chain in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35: 1459-1466
19 Melle C, Ernst G, Scheibner O, Kaufmann R, Schimmel B, Bleul A, Settmacher U, Hommann M, Claussen U, von Eggeling F. Identification of specific protein markers in microdissected hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2007; 6: 306-315
20 Yoon GS, Lee H, Jung Y, Yu E, Moon HB, Song K, Lee I. Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 1117-1120
21 Yi X, Luk JM, Lee NP, Peng J, Leng X, Guan XY, Lau GK, Beretta L, Fan ST. Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 315-325
22 Zeindl-Eberhart E, Haraida S, Liebmann S, Jungblut PR, Lamer S, Mayer D, Jager G, Chung S, Rabes HM. Detection and identification of tumor-associated protein variants in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2004; 39: 540-549
23 Yang ZF, Ho DW, Lam CT, Luk JM, Lum CT, Yu WC, Poon RT, Fan ST. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 219-225
24 Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics* 2004; 4: 2111-2116
25 Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 2487-2493
26 Kim W, Oe Lim S, Kim JS, Ryu YH, Byeon JY, Kim HJ, Kim YI, Heo JS, Park YM, Jung G. Comparison of proteome between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5493-5500
27 Sun W, Xing B, Sun Y, Du X, Lu M, Hao C, Lu Z, Mi W, Wu S, Wei H, Gao X, Zhu Y, Jiang Y, Qian X, He F. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 1798-1808
28 Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G, Thar TT, Barget N, Wei W, Martin A, Beaugrand M, Johnson PJ. Preclinical and post-treatment changes in the HCC-associated serum proteome. *Br J Cancer* 2006; 95: 1379-1383
29 Li C, Hong Y, Tan YX, Zhou H, Ai JH, Li SJ, Zhang L, Xia QC, Wu JR, Wang HY, Zeng R. Accurate qualitative and quantitative proteomic analysis of clinical hepatocellular carcinoma using laser capture microdissection coupled with isotope-coded affinity tag and two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 399-409
30 Omenn GS. Strategies for plasma proteomic profiling of cancers. *Proteomics* 2006; 6: 5662-5673
31 Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R, Block TM. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 601-609
32 Paradis V, Degos F, Dargere D, Pham N, Belghiti J, Degott C, Janeau JL, Bezeaud A, Delforge D, Cubizolles M, Laurendeau I, Bedossa P. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2005; 41: 40-47
33 Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003; 49: 752-760
34 Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Chen DS, Yu CY, Wen CL, Lu FJ, Chow LP. Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV-related hepatocellular carcinoma using a proteomics

■同行评价

本文内容全面, 可读性较强, 但各部分内容之间缺少有机的联系.

approach. *Proteomics* 2006; 6: 2865-2873
35 Yang MH, Tyan YC, Jong SB, Huang YF, Liao PC, Wang MC. Identification of human hepatocellular carcinoma-related proteins by proteomic approaches. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388: 637-643
36 Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G, Thar TT, Barget N, Wei W, Billingham LJ, Martin A, Beaugrand M, Johnson PJ. Changes in the serum proteome associated with the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-related cirrhosis. *Br J Cancer* 2006; 94: 287-292
37 Zinkin NT, Grall F, Bhaskar K, Otu HH, Spentzos D, Kalmowitz B, Wells M, Guerrero M, Asara JM, Libermann TA, Afdhal NH. Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 470-477
38 Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Brechot C, Hanash SM, Beretta L. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 197-203
39 Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Harada T, Fujimoto M, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic analysis of autoantibodies in patients with hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2006; 6: 3894-3900
40 Hunt SM, Thomas MR, Sebastian LT, Pedersen SK, Harcourt RL, Sloane AJ, Wilkins MR. Optimal replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics. *J Proteome Res* 2005; 4: 809-819
41 Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, Warunek DJ, Yi J, Schuchard MD, Mehigh RJ, Cockrill SL, Scott GB, Tammen H, Schulz-Knappe P, Speicher DW, Vitzthum F, Haab BB, Siest G, Chan DW. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics* 2005; 5: 3262-3277

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代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)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出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、补充或删节时, 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 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2493-2496
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

巨噬细胞与急性胰腺炎关系的研究进展

党胜春, 张建新

党胜春, 张建新, 江苏大学附属医院普外科 江苏省镇江市 212001
国家自然科学基金资助项目, No. 30772117
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2007097
作者贡献分布: 党胜春与张建新对此文所作贡献均等; 与本综述相关课题由党胜春与张建新设计; 本文写作由党胜春完成; 文献采集归纳由党胜春完成; 修改和审校由张建新完成.
通讯作者: 张建新, 212001, 江苏省镇江市解放北路438号, 江苏大学附属医院普外科. zhangjx@ujs.edu.cn
电话: 0511-85026310 传真: 0511-85038661
收稿日期: 2007-10-13 修回日期: 2008-07-08
接受日期: 2008-07-16 在线出版日期: 2008-08-08

Advances in the relationship between macrophage and acute pancreatitis

Sheng-Chun Dang, Jian-Xin Zhang

Sheng-Chun Dang, Jian-Xin Zhang, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772117; and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2007097
Correspondence to: Jian-Xin Zhang, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zhangjx@ujs.edu.cn
Received: 2007-10-13 Revised: 2008-07-08
Accepted: 2008-07-16 Published online: 2008-08-08

Abstract
Acute pancreatitis (AP) has seriously endangered the life and health of human beings, and it is often accompanied with systemic inflammatory response syndrome (SIRS), serious infections, septic shock and multiple organ dysfunction syndrome, which lead to death of patients. With the deep study on the pathogenesis of AP mechanism, it is demonstrated that macrophages play an important role in antigen presentation-activated immune responses of AP patients. This paper reviews the progress in the relationship between macrophages and acute pancreatitis.

Key Words: Macrophage; Acute pancreatitis; Pancreas

Dang SC, Zhang JX. Advances in the relationship between macrophage and acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2493-2496

摘要
急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)已严重危及人类的生命健康, 其后期常出现全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、严重感染、感染性休克及多器官功能障碍综合征, 导致死亡. 随着对AP发病机制研究的不断深入, 巨噬细胞在急性胰腺炎时抗原递呈激活免疫反应中起重要的作用. 本文就巨噬细胞与急性胰腺炎关系的研究进展作一综述.

关键词: 急性胰腺炎; 巨噬细胞; 胰腺

党胜春, 张建新. 巨噬细胞与急性胰腺炎关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2493-2496
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2493.asp

0 引言
重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)已严重危及人类生命, 是当前临床治疗的难症之一, 其病死率仍高达30%[1]. 近年来细胞因子在SAP发病机制中的作用受到广泛关注和重视, 并提出阻断细胞因子的恶性循环以提高SAP治愈率的新目标, 粒细胞过度激活, 体内促炎/抗炎自稳机制的持续性失衡是导致SAP发展的中心环节[2]. 目前国内外采用的治疗手段如抑制胰酶、药物免疫治疗(如抗内毒素单抗、IL-1受体拮抗剂及TNF-α受体拮抗剂)等, 尽管能够改善临床症状, 但都不能根本逆转其已存在的结构改变[3-4]. 在SAP的治疗上, 国内外尚无重大突破. 越来越多的研究表明[5-6], 全身促炎性细胞因子的过度释放是SAP局部和全身病情恶化的主导因素. 巨噬细胞的浸润与激活是SAP发展的最初事件的启动因子[7], 同时也是产生多器官功能衰竭的一个重要病理生理步骤. 针对巨噬细胞的细胞水平的治疗由此成为热点, 调整巨噬细胞的功能成为SAP治疗的新研究方向.

近年来大量的研究表明, SAP时损伤的胰腺组织作为炎症刺激物激活巨噬细胞等炎症细胞, 释放大量细胞因子, 从而触发炎症介质瀑布样

■背景资料
急性胰腺炎已严重危及人类的生命健康, 其后期常出现全身性炎症反应综合征、严重感染、感染性休克及多器官功能障碍综合征, 导致死亡. 随着对AP发病机制研究的不断深入, 巨噬细胞在急性胰腺炎时抗原递呈激活免疫反应中起重要的作用.

■同行评议者
杨维良, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科; 吴健雄, 教授, 中国医学科学院中国协和医科大肿瘤研究所肿瘤医院腹部外科

■研发前沿
本文总结了近年来国内外关于巨噬细胞在急性胰腺炎中的关系研究情况, 提出基于巨噬细胞治疗急性胰腺炎的可能性.

级联反应, 引起胰外器官的损伤. TNF-α、IL-1β和血小板活化因子等细胞因子的大量产生和释放是SAP从胰腺局部病变迅速发展为全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征的关键所在[8-9].

1 胰腺巨噬细胞与SAP

SAP是从胰腺局部病变进展而来的全身性炎症反应过程, 巨噬细胞在炎症反应中发挥重要作用, 其产生的多种细胞因子和炎症介质是炎症反应发生、发展、协调与消散的内在机制. 这种炎症过程造成的微环境变化, 使得胰腺对损伤性刺激更为敏感. 抑制胰腺巨噬细胞的活化能够增强胰腺对损伤因素的抵抗力, 不仅能够改善胰腺本身的病理损害并在一定程度上改善预后. SAP早期炎症反应主要与胰腺实质、胰周浸润的巨噬细胞有关, 最终将导致多器官功能衰竭[10]. SAP发病时, 病变胰腺组织作为抗原或炎症刺激物激活巨噬细胞释放大量的细胞因子, 从而触发炎症介质瀑布样级联反应, 引起胰外器官的损伤[11]. 当机体发生AP时, 浸润到胰腺的中性粒细胞和单核巨噬细胞产生促炎细胞因子, 如TNF-α, IL-1等[12], 而且存在着从胰腺到外周组织由高到低浓度的梯度分布[13]. Hughes *et al*[14]用无菌鼠证实了AP时TNF-α升高与内毒素无关, 推断TNF-α在AP的发病机制中起着始动作用. Van Laethem *et al*[15]在用蛙皮素诱导的小鼠AP中发现, IL-10通过抑制活化的巨噬细胞释放TNF-α, 从而下调ICAM-1和VCAM-1的表达以及控制IL-1和IL-8的释放, 进而抑制白细胞的趋化以及白细胞和内皮细胞的黏附, 减轻AP早期的炎症反应. 巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种重要的前炎症因子, 能促使巨噬细胞在炎症局部的聚集、增生、活化, 增强其黏附、吞噬作用, 并能促进多种致炎细胞因子的生成, 抵消糖皮质类固醇激素的免疫抑制作用, 是全身性炎症反应综合征中的关键介质. MIF在急性重症胰腺炎发病中起着重要的作用, Sakai *et al*[16]的研究提示, 在SAP的发生发展中, 患者血清巨噬细胞移动抑制因子水平明显升高, 抗-MIF抗体能降低实验性SAP大鼠的死亡率.

2 腹腔巨噬细胞与SAP

腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophages, PM)因为其本身的功能特点和位置关系, 可能在SAP所致SIRS或多器官功能衰竭的发生、发展中扮演重要角色. 腹腔中(胰腺周围, 大网膜, 腹膜)常驻巨噬细胞占全身单核/巨噬细胞总数的大约8%, 对腹腔炎症反应和免疫防御功能有重要作用. Ma *et al*[17]研究发现, 使用白藜芦醇(resveratrol)后可以减少体外培养的PM的NF-kappa与iNOS的表达, 减少培养基与血清TNF-α, IL-1与NO的水平. 活体实验也证实, 干预巨噬细胞可以减轻胰腺炎的严重程度. PM可以通过分泌大量的TNF-α和IL-1β等细胞因子影响SAP的严重程度[11]. Shifrin *et al*[7]研究表明, 在SAP时, 巨噬细胞分泌的促炎细胞触发胰腺局部及全身的炎症反应, 使用氯膦酸二钠(clodronate)脂质体使小鼠体内的巨噬细胞衰竭后, 胰腺局部及全身的炎症反应明显减轻, 而对其他细胞无影响. Mikami *et al*[18]使用该脂质体使小鼠体内的PM衰竭后, 发现其可以减轻胰腺局部、腹腔以及肺部炎症反应, 提示PMA对于全身炎症反应综合征的发生和发展具有重要的作用.

3 肺巨噬细胞与SAP

肺脏是SAP时胰外器官中最容易受到损害的器官, 其功能变化对疾病预后的影响也最明显. SAP肺损伤及其随后发生的ARDS往往SAP多器官功能衰竭始发器官也是主要的累及器官. 巨噬细胞在胰腺里是正常的常驻细胞, 而在急性胰腺炎中, 他们可以将局部的炎症向远处的器官播散. Gloor *et al*[19]通过使用钆来阻断巨噬细胞活性的研究发现, 胰腺炎的严重程度并未发生改变, 而与胰腺炎相关的肺损伤却有所下降. Cheng *et al*[20-22]在AP合并肺损伤的大鼠模型使用$GdCl_3$使肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM)凋亡, 明显减轻肺损伤. 观察SAP大鼠AM功能变化时发现, 诱导SAP后AM分泌TNF-α和一氧化氮逐渐增加. 同时, 肺泡巨噬细胞TNF-α mRNA和诱生型一氧化氮合酶mRNA的表达与TNF-α和一氧化氮的变化趋势相同, AM活化可能在SAP肺损伤中起重要作用. 研究表明, 除了AM外, 肝巨噬细胞的激活也参与了SAP时肺损伤[23]. 调整MIF对AP相关性肺损伤有保护作用, 间接表明AM在肺损伤中具有重要的作用[24].

4 肝巨噬细胞与SAP

肝脏是人体最大的巨噬细胞储库, 在SAP全身反应中的作用是比较独特的. 实验证实, 枯否氏细胞(kupffer cell)产生的TNF-α, IL-1β等细胞因子是导致肝细胞损伤和肝脏功能障碍的直接原因[25-26]. 阻止肝巨噬细胞TNF-α, IL-1β的产生可以减轻肝的损伤[27]. 目前越来越多的研究表明,

SAP发生时的肝细胞凋亡可能是导致肝功能衰竭的重要原因[28-32]. TNF-α等细胞因子在细胞凋亡中的作用已较明确, 但SAP发生时尚存在一些特异性的凋亡机制. Hori *et al*[33]研究发现, SAP发生时巨噬细胞来源的转化生长因子β1(TGF-β1)是诱导肝细胞凋亡的主要原因之.

5 结论

SAP的发病过程异常复杂, 巨噬细胞及其分泌的细胞因子在其发生、发展的进程中具有很重要的作用. 针对巨噬细胞的靶向治疗研究是当今医学的前沿课题, 困扰其临床应用的一个难点是在各系统的不同病理、生理条件下, 如何对巨噬细胞的功能状态进行监测. 目前对巨噬细胞的研究目前多为在一定时间内处死实验动物, 对组织进行切片等检查. 而这些侵袭性的方法, 不能对巨噬细胞在同一动物体内的迁徙增殖情况进行动态的观察, 故需要非侵袭的手段来对体内的巨噬细胞进行监测.

6 参考文献

1 Takeda K, Mikami Y, Fukuyama S, Egawa S, Sunamura M, Ishibashi T, Sato A, Masamune A, Matsuno S. Pancreatic ischemia associated with vasospasm in the early phase of human acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2005; 30: 40-49

2 Hirota M, Sugita H, Maeda K, Ichibara A, Ogawa M. [Concept of SIRS and severe acute pancreatitis] *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2128-2136

3 Masamune A, Shimosegawa T. [Anti-cytokine therapy for severe acute pancreatitis] *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2116-2121

4 Folch E, Serrano A, Sabater L, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Closa D. Soluble receptors released during acute pancreatitis interfere with the detection of tumor necrosis factor-alpha. *Crit Care Med* 2001; 29: 1023-1026

5 Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. *J Pathol* 2007; 211: 383-388

6 Takei M, Kobayashi M, Herndon DN, Pollard RB, Suzuki F. Glycyrrhizin inhibits the manifestations of anti-inflammatory responses that appear in association with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions. *Cytokine* 2006; 35: 295-301

7 Shifrin AL, Chirmule N, Zhang Y, Raper SE. Macrophage ablation attenuates adenoviral vector-induced pancreatitis. *Surgery* 2005; 137: 545-551

8 Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4693-4696

9 邓伟, 梁力建. 血管生成素及受体和VEGF在人肝细胞癌组织中的表达及作用. 中国现代医学杂志 2005; 15: 1297-1300

10 Sharif S, Broman M, Babcock T, Ong E, Jho D, Rudnicki M, Helton WS, Espat NJ. A priori dietary omega-3 lipid supplementation results in local pancreatic macrophage and pulmonary inflammatory response attenuation in a model of experimental acute edematous pancreatitis (AEP). *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 271-276

11 马振华, 马清涌, 沙焕臣, 王连才, 张梅. 腹腔巨噬细胞在大鼠重症急性胰腺炎发病机制中的作用. 西安交通大学学报(医学版) 2006; 27: 590-592, 601

12 李红光, 周总光, 雷松, 朱林, 郑雪莲, 张鸿彦, 王永, 张建成. 人急性胰腺炎早期外周血单核细胞Toll样受体4表达变化. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 197-200

13 Dugernier TL, Laterre PF, Wittebole X, Roeseler J, Latinne D, Reynaert MS, Pugin J. Compartmentalization of the inflammatory response during acute pancreatitis: correlation with local and systemic complications. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 148-157

14 Hughes CB, Gaber LW, Kotb M, Mohey el-Din AB, Pabst M, Gaber AO. Induction of acute pancreatitis in germ-free rats: evidence of a primary role for tumor necrosis factor-alpha. *Surgery* 1995; 117: 201-205

15 Van Laethem JL, Eskinazi R, Louis H, Rickaert F, Robberecht P, Devière J. Multisystemic production of interleukin 10 limits the severity of acute pancreatitis in mice. *Gut* 1998; 43: 408-413

16 Sakai Y, Masamune A, Satoh A, Nishihira J, Yamagiwa T, Shimosegawa T. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 725-736

17 Ma ZH, Ma QY, Wang LC, Sha HC, Wu SL, Zhang M. Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res* 2005; 54: 522-527

18 Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, Qiu-Feng H, Shimamura H, Yamauchi J, Egawa S, Sunamura M, Yagi H, Endo Y, Matsuno S. Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats? *Pancreas* 2003; 27: 253-260

19 Gloor B, Todd KE, Lane JS, Lewis MP, Reber HA. Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 430-435

20 Cheng S, Song MM, Li ZH, He SG. [The protective role of gadolinium chloride in lung injury associated with acute necrotizing pancreatitis] *Zhonghua Waike Zazhi* 2004; 42: 936-939

21 Cheng S, Zhao J, He SG, Song MM, Li ZH, Zhang YW. [The role of nitric oxide in lung injury associated with acute necrotizing pancreatitis] *Zhonghua Waike Zazhi* 2003; 41: 336-339

22 Cheng S, He S, Zhang J. [The role of alveolar macrophage activation in rats with lung injury associated with acute necrotizing pancreatitis] *Zhonghua Waike Zazhi* 2002; 40: 609-612

23 Closa D, Sabater L, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Ann Surg* 1999; 229: 230-236

24 Matsuda N, Nishihira J, Takahashi Y, Kemmotsu O, Hattori Y. Role of macrophage migration inhibitory factor in acute lung injury in mice with acute pancreatitis complicated by endotoxemia. *Am J*

■相关报道

在急性胰腺炎的治疗上, 国内外尚无重大突破. 越来越多的研究表明, 全身促炎性细胞因子的过度释放是SAP局部和全身病情恶化的主导因素. 巨噬细胞的浸润与激活是急性胰腺炎发展的最初事件的启动因子, 同时也是产生多器官功能衰竭的一个重要病理生理步骤.

■同行评价
本文提供了近年来基础研究的新进展, 为临床实践提供了一些有参考价值的研究方向.

Respir Cell Mol Biol 2006; 35: 198-205
25 Liu HB, Cui NQ, Li DH, Chen C. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated lung injury of rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 403-407
26 Pastor CM, Vonlaufen A, Georgi F, Hadengue A, Morel P, Frossard JL. Neutrophil depletion--but not prevention of Kupffer cell activation--decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1219-1224
27 Yang J, Denham W, Carter G, Tracey KJ, Norman J. Macrophage pacification reduces rodent pancreatitis-induced hepatocellular injury through down-regulation of hepatic tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta. *Hepatology* 1998; 28: 1282-1288
28 Wang X, Zhao X, Shi C, Börjesson A, Chen Z, Axelsson J, Zhao H, Andersson R. Potential mechanisms and significance of acute pancreatitis-associated liver injury. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 604-613
29 Peng Y, Gallagher SF, Haines K, Baksh K, Murr MM. Nuclear factor-kappaB mediates Kupffer cell apoptosis through transcriptional activation of Fas/FasL. *J Surg Res* 2006; 130: 58-65
30 Peng Y, Sigua CA, Gallagher SF, Murr MM. Protein kinase C-zeta is critical in pancreatitis-induced apoptosis of Kupffer cells. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 1253-1261
31 Gallagher SF, Peng Y, Haines K, Baksh K, Epling-Burnette PK, Yang J, Murr MM. Fas/FasL play a central role in pancreatitis-induced hepatocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 467-474; discussion 474-475
32 Yang J, Gallagher SF, Haines K, Epling-Burnette PK, Bai F, Gower WR Jr, Mastorides S, Norman JG, Murr MM. Kupffer cell-derived Fas ligand plays a role in liver injury and hepatocyte death. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 166-174
33 Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y. Macrophage-derived transforming growth factor-beta1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rat severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000; 127: 641-649

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 •

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2497-2502
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

炎症性肠病治疗新策略

蒋 巍, 张顺财

蒋巍, 张顺财, 复旦大学附属中山医院消化内科 上海市 200032
作者贡献分布: 本文由蒋巍综述, 张顺财审校.
通讯作者: 张顺财, 200032, 上海市, 复旦大学附属中山医院消化内科. doctorzhangsc@163.com
电话: 021-64041990-2424
收稿日期: 2008-05-17 修回日期: 2008-06-20
接受日期: 2008-06-30 在线出版日期: 2008-08-08

New strategies in therapy for inflammatory bowel disease

Wei Jiang, Shun-Cai Zhang

Wei Jiang, Shun-Cai Zhang, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China
Correspondence to: Shun-Cai Zhang, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China. doctorzhangsc@163.com
Received: 2008-05-17 Revised: 2008-06-20
Accepted: 2008-06-30 Published online: 2008-08-08

Abstract
Conventional drug therapy for inflammatory bowel disease (IBD) has some limitations. The impressive results of new biological agents in the treatment of patients who were refractory to standard therapy have led to a clinical debate about "step-up versus top-down strategy". Recent studies in newly diagnosed patients of refractory Crohn's disease have shown that early administration of infliximab with azathioprine (top-down therapy) is superior to conventional "step-up" therapy in induction and maintenance of remission, mucosal healing and so on, which may mean to modify the natural history of disease. However, several factors confine the use of biological agents as first-line therapy for IBD patients. Recent debates are focusing on where biologics should be positioned within the current treatment strategies so as to maximize efficacy while balance risk.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Biological agents; Step-up therapy; Top-down therapy; Natural history

Jiang W, Zhang SC. New strategies in therapy for inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2497-2502

摘要
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的传统药物治疗存在很大的局限性.生物制剂带来的令人振奋的效果, 引发了一场上阶梯(step-up)和下阶梯(top-down)治疗策略之间的较量. 针对新发的难治性克罗恩病(crohn's disease, CD)患者, 最新研究显示, 下阶梯(top-down)治疗较目前标准治疗在诱导和维持疾病缓解、促进黏膜愈合等方面均有明显优势, 其可能改变疾病的自然病史. 然而, 仍有一些因素限制生物制剂作为一线治疗用于IBD患者. 目前, 如何摆放生物治疗的地位以获取最佳效益风险比成为IBD治疗的争论焦点.

关键词: 炎症性肠病; 生物制剂; 上阶梯治疗; 下阶梯治疗; 自然病史

蒋巍, 张顺财. 炎症性肠病治疗新策略. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2497-2502
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2497.asp

■背景资料
炎症性肠病的传统治疗存在很大局限性, 而抗肿瘤坏死因子α等生物制剂的相继问世, 不仅提供了新的治疗选择, 更是在治疗模式上带给人类新的启发.

0 引言
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类病因尚不十分明确的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(crohn's disease, CD). 该病的发病率及患病率在全球均报道有继续增加. 过去10年间, 随着抗肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor alpha, TNF-α)mAb等生物制剂的问世, 带给IBD患者更多崭新而有效的治疗选择. 同时, 改变疾病的自然病史、最大限度地提高生活质量逐渐成为IBD的最终治疗目标. 经典的"上阶梯(step-up)"即金字塔型治疗模式在过去一直为IBD专家们所推荐. 但最近, 一种颠覆传统的"下阶梯(top-down)"即倒金字塔型治疗策略的提出引起了广泛关注. "如何摆放生物治疗的地位以获取最佳效益风险比"成为了目前IBD治疗的争论焦点. 本文就此方面进展作一简要介绍.

■同行评议者
任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

■研发前沿
“下阶梯”治疗策略有可能改变炎症性肠病的自然病史. 而如何摆放生物治疗的地位以获取最佳效益风险比成了目前炎症性肠病治疗中的争论焦点.

1 传统治疗策略及其局限性

传统的IBD治疗策略, 是根据对病变范围、严重程度、病程分期和并发症的评估, 同时引入疾病活动指数(DAI), 采用建立在氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂和生物制剂基础上的金字塔型治疗方案. 这种渐进式的治疗模式在过去一直为IBD专家们所推荐, 然而这其中存在很大的局限性.

5-氨基水杨酸(5-ASA)和柳氮磺胺吡啶(SASP)被认为是UC的治疗支柱, 但对CD患者却不能有效地维持缓解[1].

对大部分活动期的IBD, 皮质类固醇能快速有效地诱导缓解, 但对维持缓解却缺乏功效; 况且长期使用激素还会导致骨质疏松、糖尿病、高血压等毒副作用. 虽然人群研究发现少于50%的患者需终身使用皮质类固醇治疗, 但在基于医院的研究中发现: 尽管接受正规的传统内科治疗, 疾病却仍在进展, 其中以并发症的出现最为常见[1]. 另外, 当患者逐渐出现对激素无反应或依赖时, 便需免疫抑制剂介入作为辅助治疗, 而这些患者中, 一年累积手术率在CD和重度UC分别达到36%和28%[1].

另有证据显示, 皮质类固醇能通过干扰免疫细胞凋亡从而打破机体的免疫耐受, 即所谓的“皮质类固醇诱导的耐受缺失”. 回顾Crohn's病的发生机制, T淋巴细胞凋亡缺陷所致的自身免疫耐受缺失在其中扮演了相当重要的角色. 然而, 治疗剂量的皮质类固醇在作用于活动期靶细胞的同时, 亦能对T淋巴细胞的凋亡起抑制作用. 这将使Crohn's病的远期炎症进程复杂化[2]. 因此也给临床工作带来了质疑: 将皮质类固醇作为一线治疗是否恰当?

硫唑嘌呤(AZA)和6-巯基嘌呤(6-MP)对CD和UC的诱导和维持缓解均有效, 但由于显效慢及一些潜在的副作用限制了该类药物的使用[1-2]. 而对MTX肌注有应答的活动性CD, MTX亦能有效维持缓解; 他还适用于对AZA/6-MP治疗不耐受或失败者[3]. 而尽管将免疫抑制剂用于对激素无反应的患者看似合理, 但目前仍缺乏对其长期预后的跟踪调查[1]. 基于各研究的异质性(对人群的设定、疾病复发的定义以及免疫抑制剂适应症和手术指征存在差异), 确诊CD后的首个15年内需行手术的概率在38%-96%范围之间[4].

少数由infliximab(IFX)诱导缓解的CD住院患者(包括部分已打算行手术治疗者), 将IFX用于维持缓解同样有效[5]. 但在大多数的指南中, IFX仍是被推荐作为术前最末的药物治疗措施.

总之, 传统治疗虽在一定程度上改善部分IBD患者的生存质量, 但仍有相当部分患者存在治疗困难, 并且传统治疗策略似乎无法改变疾病的自然病史.

2 治疗目标

过去10年间, 随着生物制剂的问世, 带给IBD患者更多崭新而有效的治疗选择. 医患双方也不再仅仅满足于疾病症状的改善. 目前内科医师们正通过各种治疗渠道, 设法在避免激素使用下诱导IBD临床缓解, 并维持缓解, 促进黏膜修复, 减少复发, 防治并发症, 降低手术率, 最大限度地提高生活质量. 对儿童患者而言, 还应促进其生长发育.

这便涉及如何评估病情的问题. UC的评估相对简单, 他的活动几乎总与腹泻或血便相关, 而且通过肠镜即能较容易地明确病变; 然而由于CD表现存在多异性, 他的评估就复杂的多. 因而临床工作中, 多数医生仍按患者主诉来判断CD病情, 这与生化指标或内镜下改变的相关性较差. 在临床试验中, CDAI(Crohn's病活动指数)常被用作衡量指标, 但CDAI亦主要以症状为参数, 他与内镜下和组织学改变相关性亦较弱[6]. 可惜, 目前对CD临床和内镜下缓解尚缺乏明确的定义.

近年来, 改变疾病的自然病史已逐渐成为IBD治疗的最终目标. 临床研究中, 内镜结果对于功效判断显得日益重要, 综合黏膜修复、住院和手术需求等指标被认为可用来评判IBD自然病史的改变[7]. Vermeire *et al*[7]就“目前常用治疗措施能否改变CD自然病史”的问题对一些临床研究结果进行了总结(表1). 也有越来越多的研究证实IFX能够促进黏膜修复, 而这与住院率和手术率的减少密切相关[8-9]. 可惜, 至今尚无研究报道IFX治疗达到的肠黏膜病变愈合与CD自然病史的相关性.

3 生物制剂

3.1 IFX 生物制剂问世之前, 大多数对传统治疗无效的Crohn's病患者最终需行手术治疗, 然而即使切除所有临床上明显的病损, CD还可能复发. 一种人-鼠嵌合抗TNF-α单克隆IgG1抗体的出现, 打破了这个局面. 1998年起, IFX(Remicade®)就获FDA批准用于对常规治疗无效的成人活动性中重度CD及合并瘘管者. ACCENT[10-11]等多项临床研究证实: 对活动性CD, IFX能迅速修复黏膜, 发挥激素助减剂作用, 并能促使瘘管(包括肛瘘、皮瘘或直肠阴道瘘)

闭合; 而对由IFX诱导缓解者继以每隔8 wk 1次的持续给药, 亦能有效维持缓解. 一项随机对照开放式Ⅲ期试验REACH[12]显示, IFX用于治疗儿童中重度CD的有效和安全性与成人相当. 基于该研究结果, 2006年FDA批准IFX用于儿童CD的治疗, 2007年此扩大适应证亦在欧盟(EU)获准. ACT两项大型临床试验[13]证实IFX对常规治疗无效的活动性UC同样有效, 并有短期的维持缓解功效. 但在疗效长期维持方面, 目前尚缺乏相关资料. 甚至为避免结肠切除, 把IFX作为急性中重度 UC的补救治疗, 也看似有效[14]. 因而2005-09/2006-03, IFX又先后获FDA和EU批准用于治疗中重度UC. 然而对于UC, 手术是一种较为有效的治疗手段, 而且多数患者对5-ASAs类药反应较好, 因此Datamonitor(著名的市场调研公司)预期生物制剂在UC治疗领域不会有很大的成绩. 另有一些临床研究显示IFX对改善IBD引发的肠外表现同样有效, 如坏疽性脓皮病、葡萄膜炎、关节炎等[15].

由于生物制剂在IBD治疗中的独特疗效, 其应用安全性问题因而备受关注. IFX使用已近10年, 从上市前的临床试验到上市后世界范围的临床研究、药物不良反应监测和登记[16]、案例报告等资料的积累, 对其不良反应的认识逐步加深. 一方面, IFX具有免疫原性, 中和抗体的产生可引起输液反应、迟发的血清病样反应和疗效降低. 另一方面, IFX的严重不良反应主要包括机会性感染(尤其结核)、淋巴瘤和加重已存在的充血性心力衰竭等. 我国属结核病高发国家, 相关的筛查、监测和防治工作应更为严格. 但一项多因素Logistic回归分析显示, 是否使用IFX在死亡、严重感染及恶性肿瘤的发生率上不存在显著差异[17]. 换言之, 目前尚无证据表明用IFX治疗会增加恶性事件的发生率.

15年来IFX进行了各项临床试验, 期间全球也已有将近92.5万人使用该药进行治疗, 他在治疗各适应证时的安全性和疗效已得到了很好的证实. 获国家食品药品监督管理局批准, 2007-09-01起, IFX(类克®)也正式在中国上市.

3.2 其他生物制剂 近两年来, 一些新型的生物制剂也开始进入临床或正在进行早期试验. 对CD而言, 其中完全人源化的抗TNF-α单克隆IgG1抗体-Adalimumab(Humira®), 人源化的抗TNF mAb Fab片段-Certolizumab-pegol(Cimzia®)以及人源化的抗α4整合素IgG4抗体-Natalizumab(Tysabri®), 在对照试验结果中显得最具前途[18].

表 1 不同治疗措施对Crohn's病自然病史的影响

	黏膜修复	降低手术需求	减少术后复发
糖皮质激素	否	否	否
硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤	是	否	是[1]
甲氨蝶呤	是	否	未知
肠内营养	是	否	是
IFX	是[1]	是[1]	未知

[1]随机对照研究.

Adalimumab是完全人源化的自身给药型生物制剂, 即使是对IFX抵抗或不耐受的患者, 亦显示出了良好的功效和安全性. 因此, 2007年初Humira已被FDA批准用于成人难治性和/或对IFX抵抗或不能耐受的中重度CD的治疗, 他可减轻患者的症状体征并能有效地诱导和维持缓解.

Certolizumab-pegol具有较弱的免疫原性, 他不会诱导补体激活、抗体依赖的细胞毒作用或者T细胞/单核细胞的凋亡. PRECISE试验[19-20]证实了他在中重度CD治疗中的安全性和功效. 2008-04 Cimzia最新通过美国FDA批准用于CD的治疗, 但同时被告知应警惕他的一些严重副作用包括严重感染、可能引发淋巴瘤等. 远期安全性评价有待进一步的跟踪研究.

在起抑制淋巴细胞聚集、迁移作用的抗黏附分子抗体(包括Natalizumab, MLN-02, alicaforsen)中, Natalizumab显得最为有效[21], 但由于出现严重的脑部并发症-进行性多灶性白质脑病(PML), Tysabri®曾一度撤市. 虽然目前FDA已认可Tysabri用于其他药物治疗失败或耐受性差的成人中重度CD患者, 但欧洲人用药委员会对此仍表示拒绝. 出于对PML是一种高致命的脑部感染的考虑, 使用担忧仍然存在.

另外, IL12/干扰素γ抑制剂亦表现出不错的治疗潜能[18]. 对于重度UC, 除IFX外, 抗T细胞CD3 mAb-Visilizumab(Nuvion®)的出现初始也带来不少惊喜, 但RESTORE试验结果却令人失望, 与单用静脉激素相比, Visilizumab在难治性UC治疗中未显示充分的功效及较好的安全性, 因而Ⅲ期临床试验将不再进行. 其他的生物制剂如干扰素α/β抑制剂、IL2受体抑制剂、生长激素(GH)、表皮生长因子(EGF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等也在进行试验评估, 但效果可能不及上述药物.

■创新盘点
本文从炎症性肠病传统治疗的局限性入手, 从而提出疾病的治疗目标, 并对目前较热门的生物制剂作了简介及特点比较, 最后在现有研究基础上对新型治疗策略的有效性和可行性进行了阐述、分析与展望.

■应用要点
本文不仅给炎症性肠病的治疗提供参考, 并对该领域新兴的研究热点作了阐述, 对临床和科研均有重要的指导意义.

4 Top-down治疗策略

早在1997年, 就有研究证实, 与SASP单一治疗相比, 强化的联合治疗(包括SASP、MTX和大剂量泼尼松龙)用于早期类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA), 能更有效地抑制关节损害加重, 控制病情发展, 而且在激素停用后作用持续长达1年[22]. 此后又有报道, 早期联用TNF拮抗剂和MTX治疗RA, 比任选二者之一单药治疗, 能获取更佳的疗效[23-24]. 更有意义的是, TNF拮抗剂的早期介入可能改变RA的自然病程[25].

Crohn's病的主流治疗策略是经典的“上阶梯(Step-up)”方案-治疗从5-氨基水杨酸开始, 经过抗生素和类固醇向免疫抑制剂逐步推进, 最后采用抗TNF-α治疗. 由于IBD与RA在发生机制上有着多处相似, 因而, RA治疗策略上的发展启发了IBD专家们将类似研究用于CD, 挑战传统的治疗策略.

一些小型的回顾性研究显示, 若初始就将免疫调节治疗用于儿童CD患者, 会取得更好的效果. 例如早期使用IFX或AZA均显示能延长缓解期的维持[26-27]; 将6-MP与糖皮质激素合用治疗新发的儿童中重度CD, 能更长地维持缓解, 并且6-MP发挥出激素助减剂的作用[28].

最近, 学术界更兴起了一股对被称作为“下阶梯(Top-down)”治疗策略的研究热潮. 该策略建立在早期应用生物制剂(抗TNF-α)和免疫抑制剂的基础上. 研究人员认为, 这可能在Crohn's病病程早期就使患者获得更好的效果, 并且有可能延迟或阻止疾病的进展.

一项多中心随机对照研究[29-30]对133例较早期(病程在4年以内)的中至重度活动性Crohn's病患者进行了“上阶梯(Step-up)”与“下阶梯(Top-down)”治疗策略的作用比较. 入选者必须从未接受过皮质类固醇、免疫抑制剂或生物制剂治疗. 方法: Step-up治疗组(n = 66): 首先予皮质类固醇诱导缓解, 若出现激素无效或依赖加予AZA治疗, 若仍无效最终予IFX治疗. Top-down治疗组(n = 67): 采用AZA 2-2.5 mg/(kg·d)和IFX(5 mg/kg)3次输注(分别于第0、2和6周)的治疗, 复发者给予重复IFX输注和皮质类固醇(对IFX无应答者)治疗. 研究结果显示, Top-down方案能更快更多地诱导缓解(缓解定义为CDAI<150分, 不需肠段切除及皮质类固醇的完全撤除), 更迟更少地出现复发(复发定义为CDAI>200分, 需行肠段切除或添加额外治疗). 26 wk时, Top-down组患者缓解率达60.0%, 而Step-up组仅为35.9%(P = 0.0062<0.01); 52 wk时相对的两组缓解率分别为61.5%和42.2%(P = 0.0278<0.05). 然这种作用差异在52 wk之后开始变小, 分析可能原因是Step-up组患者开始接受AZA和IFX治疗. 且52 wk时Step-up组仍有18.8%的患者接受皮质类固醇治疗, 而Top-down组却没有. 另外, 经14 wk成功诱导缓解的患者出现复发的中位时间在Top-down组为329.0 d, Step-up组为174.5 d(P = 0.031<0.05). 研究还发现[2]: 未接受任何治疗的患者几乎100%对IFX有应答, 而在先接受过皮质类固醇或免疫抑制剂的患者中仅为60%-70%; 并且Top-down组的瘘管控制情况优于Step-up组. 而在接受治疗的两年后, 49例患者(26例来自Top-down组/23例来自Step-up组)复查内镜发现, 肠道黏膜愈合在Top-down组更为显著. 溃疡完全消失者在Top-down组占73.1%, 而Step-up组仅为30.4%(P = 0.0028<0.01). 并且证实皮质类固醇对黏膜修复无效.安全性方面, 虽然Top-down组不良事件的发生(30.8%)较Step-up组(25.3%)更为多见, 但差异无统计学意义.

然而, 我们并不能就此推论出这究竟是IFX、AZA或是两者共同作用的结果. 因此, 正在进行的SONIC研究将评价并比较IFX、AZA以及两者合用在从未接受生物制剂和免疫抑制剂治疗的中重度CD患者中的功效. Sandborn最近表示[31], 已有初步证据显示初始即联用IFX和AZA治疗可能对早期CD有益. 而该研究有望在今年下半年完成.

目前, 仍存在一些因素限制了IFX等生物制剂作为一线治疗用于IBD患者. 首先, 流行病学调查显示超过50%的CD患者始终仅为轻度病变而从不需要激素或免疫调节剂等治疗手段[32], 因而, 冒着各种可能的风险, 盲目地将Top-down治疗策略用于这些患者, 将得不偿失. 况且, 生物制剂的远期安全性问题尚待进一步的研究证实. 另外, 如何识别高危患者、识别对生物制剂和免疫抑制剂具有高应答者是向我们提出的另一挑战. 虽然已有一些疾病特异性标志物被识别可用来预测疾病复发[33], 但要行个体化分析仍有困难. 而对于新发的IBD患者, 他们的病程发展将更难预知. 并且, IBD作为一类多显型、多基因、遗传异质性疾病, 影响因素多种多样, 这给Top-down治疗策略的研究及临床实践带来了很大的阻碍. 除此之外, 生物制剂的高成本也限制了他的推广使用.

