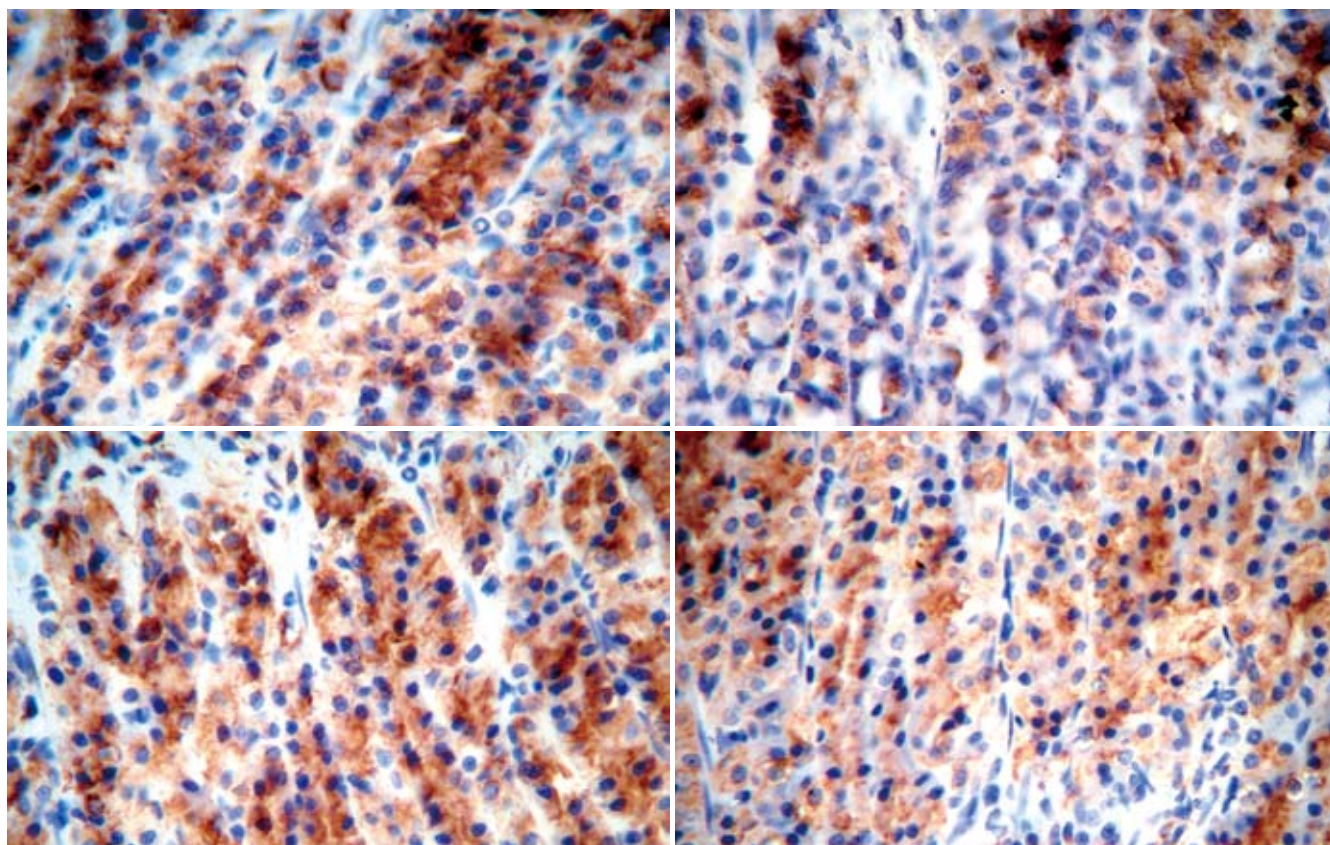


# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009 年 7 月 8 日 第 17 卷 第 19 期 (Volume 17 Number 19)



19 / 2009

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

陈可冀教授  
黄象谦教授  
黄志强教授  
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  
杨思风教授  
姚希贤教授  
岳茂兴教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 常务编委

程英升教授  
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  
聂李明教授  
陈洪副教授

陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌副教授  
迟宝荣教授  
崔立红副教授  
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  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
郭晓钟教授  
何松教授  
洪天配教授  
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  
黄缘教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
李祖国副教授  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海林主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
马欣主任医师

倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
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  
宋军副教授  
宋于刚教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党副教授  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授  
许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
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  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
周国雄主任医师  
朱春兰主任医师  
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  
陈进宏副主任医师  
陈力教授  
陈立波副教授  
陈凜教授  
陈强谱教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
仇毓东副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
单云峰副主任医师  
丁义涛教授  
董明教授  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
葛海燕教授  
龚建平教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
何超教授  
何裕隆教授  
黄志勇教授  
季加孚教授  
英卫东副主任医师  
蒋龙元副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师  
李靖副教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李涛副主任医师

李文岗副教授  
李旭副教授  
李永翔主任医师  
梁力建教授  
刘超副教授  
刘建教授  
刘作金副教授  
卢实春教授  
陆才德教授  
禄韶英副主任医师  
吕明德教授  
吕云福教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民副主任医师  
邱宝安主任医师  
邱双健副教授  
邱伟华副主任医师  
裘正军教授  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
施诚仁教授  
石毓君副研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
汤恢焕教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师  
汪根树副教授  
王春友教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王广义教授  
王健生教授  
王鲁副教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王要军教授  
王悦华副主任医师



# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
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  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师  
徐迅迪副主任医师  
徐泱副主任医师  
许戈良教授  
严律南教授  
杨柏霖副主任医师  
杨家和主任医师  
杨秋蒙副主任医师  
杨维良教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
郁宝铭教授  
元云飞教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张群华教授  
张水军教授  
张宗明教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈仕珠主任医师  
陈耀凯副教授  
陈志辉副主任医师  
党双锁教授  
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  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
林菊生教授  
刘杞教授  
刘正稳教授  
貌盼勇研究员  
宁琴教授  
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  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
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  
宣世英教授  
杨江华副主任医师  
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  
赵连三教授  
周霞秋教授  
朱传武主任医师  
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  
李军祥教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员

刘孟安教授  
刘平教授  
刘绍能主任医师  
沈洪教授  
唐志鹏研究员  
王富春教授  
王新月教授  
谢鸣教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
张声生教授

### 消化肿瘤学

曹秀峰主任医师  
曹志成院士  
陈公琰主任医师  
李璠教授  
刘宝瑞教授  
刘彬彬副研究员  
刘云鹏教授  
沈克平主任医师  
肖文华主任医师  
熊斌教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授  
韩新巍教授  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
倪才方教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐克教授  
杨业发教授  
杨建勇教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授  
郝俊鸣副主任医师  
潘林娜教授  
孙明军教授  
万军教授

吴硕东教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
张春虎副教授

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员  
樊红副教授  
高春芳研究员  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
胡旭初副教授  
黄文林教授  
李刚教授  
李杰副教授  
李永哲副研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
梅林教授  
彭曦副研究员  
钱睿哲教授  
任超世研究员  
任浩副教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
田颖刚副研究员  
汪思应教授  
吴军研究员  
吴俊华副教授  
徐宁志研究员  
许文燮教授  
姚登福教授  
阴赓宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬副教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授

周晓东研究员  
周晓武副主任医师

### 消化病理学

杜祥教授  
李淳副教授  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
马大烈教授  
潘兴华副主任医师  
王鲁平主任医师  
王娅兰教授  
魏蕾教授  
阎晓初副教授  
颜宏利副教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵景民教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2009 年 7 月 8 日

第 17 卷

第 19 期

(总第279期)

述 评

1909 半乳凝素3与肝病关系的研究进展  
段晓燕, 范建高

基 础 研 究

1913 RNA干扰HIF-1 $\alpha$ 对血管生成拟态相关基因表达的影响  
华杰, 施瑞华, 张红杰, 于莲珍, 朱宏, 肖斌, 张国新, 郝波  
1919 JNK在室旁核内微量注射催产素对大鼠胃缺血-再灌注调控中的作用  
张咏梅, 张文文, 张建福  
1925 脂联素及其受体2在非酒精性脂肪性肝炎发病过程中的表达  
钱晓武, 范竹萍, 汪晓红, 盛黎, 奚志峰, 邱德凯  
1931 PTD-NBD多肽对大鼠胰腺腺泡细胞炎症反应的抑制作用  
刘学进, 龙友明, 陈垦, 谢文瑞, 王晖  
1936 左金丸及其主要单体成分对大肠癌的干预作用  
文彬, 黄秋凌, 龚艳青, 陈蔚文  
1942 谷氧还蛋白1在高糖诱导的血管内皮细胞凋亡中的作用及其机制  
于海涛, 张春晶, 岳丽玲, 于英君  
1947 乳源 $\beta$ -酪啡肽7对大鼠葡萄糖吸收的影响及其作用机制  
宋晓丹, 左伟勇, 范英兰, 张源淑

临 床 研 究

1952 EMMPRIN、HER-2蛋白表达与胃癌侵袭转移的关系  
高俊, 陈洪雷, 薛敬玲, 朱润庆

文 献 综 述

1957 胃十二指肠黏膜防护研究进展  
吴成跃, 张传勇  
1962 气体信号分子在肝硬化门静脉高压形成中的作用  
宋丽秀, 郑勇  
1967 胆管乳头状瘤病研究进展  
杨丽, 杨锦林, 胡兵, 王一平  
1972 胶囊内镜与其他小肠检查技术的比较  
辛磊, 廖专, 李兆申