5 结论

IBD的治疗正在进入免疫调节的生物学时代, 药物治疗尤其是生物制剂带来的疗效, 使研究者和临床医生们备受鼓舞, 因而, 对IBD的治疗提出了更高的目标. 相比传统治疗策略, 新近提出的“下阶梯”治疗策略在目前的研究中展现出一些优势, 并提示可能改变疾病的自然病史. 然而至今, 有关这种颠覆传统的倒金字塔治疗模式所带来的效益、风险和成本信息仍非常有限. 对“下阶梯”治疗策略的远期疗效和安全性评价以及对IBD自然病史改变的定义有待进一步的完善. 同时, 鉴于IBD的复杂性, 治疗策略间的长期比较或许更适合在同质人群中展开. 同时, 优化金字塔中其他治疗手段的摆放位置, 也可能在将来挖掘出一些治疗潜力. 最终, 这些研究成果将指导临床医生们做出个体化的治疗抉择, 以获取最佳效益风险比、最大限度地提高患者的生活质量.

6 参考文献

1 Oldenburg B, Hommes D. Biological therapies in inflammatory bowel disease: top-down or bottom-up? *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 395-399

2 Löwenberg M, Peppelenbosch M, Hommes D. Biological therapy in the management of recent-onset Crohn's disease: why, when and how? *Drugs* 2006; 66: 1431-1439

3 Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53 Suppl 5: V1-V16

4 Wolters FL, Russel MG, Stockbrügger RW. Systematic review: has disease outcome in Crohn's disease changed during the last four decades? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 483-496

5 Rutgeerts P, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Hanauer SB. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 402-413

6 Modigliani R, Mary JY, Simon JF, Cortot A, Soule JC, Gendre JP, Rene E. Clinical, biological, and endoscopic picture of attacks of Crohn's disease. Evolution on prednisolone. Groupe d'Etude Thérapeutique des Affections Inflammatoires Digestives. *Gastroenterology* 1990; 98: 811-818

7 Vermeire S, van Assche G, Rutgeerts P. Review article: Altering the natural history of Crohn's disease--evidence for and against current therapies. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 3-12

8 D'haens G, Van Deventer S, Van Hogezand R, Chalmers D, Kothe C, Baert F, Braakman T, Schaible T, Geboes K, Rutgeerts P. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. *Gastroenterology* 1999; 116: 1029-1034

9 Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M, Olson A, Lichtenstein GR, Bao W, Patel K, Wolf DC, Safdi M, Colombel JF, Lashner B, Hanauer SB. Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodic treatment for the healing of mucosal ulceration associated with Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 433-442; quiz 464

10 Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 1541-1549

11 Sands BE, Blank MA, Patel K, van Deventer SJ. Long-term treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease: response to infliximab in the ACCENT II Study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 912-920

12 Hyams J, Crandall W, Kugathasan S, Griffiths A, Olson A, Johanns J, Liu G, Travers S, Heuschkel R, Markowitz J, Cohen S, Winter H, Veereman-Wauters G, Ferry G, Baldassano R. Induction and maintenance infliximab therapy for the treatment of moderate-to-severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology* 2007; 132: 863-873; quiz 1165-1166

13 Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462-2476

14 Järnerot G, Hertervig E, Friis-Liby I, Blomquist L, Karlén P, Grännö C, Vilien M, Ström M, Danielsson A, Verbaan H, Hellström PM, Magnuson A, Curman B. Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 2005; 128: 1805-1811

15 Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. Review article: Infliximab therapy for inflammatory bowel disease--seven years on. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 451-463

16 Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Diamond RH, Chen DM, Pritchard ML, Sandborn WJ. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 621-630

17 Hanauer SB. Clinical perspectives in Crohn's disease. Turning traditional treatment strategies on their heads: current evidence for "step-up" versus "top-down". *Rev Gastroenterol Disord* 2007; 7 Suppl 2: S17-S22

18 van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P. Emerging biological treatments in inflammatory bowel diseases. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007; 53: 249-255

19 Sandborn WJ, Feagan BG, Stoinov S, Honiball PJ, Rutgeerts P, Mason D, Bloomfield R, Schreiber S. Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 228-238

20 Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen OØ, Hanauer SB, McColm J, Bloomfield R, Sandborn WJ; PRECISE 2 Study Investigators. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 239-250

21 Danese S, Semeraro S, Armuzzi A, Papa A, Gasbarrini A. Biological therapies for inflammatory bowel disease: research drives clinics. *Mini Rev Med Chem* 2006; 6: 771-784

22 Boers M, Verhoeven AC, Markusse HM, van de Laar

■同行评价

本文科学性、先进性均较好, 具有较好的可读性.

MA, Westhovens R, van Denderen JC, van Zeben D, Dijkmans BA, Peeters AJ, Jacobs P, van den Brink HR, Schouten HJ, van der Heijde DM, Boonen A, van der Linden S. Randomised comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *Lancet* 1997; 350: 309-318

23 St Clair EW, van der Heijde DM, Smolen JS, Maini RN, Bathon JM, Emery P, Keystone E, Schiff M, Kalden JR, Wang B, Dewoody K, Weiss R, Baker D. Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3432-3443

24 Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJ, Hazes JM, Zwinderman AH, Ronday HK, Han KH, Westedt ML, Gerards AH, van Groenendael JH, Lems WF, van Krugten MV, Breedveld FC, Dijkmans BA. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3381-3390

25 Breedveld FC, Emery P, Keystone E, Patel K, Furst DE, Kalden JR, St Clair EW, Weisman M, Smolen J, Lipsky PE, Maini RN. Infliximab in active early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 149-155

26 Jaspers GJ, Verkade HJ, Escher JC, de Ridder L, Taminiau JA, Rings EH. Azathioprine maintains first remission in newly diagnosed pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 831-836

27 Lionetti P, Bronzini F, Salvestrini C, Bascietto C, Canani RB, Dé Angelis GL, Guariso G, Martelossi S, Papadatou B, Barabino A. Response to infliximab is related to disease duration in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 425-431

28 Markowitz J, Grancher K, Kohn N, Lesser M, Daum F. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 895-902

29 Hommes DW, Baert F, van Assche G, Caenepeel F, Vergauwe P, Tuynman H, De Vos M, van Denventer S, Stitt L, Rutgeerts P, Feagan B, D'haens G. Management of recent onset Crohn's disease: a controlled randomized trial comparing step-up and top-down therapy. *Gastroenterology* 2005; 129: 371

30 D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, De Vos M, van Deventer S, Stitt L, Donner A, Vermeire S, Van de Mierop FJ, Coche JC, van der Woude J, Ochsenkühn T, van Bodegraven AA, Van Hootegem PP, Lambrecht GL, Mana F, Rutgeerts P, Feagan BG, Hommes D; Belgian Inflammatory Bowel Disease Research Group; North-Holland Gut Club. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 2008; 371: 660-667

31 Sandborn WJ. Initial combination therapy in early Crohn's disease. *Lancet* 2008; 371: 635-636

32 Baert F, Caprilli R, Angelucci E. Medical therapy for Crohn's disease: top-down or step-up? *Dig Dis* 2007; 25: 260-266

33 Wolters FL, Russel MG, Sijbrandij J, Ambergen T, Odes S, Riis L, Langholz E, Politi P, Qasim A, Koutroubakis I, Tsianos E, Vermeire S, Freitas J, van Zeijl G, Hoie O, Bernklev T, Beltrami M, Rodriguez D, Stockbrügger RW, Moum B. Phenotype at diagnosis predicts recurrence rates in Crohn's disease. *Gut* 2006; 55: 1124-1130

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 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2503-2506
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

槲皮素对食管癌细胞侵袭和中期生长因子基因表达的影响

钟锡明, 吴 莺, 范 钰

钟锡明, 吴莺, 范钰, 江苏大学附属人民医院肿瘤研究所化疗科 江苏省镇江市 212002
中国博士后基金资助项目, No. 2003033547
作者贡献分布: 钟锡明与范钰对此文所作贡献均等; 此课题由范钰设计; 研究过程由钟锡明及吴莺操作完成; 研究所用试剂及分析工具均由范钰及钟锡明提供; 数据分析由吴莺完成; 本论文写作由范钰完成.
通讯作者: 范钰, 212002, 江苏省镇江市, 江苏大学附属人民医院肿瘤研究所化疗科. yufanzh99@sina.com
电话: 0511-85797359 传真: 0511-85797359
收稿日期: 2008-04-22 修回日期: 2008-07-12
接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-08

Effects of Quercetin on invasion and midkine expression of human esophageal cancer cell

Xi-Ming Zhong, Ying Wu, Yu Fan

Xi-Ming Zhong, Ying Wu, Yu Fan, Department of Chemotherapy, Cancer Institute, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China
Supported by: China Post-doctoral Foundation, No. 2003033547
Correspondence to: Yu Fan, Cancer Institute, Department of Chemotherapy, Cancer Institute, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China. yufanzh99@sina.com
Received: 2008-04-22 Revised: 2008-07-12
Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To observe the effects of Quercetin on the invasion of human esophageal cancer cells, and to investigate the possible mechanism.

METHODS: Human esophageal cancer cell line EC109 was treated with different concentrations of Quercetin, and then the anchorage independence growth of EC109 cells was studied by colony formation in soft agar; the invasion ability of EC109 cells was determined by Boyden chamber, and the expression levels of midkine mRNA and protein were detected by real time RT-PCR and Western blot assay, respectively.

RESULTS: After Quercetin treatment, the malignant proliferation and invasive ability of EC109 cells were obviously decreased, which showed a dose-dependent manner (all $P < 0.05$). Meanwhile, Quercetin down-regulated the expression of midkine mRNA and protein in a dose- and time-dependent manner (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Quercetin can inhibit the invasion of EC109 cells by down-regulating midkine expression.

Key Words: Esophageal carcinoma; Quercetin; Invasion; Midkine; Western blot; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Zhong XM, Wu Y, Fan Y. Effects of Quercetin on invasion and midkine expression of human esophageal cancer cell. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2503-2506

摘要

目的: 观察中药提取物槲皮素对食管癌细胞侵袭的影响, 并探讨其可能机制.

方法: 采用不同浓度的槲皮素处理食管癌EC109细胞后, 以软琼脂集落培养试验检测癌细胞锚着不依赖性增殖, 以Boyden小室模型方法检测癌细胞侵袭能力, 采用荧光实时定量RT-PCR检测癌细胞中期因子(midkine, MK)基因mRNA水平, 以Western blot方法检测癌细胞MK基因蛋白水平变化.

结果: 食管癌EC109细胞经槲皮素处理后, 恶性增殖和侵袭能力均明显下降, 且呈剂量依赖性(均P<0.05). 槲皮素处理组MK基因mRNA和蛋白水平均明显下调, 且呈时间和浓度依赖性(均P<0.05).

结论: 槲皮素可明显抑制食管癌EC109细胞侵袭能力, 其机制可能与下调MK基因表达有关.

关键词: 食管肿瘤; 槲皮素; 侵袭; 中期生长因子; 免疫印迹; 逆转录-聚合酶链反应

钟锡明, 吴莺, 范钰. 槲皮素对食管癌细胞侵袭和中期生长因子基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2503-2506
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2503.asp

■背景资料
槲皮素是一种天然的黄酮类化合物, 广泛分布于蔬菜、水果及常见中草药之中. 已有研究发现, 槲皮素可抑制多种肿瘤细胞的增殖, 和某些肿瘤细胞的侵袭能力, 是颇具应用前景的抗癌药物之一, 但内在机制尚不清楚.

■同行评议者
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

■研发前沿
槲皮素(Que)可抑制多种肿瘤细胞的增殖及侵袭, 是颇具应用前景的抗癌药物之一, 但内在机制尚不清楚.

0 引言

槲皮素(quercetin, Que)是一种天然的黄酮类化合物, 广泛分布于蔬菜、水果及常见中草药之中. 已有研究发现, 槲皮素可抑制多种肿瘤细胞的增殖[1-2], 和某些肿瘤细胞的侵袭能力[3-6], 是颇具应用前景的抗癌药物之一, 但内在机制尚不清楚. 为此, 本研究采用Que处理食管癌EC109细胞, 观察了Que对癌细胞锚着不依赖性增殖、侵袭和中期生长因子(midkine, MK)基因表达的影响, 以探讨其抗癌机制.

1 材料和方法

1.1 材料 槲皮素, 购自Sigma公司, 用DMSO(二甲基亚砜)配成储液, -20℃冰箱保存. 试验时用1640培养基稀释, DMSO的最终浓度小于0.9%. 人食管癌细胞株EC109购自美国ATCC细胞库. TRIzol试剂购自Invitrogen公司. BCA蛋白分析试剂盒购自PiercE公司. MK和β-actin mAb, 购自Santa Cruz公司. RPMI 1640、新生小牛血清, 购自Gibco公司. 荧光实时定量PCR MK引物: 上游, 5'-GCGCGCTACAATGCTCAGT-3'; 下游, 5'-CCCTTCCCTTTCTTGGCTTT-3'. FAM探针引物5'-CTCCTTACTGTGCTGTATCCCCATGG-3'. 以3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)为内参.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人食管癌EC109细胞在含100 mL/L新生小牛血清的RPMI 1640液中培养, 置37℃, 50 mL/L CO_2培养箱中. 每日观察, 待细胞至对数生长期, 采用不同浓度的槲皮素处理后, 然后准备进行以下试验.

1.2.2 软琼脂集落培养试验: 根据文献[7]进行. 倒置显微镜下随机计数每组样品10个视野中的集落数, 取其平均数作比较. 结果采用*t*检验分析.

1.2.3 体外侵袭抑制试验: 该试验在改良的Boyden小室中操作, 根据文献方法[7]进行. 400倍光镜下计数穿过聚碳酸酯膜的细胞数, 以侵袭细胞的相对数目表示肿瘤细胞侵袭能力. 随机计数5个视野内的细胞数, 取平均值进行统计处理, 每组计数3份样本.

1.2.4 MK基因表达检测: 分别于槲皮素处理食管癌细胞24、48、72 h后, 收集各组细胞, 用TRIzol提取RNA, 并进行cDNA合成, 根据文献[8]方法, 采用荧光实时定量PCR检测MK基因mRNA表达水平. 按照上述时间收集各组细胞, 提取细胞总蛋白, 蛋白定量后进行常规Western blot检测. 利用Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software(Eastman Kodak公司, USA)测定Western blot条带净灰度值, 并与内参照β-actin的测定结果相比较, 计算其比值.

■相关报道
有学者发现, MK基因与某些癌细胞侵袭有关, 但是尚不了解MK基因与食管癌细胞侵袭的关系, 需要从细胞水平、基因水平进行研究, 以进一步深入了解槲皮素的抗癌机制.

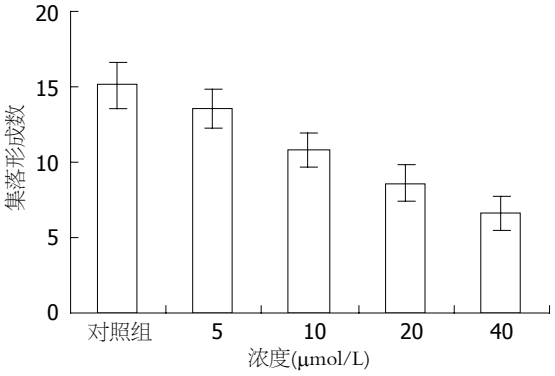


图 1 槲皮素对食管癌EC109细胞软琼脂集落形成的影响.

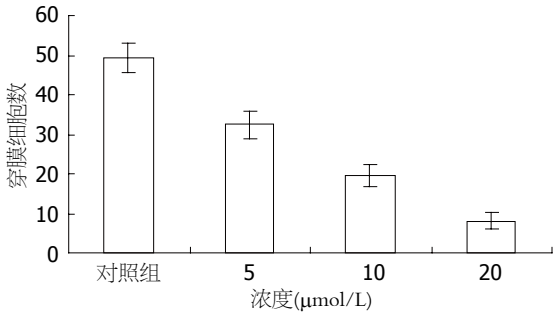


图 2 槲皮素对食管癌EC109细胞侵袭的影响.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件包进行统计学处理, 所得到的数值均以mean±SD表示.

2 结果

2.1 Que对食管癌细胞软琼脂集落形成的影响 食管癌EC109细胞在体外半固体培养体系中可以自发地形成集落. 而癌细胞经槲皮素处理后, 所形成的集落数明显减少, 且呈剂量依赖性($P<0.05$, 图1).

2.2 Que对食管癌细胞侵袭的影响 收集经Que处理的细胞, 采用Boyden小室检测癌细胞侵袭情况. 结果发现, 与对照组比较, Que处理组癌细胞穿过滤膜的细胞数明显下降, 且呈浓度依赖性($P<0.05$, 图2).

2.3 Que对食管癌细胞MK基因表达的影响 以槲皮素处理细胞后, 于不同时间收集细胞, 分别采用荧光实时定量PCR和Western blot检测. 结果发现, 与对照组比较, 处理组MK基因mRNA和蛋白水平明显降低($P<0.05$, $P<0.05$, 图3-4).

3 讨论

自1971年美国NCI组织首次发现槲皮素对P388白血病的抑制作用后, 许多学者发现, 槲皮素可

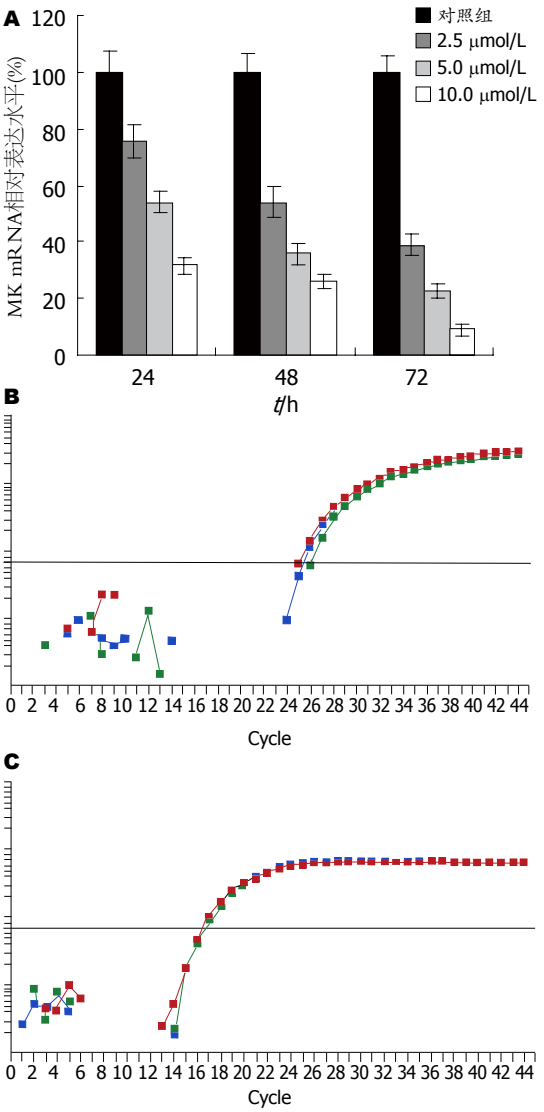


图 3 槲皮素对食管癌细胞MK基因mRNA水平的影响. B–C: 实时定量PCR图(48 h); B: MK; C: GAPDH.

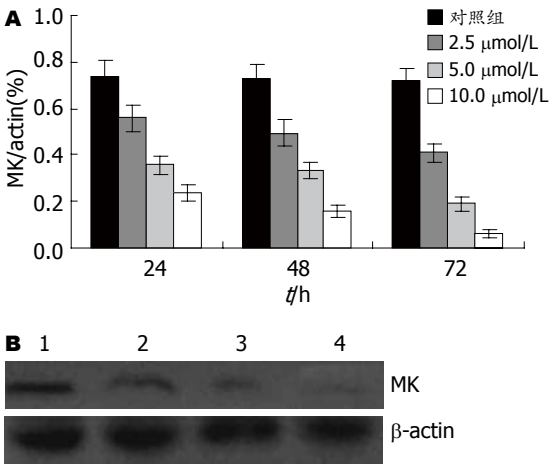


图 4 槲皮素对食管癌细胞MK蛋白水平的影响. B: Western blot检测(48 h); 1: 对照组; 2: 2.5 μmol/L; 3: 5.0 μmol/L; 4: 10.0 μmol/L.

■创新盘点

本研究首次从细胞水平观察了槲皮素对食管癌细胞侵袭的影响, 并从MK基因角度探讨了可能的机理, 具有重要的意义.

抑制多种恶性肿瘤如白血病、肺癌、肝癌、卵巢癌、膀胱癌、结肠癌等多种癌细胞的恶性增殖. 最近研究发现, 槲皮素可抑制某些癌细胞侵袭转移[5-6], 但其机制尚不完全清楚. 本研究采用槲皮素处理食管癌EC109细胞, 观察了其对锚着不依赖性增殖和侵袭的影响, 并从MK基因角度方面初步探索了其可能的抗癌机制.

正常真核细胞, 除成熟血细胞外, 大多须黏附于特定的细胞外基质上存活, 称为锚着依赖性(anchorage dependence). 一般认为, 肿瘤细胞在软琼脂形成集落的多少可反映肿瘤细胞锚着不依赖性增殖的特性, 且与其恶性程度呈正相关. 癌细胞侵袭能力强, 则在软琼脂上形成的集落数目多. 本研究发现, 食管癌细胞经不同浓度的槲皮素处理后, 软琼脂集落数明显减少, 且呈浓度依赖性($P<0.05$).

肿瘤细胞侵袭转移是一个复杂的过程. 先从原发肿瘤上脱落, 侵入细胞外基质, 然后穿透淋巴管和血管, 进行远处转移. 在此过程中, 肿瘤细胞侵袭细胞外基质, 是重要的步骤. 本研究所用的基质胶(matrigel)含有Ⅳ型胶原、层黏蛋白、巢蛋白(entactin)、硫酸肝素蛋白多糖等成分, 与细胞外基质的成分非常相近. 因此, 能有效地在体外模拟肿瘤细胞的侵袭过程. 在体外侵袭实验中, 我们观察到EC109胞具有较强的侵袭能力, 而经过Que处理的癌细胞, 穿过聚碳酸脂膜的细胞数量减少, 且呈浓度依赖性($P<0.05$). 由此说明, 槲皮素可抑制食管癌细胞的侵袭能力.

MK基因是1988年Caltagirone *et al*[9-10]在视黄酸诱导的小鼠胚胎肿瘤细胞系HM-1细胞cDNA文库中发现的一种新基因, 其后, 在多种动物和人类中均已发现了基因. MK蛋白和另一种相似的细胞因子-多效生长因子(pleiotrophin, PTN)一起归为一类新的肝素结合因子家族(heparin binding factor family)[9]. 研究发现, MK在许多肿瘤如食管癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌、肝细胞癌、肺癌等多种癌细胞和组织中过表达, 而在正常组织中表达很低或不表达[10-18]. 近来有学者发现, MK基因表达与某些癌细胞侵袭有关[19]. 因此, MK有可能作为肿瘤标志物在肿瘤的诊断、预后和治疗中发挥作用本研究以Que处理食管癌EC109细胞后, 分别以荧光实时定量PCR方法和Western blot检测cripto基因mRNA和蛋白水平, 结果发现, Que处理组MK蛋白和mRNA水平均明显下调, 且呈时间和浓度依赖性($P<0.05$, $P<0.05$). 因此, 我们推测, Que抑制食管癌细胞侵袭, 可能与下调MK基因表达有关.

■同行评价
本研究方法合理, 对照可靠, 统计方法运用恰当, 结果明确, 讨论部分能够结合国内外相关文献就研究内容展开重点突出的讨论, 并得出相应的结论, 具有一定的参考价值.

总之, 本研究提示, Que可明显抑制食管癌细胞体外恶性增殖和侵袭能力, 下调MK基因表达, 可能是重要机制之一.

4 参考文献

1 Hollman PC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 937-942

2 魏金文, 范钰, 张尤历, 吴莺, 王晓燕, 陈萍. 槲皮素对胃癌细胞增殖的影响及机制探讨. 山东医药 2007; 47: 14-16

3 Devipriya S, Ganapathy V, Shyamaladevi CS. Suppression of tumor growth and invasion in 9,10 dimethyl benz(a) anthracene induced mammary carcinoma by the plant bioflavonoid quercetin. *Chem Biol Interact* 2006; 162: 106-113

4 Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Mol Cell Biochem* 2006; 287: 109-116

5 Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87: 595-600

6 Zhang X, Xu Q, Saiki I. Quercetin inhibits the invasion and mobility of murine melanoma B16-BL6 cells through inducing apoptosis via decreasing Bcl-2 expression. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18: 415-421

7 Fan Y, Zhang YL, Wu Y, Zhang W, Wang YH, Cheng ZM, Li H. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses invasion through inducing anoikis in human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 428-434

8 范钰, 郑树, 丁佳逸. 脂质体介导的cripto反义寡核苷酸抑制结肠癌细胞端粒酶活性. 中国病理生理杂志 2006; 22: 761-765

9 Takada T, Toriyama K, Muramatsu H, Song XJ, Torii S, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J Biochem* 1997; 122: 453-458

10 Shimada H, Nabeya Y, Tagawa M, Okazumi S, Matsubara H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Ikematsu S, Sakuma S, Ochiai T. Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 628-632

11 Wu X, Yao J, Li Q, Zheng H, Xin Y. Expression of midkine in benign, premalignant and malignant vulvar tumors. *Chin Med Sci J* 2002; 17: 148-152

12 Barthlen W, Flaadt D, Girgert R, Conzelmann J, Schweizer P, Zugmaier G, Buck M, Knabbe C. Significance of heparin-binding growth factor expression on cells of solid pediatric tumors. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 1296-1304

13 Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett* 2004; 204: 127-143

14 Obata Y, Kikuchi S, Lin Y, Yagyu K, Muramatsu T, Kumai H. Serum midkine concentrations and gastric cancer. *Cancer Sci* 2005; 96: 54-56

15 Maehara H, Kaname T, Yanagi K, Hanzawa H, Owan I, Kinjou T, Kadomatsu K, Ikematsu S, Iwamasa T, Kanaya F, Naritomi K. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 757-762

16 Krzystek-Korpacka M, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Blachut K, Kustrzeba-Wojcicka I, Banas T. Serum midkine depends on lymph node involvement and correlates with circulating VEGF-C in oesophageal squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2007; 12: 403-413

17 Maeda S, Shinchi H, Kurahara H, Mataki Y, Noma H, Maemura K, Aridome K, Yokomine T, Natsugoe S, Aikou T, Takao S. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer* 2007; 97: 405-411

18 Tanabe K, Matsumoto M, Ikematsu S, Nagase S, Hatakeyama A, Takano T, Niikura H, Ito K, Kadomatsu K, Hayashi S, Yaegashi N. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 1125-1130

19 Ren YJ, Zhang QY. Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2006-2010

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2507-2511
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

丹参酮ⅡA磺酸钠对MKN-45胃癌裸鼠移植瘤增殖及血管生成的影响

陈 坚, 钟 良, 钱立平, 蒋蔚茹, 黄剑平, 邱冬妮

陈坚, 钟良, 钱立平, 蒋蔚茹, 黄剑平, 邱冬妮, 复旦大学附属华山医院消化科 上海市 200040
作者贡献分布: 此课题由陈坚设计; 研究过程由陈坚、钟良、钱立平、蒋蔚茹、黄剑平、邱冬妮共同完成; 研究所用新试剂及分析工具由钟良提供; 数据分析由邱冬妮完成; 本论文写作由陈坚完成.
通讯作者: 钟良, 200040, 上海市乌鲁木齐中路12号, 复旦大学附属华山医院消化科. zhongniping@163.com
电话: 021-62489999-6662 传真: 021-62485501
收稿日期: 2008-02-01 修回日期: 2008-07-17
接受日期: 2008-07-25 在线出版日期: 2008-08-08

Anticancer effects and mechanisms of Tanshinone ⅡA sulfonic acid in nude mouse xenograft model bearing MKN-45 gastric cancer cells

Jian Chen, Liang Zhong, Li-Ping Qian, Wei-Ru Jiang, Jian-Ping Huang, Dong-Ni Qiu

Jian Chen, Liang Zhong, Li-Ping Qian, Wei-Ru Jiang, Jian-Ping Huang, Dong-Ni Qiu, Department of Gastroenterology, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China
Correspondence to: Liang Zhong, Department of Gastroenterology, Huashan Hospital Affliated to Fudan University, Shanghai 200040, China. zhongniping@163.com
Received: 2008-02-01 Revised: 2008-07-17
Accepted: 2008-07-25 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To identify the anticancer effects of Tanshinon ⅡA sulfonic acid (TASA) *in vivo* by the model of nude mice with MKN-45 gastric cancer cells transplanted subcutaneously.

METHODS: MKN-45 human gastric cancer cells were grown as xenografts in 24 immunodeficient mice, which were randomly divided into 4 groups. The mice in observation groups were injected intraperitoneally with TASA at 1 mg/kg (low dosage), 5 mg/kg (median dosage) or 10 mg/kg (large dosage) once per day respectively for 2 wk while the mice in the fourth group were injected with sodium chloride as controls. All the nude mice were sacrificed 2 wk later and growth inhibition rates of transplanted tumors were measured by weighing the masses. Apoptosis index was tested by TUNEL assay. Microvascular density (MVD) was marked by CD34 staining. The protein expression levels of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were measured by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with that in the control group, the apoptosis index was significantly increased in the three observation groups (36.02% ± 3.41%, 34.78% ± 3.41%, 30.05% ± 3.41% *vs* 10.83% ± 0.92%, all $P < 0.05$). Low-dose TASA suppressed MKN-45 cell proliferation, and the growth inhibition rate was 20.69% ± 1.79%. On the contrary, median- and large-dose TASA promoted the growth of MKN-45 cells, and the growth inhibition rate in large-dose group was -(21.4% ± 2.38%). Compared with that in the control group, MVD and VEGF expression were up-regulated in the observed groups, especially in the median- and large-dose group (8.11 ± 1.011, 10.01 ± 0.89 *vs* 6.56 ± 0.42; 63628 ± 611, 70957 ± 684 *vs* 51056 ± 410; all $P < 0.05$). COX-2 expression had no significant difference between the four groups. HIF1α expression was slightly down-regulated in low-dose TASA group, not significantly; however, it was significantly up-regulated in the median- and large-dose groups as compared with that in the contol group (29468 ± 204, 42227 ± 214 *vs* 15691 ± 106, $P < 0.01$ or 0.05).

CONCLUSION: The anticancer effects of TASA *in vivo* is not so significant as that *in vitro*. The effect of large-dose TASA may be offseted or even reversed by compensatory up-regulation of HIF expressioin.

Key Words: Tanshinone ⅡA; Gastric cancer; Nude mouse; Hypoxia-inducible factor 1alpha; TUNEL assay; Immunohistochemistry; Microvascular density; Vascular endothelial growth factor; Cyclooxygenase-2

Chen J, Zhong L, Qian LP, Jiang WR, Huang JP, Qiu DN. Anticancer effects and mechanisms of Tanshinone ⅡA

■背景资料
丹参酮ⅡA(TanⅡA)是从活血化瘀中药丹参中提取的有效成分. 体外研究显示, TanⅡA对多种肿瘤细胞具有抑增殖、促凋亡的作用. 但TanⅡA体内的抗癌效应及机制目前报道不多.

■同行评议者
陈凛, 教授, 中国人民解放军总医院普通外科

■研发前沿
将HIF作为肿瘤耐药的重要调控靶点, 结合肿瘤耐受缺氧和代谢方式改变的机制研究, 将会为肿瘤的治疗提供新的思路.

sulfonic acid in nude mouse xenograft model bearing MKN-45 gastric cancer cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2507-2511

摘要

目的: 明确丹参酮ⅡA磺酸钠(TanⅡA)在体内的抗癌作用及其对肿瘤血管生成的影响.

方法: 建立MKN-45胃癌裸鼠移植瘤模型, 随机分成对照组和低、中、高丹参酮ⅡA磺酸钠干预组, 每组6只. 干预组分别用TanⅡA磺酸钠1、5、10 mg/kg, ip, 1 次/d, 连续14 d. 对照组等量生理盐水干预. 2 wk后处死裸鼠, 分离瘤块, 观察抑瘤率; TUNEL法测凋亡指数; CD34标志法观察四组瘤块微血管密度(MVD); 免疫组化法观察缺氧诱导因子HIF1α、血管内皮生长因子(VEGF)、COX2的蛋白表达.

结果: 与对照组相比, 3组干预组凋亡指数AI明显上升(36.02%±3.41%, 34.78%±3.41%, 30.05%±3.41% *vs* 10.83%±0.92%, 均$P<0.05$). 低剂量组增殖减慢, 抑瘤率为20.69%±1.79%; 中、高剂量瘤重反而增加, 高剂量组抑瘤率为-(21.4%±2.38%). 与对照相比, 3组干预组MVD、VEGF表达上调, 尤以中高剂量组差异显著(8.11±1.011, 10.01±0.89 *vs* 6.56±0.42; 63628±611, 70957±684 *vs* 51056±410, 均$P<0.05$); 3组干预组COX-2表达与对照无明显差异; HIF1α在低剂量组表达略有下调, 但未达到统计学差异, 中高剂量组表达则有明显上调(29468±204, 42227±214 *vs* 15691±106, $P<0.01$或0.05).

结论: 丹参酮ⅡA体内的抗肿瘤效果没有体外细胞实验显著, 高剂量丹参酮ⅡA的抗癌效应可被HIF的代偿高表达抵消甚至逆转.

关键词: 丹参酮ⅡA; 胃癌; 裸鼠; 缺氧诱导因子1α; TUNEL法; 免疫组化; 微血管密度; 血管内皮生长因子; 环氧合酶-2

陈坚, 钟良, 钱立平, 蒋蔚茹, 黄剑平, 邱冬妮. 丹参酮ⅡA磺酸钠对MKN-45胃癌裸鼠移植瘤增殖及血管生成的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2507-2511
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2507.asp

0 引言

丹参酮ⅡA(tanshinone ⅡA, TanⅡA)是从活血化瘀中药丹参中提取的有效成分. 研究表明, 丹参酮类含有邻醌或对醌结构, 在生物体内参与电子传递、具有较强的抗炎、抗氧化活性[1]. 同时体外研究显示, TanⅡA对多种肿瘤细胞具有抑增殖、促凋亡的作用[2-3]. 但TanⅡA体内的抗癌效应及机制目前报道不多, 本研究以人胃癌细胞株MKN-45的荷瘤裸鼠为研究对象, 观察TanⅡA在体内对胃癌生长的抑制作用及其机制, 以探讨中药单体治疗胃癌的可能性.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株MKN-45是低分化腺癌细胞株, MKN-45裸鼠皮下移植瘤瘤苗由上海市肿瘤研究所惠赠并皮下移植成瘤[4], ♂SPF级Balb/c裸鼠24只, 体质量20 g左右, 购于中科院实验动物研究所. TanⅡA磺酸钠注射液购自上海第一生化药业有限公司(国药准字H31022558), 规格为10 mg/2 mL, 用0.9%生理盐水稀释备用. 免疫组化试剂一抗(HIF-1α、MVD、VEGF、COX2)购自美国Santa Cruz公司; EnVision试剂(HRP/Rabbit)即用型购于丹麦Dako公司; 原位细胞凋亡检测试剂盒购自德国宝灵曼公司; 二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)购自Sigma公司; PBS和TBS缓冲液为实验室自行配制使用. 切片机德国Leica RM2145型, 展片机德国Leica HI1210型, 烤片机德国Leica, HI1220型, 显微镜为Olympus BH2, 数码相机日本Nikon仪器. IMS细胞图像分析系统购自上海申腾信息技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 荷瘤裸鼠肿瘤抑制实验: 将重度联合免疫缺陷(SCID)的Balb/c裸鼠24只及MKN-45荷瘤鼠2只在复旦大学实验动物部饲养观察2 d. 然后在无菌条件下处死荷瘤鼠2只, 分离瘤块, 切割成约1 mm×1 mm瘤块, 用6号穿刺针接种于裸鼠右侧腋窝皮下, 接种后第8天见有皮下小结节开始生长. 随机分成对照组和低、中、高丹参酮ⅡA磺酸钠干预组, 每组6只. 干预组分别用TanⅡA磺酸钠1、5、10 mg/kg ip, 1 次/d, 连续14 d. 对照组则用同等量生理盐水ip干预. 观察四组裸鼠裸鼠生存状态. 干预2 wk后颈椎脱位法处死裸鼠, 分离肿瘤称质量, 并按下列公式计算抑瘤率: 抑瘤率(%) = (1-用药组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100. 将瘤块用40 g/L甲醛固定后石蜡包埋备用.

1.2.2 缺氧诱导因子1α(HIF1α)、血管内皮生长因子(VEGF)、环氧合酶2(COX2)蛋白的免疫组化表达: 分别取4组瘤块, 用EnVision法进行免疫组化染色. 试剂盒提供阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 实验步骤如下: 石蜡切片常规

脱蜡至水, PBS洗3×3 min; 用pH6.0的0.01 mol/L柠檬酸缓冲液热诱导修复(微波3档20 min), 室温自然冷却, PBS洗3×3 min; 0.3% H_2O_2抑制内源性过氧化物酶20 min, 室温; PBS洗3×3 min; 20%羊血清室温孵育30 min; 滴加一抗37℃孵育2 h; PBS洗3×3 min; EnVision试剂(HRP/R)37℃30 min; PBS洗3×3 min; DAB显色8-12 min; 苏木素衬染; 吹干后, 树脂封片; 镜下观察, 核紫蓝色, 阳性呈棕黄色. 细胞染色呈棕黄色为阳性, 随机选取3个视野, 用图像分析软件计算阳性面积, 取均值.

1.2.3 微血管密度(microvascular density, MVD)免疫组化检测: 分别取4组瘤块, 用EnVision法进行肿瘤微血管染色. MVD是用免疫组化的方法, 用CD34抗体, 标志瘤体内微血管, 然后计数其单位面积中的微血管数, 间接判断肿瘤的血管形成能力.

1.2.4 TUNEL检测凋亡指数: 严格按试剂说明书操作, 实验用玻片预先用0.1 g/L多聚赖氨酸或其他防脱片剂处理; 石蜡切片用40 g/L甲醛4℃过夜固定, 较低温度(低于60℃)下浸蜡、包埋、切片, 检测前切片常规脱蜡入水; 冷冻切片及细胞涂片用40 g/L甲醛PBS液室温固定15 min, 用0.01 mol/L PBS(pH7.4)洗片, 5 min/次×3; 样品片放入新鲜配制的3%过氧化氢水溶液中, 室温10 min, PBS洗样品片5 min/次×3; 用0.01 mol/L PBS(7.4)稀释DAN蛋白酶K储备液中20 mg/L, 50 μL/片加至脱蜡入水后的样品片上37℃湿盒中放置10-20 min, 冰冻切入及细胞涂片放入2 g/L TritonX-100 PBS液中, 室温下5 min; 双蒸水洗样品5 min/次×3; 样品片上加标志缓冲液, 20 μL/片, 室温放置15 min; 将TDT及Biotin-11-dUTP经离心机离心, 再于混匀器上混匀后, 分别取2 μL加入16 μL标志缓冲液中, 再在混匀器上混匀, (加样及混匀时要尽量避免产生泡沫); 甩掉样品片上标志缓冲液(只保证样品片湿润即可, 不应残留较多缓冲液), 然后加上述已混匀的混合液至样品片上, 20 μL/片, 37℃湿盒中标志60 min; 将20×SSC液稀释10倍, 然后将标志后的样品片浸泡于2×SSC中, 室温放置15 min; PBS洗样品片, 3 min/次×3; 样品片加封闭液50 μL/片, 室温放置30 min, 然后甩掉封闭液, 勿洗; 以封闭液按1∶50配制Avidin-HRP为工作液; 50 μL每片加于样品片上, 37℃湿盒反应60 min; PBS洗样品片, 3 min/次×3; DAB显色液显色; 苏木素复染; 常规封片、镜检. 镜下凋亡指数(apoptosis index, AI) = 凋亡细胞/细胞总数×100%. 阳性结果为细胞核棕黄色或棕褐色深染, 背景呈紫蓝色.

1.2.5 免疫组化图像定量分析: 图像采集: 通过显微镜、图像采集卡、数码相机采集数字图像, 数字图像为标准的BMP(位图)文件格式. 距离测量定标: 距离可以用显微镜专用校正微尺来标定. 标定可在x20条件下进行. 步骤是先点击图像中微尺上的2个点, 再将他的实际微米数输入计算机, 计算机自动计算得到比例因子后存储备用. 消除背景: 本命令能把免疫组化中的紫蓝色背景从图像上去除. 选阴性区域: 操作时用鼠标选择阴性区域, 处理后有效阴性区域用蓝色表示. 此功能可以和选阳性区域功能交替使用. 选阳性区域: 操作时用鼠标选择棕黄色或棕褐色阳性区域, 处理后有效阳性区域用红色表示. 此功能可和选阴性区域功能交替使用. 测量: 测量方式可选全视场测量. 否则, 需选择测量区域(用鼠标选择任意区域或选择矩形区域). 测量结果: 免疫组化图像中阳性区域面积和阳性比率以及吸光度(*A*). 每张切片至少分析3个视野, 每组数据至少10个.

2 结果

四组裸鼠均生长良好, 仅高剂量组在实验过程中死亡1只. 干预2 wk后处死裸鼠, 剥离移植瘤时见移植瘤呈类圆形或结节状, 表面有假包膜, 与正常组织边界清楚. 高剂量组瘤表面毛细血管较丰富, 剖面发现有坏死灶, 部分肿瘤旁有小的卫星灶. 滤纸吸干后分别称重移植瘤, 然后送免疫组化检测. 与对照相比, 干预组凋亡指数AI明显上升($P<0.05$). 低剂量组增殖减慢, 抑瘤率为20.69%; 中、高剂量组瘤质量反而增加, 高剂量组抑瘤率为-21.4%, 增殖加快(表1).

与对照相比, 3组干预组MVD、VEGF表达上调, 尤以中高剂量组差异显著($P<0.05$); 三组干预组COX2表达与对照无明显差异; HIF1α在低剂量组表达略有下调, 但未达到统计学差异, 中高剂量组表达则有明显上调($P<0.01$, 表2).

3 讨论

由于凋亡细胞的内源性核酸内切酶被激活, 细胞自身的染色质或DNA被切割, 并产生与DNA断点数目相同的3'-羟基末端. 该生物素可以通过于亲和素的特异结合使亲和素一辣根过氧化物酶(Avidin-HRP)结合在DNA断点部位, 加入HRP显色底物后在原位出现有色沉淀, 从而

■创新盘点

在裸鼠体内高剂量TanⅡA的抗癌效应会被HIF1α的代偿高表达抵消甚至逆转. 将HIF作为肿瘤生长的重要调控靶点, 结合肿瘤耐受缺氧和代谢方式改变的机制研究, 将会为肿瘤的治疗提供新的思路.

■应用要点
本研究以人胃癌细胞株MKN-45的荷瘤裸鼠为研究对象, 观察TanⅡA在体内对胃癌生长的抑制作用及其机制, 以探讨中药单体治疗胃癌的可能性.

表 1 不同组中肿瘤增殖、凋亡比较

	对照组	低剂量	中剂量	高剂量
凋亡指数(%)	10.83 ± 0.92	36.02 ± 3.41[a]	34.78 ± 3.41[a]	30.05 ± 3.41[a]
瘤重(g)	0.841 ± 0.278	0.667 ± 0.263[a]	0.891 ± 0.208	1.021 ± 0.293[a]
抑瘤率(%)		20.69 ± 1.79	–(5.95 ± 2.38)	–(21.4 ± 2.38)

[a]$P<0.05$ *vs* 对照组.

表 2 不同组中肿瘤血管生成指标比较

阳性面积	对照组	低剂量	中剂量	高剂量
HIF1α	15 691 ± 106	13 112 ± 111	29 468 ± 204[a]	42 227 ± 214[b]
COX2	31 459 ± 211	33 104 ± 114	30 846 ± 291	36 609 ± 334
VEGF	51 056 ± 410	53 680 ± 451	63 628 ± 611[a]	70 957 ± 684[a]
MVD(*n*)	6.56 ± 0.42	7.25 ± 0.53	8.11 ± 1.011[a]	10.01 ± 0.89[a]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 对照组.

可在显微镜下观察到被着色的凋亡细胞. 此为TUNEL法测定凋亡指数的原理. 本实验显示: TanⅡA磺酸钠低剂量在体内有一定抑制胃癌增殖作用, 抑瘤率约为20%, 机制可能与诱导肿瘤凋亡有关, 这也与作者先期所作的体外实验相符[5]. 但体内实验发现TanⅡA磺酸钠的抗癌作用并未如体外细胞学实验那样呈现剂量依赖效应, 相反随着干预剂量的加大, 肿瘤生长反而呈现加速趋势, 这与实验设计时的预判大相径庭.

实体肿瘤由于低分化, 恶性程度高, 生长迅速, 常常引起血供不足, 循环和淋巴系统紊乱, 因此肿瘤细胞经常处于缺血缺氧的环境中. 尤其是移植瘤没有自身的供血, 更容易缺血坏死[6-7]. 所以在高剂量组的肿瘤解剖中发现了坏死灶的存在, 这也可能是高剂量组瘤体反而加大加重的原因. 但是我们同时发现, 高剂量组瘤体表面毛细血管更为丰富, 同时免疫组化亦显示, 肿瘤的HIF、MVD及VEGF表达上调. 说明在缺血坏死的同时, 肿瘤组织并没有停止生长, 反而呈现肿瘤血管新生的加速.

早在70年前, 就有学者指出: 肿瘤组织的糖酵解能力显著高于正常组织, 甚至在有氧情况下肿瘤组织也以糖酵解作为主要产能方式, 这种现象称为“warburg效应”[8-9]. Warburg效应对于肿瘤细胞是一种普遍现象, 只是到了近年, 人们才着眼于其分子机制. 大量研究表明: 缺氧诱导因子HIF-1的高表达是肿瘤耐受缺氧, 恶性演进并远处转移的关键事件[10-13]. 据文献报道, 肿瘤组织可通过上调HIF-1的表达, 改变糖代谢途径中关键酶的表达水平和活性, 如促进丙酮酸激酶(pyruvate-kinase, PK)、己糖激酶(hexokinase, HK)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)等代谢酶的表达[14-15], 使肿瘤组织能以无氧酵解作为主要的能量供应方式, 使其在缺氧条件下得以存活. 另一方面, HIF转录因子家族还可以促进下游基因如VEGF的表达, 代偿性地提高了肿瘤血管的生成, 促进了营养物质的供应[16-17], 这两方面的因素都有利于细胞的存活. 本研究的结果正是该理论的良好佐证.

此外, HIF对肿瘤血管生成的影响还存在不依赖VEGF的途径[18]. 如体外细胞实验已证实HIF1可诱导人内皮细胞环氧合酶COX2的表达, 而COX2及其合成产物前列腺素等, 均可通过除VEGF以外的生长因子家族(bFGF、PDGF、EGF、IGF、TGF)等多种途径调节血管生成. 但本研究并未发现四组裸鼠移植瘤中COX2的表达存在显著差异, 提示体外的实验结果有时会和体内实验存在诸多差异, 原因有待进一步深入探讨.

虽然本研究结果与课题设计时的初衷大相径庭, TanⅡA的抗肿瘤效果没有体外细胞实验那样显著. 高剂量TanⅡA的抗癌效应会被HIF的代偿高表达抵消甚至逆转. 缺氧既是肿瘤发展的结果(高剂量组瘤块见缺血坏死灶), 又可以促进肿瘤的生长、转移(高剂量组瘤块见卫星转移灶). 缺氧诱导了血管生成、凋亡信号级联、

糖酵解途径和多种细胞周期调控蛋白等关键组分的表达. 在细胞水平, 缺氧介导了无血管肿瘤区域的肿瘤血管新生, 从而促进肿瘤的恶性演进. 因此, 将HIF作为肿瘤生长的重要调控靶点, 结合肿瘤耐受缺氧和代谢方式改变的机制研究, 将会为肿瘤的治疗提供新的思路[19].

4 参考文献

1 Wang X, Morris-Natschke SL, Lee KH. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Med Res Rev* 2007; 27: 133-148

2 陈坚. 丹参酮抗肿瘤的研究进展. 复旦学报(医学版) 2003; 30: 626-628

3 董晓荣, 伍钢, 董继华, 张涛, 刘莉, 侯晓华. 丹参酮ⅡA对MKN-45细胞生长的影响. 肿瘤防治杂志 2005; 12: 1465-1468

4 姚明, 闫明霞, 周光兴, 范士明, 孔韩卫, 戚锦芳. BNX小鼠人胃癌原位移植模型的建立及其生物学特性的观察. 肿瘤 2004; 24: 566-560

5 陈坚, 钟良, 钱立平, 华正豪, 林庚金, 刘珊林. 丹参酮ⅡA诱导SGC7901胃癌细胞凋亡及机制. 复旦学报(医学版) 2007; 34: 57-61

6 陈坚, 林庚金, 程建, 唐峰, 朱虹光, 刘珊林. 锰型超氧化物歧化酶基因转染抑制SGC7901胃癌细胞增殖的机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1386-1389

7 Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29: 15-18

8 Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 2002; 277: 23111-23115

9 Racker E, Spector M. Warburg effect revisited: merger of biochemistry and molecular biology. *Science* 1981; 213: 303-307

10 Jiang Y, Zhang W, Kondo K, Klco JM, St Martin TB, Dufault MR, Madden SL, Kaelin WG Jr, Nacht M. Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 453-462

11 Liu S, Tan WY, Chen QR, Chen XP, Fu K, Zhao YY, Chen ZW. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF-kappaB/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth. *Cancer Sci* 2008; 99: 952-957

12 Salnikow K, Davidson T, Costa M. The role of hypoxia-inducible signaling pathway in nickel carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 2002; 110 Suppl 5: 831-834

13 Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 266-276

14 Xu L, Tong R, Cochran DM, Jain RK. Blocking platelet-derived growth factor-D/platelet-derived growth factor receptor beta signaling inhibits human renal cell carcinoma progression in an orthotopic mouse model. *Cancer Res* 2005; 65: 5711-5719

15 Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res* 2002; 276: 24-31

16 Cabuk D, Basaran G, Celikel C, Dane F, Yumuk PF, Iyikesici MS, Ekenel M, Turhal NS. Vascular endothelial growth factor, hypoxia-inducible factor 1 alpha and CD34 expressions in early-stage gastric tumors: relationship with pathological factors and prognostic impact on survival. *Oncology* 2007; 72: 111-117

17 Lee BL, Kim WH, Jung J, Cho SJ, Park JW, Kim J, Chung HY, Chang MS, Nam SY. A hypoxia-independent up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 by AKT contributes to angiogenesis in human gastric cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 44-51

18 Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Hsieh CY, Kuo ML, Lin JT. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci* 2005; 12: 229-241

19 Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 516-525

■同行评价
本研究有较好的学术创新性, 设计合理, 研究结果给胃癌治疗提供新的思路, 对于研究和临床都有一定的参考价值.

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 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2512-2515
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

达肝素钠对早期肝癌的生长抑制作用

闫 钧, 郑 起, 汪 昱, 潘 烨, 邱文才, 陆洪芬, 薛 琼, 汤钊猷

■背景资料
肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 肿瘤生长和转移复发与血管生成密切相关. 本实验采用人肝癌裸鼠转移模型, 研究法安明在早期肝癌细胞生长过程中对血管形成的抑制作用.

闫钧, 郑起, 汪昱, 潘烨, 邱文才, 上海交通大学医学院附属第六人民医院普外科 上海市 200233
陆洪芬, 复旦大学附属肿瘤医院病理科 上海市 200232
薛琼, 汤钊猷, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所 上海市 200232
上海市卫生局基金资助项目, No. 00441
作者贡献分布: 此课题由闫钧和郑起设计; 研究过程由闫钧, 汪昱, 潘烨及邱文才操作完成; 数据分析由陆洪芬, 薛琼及汤钊猷完成; 本论文写作由闫钧完成.
通讯作者: 郑起, 200233, 上海市, 上海交通大学医学院附属第六人民医院普外科. sh6_zhengqi@126.com
电话: 021-64369181
收稿日期: 2008-05-10 修回日期: 2008-06-16
接受日期: 2008-06-23 在线出版日期: 2008-08-08

Inhibitory effect of dalteparin sodium on the growth of early-stage hepatocellular carcinoma

Jun Yan, Qi Zheng, Yu Wang, Ye Pan, Wen-Cai Qiu, Hong-Fen Lu, Qiong Xue, Zhao-You Tang

Jun Yan, Qi Zheng, Yu Wang, Ye Pan, Wen-Cai Qiu, Department of General Surgery, the Sixth Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University Scholl of Medicine, Shanghai 200233, China
Hong-Fen Lu, Department of Pathology, Cancer Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China
Qiong Xue, Zhao-You Tang, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China
Supported by: the Health Administration Foundation of Shanghai Municipality, No. 00441
Correspondence to: Qi Zheng, Department of General Surgery, the Sixth Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200233, China. sh6_zhengqi@126.com
Received: 2008-05-10 Revised: 2008-06-16
Accepted: 2008-06-23 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate the inhibition of dalteparin sodium (low molecular weight heparins) on early hepatocellular carcinoma (HCC) in nude mice.

METHODS: The metastatic model of HCC was established in 40 nude mice, which were randomly divided into 4 groups: control group (treated with saline), chemotherapy group (treated with 5-fluorouracil and cis-dichlorodiamine platinum), dalteparin sodium treatment group, and combined treatment group (treated with dalteparin sodium, 5-fluorouracil and cis-dichlorodiamine platinum). The following parameters, such as tumor size, tumor inhibition rates, alpha fetoprotein (AFP) and intratumoral microvessel density (MVD), were evaluated respectively 14 d after operation.

RESULTS: In comparison with that in the control group, the tumor size was significantly reduced in the chemotherapy group, dalteparin sodium group and combined group (26.25 ± 11.55, 33.70 ± 14.78, 17.25 ± 6.80 mm^3 *vs* 68.47 ± 22.04 mm^3; all $P < 0.05$); the tumor inhibition rates showed that dalteparin sodium had a satisfactory depressing effect on tumor growth. The MVD values were markedly lower in the dalteparin sodium group and combined group than those in the control group and chemotherapy group (5.2 ± 1.55, 4.7 ± 2.21 *vs* 19.34 ± 3.57, 17.1 ± 3.03; all $P < 0.05$). Moreover, the level of alpha-fetoprotein was significantly decreased in the chemotherapy group, dalteparin sodium group and combined group as compared with that in the control group (14.56 ± 8.87 mg/L, 13.36 ± 7.60 mg/L, 11.57 ± 7.82 mg/L *vs* 22.20 ± 6.29 mg/L, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Dalteparin sodium can suppress tumor growth and metastasis by inhibiting tumor angiogenesis of early-stage HCC.

Key Words: Heparins; Hepatocarcinoma; Angiogensis; Dalteparin sodium

Yan J, Zheng Q, Wang Y, Pan Y, Qiu WC, Lu HF, Xue Q, Tang ZY. Inhibitory effect of dalteparin sodium on the growth of early-stage hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2512-2515

摘要

目的: 研究达肝素钠(法安明)对早期肝癌生长的抑制作用.

方法: 采用人肝癌裸鼠转移模型(LCI-D20)40只, 随机分成4组, 即对照组(生理盐水)、化疗组(顺铂+5-氟尿嘧啶)、法安明组、联合组(顺

■同行评议者
高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

铂、5-氟尿嘧啶与法安明). 分别于术后第14天处死观察肿瘤大小、抑瘤率、血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)和肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD).

结果: 化疗组、法安明组、联合组分别与对照组进行对比, 其肿瘤明显缩小(26.25±11.55, 33.70±14.78, 17.25±6.80 mm^3 *vs* 68.47±22.04 mm^3, 均P<0.05); 抑瘤率结果也提示法安明对肿瘤有良好的抑制作用. 法安明组和联合治疗组肿瘤组织内微血管及新生血管形成显著低于对照组和化疗组(5.2±1.55, 4.7±2.21 *vs* 19.34±3.57, 17.1±3.03, 均P<0.05), 化疗组、法安明组、联合组的AFP较对照组有明显降低(14.56±8.87, 13.36±7.60, 11.57±7.82 mg/L *vs* 22.20±6.29 mg/L, 均P<0.05).

结论: 法安明通过抗肿瘤血管形成, 对早期肝癌的生长有抑制作用.

关键词: 肝素; 肝脏肿瘤; 血管生成; 法安明

闫钧, 郑起, 汪昱, 潘烨, 邱文才, 陆洪芬, 薛琼, 汤钊猷. 达肝素钠对早期肝癌的生长抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2512-2515

http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2512.asp

0 引言

肿瘤患者往往伴发高凝血症及血管栓塞, 有资料显示癌症合并静脉血栓患者, 肝素的使用明显改善患者的生存[1-2]. 同时研究表明, 肿瘤生长和转移复发与血管生成密切相关[3-4]. 本实验采用人肝癌裸鼠转移模型(LCI-D20, 简称肝癌模型), 研究法安明在早期肝癌细胞生长和转移过程中对血管形成的抑制作用.

1 材料和方法

1.1 材料 BABLC/A裸小鼠(上海中科院实验动物中心提供), ♂, 40只, 鼠龄4-6 wk, 体质量约20 g, 在SPF级条件下饲养, 构建肝癌模型14 d后即为早期肝癌模型[5]. 本组瘤源为第141代. 兔抗人F8因子(Dako公司, 1∶300), Dako抗鼠EnVision™加强型试剂盒, 0.5 g/L DAB(Dako公司)染色; 低分子肝素(法安明, 法玛西亚普强公司); 5-氟尿嘧啶(5-FU, 上海旭东海普药业); 顺铂(齐鲁制药).

1.2 方法

1.2.1 分组: 肝癌模型随机分成4组, 每组10只, 分别设为对照组: 生理盐水腹腔内注射; 化疗组: ip 5-FU 30 mg/(kg·d)+顺铂2 mg/(kg·d), 共用5 d; 法安明组: sc法安明1800 IU/(kg·d)共用14 d; 联合治疗组: ip 5-FU、顺铂和sc法安明.

1.2.2 肿瘤增长抑制率的测定: 模型构成后第2天即术后第1天开始干预用药, 法安明sc, 其他为腹腔用药. 实验第14天分别处死裸鼠, 检测肿瘤体积[V(mm^3) = (长×宽)^2/2]、肿瘤增长抑制率TGI(%)[(C_x-T_x)/C_x×100%](C_x和T_x分别为对照组和治疗组肿瘤平均体积)[6].

1.2.3 血清学分析: 采集裸鼠血清, 放免法测定AFP含量.

1.2.4 肿瘤微血管密度(MVD)测定: 对第8因子免疫组织化学染色的肿瘤微血管参照文献Weidner *et al*[7]的方法进行计数. 计数由两位不知临床资料的病理科医生在多筒显微镜下同时进行, 先在低倍镜40倍下全面观察切片选定残癌组织内血管密度最高处(即热点), 然后在200倍镜下取3个视野分别计算所有染色的微血管, 取3个测定值的平均数为该病例的MVD值. 在计数微血管时, 以与周围肿瘤细胞和结缔组织成分有明显区别的任何一个染成棕色的血管内皮或内皮细胞簇作为一个血管计算, 只要结构不相连, 其分枝结构也作为一个血管计数.

统计学处理 组间比较用方差分析, 率比较用χ^2检验, 以P<0.05为统计学上有显著性意义.

2 结果

2.1 肿瘤生长和抑制 化疗组、法安明组、联合组分别与对照组比, 肿瘤明显缩小(P<0.05), 从抑瘤率结果也提示法安明对肿瘤有良好的抑制作用. 法安明组和联合组与化疗组比较抑制肿瘤作用略差, 但统计学比较无明显差异(P>0.05, 表1).

2.2 MVD计数 镜下观察, 对照组实体瘤血管形成明显多于法安明组和联合组. 化疗组与对照组比较, MVD计数差异无显著意义(P>0.05). 法安明组和联合治疗组肿瘤组织内微血管及新生血管形成明显少与对照组, MVD显著低于化疗组(P<0.05, 表1). CD31计数也与MVD计数相类似的结果.

2.3 肿瘤相关指标 对照组的AFP有异常升高. 化疗组、法安明组、联合组的AFP比对照组有明显降低(P<0.05, 表1).

3 讨论

肝癌总体预后较差, 主要与肝癌富有血供, 并具有较强的侵袭性有关. 有学者于1970年代首次提出“肿瘤生长依赖于血管形成”的观点[1]. 一系

■创新盘点

本研究重点观察肿瘤微血管密度等数值来探讨法安明对其早期肝癌生长抑制的效果进行初步评价.

■应用要点
本实验结果显示法安明通过抑制肿瘤血管形成, 对体内早期肝癌生长具有抑制作用.

表 1 各实验组实验结果比较览表 (mean ± SD, n = 10)

分组	肿瘤体积(mm^3)	抑瘤率(%)	肿瘤微血管密度	甲胎蛋白(mg/L)
对照组	68.47 ± 22.04	0	19.34 ± 3.57	22.20 ± 6.29
化疗组	26.25 ± 11.55^b	61.66	17.10 ± 3.03	14.56 ± 8.87^b
法安明组	33.70 ± 14.78^b	50.78	5.20 ± 1.55^{bd}	13.36 ± 7.60^b
联合组	17.25 ± 6.80^{bf}	74.81	4.70 ± 2.21^{bd}	11.57 ± 7.82^b

^bP<0.01 *vs* 对照组; ^dP<0.01 *vs* 化疗组; ^fP<0.01 *vs* 法安明组.

列研究也证实, 血管的生成是体积大于1-2 mm^{3}实体瘤生长和癌细胞转移的前提条件[8]. 我们在以前的研究已经发现了达肝素钠对肝癌生长有抑制作用, 对其他脏器的转移也有抑制的作用[9], 本实验的研究是要观察在早期的肝癌动物模型上达肝素钠是否对肝癌的生长有抑制作用.

我们选用法安明较肝素有以下优点: 抗凝血Xa因子作用更强、抗凝血IIa因子作用弱、抗血栓作用强、出血副作用小; 分子质量小, 生物利用度高, 血浆半衰期长; 能与肝素不结合的蛋白相结合, 因此有更稳定的量效关系. 法安明具有皮下注射生物利用度高(90%)和副作用小等特点, 为此被选为实验用药.

研究表明肝素影响血管内皮细胞增生是通过影响血管形成因子, 特别是成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGFs)与血管内皮生长因子(VEGFs)来完成的. 低分子肝素可通过竞争性结合细胞硫酸乙酰肝素受体来抑制血管形成, 能阻止细胞外组成物的溶解、细胞黏附以及细胞扩增与迁移, 并起一定的屏障作用[5]; 关键肝素能阻止肿瘤对血管与组织的侵犯[8]. 已有研究证实, 低分子肝素可以抑制肝素酶的活性和减少肿瘤转移[8-10]. 同时有研究表明低分子量肝素有下调COX-2的作用, 通过一系列途径作用VEGF基因, 减少VEGF mRNA和蛋白水平的上调, 进而减少肿瘤新生血管的产生. 阻止肿瘤对血管与组织的侵犯, 结合生长因子以及血管生成蛋白抑制肿瘤血管的形成; 肝素是多糖类药物有抗癌作用; 法安明经研究证实可抑制肝素酶活性和减少肿瘤转移[11-12].

本实验结果提示: 法安明可抑制肿瘤生长, 与对照组比较尤其明显, 但是不如化疗组, 与化疗药物联合并不能增加疗效, 提示抗肿瘤不仅仅是抗肿瘤药物的单纯叠加那么简单, 如何有协同作用尚需进一步研究. 结果还提示: 低分子肝素法安明可降低MVD表达, 从而证实了法安明有抑制肿瘤血管形成的作用. 本研究结果还表明: 低分子肝素法安明可使AFP降低. 本研究表明肝癌诱导产生大量结构和功能异常的血管, 如管壁不完整和缺乏基膜等, 此时肿瘤细胞极易脱离母瘤而进入血管并形成转移. 法安明通过抑制肿瘤新生血管形成, 减少了肝癌细胞血液转移的途径.

实验结果表明法安明在肝癌转移模型中有抑制肿瘤生长作用, 通过抑制肿瘤血管形成有良好的抑制肿瘤转移的作用. 探索法安明是否有临床价值尚需通过进一步大样本实验和临床研究. 法安明抑制肿瘤的最低有效剂量也有待于进一步研究. 同时在法安明中产生抑制肿瘤生长、转移作用的有效结构或者基团也有待于进一步探索与研究.

本研究中观察到, 对照组实体瘤血管形成, 且新生血管缺乏周细胞, 基底膜不完整, 使癌细胞具有侵袭、转移的潜能, 易进入血液循环, 并远处转移. 化疗组与对照组相比, MVD差异无显著意义; 而低分子肝素组与联合组MVD明显低于化疗组和对照组, 肿瘤血管内皮细胞处于静止状态, 几乎无新生血管形成, 癌细胞处于休眠状态. MVD、SMA以及VEGF的阳性率均有明显减少, 导致肿瘤组织的体积、肿瘤分泌的AFP、CEA等均有明显减少. 故低分子肝素的应用有一定的抑瘤率, 同时减少了肿瘤新生血管的形成. 同时由于肿瘤组织的血管壁不完整, 缺乏完整的平滑肌, 有报道顺铂等化疗药物有一定抑制血管平滑肌作用, 所以SMA的表达在各治疗组之间没有明显的区别, 与对照组相比有意义. 对本研究中联合组疗效较化疗组略差, 可能与低分子肝素抑制新生血管形成, 使得肿瘤组织内形成新生血管大为减少, 导致化疗药物进入肿瘤组织减少有关[10]. 血管生成抑制剂的应用, 为解决传统化疗药物肿瘤耐药问题提供了一个新的思路. 一方面, 血管生成抑制剂有望成为传统化疗后新的一种药物治疗手段; 另一方面, 应用血管生成抑制剂又可能抑制残留病灶

的生长, 也可使微小转移灶处于休眠状态, 从而控制微小病灶引起的临床复发与转移, 达到肿瘤亚临床治疗的新水平[11-12], 低分子肝素可能具有此作用.

本实验结果证实低分子肝素通过抑制肿瘤血管形成, 对体内早期肝癌生长具有抑制作用. 血管生成抑制剂与传统化疗药物的序贯性治疗有待进一步研究证实. 同时低分子肝素治疗剂量与抑制肿瘤的关系也有待进一步研究.

4 参考文献

1 Bereczky B, Gilly R, Rásó E, Vágó A, Tímár J, Tóvári J. Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22: 69-76

2 王凤山, 刘永锋. 转移性肝癌的治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 115-119

3 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257

4 徐克成, 牛立志. 肝癌的冷冻治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 229-235

5 Sun FX, Tang ZY, Lui KD, Ye SL, Xue Q, Gao DM, Ma ZC. Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice via orthotopic implantation of histologically intact tissues. *Int J Cancer* 1996; 66: 239-243

6 程树群, 周信达, 汤钊猷. 高功率聚焦超声联合肝素可的松治疗肝癌的实验研究. 中华消化杂志 1999; 19: 10-12

7 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887

8 Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, van Hinsbergh VW. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res* 2000; 60: 6196-6200

9 阎钧, 郑起, 汪昱, 陆洪芬, 薛琼, 汤钊猷. 达肝素钠对肝癌生长转移抑制的实验研究. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 359-361

10 Zcharia E, Metzger S, Chajek-Shaul T, Friedmann Y, Pappo O, Aviv A, Elkin M, Pecker I, Peretz T, Vlodavsky I. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and mammary gland morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 311-322

11 El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1299-1305

12 Abe W, Ikejima K, Lang T, Okumura K, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Low molecular weight heparin prevents hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol* 2007; 46: 286-294

■**同行评价**
本研究设计合理, 数据可靠, 结果可信, 具有非常重要的意义和应用前景.

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 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2516-2520
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

大鼠肝部分切除术的应用解剖及实施

史冀华, 朱盛兴, 张水军

■背景资料
大鼠肝部分切除术模型主要应用于肝脏肿瘤、急慢性肝衰、肝脏再生和肝脏移植等模型的研究. 随着临床减体积肝移植等新技术的实施和发展, 对大鼠肝部分切除术模型的制作也提出了新的要求.

史冀华, 张水军, 郑州大学第一附属医院外科 河南省郑州市 450052
朱盛兴, 郑州市第五人民医院普外科 河南省郑州市 450052
作者贡献分布: 此课题由史冀华和张水军设计; 研究过程和论文写作由史冀华与朱盛兴完成, 张水军指导和监督.
通讯作者: 张水军, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院外科. zhangshuijun@zzu.edu.cn
电话: 0371-66862121
收稿日期: 2008-05-20 修回日期: 2008-06-24
接受日期: 2008-06-30 在线出版日期: 2008-08-08

Applied anatomy of liver and partial hepatectomy in rats

Ji-Hua Shi, Sheng-Xing Zhu, Shui-Jun Zhang

Ji-Hua Shi, Shui-Jun Zhang, Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Sheng-Xing Zhu, Department of General Surgery, the Fifth People Hospital of Zhengzhou Ciy, Zhengzhou 450000, Henan Province, China
Correspondence to: Professor Shui-Jun Zhang, Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhangshuijun@zzu.edu.cn
Received: 2008-05-20 Revised: 2008-06-24
Accepted: 2008-06-30 Published online: 2008-08-08

Abstract
AIM: To observe the anatomy of liver and its accessory ducts in Wistar rats, and to establish an experimental model of partial hepatectomy.

METHODS: Through *in vivo* and *in vitro* specimens and observation after hepatic lobectomy, we clarified the hepatic location, lobes, accessory ducts and their neighborhood characters of 40 rats. Another 54 rats were classified into 9 groups depending on the amount to be resected. Then partial hepatectomy was conducted using bloodless liver resection and the remnant lobes and the survival of rats were observed.

RESULTS: The shape and weight ratio of each lobe kept relatively constant. Each lobe had independent Glisson system and hepatic vein system, so hepatic lobectomy could be performed easily after ligation of pedicles. The partial hepatectomy with different sizes from 10% to 90% were performed successfully according to different combinations of hepatic lobes.

CONCLUSION: Applied anatomy based on the four divisions of liver and employment of bloodless hepatectomy are the keys to perform partial hepatectomy.

Key Words: Rat; Liver; Applied anatomy; Partial hepatectomy; Bloodless liver resection

Shi JH, Zhu SX, Zhang SJ. Applied anatomy of liver and partial hepatectomy in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2516-2520

摘要
目的: 对Wistar大鼠肝脏及脉管进行系统的解剖学观测, 并建立肝部分切除术的实验模型.

方法: 对40只大鼠原位观测、肝叶切除和离体观测, 明确大鼠肝脏位置、分叶、脉管系统以及比邻的特征; 54只大鼠按照切除体积的不同, 随机分为9组, 应用无血切肝技术, 实施大鼠原位肝部分切除术, 观察术后肝叶和大鼠生存情况.

结果: 各肝叶形态、比例较为恒定, 均有相对独立的Glisson系统和肝静脉回流系统, 易于结扎肝蒂行肝叶切除. 按照不同的肝叶组合, 成功实施了切除比例为10%-90%肝部分切除术.

结论: 以肝叶4分法为基础的肝脏应用解剖和无血切肝技术的应用是实施大鼠不同切除比例的肝部分切除术的关键.

关键词: 大鼠; 肝脏; 应用解剖; 肝部分切除术; 无血切肝术

史冀华, 朱盛兴, 张水军. 大鼠肝部分切除术的应用解剖及实施. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2516-2520
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2516.asp

0 引言
大鼠肝部分切除术模型是Higgins和Anderson *et al*[1]首先创建, 主要应用于肝脏肿瘤、急慢性肝衰、肝脏再生和肝脏移植等模型的研究. 随

■同行评议者
邱伟华, 副主任医师, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

着临床减体积肝移植等新技术的实施和发展, 对大鼠肝部分切除术模型的制作也提出了新的要求. 然而关于大鼠肝脏解剖系统研究报道很少, 现有的文献中关于大鼠肝脏的解剖学描述简短、混乱[2-5]. 本实验在Gershbein *et al*[4]和吕毅 *et al*[5]研究基础上, 对94只成年Wistar大鼠肝脏进行系统的解剖学观测并实施肝部分切除术, 为大鼠肝部分切除术为基础的研究提供解剖基础和实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年Wistar大鼠94只, 雌雄不拘, 10-12 wk龄, 体质量180-230 g, 由河南省实验动物中心提供, 排除器官左右易位者. 器械主要有SXP-1手术显微镜, 显微外科手术器械, 托盘式扭力天平(TN-100B), 自制电热烧灼器和自制鼠台. 所有操作均在清洁的环境下实施.

1.2 方法 所有大鼠术前禁食12 h、禁水4 h. 40 g/L水合氯醛麻醉后固定于鼠板. 腹部正中切口脱毛, 30 g/L碘伏消毒. 参照Kamada *et al*[6]方法, 游离肝脏周围的韧带, 显露大鼠肝脏, 游离第一肝门中肝动脉、门静脉和胆道.

1.2.1 原位观测和肝叶切除: 对30只大鼠肝脏行解剖学观察, 测量肝脏附属管道的长度和内径进行测量. 参照Higgins和Anderson *et al*[1]大鼠肝部分切除术, 在本研究观测的肝脏解剖的基础上, 实施规则的原位肝叶切除. 用棉签拨起肝脏, 显露各叶肝蒂. 按照Kubota *et al*方法改进, 采用无血切肝术即先使用7-0丝线集束结扎各肝叶Glisson系统, 3-0丝线结扎含肝叶静脉的肝蒂后切断肝叶[7-9]. 沿逆时针方向依次切除乳头叶、左外叶、左内叶、中叶、三角叶和右外叶, 测量各叶肝脏湿重和比重. 注意结扎、切除时左外叶和左内叶应远离第二肝门, 以免影响其他肝叶静脉回流; 结扎、切除肝中叶、右外叶和三角叶时应距离下腔静脉(PVC)3 mm, 3-0丝线缝扎肝组织断面.

1.2.2 离体观测: 10只大鼠, 使用Kamada *et al*[6]方法沿经肠系膜总静脉(CMV)使用0-4℃肝素生理盐水10 mL(含肝素500 IU)原位灌注肝脏后, 取下肝脏, 保持其完整性. 沿腹侧切开PVC, 观察第二肝门; 切断各叶肝蒂, 分别称质量.

1.2.3 大鼠原位肝部分切除术: 54只大鼠按照切除肝脏部位和剩余肝脏体积的不同, 随机分为9组: 乳头叶切除组(C组), 肝左叶(含左外叶和左内叶)切除组(L组), 肝中叶切除组(M组), 肝右叶(右外叶和三角叶)切除组(R组), 乳头叶和肝左叶切除组(50%组), 左外叶和肝中叶切除组(40%组), 肝左叶和肝中叶切除组(30%组), 乳头叶、肝左叶和肝中叶切除组(20%组), 肝左叶、肝中叶和肝右叶切除组(10%组). 每组6只, 均采用上述无血切肝术依次切除上述各肝叶, 保留第一肝门Glisson系统和肝上、下下腔静脉. 3-0丝线连续缝合腹部切口, 术后观察大鼠生存情况, 予保暖、50 g/L葡萄糖饮饲. 术后1 d后再次手术, CMV插管、使用0-4℃肝素生理盐水10 mL(含肝素500 IU)原位灌注剩余肝叶, 观察肝叶灌注情况.

统计学处理 记录各组大鼠的体质量、肝质量和各肝叶的质量以及各组肝部分切除术的手术成功率和1 d生存率, 结果用mean±SD表示.

2 结果

2.1 肝脏应用解剖

2.1.1 肝脏分叶及形态: 大鼠肝脏分为6叶, 以肝门为中心逆时针依次为乳头叶(2叶)、左外叶、左内叶、中叶、右外叶和三角叶. 各叶均具一肝蒂, 为Glisson系统和肝静脉系统出入. 乳头叶离开肝门分为腹、背两个叶片, 相互交错、重叠; 中叶与左内叶在镰状韧带附着处通过间质组织(interstitial tissue)和血管相连; 右外叶与三角叶环形包裹PVC并沿PVC相互移行, 在PVC左侧与乳头叶相连; 三角叶呈狭长三棱锥形, “锥尖”指向外侧, 锥底紧贴PVC. 除三角叶外, 其余各肝叶为薄片样结构, 其中央钝厚, 外缘薄锐, 分隔脏两面, 隔面稍凸, 脏面微凹, 缘呈圆弧状. 原位观测和离体观测的40份肝脏及各肝叶质量资料见表1.

2.1.2 位置及毗邻: 大鼠肝脏位于横膈以后、腹腔头侧. 两片乳头叶嵌于胃小弯, 其周缘从背腹两面夹胃小弯. 左外叶左缘和食道相邻, 中叶和左内叶又将几乎全部右外叶和左外叶的1/2遮盖, 肝下缘和十二指肠、空肠、横结肠、胰腺组织相邻. 三角叶与右肾、右肾上腺相毗邻.

2.1.3 肝脏的韧带: 镰状韧带: 起于中叶与左内叶交界处头侧1/2, 矢向止于隔肌; 冠状韧带: 起于左外叶、左内叶、中叶、右外叶的脏隔面交界线, 冠状位止于膈弯; 肝食管韧带: 起于左外叶, 止于食道, 内有血管交通支; 肝胃韧带: 起于第一肝门, 包裹乳头叶, 止于胃小弯; 肝十二指肠韧带: 起于第一肝门, 止于十二指肠, 内有肝动脉、门静脉和胆道, 门静脉位于背侧, 其腹侧偏

■**研发前沿**
近年来肝移植近期效果的提高以及减体积肝移植、背驮式肝移植等新的外科技术的发展, 极大推动了肝脏基础研究, 也对新的实验模型的建立以及相关的大鼠肝脏解剖的研究提出了新的要求.

■**创新盘点**
本研究对大鼠肝脏及脉管进行系统的解剖学观测，并建立肝部分切除术的实验模型，发现各肝叶形态、比例较为恒定，均有相对独立的Glisson系统和肝静脉回流系统，易于结扎肝蒂行肝叶切除；并按照不同的肝叶组合，成功实施了切除比例为10%-90%肝部分切除术.

表 1 肝脏及各肝叶质量资料 (n = 40)

	全肝	肝乳头叶	肝左叶		肝中叶	肝右叶	
		乳头叶	左外叶	左内叶	中叶	右外叶	三角叶
质量(g)	7.45 ± 0.69	0.59 ± 0.13	2.24 ± 0.49	0.77 ± 0.13	2.07 ± 0.22	1.14 ± 0.21	0.58 ± 0.16
百分比(%)	100	7.9	30.1	10.3	27.8	15.3	7.8

大鼠体质量213.3 ± 10.6 g.

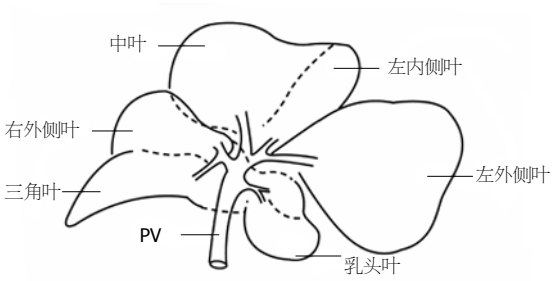


图 1 肝脏各肝叶及Glisson系统示意图.

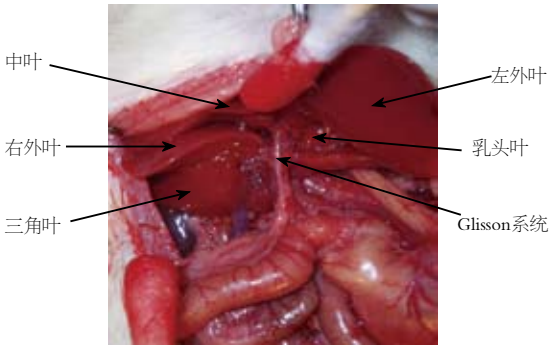


图 2 肝脏部分肝叶及Glisson系统.

左为肝动脉、紧贴门静脉，偏右为胆道；肝肾韧带：起于三角叶，止于右肾前极，右肾上腺静脉包埋于此韧带中；肝后腔韧带：起于三角叶、右外叶，背侧止于肝后膈肌、肾上腺.

2.1.4 肝脏脉管系统：大鼠肝脏脉管系统主要包括Glisson系统和肝静脉. 肝动脉：肝总动脉起自腹腔干动脉，向右头侧走行，继之转向腹侧，位于肝十二指肠韧带内门静脉及胆管左侧，发出胰十二指肠动脉和胃右动脉后，即延续为肝固有动脉，直达肝门，分左、右、头三支入肝实质. 门静脉：由肠系膜总静脉和脾静脉汇合而成，位于肝十二指肠韧带右侧缘背方，沿途收纳幽门静脉回流. 胆道：大鼠无胆囊，各肝胆管直接汇合成胆总管，在肝十二指肠韧带内，位于PV腹侧及肝动脉右侧，尾段被弥散的胰腺组织包绕，在十二指肠左背侧进入肠腔. PVC：肝上PVC较粗短. 肝背PVC被肝中叶、左内叶及右外叶、三角叶的肝组织包绕，出三角叶后即延续为肝下PVC.

第一肝门为Glisson系统入肝处，在肝外易游离各管道. 肝动脉、门静脉和胆道及其分支全程相伴，在肝内三者走行基本一致. Glisson系统在肝门分为三支，分别走向左、右、头方. 左支进入两片乳头叶，右支入右外叶前分支至三角叶. 头支较粗，分二支，分别入中叶和左外叶、左内叶.

肝静脉系统与Glisson系统在肝内空间上交叉分布，出各叶肝实质时，与各叶Glisson系统距

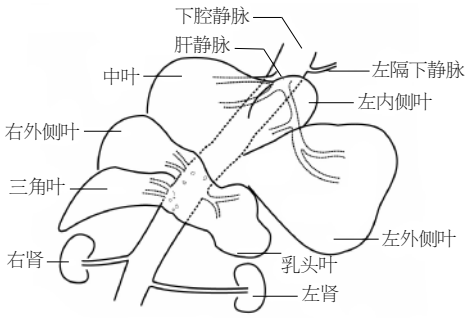


图 3 肝脏各肝叶、肝静脉和下腔静脉系统示意图.