研 究 快 报

1978 胃康舒宁对大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变相关细胞因子的影响  
杨丽萍, 张文娟, 蒋时红, 刘旺根, 王琦, 王雪萍  
1982 GABA及GABA $_A$ 受体激动剂对胰腺癌细胞增殖及MMP-2表达的影响  
张利凡, 余胜利, 王营, 费素娟  
1986 HepG2细胞在不同琼脂糖浓度下克隆形成能力的比较  
丁洁, 魏德全, 蒋吉英, 王宝松, 姜栋栋, 于树娜, 王晓萃

临 床 经 验

1990 不同类型单纯性肥胖者近端胃功能特征分析67例  
常丽丽, 姚树坤, 任锡玲, 郝顺霞, 赵英丽, 秦素丽, 王静玲, 高富贵  
1993 藏、回、汉族胃癌患者发病特征分析1165例  
姬发祥, 赵久达, 沈国双, 曹成珠, 贺菊香, 马新福, 王丽娟, 李进章, 耿排力  
1996 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者外周血HBcAg特异性CTL的影响  
闫杰, 谢雯, 蔺亚辉, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军

	<p>2000 癌-睾丸抗原SSX基因在肝细胞癌中的表达及临床意义 张小静, 范蓉, 何少健, 罗彬, 李颀, 罗国容, 谢小薰</p> <p>2005 原发性胆管结石手术引流方式的分析及其再认识 陈水平, 余新, 邵江华, 郭林泉, 邹书兵, 傅华群</p> <p>2010 胶囊内镜对结肠的检查 王炳周, 吴灵飞, 李国平, 杨伟昂</p>
致 谢	2014 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>1918 <i>WJG</i>成功通过评审被PMC收录</p> <p>1924 汤姆森-路透公布2008年<i>WJG</i>影响因子2.081</p> <p>1935 中国科技期刊引证报告(核心版)发布《世界华人消化杂志》2007年影响因子0.568</p> <p>1941 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>1956 《世界华人消化杂志》标点符号用法</p> <p>1971 《世界华人消化杂志》修回稿须知</p> <p>1977 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知</p> <p>1981 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>1985 《世界华人消化杂志》计量单位标准</p> <p>1989 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</p> <p>1999 《世界华人消化杂志》外文字符标准</p> <p>2004 《世界华人消化杂志》数字用法标准</p> <p>2009 《世界华人消化杂志》栏目设置</p> <p>2013 《世界华人消化杂志》英文摘要要求</p>
封面故事	<p>张咏梅, 张文文, 张建福. JNK在室旁核内微量注射催产素对大鼠胃缺血-再灌注调控中的作用.</p> <p>世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1919-1924</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1919.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1919.asp</a></p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁, 张晓枚, 王天奇;</p> <p>审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-07-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>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</p>		<p><b>编辑</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>出版</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂</p> <p><b>发行</b> 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)</p> <p><b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p><b>邮购</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p>	<p>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.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<a href="http://wcjd.wjgnet.com">http://wcjd.wjgnet.com</a>), 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.</p> <p><b>特别声明</b> 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.</p> <p>2009年版版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 <b>ISSN 1009-3079</b> <b>CN 14-1260/R</b></p>		<p>邮发代号 82-262</p> <p>国外代号 <b>M 4481</b></p>	<p>国内定价 每期24.00元 全年864.00元</p> <p>广告经营许可证 1401004000050</p>

# World Chinese Journal of Digestology

## July 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 19

<b>EDITORIAL</b>	1909 Advances in research on relationship between galectin-3 and liver diseases <i>Duan XY, Fan JG</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>1913 Effect of RNA interference-based silencing of HIF-1<math>\alpha</math> gene on the expression of vasculogenic mimicry-associated genes in esophageal squamous carcinoma cells <i>Hua J, Shi RH, Zhang HJ, Yu LZ, Zhu H, Xiao B, Zhang GX, Hao B</i></p> <p>1919 JNK mediates the effects of oxytocin microinjected into the paraventricular nucleus on gastric ischemia-reperfusion in rats <i>Zhang YM, Zhang WW, Zhang JF</i></p> <p>1925 Expression of adiponectin and its receptor 2 during the development of nonalcoholic steatohepatitis <i>Qian XW, Fan ZP, Wang XH, Sheng L, Xi ZF, Qiu DK</i></p> <p>1931 Inhibitory effects of cell-permeable PTD-NBD peptide on lipopolysaccharide-induced inflammation of pancreatic acinar cell line AR42J <i>Liu XJ, Long YM, Chen K, Xie WR, Wang H</i></p> <p>1936 <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> anti-colorectal carcinoma activities of Zuojin Pill and its major constituents <i>Wen B, Huang QL, Gong YQ, Chen WW</i></p> <p>1942 Mechanism underlying the protective effects of glutaredoxin-1 against high glucose-induced apoptosis of umbilical vein endothelial cells <i>Yu HT, Zhang CJ, Yue LL, Yu YJ</i></p> <p>1947 Effect of <math>\beta</math>-casomorphin-7 from milk on the absorption of glucose <i>in vitro</i> and its mechanism <i>Song XD, Zuo WY, Fan YL, Zhang YS</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	1952 Correlation of the expression of EMMPRIN and HER-2 proteins with the invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma <i>Gao J, Chen HL, Xue JL, Zhu RQ</i>
<b>REVIEW</b>	<p>1957 Advance in gastroduodenal mucosal defense <i>Wu CY, Zhang CY</i></p> <p>1962 Role of gaseous signal molecules in the development of hepatic cirrhosis with portal hypertension <i>Song LX, Zheng Y</i></p> <p>1967 Advances in research on biliary papillomatosis <i>Yang L, Yang JL, Hu B, Wang YP</i></p> <p>1972 Comparison of capsule endoscopy with other imaging modalities in small bowel <i>Xin L, Liao Z, Li ZS</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>1978 Impact of Weikang Shuning Decoction on cytokines involved in the development of gastric precancerous lesions in rats with chronic atrophic gastritis <i>Yang LP, Zhang WX, Jiang SH, Liu WG, Wang Q, Wang XP</i></p> <p>1982 Effect of GABA and GABA<sub>A</sub> receptor activator on the proliferation of pancreatic cancer cells and the expression of MMP-2 in cancer cells <i>Zhang LF, Yu SL, Wang Y, Fei SJ</i></p> <p>1986 Comparison of colony-forming capacity of HepG2 cells in different soft agar systems <i>Ding J, Wei DQ, Jiang JY, Wang BS, Jiang DD, Yu SN, Wang XC</i></p>

<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>1990 Proximal gastric function in volunteers with different types of simple obesity: an analysis of 67 cases <i>Chang LL, Yao SK, Ren XL, Hao SX, Zhao YL, Qin SL, Wang JL, Gao FG</i></p> <p>1993 Morbidity features among Tibet, Hui and Han nationalities with gastric cancer: an analysis of 1165 cases <i>Ji FX, Zhao JD, Shen GS, Cao CZ, He JX, Ma XF, Wang LJ, Li JZ, Geng PL</i></p> <p>1996 Effect of adefovir dipivoxil on the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells in patients with chronic hepatitis B <i>Yan J, Xie W, Lin YH, Feng X, Wang BB, Xiao J, Ou WN, Wang YB, Cheng J</i></p> <p>2000 Clinical significance of SSX mRNA expression in hepatocellular carcinoma <i>Zhang XJ, Fan R, He SJ, Luo B, Li Q, Luo GR, Xie XX</i></p> <p>2005 An analysis and re-evaluation of biliary drainage procedures for patients with primary bile duct stones <i>Chen SP, Yu X, Shao JH, Wu LQ, Zou SB, Fu HQ</i></p> <p>2010 Use of capsule endoscopy to diagnose colon diseases <i>Wang BZ, Wu LF, Li GP, Yang WA</i></p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>2014 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Zhang YM, Zhang WW, Zhang JF.</i> JNK mediates the effects of oxytocin microinjected into the paraventricular nucleus on gastric ischemia-reperfusion in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(19): 1919-1924 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1919.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1919.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang, Xiao-Mei Zhang, Tian-Qi Wang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** July 8, 2009

### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

### RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

### SPONSOR

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

### EDITING

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

### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

### PUBLISHING

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

© 2009 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](http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp). If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

# 半乳凝素3与肝病关系的研究进展

段晓燕, 范建高

段晓燕, 上海交通大学附属第一人民医院脂肪肝诊治中心  
上海市 200080

范建高, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科 上海市 200092

范建高, 主任医师, 教授, 长期致力于脂肪性肝病的基础和临床研究.

作者贡献分布: 本文由段晓燕综述, 范建高审校.