离甚近，近向背侧分别开口于PVC. 乳头二叶静脉汇合后形成共干、肝组织包裹形成肝蒂，开口于PVC左侧壁；右外叶、三角叶除各有2-3支较大的静脉开口于PVC右侧壁外，另有数支微小肝静脉直接沿PVC背侧弥散汇入. 左外叶二支静脉与左内叶静脉汇合后形成肝左静脉，中叶内含肝中静脉(镰状韧带附着处右侧约3 mm肝实质内)和肝右静脉. 大鼠第二肝门为肝背段PVC腹侧壁前部分，是肝左静脉、肝中静脉和肝右静脉开口进入PVC处(图1-3).

2.2 肝部分切除术的实施 在肝脏观测和肝叶切除的基础上实施原位肝部分切除术，切除肝脏比例为10%-90%，手术成功率100%，术中无因结扎线脱落致门静脉、肝动脉或下腔静脉大出血、胆瘘等. 50%组、40%组、30%组、20%组和10%组大鼠术后均出现精神萎靡不振、嗜睡

状态, 6-12 h后恢复自由饮水、活动; 10%组大鼠1 d生存率均为83%(5/6), 其余8组大鼠1 d生存率均为100%. 肝素生理盐水原位灌注后剩余肝叶皆变淡白色, 无血管扭曲或局段血栓栓塞形成, 切除各叶断面无渗漏(表2).

3 讨论

根据原位、离体标本的观察研究以及原位肝叶切除术的实施情况, 本研究对大鼠肝叶和Glisson系统, 特别对下腔静脉和肝静脉进行了系统解剖; 较Madrahimov *et al*[3]更系统的揭示了大鼠下腔静脉和肝静脉与肝脏的解剖比邻情况. 该结果为按照不同比例切肝、研究部分肝切除后再生规律和减体积肝移植移植物的选取等提供了理想的实验模型. 在吕毅 *et al*[5]肝脏分为6叶的基础上, 按照大鼠肝脏Glisson系统和肝静脉系统的特征, 将肝脏分为4个解剖功能单位: 乳头叶、肝左叶(包括左外叶和左内叶)、肝中叶和肝右叶(包括右外叶和三角叶). 并按照以上分叶方法, 使用不同的组合构成不同的肝切除比例, 规范了肝叶切除程序.

在熟悉肝脏解剖的基础上, 成功实施了大鼠肝脏各叶切除术以及切除比例为10%-90%肝部分切除术, 术后短期生存率优于同类研究报道[10-13]. 总结其操作要点有: (1)熟悉大鼠肝叶解剖特征. 本研究表明肝脏按各肝叶重量百分比计, 从大到小依次为左外叶、中叶、右外叶、左内叶、三角叶和乳头叶, 各肝叶形态、比例较为恒定, 这与吕毅 *et al*[5]、Palmes *et al*[10]研究结果基本一致. 肝脏各叶有相对独立的Glisson系统和肝静脉回流系统[14], 易于绕线以阻断血流, 或结扎肝蒂行肝叶切除. 肝乳头叶、左外叶单独切除较容易. 左内叶与中叶头侧部分相连不易独立切除某一叶, 但使用无血切肝术、3-0丝线连续缝合断面, 左内叶与中叶也可分离. 肝右外叶和三角叶包绕下腔静脉, 且有较多微小静脉直接开口下腔静脉, 不易彻底切除. (2)注意肝叶周围组织及其游离. 肝镰状韧带是分隔肝中叶和左内叶的表面标志, 他将中叶和左内叶矢状位固定于横隔, 只有切断此韧带, 向尾端轻拨中叶和左内叶, 方能暴露和游离肝上PVC. 冠状韧带将除三角叶和乳头叶外的其他肝叶冠状位固定于横隔, 切断此韧带, 可游离左内叶、左外叶、中叶和右外叶. 肝胃韧带背腹两层内夹两片乳头叶, 游离乳头叶必须切开肝胃韧带. 肝十二指肠韧带内含构成Glisson系统的三条管道,

表 2 各组肝切除肝叶的情况 (n = 6)

分组	切除肝叶	剩余肝叶	保留肝脏(%)
C组	C	L, M, R	90
L组	L	C, M, R	60
M组	M	C, L, R	70
R组	R	C, L, M	80
50%组	C, R	M, R	50
40%组	LL, M	C, LC, R	40
30%组	L, M	C, R	30
20%组	C, L, M	R	20
10%组	L, M, R	C	10

C: 乳头叶; L: 肝左叶; LL: 左外叶; LC: 左内叶; M: 中叶; R: 肝右叶; RL: 右外叶; RLI: 三角叶.

将胃及肠管拨向左、尾方才直接暴露此韧带, 游离门静脉. 肝肾韧带内有右肾前腺静脉, 切断时需结扎此静脉或烧灼确切. 固定三角叶除肝肾韧带外, 还有肝后腔韧带. 肝食道韧带中有细血管交通支, 切断前应先予结扎或烧灼. 肝叶间韧带将左外叶和乳头叶维系在一起, 游离左外叶和乳头叶前应先剪开此韧带. (3)以显微外科技术为基础的无血切肝技术, 已使大鼠的各个肝叶切除术以及各种体积的切除术成为可能[10]. 但应避免肝脏出血、胆漏或血管扭曲. 在确认切除的肝组织后, 沿门静脉分支确认切除肝叶的Glisson系统. 先使用7-0丝线紧贴肝组织集束结扎各肝叶Glisson系统, 3-0丝线结扎含肝叶静脉的肝蒂后切断肝叶. 各肝叶均有独立的管道系统出入肝蒂, 行肝蒂阻断或切除的操作并不复杂. 需要指出, 左外叶、左内叶脉管紧邻、空间位置关系密切, 行一叶肝蒂结扎时, 极易影响另一肝叶蒂的血供. 在国内外的研究报道[5-6,15]倾向于将左内叶与肝中叶视为同一解剖单位观点的基础上, 本研究从二叶脉管关系和肝叶切除的实际考虑出发, 将左外叶和左内叶合并为同一解剖单位-肝左叶. 同样, 肝右外叶和三角叶位置紧邻、与下腔静脉的解剖紧密, 将肝右外叶和三角叶归为肝右叶.

总之, 本研究在对大鼠肝脏系统解剖的基础上, 按照大鼠肝脏Glisson系统和肝静脉系统的特征, 将肝脏分为乳头叶、肝左叶、肝中叶和肝右叶4个解剖功能单位; 应用无血切肝技术, 成功实施了大鼠10%-90%的肝部分切除术. 大鼠术后短期存活好, 剩余肝脏保留了胆总管、肝动脉、门静脉主干和下腔静脉的结构, 为袖套法减体积肝移植的实施奠定了基础. 以此为

■**应用要点**
本文证实以肝叶4分法为基础的肝脏应用解剖和无血切肝技术的应用是实施大鼠不同切除比例的肝部分切除术的关键.

■同行评价
本研究内容详细具体, 研究方法先进, 紧密结合目前动物实验中的核心问题, 具有重要的现实意义.

基础, 肝脏再生, 急性肝脏衰竭以及减体积肝移植模型的建立及其机制有待于进一步探讨.

4 参考文献

1 Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. 1. Restoration of liver of white rat following surgical removal. *Arch Pathol Lab Med* 1931; 12: 186-202
2 Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int* 2007; 27: 384-392
3 Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg* 2006; 244: 89-98
4 Gershbein LL, Elias H. Observations on the anatomy of the rat liver. *Anat Rec* 1954; 120: 85-98
5 吕毅, 潘承恩, 孟令忠, 刘学民. SD大鼠肝脏及附属管道的应用解剖. 西安医科大学学报(中文版) 1998; 19: 70-73
6 Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69
7 Kubota T, Tanabe K, Yang M, Sekido H, Endo I, Ichikawa Y, Togo S, Shimada H. Minimum sizes for remnant and transplanted livers in rats. *J Hep Bil Pancr Surg* 1997; 4: 398-404
8 Tanaka H, Hashizume K, Enosawa S, Suzuki S. Successful transplantation of a 20% partial liver graft in rats: a technical innovation. *J Surg Res* 2003; 110: 409-412
9 Rodríguez G, Lorente L, Durán HJ, Aller MA, Arias J. A 70% hepatectomy in the rat using a microsurgical technique. *Int Surg* 1999; 84: 135-138
10 Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004; 25: 1601-1611
11 Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 1997; 121: 142-149
12 Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4: 902-904
13 Kim WH, Lee JH, Han SU, Jin YM, Kwak YS, Wang HJ, Kim MW. Systematic analysis of the effects of hepatocyte transplantation on rats with acute liver failure. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 371-374
14 Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hep Bil Pancr Surg* 1999; 6: 171–175
15 Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 2008; 28: 3-11

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/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃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 cm×4.5 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 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2521-2524
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

改良双袖套法大鼠原位肝移植500例

刘 静, 陈 福, 陈达丰, 刘 旋, 杨爱国, 汪 爽, 孙尔维

刘静, 陈达丰, 刘旋, 厦门大学附属东南医院; 中国人民解放军第一七五医院肿瘤治疗中心 福建省漳州市 363000
陈福, 厦门大学医学院动物中心 福建省厦门市 361000
杨爱国, 厦门大学附属东南医院; 中国人民解放军第一七五医院普外科 福建省漳州市 363000
汪爽, 孙尔维, 南方医科大学珠江医院器官移植科 广东省广州市 510282
国家自然科学基金资助项目, No. 39970705
福建省青年人才资助项目, No. 2004F3147
漳州市科技资助项目, No. 2006Z06076
作者贡献分布: 刘静与陈福对此文所作贡献均等; 此课题由刘静, 陈福, 汪爽及孙尔维设计; 研究过程由刘静, 陈福, 陈达丰, 刘旋, 杨爱国, 汪爽及孙尔维操作完成; 研究所用动物由刘静与孙尔维提供; 数据分析由刘静, 陈福与陈达丰完成; 本论文写作由刘静, 陈福, 陈达丰及刘旋完成.
通讯作者: 刘静, 363000, 福建漳州市漳华路, 厦门大学附属东南医院; 中国人民解放军第一七五医院肿瘤治疗中心.
ljdoctor@hotmail.com
电话: 0596-2936361-395839 传真: 0596-2975534
收稿日期: 2008-04-20 修回日期: 2008-07-05
接受日期: 2008-07-07 在线出版日期: 2008-08-08

Othotopic liver transplantation in 500 rats using a reformed two-cuff method

Jing Liu, Fu Chen, Da-Feng Chen, Xuan Liu, Ai-Guo Yang, Shuang Wang, Er-Wei Sun

Jing Liu, Da-Feng Chen, Xuan Liu, Center of Tumor Therapy, the 175th Hospital of Chinese PLA; Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
Fu Chen, Animal Center of Medical College, Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian Province, China
Ai-Guo Yang, Department of General Surgery, the 175th Hospital of Chinese PLA; Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
Shuang Wang, Er-Wei Sun, Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 39970705; the Talented Youth Project of Fujian Province, No. 2004F3147; and the Science and Technology Project of Zhangzhou City, No. 2006Z06076
Correspondence to: Jing Liu, Center of Tumor Therapy, the 175 Hospital of Chinese PLA; Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China. ljdoctor@hotmail.com
Received: 2008-04-20 Revised: 2008-07-05
Accepted: 2008-07-07 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To improve the method of rat othotopic liver transplantation using two cuffs and shorten anhepatic phase, and to raise the success rate of operation.

METHODS: The animals used in formal trial were divided five groups: (1) liver transplantation on normal rats was carried out after infusing apoptotic splenocytes of donors 1 wk before transplantation (including 4 subgroups); (2) liver transplantation on normal rats was carried out with simultaneous injection of apoptotic splenocytes from donors (including); (3) apoptotic splenocytes of donors were infused after liver transplantation on normal rats was carried out (including 4 subgroups); (4) liver transplantation on cirrhotic rats was carried out after infusing apoptotic splenocytes of donors 1 wk before transplantation (including 4 subgroups); (5) liver transplantation on normal rats was carried out after infusing apoptotic lymphocytes of donors 1 wk before transplantation (including 3 subgroups). Each subgroup contained 10 rats. Operating time, 2-day and 1-week survival rate of rats were observed.

RESULTS: The operating time on donor rats, the warm ischemia time of donor livers, the time for cuff preparation, the operating time on recipient rats, the anhepatic phase and the cold ischemia time of donor livers were 30 ± 5 min, 2 ± 0.5 min, 10 ± 2 min, 51 ± 10 min, 16 ± 4 min and 61 ± 5 min, respectively, in formal trials. The 2-day and 1-week survival rates were 96.8% (184/190) and 95.3% (181/190), respectively.

CONCLUSION: The reformed two-method can simplify the operating procedure, reduce complication and raise the survival rates.

Key Words: Rat liver transplantation; Animal model; Two-cuff method

Liu J, Chen F, Chen DF, Liu X, Yang AG, Wang S, Sun EW. Othotopic liver transplantation in 500 rats using a reformed two-cuff method. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2521-2524

摘要

目的: 改进大鼠肝移植的方法, 缩短无肝期,

■背景资料
大鼠原位肝移植是常用肝移植动物模型. 最初由Lee *et al*在1973年报道, 但手术难度较大, 技术要求较高.

■同行评议者
邱宝安, 主任医师, 中国人民解放军海军总医院肝胆外科

■应用要点
本研究改进显露方法及肝上下腔静脉吻合方法后, 手术简化, 同时并发症减少, 生存率提高.

提高手术成功率, 总结大鼠原位肝移植经验.

方法: 正式实验分组: (1)预输注供者凋亡的脾细胞正常大鼠肝移植研究组(分4小组); (2)同期输注供者凋亡的脾细胞对正常大鼠肝移植研究组(分4小组); (3)术后输注供者凋亡的脾细胞正常大鼠肝移植研究组(分4小组); (4)预输注供者凋亡的脾细胞对肝硬化大鼠肝移植研究组(分4小组); (5)预输注供者凋亡的血液淋巴细胞对正常大鼠肝移植研究组(分3小组), 每小组各10只大鼠. 观察手术时间以及大鼠肝移植2 d和1 wk存活率.

结果: 在正式实验大鼠肝移植中, 供体手术时间30±5 min, 供肝热缺血时间2±0.5 min, 袖套准备及肝脏修整时间10±2 min, 受体手术时间51±10 min; 无肝期16±4 min. 冷缺血时间61±5 min. 正式实验大鼠肝移植2 d存活率96.8%(184/190), 1 wk存活率95.3%(181/190).

结论: 改进显露方法及肝上下腔静脉吻合方法后, 手术简化, 同时并发症减少, 生存率提高.

关键词: 大鼠肝移植; 动物模型; 双袖套法

刘静, 陈福, 陈达丰, 刘旋, 杨爱国, 汪爽, 孙尔维. 改良双袖套法大鼠原位肝移植500例. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2521-2524
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2521.asp

0 引言

大鼠原位肝移植是常用肝移植动物模型. 最初由Lee *et al*[1]在1973年报道, 但由于手术难度较大, 技术要求较高. 2000-03/2008-02, 我们在进行肝移植免疫耐受的诱导[2-3]、肝缺血预处理和药物预处理对肝移植中供肝保护效应的信号转导等研究中, 把Kamada *et al*[4]及孙君泓[5]的双袖套法肝移植术加以部分改进, 使得操作更加简便, 成功率提高, 取得了满意的结果.

1 材料和方法

1.1 材料 供、受体均为清洁级SD、Wistar、F344/N大鼠, 体质量200-300 g(购自中山大学实验动物中心及南方医科大学实验动物中心). 供体体质量等于或略低于受体. 术前禁食12 h, 术前15-30 min sc阿托品(0.03-0.04 mg/kg体质量)、禁水. 显微器械手术包、中号哈巴狗钳: 上海医疗器械厂生产; Satinsky钳: 德国马丁公司生产; 7/0、8/0及9/0无损伤手术缝线: 上海医用缝合线厂生产. 套管: 用棉棒(中山市塑料制品厂)制成门静脉套管及肝下下腔静脉套管; 用一次性硬膜外麻醉导管(浙江嘉兴市苏嘉医疗器械厂)制成胆管支架管. 乙醚溶液: 广东汕头西陇化工厂生产.

1.2 方法

1.2.1 套管的制作: 用壁薄有一定张力内径约为2.0、2.7 mm的棉棒切成管体长为3.5、4.5 mm, 管柄长2 mm, 用直血管钳在管体部钳夹一周使管体有槽, 并使管体内腔呈长圆柱型, 制成门静脉套管及肝下下腔静脉套管. 徒手或在沸水中将硬膜外麻醉导管拉成内径为0.7 mm至0.9 mm, 剪成为端面与长轴成30-45度的斜面, 长约7 mm的胆道支架管.

1.2.2 麻醉: 开放式吸入麻醉.

1.2.3 手术方法: 为清洁手术. (1)供体手术: 麻醉后仰卧位橡皮筋固定四肢, 腰部垫高, 酒精消毒, 取腹部横切口, 由剑突到耻骨联合的中点向两侧延至腰大肌前. 持针器钳夹剑突向头侧牵引固定, 自制弹性拉钩将季肋部向两侧牵拉, 游离左肾静脉水平以上的肝下下腔静脉(IVC), 结扎右肾动脉, 游离右肾静脉, 9/0丝线结扎切断. 切断右三角韧带及肝后韧带, 5/0丝线结扎切断右肾上腺静脉. 切断肝胃韧带, 结扎切断肝后食管段之间的血管支, 切断镰状韧带、左三角韧带. 7/0丝线缝扎切断左膈静脉. 在距肝门分叉约0.5 cm处胆总管前壁做一斜切口, 插入胆管支架管, 5/0丝线环扎固定. 9/0丝线结扎幽门静脉, 5/0丝线结扎肝总动脉, 在十二指肠上缘结扎除门静脉(PV)外的肝十二指肠韧带内所有组织. 游离PV至脾静脉汇合处. 阴茎背静脉注射肝素生理盐水1 mL(125 kU/L)后, 在脾静脉汇合以下阻断肠系膜上静脉及脾静脉, 切开PV, 插管, 4℃肝素生理盐水(12.5 kU/L)灌注肝脏8-10 mL, 灌注开始后即剪开左肾静脉汇合以下的下腔静脉, 使灌洗液顺利流出. 冰盐水纱布覆盖肝脏. 依次切断PV、IVC, 贴近膈肌剪断肝上下腔静脉(SVC). 取出供肝置4℃生理盐水中. (2)修整供肝: 在4℃生理盐水中进行. 修整PV, 用显微血管镊穿过PV套管腔夹住PV断端拖出, 管柄向肝前缘侧, 用血管夹夹住管柄及PV协助固定, 将PV外翻于套管体上, 反折线在幽门静脉汇合以上, 5/0丝线固定. 同法安装IVC套管, 反折线在右肾静脉汇合以上. 经PV注入少量4℃肝素生理盐水(12.5 kU/L), 以冲出肝内残留血液及检查套后的血管

是否通畅. 用一小血管夹夹闭IVC. 修整SVC, 用8/0缝线在左右两侧及前壁中点各缝一支持线. 将各肝叶复位, 置4℃生理盐水中, 纱布覆盖. (3)受体手术: 入腹腔及暴露方法同供体手术. 湿纱布保护肠管. 游离肝脏同前, 自肝下缘分离IVC至右肾静脉上缘, 结扎切断右肾上腺静脉、肝与食管段之间血管支和左膈静脉及韧带. 结扎并切断肝固有动脉、胆总管上端. 加深麻醉. 用7/0缝线在受体PV左右支预缝置牵引线, 左侧穿过残留的胆管系膜, 右侧贯穿肝实质.

待麻醉处于第Ⅲ期第三级后, 停止麻醉, 在右肾静脉上方阻断IVC, 于幽门静脉上方阻断PV. 将肝脏向下牵拉, 小Satinsky钳或哈巴狗钳阻断SVC, 紧贴肝脏剪断SVC, 于门静脉牵引线肝侧切断门静脉、动脉、胆管的分支, 带少许肝组织切断IVC. 移去受体肝, 原位置入供肝. Satinsky钳或哈巴狗向头侧翻转固定在橡皮泥上. 用供肝的SVC支持线在受体SVC断端两侧各缝合结扎固定一针, 并向两侧牵引. 用8/0缝合线将受体的SVC前壁中点缝合向头侧牵引, 供肝相应缝线向尾侧牵引. 先由左至右连续外翻缝合后壁, 然后用8/0缝线将供、受体前壁中点缝合单结结扎后向头侧牵引, 再由右向左连续缝合前壁. 结束吻合前用4℃生理盐水冲洗血管腔排气、湿润供肝. 肝叶复位, 向外上方牵引PV左右支缝线, 在PV分叉处V形切开, 瞬间开放PV约0.5 s排除血凝块后再阻断PV, 用自制接注射器的“小针钩”撑开PV管壁, 同时冲洗供、受体管腔, 将供体PV套入受体PV腔内, 5/0丝线环扎固定, 线结在供体套管固定线以下. 恢复PV血供, 去除SVC阻断钳. 在受体IVC断端两侧用7/0缝线各吊一针牵引线, 向外上方牵引, 同法吻合IVC. 距受体胆总管断端2 mm将受体胆总管前壁剪成V形口, 将已入供体胆管支架管另一端经此口套入胆总管, 5/0丝线固定, 用大网膜覆盖胆管吻合处. 棉球吸尽腹腔积液, 肠管复位, 腹腔留放含青霉素钠20万IU生理盐水1 mL. 两层缝合腹壁. 经阴茎背静脉注肝素生理盐水1 mL(12.5 kU/L). 颈背部皮下注射生理盐水5-10 mL.

保温0.5-1 h, 单笼喂养. 术后3 d内除给予饲料、水外, 另给予100 g/L葡萄糖水喂养.

1.2.4 实验分组: 正式实验中分组如下: (1)预输注供者凋亡的脾细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受的研究分四组(对照组, 单纯供体地塞米松处理组, 单纯输供者脾细胞组, 地塞米松诱导供者凋亡脾细胞输注组, 每组各10只Wistar、SD大鼠); (2)同期输注供者凋亡的脾细胞对大鼠肝移植免疫影响的研究分四组(对照组, 单纯供体地塞米松处理组, 单纯输供者脾细胞组和地塞米松诱导供者凋亡脾细胞输注组. 每组各10只Wistar、SD大鼠); (3)术后输注供者凋亡的脾细胞对大鼠肝移植免疫影响的研究分四组(对照组, 单纯供体地塞米松处理组, 单纯输供者脾细胞组和地塞米松诱导供者凋亡脾细胞输注组. 每组各10只Wistar、SD大鼠); (4)预输注供者凋亡的脾细胞对肝硬化大鼠肝移植免疫影响的研究分四组(对照组, 单纯供体地塞米松处理组, 单纯输供者脾细胞组, 地塞米松诱导供者凋亡脾细胞输注组, 每组各10只Wistar、SD大鼠); (5)预输注供者凋亡的血液淋巴细胞对大鼠肝移植免疫影响的研究分三组(对照组, 单纯供体淋巴细胞处理组, 已诱导供者凋亡淋巴细胞输注组, 每组各10只Wistar、SD大鼠). 共计190对大鼠.

2 结果

310例预试验中, 易出现的意外为SVC漏血、SVC成角狭窄、SVC撕裂、肝挫伤出血、气胸、空气栓塞、吻合口血栓、PV、IVC的套管扭转成角、胆漏、肝功能衰竭、麻醉死亡、分离PV、右肾上腺静脉、左膈静脉时相应的静脉破裂出血、腹腔及肺部感染.

按改进的二袖套法进行的190例正式实验中, 供体手术时间30±5 min, 供肝热缺血时间2±0.5 min, 袖套准备及肝脏修整时间10±2 min, 受体手术时间51±10 min; 无肝期: 16±4 min. 冷缺血时间: 61±5 min. 正式实验2 d存活率96.8%(184/190), SVC漏血死亡3例, SVC狭窄死亡2例, PV左分支破裂漏血1例; 1 wk存活率95.3%(181/190), 死亡原因为肝脏坏死. 1 wk后死亡的受体原因全部为胆道并发症, 最长生存时间超过1.5年.

3 讨论

经过前期的预实验, 我们在传统的双袖套法肝移植术的基础上, 对腹部横切口的选择、弹性拉钩牵开季肋部、供者右肾上腺动脉的结扎、分离PV的改进、受体PV缝扎牵引线的提前预置、使用橡皮泥固定钳夹SVC的器械、供、受体SVC前壁牵开、SVC的“三定点”吻合、自制“小针钩”的气泡驱除等方面进行了改进. 改进后的手术方式可单人直视下操作, 不需要

■同行评价
本研究把kamada及孙君泓的双袖套法肝移植术加以部分改进, 使得操作更加简单, 成功率高, 具有一定的实用性.

显微镜或助手协助, 使操作更加简单、确切, 手术成功率达到96.8%, 长期存活率为95.3%, 较孙君泓 *et al*[5]法报道的手术成功率(92.5%)与长期存活率(89%)为高. 笔者总结出“开放灌注四牵三缝二横一拉”法大鼠原位肝移植的无肝期, 手术时间缩短, 7 d生存率提高[6]. 本方法又以下优点: (1)管道的制作: 用止血钳钳夹管壁一圈形成刻痕, 制作方法简单. (2)横切口选择: 既往文献报道由于顾忌出血多及创伤大, 受体均采用腹部直切口[1,4-5,7-9]. 实际上直切口暴露较差, 而腹部横切口可充分暴露, 操作视野广阔, 更好地显露SVC, 提高吻合成功率, 并可减少对肝脏的翻动及损伤, 降低了手术的难度; 术中可以更直观地观察肝脏颜色及呼吸动度来监测麻醉深浅. 可棉球局部压迫腹壁进行止血, 效果好. (3)供肝的灌注: 供体全身肝素化后, 向PV边插管边排管中的气泡. 低压灌注肝脏, 在灌注的同时剪开下腔静脉放血. 灌注速度控制在2-3 mL/min, 以PV无扩张、肝不肿胀为宜. 可确保供肝灌注彻底、均匀、低压, 防止肝脏水肿、花斑. 并用冰盐水纱布覆盖肝脏, 使局部持续低温. (4)PV缝扎牵引线预置: 在无肝期前, 用8/0缝线在受体PV左右分支预置牵引线, 避免分离PV左右支时的可能出血, 以免阻断PV后行PV置牵引线, 缩短了无肝期. (5)供、受体SVC吻合 SVC吻合是受体手术的难点. 用横切口把受体腰部垫高, 用自制弹性拉钩将季肋部向两侧牵拉, 并用Satinsky钳或哈巴狗钳夹受体SVC后向头侧翻转固定, 使受体SVC与供体SVC在一个平面上, 既解决了吻合口的张力问题, 又把吻合口变浅, 避免了在狭小、深在的空间操作, 视野清晰, 无需显微镜即可操作. 为防止吻合口狭窄或成角, 应作SVC间的血管端端吻合, 而不是如某些文献[7-8]作膈肌环间的吻合. 采用“三定点”缝合法, 即缝合完后壁后, 将前壁中点吊起, 可确保吻合口均匀、整齐、光滑, 避免血管膜内翻及前后壁缝闭, 后期的实验发现: 连续缝合3针再一起收线不仅缝合均匀、对合良好而且加快吻合速度, 提高手术成功率. (6)气泡驱除: 可将注射器针头针尖弯成钩, 制成“小针钩”, 钩住少许血管断端前壁向前提拉以撑开血管壁作牵引, 在推注生理盐水排气泡同时插入套管完成吻合. 操作简单、确切、迅速, 无需助手协助.

4 参考文献

1 Lee S, Charters AC, Chandler JG, Orloff MJ. A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1973; 16: 664-669

2 刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维. 细胞凋亡与肝移植免疫耐受. 世界华人消化杂志 2004; 12: 446-447

3 Liu J, Gao Y, Wang S, Sun EW, Wang Y, Zhang Z, Shan YQ, Zhong SZ. Effect of operation-synchronizing transfusion of apoptotic spleen cells from donor rats on acute rejection of recipient rats after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1161-1166

4 Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69

5 孙君泓, 吴孟超, 曾琪华. 300次大鼠原位肝移植. 中华器官移植杂志 1990; 11: 19-20

6 刘静, 孙尔维, 汪爽, 李冉冉, 聂凯, 杨爱国, 高毅, 钟世镇. “开放灌注四牵三缝二横一拉”法行大鼠原位肝移植. 中华器官移植杂志 2005; 26: 695-696

7 田超睿, 姜汉英, 夏穗生. 受体肝分步切除的三袖套法大鼠原位肝移植术. 中华器官移植杂志 1999; 20: 152-153

8 王轩, 杨甲梅, 严以群, 姚晓平, 吴孟超. 大鼠原位肝移植不同术式的探讨. 中华器官移植杂志 1998; 19: 76-78

9 康俊升, 吴孟超. 大鼠原位肝移植的手术技巧初探. 实验动物科学与管理 1999; 16: 47-48

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2525-2528
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

沈阳地区药物性肝损伤病因和损伤类型

陈昶铭, 常 冰, 张 岱, 向国卿, 贺晓虎, 王炳元

陈昶铭, 常冰, 张岱, 向国卿, 贺晓虎, 王炳元, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
作者贡献分布: 陈昶铭与常冰对此文所作贡献均等; 此课题由陈昶铭, 常冰, 王炳元设计; 研究过程由陈昶铭, 常冰, 张岱, 向国卿, 贺晓虎操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由常冰提供; 数据分析由常冰完成; 本论文写作由陈昶铭, 常冰完成.
通讯作者: 王炳元, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第一临床医院消化内科. cb000216@163.com
电话: 024-23282199
收稿日期: 2008-03-27 修回日期: 2008-06-24
接受日期: 2008-07-02 在线出版日期: 2008-08-08

Etiology and injury types of drug-induced liver indury in Shenyang

Chang-Ming Chen, Bing Chang, Dai Zhang, Guo-Qing Xiang, Xiao-Hu He, Bing-Yuang Wang

Chang-Ming Chen, Bing Chang, Dai Zhang, Guo-Qing Xiang, Xiao-Hu He, Bing-Yuang Wang, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Bing-Yuang Wang Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cb000216@163.com
Received: 2008-03-27 Revised: 2008-06-24
Accepted: 2008-07-02 Published online: 2008-08-08

Abstract
AIM: To discuss the etiology and types of drug-induced liver injury (DILI) in Shenyang City of China.

METHODS: We retrospectively analyzed 181 patients diagnosed with DILI in gastrointestinal department of the first affiliated hospital of China Medical University from January 2000 to June 2004.

RESULTS: The common drugs that induced liver injury were Chinese herbal medicine (50.27%), antibiotics (15.47%), and non-steroid anti-inflammatory drugs (15.47%). Bilirubin paraeccrisis and enzyme changes were the main manifestations in biochemical examination, while protein synthesis at early stage hardly changed. The injuries included hepatic cell type (n = 106; 58.56%), cholestatis type (n = 36; 19.89%), mixed type (n = 17; 9.39%), and uncertained type (n = 22; 12.15%). Chinese herb-induced cholestasis was up to 83.3%, and its incidence rate was obviously higher than hepatic cell type (χ^2 = 78.981, P < 0.001). Other drugs induced hepatic cell injury most.

CONCLUSION: Half of DILI in Shenyang are caused by Chinese herbal medcine, and biochemical examnation can simply and roughly estimate its injury type.

Key Words: Drug-induced liver injury; Chinese herbal medicine; Biochemical examination

Chen CM, Chang B, Zhang D, Xiang GQ, He XH, Wang BY. Etiology and injury types of drug-induced liver indury in Shenyang. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2525-2528

摘要
目的: 探讨沈阳地区药物性损伤(drug-induced liver injury, DILI)的病因和损伤类型.

方法: 回顾性分析2000-01/2004-06在中国医科大学附属第一医院消化内科住院的DILI患者181例, 所有患者均诊断明确.

结果: 引起肝损伤的相关药物中最常见的为: 中草药类(50.27%); 抗生素类药物(15.47%); 非甾体类抗炎药(15.47%). 生化检查主要表现在酶学改变和胆红素排泄障碍, 而早期对蛋白合成功能几乎无影响. 损伤类型中肝细胞型106例(58.56%); 胆汁淤滞型36例(19.89%); 混合型17例(9.39%); 不确定的22例(12.15%). 中草药导致的胆汁淤积型中高达83.3%, 其发病率明显高于肝细胞型(χ^2 = 78.981, P<0.001); 其他药物均以肝细胞损伤为主.

结论: 沈阳地区50.27%的DILI是中草药引起, 单纯生化学检查可粗略估计DILI的细胞损伤类型, 即ALT增高反映肝细胞型, ALP、GGT增高反映胆道系统的损伤.

关键词: 药物性肝损伤; 中草药; 生化学检查

陈昶铭, 常冰, 张岱, 向国卿, 贺小虎, 王炳元. 沈阳地区药物性肝损伤病因和损伤类型. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2525-2528
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2525.asp

■背景资料
随着新药的不断问世, DILI的发病率也相应增加. 但由于DILI的临床和病理表现变化复杂, 且临床表现和实验室检查缺乏特异性, 易被误诊, 本文就DILI的临床及实验室特点进行分析总结.

■同行评议者
戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科; 陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

■相关报道
药物性肝病的诊断复杂, 2005年亚特兰大药物性肝病临床专题研讨会上提出的诊断药物性肝病的因果判断法, 对临床有一定指导作用.

0 引言

药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是指在使用某种或几种药物后, 由于药物本身或其代谢产物而引起的不同程度的肝脏损伤. 临床上既可以表现为急性肝损伤, 也可以表现慢性肝损伤, 甚至肝硬化. 随着新药的不断问世, DILI的发病率也相应增加. 但由于DILI的临床和病理表现变化复杂, 且临床表现和实验室检查缺乏特异性, 易被误诊, 据报道, 有10%-20%的爆发型肝功能衰竭是由药物导致的[1]. 本文对2000-01/2004-06在中国医科大学附属第一医院消化内科确诊为DILI患者的临床资料进行分析总结.

1 材料和方法

1.1 *材料* 2000-01/2004-06在中国医科大学附属第一医院收治住院的DILI患者共181例, 其中男性87例, 女性94例. 年龄8-85(平均年龄45.85±15.72)岁.

1.2 *方法* 采用回顾性分析方法, 在病案室以主题词“药物性肝损伤”检出189个相关病例, 对所有病例进行复习, 剔除不符合诊断标准的病例后, 共得到符合DILI诊断标准[1]的病例181例. 记录用药史, 临床症状, 体征, 肝功能及治疗情况等, 使用SPSS11.5对上述资料进行统计分析. 同时依据国际医学科学组织理事会(council for international organizations of medical sciences, CIOMS)确立的标准[2]对DILI进行临床分型, 分为肝细胞性、胆汁淤积性和混合性.

2 结果

2.1 *引起DILI的药物构成* 本组病例中引起DILI的药物几乎包括临床应用的各种药物, 前3位药物是中药、抗生素和非甾体类抗炎药, 其中中草药(以偏方或不明成分的药物为主)和中成药高达50.27%(表1).

2.2 *临床表现* 临床上近1/2(49.2%)以黄疸为首发表现, 乏力(46.4%)、纳差(39.8%)、腹痛(32.6%)恶心占(30.4%)、腹胀(19.3%)、腹泻(11.6%)等往往认为是原发病所致, 黄疸出来后才促使患者就诊, 所以DILI比其他原因所致肝病的病程较长.

2.3 *实验室检查* 本组DILI主要表现为肝功能异常. DILI的生化检查明显不同于其他肝病, 主要表现在酶学改变和胆红素排泄障碍, 而早期对蛋白合成功能几乎无影响, 但药物量大(如大剂量扑热息痛类或大量单味中草药)毒性大、晚期或严重肝坏死时蛋白变化就比较明显(表2). 根据肝功能实验结果, 参照国际DILI分型标准, 可将DILI分为3型, 在本组资料中肝细胞型106例(占全部药物性肝病的58.6%)平均年龄44.48±15.51岁, 其中男性55例, 女性51例, 临床表现为乏力、纳差、恶心, 腹痛等症状为主; 肝内胆汁淤积型36例(占全部药物性肝病的19.9%), 平均年龄49.61±17.07岁, 其中男性14例, 女性22例, 与肝细胞型相比在发病性别上没有显著性差异(χ^2 = 1.817, P = 0.178>0.05), 多表现为黄疸, 纳差, 乏力, 搔痒等症状为主. 无论肝细胞型或是胆汁淤积型, 中草药均占第1位, 但在胆汁淤积型中高达83.3%, 其中中草药导致的胆汁淤积型肝损伤的发病率明显高于肝细胞型的发病率(χ^2 = 78.981, P<0.001); 抗生素类和激素类均是肝细胞损伤型; 非甾体类消炎药和抗结核药物均以肝细胞损伤为主. 该结果对寻找致损伤药物和选择治疗方案具有非常重要的意义. 导致肝细胞型肝损伤的药物多为中草药(45.28%), 抗生素(17.92%), 非甾体类抗炎药(14.15%)等, 多在服药1 wk到1 mo发病, 停药后恢复较快. 导致胆汁淤积型肝损伤的药物多为中草药(83.33%), 非甾体类消炎药(5.56%)以及抗结核药(5.56%), 起病较隐匿, 服药时间均在1 mo以上, 停药后恢复

表 1 引起DILI的药物分布情况药物例数构成比

药品种类	n	%
中草药类	91	50.27
抗生素类药物	28	15.47
非甾体类抗炎药	28	15.47
抗结核药物	18	9.94
肿瘤化疗药	7	3.87
抗甲状腺药	7	3.87
激素类药	2	1.11
合计	181	100.00

表 2 药物性肝病的肝功能变化

名称	mean ± SD
ALT	582.54 ± 1763.59
ALP	217.63 ± 266.79
GGT	252.40 ± 249.66
TBIL	129.54 ± 164.16
DBIL	110.91 ± 119.06
TP	65.38 ± 9.71
ALB	37.22 ± 6.92

■创新盘点
引起药物性肝病的药物复杂, 本文就沈阳地区药物性肝病的特点进行分析, 提出中草药是目前导致药物性肝病的最常见原因.

表 3 DILI的分型与导致DILI的药物

药品名称	肝细胞型		胆汁淤积型	
	n	%	*n*	%
中草药类	48	45.28	30	83.33
抗生素类药物	19	17.92	0	0.00
非甾体类抗炎药	15	14.15	2	5.56
抗结核药物	14	13.21	2	5.56
肿瘤化疗药	3	2.83	1	2.78
抗甲状腺药	5	4.72	1	2.78
激素类药	2	1.89	0	0.00
合计	106	100.00	36	100.00

表 4 肝细胞型与胆汁淤积型实验室指标比较 (mean ± SD)

名称	肝细胞型	胆汁淤积型	*t*	*P*
ALT	848.13 ± 2242.19	125.02 ± 96.65	3.311	0.010
AST	428.03 ± 595.14	206.25 ± 424.25	1.176	0.246
ALP	167.60 ± 292.23	386.92 ± 234.90	4.496	0.000
GGT	210.74 ± 191.40	346.86 ± 275.47	2.739	0.009
TBIL	133.92 ± 181.74	142.16 ± 130.59	0.532	0.596
DBIL	113.21 ± 126.32	129.11 ± 108.77	0.250	0.803
TP	65.58 ± 9.95	64.31 ± 9.38	0.653	0.515
ALB	38.41 ± 6.46	33.23 ± 6.64	3.900	5.180

■名词解释

药物性肝损害分型: 以丙氨酸氨基转移酶(ALT)与碱性磷酸酶(ALP)的比值R进行判断. 当ALT大于正常上限2倍或R>5时为肝细胞型; 当ALP大于正常上限2倍或R<2为胆汁淤积型; 当ALT和ALP均升高, R在2-5之间为混合型.

较慢(表3). 两种类型肝损伤的实验室检查指标进行比较时发现, 肝细胞型主要以ALT升高为主(t = 3.311, P = 0.01<0.05), 而胆汁淤积型则以ALP(t = 4.496, P = 0.000<0.05), GGT(t = 2.739, P = 0.009<0.05)升高为主(表4). AST、TBIL、DBIL、TP、ALB无统计学差异. 结果提示, 单纯生化学检查可粗略地估计DILI的细胞损伤类型, 即ALT反应肝细胞型损害; ALP、GGT反应胆道系统的损伤(胆汁淤积).

3 讨论

DILI是常见的肝病之一, 约占非病毒性肝病中的20%-50%[3], 占所有黄疸住院病例的2%-5%, 占成人“急性肝炎”住院病例的10%, 药物性肝衰占所有急性肝衰患者的10%-52%[4]. 法国学者Sgro *et al*对81 301人研究三年认为, 每10万用药者中大约有11-15人发病[5].

到目前为止, 可造成肝脏不同程度损伤的药物多达800多种, 几乎遍及各类药物[6]. 随着基础医学的发展, 各类新药的不断涌现和广泛应用, DILI的发病率呈上升趋势[7]. 本组资料显示, 在众多导致DILI药物中, 中草药是最常见的致病因素, 占本组DILI的多数(91例, 占50.27%), 其次是抗生素及非甾体类抗炎药, 分别为15.47%和15.47%. 导致DILI的中草药, 主要是用于治疗恶性肿瘤、风湿病、牛皮癣等疾病. 结果提示应该重视中草药对肝脏的毒性作用. 上述患者多数因服药后引起黄疸(49.2%), 乏力(46.4%), 纳差(39.8%), 腹痛(32.6%), 恶心(30.4%)等症状而就诊.

导致肝细胞型损伤的作用机制, 可能是与药物导致肝细胞坏死或肝细胞膜的通透性增加, 致使血清酶的活性增高有关. 反映肝细胞损伤的敏感指标ALT和AST多为2-10倍升高, 是肝细胞线粒体损伤及肝腺泡病变的标志. 多数抗生素及非甾体类抗炎药导致的肝损伤即属于此类.

胆汁淤积型损伤的发病机制, 主要是在肝细胞水平的胆汁流生成和排泄障碍. 近年研究发现, 药物影响胆汁分泌主要在以下环节: 干扰胆汁酸的摄取, 干扰胆汁酸的肝内转运, 干扰毛细胆管的胆汁分泌, 干扰毛细胆管的骨架结构等. GGT较ALP有更高的敏感性, DILI发展到肝坏死时, GGT反而降低, 故可作为预后指标. 但是, GGT对DILI缺乏特异性. 抗结核药, 抗癫痫药等的治病机制即属于此类.

另外在对中草药导致DILI的分析中, 中草药导致的胆汁淤积型肝损伤的发病率明显高于肝细胞型(χ^2 = 78.981, P<0.001). 可见中草药导致的DILI常以黄疸为首发表现, 也是促使患者就诊的主要原因.

临床上DILI的诊断有一定的难度, 有相当一部分的患者被误诊或漏诊[8]. 目前国际上主要采取RUCAM及CDS量表[2,9]来诊断DILI, 2005年亚特兰大DILI临床专题研讨会DILI的研究者目前正在开发更有效的因果关系判断方法[10]. 而国内对DILI的诊断标准尚未完全统一, 再次给药致肝损伤是诊断DILI的“金标准”, 但不可故意重新给予可疑损肝药. 重新给一次药有时会引起暴发性肝炎[11]. 因此在临床工作中要做好DILI的诊断首先应提高对该病的认识和警惕性, 主要依据用药史和肝功能损伤的实验室检查, 并且排除病毒性肝炎, 酒精性肝病以及自身免疫性肝病; 其次, 在用药过程中, 特别是使用对肝功能有损伤的药物时, 应注意监测肝功能.

停用肝功能损伤的药物是治疗的关键[12]. 有报道称山莨菪碱能治疗DILI, 减轻药物的肝毒性作用, 其副作用小, 价格低廉, 值得我们在临床实践中应用[13]. 应用还原型谷胱甘肽以补充肝

■同行评价
本研究提供了一些有价值的信息, 对临床认识药物性肝病有一定的应用价值.

内巯基, 有利于药物的生物转化, 明显肝内淤胆者可应用糖皮质激素等治疗. 对于高度黄疸而激素不敏感者, 主要应用思美泰[14-15]. 肝损伤严重者应采取血液净化措施, 清除药物. DILI重在预防, 对于某些能损伤肝脏的药物不要长期或大剂量的超负荷使用.

本研究观察到沈阳地区引起DILI的前三位药物是中药、抗生素和非甾体类抗炎药, 50%以上的DILI是由中草药引起. 近1/2患者以黄疸为首发表现, 酶学改变和胆红素排泄障碍为主, 临床上可与其他原因的肝病相鉴别. 单纯生化学检查可粗略地估计DILI的细胞损伤类型, 即ALT增高反应肝细胞型, ALP、GGT增高反应胆道系统的损伤(胆汁淤积型).

4 参考文献

1 廖正秋. 药物性肝病. 现代实用医学 2003; 15: 10-11
2 支杰华, 朱萱. 药物性肝病病理及诊治的研究进展. 实用肝脏病杂志 2006; 9: 124-124
3 王吉耀. 药物性肝病内科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 482-486
4 杨安卿, 胡颖. 药物性肝病的诊断和治疗. 中华现代内科学杂志 2006; 3: 658-660
5 Sgro C, Clinard F, Ouazir K, Chanay H, Allard C, Guilleminet C, Lenoir C, Lemoine A, Hillon P. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology* 2002; 36: 451-455
6 Billups SJ, Carter BL. Mibefradil withdrawn from the market. *Ann Pharmacother* 1998; 32: 841
7 Andrade RJ, Lucena MI, Aguilar J, Lazo MD, Camargo R, Moreno P, Garcia-Escano MD, Marquez A, Alcantara R, Alcain G. Chronic liver injury related to use of bentazepam: an unusual instance of benzodiazepine hepatotoxicity. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1400-1404
8 Zimmerman HJ, Ishak KG. General aspects of drug-induced liver disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24: 739-757
9 Maria VA, Victorino RM. Development and validation of a clinical scale for the diagnosis of drug-induced hepatitis. *Hepatology* 1997; 26: 664-669
10 向晓星, 于乐成, 陈成伟. 2005年亚特兰大药物性肝病临床专题研讨会介绍. 肝脏 2006; 11: 123-127
11 Larrey D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 145-155
12 王吉耀, 郭津生. 药物性肝病的诊断和治疗. 中华肝脏病杂志 2001; 12: 43-46
13 王青丽, 张国祥, 郑建华. 山莨菪碱在防治药物不良反应中的作用. 医药导报 2005; 24: 162-163
14 刘畅, 王炳元. 酒精性肝炎治疗方法的评价. 药品评价 2007; 4: 101-103
15 刘畅, 王颖, 王炳元, 常冰, 贺小虎, 向国卿, 孟晓丹. 88例酒精性肝炎临床特征及疗效分析. 药品评价 2007; 4: 110-113

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 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4±0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定:分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2529-2532
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

延边地区朝鲜族乙型肝炎病毒感染者病毒基因型的检测与分析

韩学吉, 许顺姬, 偰光华, 崔鹤松, 朴红心

韩学吉, 朴红心, 崔鹤松, 延边大学医院感染科 吉林省延吉市 133000
许顺姬, 延边大学附属医院检验科 吉林省延吉市 133000
偰光华, 延边大学附属医院肝胆外科 吉林省延吉市 133000
留学回国博士启动基金资助项目, No. 教外司留[2004]527
作者贡献分布: 韩学吉与许顺姬对此文所作贡献均等; 此课题由韩学吉与许顺姬设计; 研究过程由韩学吉, 许顺姬, 偰光华, 崔鹤松及朴红心操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由许顺姬提供; 数据分析由韩学吉与偰光华完成; 本论文写作由韩学吉与许顺姬完成.
通讯作者: 许顺姬, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学附属医院检验科. xsj1218@yahoo.com.cn
电话: 0433-2670803
收稿日期: 2008-01-20 修回日期: 2008-07-08
接受日期: 2008-07-10 在线出版日期: 2008-08-08

Inspection and analysis of hepatitis B virus genotypes among the korean nationality of Yanbian area in China

Xue-Ji Han, Shun-Ji Xu, Guang-Hua Xie, He-Song Cui, Hong-Xin Piao

Xue-Ji Han, He-Song Cui, Hong-Xin Piao, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Shun-Ji Xu, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Guang-Hua Xie, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Supported by: the the Returned Overseas Chinese Doctors Start-up Funds from Education Ministry of China, No. [2004]527
Correspondence to: Shun-Ji Xu, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China. xsj1218@yahoo.com.cn
Received: 2008-01-20 Revised: 2008-07-08
Accepted: 2008-07-10 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate the distribution and clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes among the Korean Chinese of Yanbian area in China.

METHODS: A total of 215 Korean Chinese with HBV infection in Yanbian area included symptomatic carrier (SC, n = 36), acute hepatitis B (AHB, n = 5), chronic hepatitis B (CHB, n = 106), hepatitis-induced cirrhosis (HC, n = 50), and primary hepatic carcinoma (HCC, n = 18). Specific primer-polymerase chain reaction was used to detect the HBV genotypes in this cases.

RESULTS: Of the 215 cases, genotype B and C were found in 61 (28.0%) and 154 (72.0%) cases, respectively. The ratio of genotype C was markedly higher in CHB (79.0%), HC (84.0%), HCC (89.0%) than that in SC (25.0%) and AHB (60.0%), respectively (P < 0.05). In SC, the proportion of genotype B was significantly higher than that of genotype C (75.0% *vs* 25.0%, P < 0.01). The rate of genotype C was higher in the HBeAg-positive cases than that in the HbeAg-negative cases (73.0% *vs* 54.0%, P < 0.05), but the rate of genotype B was the other way around (46.0% *vs* 27.0%, P < 0.01).

CONCLUSION: Genotype C HBV infection is predominant in the Korean Chinese of Yanbian area in China, and genotype B is the second. Genotype C is mostly found in CHB, HC and HCC.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Chronic hepatitis B; Hepatitis-induced cirrhosis; Primary hepatic carcinoma

Han XJ, Xu SJ, Xie GH, Cui HS, Piao HX. Inspection and analysis of hepatitis B virus genotypes among the korean nationality of Yanbian area in China. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2529-2532

摘要

目的: 分析延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型分布及其临床意义.

方法: 延边地区朝鲜族HBV感染者215例分为无症状携带者36例, 急性乙型肝炎5例, 慢性乙型肝炎106例, 肝炎肝硬化50例, 原发性肝癌18例. 利用特异性引物聚合酶链反应法(PCR), 对患者血清标本进行基因型检测.

■背景资料
目前研究表明HBV各地病毒株有差异并根据核苷酸序列的差异分为A-H 8个基因型. 另外, 有研究表明, HBV基因型与感染途径、感染谱和疾病进展有一定相关性. 本文分析延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型分布, 这对了解延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型的分布情况, 以及判断病情发展及预后, 推测抗病毒疗效提供理论依据, 具有重要意义.

■同行评议者
孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科; 刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

■相关报道
目前已有报道肝病发生、发展与患者的遗传基因, 病毒的基因类型有密切关系. HBV基因类型有高地区分布特异性. 另外, HBV基因类型与肝病的临床类型、病情发展经过、病情轻重、抗病毒疗效有密切联系.

结果: 215例HBV感染者中检出B基因型61例(28.0%), C基因型154例(72.0%), 未检出其他基因型. 在慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌患者中, C基因型比例(79.0%、84.0%、89.0%)明显高于无症状携带者及急性乙型肝炎(25.0%、60.0%, $P<0.01$), 在无症状携带者中, B基因型比例高于C基因型(75.0% *vs* 25.0%, $P<0.01$). HbeAg阳性组C基因型比例高于HBeAg阴性感染组(73.0% *vs* 54.0%, $P<0.05$), HbeAg阴性组的B基因型比例高于HBeAg阳性组(46.0% *vs* 27.0%, $P<0.01$).

结论: 延边地区朝鲜族HBV感染主要为C基因型, 其次为B基因型. C基因型在临床上以慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌多见, 其发生率显著高于B基因型.

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 慢性乙型肝炎; 肝炎肝硬化; 肝细胞癌

韩学吉, 许顺姬, 俣光华, 崔鹤松, 朴红心. 延边地区朝鲜族乙型肝炎病毒感染者病毒基因型的检测与分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2529-2532
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2529.asp

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个全球性问题, 严重影响我国人民的健康, 目前研究表明HBV各地病毒株有差异并根据核苷酸序列的差异分为A-H共8个基因型. 另外, 有研究表明, HBV基因型与感染途径、感染谱和疾病进展有一定相关性[1-4]. 本研究利用特异性引物聚合酶链反应法(PCR)分析延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型分布, 这对了解延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型的分布情况, 以及判断病情发展及预后, 推测抗病毒疗效提供理论依据, 具有重要意义.

1 材料和方法

1.1 *材料* 采集2005-07/2007-11延边大学附属医院收治的延边地区朝鲜族HBV感染者血清标本215例, 男164例, 女51例, 年龄19-72岁. 按2000年[病毒性肝炎防治方案][5]将215例分为无症状携带者36例, 急性乙型肝炎5例, 慢性乙型肝炎106例, 肝炎肝硬化50例, 原发性肝癌18例. ELISA试剂盒由上海华美生物技术有限公司生产.

1.2 *方法* 应用ELISA试剂盒检测HbeAg, 操作严格按说明书进行. 用多对引物和巢式PCR法对HBV基因分型. 将50 μL待检血清加入到60 μL裂解液中, 混匀, 37℃水浴10 min, 加入30 μL的Tris饱和酚和30 μL的氯仿：异戊醇(49：1)溶液, 充分混匀后, 14 000 *g*离心10 min, 取上清液, 加入等体积的异戊醇和10 μL的醋酸钠溶液, -20℃沉淀2 h, 14 000 *g*离心15 min, 弃上清液, 加入750 mL/L预冷乙醇500 μL, 14 000 *g*离心10 min, 弃上清液, 沉淀于50℃干燥后, 溶于20 μL的DEPC水中, 保存在-20℃备用, 作为PCR反应的模板. 采用40 μL的反应体系(10×缓冲液4 μL, dNTP 4 μL, $MgCl_2$ 2.4 μL, p1 0.8 μL, S4R 0.8 μL, HBV DNA模板10 μL, Taq酶 0.2 μL, H_2O 17.8 μL), 按95℃, 10 min; 94℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 1 min, 进行40个循环, 72℃延伸7 min, 然后取第一轮PCR产物作为模板进行第二轮扩增: 40 μL的反应体系(10×缓冲液4 μL, dNTP4 μL, $MgCl_2$ 2.4 μL, B2 0.8 μL, BA1R 0.8 μL, BB1R 0.8 μL, BC1R 0.8 μL, 或B2R 0.8 μL, BD1 0.8 μL, BE1 0.8 μL, BF1 0.8 μL, 第一轮PCR产物5 μL, Taq酶0.4 μL, H_2O 21 μL), 按95℃, 10 min, 94℃ 20 s, 65℃ 20 s, 72℃ 30 s, 进行40个循环, 72℃延伸7 min, 然后取10 μL的第二轮PCR产物在100 V电压下, 经20 g/L琼脂糖凝胶电泳20 min, 用凝胶成像仪观察电泳条带的大小, 以确定其基因型, A型为68 bp, B型为281 bp, C型为122 bp, D型为119 bp, E型为167 bp, F型为97 bp. 引物由上海生工生物技术公司合成, 序列见表1.

统计学处理 应用统计分析软件进行χ^2检验.

2 结果

PCR产物在100 V电压下, 经20 g/L琼脂糖凝胶电泳20 min, 用凝胶成像仪观察电泳条带的大小, 以确定其基因型, B型为281 bp, C型为122 bp(图1). 215例延边地区朝鲜族HBV感染者中检出B基因型61例(28.0%), C基因型154例(72.0%), 未检出其他基因型. HBV基因型在不同类型HBV感染者中的分布差异有统计学意义, 在慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌患者中, C基因型比例(79.0%、84.0%、89.0%)明显高于无症状携带者及急性乙型肝炎(25.0%、60.0%, $P<0.01$), 在无症状携带者中, B基因型比例(75.0%)高于C基因型(25.0%, $P<0.01$, 表2), HbeAg阳性组C基因型比例(73.0%)高于HbeAg阴性感染组(54.0%, $P<0.05$), HbeAg阴性组的B基因型比例(46.0%)高于HbeAg阳性组(27.0%, $P<0.01$, 表3).

3 讨论

HBV是急、慢性肝炎, 肝硬变以及肝癌的主要

表 1 引物序列

基因型	PCR	正义链	反义链
A–F	1stPCR	P1: 5'–TCACCATATTCTTGGGAACAAGA–3'	S4R:5'–AGAAGATGAGGCATAGCAGC–3'
A	2ndPCR	B2: 5'–GGCTCMAGTTCMGGAACAGT–3'	BA1R:5'–CTCGCGGAGATTGACGAGATGT–3'
B		B2: 5'–GGCTCMAGTTCMGGAACAGT–3'	BB1R:5'–CAGGTTGGTGAGTGACTGGAGA–3'
C		B2: 5'–GGCTCMAGTTCMGGAACAGT–3'	BC1R:5'–GGTCCTAGGAATCCTGATGTGT–3'
D		BD1: 5'–GCCAACAAGGTAGGAGCT–3'	B2R:5'–GGAGGCGGATYTGCTGGCAA–3'
E		BE1: 5'–CACCAGAAATCCAGATTGGGACCA–3'	B2R:5'–GGAGGCGGATYTGCTGGCAA–3'
F		BF1: 5'–GYTACGGTCCAGGGTTCACA–3'	B2R:5'–GGAGGCGGATYTGCTGGCAA–3'

M: A或C; Y: C或T.

表 2 不同类型HBV感染者中HBV基因型分布 *n*(%)

分组	*n*	B型	C型
无症状携带者	36	27(75.0)	9(25.0)
急性乙型肝炎	5	2(40.0)	3(60.0)
慢性乙型肝炎	106	22(21.0)	84(79.0)
肝炎肝硬化	50	8(16.0)	42(84.0)
肝细胞癌	18	2(11.0)	16(89.0)

致病原[6], 肝病发生、发展与患者的遗传基因, 病毒的基因类型有密切关系[7]. 目前报告, HBV基因类型有高地区分布特异性[8]. 另外, HBV基因类型与肝病的临床类型、病情发展经过、病情轻重、抗病毒疗效有密切联系[9-13]. 既往研究表明, 我国主要以HBV C和B基因型感染为主, 也存在 D基因型及B和C基因型混合感染[14-19], 在韩国研究发现, C型占99.5%, A型占0.5%[20-21]. 本研究发现, 215例延边地区朝鲜族HBV感染者中, 72.0%为C基因型, 28.0%为B基因型感染. 提示延边地区朝鲜族HBV感染主要为C基因型, 其次为B基因型, 未检出其他基因型. 与韩国相比B基因型占的比例高于韩国[20-21], 可能与 HBV基因类型有高地区分布特异性及本研究检测例数少有关.

对不同类型HBV感染者的基因型分布表明, 在慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌患者中, C基因型比例(分别为79.0%、84.0%、89.0%)明显高于无症状携带者及急性乙型肝炎(分别为25.0%、60.0%, $P<0.01$), 在无症状携带者中, B基因型比例(75.0%)高于C基因型(25.0%, $P<0.01$). C基因型在临床上以慢性乙型肝炎、肝炎肝硬化、肝细胞癌多见, 其发生率显著高于B基因型与目前报道一致[22-23]. 另外, 本研究表明, HbeAg阳性组C基因型比例(73.0%)高于HbeAg阴性感染组(54.0%, $P<0.05$), 但HbeAg阴性组的B基因型比例(46.0%)高于HbeAg阳性组(27.0%, $P<0.01$). 进一步表明了C基因型感染时免疫清除期长, 而B基因型易发生HbeAg血清转化的可能[22]. 尽管对HbeAg阴性或阳性状态与基因型的相关性目前还存在不同看法, 但无论C基因型或B基因型感染患者, 都必须严密随访, 合理、适时地选择抗病毒治疗, 延缓或减少肝纤维化和肝癌的发生率. 延边地区是一个朝鲜族居住的少数民族地区, 肝炎发病率高, 病情比较重, 抗病毒疗效不佳. 这可能与延边地区朝鲜族HBV感染主要为C基因型有关.

■**创新盘点**
本文丰富了国内各地区HBV基因型分布的数据, 即延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型分布, 这对了解延边地区朝鲜族HBV感染者HBV基因类型的分布情况, 以及判断病情发展及预后, 推测抗病毒疗效提供理论依据, 具有重要意义.

表 3 HbeAg阳性与阴性HBV感染者中基因型分布 *n*(%)

分组	*n*	B型	C型
HbeAg阳性	125	34(27.0)	91(73.0)
HbeAg阴性	90	41(46.0)	49(54.0)

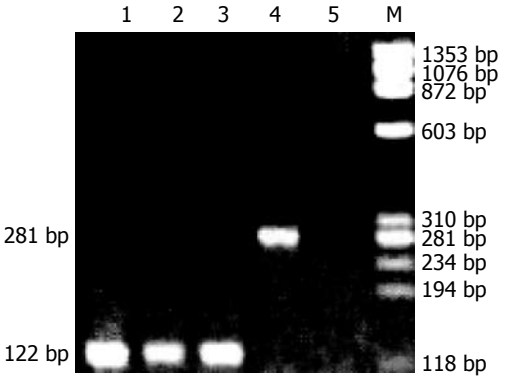


图 1 HBV基因分析PCR结果. M: Marker; 1–3: C基因型; 4: B基因型; 5: PCR阴性对照.

4 参考文献

1 Shiina S, Fujino H, Uta Y, Tagawa K, Unuma T, Yoneyama M, Ohmori T, Suzuki S, Kurita M, Ohashi Y. Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part I: Analysis of 1744 HBsAg carriers. *Am J*

■同行评价
本研究统计学处理方法恰当，结果可靠，结论可信，具有一定的科学性，创新性和可读性.

Gastroenterol 1991; 86: 866-871

2 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304

3 Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 1998; 72: 163-174

4 Du H, Li T, Zhang HY, He ZP, Dong QM, Duan XZ, Zhuang H. Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/precore with clinical features of chronic HBV infection. *Liver Int* 2007; 27: 240-246

5 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62

6 World Health Organization. Executive Summary: The World Health Report 1988: Life in the 21st century a vision for all. http://www.oms.ch/whr/1998/exsum 98e.htm, [Accessed 1999, May 26]

7 Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993; 342: 1335-1340

8 Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503

9 Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, Trepo C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1996; 48: 8-16

10 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-559

11 Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2000; 7: 258-267

12 Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000; 33: 998-1002

13 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304

14 Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001; 44: 43-47

15 Ding X, Mizokami M, Ge X, Orito E, Iino S, Ueda R, Nakanishi M. Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning, southern China. *Hepatol Res* 2002; 22: 37-44

16 Ding X, Gu H, Zhong ZH, Zilong X, Tran HT, Iwaki Y, Li TC, Sata T, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56: 19-22

17 范金水, 庄辉, 李远贵, 朱晓洁, 徐德忠, 马为民, 王跃民, 陈雅洁, 类国强, 马廷贤. 我国八城市HBsAg阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析. 中华微生物和免疫学杂志 1998; 18: 88-92

18 阎丽, 侯金林, 王战会, 牛贞玉, 郭亚兵, 骆抗先. 宁夏地区乙性肝炎病毒基因型分布及D基因型的测定鉴定. 解放军医学杂志 2000; 25: 4-7

19 夏国良, Omana V Nainan, 贾志远, 刘洪斌, 罗述斌, 李荣成, 曹慧霖, 刘崇柏, Harold S Margolis. 乙型肝炎病毒基因型和血清亚型在我国部分地区的分布及其特点. 中华流行病学杂志 2001; 22: 348-351

20 Seng Wook Oh, Seng Gyu Hwang, Kwang Hyun Ko, Eun Mi Jung, Hyung Tae Kim, Sung Pyo Hong, Pil Won Park, Gyu Sung Rim, Nam Geun Kim, Wk Seop Hyun, Tae Kyu Lee. Hepatitis B Virus Genotype in Kyunggi and Seoul Provinces. *Korean J Gastroenterol* 2002; 40: 46-52

21 Soong Hwan Lee, Sung Hee Han, Seung Chul Cho, Byung Joo Roh, Joo Hyun Sohn, Duck An Kim, Dong Hoo Lee, Choon Suhk Kee. Distribution of HBV Genotypes in Patients With Chronic HBV Infection in Korea. *Korean J Hepatol* 2001; 7: 373-380

22 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-559

23 Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 19-26

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2533-2536
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

HA树脂血液灌流治疗重型肝炎40例

罗 玲, 袁春兰, 曾维群, 张大志

罗玲, 袁春兰, 曾维琼, 张大志, 重庆医科大学附属二院感染病科 重庆市 400010
作者贡献分布: 本课题设计由罗玲完成; 操作由罗玲, 袁春兰, 曾维群及张大志完成; 数据分析由罗玲与袁春兰完成; 本论文写作由罗玲与袁春兰完成.
通讯作者: 罗玲, 400010, 重庆市, 重庆医科大学附属二院感染病科. luo_l8888@163.com
电话: 023-63693344
收稿日期: 2008-04-28 修回日期: 2008-06-10
接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-08-08

Treatment of severe hepatitis by HA neutral macroporous resin hemoperfusion: an analysis of 40 cases

Ling Luo, Chun-Lan Yuan, Wei-Qun Zeng, Da-Zhi Zhang

Ling Luo, Chun-Lan Yuan, Wei-Qun Zeng, Da-Zhi Zhang, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
Correspondence to: Ling Luo, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China. luo_l8888@163.com
Received: 2008-04-28 Revised: 2008-06-10
Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of hemoperfusion with HA neutral macroporous resin in the treatment of severe hepatitis, and to find out the important nursing points to get better results.

METHODS: A total of 40 severe hepatitis patients were treated by HA neutral macroporous resin (HA330-Ⅱ) hemoperfusion (96 times in total). The symptoms, signs, liver function, renal function, prothrombin activity (PTA), tumor necrosis factor-α (TNF-α), and interleukin-6 (IL-6) levels were analyzed before and after treatment. Venous cannula or venepuncture was used to set up blood circulation.

RESULTS: After hemoperfusion, the symptoms and signs were improved to different extents in most of the patients; the levels of ALT, TBIL, DBIL were decreased significantly (92.3 ± 53.1 IU/L *vs* 176.8 ± 120.2 IU/L; 283.2 ± 90.2 μmol/L *vs* 363.0 ± 140.3 μmol/L; 122.8 ± 71.7 μmol/L *vs* 247.5 ± 106.4 μmol/L; all $P < 0.01$); PTA was increazed (39.6% ± 12.5% *vs* 29.2% ± 14.8%, $P < 0.01$). Meanwhile, the levels of IL-6 and TNF-α were decreased (27.6 ± 22.5 ng/L *vs* 88.5 ± 32.8 ng/L, 0.47 ± 0.4 μg/L *vs* 0.83 ± 0.6 μg/L; both $P < 0.01$) after hemoperfusion. Of the 40 patients, 29 cases recovered (72.5%); 3 cases were found without improvements and discharged from hospital (7.5%); 8 cases died (20%). Thirty-six patients (90%) finished hemoperfusion by venepuncture and 4 patients (10%) by venous cannula.

CONCLUSION: HA resin hemoperfusion is able to remove toxins in patients with severe hepatitis, and improve the clinical symptoms and signs to some extent. Full preparation, skillful techniques, close observation and timely treatment of side effects contribute to a favorable efficacy.

Key Words: Hemoperfusion; Severe hepatitis; Therapeutic effect; Nursing

Luo L, Yuan CL, Zeng WQ, Zhang DZ. Treatment of severe hepatitis by HA neutral macroporous resin hemoperfusion: an analysis of 40 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2533-2536

摘要

目的: 探讨HA中性大孔树脂(HA330-Ⅱ)治疗重型肝炎的疗效, 把握血液灌流治疗的重要护理环节和过程, 提高治疗成功率.

方法: 应用HA中性大孔树脂进行血液灌流治疗重型肝炎肝衰竭患者40例, 共96次, 在灌流前后观察患者临床症状及体征, 最终治疗效果, 检测肝功能、肾功能、凝血酶原活动度(PTA)、血常规、肿瘤坏死因子(TNF-α)、白介素(IL-6)的水平. 首选直接动静脉穿刺建立循环回路, 如穿刺困难则采用股静脉穿刺置管术.

结果: 灌流后患者临床症状体征均有不同程度改善; ALT、TBIL、DBIL等明显下降(92.3±53.1 IU/L *vs* 176.8±120.2 IU/L; 283.2±90.2

■背景资料
重症肝炎死亡率高, 传统治疗效果差, 血浆置换是临床应用最广泛的治疗方法, 安全有效, 但需大量的冰冻血浆, 本研究应用HA大孔树脂血液灌流治疗慢性重型肝炎, 治疗过程中观察了患者的不良反应并给予相应的护理, 取得了较好效果.

■同行评议者
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; 谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■**创新盘点**
本文报道了HA型树脂血液灌流治疗重型肝炎的操作方法、尤其是建立回路时使用的直接动静脉穿刺、体外循环时肝素化的量较其他疾病应减少.

μmol/L *vs* 363.0±140.3 μmol/L; 122.8±71.7 μmol/L *vs* 247.5±106.4 μmol/L; 均$P<0.01$); PTA明显升高(39.6%±12.5% *vs* 29.2%±14.8%, $P<0.01$); 灌流后患者IL-6、TNF-2明显下降(27.6±22.5 ng/L *vs* 88.5±32.8 ng/L, 0.47±0.4 μg/L *vs* 0.83±0.6 μg/L; 均$P<0.01$); 电解质及血常规无明显变化. 患者病情好转出院29例(72.5%), 病情危重自动出院3例(7.5%), 死亡8例(20%). 在治疗过程直接动静脉穿刺成功者36例(90%), 股静脉穿刺置管术4例(10%).

结论: HA树脂血液灌流治疗能清除重型肝炎患者体内的毒素, 能不同程度改善患者的临床症状、体征及治疗效果. 充分准备、熟练技术、密切观察和及时处理不良反应是保证血液灌流治疗效果的关键.

关键词: 血液灌流; 重型肝炎; 疗效; 护理

罗玲, 袁春兰, 曾维群, 张大志. HA树脂血液灌流治疗重型肝炎40例. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2533-2536
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2533.asp

0 引言

慢性重型肝炎是在肝病基础上并发肝细胞大面积坏死, 出现肝衰竭, 目前尚无特效治疗手段, 病死率高达50%-70%[1]. 非生物型人工肝利用有效的血液净化手段, 清除肝功能衰竭时体内蓄积的相关毒素, 以暂时替代肝脏部分功能. 由于肝脏有强大的再生能力, 人工肝治疗可为肝细胞再生赢得时间. 其中血浆置换是临床应用最广泛的治疗方法, 安全有效[2], 但需大量的冰冻血浆, 而近一年来我市血浆非常紧缺, 我科另劈途径, 应用HA大孔树脂血液灌流治疗慢性重型肝炎40例, 取得较好疗效, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 *材料* 选择本科住院的慢性重型病毒性肝炎患者40例, 诊断符合2000年西安全国肝病会议《病毒性肝炎防治方案》所制定的诊断标准, 其中男28例, 女12例, 平均年龄32±6.15岁.

1.2 *方法* 在内科综合治疗(保肝、退黄、纠正肝性脑病、白蛋白、血浆支持)的同时给予血液灌流: 采用广州市暨华医疗器械有限公司生产的JHBP-2000型血泵, 珠海丽珠医用生物材料有限公司生产的HA330-Ⅱ型树脂血液灌流器及8CM贝朗血管回路, 将血管回路与HA型血液灌流器及血泵连接. 灌流器及血管回路严格按产品说明规定的要求进行预冲, 先用50 g/L葡萄糖溶液液500 mL冲洗, 放置30 min后, 继用肝素生理盐水2000 mL(每500 mL含肝素10-15 mg)反复冲洗, 充分排除血液灌流器内的残留气体待用; 经过股静脉置管或直接动脉、静脉穿刺建立循环血路(常用静脉有肘正中静脉、头静脉及贵要静脉, 常用浅动脉有桡动脉、足背动脉、肱动脉等). 术前肝素化, 首剂0.5-1.0 mg/kg, 术中每30 min补充肝素5-7 mg或直接用低分子肝素5000 U(根据患者的凝血功能调整抗凝药物的用量), 血液流速150-200 mL/min, 每次治疗时间2.5-3.0 h, 灌流结束后使用鱼精蛋白按1∶1进行中和. 治疗中用心电监护仪密切观察患者生命体征. 每例患者依病情治疗2-4次, 40例患者共治疗96次, 平均2.4 次/人. 观察患者临床症状及体征, 检测肝功能、肾功能、凝血酶原活动度(prothrombin activity, PTA)、血常规、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白介素(interleukin 6, IL-6)的水平.

统计学处理 计量数据采用mean±SD表示, 治疗前后的检测结果进行t检验.

2 结果

2.1 *血液灌流前后临床症状、体征、最终治疗效果的变化* 灌流治疗后患者临床症状、体征均有不同程度改善, 表现为精神好转、食欲增加, 乏力、腹胀、黄疸等有不同程度减轻. 在本组观察病例中, 患者病情好转出院29例(72.5%), 病情危重自动出院3例(7.5%), 死亡8例(20.0%). 提高了重型肝炎患者的生存率.

2.2 *血液灌流前后肝、肾功能、血常规及炎性介质的变化* 树脂灌流治疗前患者肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)等明显高于正常, 治疗后明显好转, 与治疗前比较差异有显著性(均$P<0.01$); 治疗后患者PTA明显升高, 差异有显著性($P<0.01$); 治疗后IL-6、TNF-α明显下降, 差异有显著性($P<0.01$). 治疗前后血常规、电解质无明显变化; 尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)治疗后有下降, 但无统计学差异($P>0.05$, 表1).

2.3 *治疗过程中的不良反应* 治疗过程中出现的不良反应有: 皮下出血10例(25.0%), 皮下血肿3例(7.5%), 低血压4例(10.0%), 畏寒、发热、胸闷5例(12.5%), 恶心、呕吐4例(10.0%).

3 讨论

慢性重型肝炎肝细胞大量坏死, 必然导致体内

表 1 治疗前后肝、肾功能、血常规及炎性介质的变化 (mean ± SD)

指标	治疗前	治疗后	*P*值
TBIL(μmol/L)	363.0 ± 140.3	283.2 ± 90.2	<0.01
DBIL(μmol/L)	247.5 ± 106.4	122.8 ± 71.7	<0.01
ALT(IU/L)	176.8 ± 120.2	92.3 ± 53.1	<0.01
ALB(g/L)	33.8 ± 4.2	32.6 ± 4.6	>0.05
PTA(%)	29.2 ± 14.8	39.6 ± 12.5	<0.01
IL-6(ng/L)	88.5 ± 32.8	27.6 ± 22.5	<0.01
TNF-α(μg/L)	0.83 ± 0.6	0.47 ± 0.4	<0.01
Cr(μmol/L)	81.3 ± 15.6	75.9 ± 13.3	>0.05
BUN(mmol/L)	10.6 ± 3.1	9.5 ± 2.5	>0.05
K^+(mmol/L)	4.9 ± 0.6	4.7 ± 0.5	>0.05
Na^+(mmol/L)	137.3 ± 8.7	140.6 ± 9.2	>0.05
WBC(10^9/L)	5.6 ± 1.1	5.1 ± 1.0	>0.05
RBC(10^{12}/L)	3.8 ± 0.26	3.6 ± 0.2	>0.05
Hb(g/L)	120 ± 1.0	115 ± 1.5	>0.05
PLT(10^9/L)	96 ± 29	85 ± 12	>0.05

■应用要点
对重型肝炎患者首剂肝素量应相应减少, 个别文献报道需1.0-1.5 mg/kg体质量, 本研究发现0.5-1.0 mg/kg体质量足够, 患者未出现过体外血液凝固现象. 治疗过程中的病情观察及相应的处理, 让患者顺利完成治疗有一定的指导作用.

大量毒性物质和代谢产物堆积, 二者可进一步加重肝细胞坏死, 阻碍肝细胞再生, 从而形成恶性循环.

资料表明, 慢性重型肝炎患者TNF-α表达量多, TNF-α可造成肝损伤或引起肝肝细胞的坏死[3]. 慢性重症肝炎患者血清中IL-6显著高于正常, IL-6的生物学活性广泛, 能导致肝脏炎症和免疫损伤, 增加自然杀伤细胞(nature killer, NK)杀伤靶细胞的能力[4].

HA330-Ⅱ型树脂血液灌流器能相对特异地吸附炎性细胞因子、胆红素、胆汁酸以及其他大分子毒素, 消除患者体内毒性物质, 打破恶性循环, 改善内环境, 维持内环境相对稳定, 从而促进肝细胞再生, 延缓甚至逆转病情进展, 改善预后, 使患者肝脏得到早日修复. 而科学、系统的护理是治疗成功的关键, 尤其应注意把好以下几个护理环节. (1)心理护理: 血液灌流治疗重型肝炎是一种较新的治疗方法, 人们对其操作、疗效认识不足或持怀疑态度, 我们应耐心仔细地向患者及家属讲解该治疗的目的、方法、过程、疗效、可能出现的并发症及需要的配合, 使患者及家属有充分的思想准备, 以消除患者的紧张情绪, 保持平静的心态接受治疗. (2)预防感染的护理: 重型肝炎患者肝功能处于失代偿期, 抵抗力低下, 极易引起感染, 尤其是有股静脉置管者. 治疗前人工肝室应用动态多功能杀菌机消毒1 h, 室温保持在25-26℃[5], 相对湿度在50%-60%, 地面及物体表面用1000 mg/L的84消毒液擦拭及喷洒, 限制进入人数, 医护人员进入人工肝室前应穿好工作服、带好口罩、帽子、更换清洁拖鞋或用鞋套. 股静脉置管者穿刺点每天换药1次, 严格无菌操作, 尽量不在导管内采血、输液. (3)及时观察和配合处理各种不良反应, 最常见的不良反应及处理如下: 皮下出血、皮下血肿: 本组病例中有36例采用直接动静脉穿刺法建立循环回路, 有10例患者出现了皮下出血. 4例患者采用股静脉穿刺置管术, 有3例患者出现皮下血肿. 可能与肝病本身凝血机制障碍、置管时反复穿刺或误穿刺入动脉有关. 皮下出血表现为穿刺部位出现大小不等的淤斑, 无须特殊处理, 密切观察局部情况. 皮下血肿表现为较大范围的淤斑与肿胀, 局部压迫止血30 min后用绷带卷加压包扎24 h, 48 h后局部热敷, 促进血液循环, 减轻肿胀. 考虑患者凝血功能较差, 股静脉插管有较大的风险, 我科常用直接动、静脉穿刺法, 同时应尽可能少用肝素剂量. 我科常用肝素剂量为: 首剂为0.5-1.0 mg/kg, 术中每30 min补充肝素5-7 mg或直接用低分子肝素5000 U, 40例96次治疗过程中均无血液凝固现象发生. 而文献报道肝素用量为首剂1.0-1.5 mg/kg体质量, 术中每30 min-1 h补充肝素10-20 mg[6]. 治疗过程中必须密切观察患者穿刺部位的情况, 如有肿胀应立即更换穿刺部位, 拔出穿刺针后局部按压10 min后再加压包扎24 h. 低血压: 4例患者在治疗过程中出现低血压, 可能与血容量不足有关. 治疗前嘱患者尽可能进食一些食物, 适当饮水以避免血容量不足; 治疗中加强生命体征的监测, 一旦出现低血压, 减

■同行评价
本文从护理角度探讨血液灌流治疗重型肝炎, 立题较新颖, 设计基本合理, 符合医学伦理学要求, 有一定的学术价值.

慢灌流速度, 给予静脉补充低分子右旋糖苷250 mL或500 mL后很快缓解. 畏寒、发热、胸闷: 5例患者在治疗过程中出现畏寒、发热、胸闷, 可能与吸附剂相容性有关[6]. 立即减慢灌流速度, 给予棉被保暖、调高室温, 肌肉注射非乃根25 mg, 严重者给予地塞米松5 mg静脉推注. 消化道症状: 4例患者出现恶心、呕吐症状, 可能与肝病本身有关. 及时清除呕吐物, 头偏向一侧, 温水漱口, 恶心时鼓励患者深呼吸, 必要是肌肉注射胃复安10 mg.

总之, HA330-Ⅱ型型树脂血液灌流是一种有效治疗慢性重型肝炎的方法, 值得临床推广使用. 但在治疗前患者及环境的充分准备, 穿刺过程中护士熟练的技术操作及治疗过程中及时发现和处理不良反应是保证血液灌流治疗效果的关键.