通讯作者: 范建高, 教授, 200092, 上海市, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科. fanjiangao@gmail.com

电话: 021-65790000-7101 传真: 021-65790825

收稿日期: 2009-05-11 修回日期: 2009-06-29

接受日期: 2009-07-06 在线出版日期: 2009-07-08

## Advances in research on relationship between galectin-3 and liver diseases

Xiao-Yan Duan, Jian-Gao Fan

Xiao-Yan Duan, Center for Fatty Liver Disease, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Jian-Gao Fan, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Professor Jian-Gao Fan, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China. fanjiangao@gmail.com

Received: 2009-05-11 Revised: 2009-06-29

Accepted: 2009-07-06 Published online: 2009-07-08

## Abstract

Galectin-3, having an apparent molecular weight between 29 and 35 kDa, is a member of a galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins consisting so far of 14 reported members. Galectin-3 is predominantly localized in the cytoplasm and may translocate to the perinuclear membrane, nucleus and get secreted into the extracellular matrix (ECM). It is involved in cell growth, proliferation, differentiation and adhesion, immune responses, angiogenesis, apoptosis, and tumor progression and metastasis. Furthermore, galectin-3 can act as a receptor for advanced glycation end-products. Recent studies have shown that galectin-3 is associated with many hepatic diseases, such as fatty liver disease, hepatic fibrosis, cirrhosis and liver cancer. Here, we will review the relationship between galectin-3 and hepatic diseases.

**Key Words:** Galectin-3; Liver disease; Fatty liver; Liver cancer

Duan XY, Fan JG. Advances in research on relationship between galectin-3 and liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1909-1912

## 摘要

半乳凝素3(galectin 3, Gal-3)是一种相对分子质量为29-35 kDa的基因产物, 包含已报道的14种成员的糖结合蛋白家族的一员, 主要存在于细胞质中, 也可易位到核膜, 细胞核并且分泌到细胞外基质中. Gal-3参与细胞生长、增殖、分化、黏附, 炎症和免疫应答, 血管发生、凋亡以及肿瘤的进展和转移, 并且是糖基化终产物受体之一. 近年来人们开始关注Gal-3与各种肝脏疾病之间的关系, 如脂肪肝、肝纤维化、肝硬化和肝癌. 本文就此作一综述.

**关键词:** 半乳凝素3; 肝脏疾病; 脂肪肝; 肝癌

段晓燕, 范建高. 半乳凝素3与肝病关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(19): 1909-1912

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1909.asp>

## 0 引言

凝集素(lectin)是自然界广泛存在的一类选择性识别糖结构并与其非共价结合的蛋白质, 根据来源分为动物凝集素、植物凝集素和微生物凝集素. 半乳凝素(galectins)是动物凝集素家族的一员, 迄今为止已经识别的该家族成员有14个, 均含有约130个氨基酸组成的保守糖识别结构域(carbohydrate recognition domain, CRD). 根据CRD数目和组织分布不同, 该家族成员可分为3个亚型: 原型, 嵌合型和串联重复型. 半乳凝素3(galectin 3, Gal-3)是唯一的脊椎动物嵌合型半乳凝素, 含有一个连接到富含脯氨酸和甘氨酸的长N末端的CRD<sup>[1]</sup>. 脊椎动物半乳凝素存在于胞质、胞核、细胞表面以及细胞外基质. 半乳凝素分布广泛, 存在于多种组织和细胞内, 参与细胞黏附、增殖、凋亡、炎症、免疫反应等多

## ■背景资料

Gal-3是一种广泛表达的半乳糖苷结合蛋白, 通过介导细胞黏附、增殖、凋亡、炎症、免疫反应等多种作用参与肿瘤、糖尿病、动脉粥样硬化、感染性疾病等的发展. 值得注意的是, 最近越来越多的基础和临床研究报道了Gal-3在肝脏疾病中的作用.

## ■同行评议者

宣世英, 教授, 山东省青岛市立医院肝病内科



## ■研究前沿

Gal-3与肝病关系的研究多集中于对肝癌(包括原发性肝癌和转移性肝癌)的研究,其作为肝癌候选诊断指标及治疗靶点仍须进一步研究证实;此外, Gal-3与脂肪肝、肝纤维化、肝硬化以及其他肝损伤性疾病的研究,特别是Gal-3在肝内不同细胞(包括具有吞噬功能的Kupffer细胞)的作用及其胞内信号转导途径的探讨,应是今后研究的重点。

## ■相关报道

Nomoto *et al* 研究发现 Gal-3 基因敲除小鼠 [Gal-3(-/-)] 6 mo 时能发展为临床病理特征类似于人类的 NAFLD, Nakanishi *et al* 延长实验时间以期观察肝组织学改变, 结果发现此类小鼠 15 mo 或更久可发展为肝肿瘤, 研究者推测选择性阻断 Gal-3 可能会加速 NASH 基础上肝癌的形成。

种病理生理过程, 并有可能成为肿瘤和炎症性疾病治疗的靶点<sup>[2-4]</sup>。对该家族成员研究最多的是 Gal-3, Gal-3 与多种疾病密切相关, 如肿瘤、糖尿病、动脉粥样硬化、感染性疾病等。近年来愈来愈多的研究发现他参与某些肝脏疾病的病理过程。本文就 Gal-3 的结构、分布、功能及其与肝病的关系作一综述。

## 1 Gal-3 的概况

**1.1 Gal-3 的结构和分布** Gal-3, 一种相对分子质量为 29-35 kDa 的  $\beta$  半乳糖苷结合蛋白, 1982 年, 作为巨噬细胞表面抗原-2 (macrophage surface antigen-2, Mac-2) 在鼠类腹腔巨噬细胞被鉴定出来, 而后在小鼠成纤维细胞中发现 35 kDa 的碳水化合物结合蛋白 (35 kDa carbohydrate-binding protein, CBP-35), 在嗜碱细胞性白血病细胞中发现  $\epsilon$  结合蛋白 ( $\epsilon$ -binding protein,  $\epsilon$ BP)、在大鼠和人肺组织中发现 29 kDa 的凝集素 (RL-29、HL-29), 在癌基因转染的大鼠胚胎成纤维细胞内发现 34 kDa 的凝集素 (L-34), 以及在巨噬细胞内发现非整合素层粘连蛋白结合蛋白 (laminin binding protein, LBP), 这些蛋白的氨基酸和基因序列分析显示具有高度同源性, 故在 1994 年被统一命名为 Gal-3<sup>[1]</sup>。Gal-3 属于半乳凝素家族, 是一个可与细胞内糖蛋白、细胞表面分子和细胞外基质相互作用的细胞内和细胞外凝集素, 其基因位于染色体 1p13 及 14q21-22, 由 CRD 与一个胶原蛋白重复结构域融合而成。Gal-3 常以同二聚体的形式存在, 且在 CRD 上还具有罕见的串联重复氨基酸侧链。Gal-3 主要表达在肿瘤细胞、巨噬细胞、上皮细胞、成纤维细胞和激活的 T 细胞表面。Gal-3 在小鼠大脑、心脏和胰腺低表达, 在肝、回肠、肾脏和肾上腺中表达, 在肺、脾、胃、结肠、子宫和卵巢高表达<sup>[5]</sup>。Gal-3 主要存在于细胞质中, 细胞核和细胞表面也有表达, 由于其缺乏经典的信号序列, 还可通过非经典途径分泌到细胞外, 以自分泌或旁分泌的形式起作用。

**1.2 生物学功能** Gal-3 在亚细胞定位后表现出多效性生物功能, 包括调节黏附、凋亡、介导炎症和免疫应答、pre-mRNA 剪接、高亲和力结合、内吞、降解晚期糖基化终产物 (advanced glycation end-products, AGEs) 等作用, 其生物学作用的发挥取决于其细胞定位, 而其定位则取决于细胞类型和细胞增殖状态。Gal-3 具有调节细胞与细胞、细胞与基质的黏附作用。Gal-3 对细胞凋亡的调节具有双向性, 位于胞质的 Gal-3 具有抗凋亡活性, 可促进肿瘤的发生, 同时与抗癌

药耐药性产生有关<sup>[6]</sup>, 而核内的 Gal-3 则表现出相反的效应<sup>[7]</sup>。Gal-3 是一种强大的炎症信号, 可激活 NADPH 氧化酶, 刺激中性粒细胞产生超氧化物, 去除小鼠体内 Gal-3, 小鼠表现为缺乏炎症细胞<sup>[8]</sup>。Gal-3 能够负性调节脂多糖诱导的炎症, 保护宿主免受内毒素休克<sup>[9]</sup>。Gal-3 也可以通过维持线粒体稳态而保护细胞免于损伤和死亡<sup>[10]</sup>。Gal-3 能抑制 T 细胞免疫应答, 促进肿瘤生长, 参与肿瘤免疫耐受<sup>[11]</sup>。Gal-3/AGE-R3 作为一种 AGEs 受体, 能够保护细胞免受 AGE 诱导的组织损伤<sup>[12]</sup>。AGE 特异性受体 (receptor for advanced glycation end-product, RAGE) 也是 AGEs 受体的一种, 但不同于 Gal-3, 他与 ROS 的产生和 p21 依赖的 MAPK 及其下游靶基因 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 复合物的激活以及由此导致的组织损伤有关<sup>[13]</sup>。

## 2 Gal-3 与肝脏疾病的关系

肝脏 Gal-3 的表达在大鼠出生后第 9 天可很快被诱导, 但是成年后只有微量表达。在人类和小鼠的正常肝细胞检测不到 Gal-3, 然而他显著表达在胆管上皮细胞和 Kupffer 细胞<sup>[13]</sup>。AGEs 作为一种非酶性糖基化反应产物, 在衰老过程中缓慢增加, 在糖尿病、肾衰、动脉粥样硬化、恶性肿瘤等多种疾病的发病机制中起重要作用。AGE 主要在肝脏代谢, 肝功能受损可能会导致 AGE 水平的增加。Gal-3 作为 AGEs 的一种重要受体, 二者形成 AGE-受体复合体具有细胞保护作用, RAGE 有细胞毒效应, RAGE 能够激活促炎信号通路, 直接或间接减弱肝脏抗炎介质的表达和生物学作用的发挥, 而 Gal-3 在调节炎症和受损肝细胞修复中起重要作用。Gal-3 缺陷能致脂质和葡萄糖代谢紊乱, 及炎症或细胞存活率的失衡<sup>[14]</sup>。Butscheid *et al*<sup>[15]</sup>报道了 Gal-3 和 RAGE 在肝病患者肝脏的表达。