4 参考文献

1 彭文伟. 传染病学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 45
2 何金秋, 陈川英, 邓见廷, 祁红霞, 张小青, 陈绛青. 人工肝支持系统治疗重症肝炎临床研究. 中国危重病急救医学 2000; 12: 105-108
3 甘建和, 江敏华, 赵卫峰. 重型肝炎患者血清TNF-α的变化及临床意义. 中国血液流变学杂志 2001; 11: 299-302
4 虞岱斌, 李亚明, 段钟平. 细胞因子与肝损伤的关系及人工肝治疗对细胞因子的影响. 国际移植与血液净化杂志 2006; 4: 26-29
5 曾博宇. 血浆置换术治疗重症肝炎78例的护理体会. 临床和实验医学杂志 2007; 16: 197
6 刘颖. 血液灌流在重型肝炎中应用的护理对策. 全国血液净化护理学术交流暨专题讲座会议 2004: 8-10

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 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣 *et al*[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp)和*World Journal of Gastroenterology*(http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号 ; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2537-2541
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

肝癌发生过程中的差异基因表达

白阳秋, 丁光伟, 杨玉秀

白阳秋, 丁光伟, 杨玉秀, 河南省人民医院消化内科 河南省郑州市 450003
河南省医学科技创新基金资助项目, No. 20050080
作者贡献分布: 此课题由杨玉秀, 丁光伟及白阳秋设计; 由杨玉秀审校; 标本收集由丁光伟与白阳秋完成; 研究过程, 数据分析由白阳秋与丁光伟完成; 本论文写作由白阳秋完成.
通讯作者: 杨玉秀, 450003, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院消化内科. yangyuxiu55@126.com
电话: 0371-65580767, 65580713
收稿日期: 2008-05-16 修回日期: 2008-07-02
接受日期: 2008-07-07 在线出版日期: 2008-08-08

Expression of differential genes during hepatocarcinogenesis

Yang-Qiu Bai, Guang-Wei Ding, Yu-Xiu Yang

Yang-Qiu Bai, Guang-Wei Ding, Yu-Xiu Yang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China
Supported by: the Medical Innovation Foundation from Health Department of Henan Province China, No. 20050080
Correspondence to: Professor Yu-Xiu Yang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, 7 Weiwu Road, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. yangyuxiu55@126.com
Received: 2008-05-16 Revised: 2008-07-02
Accepted: 2008-07-07 Pubilshed online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate the gene expression profiles in tissues of normal human liver, chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) by oligonucletide chip, and to screen HCC-related genes.

METHODS: The total RNA was extracted and reverse transcribed into double-strand cDNA, and then transcribed into biotin-labled cRNA target probes. The probes were hybridized with oligonucleotide chip containing 19378 genes respectively. Subsequently, the signal images were scanned by gene Scanner 3000 and analyzed with GenePix Pro 3.0 software.

RESULTS: Eighty-one genes differentially expressed among tissues of chronic hepatitis B, cirrhosis and HCC were screened out in the gene expression profiles. Of the 81 genes, 53 genes were consistently up-regulated, while 28 genes were consistently down-regulated.

CONCLUSION: The oligonucleotide chip of gene expression profile is powerful for screening HCC-related genes. Our results indicate that multiple genes take part in the carcinogenesis of HCC.

Key Words: Oligonucleotide chip; Gene expression profile; Hepatocellular carcinoma

Bai YQ, Ding GW, Yang YX. Expression of differential genes during hepatocarcinogenesis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2537-2541

摘要

目的: 应用寡核苷酸芯片研究正常肝脏、慢性乙型肝炎、肝硬化及肝癌的基因表达谱, 筛选肝癌相关基因.

方法: 分别对正常肝组织及肝炎、肝硬化和肝癌组织进行总RNA抽提并纯化, 反转录得到cDNA, 生物素标记cRNA探针, 分别与含有19378个已知基因的寡核苷酸芯片进行杂交, Gene Scanner 3000激光系统扫描, GenePix Pro 3.0分析软件读取处理杂交信号.

结果: 在慢性乙型肝炎、肝硬化及肝癌组织中, 筛选出共同差异表达基因81个,其中持续上调表达基因53个, 持续下调表达基因数28个.

结论: 寡核苷酸基因表达谱芯片能够快速筛选出肝癌相关基因, 有多种基因共同参与肝癌发生的整个过程.

关键词: 寡核苷酸芯片; 基因表达谱; 肝细胞癌

白阳秋, 丁光伟, 杨玉秀. 肝癌发生过程中的差异基因表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2537-2541
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2537.asp

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC, 简称肝癌)是最常见的恶性肿瘤之一, 我国乙型肝炎

■背景资料
肝细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一, 我国乙型肝炎病毒感染是导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌的主要原因, 单基因研究很难说明肝癌变化的本质, 基因芯片技术可以准确高效地同时研究成千上万个基因的表达状况, 已成为肿瘤研究的重要手段.

■同行评议者
季国忠, 副教授, 南京医科大学第二附属医院消化科; 程斌, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科

■研发前沿
基因芯片是目前筛选差异表达基因较成熟的方法, 如何从中找出能应用于临床的基因是提高肝癌早期诊断与治疗水平的关键.

病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌的主要原因[1], 肝癌的发生一般要经过慢性肝炎→肝硬化→肝癌的病理过程, 其中涉及到众多基因异常表达改变. 单基因研究很难说明肝癌变化的本质, 基因芯片技术可以准确高效地同时研究成千上万个基因的表达状况, 已成为肿瘤研究的重要手段[2]. 本研究采用目前含19 378个已知基因信息Affymetrix U133plus2.0芯片研究正常肝脏、慢性乙型肝炎、肝硬化、肝癌组织基因表达谱, 对共同表达的差异基因进行分析, 探讨相关基因变化与肝癌发生过程中的可能的内在联系.

1 材料和方法

1.1 材料 正常肝组织9例, 慢性乙型肝炎(以下简称肝炎)组织13例, 乙型肝炎肝硬化(以下简称肝硬化)组织6例, HBV所致肝癌组织15例. 标本取自河南省人民医院和安阳市五院肝脏手术切除组织及肝活检组织(2005-03/2006-04). 肝炎、肝硬化、肝癌组织标本HBsAg均阳性, 正常肝组织HBsAg阴性. 所有疾病诊断均经病理证实. 标本取出后迅速置于液氮冷冻, 冻存待用.

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取: 按Invitrogen公司的TRIzol试剂盒操作程序TRIzol一步法抽提正常肝组织及肝炎、肝硬化和肝癌组织总RNA. 使用Qiagen公司的Qiagen Reasy Kit进一步纯化总RNA. 琼脂糖凝胶电泳(180 V, 0.5 h)检测总RNA的28S和18S比例, 以评估总RNA的完整性; 用分光光度计在260/280 nm测定总RNA吸光度, 以计算总RNA的纯度.

1.2.2 cRNA合成、芯片杂交和检测: 按Affymetrix公司芯片制作要求, 取5-10 μg总RNA反转录得到cDNA, 体外转录合成生物素标记的cRNA, 并将其片段化处理(35-200 bp). 将预杂交液加入Affymetrix U133plus2.0芯片中, 杂交炉中45℃预杂交10 min, 取出预杂交液, 加入等体积的杂交液及生物素标记的cRNA, 杂交炉中45℃杂交16 h. 采用Affymetrix基因芯片洗涤工作站450对芯片进行洗涤、染色. Gene array Scanner3000 7G激光共聚焦扫描系统对杂交后芯片进行扫描获取各组织芯片探针信号.

1.2.3 芯片检测数据分析: 采用GenePix Pro 3.0软件读取芯片探针信号并进行扣本底、标准化处理, 计算基因的Ratio值(肝炎、肝硬化、肝癌芯片探针信号/正常肝组织芯片对应探针信号). 差异基因筛选标准: Ratio≥2为上调基因, Ratio≤0.5为下调基因. 采用Microsoft Excel及Gominer软件对差异基因进行分析.

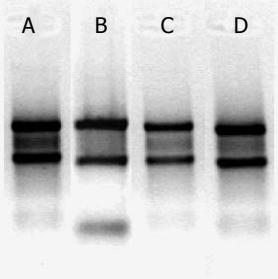


图 1 总RNA琼脂糖凝胶电泳图. A: 正常肝组织; B: 肝炎组织; C: 肝硬化组织; D: 肝癌组织.

2 结果

2.1 总RNA提取结果 各组总RNA提取结果良好, 总RNA的吸光度A_{260}/A_{280}值均在1.8-2.0, 热稳定实验显示70℃ 1 h与20℃ 1 h电泳条带比较, 28S条带无明显降解, mRNA主要集中于0.9-4.0 kb的连续条带. 电泳结果证实已抽提高纯度的RNA (图1).

2.2 芯片质量监控 Affymetrix U133 Plus 2.0基因芯片质量控制标准: 同一样品杂交同一种类两张芯片时, 两张芯片上相同信号点的相关性大于95%; 平均杂交背景信号值不大于100; 设置的内控制基因的3'端探针集合的杂交信号不能超过其5'端探针集合的杂交信号的3倍, 同时芯片中内对照基因检出信号要在所有芯片中有重复. 本实验结果完全符合上述质控标准, 信号强度达到要求. 检测系统正常, 保证杂交结果的可靠性.

2.3 差异表达基因筛选结果 以正常肝组织为对照, 筛选出肝炎、肝硬化、肝癌差异基因表达谱. 通过对其进行生物信息学对比分析, 筛选出在肝炎、肝硬化、肝癌中共同差异表达的基因81个. 有53个基因持续上调表达, 28个基因持续下调表达. 有已知基因66个, 未知功能基因15个. 这些共同差异表达基因在肝癌中的表达情况见表1-2.

3 讨论

我们应用含有19 378个已知基因的寡核苷酸芯片筛选出肝炎、肝硬化、肝癌中共同差异表达基因81个, 包括原癌基因、抑癌基因、细胞信号传导及细胞周期相关基因、代谢酶类相关基因、免疫相关基因、肿瘤相关抗原等. 说明肝癌的发生涉及到细胞功能的许多方面, 是一个多因素、多步骤、多基因参与的复杂过程.

在肝炎、肝硬化、肝癌中共同上调表达的基因中, 肿瘤相关钙离子信号传导蛋白1(tumor-

■相关报道
Jia *et al*采用芯片技术对218例伴有低或高AFP浓度的HCC病人进行分析, 寻找之间的基因表达谱差别. 从中挑选了5个在HCC过表达的基因作为诊断肝癌候选基因.

表 1 在肝炎、肝硬化、肝癌中共同上调表达的基因

编号	Gene代码	基因描述	染色体定位	比值
1	Hs.534362	Protease, serine, 1(trypsin 1), PRSS1	7q34	181.02
2	Hs.9029	Keratin 23(histone deacetylase inducible), KRT23	17q21.2	51.98
3	Hs.20415	Family with sequence similarity 3, member B, FAM3B	21q22.3	42.22
4	Hs.313	Secreted phosphoprotein 1, SPP1	4q21–q25	39.40
5	Hs.80962	Neurotensin, NTS	12q21	24.25
6	Hs.5940	Mucin 13, epithelial transmembrane, MUC13	3q13.3	22.63
7	Hs.108106	Ubiquitin–like, containing PHD and RING finger domains 1, UHRF1	19p13.3	22.63
8	Hs.165636	DIRAS family, GTP–binding RAS–like 2, DIRAS2	9q22.2	18.38
9	Hs.692	Tumor–associated calcium signal transducer 1,TACSTD1	2p21	16.00
10	Hs.121017	Histone 1, H2ae, HIST1H2AE	6p22.2–p21.1	16.00
11	Hs.237396	Hypothetical protein LOC643911, LOC643911	16q12.2	34.00
12	Hs.296341	CAP, adenylate cyclase–associated protein, 2 (yeast), CAP2	6p22.3	16.00
13	Hs.375108	CD24 antigen(small cell lung carcinoma cluster 4 antigen), CD24	6q21	14.93
14	Hs.421956	Spindle pole body component 25 homolog, Spc25	2q24.3	14.93
15	Hs.414467	Homeo box A13, HOXA13	7p15–p14	14.93
16	Hs.132748	Ribosomal protein L39–like, RPL39L	3q27	14.93
17	Hs.352662	Golgi phosphoprotein 2, GOLPH2	9q21.33	13.93
18	Hs.528669	Chromosome condensation protein G, HCAP–G	4p15.33	10.20
19	Hs.431270	Chromosome 9 open reading frame 125, C9orf125	9q31.1	9.19
20	Hs.458287	N–acetyltransferase 8B, NAT8B	2p13.1	8.57
21	Hs.436170	Nudix(nucleoside diphosphate linked moiety X)type motif 14, NUDT14	14q32.33	8.00
22	Hs.65436	Lysyl oxidase–like 1, LOXL1	15q22	6.96
23	Hs.228320	Chromosome 10 open reading frame 81, C10orf81	10q25.3	6.73
24	Hs.182137	Histone 1, H2bg, HIST1H2BG	6p21.3	6.73
25	Hs.82302	Heparan sulfate 6–O–sulfotransferase 2, HS6ST2	xq26.2	6.65
26	Hs.132526	Melanoma antigen, LOC51152	1q21.1	6.50
27	Hs.2316	SRY (sex determining region Y)–box 9, SOX9	17q24.3–q25.1	6.28
28	Hs.166071	Cyclin–dependent kinase 5, CDK5	7q36	6.06
29	Hs.169300	Transforming growth factor, beta 2, TGFB2	1q41	5.86
30	Hs.444118	MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 , MCM6	2q21	5.10
31	Hs.44532	Ubiquitin D, UBD	6p21.3	4.92
32	Hs.105859	Hypothetical protein FLJ10260, FLJ10260	17q12	4.59
33	Hs.14968	Pleiomorphic adenoma gene 1, PLAG1	8q12	4.59
34	Hs.352213	Hypothetical protein LOC131368, LOC131368	3q12.3	4.29
35	Hs.445489	Pleckstrin homology domain containing, family B member 1, PLEKHB1	11q13.5–q14.1	4.29
36	Hs.48554	RAP2A, member of RAS oncogene family, RAP2A	13q34	3.73
37	Hs.446698	Basic leucine zipper transcription factor, ATF–like 2, BATF2	11q13.1	3.73
38	Hs.44155	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1–like, MTHFD1L	6q25.1	3.56
39	Hs.469358	KIAA1641	2q11.2	3.48
40	Hs.284266	Family with sequence similarity 127, member B, FAM127B	xq26.3	3.48
41	Hs.294144	Hypothetical protein FLJ21657, FLJ21657	5p12	3.40
42	Hs.55279	Serine(or cysteine) proteinase inhibitor, clade B member 5, SERPINB5	18q21.3	3.36
43	Hs.283085	Protocadherin beta 6, PCDHB6	5q31	3.25
44	Hs.91662	KIAA0888 protein, KIAA0888	5q13.3	3.03
45	Hs.171466	Elongation factor RNA polymerase II–like 3, ELL3	15q15.3	3.03
46	Hs.221974	Synaptosomal–associated protein, 25 kDa, SNAP25	20p12–p11.2	2.89
47	Hs.188662	KIAA1702 protein, KIAA1702	6p11	2.83
48	Hs.83450	Laminin, alpha 3, LAMA3	18q11.2	2.60
49	Hs.425352	F–box protein 17, FBXO17	19q13.2	2.30
50	Hs.390427	Immunoglobulin kappa variable 1D–13, IGKV1D–13	2p12	2.30
51	Hs.31442	RecQ protein–like 4, RECQL4	8q24.3	2.14
52	Hs.235368	Collagen, type V, alpha 3, COL5A3	19p13.2	2.05
53	Hs.24970	RAB39B, member RAS oncogene family, RAB39B	xq28	2.00

■创新盘点

本研究采用基因芯片技术研究正常肝脏、慢性乙型肝炎、肝硬化、肝癌组织基因表达谱, 通过生物信息学处理, 对共同表达的差异基因进行分析, 探讨相关基因变化与肝癌发生过程中的可能内在联系.

■名词解释

Hs.75678: 是某一个基因的UniGene ID, 每个基因都有一个明确的ID, 例如通过Hs.75678, 可以在www.pubmed.com基因bank数据库中查询基因名称以及目前已知的功能和基因序列等信息.

■应用要点
对差异表达基因功能分析有助于肝癌发生机制的深入研究, 为寻找理想的肝癌肿瘤标志物和探索基因治疗提供线索.

表 2 在肝炎、肝硬化、肝癌中共同下调表达的基因

编号	Gene代码	基因描述	染色体定位	比值
1	Hs.75678	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B, FOSB	19q13.32	0.067
2	Hs.8373	Chromosome 5 open reading frame 27, C5orf27	5q15	0.067
3	Hs.83623	X(inactive)-specific transcript, XIST	xq13.2	0.075
4	Hs.282409	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19, CYP2C19	10q24.1-q24.3	0.082
5	Hs.110	Solute carrier family 3 member 1, SLC3A1	2p16.3	0.102
6	Hs.532933	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12, P2RY12	3q24-q25	0.177
7	Hs.1321	Coagulation factor XII, F12	5q33-qter	0.189
8	Hs.82120	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2, NR4A2	2q22-q23	0.198
9	Hs.25647	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, FOS	14q24.3	0.203
10	Hs.534337	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4, HLA-DRB4	6p21.3	0.250
11	Hs.332053	Serum amyloid A1, SAA1	11p15.1	0.287
12	Hs.9701	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma, GADD45G	9q22.1-q22.2	0.308
13	Hs.1395	Early growth response 2, EGR2	10q21.1	0.330
14	Hs.388674	Heart alpha-kinase, HAK	18q21.31	0.354
15	Hs.171695	Dual specificity phosphatase 1, DUSP1	5q34	0.366
16	Hs.414795	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor clade E member 1, SERPINE1	7q21.3-q22	0.379
17	Hs.8364	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4, PDK4	7q21.3-q22.1	0.420
18	Hs.156637	Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence c, CBLC	19q13.2	0.435
19	Hs.76422	Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid), PLA2G2A	1p35	0.435
20	Hs.1581	Glutathione S-transferase theta 2, GSTT2	22q11.23	0.435
21	Hs.30246	Solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2, SLC19A2	1q23.3	0.451
22	Hs.177534	Dual specificity phosphatase 10, DUSP10	1q41	0.451
23	Hs.9914	Follistatin, FST	5q11.2	0.456
24	Hs.74088	Early growth response 3, EGR3	8p23-p21	0.467
25	Hs.144287	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2, HEY2	6q22.2-q22.33	0.467
26	Hs.351344	Transmembrane protein 25, TMEM25	11q23.3	0.467
27	Hs.249441	WEE1 homolog (S. pombe), WEE1	11p15.3-p15.1	0.483
28	Hs.376206	Kruppel-like factor 4 (gut), KLF4	9q31	0.483

associated calcium signal transducer 1, TACSTD1)基因编码一种跨膜糖蛋白钙离子依赖的细胞黏附分子, 他是一种肿瘤相关抗原. 体内低甲基化状态导致TACSTD1基因的扩增, 通过上调原癌基因c-Myc表达和cyclin A/E的表达, 诱导细胞增殖. 在结肠癌、乳腺癌等肿瘤中上调表达, 提示预后不良. Liljefors *et al*应用TACSTD1多克隆抗体显著降低了结肠癌的侵袭性, 已经作为肿瘤免疫治疗的基因靶点[3-4]. CD24(CD24 molecule)基因编码一种糖基化磷脂酰肌醇锚蛋白, 在胃癌、肝癌、结肠癌、肺癌等多种肿瘤中均有高表达, 其表达强度可作为分子标志判定组织是否恶性转化以及预测有无淋巴结转移, 他是预后不良的标志[5], CD24在HBsAg阳性肝癌中高于HBsAg阴性肝癌, CD24的高表达与高AFP、HBsAg阳性的低分化肝癌显著相关. 其异常表达可能是肝癌早期的分子事件, 联合AFP可以作为HCC早期诊断指标. Sagiv *et al*应用CD24单克隆抗体使结肠癌细胞系生长抑制, 认为可作为肝癌生物免疫靶向治疗位点[6]. 丝氨酸蛋白酶抑制物B簇5蛋白(serpin peptidase inhibitor, clade B member 5, SERPINB5)基因又名Maspin, 认为是候选2类抑癌基因, 在动物模型和体外细胞培养试验中可以抑制肿瘤细胞的生长及肿瘤浸润, 可能与抑制基质蛋白酶有关. 但在乳头状甲状腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌等多种肿瘤中Maspin呈上调表达, 不是下调表达, 且上调表达程度与肿瘤的低分化程度和浸润显著相关, 这提示Maspin在体内的作用是复杂的, 可能有着不同的转录作用方式. Maspin在肝癌中未见报道, 其在肝癌中的作用有待进一步研究[7-8].

在肝炎、肝硬化、肝癌中共同下调表达的基因中, 谷胱甘肽S转移酶θ2(glutathione S-transferase theta 2, GSTT2)基因编码谷胱甘肽S转移酶θ2, 催化还原型谷胱甘肽与体内各种潜在致癌物结合反应, 清除体内亲电子基团, 使之失去与DNA结合活性. 此类基因突变或缺失, 降低机体对潜在致癌物的抵抗力从而增加

患癌风险. 研究表明, 在结肠癌、胃癌、乳腺癌GSTT2表达下降并与肿瘤的恶性程度呈负相关[9-10]. 肝脏中富含谷胱甘肽S转移酶, GSTT2表达程度下降, 是肝癌发生的重要危险因素. KLF4 (kruppel-like factor 4, Kruppel因子4)基因在胃肠道系统内表达丰富, 编码含有锌指蛋白结构域的转录因子抑制物. 在细胞G_1/S和G_2/M转换期发挥检控点的作用, 负向调控细胞增殖. 在DNA损伤的过程中, KLF4表达增高抑制细胞G_1/S期或G_2/M转化, 维持DNA受损的细胞周期稳定. 在结肠癌、胆囊癌、胃癌中KLF4是低表达的, KLF4低表达往往提示肿瘤预后较差, 是一个判断预后的独立因素. 在胃癌中通过转染KLF4, 能降低肿瘤集落的形成及肿瘤细胞的迁移[11]. 研究提示, KLF4启动子超甲基化可能是KLF4表达下降的原因[12], 在肝脏疾病中未见报道, 他在肝癌发生过程中的作用有待进一步阐明.

我们的研究已经筛选出一些与肝癌发生相关的异常表达基因, 有助于从分子水平了解肝癌发生机制, 为寻找理想的肝癌肿瘤标志物和探索基因治疗提供线索. 这些基因在肝炎、肝硬化阶段已经有异常表达, 说明他们可能参与了肝癌发生的整个过程. 有部分异常表达基因尚未在肝脏病变中报道, 弄清其在肝癌发生中的作用是下一步工作的任务.

4 参考文献

1 Kao JH, Chen DS. Changing disease burden of hepatocellular carcinoma in the Far East and Southeast Asia. *Liver Int* 2005; 25: 696-703

2 Dudda-Subramanya R, Lucchese G, Kanduc D, Sinha AA. Clinical applications of DNA microarray analysis. *J Exp Ther Oncol* 2003; 3: 297-304

3 Munz M, Zeidler R, Gires O. The tumour-associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP. *Cancer Lett* 2005; 225: 151-157

4 Liljefors M, Nilsson B, Fagerberg J, Ragnhammar P, Mellstedt H, Frödin JE. Clinical effects of a chimeric anti-EpCAM monoclonal antibody in combination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2005; 26: 1581-1589

5 Lim SC, Oh SH. The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract* 2005; 201: 479-486

6 Sagiv E, Memeo L, Karin A, Kazanov D, Jacob-Hirsch J, Mansukhani M, Rechavi G, Hibshoosh H, Arber N. CD24 is a new oncogene, early at the multistep process of colorectal cancer carcinogenesis. *Gastroenterology* 2006; 131: 630-639

7 Son HJ, Sohn TS, Song SY, Lee JH, Rhee JC. Maspin expression in human gastric adenocarcinoma. *Pathol Int* 2002; 52: 508-513

8 Chen EI, Yates JR. Maspin and tumor metastasis. *IUBMB Life* 2006; 58: 25-29

9 de Bruin WC, Wagenmans MJ, Board PG, Peters WH. Expression of glutathione S-transferase theta class isoenzymes in human colorectal and gastric cancers. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1453-1457

10 Geylan-Su YS, Isgör B, Coban T, Kapucuoglu N, Aydintug S, Iscan M, Iscan M, Güray T. Comparison of NAT1, NAT2 and GSTT2-2 activities in normal and neoplastic human breast tissues. *Neoplasma* 2006, 53: 73-78

11 Wei D, Gong W, Kanai M, Schlunk C, Wang L, Yao JC, Wu TT, Huang S, Xie K. Drastic down-regulation of Kruppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res* 2005; 65: 2746-2754

12 Whitney EM, Ghaleb AM, Chen X, Yang VW. Transcriptional profiling of the cell cycle checkpoint gene kruppel-like factor 4 reveals a global inhibitory function in macromolecular biosynthesis. *Gene Expr* 2006; 13: 85-96

■同行评价

本文分析了部分差异表达基因在疾病发生发展中的可能作用, 对于肝硬化、肝癌等疾病的发生机制研究有一定的参考价值, 建议对本研究发现的尚未见在肝脏病变中报道的异常表达基因作相应的介绍和分析.

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 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2542-2544
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

腔镜超声引导下腹腔镜肝段切除术的临床应用

马龙滨, 李 文, 李 宾, 何 津, 王新元, 张大伟, 李 博

■背景资料
腹腔镜肝切除术虽经历十多年的发展, 但尚未普及, 原因为难以克服的大出血及胆漏等并发症. 本文以腔镜超声引导下以肝段为本的解剖性肝切除术有效的解决上述问题. 特别在肝癌腹腔镜肝切除术应用中更加符合肿瘤外科及微创外科原则.

马龙滨, 李宾, 何津, 王新元, 张大伟, 李博, 华北煤炭医学院附属人民医院肝胆外科 河北省唐山市 063001
李文, 华北煤炭医学院附属人民医院普外科 河北省唐山市 063001
河北省科技厅立项资助项目, No. 062761591
作者贡献分布: 此题由马龙滨设计, 研究过程由马龙滨, 李文, 李宾, 何津, 王新元, 张大伟及李博共同完成; 本论文写作由马龙滨完成.
通讯作者: 马龙滨, 063001, 河北省唐山市, 华北煤炭医学院附属人民医院肝胆外科. mayifu1@yahoo.com.cn
电话: 0315-2864784
收稿日期: 2008-05-06 修回日期: 2008-06-06
接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-08-08

Anatomical segmental hepatectomy under the guidance of ultrasongraphy

Long-Bin Ma, Wen Li, Bin Li, Jin He, Xin-Yuan Wang, Da-Wei Zhang, Bo Li

Long-Bin Ma, Bin Li, Jin He, Xin-Yuan Wang, Da-Wei Zhang, Bo Li, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital Affiliated to North China Coal Medical College, Tangshan 063001, Hebei Province, China
Wen Li, Department of General Surgery, People's Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063001, Hebei Province, China
Supported by: the Science and Technology Department Foundation of Hebei Province, No. 062761591
Correspondence to: Long-Bin Ma, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital Affiliated to North China Coal Medical College, Tangshan 063001, Hebei Province, China. mayifu1@yahoo.com.cn
Received: 2008-05-06 Revised: 2008-06-06
Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To assess the feasibility, safety and clinical value of laparoscopic anatomical segmental hepatectomy under the guidance of ultrasongraphy.

METHODS: We performed laparoscopic liver resection in 20 patients from January 2005 to October 2006, including 13 cases of hepatocellular carcinoma, 1 case of cholangiocarcinoma, 3 cases of hemangioma, 1 case of adenoma, and 2 cases of liver abscess. All the cases received laparoscopic liver anatomy under endoscopic ultrasound guidance in complete pneumopertoneum.

RESULTS: The mean operating time was 188 min, and the mean blood loss was 300 mL. There were no uncontrollable complications. The mean time of hospital stay after operation was 8.6 d.

CONCLUSION: Segment-based hepatectomy under the guidance of ultrasonography conforms to the principle in tumor treatment and is worthy of being applied in liver surgery.

Key Words: Laparoscopy; Segment-based hepatectomy; Laparoscopic ultrasound

Ma LB, Li W, Li B, He J, Wang XY, Zhang DW, Li B. Anatomical segmental hepatectomy under the guidance of ultrasongraphy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2542-2544

摘要

目的: 探讨腔镜超声引导下腹腔镜肝解剖性肝段切除术的可行性、安全性与临床价值.

方法: 收集2005-01/2006-12我院行腹腔镜肝切除术患者20例, 其中原发性肝癌13例、肝内胆管细胞癌1例、肝血管瘤3例、肝脏腺瘤1例, 肝脓肿2例. 所有病例均在全气腹条件下完成腔镜超声引导下腹腔镜肝解剖性肝段切除手术.

结果: 20例病例的手术时间平均188 min, 出血量平均300 mL. 术中未出现不能控制的并发症, 术后平均住院8.6 d.

结论: 腔镜超声引导下以肝段为本的解剖性肝切除术更加符合肿瘤根治原则, 值得在肝脏外科推广应用.

关键词: 腹腔镜; 肝切除; 腔镜超声

马龙滨, 李文, 李宾, 何津, 王新元, 张大伟, 李博. 腔镜超声引导下腹腔镜肝段切除术的临床应用. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2542-2544
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2542.asp

■同行评议者
李胜, 研究员, 山东省肿瘤防治研究院肝胆外科; 于聪慧, 教授, 中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科

0 引言

随着20世纪80年代术中超声技术的应用以及肝胆外科医生对肝脏解剖的进一步认识, 肝脏

切除技术也发生了巨大的变化, 从既往的大面积肝叶切除发展到解剖更为准确的肝段切除, 从而最大限度保留了正常肝脏, 对残肝影响少, 术后肝功能恢复较快, 并发症较少. 我院从2005-01/2006-12采用腔镜超声引导下以肝段为本的解剖性肝切除技术完成各种肝胆疾病的肝切除20例, 取得了较好的效果, 现总结报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2005-01/2006-12共完成行腔镜超声引导下腹腔镜下肝切除20例, 其中男性12例, 女性8例. 年龄25-79岁, 平均50岁. 原发性肝癌13例、肝内胆管细胞癌1例、肝血管瘤3例、肝脏腺瘤1例, 肝脓肿2例. 肝功能Child分级A级16(75%)例, B级4(25%)例. 术前常规行肝肾功能、腹部B超、薄层CT平扫+增强检查以了解病灶范围、数量以及与肝脏血管的解剖毗邻. 病灶位于肝脏边缘、右肝表面Ⅴ段3例, Ⅵ段4例或者左半肝Ⅱ-Ⅲ段9例, Ⅳ段4例; 肝功能Child分级B级以上, 无腹部手术史.

1.2 方法 全身麻醉下, 根据手术需要调整体位, 如果肿瘤位于右肝6, 7段, 取右侧抬高卧位. 主刀医生: 站在患者的左侧, 其余位置的肿瘤取平卧分腿位, 主刀医生站在患者两腿中. 于脐下缘做一小切口刺入气腹针建立气腹, 控制腹内压于14 mmHg水平, 自脐下Trocar管置入30度腹腔镜．分别于上腹部放置3-4个Trocar并置入操作器械. 我们采用先腹腔镜探查以确定有无肝外转移, 术中腔镜超声引导下切肝. 根据切除部位的需要先用超声刀或电凝游离肝脏周围的韧带. 右肝表面局部肿块切除及左肝外侧叶切除可不解剖第一肝门和第2肝门的脉管结构. 用电凝在肝脏表面标记出手术切缘, 用电凝、超声刀分离肝实质, 遇到管道可根据管道的粗细选用普通钛夹夹闭. 肝脏创面仔细电灼止血, 并且于肝脏断面喷洒医用生物蛋白胶, 根据需要放置腹腔引流管1根, 标本由标本袋装之经过左下腹一约5 cm横切口取出.

2 结果

20例均未中转开腹, 左肝外侧解剖性切除9例, 左半肝解剖性切除4例, 切除肝体积3 cm×2.5 cm×2.5 cm-7.5 cm×6 cm×4 cm, 平均标本长度为5.5 cm(2.5-7.5 cm), 手术时间术中出血量为50-400 mL(平均300 mL), 输血量为200-800 mL(平均350 mL); 术中阻断肝门时间15-30 min(平均20 min); 肿瘤患者切缘全部呈阴性. 术后胆漏1例, 未发生不能控制的出血. 术后1-6 d开始进食. 1-3 d可下床, 术后住院时间2-16 d(平均8.6 d).

3 讨论

自1991年Reich *et al*首次报道腹腔镜肝脏切除术以来[1], 与腹腔镜相关的肝脏手术报道逐渐增多. 周伟平 *et al*[2]1993年报道国内首例腹腔镜肝癌切除术. 由于肝脏解剖和生理特点, 肝脏作为丰富血供的实质性器官, 进行腹腔镜肝脏手术, 需要应用有效的切肝工具断肝以及对肝脏创面进行确实有效的止血, 我们采用术中超声定位, 即通过术中超声追踪肝静脉和门静脉分支, 根据病灶所在的部位, 在肝表面确定肝段切除范围及界线, 并预先通过肝外解剖(第一、二、三肝门)暂时性阻断人肝及出肝血流, 用超吸刀离断肝实质, 在肝内显露相关肝段血管和胆管, 并加以结扎. 这种手术方法操作简单, 阻断肝门时间较短, 术中出血少, 大多数患者不需要输血, 如行解剖性左半肝切除阻断肝门时间为20 min, 出血量不超过300 mL.

目前腹腔镜下行肝脏规则切除报导较少, 难度大而风险高. 腹腔镜肝脏手术对病例的选择通常是肝脏良性病变以及肝硬化患者不适宜行开腹手术的肝脏恶性肿瘤[3-4]. 我们选择的病例为病灶位于右肝表面或者左半肝, 对于肝脏恶性肿瘤, 同常规开腹手术一样．切除时采取“no touch”原则.

我们体会术中超声技术在肝胆外科的应用是肝脏外科的又一大进步, 如果没有术中超声, 解剖性肝段切除术是不可能施行的. 它的主要作用包括: (1)能够发现术前各种影像检查所漏诊的病变, 从而改变治疗方案, 提高疗效. 避免不必要的开腹探查术, 手术结束时检查手术效果, 确认有无残留病变等. (2)能够进行准确定位, 明确病变的部位、范围以及与周围血管的解剖关系, 为术式选择提供依据, 决定是保留血管还是一并切除, 正确处理血管, 既可最大限度地保存肝组织或不影响血液回流, 又可避免切除的不彻底. (3)准确地定出切除范围, 划定切除界限, 尤其是肿瘤, 至少保证切缘距肿瘤边缘>1 cm, 才能达到根治性切除标准. 本组仅发生1例胆漏是开始时由于手术经验不足所致, 13例肝癌患者手术切缘全部阴性, 这与多数学者认为恶性肿瘤规则性肝切除效果要优于局部切除的结果

■研发前沿
腔镜超声具有探查性质, 可避免不必要的手术; 腔镜超声引导切肝符合肝段切除, 具有出血少及损伤小等特点.

■同行评价
本文科学性较强, 结论明确, 具有一定的临床参考价值, 但创新性一般.

一致[5].

严重的出血是腹腔镜肝脏手术中转开腹的主要原因, 但出血大部分可在腹腔镜下电凝或钛夹夹闭予以解决[6-8]. 由于腔镜超声引导和腹腔镜的放大作用, 我们在本组操作过程中未发生不能控制的出血, 对于出血血管, 经电凝或钛夹夹闭均可完全止血.

本组20例病例手术均获成功, 所有患者恢复良好, 无严重并发症, 疗效满意. 经验表明: (1)腔镜超声引导下腹腔镜肝切除术后痛苦少, 术中出血少, 恢复快, 并发症少, 住院时间短等微创优势. (2)只要熟练掌握腹腔镜技术和肝胆外科技术, 并具有丰富的临床经验和必要的器械条件, 腹腔镜下肝切除术是是安全和可行的. (3)腔镜超声引导下以肝段为本的解剖性肝切除术具有操作简单, 阻断肝门时间短, 术中出血少, 术后残肝发生缺血机会少, 并发症低以及更加符合肿瘤根治的原则等优点, 值得在肝脏外科推广应用.

4 参考文献

1 Reich H, McGlynn F, DeCaprio J, Budin R. Laparoscopic excision of benign liver lesions. *Obstet Gynecol* 1991; 78: 956-958

2 周伟平, 陈汉, 孙志宏, 胡冰, 吴孟超. 腹腔镜技术在肝癌治疗中的应用. 中华普通外科杂志 1994; 9: 224-225

3 Descottes B, Lachachi F, Sodji M, Valleix D, Durand-Fontanier S, Pech de Laclause B, Grousseau D. Early experience with laparoscopic approach for solid liver tumors: initial 16 cases. *Ann Surg* 2000; 232: 641-645

4 Abdel-Atty MY, Farges O, Jagot P, Belghiti J. Laparoscopy extends the indications for liver resection in patients with cirrhosis. *Br J Surg* 1999; 86: 1397-1400

5 DeMatteo RP, Palese C, Jarnagin WR, Sun RL, Blumgart LH, Fong Y. Anatomic segmental hepatic resection is superior to wedge resection as an oncologic operation for colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 178-184

6 Gagner M, Rogula T, Selzer D. Laparoscopic liver resection: benefits and controversies. *Surg Clin North Am* 2004; 84: 451-62

7 刘兴国, 李朝龙. 腹腔镜肝脏切除术. 中华肝胆外科杂志 2003; 9: 56-58

8 耿小平. 肝脏外科的微创观念与技术. 中国微创外科杂志 2003; 3: 192-193

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 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T1/2不能写成tl/2或$T_{\frac{1}{2}}$, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *Cl*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2545-2548
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

MMP-9、TIMP-1在胰腺癌组织中的表达及临床意义

滕晓丽, 马 威, 杨家耀, 胡 伟, 赵 秋

滕晓丽, 杨家耀, 胡伟, 武汉市第一医院消化内科 湖北省武汉市 430022
马威, 武汉市第一医院中心实验室 湖北省武汉市 430022
赵秋, 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
作者贡献分布: 此课题由滕晓丽, 马威, 杨家耀, 胡伟及赵秋设计; 研究过程由滕晓丽, 马威, 杨家耀, 胡伟及赵秋操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由马威提供; 数据分析由滕晓丽, 马威及杨家耀完成; 本论文写作由滕晓丽完成.
通讯作者: 赵秋, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. dalianmao2121@hotmail.com
电话: 027-85332666
收稿日期: 2008-05-12 修回日期: 2008-07-02
接受日期: 2008-07-07 在线出版日期: 2008-08-08

Expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in pancreatic carcinoma and their clinical significances

Xiao-Li Teng, Wei Ma, Jia-Yao Yang, Wei Hu, Qiu Zhao

Xiao-Li Teng, Jia-Yao Yang, Wei Hu, Department of Digestive Diseases, the First Hospital of Wuhan City, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Wei Ma, Department of Central Laboratory, the First Hospital of Wuhan City, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Qiu Zhao, Department of Digestive, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Qiu Zhao, Department of Digestive, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. dalianmao2121@hotmail.com
Received: 2008-05-12 Revised: 2008-07-02
Accepted: 2008-07-07 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and their correlations with the metastasis and prognosis of pancreatic carcinoma.

METHODS: Immunohistochemical staining (SP method) was used to measure MMP-9 and TIMP-1 expression in 63 cases of pancreatic carcinoma, 11 cases of chronic pancreatitis (CP) and 6 cases of normal pancreas.

RESULTS: The expression of MMP-9 in pancreatic carcinoma was significantly higher than that in chronic pancreatitis and normal pancreas (58.7% *vs* 18.1%, 0.0%; both $P < 0.05$), while the expression of TIMP-1 pancreatic carcinoma was significantly lower than that in normal pancreas (46.0% *vs* 100.0%, $P < 0.05$). MMP-9 and TIMP-1 expression in pancreatic carcinoma were correlated with lymph node involvements and distant metastases ($P < 0.05$); however, they had no correlations with the sex, age of patients and histological staging.

CONCLUSION: MMP-9 and TIMP-1 may be associated with the metastasis of pancreatic carcinoma.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Matrix metalloproteinase-9; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Immunohistochemistry

Teng XL, Ma W, Yang JY, Hu W, Zhao Q. Expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in pancreatic carcinoma and their clinical significances. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2545-2548

摘要

目的: 探讨胰腺癌患者组织中MMP-9、TIMP-1的表达及其相互关系, 分析其与临床及转移预后的关系.

方法: 免疫组织化学SP法检测63例胰腺癌、11例慢性胰腺炎和6例正常胰腺组织中MMP-9、TIMP-1的表达.

结果: 胰腺癌组织中MMP-9表达明显高于慢性胰腺炎和正常胰腺组织(58.7% *vs* 18.1%, 0.0%; 均$P<0.05$). TIMP-1在胰腺癌的表达低于正常胰腺组织(46.0% *vs* 100.0%, $P<0.05$). MMP-9和TIMP-1在胰腺癌组织中的表达与性别、年龄、组织学分级无关, 而与患者的淋巴结转移、远处转移情况有关($P<0.05$).

结论: MMP-9、TIMP-1在胰腺癌组织中的表达变化可能与胰腺癌转移相关.

关键词: 胰腺癌; MMP-9; TIMP-1; 免疫组织化学

■**背景资料**
MMPs和TIMPs在降解ECM过程中起着重要作用, 是恶性肿瘤侵袭和转移潜能的主要调节蛋白, 本研究采用免疫组织化学方法检测胰腺癌组织中的MMP-9和TIMP-1的表达情况, 以探讨二者在胰腺癌中的表达变化特点、相互关系及其临床意义.

■**同行评议者**
刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

■相关报道
文献表明肿瘤侵袭转移的潜能与肿瘤细胞产生MMP-9的能力有着密切的正相关关系, 他不仅参与ECM的降解, 而且还对肿瘤细胞的黏附能力有影响.