总之, Gal-3 在肝脏某些病理情况下的诱导性表达表明 Gal-3 在维持肝脏内环境稳态方面有重要作用。

**2.1 Gal-3 与非酒精性脂肪性肝病** 在非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 时与 Gal-3 有关的内毒素血症和线粒体功能障碍<sup>[9-10]</sup>使肝脏容易遭受“二次打击”。Gal-3 以前作为巨噬细胞的一种表面标志, 与巨噬细胞的功能有关。大量研究显示浸润在肝脏脂肪的巨噬细胞和 Kupffer 细胞参与胰岛素抵抗和 NASH 的发生。这提示 Gal-3 与 NAFLD 的发病可能有一定联系。Nomoto *et al*<sup>[13]</sup>研究发现 Gal-3 基因敲

除小鼠[Gal-3(-/-)] 6 mo时能发展为临床病理特征类似于人类的NAFLD, Gal-3(-/-)小鼠肝指数、血清转氨酶水平, 肝组织TG含量和脂质过氧化物都比野生型[Gal-3(+/-)]小鼠显著增加, 此外, AGE、RAGE和PPAR $\gamma$ 也显著升高. 研究提示Gal-3缺乏能够导致NAFLD的发生, 可能的机制如下: (1) 肝脏RAGE蛋白表达增加. 已知他们的实验发现Gal-3(-/-)小鼠肝脏RAGE蛋白表达在2 mo时就已增加. 而且与Gal-3(+/-)小鼠相比, Gal-3(-/-)小鼠肝脏RAGE蛋白表达显著增加, 而RAGE mRNA表达却无差别, 提示Gal-3对RAGE的调节发生在转录后水平, 并且这样的调节可能保护肝脏免受RAGE诱导的组织损伤. (2) 肝脏AGE增加. 研究者推测Gal-3(-/-)小鼠AGE的肝脏清除率下降导致其在肝脏的积聚而产生了肝毒性, 终至NAFLD的发生. (3) 肝脏过度表达PPAR $\gamma$ . Gal-3缺陷可以直接诱导肝脏PPAR $\gamma$ 过度表达从而导致脂肪肝.

**2.2 Gal-3与肝纤维化、肝硬化** 在人类硬化肝, Gal-3表达上调<sup>[15-17]</sup>. Gal-3在硬化肝中快速增殖的肝细胞内表达增加可能是高有丝分裂指数的结果或是早期的成瘤事件<sup>[16]</sup>. 体内和体外阻断Gal-3基因能阻止肌纤维母细胞激活和前胶原蛋白I的表达, 显著减轻肝纤维化. 体外给予外源性重组Gal-3能逆转肝纤维化. 和野生型肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)相比, TGF- $\beta$ 不能反式激活Gal-3(-/-)的HSC, 但在刺激Smad-2和-3激活方面是等效的. 提示Gal-3对TGF- $\beta$ 介导的肌纤维母细胞激活和基质产生是必需的<sup>[15]</sup>. HSC, 肝特异性外膜细胞, 在肝纤维化形成过程中起关键作用. 在HSC转分化为肌纤维母细胞以及肝组织纤维化过程中Gal-3表达显著上调, 重组Gal-3可通过MEK1/2-ERK1/2信号途径刺激培养的HSC增殖, 蛋白激酶C(PKC)和A(PKA)参与HSC内Gal-3依赖性ERK1/2的激活<sup>[18]</sup>. Gal-3在原代培养的HSC中的表达以时间依赖的方式增加, TAA诱导的大鼠硬化肝中, Gal-3在HSC和Kupffer细胞均有表达. Gal-3以剂量依赖的方式刺激HSC的DNA合成, 但是不会刺激肝细胞DNA合成<sup>[19]</sup>.

**2.3 Gal-3与肝癌** Nakanishi *et al*<sup>[14]</sup>在他们以前研究发现Gal-3基因敲除小鼠6 mo时能发展为临床病理特征类似于人类的NAFLD基础上, 延长实验时间以期观察肝组织学改变, 结果发现此类小鼠15 mo或更久即发展为肝肿瘤, 并伴有不同程度的异型核及3区轻到中度的纤维化; 并且研究者没有得到其他部位发生肿瘤的证据. 据此研究者们认为Gal-3基因敲除小鼠发生肝肿瘤是

由于NASH而不是由于缺乏Gal-3, 他们还推测选择性阻断Gal-3可能会加速NASH基础上肝癌的形成. Chung *et al*<sup>[20]</sup>用高密度cDNA微阵列技术检测HCC差异表达基因发现Gal-3表达上调. 最近的一项研究发现Gal-3表达参与肿瘤的进展并与HCC的预后有关, 提示Gal-3可能是一种新的肿瘤标志物和治疗靶点<sup>[21]</sup>. Huang *et al*<sup>[22-23]</sup>的研究发现, Balb/c结肠癌肝转移小鼠中, 肝组织和血清Gal-3表达显著增加. Gal-3通过与层粘连蛋白结合的机制在腺癌肝转移中起重要作用, 抑制癌细胞表面Gal-3能减少细胞与层粘连蛋白的黏着和肝转移的发生<sup>[24]</sup>. Shimonishi *et al*<sup>[25]</sup>收集20例正常肝内胆管, 15例胆管上皮异常增生, 40例肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)的样本用免疫组织化学法进行检测发现, 在正常肝内胆管, Gal-3组成性低表达; 在肝石病和胆管上皮异常增生Gal-3呈强阳性表达. 在分化良好的ICC, Gal-3往往强表达在胞质, 而在低分化的ICC其表达显著减少且很少强表达, 甚至无表达. 这些结果提示, 尽管Gal-3在ICC的晚期阶段易于消失, 但是在ICC的肿瘤发生前及早期新生物形成阶段上皮细胞Gal-3表达是上调的. Hsu *et al*<sup>[17]</sup>的研究揭示了Gal-3在HCC的表达不依赖于患者是否存在先前的HBV感染, 然而, Gal-3启动子和HBV-X蛋白表达载体的共转染研究证明了乙型肝炎病毒X蛋白可反式激活凝集素启动子引起Gal-3的表达.

**2.4 Gal-3和其他肝病** 用CCl<sub>4</sub>处理成年大鼠致肝炎, 48-72 h后发现门静脉周围的肝细胞胞质内Gal-3 mRNA大量积聚, 与DNA损伤修复基因的表达是同时出现的, 提示Gal-3基因转录水平增加, 且与受损肝细胞的修复有关<sup>[26-27]</sup>. CCl<sub>4</sub>毒性对Gal-3(+/-)和Gal-3(-/-)小鼠可产生以细胞色素氧化酶降低、AST水平升高、细胞水肿或坏死等为表现的肝损伤, Gal-3基因缺损可减轻CCl<sub>4</sub>肝毒性<sup>[28]</sup>. Gal-3与IL-10可协同相互作用对抗肝脏的缺血再灌注损伤<sup>[29]</sup>.

### 3 结论

Gal-3参与脂肪肝、肝纤维化、肝硬化及肝癌的发生发展, 但具体机制尚未阐明. 可以预见Gal-3在肝脏疾病的深入认识有着引人注目的临床应用前景, Gal-3对肝癌的诊断有重要的参考价值, 同时阻断其胞质的表达以抑制肿瘤的研究也是当今热点问题. Gal-3作为肝纤维化治疗的靶点仍需要进一步的研究来证实. 脂肪肝组织和血清

### ■创新盘点

本文就Gal-3的结构、分布、生物学功能及其与肝脏疾病关系的最新研究成果作了较为全面的阐述, 同时指出了Gal-3在肝病领域的未来发展趋势.

### ■名词解释

1 晚期糖化终产物(AGEs): 是在蛋白质赖氨酸的氨基和还原糖的醛基之间发生非酶性糖基化反应生成的终产物总称. 能提供氨基的核酸和脂质也能经糖化修饰形成AGEs. AGEs可通过与其他蛋白发生交联直接影响组织细胞功能, 也可与特异受体结合, 通过信号转导机制导致疾病的发生发展.

2 AGEs受体: 是首先在单核细胞和巨噬细胞中发现的细胞表面特异的AGEs结合蛋白, 包括AGE特异性受体(RAGE)、AGE-R1、AGE-R2、AGE-R3(Gal-3)等, AGEs可通过AGEs受体与细胞结合, 介导吞噬细胞对AGEs的内吞和降解.

# ■同行评价

本文从几个方面综述半乳糖素3与肝病关系的研究进展,追踪肝病研究的前沿,并对半乳糖素3在肝病领域的进一步研究提出展望,具有一定的理论价值。

Gal-3的表达水平以及二者表达是否一致尚无相关报道。在肝脏疾病治疗方面, Gal-3是一种有前途的分子靶点。探讨其在肝内不同细胞的作用及其胞内信号转导途径, 应是今后的研究方向。同时随着对Gal-3基础研究的不断深化, 应该更注重开发他在肝脏疾病治疗方面的临床应用价值。

## 4 参考文献

- Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 616-635
- Nakahara S, Raz A. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 605-610
- Liu FT, Hsu DK. The role of galectin-3 in promotion of the inflammatory response. *Drug News Perspect* 2007; 20: 455-460
- Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10: e17
- Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, Joo HG, Shin T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biol Int* 2007; 31: 655-662
- Fukumori T, Kanayama HO, Raz A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. *Drug Resist Updat* 2007; 10: 101-108
- Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brule F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene* 2004; 23: 7527-7536
- Hernandez JD, Baum LG. Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology* 2002; 12: 127R-136R
- Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, Xu D. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *J Immunol* 2008; 181: 2781-2789
- Matarrese P, Tinari N, Semeraro ML, Natoli C, Iacobelli S, Malorni W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett* 2000; 473: 311-315
- Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G, Wang RF. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Res* 2008; 68: 7228-7236
- Iacobini C, Menini S, Oddi G, Ricci C, Amadio L, Pricci F, Olivieri A, Sorcini M, Di Mario U, Pesce C, Pugliese G. Galectin-3/AGE-receptor 3 knockout mice show accelerated AGE-induced glomerular injury: evidence for a protective role of galectin-3 as an AGE receptor. *FASEB J* 2004; 18: 1773-1775
- Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Fujimoto M, Kato I, Hiraga K, Hsu DK, Liu FT, Takano Y. Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *J Pathol* 2006; 210: 469-477
- Nakanishi Y, Tsuneyama K, Nomoto K, Fujimoto M, Salunga TL, Nakajima T, Miwa S, Murai Y, Hayashi S, Kato I, Hiraga K, Hsu DK, Liu FT, Takano Y. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in galectin-3 knockout mice. *Hepatol Res* 2008; 38: 1241-1251
- Butscheid M, Hauptvogel P, Fritz P, Klotz U, Alscher

- DM. Hepatic expression of galectin-3 and receptor for advanced glycation end products in patients with liver disease. *J Clin Pathol* 2007; 60: 415-418
- Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5060-5065
- Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 81: 519-526
- Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai K, Yoshizato K. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 2003; 278: 18938-18944
- Maeda N, Kawada N, Seki S, Ikeda K, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai KI, Yoshizato K. Involvement of Galectin-1 and Galectin-3 in Proliferation and Migration of Rat Hepatic Stellate Cells in Culture. *Comp Hepatol* 2004; 3 Suppl 1: S10
- Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YJ, Kim YI, Han HS, Kim JC, Kim MK. Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells* 2002; 14: 382-387
- Matsuda Y, Yamagiwa Y, Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2008; 38: 1098-1111
- Huang ZL, Liu HY. [Expression of galectin-3 in liver metastasis of colon cancer and the inhibitory effect of modified citrus pectin] *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2008; 28: 1358-1361
- Liu HY, Huang ZL, Yang GH, Lu WQ, Yu NR. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7386-7391
- Inufusa H, Nakamura M, Adachi T, Aga M, Kurimoto M, Nakatani Y, Wakano T, Miyake M, Okuno K, Shiozaki H, Yasutomi M. Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis. *Int J Oncol* 2001; 19: 913-919
- Shimonishi T, Miyazaki K, Kono N, Sabit H, Tuneyama K, Harada K, Hirabayashi J, Kasai K, Nakanuma Y. Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 302-310
- Yamazaki K, Kawai A, Kawaguchi M, Hibino Y, Li F, Sasahara M, Tsukada K, Hiraga K. Simultaneous induction of galectin-3 phosphorylated on tyrosine residue, p21(WAF1/Cip1/Sdi1), and the proliferating cell nuclear antigen at a distinctive period of repair of hepatocytes injured by CCl<sub>4</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 1077-1084
- Li F, Kato I, Kawaguchi H, Takasawa K, Hibino Y, Hiraga K. The galectin-3 gene promoter binding proteins in the liver of rats 48-h post-treatment with CCl<sub>4</sub>. *Gene* 2006; 367: 46-55
- 郑华川, 王威, 关一夫, 平贺紘一. CCl<sub>4</sub>诱发galectin-3基因敲除鼠急性肝损伤的实验研究. *中国医科大学学报* 2008; 37: 603-606
- Lee YJ, Song YK. Cooperative interaction between interleukin 10 and galectin-3 against liver ischemia-reperfusion injury. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 217-220

# RNA干扰HIF-1 $\alpha$ 对血管生成拟态相关基因表达的影响

华杰, 施瑞华, 张红杰, 于莲珍, 朱宏, 肖斌, 张国新, 郝波

华杰, 施瑞华, 张红杰, 于莲珍, 朱宏, 肖斌, 张国新, 郝波, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029  
华杰, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤早期发病机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30770991

作者贡献分布: 此课题由华杰、施瑞华及朱宏设计; 研究过程由华杰、郝波在张红杰、于莲珍、肖斌及张国新的指导下操作完成; 研究所用试剂及分析工具由施瑞华提供; 数据分析由华杰与郝波完成; 本论文写作由华杰与施瑞华完成。

通讯作者: 施瑞华, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化内科. ruihuashi@126.com

收稿日期: 2009-04-09 修回日期: 2009-05-21

接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-08

## Effect of RNA interference-based silencing of HIF-1 $\alpha$ gene on the expression of vasculogenic mimicry-associated genes in esophageal squamous carcinoma cells

Jie Hua, Rui-Hua Shi, Hong-Jie Zhang, Lian-Zhen Yu, Hong Zhu, Bin Xiao, Guo-Xin Zhang, Bo Hao

Jie Hua, Rui-Hua Shi, Hong-Jie Zhang, Lian-Zhen Yu, Hong Zhu, Bin Xiao, Guo-Xin Zhang, Bo Hao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770991

Correspondence to: Professor Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com

Received: 2009-04-09 Revised: 2009-05-21

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of RNA interference-based silencing of HIF-1 $\alpha$  gene on the expression of vasculogenic mimicry-associated genes in esophageal squamous carcinoma cells (Eca-109) cultured in either a normoxia or a hypoxia environment.

**METHODS:** Eca-109 cells were divided into four groups, namely, untransfected Eca-109 cells and three different strains of Eca-109 cells stably transfected with HIF-1 $\alpha$  siRNA (H2/20, H3/10 and H3/15 strains). After the cells were cultured

in a normoxia environment or in a hypoxia environment for 12, 24, 36, 48, 60, 72 and 96 h, respectively, the expression of HIF-1 $\alpha$  protein and mRNA was detected by Western blot and semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the expression of EphA2, VE-cadherin, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and laminin-5 gamma-2 chain (LN-5 $\gamma$ 2) was determined by Western blot.

**RESULTS:** After Eca-109 cells were cultured in a hypoxia environment, the expression of HIF-1 $\alpha$  protein was upregulated, reaching its peak at 24 and 48 h and beginning to decline at 72 and 96 h. However, there was no significant difference in the expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA ( $F = 0.70$ ,  $P = 0.67$ ). The expression of HIF-1 $\alpha$ , EphA2 and LN-5 $\gamma$ 2 proteins was hardly detected in HIF-1 $\alpha$ -silenced cells, and could not be upregulated in a hypoxia environment. In contrast, the expression of VE-cadherin and MMP-2 proteins was slightly down-regulated in HIF-1 $\alpha$  silenced cells, and could be upregulated in a hypoxia environment though the upregulation was not statistically significant (all  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** RNA interference targeting the HIF-1 $\alpha$  gene is able to efficiently silence the expression of HIF-1 $\alpha$  gene in human esophageal squamous carcinoma cells (Eca-109) and thereby inhibit the expression of vasculogenic mimicry-associated genes (EphA2, VE-cadherin, MMP-2 and LN-5 $\gamma$ 2) to a different extent.

**Key Words:** Vasculogenic mimicry; RNA; Small interference; Hypoxia-inducible factor 1; Esophageal neoplasm; Hypoxia

Hua J, Shi RH, Zhang HJ, Yu LZ, Zhu H, Xiao B, Zhang GX, Hao B. Effect of RNA interference-based silencing of HIF-1 $\alpha$  gene on the expression of vasculogenic mimicry-associated genes in esophageal squamous carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1913-1918

## 摘要

**目的:** 探讨常氧及缺氧培养条件下RNA干扰沉默人食管鳞癌细胞Eca-109缺氧诱导因子

## ■背景资料

研究证实部分恶性肿瘤细胞在缺氧环境下高表达缺氧诱导因子1 $\alpha$ , 亦有研究发现部分高度恶性的肿瘤可以形成血管生成拟态, 且在缺氧状态下更为明显。

## ■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科



## ■研发前沿

血管生成拟态是新近发现的一种恶性肿瘤的供血模式,其确切的发生机制尚未完全明确,有待进一步研究。

-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )对血管生成拟态相关基因表达的影响。

**方法:**选择未转染处理的食管鳞癌Eca-109细胞和3株稳定转染HIF-1 $\alpha$  SiRNA的Eca-109细胞,分别予以常氧和缺氧培养,缺氧培养12、24、36、48、60、72、96 h,采用Western blot法和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测HIF-1 $\alpha$ 蛋白及mRNA表达,同时Western blot法检测上皮细胞激酶(EphA2)、血管上皮钙黏附素(VE-cadherin)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、层粘连蛋白5 $\gamma$ 2链(LN-5 $\gamma$ 2)等血管生成拟态相关基因的表达。