滕晓丽, 马威, 杨家耀, 胡伟, 赵秋. MMP-9、TIMP-1在胰腺癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2545-2548
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2545.asp

0 引言

肿瘤的生长、侵袭和转移是一个复杂的多阶段过程[1]. 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解及基底膜的破坏是肿瘤浸润和转移的先决条件之一[2]. ECM由多种胶原蛋白、层粘连蛋白、连接蛋白、弹性蛋白和蛋白多糖组成[3], 他的降解过程依靠蛋白水解酶, 主要有丝氨酸蛋白酶类、半胱氨酸蛋白酶类和基质金属蛋白酶类(matrimetalloproteinasea, MMPs). 在维持ECM的平衡及肿瘤侵袭转移过程中, MMPs及组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)发挥了重要作用[4]. 我们采用免疫组织化学方法检测胰腺癌组织中的MMP-9和TIMP-1的表达情况, 以探讨二者在胰腺癌中的表达变化特点、相互关系及其临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2000-2007年华中科技大学同济医学院附属同济医院和武汉市第一医院胰腺癌手术标本63例, 其中男性42例, 女性21例; 年龄20-90(平均54.8)岁. 全部病例术前均未接受放疗或化疗, 均经组织病理学诊断为胰腺癌, 其中导管腺癌61例, 实性乳头状癌1例, 黏液腺癌1例. 组织学分级高中分化腺癌44例, 低分化腺癌17例; 63例临床和/或病检记录中, 胰腺外器官转移阳性者19例, 占30.1%, 淋巴结转移阳性者24, 占38.9%. 另取同期病理证实的11例慢性胰腺炎和6例正常胰腺组织作为对照. 兔抗人MMP-9多克隆抗体、兔抗人TIMP-1多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; 兔抗SP试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法 免疫组织化学染色按SP试剂盒说明书进行. 用已知的乳腺癌阳性片作为阳性对照, 以0.05 mol/L PBS液代替一抗作为阴性对照. MMP-9和TIMP-1均以细胞胞质中出现清晰棕黄色颗粒为阳性细胞, 切片中计数10个高倍视野阳性细胞百分率, 阳性细胞率≥30%为阳性病例, <30%为阴性病例[3]. 所有评判过程均由同一病理医师完成.

统计学处理 所有数据均用SPSS12.0统计软件包进行统计学分析, 统计方法采用χ^2检验和Fisher检验. $P<0.05$认为有统计学意义.

表 1 胰腺癌组织中MMP-9、TIMP-1的表达与临床病理特征的关系

	n	MMP-9		TIMP-1	
		阴性	阳性	阴性	阳性
性别					
男	42	18	24	22	20
女	21	8	13	12	9
年龄					
≥60	25	10	15	14	11
<60	38	16	24	20	18
组织学分级					
高中分化	44	18	26	24	20
低分化	19	8	11	10	9
淋巴结转移					
有	24	2[a]	22	16[a]	8
无	39	24	15	13	26
远处转移					
有	19	0[a]	19	16[a]	3
无	44	39	5	18	26

[a]$P<0.05$ *vs* 同组.

2 结果

2.1 MMP-9、TIMP-1在胰腺癌组织中的表达 MMP-9在63例胰腺癌组织中有37例阳性表达, 阳性表达率为58.7%, 显著高于慢性胰腺炎组织(2例阳性表达, 阳性表达率为18.1%)和正常胰腺组织(0例阳性表达, 阳性表达率为0%)($P<0.05$). MMP-9阳性表达主要定位于肿瘤细胞的胞质, 间质细胞、血管内皮细胞也有阳性染色. TIMP-1在63例胰腺癌组织中有29例(46%)表达, 与慢性胰腺炎组织(9例表达, 81.8%)比较, 没有统计学意义; 与正常胰腺组织(6例表达, 100%)比较, 有统计学意义($P<0.05$). TIMP-1阳性表达主要定位于细胞胞质.

2.2 胰腺癌组织中MMP-9、TIMP-1的表达和临床病理指标的关系 MMP-9和TIMP-1在胰腺癌组织中的表达与性别、年龄、组织学分级无关, 而与患者的淋巴结转移、远处转移情况有关($P<0.05$, 表1).

2.3 MMP-9、TIMP-1的表达和淋巴结转移间的多因素分析 将63例胰腺癌组织按照MMP-9、TIMP-1的表达情况分为4组: MMP-9 (+)/TIMP-1(-)、MMP-9(-)/TIMP-1(+)、MMP-9(+)/TIMP-1(+)、MMP-9(-)/TIMP-1(-), 统计淋巴结转移情况, 结果显示: MMP-9(+)/TIMP-1(-)组有11例淋巴结转移, 无淋巴结转移为7例, MMP-9(-)/TIMP-1(+)组有1例淋巴结转移, 无

表 2 胰腺癌组织中MMP-9、TIMP-1的表达与淋巴结转移的多因素分析

淋巴结转移	MMP-9(+) /TIMP-1(-)	MMP-9(-) /TIMP-1(+)	MMP-9(+) /TIMP-1(+)	MMP-9(-) /TIMP-1(-)
有	11[a]	1[a]	7	0
无	7	18	6	11

[a]$P<0.05$ *vs* 无淋巴结转移组.

■应用要点
本文对胰腺癌组织中的MMP-9和TIMP-1的表达进行了回顾性的研究, 从一定层面上说明了二者在胰腺癌组织中的表达可能与转移相关, 对下一步研究提供了基础.

淋巴结转移为18例, 两组比较有显著性差异($P<0.05$, 表2).

3 讨论

MMPs和TIMPs在降解ECM过程中起着重要作用, 参与恶性肿瘤的侵袭和转移, 是恶性肿瘤侵袭和转移潜能的主要调节蛋白[5-6]. MMPs是高度保守的依赖于锌离子的内切蛋白水解酶家族, 可降解基底膜和ECM的大多数蛋白质, 目前已发现了至少26个成员[7], 其中属于明胶酶的明胶酶B(即MMP-9)主要降解明胶和基底膜Ⅳ型胶原. 文献表明肿瘤侵袭转移的潜能与肿瘤细胞产生MMP-9的能力有着密切的正相关关系, 他不仅参与ECM的降解, 而且还对肿瘤细胞的黏附能力有影响[8-9].

本研究显示MMP-9阳性表达主要定位于肿瘤细胞的胞质, 间质细胞、血管内皮细胞也有阳性染色. MMP-9在胰腺癌组织中的表达明显高于慢性胰腺炎组织和正常胰腺组织, 并且实验还显示MMP-9在胰腺癌组织中的表达与性别、年龄、组织学分级无关, 而与患者的淋巴结转移、远处转移情况有关. 这与国内外学者文献报道的基本一致[3,10]. 说明MMP-9在胰腺癌的发生发展过程中起重要作用. MMP-9阳性表达可否作为胰腺癌浸润转移的重要分子标志之一, 仍需进一步研究.

TIMPs是MMPs的天然抑制剂, 是一个多基因家族的编码蛋白, 通过非共价键与MMPs结合抑制MMPs活性. 目前已经发现的TIMPs至少有4种, 其中TIMP-1既能结合无活性MMP-9, 又能结合激活状态的MMP-9, 而且可以终止MMPs所有成员的水解活性[11].

本研究结果显示TIMP-1在胰腺癌组织中的表达低于正常胰腺组织($P<0.05$), 但与在慢性胰腺炎组织中的表达相比较, 没有统计学意义; TIMP-1在胰腺癌组织中的表达与性别、年龄、组织学分级无关, 而与患者的淋巴结转移、远处转移情况有关. TIMP-1能与MMP-9形成1∶1复合物, 抑制其活性[10], 在肿瘤的侵袭转移中起负性调节作用[12], 甚至可终止肿瘤细胞的浸润. 作者认为TIMP-1阳性表达率低的胰腺癌患者更具有转移倾向[12], 本实验研究的结果也支持这一观察. TIMP-1在抑制肿瘤浸润转移过程中所起的作用, 可以在一定程度上为肿瘤的生物治疗和基因治疗提供新的思路.

MMPs、TIMPs在体内建立起基质合成和降解的平衡, 恶性肿瘤中存在某种因素使MMPs过度表达和表达程度大于TIMPs时, 这种平衡就发生改变, 导致基质降解, 有利于肿瘤浸润转移; 相反, TIMPs的过度表达可防止基质降解, 抑制肿瘤浸润转移. 本研究亦显示在胰腺癌组织中MMP-9和TIMP-1的阳性表达存在负相关. 在有MMP-9阳性表达而TIMP-1阴性表达的11例胰腺癌病例中, 均表现有淋巴结转移; 而在有MMP-9阴性表达而TIMP-1阳性表达的病例中, 只1例有淋巴结转移; 20例无淋巴结转移. 两组比较有明显明显的统计学差异. 由此推测, MMP-9阳性表达而TIMP-1阴性表达的病例相较于MMP-9阴性表达而TIMP-1阳性表达的病例, 预后更差.

本研究提示MMP-9、TIMP-1在胰腺癌组织中的发达变化可能与胰腺癌转移相关, 但其能否可作为临床预后判断指标之一, 仍需进一步研究.

4 参考文献

1 Duffy MJ. The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1992; 10: 145-155
2 Hirvonen R, Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T(1-2)N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77: 85-91
3 Pryczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Dymicka-Piekarska V, Czyzewska J, Kemona A. Expression of matrix metalloproteinase 9 in pancreatic ductal carcinoma is associated with tumor metastasis formation. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45: 37-40
4 Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix

■同行评价
本文是一篇回顾性研究, 具有一定的学术价值, 如能加入患者存活或死亡方面的数据更好.

during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 541-573
5 Görögh T, Beier UH, Bäumken J, Meyer JE, Hoffmann M, Gottschlich S, Maune S. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006; 28: 31-39
6 Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S. Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2001; 165: 1769-1772
7 de Coignac AB, Elson G, Delneste Y, Magistrelli G, Jeannin P, Aubry JP, Berthier O, Schmitt D, Bonnefoy JY, Gauchat JF. Cloning of MMP-26. A novel matrilysin-like proteinase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 3323-3329
8 Ogata Y, Miura K, Ohkita A, Nagase H, Shirouzu K. Imbalance between matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 expression by tumor cells implicated in liver metastasis from colorectal carcinoma. *Kurume Med J* 2001; 48: 211-218
9 Zhang S, Li L, Lin JY, Lin H. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 899-904
10 O'Grady A, Dunne C, O'Kelly P, Murphy GM, Leader M, Kay E. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression. *Histopathology* 2007; 51: 793-804
11 Rhee JS, Diaz R, Korets L, Hodgson JG, Coussens LM. TIMP-1 alters susceptibility to carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 952-961
12 Ramer R, Hinz B. Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 59-69

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 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD_{50}, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写. (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2549-2552
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

VEGF的表达与大肠癌组织生长、侵袭及转移的关系

朱云松, 杨大明, 姚登福, 钱俊波, 李玉明, 许利华

朱云松, 钱俊波, 李玉明, 许利华, 南通医学院第二附属医院消化内科 江苏省南通市 226001
杨大明, 姚登福, 南通医学院附属医院 江苏省南通市 226001
作者贡献分布: 此课题由朱云松和杨大明设计; 研究过程由朱云松, 杨大明, 姚登福, 钱俊波, 李玉明及许利华完成; 数据分析由许利华完成; 本论文写作由朱云松完成.
通讯作者: 朱云松, 226001, 江苏省南通市孩儿巷北路6号, 南通医学院第二附属医院消化内科. js.zys@163.com
电话: 0513-85806902
收稿日期: 2008-05-05 修回日期: 2008-06-11
接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-08-08

Expression of vascular endothelial growth factor expression and its relation with growth, invasion and metastasis of human colorectal cancer

Yun-Song Zhu, Da-Ming Yang, Deng-Fu Yao, Jun-Bo Qian, Yu-Ming Li, Li-Hua Xu

Yun-Song Zhu, Jun-Bo Qian, Yu-Ming Li, Li-Hua Xu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nantong Medical College, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Da-Ming Yang, Deng-Fu Yao, the Affiliated Hospital of Nantong Medical College, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Yun-Song Zhu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nantong Medical College, 8 Hai'er xiang North Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. js.zys@163.com
Received: 2008-05-05 Revised: 2008-06-11
Accepted: 2008-06-17 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To explore the relations of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression with the growth, invasion and metastasis of colorectal cancer.

METHODS: We collected 23 fresh colorectal cancerous, distal cancerous tissues resected during operation, 16 colon polyps and 45 serum samples from colon cancer patients. The expression of VEGF in colorectal tissues and serum samples was detected by nested reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. The relationship was also analyzed between VEGF expression and Duke's staging.

RESULTS: The expression of VEGF mRNA was significantly higher in the colorectal cancer tissues than that in the distal cancerous tissues or colon polyps (65.22% *vs* 21.74%, 18.75%, both $P < 0.01$). VEGF mRNA expression was positive in 3 patients (37.5%) with Duke's stage A or B, and it was positive in 12 patients with (80.0%) stage C or D; there was significant difference between them ($P < 0.05$). The level of serum VEGF was markedly higher in patients with stage C or D than that in patients with stage A or B (716.71 + 229.39 ng/L *vs* 312.30 + 103.61 ng/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: VEGF can serve as an index in predicting the growth, invasion and metastasis of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Vascular endothelial growth factor; Metastasis

Zhu YS, Yang DM, Yao DF, Qian JB, Li YM, Xu LH. Expression of vascular endothelial growth factor expression and its relation with growth, invasion and metastasis of human colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2549-2552

摘要

目的: 探讨血管内皮生长因子表达与大肠癌组织的生长、侵袭和转移的关系.

方法: 手术切除新鲜大肠癌组织、远癌组织标本各23份, 结肠息肉16例, 另外收集结肠癌患者45例. 应用逆转录聚合酶链(RT-PCR)和ELISA法, 对大肠癌组织和血清VEGF进行测定, 并分析VEGF与大肠癌Dukes临床病理分期的关系.

结果: 23例大肠癌组血管内皮生长因子mRNA阳性率明显高于远癌组及结肠息肉组(65.22% *vs* 21.74%, 18.75%, 均$P<0.01$). 根据Dukes临床病理分期, A和B期VEGFmRNA阳性为3例(37.5%), C与D期阳性有12例(80.0%), 两者差异有显著性($P<0.05$). 45例结肠癌C和D期血清VEGF水平明显高于A和B期(716.71+229.39

■背景资料
大肠癌是我国临床上常见的恶性肿瘤之一, 但因其易发生转移和扩散, 手术切除后患者复发率较高, 探索大肠癌转移机制一直是众多学者的研究重点. 大肠癌转移是个复杂而又多样的过程, 其分子机制尚未完全阐明. 目前认为, 实体肿瘤的浸润生长和转移是一个多因素作用的结果, 肿瘤血管形成对实体肿瘤的生长及转移有重要作用, 肿瘤血管形成又依赖于多种相关因子的诱导和调节, 血管内皮生长因子是其中重要的因子之一.

■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

■研发前沿
最近靶向VEGF及其受体的药物和基因治疗取得了一定的进展, 但是, 抗肿瘤血管形成只能抑制肿瘤的生长和转移, 如何筛选和评价药物疗效、最佳用药时机尚需要进一步的研究.

ng/L *vs* 312.30+103.61 ng/L), 两者差异有显著性(P<0.01).

结论: 血管内皮生长因子可作为大肠癌生长、侵袭和转移的临床预后判断指标.

关键词: 大肠癌; 血管内皮生长因子; 生长; 侵袭; 转移

朱云松, 杨大明, 姚登福, 钱俊波, 李玉明, 许利华. VEGF的表达与大肠癌组织生长、侵袭及转移的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2549-2552
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2549.asp

0 引言

血管生成在实体肿瘤生长、侵袭中起着重要作用[1]. 肿瘤血管发生是一多因素调节的复杂过程, 其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是迄今认为重要的血管生成诱导因子. 可作为肿瘤代谢及转移的标志物[2-3]. 我们应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和ELISA法对大肠癌组织和血清检测VEGF, 探讨其与大肠癌生长、侵袭和转移中的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 外科手术切除的新鲜大肠组织标本, 分别留取癌组织、远癌组织各23份(重约200 mg), 其中结肠癌16例, 直肠癌7例. 结肠息肉16例, 均来自于内镜下高频电切除标本. 置于-85℃冰箱保存, 留作总RNA制备、VEGF mRNA特定片段扩增. 另外于收集结肠癌患者45例, 男36例, 女9例. 年龄36-78(平均年龄57.2±12.1)岁. 术前空腹采外周血5 mL, 离心取血清保存在-20℃备用.

1.2 方法

1. 2.1 PCR引物设计及RT-PCR扩增方法: 参照文献[3-4]报道的VEGF基因设计PCR扩增引物, 上游引物: 5'-GATCCTGCCCTGTCTCTCTG-3'; 下游引物: 5'-TCCTCACACCATTGAAACCA-3'. 由上海赛尔生物技术公司所合成. 精确称取各组织50 mg置于无RNAase的匀浆器中, 加入TRIzol 1.0 mL匀浆2 min, 再按Li *et al*[2]方法制备总RNA, 最后加入TE缓冲液100 μL, 取部分RNA经紫外分光扫描鉴定, 已纯化的RNA未受到污染或降解, 吸光度260/280≥1.8. 总RNA先经随机引物(Promega)和逆转录酶(Gibco/BRL)合成VEGF-cDNA, 逆转录反应程序为: 23℃ 10 min; 42℃ 60 min; 95℃ 10 min. 逆转录结束后在PE960型DNA扩增仪上行PCR扩增, PCR循环程序为: 93℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 1 min连续35个循环结束后, 在72℃ 10 min后于4℃保存. 扩增产物片段为142 bp.

1.2.3 血清VEGF浓度测定: 将静脉血离心后, 留取血清. 检测方法为双抗体夹心ELISA法, 按试剂盒说明书操作. 人VEGF、ELISA试剂盒为北京晶美生物工程有限公司产品.

统计学处理 数据以mean±SD, 百分率表示, 以t检验处理数据, P<0.05有统计学显著性.

表 1 血清VEGF浓度与结肠癌临床分期

分组	n	血清VEGF浓度(ng/L)	P值
临床分期			
A+B	17	312.30 ± 103.61	–
C+D	28	716.71 ± 229.39	<0.01
淋巴结转移			
无	11	305.12 ± 111.23	–
有	34	721.35 ± 283.39	<0.01

2 结果

2.1 组织VEGF mRNA扩增 对23例大肠癌、远癌组织及结肠息肉以RT-PCR法, 对人VEGF mRNA进行了扩增, 其结果表现为: 扩增片段与原设计片段大小完全一致, PCR终产物为142 bp. 区带清晰未见非特异性扩增区带出现.

2.2 大肠组织VEGF mRNA表达结果 在自身配对的大肠癌、远癌组织中, 23例癌组织中表达VEGF mRNA有15例, 阳性率为65.22%; 而癌旁组织仅5例阳性, 阳性表达率21.74%. 差异有显著性(P<0.01). 16例结肠息肉(其中管状腺瘤12例, 绒毛状腺瘤3例, 混合性腺瘤1例), 表达VEGF mRNA有3例, 阳性率为18.75%, 与大肠癌组比较差异有显著性(P<0.01), 而与远癌组织比较, 差异无显著性(P>0.05), 3例阳性息肉中2例为绒毛状腺瘤、1例为混合性腺瘤.

2.3 VEGF与大肠癌临床病理分期 组织VEGF mRNA与大肠癌临床病理分期: 大肠癌23例根据Dukes临床病理分期, A与B期共8例, C期11例, D期4例; A和B期VEGF mRNA阳性为3例(37.5%), C与D期阳性有12例(80.0%), 两者差异有显著性(P<0.05). 血清VEGF浓度与大肠癌临床病理分期: 45例结肠癌根据Dukes临床病理分期, A与B期共17例, C期和D期28例; C和D期血清VEGF水平716.71+229.39 ng/L明显高于A和B期312.30+103.61 ng/L(表1), 两者差异有显著

性(P<0.01). 伴有淋巴结转移的结肠癌患者血清VEGF浓度明显高于不伴有转移者, 差异有显著性(P<0.01).

3 讨论

VEGF是一种有亚基内及亚基间二硫键交联形成的同型二聚体糖蛋白, 分子质量为35-45 kDa, 他与血小板源性生长因子有一定的同源性. 定位于人体第六对染色体长臂上. VEGF基因外显子的选择性剪接, 至少可产生7种VEGF变异体, 分别为VEGF206、VEGF189、VEGF165、VEGF163、VEGF121, VEGF145和VEGF148[1,5-7]. VEGF能强烈地刺激血管内皮细胞增生、迁移和形成新生血管. 研究表明, 在许多实体肿瘤, 包括胃肠道肿瘤、子宫颈癌以及肺癌中都存在活跃的血管生成, 并发现其血管生成的活跃程度与这些肿瘤的预后相关[8-11].

本研究采用RT-PCR检测23例大肠癌组织和远癌组织, 结果显示在癌组织中的VEGF mRNA阳性15例(65.22%), 远癌组织阳性5例(21.74%), 癌组织的VEGF表达明显高于远癌组织, 也高于息肉对照组. 几乎所有实体瘤的生长和转移均依赖于肿瘤血管生成[12]. 研究证明肿瘤直径在2-3 mm时, 肿瘤细胞通过弥漫作用吸取营养, 当肿瘤进一步长大时, 必须依赖新生的毛细血管提供充足的营养, 同样也促进了肿瘤的转移[13-14]. VEGF是一种具有特异性促内皮细胞增生诱导血管新生、血管生长的蛋白. 促使肿瘤细胞新生血管形成, 还能使血管通透性增加, 血浆蛋白外渗, 纤维蛋白原和血浆纤维连接蛋白在肿瘤间质中积聚, 高度特异的选择性诱导血管内皮细胞有丝分裂, 刺激内皮细胞增殖, 从而诱发新生血管形成和肿瘤生长. 新生的肿瘤血管不仅是癌细胞增殖、复发所必须的内部条件, 也是癌细胞浸润和血行转移的第一路径[15]. 免疫组化和原位杂交方法研究发现, 大肠癌VEGF的表达均高于正常组织[16]. 而抗VEGF单抗或采用反义mRNA技术封闭VEGF表达, 则可抑制肿瘤细胞的生长[1,17]. 在结肠息肉16例中VEGF表达3例(18.75%), 明显低于大肠癌组织, 且均为直径在2 cm的巨大结肠息肉, 内镜下观察, 息肉表面有糜烂、渗血, 病理切片为绒毛状腺瘤, 其中2例伴有不典型增生. 结肠息肉VEGF呈阳性表达, 是由于息肉巨大, 组织血供欠佳, 局部缺血、缺氧而诱导VEGF表达; 还是在大肠腺瘤型息肉早期癌变过程中, 即有VEGF表达增加有关, 尚不能肯定[18-20], 需进一步观察研究.

进一步对大肠癌患者的临床病理分期分析, 中晚期患者伴有淋巴结和远处肝、肺脏器转移的癌组织VEGF阳性表达亦高于A、B期的大肠癌患者, 差异有显著性. VEGF是肿瘤新生血管生长的一个重要调控因素, 肿瘤血管一方面为肿瘤细胞生长提供营养物质, 另一方面为其转移提供条件. 由于肿瘤诱发的血管不同于正常血管, 其结构与功能异常, 易引起局部坏死. 另外, 肿瘤组织微血管基底膜不完整, 血管壁缺乏平滑肌支持, 血管壁很薄, 易通透, 使瘤细胞产生的各种因子和蛋白酶类易渗透至细胞间隙, 而瘤细胞易穿透到血管内使瘤细胞顺血流到远隔部位, 形成微小转移灶[21]. 提示VEGF与肿瘤生长、侵袭和转移密切相关, 有助于癌组织的生长和转移. 本研究发现血清与组织VEGF水平密切相关, 血清VEGF浓度高低亦与大肠癌患者的临床病理分期密切相关, 中晚期患者结肠癌患者血清VEGF浓度明显高于A、B期的大肠癌患者. 多数学者认为循环中VEGF的主要来源是肿瘤本身. 肿瘤细胞分泌的VEGF进入血液中的可能机制: VEGF随穿过血管壁的血细胞进入血液; VEGF使血管通透性增加, 从而扩散到血液中. 说明血清VEGF水平可以替代组织VEGF的测定[22-23].

由此可见, 血管内皮生长因子VEGF其中在大肠癌的生长和侵袭转中起着重要的作用. 而测定血清VEGF, 具有取材简便、操作简单、便于复查等优点, 利于临床开展和广泛应用.

■应用要点

VEGF在大肠癌的生长和侵袭转中起着重要的作用. 减少或阻止VEGF表达可使肿瘤细胞生长明显受到抑制. 为临床进一步防治大肠癌提供可靠理论依据; 作出大肠癌预后判断, 提高患者手术切除机会, 降低术后复发. 而测定血清VEGF, 具有取材简便、操作简单、便于复查等优点, 利于临床开展和广泛应用.

4 参考文献

1 Rmali KA, Puntis MC, Jiang WG. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9: 3-14

2 Li JK, Yu L, Shen Y, Zhou LS, Wang YC, Zhang JH. Inhibition of CXCR4 activity with AMD3100 decreases invasion of human colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2308-2313

3 Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA, Fox SB. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol* 2003; 200: 183-194

4 Kobayashi H, Sugihara K, Uetake H, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Kuramochi H, Lenz HJ, Danenberg KD, Danenberg PV. Messenger RNA expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis. *Ann Surg Oncol*

■同行评价
本文报道和分析了组织和血清VEGF检测对大肠癌生长和转移的意义, 条理尚清晰, 具有科研和临床价值.

2008; 15: 1232-1238
5 Belizon A, Balik E, Horst P, Feingold D, Arnell T, Azarani T, Cekic V, Skitt R, Kumara S, Whelan RL. Persistent elevation of plasma vascular endothelial growth factor levels during the first month after minimally invasive colorectal resection. *Surg Endosc* 2008; 22: 287-297
6 Gao Y, Zhong WX, Mu DB, Yuan YP, Zhang YH, Yu JM, Sun LP, Wang L, Li YH, Zhang JB, Zhao Y, Cai SP, Zhou GY. Distributions of angiogenesis and lymphangiogenesis in gastrointestinal intramucosal tumors. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1117-1123
7 Gonzalez FJ, Vicioso L, Alvarez M, Sevilla I, Marques E, Gallego E, Alonso L, Matilla A, Alba E. Association between VEGF expression in tumour-associated macrophages and elevated serum VEGF levels in primary colorectal cancer patients. *Cancer Biomark* 2007; 3: 325-333
8 Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9: 793-800
9 Lee JJ, Chu E. An update on treatment advances for the first-line therapy of metastatic colorectal cancer. *Cancer J* 2007; 13: 276-281
10 Zafirellis K, Agrogiannis G, Zachaki A, Gravani K, Karameris A, Kombouras C. Prognostic significance of VEGF expression evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in colorectal cancer. *J Surg Res* 2008; 147: 99-107
11 Ferroni P, Palmirotta R, Spila A, Martini F, Formica V, Portarena I, Del Monte G, Buonomo O, Roselli M, Guadagni F. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and vascular endothelial growth factor tumor tissue content in colorectal cancer. *Oncology* 2006; 71: 176-184
12 Los M, Roodhart JM, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist* 2007; 12: 443-450
13 Hu WG, Li JW, Feng B, Beveridge M, Yue F, Lu AG, Ma JJ, Wang ML, Guo Y, Jin XL, Zheng MH. Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. *Eur Surg Res* 2007; 39: 229-238
14 Kazama S, Watanabe T, Kanazawa T, Hatano K, Nagawa H. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) is a more specific risk factor for lymph node metastasis than VEGF-D in submucosal colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 71-76
15 Sharma A, Greenman J, Sharp DM, Walker LG, Monson JR. Vascular endothelial growth factor and psychosocial factors in colorectal cancer. *Psychooncology* 2008; 17: 66-73
16 Tien YW, Chang KJ, Chiu YF, Huang KW, Lee PH. Comparison of angiogenic factor levels in tumor drainage and peripheral venous blood from colorectal cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1357-1363
17 Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, Denning KL, Kandil HA, Silverman JF. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2006; 19: 1317-1323
18 Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* 2006; 94: 1823-1832
19 Ogata Y, Matono K, Mizobe T, Ishibashi N, Mori S, Akagi Y, Ikeda S, Ozasa H, Murakami H, Shirouzu K. The expression of vascular endothelial growth factor determines the efficacy of post-operative adjuvant chemotherapy using oral fluoropyrimidines in stage II or III colorectal cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 1111-1116
20 Kaklamanis L, Trichas M, Amarantidis K, Spathari N, Micheli A, Karayiannakis A, Chatzaki E, Georgoulias V, Kakolyris S. VEGF expression in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Oncol Res* 2006; 15: 445-451
21 Yoon SS, Kim SH, Gonen M, Heffernan NM, Detwiller KY, Jarnagin WR, D'Angelica M, Blumgart LH, Tanabe KK, Dematteo RP. Profile of plasma angiogenic factors before and after hepatectomy for colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 353-362
22 顾磊, 张玉, 查文菁. 结直肠癌组织与血清血管内皮生长因子的相关性. 复旦学报(医学版) 2006; 33: 794-796
23 Kuramochi H, Hayashi K, Uchida K, Miyakura S, Shimizu D, Vallböhmer D, Park S, Danenberg KD, Takasaki K, Danenberg PV. Vascular endothelial growth factor messenger RNA expression level is preserved in liver metastases compared with corresponding primary colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 29-33

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2553-2556
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

CCND1基因A870G多态与结直肠癌遗传易感性的相关性

荆佳晨, 熊文坚, 金 惠, 稽贝纳

荆佳晨, 熊文坚, 金惠, 稽贝纳, 上海市徐汇区中心医院消化内科 上海市 200031
作者贡献分布: 此课题由荆佳晨, 熊文坚, 金惠及稽贝纳设计; 研究过程由荆佳晨及金惠操作完成; 数据分析由荆佳晨与稽贝纳完成; 本论文写作由荆佳晨与熊文坚完成.
通讯作者: 熊文坚, 200031, 上海市淮海中路966号, 徐汇区中心医院消化内科. xiongwenjian@126.com
电话: 021-54037810
收稿日期: 2008-05-05 修回日期: 2008-06-15
接受日期: 2008-06-17 在线出版日期: 2008-08-08

Relationship between CCND1 gene A870G polymorphism and genetic susceptibility to colorectal cancer

Jia-Chen Jing, Wen-Jian Xiong, Hui Jin, Bei-Na Ji

Jia-Chen Jing, Wen-Jian Xiong, Hui Jin, Bei-Na Ji, Department of Gastroenterology, Xuhui District Central Hospital of Shanghai Municipality, Shanghai 200031, China
Correspondence to: Dr. Wen-Jian Xiong, Department of Gastroenterology, Xuhui District Central Hospital of Shanghai Municipality, 966 Central Huaihai Road, Shanghai 200031, China. xiongwenjian@126.com
Received: 2008-05-05 Revised: 2008-06-15
Accepted: 2008-06-17 Pubilshed online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To investigate the possible association between CCND1 gene A870G polymorphism and susceptibility to colorectal cancer (CRC) in Shanghai population.

METHODS: CCND1 gene A870G genotypes were determined using real-time PCR technology with TaqMan MGB probes in 104 CRC cases and 205 sex-, age-matched controls.

RESULTS: The frequencies of A and G alleles were 0.601 and 0.399 in CRC cases, and 0.524 and 0.476 in controls, respectively. The A allele was marginally associated with CRC (P = 0.057) and had an increased risk for CRC (95%CI = 0.99-1.97) as compared with the G allele. Compared with GG genotype, GA genotype had a 1.99-fold increased risk (95%CI = 0.94-4.20, P = 0.070), whereas AA genotype had a 2.46-fold increased risk (95%CI = 1.09-5.56, P = 0.031) for CRC. The A-allele carriers (GA or AA genotypes) had a significantly elevated CRC risk (OR = 2.13, 95%CI = 1.03-4.39, P = 0.040) when as compared with GG genotype.

CONCLUSION: The A allele of CCND1 A870G is associated with the occurrence of CRC, which may serve as an index for screening high-risk population in Shanghai.

Key Words: Colorectal cancer; CCND1; Genetic polymorphism; Genetic susceptibility

Jing JC, Xiong WJ, Jin H, Ji BN. Relationship between CCND1 gene A870G polymorphism and genetic susceptibility to colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2553-2556

摘要

目的: 探讨CCND1基因A870G多态与上海地区人群结直肠癌(colorectal cancer, CRC)遗传易感性的关系.

方法: 采用TaqMan MGB探针实时定量PCR法, 检测104例CRC与205名对照人群CCND1 A870G基因型分布及差异.

结果: CRC组和对照组870A等位基因频率分别为60.1%和52.4%, A的CRC发病风险是G的1.40倍(95%CI = 0.99-1.97, P = 0.057). 与GG基因型相比, GA基因型的CRC风险增加至1.99倍(95%CI = 0.94-4.20, P = 0.070), 而AA基因型的CRC风险显著增加至2.46倍(95%CI = 1.09-5.56, P= 0.031). 将GA、AA基因型合并计算, 则其CRC发病风险与GG基因型相比呈相似的显著性增加(OR = 2.13, 95%CI = 1.03-4.39, P = 0.040).

结论: CCND1 870A增加CRC发病风险, 可作为这一地区CRC高危人群的筛选指标.

关键词: 结直肠癌; CCND1; 基因多态; 遗传易感性

荆佳晨, 熊文坚, 金惠, 稽贝纳. CCND1基因A870G多态与结直肠癌遗传易感性的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2553-2556
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2553.asp

■背景资料
有关CCND1基因与恶性肿瘤关系的研究广泛, 但目前对该基因多态性研究仍处于初步阶段, CCND1基因A870G多态性与结直肠癌相关性的报道缺乏一致性.

■同行评议者
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; 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
近年来, CCND1基因多态性与肿瘤相关性日益受到重视, 但其结果存在分歧, 可能与样本量小、种族差异和疾病遗传异质性等有关, 需要进一步扩大样本、统一研究方法及统计标准, 深入研究.

0 引言

CCND1基因编码产物Cyclin D1是一种关键的细胞周期调控蛋白, 促进细胞周期由G_1期向S期转化, 其异常表达与肿瘤发生发展密切相关[1]. 研究发现, 人群中CCND1基因第870位点存在A或G(A870G)单核苷酸多态性. 功能学研究显示, 这种多态性影响Cyclin D1 mRNA剪切转录子的种类及特性[2]. 近来有关CCND1 A870G与包括结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在内的肿瘤遗传易感性关系的研究备受关注. 本研究初步探讨了CCND1 A870G与上海地区人群CRC发病风险的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 本院2003-2006年CRC住院患者104例, 均经组织病理学确诊为腺癌. 其中男54例, 女50例, 患者年龄32-83(平均60.7±13.3)岁. CRC组对象纳入标准包括: 上海籍; 汉族; 年龄>30岁; 术前未经放疗、化疗等治疗. 剔除标准为家族性腺瘤性息肉病和遗传性非腺瘤性结肠癌. 205名对照为同时期同一地区健康无血缘关系的上海籍汉族个体. 对照组与CRC组在性别和年龄(±2岁)方面保持均衡可比. 本研究经医院伦理委员会批准, 所有研究对象均同意并填写知情同意书.

1.2 方法 按常规蛋白酶K、酚/氯仿法提取外周血白细胞基因组DNA. 采用TaqMan MGB探针实时定量PCR法检测CCND1 A870G基因型, 由上海基康生物技术有限公司完成. 引物和探针序列: 上游引物F, 5'-ACG CTT CCT CTC CAG AGT GAT C-3'; 下游引物R, 5'-AGG CTG CCT GGG ACA TCA-3'; 等位基因A特异性TaqMan探针, 5'-FAM-TGA CCC AGT AAG TGA G-MGB-3'; 等位基因G特异性TaqMan探针, 5'-TET-TGA CCC GGT AAG TGA-MGB-3'; 扩增片段长度63 bp. PCR扩增体系(25 μL)中含: 1×TaqMan PCR master mix(Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 μL(50 mg/L)基因组DNA, 1 μmol/L上游引物, 1 μmol/L下游引物, 0.2 μmol/L FAM-标记探针, 0.2 μmol/L TET-标记探针. 扩增参数: 50℃预热2 min, 95℃预变性10 min, 然后95℃变性15 s, 62℃复性1 min, 共40个循环. 最后在ABI 7900上检测荧光信号. 基因型分析结果用Sequence Detector System 2.0软件(Applied Biosystems, Foster City, CA)自动生成(图1).

统计学处理 以非条件Logistic回归法计算表示相对危险度的比值比(*OR*)及其95%可信区间(CI). *OR*值均经性别、年龄、吸烟、饮酒和CRC家族史因素校正. 两组人群CRC混淆因素比较采用χ^2检验. 以$P<0.05$作为有统计学意义的检验水准. 数据统计应用统计分析系统SPSS10.0进行.

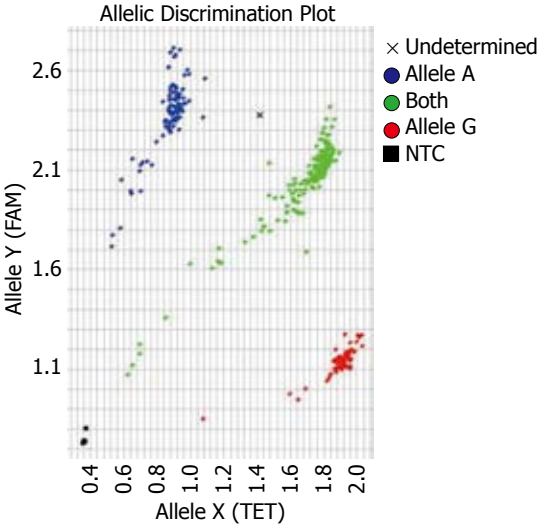


图 1 CCND1基因A870G实时定量PCR基因分型图.

2 结果

2.1 两组人群CRC混淆因素比较 两组人群的性别、年龄、吸烟和饮酒构成差异无显著意义($P>0.05$). CRC组和对照组的CRC家族史阳性者分别占10.2%和2.9%, 两者比较$P = 0.022$(表1).

2.2 CCND1 A870G与CRC风险 对照组GG、GA和AA基因型频率分别为20.0%、55.1%和24.9%, 符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律($P = 0.162$), 而CRC组的基因型频率为GG 10.6%、GA 58.7%和AA 30.8%. 据此计算, CRC组中A等位基因频率为60.1%, 高于对照组的52.4%, A的CRC发病风险是G的1.40倍(95% CI = 0.99-1.97, $P = 0.057$). 与GG基因型相比, GA基因型的CRC风险增加至1.99倍(95% CI = 0.94-4.20, $P = 0.070$), 而AA基因型的CRC风险显著增加至2.46倍(95% CI = 1.09-5.56, $P = 0.031$). 将GA、AA基因型合并计算, 则其CRC发病风险与GG基因型相比呈相似的显著性增加(*OR* = 2.13, 95% CI = 1.03-4.39, $P = 0.040$, 表2).

3 讨论

CCND1基因870G→A多态性位点位于该基因第四外显子的转录剪接供给区, 可导致转录剪接的方式发生改变, 最终产生半衰期更长的Cyclin D1蛋白质, 结果核内Cyclin D1积聚, 肿瘤发生风险

表 1 两组对象多种混淆因素频率比较 *n*(%)

分组	*n*	性别		年龄(岁)		吸烟		饮酒		CRC家族史	
		女	男	≤60	>60	否	是	否	是	无	有
对照	205	98(47.8)	107(52.2)	99(48.3)	106(51.7)	151(73.7)	54(26.3)	168(82.0)	37(18.0)	184(89.8)	21(10.2)
CRC	104	50(48.1)	54(51.9)	50(48.1)	54(51.9)	75(72.1)	29(27.9)	79(76.0)	25(24.0)	101(97.1)	3(2.9)
χ^2		0.002		0.001		0.084		1.543		5.216	
*P*值		0.964		0.971		0.772		0.214		0.022	

表 2 CCND1 A870G基因型和等位基因分布及其与CRC风险 *n*(%)

CCND1 A870G	对照组(*n* = 205)	CRC组(*n* = 104)	*OR*(95% CI)[M]	*P*
基因型				
GG	41(20.0)	11(10.6)	1.00	
GA	113(55.1)	61(58.7)	1.99(0.94–4.20)	0.070
AA	51(24.9)	32(30.8)	2.46(1.09–5.56)	0.031
GA + AA	164(80.0)	93(89.4)	2.13(1.03–4.39)	0.040
等位基因				
G	195(47.6)	83(39.9)	1.00	
A	215(52.4)	125(60.1)	1.40(0.99–1.97)	0.057

[M]经性别、年龄、吸烟、饮酒和CRC家族史因素校正.

■应用要点
CCND1基因A870G多态是上海人群患结直肠癌的一个遗传易感分子, 可作为该地区人群结直肠癌发病风险的筛选指标.

随之增加[2]. 与此功能学研究相一致, 本研究结果显示870A等位基因增加CRC发病风险. 检索文献, 尚未见以我国大陆人群为对象的CCND1 A870G与CRC遗传易感性关系的研究报道.