**结果:**缺氧条件下培养Eca-109细胞HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达较常氧时增高,以24-48 h为明显,72-96 h开始减弱,而HIF-1 $\alpha$  mRNA检测差异无统计学意义( $F = 0.70$ ,  $P = 0.67$ ); RNA干扰后细胞在常氧下HIF-1 $\alpha$ 、EphA2、LN-5 $\gamma$ 2蛋白几乎无表达,缺氧后亦无增强现象,VE-cadherin、MMP-2蛋白表达较未干扰细胞稍有减弱,缺氧后表达稍增强,但差异无显著性(均 $P > 0.05$ )。

**结论:**RNA干扰能抑制Eca-109细胞的HIF-1 $\alpha$ 基因表达, HIF-1 $\alpha$ 基因沉默后可以不同程度减少EphA2、LN-5 $\gamma$ 2等血管生成拟态相关基因的表达。

**关键词:**血管生成拟态; RNA; 小分子干扰; 缺氧诱导因子1; 食管肿瘤; 细胞缺氧

华杰, 施瑞华, 张红杰, 于莲珍, 朱宏, 肖斌, 张国新, 郝波. RNA干扰HIF-1 $\alpha$ 对血管生成拟态相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1913-1918

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1913.asp>

## ■相关报道

已有研究发现部分高度恶性的肿瘤中存在血管生成拟态现象,其形成机制及信号传导途径主要涉及肿瘤细胞及细胞微环境2个方面,其中发挥重要作用的基因包括:血管上皮钙黏附素(VE-cadherin)、黏附斑激酶(FAK)、上皮细胞激酶(EphA2)、蛋白酪氨酸激酶(Trk)、基质金属蛋白酶(MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-14)及层粘连蛋白(LN)等。

## 0 引言

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子,在多数肿瘤组织中均有HIF-1 $\alpha$ 的过表达。当实体肿瘤处在低氧环境时, HIF-1活性显著增高,涉及改善低氧条件的基因血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、葡萄糖转运蛋白1和3、血红素氧化酶1和糖酵解酶等大量的表达,从而促进肿瘤血管的再生和细胞能量代谢的加强,导致肿瘤细胞的生物学特性的变化,这正是肿瘤细胞的一种自我保护机制的体现。血管生成拟态是近年来在部分恶性实体肿瘤中发现的一种不同于新生毛细血管的肿瘤微循环供血系统,缺氧条件下更易形成,其存在对肿

瘤的发生发展、侵袭转移等起着非常重要的作用。食管癌组织中已证实有血管生成拟态现象的存在,且食管癌细胞中HIF-1 $\alpha$ 表达阳性,并与肿瘤分期、浸润深度、淋巴结转移和患者的预后相关。本研究中,我们在常氧和缺氧条件下培养RNA干扰前后的食管癌细胞,检测HIF-1 $\alpha$ 及血管生成拟态相关基因,探讨他们之间的联系及HIF-1 $\alpha$ 在血管生成拟态形成机制和信号传导通路中的可能的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人食管鳞癌细胞Eca-109购自中科院上海细胞所, RNA干扰HIF-1 $\alpha$ 后经鉴定筛选稳定转染的3株单克隆细胞(H2/20、H3/10、H3/15号细胞)为本实验室构建保存。胎牛血清及DMEM培养液购自Gibco公司。总RNA提取试剂TRIzol购自Invitrogen公司, RNA逆转录试剂盒为Fermentas公司产品, PCR试剂2 $\times$ Tag PCR MasterMix、DNA Marker为北京天根科技公司产品, 普通PCR引物由上海申能博彩公司合成。鼠抗人HIF-1 $\alpha$  mAb、鼠抗人LN5 $\gamma$ 2 mAb购自Chemicon公司, 鼠抗人Tubulin- $\alpha$  mAb购自Sigma公司, 鼠抗人EphA2 mAb、鼠抗人VE-cadherin mAb购自R&D公司, 兔抗人MMP-2 mAb购自Abcam公司, HRP标记羊抗鼠、羊抗兔二抗购自上海晶美公司。BCA蛋白定量试剂盒、ECL化学发光试剂盒购自Pierce公司, PVDF膜购自Roche公司, 蛋白预染Marker购自Fermentas公司。细胞培养箱为Thermo Forma Series II, 厌氧培养箱为上海新苗医疗器械制造有限公司生产的YQX-II型, 普通光学倒置显微镜为Nikon公司ECLIPSETE2000-S型。普通PCR仪为MyGene™ Series Peltier Thermal Cycler MG48+, 核酸电泳仪为北京六一仪器厂DYY-6C型, 凝胶成像分析系统为上海天能科技有限公司Tanon 3500。蛋白电泳及转膜系统为Bio-Rad公司产品, 酶标仪为Bio-Rad公司Model680。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:**4组细胞均用含100 mL/L胎牛血清及100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养液,在50 mL/L CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养。

**1.2.2 缺氧处理:**细胞传代贴壁后置入缺氧培养箱缺氧处理,培养箱中混合气体浓度为50 mL/L CO<sub>2</sub>、850 mL/L N<sub>2</sub>、100 mL/L H<sub>2</sub>,缺氧时间为12、24、36、48、60、72、96 h;相应设置空白

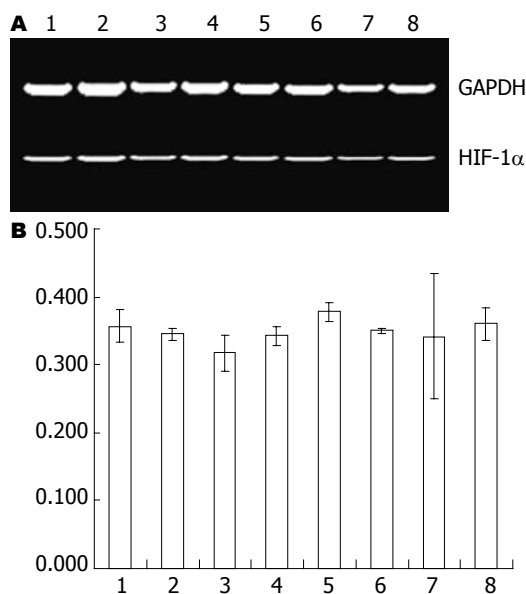


图1 不同时间点培养后Eca-109细胞中HIF-1 $\alpha$  mRNA的表达. A: 半定量RT-PCR检测结果; B: 灰度扫描结果. 1: 常氧培养; 2: 缺氧12 h; 3: 缺氧24 h; 4: 缺氧36 h; 5: 缺氧48 h; 6: 缺氧60 h; 7: 缺氧72 h; 8: 缺氧96 h.

对照组.

**1.2.3 半定量RT-PCR检测HIF-1 $\alpha$  mRNA的表达:** 将常氧和缺氧处理后的各组细胞用TRIzol一步法提取细胞总RNA, 按RNA逆转录试剂盒行逆转录合成cDNA. 引物以Primer 5软件自行设计, 交由上海申能博彩公司合成, HIF-1 $\alpha$ 上游引物5'-GCA AGA CTT TCC TCA GTC GAC ACA-3', 下游引物5'-GCA TCC TGT ACT GTC CTG TGG TGA-3', 扩增片段长度207 bp; GAPDH上游引物5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3', 下游引物5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3', 扩增片段长度983 bp. 体系为20  $\mu$ L: 10  $\mu$ L 2 $\times$  Tag PCR MasterMix, 10  $\mu$ mol/L HIF-1 $\alpha$ 上、下游引物各1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L GAPDH上、下游引物各0.5  $\mu$ L, 1  $\mu$ L cDNA, 其余用ddH<sub>2</sub>O补足, 行HIF-1 $\alpha$ 及GAPDH双重PCR反应. 程序为: 94 $^{\circ}$ C 8 min $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C 28 s $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C 28 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 28 s) $\times$ 28 cycles $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 8 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C. 扩增结束后取PCR产物上样, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳, EB染色, Tanon凝胶成像系统摄片并分析结果.

**1.2.4 Western blot检测HIF-1 $\alpha$ 蛋白及血管生成拟态相关基因的表达:** 冷PBS洗细胞2次, 加蛋白裂解液制备总蛋白, 超声破碎后8000 r/min, 离心30 min, 取上清, 重复超声破碎并离心取上清, 采用BCA法定量蛋白浓度. 取总蛋白60  $\mu$ g于100 $^{\circ}$ C加热变性5 min后上样, 行稳流SDS-PAGE电泳, 稳压冰浴电转至PVDF膜, 50 g/L脱脂奶粉室温

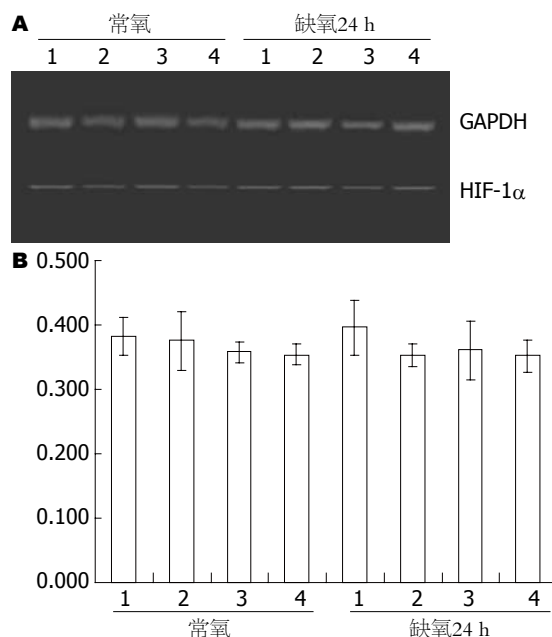


图2 常氧和缺氧培养24 h后各组细胞中HIF-1 $\alpha$  mRNA的表达. A: 半定量RT-PCR检测结果; B: 灰度扫描结果. 1: Eca109细胞; 2: H2/20号; 3: H3/10号; 4: H3/15号.