有关CCND1 A870G与CRC发病风险关系的研究在其它人群中已有报道, 但结果不完全一致, 或提示870A增加CRC风险[3-5], 或提示870G增加CRC风险[6], 或提示二者无关[7-9]. 新近Tan *et al*[7]对CCND1 A870G与CRC风险关系的荟萃分析结果显示, 870A显著增加CRC发病风险, 这支持我们的研究结果. Le Marchand *et al*[4]以多种族人群为对象的研究结果显示, 870A增加夏威夷本地人和白人、但不增加日本裔夏威夷人的CRC风险, 这提示人群差异可能是造成上述研究结果差异的重要原因之一. 此外, Huang *et al*[10]报道870A特异性增加年轻男性CRC风险, 与之相反, Schernhammer *et al*[11]报道870A特异性增加女性CRC风险. Probst-Hensch *et al*[12]报道, 870A特异性增加低异硫氰酸盐饮食/高活性GST基因型者的CRC风险. 这些研究结果提示, 饮食、遗传和性别等也是影响A870G与CRC发病风险关系的重要因素, 可能部分解释了上述研究结果差异的原因.

总之, CCND1基因A870G多态是上海人群重要的CRC遗传易感分子, 可作为CRC高危人群的筛选指标.

4 参考文献

1 Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006; 25: 1620-1628

2 Gautschi O, Ratschiller D, Gugger M, Betticher DC, Heighway J. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: a key driver of malignant transformation. Lung *Cancer* 2007; 55: 1-14

3 Kong S, Wei Q, Amos CI, Lynch PM, Levin B, Zong J, Frazier ML. Cyclin D1 polymorphism and increased risk of colorectal cancer at young age. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1106-1108

4 Le Marchand L, Seifried A, Lum-Jones A, Donlon T, Wilkens LR. Association of the cyclin D1 A870G polymorphism with advanced colorectal cancer. *JAMA* 2003; 290: 2843-2848

5 Jiang J, Wang J, Suzuki S, Gajalakshmi V, Kuriki K, Zhao Y, Nakamura S, Akasaka S, Ishikawa H, Tokudome S. Elevated risk of colorectal cancer associated with the AA genotype of the cyclin D1 A870G polymorphism in an Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 193-199

6 Hong Y, Eu KW, Seow-Choen F, Fook-Chong S, Cheah PY. GG genotype of cyclin D1 G870A polymorphism is associated with increased risk and advanced colorectal cancer in patients in Singapore. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1037-1044

7 Tan XL, Nieters A, Kropp S, Hoffmeister M, Brenner H, Chang-Claude J. The association of cyclin D1 G870A and E-cadherin C-160A polymorphisms with the risk of colorectal cancer in a case control study and meta-analysis. *Int J Cancer* 2008; 122:

■同行评价
本文选题为临床亟待解决的临床基础研究课题, 有重要临床指导意义, 但内容略显单薄.

2573-2580
8 Grieu F, Malaney S, Ward R, Joseph D, Iacopetta B. Lack of association between CCND1 G870A polymorphism and the risk of breast and colorectal cancers. *Anticancer Res* 2003; 23: 4257-4259
9 Grunhage F, Jungck M, Lamberti C, Berg C, Becker U, Schulte-Witte H, Plassmann D, Rahner N, Aretz S, Friedrichs N, Buettner R, Sauerbruch T, Lammert F. Association of familial colorectal cancer with variants in the E-cadherin (CDH1) and cyclin D1 (CCND1) genes. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 147-154
10 Huang WS, Tang R, Lin PY, Changchien CR, Chen JS, Chiang JM, Yeh CY, Wang JY, Hsieh LL. Impact of the cyclin D1 A870G polymorphism on susceptibility to sporadic colorectal cancer in Taiwan. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 602-608
11 Schernhammer ES, Tranah GJ, Giovannucci E, Chan AT, Ma J, Colditz GA, Hunter DJ, Willett WC, Fuchs CS. Cyclin D1 A870G polymorphism and the risk of colorectal cancer and adenoma. *Br J Cancer* 2006; 94: 928-934
12 Probst-Hensch NM, Sun CL, Van Den Berg D, Ceschi M, Koh WP, Yu MC. The effect of the cyclin D1 (CCND1) A870G polymorphism on colorectal cancer risk is modified by glutathione-S-transferase polymorphisms and isothiocyanate intake in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis* 2006; 27: 2475-2482

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位胃肠病学和肝病学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学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学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、中医药学、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人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (常务副总编辑: 张海宁 2008-08-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2557-2561
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

粪便钙卫蛋白检测诊断结直肠癌87例

岳 林, 崔梅花, 牟方宏, 魏 红, 杨桂彬

岳林, 崔梅花, 牟方宏, 魏红, 杨桂彬, 北京大学航天临床医学院消化科 北京市 100049
作者贡献分布: 此课题由杨桂彬与岳林设计; 临床资料及标本收集由岳林, 崔梅花,牟方宏及魏红操作完成; 钙卫蛋白检测及数据分析由岳林完成; 数据分析及论文写作由杨桂彬与岳林完成.
通讯作者: 杨桂彬, 100049, 北京市海淀区玉泉路15号, 北京大学航天临床医学院消化科. yanggb@sina.com
收稿日期: 2008-05-11 修回日期: 2008-06-16
接受日期: 2008-06-23 在线出版日期: 2008-08-08

Diagnosis of colorectal cancer by faecal calprotectin: an analysis of 87 cases

Lin Yue, Mei-Hua Cui, Fang-Hong Mu, Hong Wei, Gui-Bin Yang

Lin Yue, Mei-Hua Cui, Fang-Hong Mu, Hong Wei, Gui-Bin Yang, Department of Gastroenterology, Aerospace Clinical Medical School of Beijing University, Beijing 100049, China
Correspondence to: Gui-Bin Yang, Department of Gastroenterology, Aerospace Clinical Medical School of Beijing University, 15 Yuquan Road, Haidian District, Beijing 100049, China. yanggb@sina.com
Received: 2008-05-11 Revised: 2008-06-16
Accepted: 2008-06-23 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To explore the values of faecal calprotectin, faecal occult blood tests and serum carcinoembryonic antigen (CEA) in the diagnosis of colorectal cancer.

METHODS: Faecal calprotectin, faecal occult blood and serum CEA were detected in 60 healthy adults and 87 patients with colorectal cancer. Tumor location and Dukes' stages were obtained from postoperative pathological examination.

RESULTS: The sensitivities of faecal calprotectin, faecal occult blood test and serum CEA were 88.51%, 83.91% and 44.83%, respectively, in the diagnosis of colorectal cancer, while the specificities were 88.33, 96.67% and 93.33, respectively. The positive rates of faecal occult blood test and serum CEA in patients with Dukes' stage C and D were significantly higher than those in patients with Dukes' stage A and B (P = 0.0173, 0.0059). There was no significant difference in faecal calprotectin level in patients with different tumor locations and Dukes' stages. Faecal calprotectin in combination with FOBT and/or CEA demonstrated a little higher sensitivity.

CONCLUSION: Faecal calprotectin is sensitive in the diagnosis of colorectal cancer, and can be used as a non-invasive surrogate marker for screening colorectal cancer in outpatients.

Key Words: Colorectal cancer; Calprotectin; Faecal occult blood test; Carcinoembryonic antigen

Yue L, Cui MH, Mu FH, Wei H, Yang GB. Diagnosis of colorectal cancer by faecal calprotectin: an analysis of 87 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2557-2561

摘要

目的: 比较粪便钙卫蛋白、便潜血试验及血清CEA在结直肠癌诊断中的应用价值.

方法: 研究组共纳入肠镜证实的87例结直肠癌初诊患者, 对照组60例接受肠镜检查的健康成人. 所有研究对象在接受肠镜检查时留取大便标本, 检测便潜血及粪便钙卫蛋白, 肠镜检查后抽取静脉血4 mL, 用于检测血清CEA. 随访患者手术记录及手术病理.

结果: 粪便钙卫蛋白、便潜血试验及血清CEA诊断结直肠癌的敏感性分别为88.51%、83.91%和44.83%, 特异性分别为88.33%、96.67%和93.33%. Dukes分期为A和B期患者便潜血试验及血清CEA的阳性率明显低于C和D期患者(P = 0.0173, 0.0059), Dukes不同分期的患者中, 粪便钙卫蛋白的阳性率无明显差异; 不同部位的结直肠癌与粪便钙卫蛋白、大便潜血试验及血清CEA的阳性率无显著差异; 钙卫蛋白联合应用FOBT或/和CEA检测结直肠癌可以一定限度地提高其敏感性, 但三种联合检测组合较单用粪便钙卫蛋白检测均无显著性差异.

结论: 粪便钙卫蛋白检测结直肠癌有较高的敏感性, 且不受肿瘤分期的影响, 可以作为门

■背景资料
近年来我国结直肠癌的发病率不断升高, 做好门诊筛查, 早发现、早诊断、早治疗是提高结直肠癌疗效的关键. 便潜血试验和血清癌胚抗原是目前结直肠癌筛查中常用的非侵入性检查方法. 由于存在受肿瘤分期影响大、敏感性低等问题, 这两种方法的检测效果还不能让人满意.

■同行评议者
王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

■研发前沿
在结直肠癌患者中, 粪便钙卫蛋白的含量明显升高, 是一种潜在结直肠癌的标志物. 国内尚未见有关报道, 国外有关研究样本数较少, 研究结论不一致.

诊筛查结直肠癌的标志物.

关键词: 结直肠癌; 钙卫蛋白; 便潜血试验; 癌胚抗原

岳林, 崔梅花, 牟方宏, 魏红, 杨桂彬. 粪便钙卫蛋白检测诊断结直肠癌87例. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2557–2561
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2557.asp

0 引言

近年来我国结直肠癌的发病率不断升高[1-2], 但是患者的存活期明显低于发达国家. 明确诊断时大部分患者已经处于进展期是造成这种差距的主要原因. 做好门诊筛查工作, 早发现、早诊断、早治疗是提高结直肠癌疗效的关键. 便潜血试验是目前结直肠癌筛查中使用最普遍的非侵入性检查方法[3-4]. 肿瘤出血为间断出血, 且随着肿瘤大小不同肿瘤出血量变化很大, 因此便潜血试验的敏感性还不尽人意. 血清癌胚抗原(CEA)也是临床常用的结直肠癌肿瘤标志物, 由于检查方便、无创, 患者易于接受, 成为结直肠癌重要的辅助检查手段. 有关研究表明, CEA诊断结直肠癌的敏感性只有30%-50%, 远不能满足临床要求[5-6]. 因此临床上需要一种更敏感的用于结直肠筛查的标志物. 钙卫蛋白是中性粒细胞和巨噬细胞胞质来源的含钙蛋白, 是一种在粪便中稳定的炎性标志物[7-8]. 有研究显示在结直肠癌患者中, 粪便钙卫蛋白的含量明显升高, 是一种潜在结直肠癌的标志物[9-10]. 国内尚未见有关报道, 国外有关研究样本数较少, 研究结论不一致[11-14]. 本研究通过检测粪便钙卫蛋白, 探讨了其在门诊患者结直肠癌筛查中的应用价值, 并与便潜血试验和血清癌胚抗原进行了比较.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究共观察147例患者, 其中87例为本院内镜室行肠镜检查的初诊结直肠癌患者, 结直肠癌诊断全部经病理证实. 其中男53例、女34例, 平均年龄53.5±15(33-79)岁. 60例为本院体检中心要求进行肠镜检查的健康体检者, 其中男30例, 女30例, 平均年龄46±13(28-67)岁. 经肠镜检查排除了结直肠病变.

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 对照组及研究组患者肠镜检查前饮食不做特殊要求, 肠镜检查前1 wk内或肠镜检查3 d后留取连续3份单次粪便标本, 所有粪便标本-20℃保存. 所有研究对象肠镜检查明确结直肠情况后留取静脉血4 mL, 离心后提取血清-20℃保存备用.

1.2.2 便潜血、粪便钙卫蛋白及CEA检测: 便潜血试剂盒采用胶体金双联法检测试纸(商品名: 消康宝, 万华普曼生物工程有限公司), 按照试剂盒说明书操作, 免疫法条带阳性者为潜血阳性, 单独化学法条带阳性者稀释后重新检测, 3份粪便标本只要有1份阳性即认为患者便潜血阳性; 粪便钙卫蛋白ELISA检测试剂盒由芬兰Hycult生物技术公司提供, 将最后1次粪便标本在室温解冻后, 用取样环取约40-120 mg, 放入螺口管中称重并计算粪便净含量, 按照质量/容积(g/L) = 1∶50的比例加入萃取液, Vortex振荡器上震荡30 s, 充分混匀20 min后吸取1 mL匀浆液室温10 000 *g*离心20 min, 吸取上清夜0.5 mL -20℃留存备用, ELISA检测严格按照试剂盒说明操作. 酶标仪采用奥地利TECAN公司的SUNRISE-BASIC TECAN, 参考有关文献[8]Cut-off值取10 μg/g. 采用i2000全自动免疫定量检测系统(美国, 雅培)用微粒体发光法测定血清CEA, 按照i2000全自动免疫定量检测系统操作步骤进行操作. 不同检测方法联合检测时任何一种方法结果阳性即认为阳性.

1.2.3 病理组织学评估: 随访患者手术记录及术后病理报告, 评估Dukes分期. 按照肿瘤发生的部位分为直肠癌、乙状结肠和降结肠癌、横结肠癌(包括结肠肝曲及脾曲)和右半结肠癌(包括盲肠和升结肠).

统计学处理 粪便钙卫蛋白水平为非正态分布的计量资料, 计算中位数及全距, 两组间比较采用非参数检验Mann-Whitney检验. 计算便潜血试验、粪便钙卫蛋白及血清CEA检测结直肠癌的敏感性、特异性及准确率. 不同检测方法敏感性和特异性的比较采用χ^2检验. 应用软件SPSS12.0进行统计分析, $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 结直肠癌组和健康对照组钙卫蛋白水平、便潜血试验及血清CEA检测结果 正常对照组粪便钙卫蛋白浓度的中位数是5.3 μg/g, 结直肠癌患者粪便钙卫蛋白浓度的中位数是121 μg/g($P<0.0001$); 粪便钙卫蛋白检测结直肠癌的敏感性(88.51%)虽然稍高于便潜血试验(83.91%), 但是二者比较无统计学差异(P = 0.3792). 正常对照组中88%的患者粪便钙卫蛋白在正常水平, 97%的患者潜血阴性; CEA诊断结

■相关报道
钙卫蛋白是一种在粪便中稳定的炎性标志物, 国外有研究显示钙卫蛋白同时是一种潜在的结直肠癌标志物.

表 1 粪便钙卫蛋白、便潜血试验及血清CEA对结直肠癌诊断的敏感性、特异性及准确率 (%)

项目	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值	准确率
钙卫蛋白	88.51(77/87)	88.33(53/60)	91.67(77/84)	84.13(53/63)	88.44(130/147)
FOBT	83.91(73/87)	96.67(58/60)	97.33(73/75)	80.56(58/72)	89.12(131/147)
CEA	44.83(39/87)	93.33(56/60)	90.70(39/43)	53.85(56/104)	64.63(95/147)

表 2 不同Dukes分期患者粪便钙卫蛋白检测、便潜血试验及血清CEA检测结果 (%)

Dukes分期	*n*	钙卫蛋白(μg/g)		钙卫蛋白阳性率	FOBT阳性率	CEA阳性率
		Median	Range			
A	14	83	5–874	85.71(12/14)	64.29(9/14)	21.43(3/14)
B	27	132	6–1770	92.59(25/27)	77.78(21/27)	33.33(9/27)
C	28	97	2–435	85.71(24/28)	89.29(25/28)	53.57(15/28)
D	18	117	8–2837	88.89(16/18)	100.00(18/18)	66.67(12/18)

表 3 不同部位肿瘤患者粪便钙卫蛋白检测、便潜血试验及血清CEA检测结果 (%)

Dukes分期	*n*	钙卫蛋白(μg/g)		钙卫蛋白阳性率	FOBT阳性率	CEA阳性率
		Median	Range			
直肠	39	108	3–1923	87.18(34/39)	84.62(33/39)	48.72(19/39)
乙状结肠及降结肠	31	124	2–2837	87.10(27/31)	83.87(26/31)	41.94(13/31)
横结肠	8	115	12–984	100.00(8/8)	87.50(7/8)	37.50(3/8)
右半结肠	9	130	8–2013	88.89(8/9)	77.78(7/9)	44.44(4/9)

直肠癌有较高的特异性(93.33%), 但是敏感性只有44.83%, 明显低于钙卫蛋白及FOBT的敏感性(P<0.0001, 表1).

2.2 Dukes分期与粪便钙卫蛋白、FOBT及血清CEA的关系 Dukes分期不同的肿瘤患者粪便钙卫蛋白水平无明显差异(P = 0.7432). Dukes A、B、C、D分期的结直肠癌患者便潜血试验的阳性率分别为64.29%、77.78%、89.29%和100.00%. Dukes C期和D期患者潜血阳性率明显高于A期和B期患者(P = 0.0173). Dukes A、B、C、D分期的结直肠癌患者血清CEA的阳性率分别为21.43%、33.33%、53.57%和66.67%. Dukes C期和D期患者血清CEA阳性率明显高于A期和B期患者(P = 0.0059, 表2).

2.3 肿瘤部位与粪便钙卫蛋白水平、FOBT及血清CEA的关系 肿瘤组共包括有39个直肠癌, 31个乙状结肠和降结肠癌, 8个横结肠癌, 9个右半结肠癌. 肿瘤发生部位不同的患者粪便钙卫蛋白水平(P = 0.7606)、大便潜血阳性率(P = 0.9521)及血清CEA阳性率(P = 0.9150)无显著性差别(表3).

2.4 粪便钙卫蛋白联合FOBT或/和血清CEA诊断结直肠癌的敏感性、特异性及准确率 粪便钙卫蛋白联合血清CEA后敏感性提高至90.80%(P = 0.6186), 联合FOBT后敏感性可以提高至94.25%(P = 0.1768), 三者联合后敏感性提高至96.55%(P = 0.0802). 三种联合检测组合较单用粪便钙卫蛋白检测均无显著性差异(表4).

3 讨论

随着人口老龄化及饮食习惯的改变, 近年来我国结直肠癌的发病率有不断上升的趋势[1-2]. 我国大部分结直肠癌患者在诊断的时候已经处于进展期, 因此术后生存期明显低于发达国家. 寻找有效检测方法对高危人群或普通人群进行筛查, 特别是对门诊患者进行筛查, 对结直肠癌患者做到早发现、早诊断、早治疗是改善预后, 提高患者生存期的关键. 便潜血试验方便、便宜、无创, 成为目前临床应用最广泛的非侵入性的结直肠癌筛查方法. 有研究表明对门诊患者或者自然人群用便潜血试验进行筛查, 可有效地提高结直肠癌患者早期诊断率和长期存活

■**创新盘点**
本文通过检测粪便钙卫蛋白, 探讨了其在门诊患者结直肠癌筛查中的应用价值, 并与便潜血试验和血清癌胚抗原进行了比较.

表 4 粪便钙卫蛋白联合FOBT或/和血清CEA诊断结直肠癌的敏感性、特异性及准确率 (%)

联合项目	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值	准确率
FOBT	94.25(82/87)	85.00(51/60)	90.11(82/91)	91.07(51/56)	90.48(133/147)
CEA	90.80(79/87)	83.33(50/60)	88.76(79/89)	86.21(50/58)	87.76(129/147)
FOBT+CEA	96.55(84/87)	80.00(48/60)	87.50(84/96)	94.12(48/51)	89.80(132/147)

率[3,15-16]. 尽管如此, 由于肿瘤是间断出血, 不是持续出血, 肿瘤的出血速度可能低于或超出潜血试验的检测阈值等原因, 便潜血试验的敏感性还是不尽人意[17-18]. 增加检测的次数可以增加试验的敏感性, 但是会降低患者的依从性. 血清肿瘤标志物检查方便, 无创, 患者易于接受, 成为临床上广泛应用的结直肠癌辅助诊断方法. CEA是最早发现的肿瘤标志物之一, 是一种酸性糖蛋白, 胚胎期在小肠、肝脏、胰腺合成, 成人血清含量极低. CEA是虽然是诊断结直肠癌最传统、最常用的肿瘤标志物, 但是有研究[5-6]表明其诊断结直肠癌的敏感性只有30%-40%, 远不能满足临床筛查需要, 因此临床上需要一个检测结直肠癌的更敏感的指标.

钙卫蛋白是中性粒细胞和活化的巨噬细胞胞质中重要的蛋白质, 可以作为急性炎性标志物. 钙卫蛋白能与钙离子结合, 使其具有耐热性和抗蛋白酶活性, 在肠腔和外界环境中可长期保持相对稳定而不被酶和细菌所破坏, 钙卫蛋白因此得名. 钙卫蛋白在粪便中性质稳定且含量不受饮食成分等因素的影响, 使得粪便钙卫蛋白在反应结直肠炎症方面优于其他血清炎性标志物[7-8]. 有多个研究显示粪便中钙卫蛋白含量可以准确地反映溃疡性结肠炎病情活动情况[19-22].

结直肠癌可以导致局部黏膜的急性炎症反应, 理论上可以通过检测炎性标志物检测结直肠癌. 国外有研究报告结直肠癌患者中粪便钙卫蛋白水平升高, 也有研究认为粪便钙卫蛋白检测对诊断结直肠癌准确性有限. 国外的有关研究样本数较少[9-14], 国内尚未见有关报导. 本研究通过测定正常人及不同部位和不同分期的结直肠癌患者粪便钙卫蛋白的含量, 评估了粪便钙卫蛋白作为结直肠癌标志物的敏感性和特异性, 同时结合临床实际, 与目前临床常用的筛查结直肠癌的方法便潜血试验做比较. 本研究显示, 单次粪便钙卫蛋白检测结直肠癌敏感性为88.51%, 稍高于便潜血试验(83.91%), 显著高于血清CEA(44.83%). 与国外有关研究报告一致[9-10].

结直肠癌组织中钙卫蛋白是增加的, 免疫组化显示钙卫蛋白的表达部位在中性粒细胞和单核细胞的胞质中, 而肿瘤细胞中没有表达. 这提示粪便中钙卫蛋白水平增高主要是由于肿瘤上炎性细胞脱落造成的. 肿瘤组织中有丰富的炎性细胞, 肿瘤表面的炎性细胞可以漏入肠腔或随着肿瘤组织不断脱落而进入肠腔, 存在于中性粒细胞和单核细胞胞质中的钙卫蛋白也随之进入肠腔. 这一过程是持续发生的, 因此粪便中钙卫蛋白的水平不依赖于间断的肿瘤出血, 这使得钙卫蛋白检测结直肠癌的敏感性较少受到肿瘤分期及失血量影响. 便潜血试验依赖于肿瘤的出血量, 随着肿瘤的进展, 肿瘤体积更大、表面更糜烂、出血量更多、更持续, 便潜血试验的敏感性也就越高. 有研究[10]显示, 粪便钙卫蛋白检测诊断结直肠癌不受肿瘤分期的影响. 在本研究中潜血试验的敏感性在Dukes C和D期明显优于Dukes A和B期, 粪便钙卫蛋白检测的敏感性在不同分期中则无明显差异, 与上述结论一致. 这意味着钙卫蛋白可以在较早阶段检测出肿瘤, 从而获得更好的治疗效果, 降低结直肠癌患者的死亡率及治疗费用.

肿瘤筛查中, 患者的依从性是影响筛查效果的一个重要的因素. 由于肿瘤的出血是间断的, 为了提高潜血试验的敏感性, 大部分研究者推荐患者提供连续3次的大便样本进行检测[23]. 这会在一定程度上影响患者的依从性. 粪便中的钙卫蛋白不依赖于间断的肿瘤出血, 可以保持一个稳定的水平, 只检测一次粪便样本就可以获得较高的敏感性, 这在很大程度上方便了患者, 增加了患者的依从性.

由于钙卫蛋白是一种炎性标志物, 在其他胃肠道炎症的情况, 如: 炎症性肠病、憩室炎和小肠病变等, 也可以出现粪便中钙卫蛋白增高的情况, 这是钙卫蛋白筛查结直肠癌出现假阳性的主要原因. 在本研究中, 粪便钙卫蛋白检测诊断结直肠癌的特异性是88.33%, 低于便潜血试验. 由于粪便钙卫蛋白作为一种无创的检查手段, 和便潜血试验一样, 临床仅用于患者的初

筛检查, 诊断的敏感性是需要考虑的主要因素, 特异性稍低不会显著影响其临床应用价值. 并且, 这部分患者虽然没有结直肠癌, 但是上述的肠道炎症也是需要治疗的有临床意义的情况, 患者也会从检查中获益.

多种标志物联合应用是肿瘤筛查中提高敏感性常用的方法. 在本研究中, 钙卫蛋白联合FOBT检测结直肠癌, 敏感性可以提高至94.25%. 联合血清CEA, 敏感性可以提高至90.80%, 如果将三者联合, 敏感性可以提高至96.55%. 由于钙卫蛋白本身具有较高的敏感性, 与FOBT或/和CEA联合应用较单用粪便钙卫蛋白检测敏感性的提高无统计学差异. 且这种联合检测会大幅度增加筛查成本, 降低患者依从性. 因此钙卫蛋白联合其他标志物筛查的效果, 有待进一步明确.

在本研究中, 研究组的患者为结直肠癌的高危人群或有症状的患者. 在这些患者中, 粪便钙卫蛋白作为一种简单无创的炎性标志物, 检测结直肠癌的敏感性可以高达88.51%, 并且敏感性不受肿瘤分期影响, 是一种较好的辅助诊断结直肠癌的检测方法. 但是粪便钙卫蛋白用于无症状人群结直肠癌筛查的敏感性和特异性还需要进一步研究.

4 参考文献

1 郑树, 蔡善荣. 中国大肠癌的病因学及人群防治研究. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 1-3

2 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 欧阳宁慧, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福, 夏毅. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析. 中华肿瘤杂志 1997; 19: 3-9

3 Jørgensen OD, Kronborg O, Fenger C. A randomised study of screening for colorectal cancer using faecal occult blood testing: results after 13 years and seven biennial screening rounds. *Gut* 2002; 50: 29-32

4 李世荣, 田素丽, 武子涛, 韩英, 盛剑秋, 高革, 夏长虹, 曹建彪, 晨智敏, 王志红, 李雅君. 序贯粪隐血试验在自然人群连续性大肠癌普查中的应用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 137-139

5 Rai AJ, Chan DW. Cancer proteomics: Serum diagnostics for tumor marker discovery. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022: 286-294

6 Carpelan-Holmström M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 2002; 22: 2311-2316

7 Røseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjønsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 793-798

8 Summerton CB, Longlands MG, Wiener K, Shreeve DR. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 841-845

9 Hoff G, Grotmol T, Thiis-Evensen E, Bretthauer M, Gondal G, Vatn MH. Testing for faecal calprotectin (PhiCal) in the Norwegian Colorectal Cancer Prevention trial on flexible sigmoidoscopy screening: comparison with an immunochemical test for occult blood (FlexSure OBT). *Gut* 2004; 53: 1329-1333

10 Tibble J, Sigthorsson G, Foster R, Sherwood R, Fagerhol M, Bjarnason I. Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. *Gut* 2001; 49: 402-408

11 Kristinsson J, Røseth A, Fagerhol MK, Aadland E, Schjønsby H, Børmer OP, Raknerud N, Nygaard K. Fecal calprotectin concentration in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 316-321

12 Limburg PJ, Devens ME, Harrington JJ, Diehl NN, Mahoney DW, Ahlquist DA. Prospective evaluation of fecal calprotectin as a screening biomarker for colorectal neoplasia. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2299-2305

13 Johne B, Kronborg O, Tøn HI, Kristinsson J, Fuglerud P. A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 291-296

14 Brydon WG, Campbell SS, Anderson NA, Wilson RG, Ghosh S. Faecal calprotectin levels and colorectal neoplasia. *Gut* 2001; 48: 579-580

15 Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jørgensen OD, Søndergaard O. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* 1996; 348: 1467-1471

16 Hewitson P, Glasziou P, Watson E, Towler B, Irwig L. Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemoccult): an update. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1541-1549

17 Macrae FA, St John DJ. Relationship between patterns of bleeding and Hemoccult sensitivity in patients with colorectal cancers or adenomas. *Gastroenterology* 1982; 82: 891-898

18 Faure H, Exbrayat C, Winckel P, Bolla M. Moisture content of Hemoccult slides influences test sensitivity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1111-1114

19 Røseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58: 176-180

20 刘文斌, 吕愈敏, 杨雪玲, 金珠. 粪便钙卫蛋白对溃疡性结肠炎活动性判断价值的研究. 中华消化杂志 2005; 25: 394-397

21 李刚, 李玉林, 张国顺. 粪钙卫蛋白在溃疡性结肠炎诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3210-3214

22 Xiang JY, Ouyang Q, Li GD, Xiao NP. Clinical value of fecal calprotectin in determining disease activity of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 53-57

23 李世荣, 王化虹, 胡继春, 李楠, 刘玉兰, 武子涛, 郑悦, 王洪华, 吴凯, 叶辉. 三种粪隐血试验在结直肠癌筛检中的效率与费用分析. 中华医学杂志 2005; 85: 697-700

■同行评价

本研究密切结合临床, 设计合理, 数据详实, 结果具有一定临床价值, 但新颖性不强.

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年8月8日; 16(22): 2562-2563
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

病例报告 CASE REPORT

胃-食管重复癌并发胃内重复良性瘤1例

汪 燕, 宋继伟

■背景资料
目前大气、生物、植物、食品、声波等污染严重及所用于治疗疾病措施中, 致癌性很高, 同时也造成机体继发性免疫缺陷, 重复癌的病例不断增加.

汪燕, 河北金能邢台矿业集团总医院内镜室 河北省邢台市 054000
宋继伟, 河北邢台市第五医院影像科 河北省邢台市 054000
作者贡献分布: 汪燕操作胃镜及写作论文; 宋继伟操作CT及写作论文.
通讯作者: 汪燕, 054000, 河北省邢台市, 河北金能邢台矿业集团总医院内镜室. gewangsong@yahoo.com.cn
电话: 0319-2043182
收稿日期: 2007-12-02 修回日期: 2008-07-17
接受日期: 2008-07-25 在线出版日期: 2008-08-08

Synchronous esophageal and gastric cancer complicated by a duplicated benign tumor in the stomach: one-case analysis

Yan Wang, Ji-Wei Song

Yan Wang, Department of Endoscopy, General Hospital of Jinneng Xingtai Mining Industry Group, Xingtai 054000, Hebei Province, China
Ji-Wei Song, Department of Image, the Fifth Hospitals of Xingtai, Xingtai 054000, Hebei Province, China
Correspondence to: Yan Wang, Department of Endoscope, General Hospital of Corp. of Mining Industry, Xingtai 054000, Hebei Province, China. gewangsong@yahoo.com.cn
Received: 2007-12-02 Revised: 2008-07-17
Accepted: 2008-07-25 Published online: 2008-08-08

Abstract
Synchronous esophageal and gastric cancer is a multi-source tumor, which refers to one or more primary cancers occurred in one or more organs. This kind of case is not rare. But this paper reported one case who was confirmed with synchronous esophageal and gastric cancer complicated by a duplicated benign tumor in the stomach using pathological methods.

Key Words: Gastroscope; Synchronous esophageal and gastric cancer; Multi-source tumor

Wang Y, Song JW. Synchronous esophageal and gastric cancer complicated by a duplicated benign tumor in the stomach: one-case analysis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(22): 2562-2563

■同行评议者
韩新巍, 教授, 河南省郑州大学第一附属医院放射科

摘要
食管-胃重复型癌为多源性肿瘤, 多源性肿瘤指同患者的一个或多个器官组织发生2个以上原发恶性肿瘤. 此类病例并不罕见. 本文病例胃镜检查取活检并被病理证实同时重复合并多种恶性和良性肿瘤, 本病例少见.

关键词: 胃镜; 食管-胃重复型癌; 肿瘤

汪燕, 宋继伟. 胃-食管重复癌并发胃内重复良性瘤1例. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2562-2563
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2562.asp

0 引言
重复型癌的病例很常见, 也被报道过很多, 但是同时重复多种良性和恶性肿瘤的病例则不多见, 本例是1例重复发生四种肿瘤的病例, 现报告如下.

1 病例报告
男, 67岁. 烧心伴上腹部不适2年. 1 wk前上消化道造影: 胃窦部单发肿物. 胃镜下显示: 食管通畅, 上中段黏膜光滑完整, 血管纹理清晰, 蠕动扩张度好. 距门齿35 cm处可见簇状结节样黏膜改变, 约1 cm×1 cm、质韧色泽苍白、边界欠清晰. 贲门黏膜光滑完整, 齿状线不清晰, 贲门口开闭自然. 胃底黏膜光整. 底体交界处可见小片状散在黏膜糜烂, 约1.5 cm×1.5 cm、附少量白苔、质软, 该处胃壁蠕动存在. 胃角呈桥拱状, 黏膜光整. 近窦体交界处偏后壁可见一约2 cm×2 cm大小的隆起样新生物, 表面黏膜光整、边界清晰, 未见明显黏膜桥, 质地柔软. 胃窦部黏膜完整、粗糙, 有散在多个小结节, 色泽红白相间. 窦部偏小弯侧见一约0.8 cm×0.8 cm黄斑样改变, 边界清晰. 幽门口圆, 开闭良好. 十二指肠球部、降部黏膜粗糙, 散在多个小结节, 蠕动良好(图1).

胃镜确诊为慢性胃炎、十二指肠炎、胃内黄斑瘤; 食管病变性质可疑为早期鳞癌、胃底体交界病变性质可疑为炎症改变、胃内可疑平滑肌瘤. 后经病理证实为食管鳞状细胞癌(呈乳头状增生); 胃底体交界低分化腺癌; 胃窦体交界慢性炎症; 胃窦偏小弯为黄斑瘤. 手术大体病理证实胃窦体交界为脂肪瘤; 食管和胃底体交界病理于活检病理一致. CT检查胃壁厚度均匀一致, 未

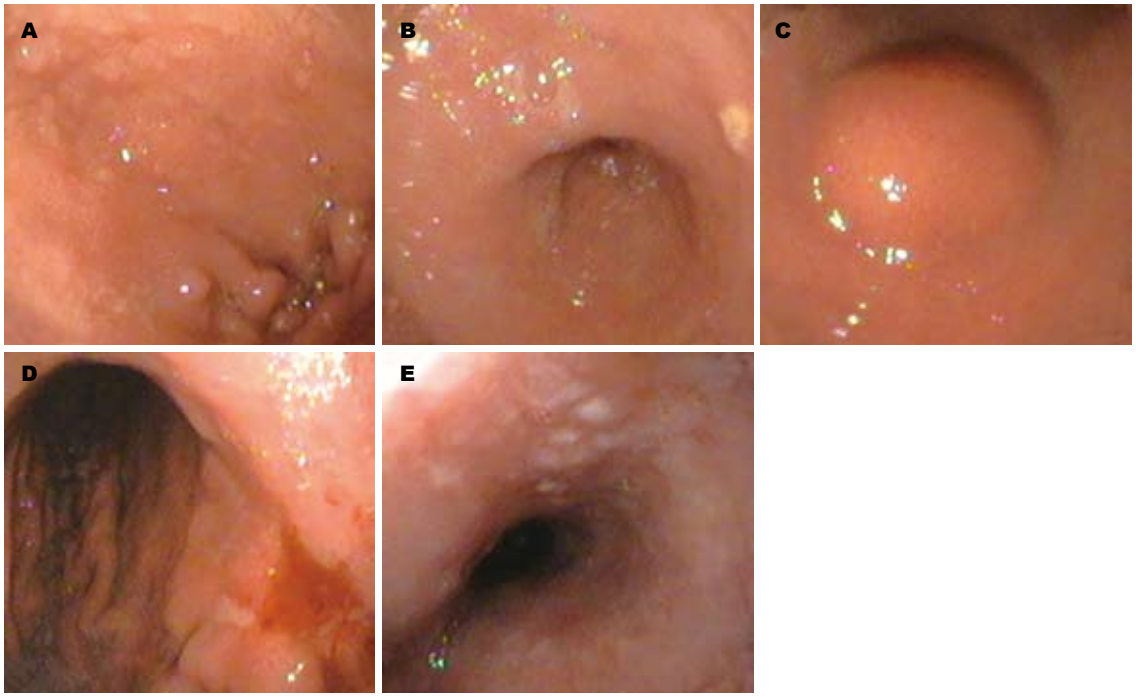


图 1 胃镜观. A: 十二指肠球部; B: 胃窦部; C: 胃体窦交界部; D: 胃底体交界部; E: 食管.

■应用要点
重复癌/瘤临床表现各异, 无论是上消化道造影还是内镜漏诊颇多. 内镜医师应重视消化道重复肿瘤的检出, 操作中尽量采用高分辨率有一定放大倍数的电子内镜, 可清晰显示黏膜的细微改变.

见明显增厚及充盈缺损.

2 讨论

胃-食管重复型癌的病例并不罕见. 同时重复合并多源良性肿瘤则少见. 多源性肿瘤是指同患者的一个或多个器官组织发生两个以上原发恶性肿瘤. 若同时发生称同时或同步多原发癌, 若与第一癌间隔一年后发生者称异时或异步多原癌, 后者在临床上更多见. 多原发癌的发病率约4%-1.7%, 也有高达12.1%的报道[1]. 刘复生1979年提出重复型癌诊断标准[2]: (1)每个肿瘤均为恶性. (2)肿瘤发生不同部位, 两者不相连续. (3)有其独特的形态特点. (4)每个肿瘤一般有其特有的转移途径.

多源性肿瘤发病因素尚不明确, 有学者认为系宿主对肿瘤的易感性, 即所谓癌病体质, 此体质与机体对致癌因子易感性有关. 多点癌变也是一种说法, 也有学者提出腔内种植转移学说. 机体免疫功能低下可能是多原发性癌瘤发病的另一重要因素. 目前大气、生物、植物、食品、声波等污染严重及所用于治疗疾病措施中如放疗、化疗等本身亦有致癌性, 同时也造成机体继发性免疫缺陷. 食管多发患者病灶多位于食管中下段. 胃多发癌以贲门部、胃体及角部好发, 主及副癌多为进展期, 早期癌多位于贲门部. 重复癌中食管癌多见, 组织学类型与来源大致相同. 重复癌瘤临床表现各异, 无论是上消化道造影还是内镜漏诊颇多. 而CT诊断空腔脏器则漏诊率更大. 漏诊原因可能为: (1)对原发癌病变的认识和警惕性不够, 往往满足于一种癌的诊断. (2)两处癌变当中有一处甚小者, 如为一点癌, 易漏诊. (3)与较大的癌肿紧邻的原发癌易被解释为一个癌. 对于诊断食管-胃重复癌瘤, 内镜仍是首选方法. 内镜医师应重视消化道重复肿瘤的检出, 操作中尽量采用高分辨率有一定放大倍数的电子内镜, 可清晰显示黏膜的细微改变. 值得提出的是内镜下黏膜染色在早癌的检出中起重要的作用, 尤其是碘染色对食管原位癌、黏膜内癌的检出具有极为重要的价值[3]. 内镜检查中发现食管黏膜色泽改变, 血管紊乱、消失、出现红斑、白斑及糜烂等, 应积极进行碘染色, 以便发现早期病灶. 对于重复肿瘤的好发部位应进行多方位、多角度仔细观察, 尤其贲门部, 应强调进镜观察及“U”形翻转观察, 重点观察贲门小弯、后壁, 注意黏膜色泽、完整性、光滑度、有无自发性出血、接触性出血等, 遇到可疑情况进行咬检、刷检, 以排除病灶.

3 参考文献

1 王效军, 陈桂秋, 郭海燕, 王卫宁. 食管、睾丸三原发恶性肿瘤一例报告. 实用肿瘤学杂志 1995; 4: 80
2 刘复生, 秦德兴, 王奇璐. 多原发癌瘤172例临床病理分析. 中华肿瘤杂志 1979; 1: 113-118
3 吴明利, 王士杰, 王顺平, 丛庆文, 张立玮, 李如迅, 李英赛, 高扬. 上消化道重复癌125例分析. 中国内镜杂志 2000; 6: 56

■同行评价
本文报道的病例3处病变均得到病理学证实, 资料可靠, 读者可以从中得到启发.

编辑 程剑侠 电编 何基才

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

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

程英升 主任医师
上海交通大学附属第六人民医院放射科, 上海交通大学影像医学研究所

杜雅菊 主任医师
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

樊红 副教授
东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

范志宁 主任医师
南京医科大学第二附属医院内镜中心

高毅 主任医师
南方医科大学珠江医院肝胆外科

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

季加孚 教授
北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

江学良 主任医师
中国人民解放军济南军区总医院消化科

李华山 副主任医师
中国中医科学院广安门医院肛肠科

李瑜元 教授
广州市第一人民医院内科

刘海林 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

彭心宇 教授
新疆石河子大学医学院第一附属医院普外一科

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科

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

田晓峰 教授
大连医科大学附属第二医院

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

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

吴君 主任医师
贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

阎晓初 副教授
中国人民解放军第三军医大学西南医院病理研究所

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

于则利 教授
首都医科大学附属北京同仁医院外科

庄林 主任医师
昆明市第三人民医院肝病科

周士胜 教授
大连大学医学院医学研究中心