封闭1 h后TBST漂洗3 $\times$ 5 min, 加入适当浓度一抗(MMP-2 1:2000、EphA2 1:500、LN5 $\gamma$ 2 1:200、HIF-1 $\alpha$  1:500、VE-cadherin 1:500、Tubulin- $\alpha$  1:4000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜. 次日TBST漂洗3 $\times$ 5 min后再加HRP标记的二抗(羊抗鼠1:5000, 羊抗兔1:4000)室温孵育1 h, TBST漂洗3 $\times$ 5 min. ECL化学发光法显影.

**1.2.5 结果灰度分析:** Tanon Gis软件对凝胶电泳条带和感光胶片条带进行灰度值分析, 以目的条带与内参照条带的比值代表目的基因mRNA和蛋白的表达水平.

**统计学处理** 所有数据均在SAS 9.1.3软件下分析, 以mean $\pm$ SD表示, 分别采用单因素及多因素方差分析,  $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 HIF-1 $\alpha$  mRNA及蛋白的表达** 在常氧和缺氧不同时间点检测Eca109细胞HIF-1 $\alpha$ 的表达, 发现各个时间点HIF-1 $\alpha$  mRNA表达无明显差异( $F = 0.70$ ,  $P = 0.67$ , 图1). Eca109细胞和干扰处理的各组细胞在常氧和缺氧培养24 h后检测, 各组细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA表达无明显差异( $F = 0.02$ ,  $0.23$ ,  $P = 0.8949$ ,  $0.8731$ , 图2). 在Eca-109细胞中HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达在缺氧处理时较常氧培养时增加, 在缺氧后24-48 h明显升高, 60 h略有降低, 72-96 h逐渐减少(图3). 3组RNA干扰的细胞常氧下HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达被明显抑制, 且在缺氧处理后

### ■创新盘点

由于缺氧条件下肿瘤细胞缺氧诱导因子1 $\alpha$ 表达明显增强, 且血管生成拟态明显增加, 提示缺氧诱导因子1 $\alpha$ 在血管生成拟态形成过程中可能发挥一定作用, 可能参与其信号传导通路. 本课题研究缺氧诱导因子1 $\alpha$ 与血管生成拟态相关基因之间的关系, 为解释缺氧状态下血管生成拟态现象增强提供一定的依据.

### ■应用要点

本研究揭示了常氧及缺氧状态下食管鳞癌细胞中缺氧诱导因子1 $\alpha$ 的表达及其与血管生成拟态相关基因之间的关系,为进一步探索缺氧诱导因子1 $\alpha$ 在食管鳞癌Eca-109细胞血管生成拟态形成过程中对其信号传导通路调节的分子生物学机制奠定一定的基础。

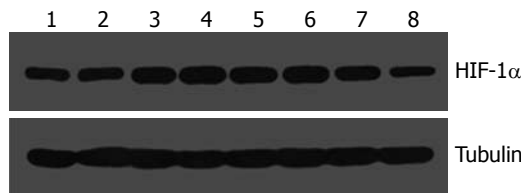


图3 不同时间点培养后Eca-109细胞中HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达。1: 常氧培养; 2: 缺氧12 h; 3: 缺氧24 h; 4: 缺氧36 h; 5: 缺氧48 h; 6: 缺氧60 h; 7: 缺氧72 h; 8: 缺氧96 h。

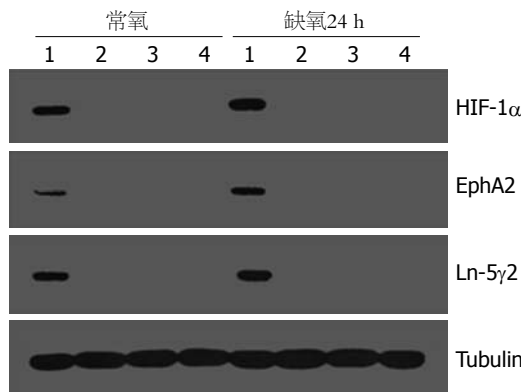


图4 常氧和缺氧培养24 h后各组细胞中HIF-1 $\alpha$ 、EphA2及Ln-5 $\gamma$ 2蛋白的表达。1: Eca109细胞; 2: H2/20号; 3: H3/10号; 4: H3/15号。

亦无明显递增趋势(图4)。

**2.2 血管生成拟态相关基因的表达** 干扰细胞常氧下EphA2、LN5 $\gamma$ 2表达比未干扰的Eca-109细胞明显减少, 缺氧处理24 h后亦无明显增加(图4); VE-cadherin、MMP-2表达较未干扰细胞略减少, 缺氧处理后表达稍增强, 但差异无统计学意义(VE-cadherin:  $F = 0.20, 1.34, P = 0.6637, 0.2922$ ; MMP-2:  $F = 0.11, 0.20, P = 0.7460, 0.8959$ , 图5)。

### 3 讨论

肿瘤增生过快造成肿瘤微环境始终处于相对缺氧和代谢紊乱状态, 这是恶性肿瘤的生长特点之一。研究表明缺氧可触发机体产生一系列应激性保护反应, 新生血管形成和细胞无氧代谢增加是肿瘤细胞得以在缺氧环境下免受损伤或死亡, 继续生长、增殖的重要途径<sup>[1-4]</sup>。其中HIF-1的表达和活性增强是肿瘤细胞适应缺氧环境的重要原因。HIF-1由HIF-1 $\alpha$ 和HIF-1 $\beta$  2个亚基组成异源二聚体, HIF-1 $\alpha$ 是主要的氧调节亚基和功能亚基。HIF-1 $\alpha$ 在常氧下迅速降解而在缺氧时稳定表达并活化<sup>[5-6]</sup>, 因而其在细胞适应缺氧途径中是连接上下游基因激活的重要调节因子。常氧条件下, HIF-1 $\alpha$ 的脯氨酸残基被羟化,

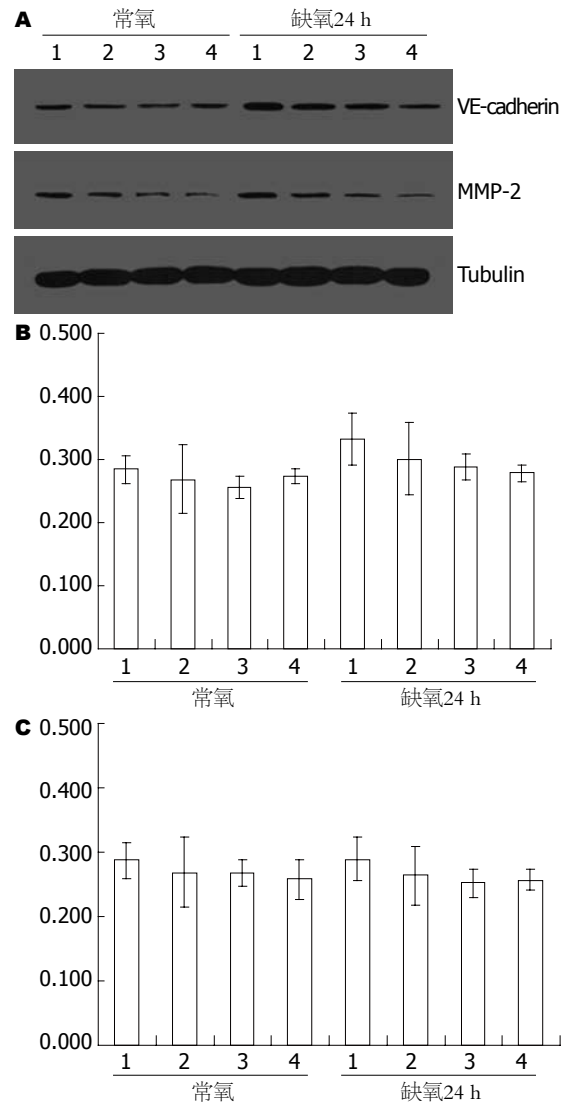


图5 常氧和缺氧培养24 h后各组细胞中VE-cadherin及MMP-2蛋白表达。A: Western blot检测结果; B、C: 灰度扫描结果。1: Eca109细胞; 2: H2/20号; 3: H3/10号; 4: H3/15号。

导致HIF-1 $\alpha$ 通过E3泛素化-蛋白酶体途径迅速降解。缺氧时, 细胞可能通过多个通路感受缺氧, 脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylase, PHDs)无活性, 泛素-蛋白酶体对HIF-1 $\alpha$ 的降解受阻, HIF-1 $\alpha$ 大量积聚并转移至细胞核中, 与HIF-1 $\beta$ 聚合形成稳定的HIF-1; HIF-1与靶基因的缺氧反应元件(hypoxia-response element, HRE)结合, 形成转录起始复合物, 启动靶基因转录。目前已知HIF-1的靶基因有60余种, 涉及血管生成、能量代谢、侵袭转移、离子代谢和儿茶酚胺代谢等<sup>[7]</sup>。本实验发现, 食管癌细胞(Eca-109)在常氧和缺氧培养各个时间点HIF-1 $\alpha$  mRNA表达无明显差异, 而Western blot显示HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达在缺氧处理时较常氧培养时增加。HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达与缺氧有时间依赖关系, HIF-1 $\alpha$  mRNA表达没有明显

差异,提示缺氧诱导的HIF-1 $\alpha$ 调节发生在蛋白水平而非转录水平<sup>[18]</sup>.

RNA干扰是生物进化过程中基因组水平上的免疫监控机制<sup>[9]</sup>,他作为一种特异性基因沉默技术,正越来越多的在反向遗传学研究、细胞信号转导通路研究和某些疾病,如病毒感染、肿瘤及多种遗传相关性疾病的发病机制和治疗学研究中发挥着重要作用.相对于传统上反义寡核苷酸和核酶等基因沉默手段来说,由于siRNA具有RNA双链结构和3'端双核苷酸悬垂,较难被核酶降解,所以RNA干扰具有更好的稳定性和更优越的抑制效果<sup>[10]</sup>,是高通量基因功能研究的得力工具.我们前期设计了3对HIF-1 $\alpha$  siRNA寡核苷酸片段,并通过分子克隆技术成功构建了质粒pGCsi-HIF-1、pGCsi-HIF-2和pGCsi-HIF-3,经脂质体转染食管鳞癌细胞系Eca-109,挑克隆筛选稳定转染细胞,经筛选培养6 mo以上得到几株干扰效率较高的细胞.本实验所选3株细胞干扰效率均较高,干扰后HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达明显抑制,且缺氧后亦无明显增强.

1999年Maniotis *et al*通过对葡萄膜黑色素瘤微循环的研究,提出了一种与经典的肿瘤血管生成途径完全不同的肿瘤血管生成模式-血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM),即在侵袭性的葡萄膜黑色素瘤中的瘤细胞通过自身变形和基质重塑形成一种无内皮细胞被覆的、由细胞外基质界定的微循环管道,血液可以在这种管腔中流动<sup>[11]</sup>.这一现象相继在多种肿瘤中被发现(乳腺癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、食管癌、滑膜肉瘤、横纹肌肉瘤、嗜铬细胞瘤、星形胶质细胞瘤、食管间质瘤等),而且发现VM的存在与疾病发展和预后不良相关<sup>[12-13]</sup>.所以,VM可能是某些肿瘤的重要微循环体系,或是血管生成以外的肿瘤微循环的重要补充.目前VM的生成机制尚不明确,可能的原因主要是:(1)肿瘤细胞的可塑性机制;(2)基因表达的改变;(3)分子信号传递的改变;(4)微环境的影响. Hess *et al*<sup>[14]</sup>发现上皮细胞激酶(epithelial cell kinase, EphA2)在体外培养中参与高度侵袭性黑色素瘤细胞血管样通道的形成.用酪氨酸激酶抑制剂除莠霉素A抑制EphA2的磷酸化,则血管样通道无法形成,去除除莠霉素A则血管样通道又可形成.免疫沉淀、Western blot、转染等方法进一步验证了EphA2在VM形成中的作用.血管内皮细胞钙黏附素(vascular endothelial cadherin, VE-cadherin)是促进同种细胞相互作用的跨膜

蛋白,属于钙依赖黏附素家族. Hendrix *et al*<sup>[15]</sup>发现VE-cadherin仅表达于高度侵袭性黑色素瘤细胞,而不见于低度侵袭性黑色素瘤细胞,下调VE-cadherin的表达将延缓血管样通道的形成. Seftor *et al*<sup>[16]</sup>在三维细胞培养中发现层粘连蛋白5 $\gamma$ 2链(laminin 5 gamma2 chain, Ln-5 $\gamma$ 2 chain)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、膜型基质金属蛋白酶1(membrane type 1-matrix metalloproteinase, MT1-MMP)存在交互作用,是侵袭性黑色素瘤细胞形成血管样通道所必需的. Hendrix *et al*<sup>[17]</sup>在黑色素瘤裸鼠移植瘤模型中发现,缺氧环境使高侵袭性黑色素瘤细胞恶性细胞基因型发生改变,成为胚胎样多能干细胞,塑形性明显提高,选择性的表达某些血管内皮细胞基因,使其能够作为血管内皮细胞样细胞参与VM. van der Schaft *et al*发现尤文氏肉瘤细胞在缺氧诱导下可形成VM. Yao *et al*<sup>[18]</sup>研究发现,缺氧是卵巢上皮癌细胞形成VM的重要诱导因素,西罗莫司通过抑制HIF-1 mRNA表达阻断VM形成.本实验选取VE-cadherin、EphA2、Ln-5 $\gamma$ 2及MMP-2等4种与血管生成拟态关系密切的基因,分别检测其常氧、缺氧培养条件下在HIF-1 $\alpha$ 干扰前后的食管癌细胞中的蛋白表达.结果显示干扰细胞常氧下EphA2、Ln5 $\gamma$ 2表达比未干扰的Eca-109细胞明显减少,缺氧处理24 h后亦无明显增加,与HIF-1 $\alpha$ 表达变化一致;而VE-cadherin、MMP-2表达较未干扰细胞略减少,缺氧处理24 h后表达稍增强,但差异无统计学意义.

总之,在与血管生成拟态关系密切的4种基因中EphA2与Ln-5 $\gamma$ 2表达与HIF-1 $\alpha$ 一致,干扰HIF-1 $\alpha$ 后EphA2与Ln-5 $\gamma$ 2蛋白表达几乎消失,缺氧后亦无增强;而VE-cadherin与MMP-2干扰后蛋白表达较未干扰细胞稍减弱,缺氧后略有增强.我们推测EphA2与Ln-5 $\gamma$ 2与HIF-1 $\alpha$ 关系更为密切,而VE-cadherin与MMP-2可能受其他影响因素的作用, RNA干扰沉默HIF-1 $\alpha$ 后可能通过抑制EphA2与Ln-5 $\gamma$ 2的表达而抑制血管生成拟态的形成.为进一步研究HIF-1 $\alpha$ 在血管生成拟态形成机制中的作用奠定了基础.

## 4 参考文献

- 1 Mizukami Y, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Chung DC. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 1765-1772
- 2 Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in

## ■名词解释

血管生成拟态(VM):即在部分恶性肿瘤中,肿瘤细胞通过自身变形和基质重塑形成一种无内皮细胞被覆的、由细胞外基质界定的微循环管道,血液可以在这种管腔中流动.免疫组织化学可见肿瘤细胞围成的PAS染色阳性的管道,其中可见红细胞,周围无血管内皮细胞衬附.是新近发现的一种肿瘤微循环供血模式.



## ■同行评价

本研究选题新颖,设计合理,方法先进,结果可信,结论可靠,具有很好的学术价值。

- 3 Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000; 60: 4010-4015
- 4 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
- 5 Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-861
- 6 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5510-5514
- 7 Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732
- 8 Pisani DF, Dechesne CA. Skeletal muscle HIF-1alpha expression is dependent on muscle fiber type. *J Gen Physiol* 2005; 126: 173-178
- 9 Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 225-232
- 10 Bass BL. RNA interference. The short answer. *Nature* 2001; 411: 428-429
- 11 Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752
- 12 Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 411-421
- 13 Yue WY, Chen ZP. Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 997-1002
- 14 Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, Carles-Kinch K, Schneider GB, Seftor RE, Kinch MS, Hendrix MJ. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Res* 2001; 61: 3250-3255
- 15 Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, Schatteman GC, Seftor RE. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8018-8023
- 16 Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V, Hendrix MJ. Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6322-6327
- 17 Hendrix MJ, Seftor RE, Seftor EA, Gruman LM, Lee LM, Nickoloff BJ, Miele L, Sheriff DD, Schatteman GC. Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: role of the microenvironment in cell-fate determination. *Cancer Res* 2002; 62: 665-668
- 18 Yao LQ, Feng YJ, Ding JX, Xu CJ, Jin HY, Yin LH. [Primary study of vasculogenic mimicry induced by hypoxia in epithelial ovarian carcinoma] *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2005; 40: 662-665

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive>(编辑部主任:程剑侠 2009-07-08)

# JNK在室旁核内微量注射催产素对大鼠胃缺血-再灌注调控中的作用

张咏梅, 张王文, 张建福

张咏梅, 张王文, 张建福, 江苏省脑病生物信息重点实验室(徐州医学院) 徐州医学院生理学教研室 江苏省徐州市 221002

张咏梅, 医学博士, 教授, 主要从事中枢神经系统对大鼠胃肠道损伤调控机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30570671

江苏省脑病生物信息重点实验室开放基金资助项目, JSBL0804

作者贡献分布: 张咏梅、张王文及张建福对此文所作贡献均等; 此课题由张建福设计; 研究过程由张王文操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张咏梅提供; 数据分析由张咏梅完成; 本论文写作由张咏梅完成。

通讯作者: 张建福, 教授, 221002, 江苏省徐州市, 徐州医学院生理学教研室. zjf\_xz@sina.com

电话: 0516-83262105

收稿日期: 2009-05-05 修回日期: 2009-06-13

接受日期: 2009-06-15 在线出版日期: 2009-07-08

## JNK mediates the effects of oxytocin microinjected into the paraventricular nucleus on gastric ischemia-reperfusion in rats

Yong-Mei Zhang, Wen-Wen Zhang, Jian-Fu Zhang

Yong-Mei Zhang, Wen-Wen Zhang, Jian-Fu Zhang, Jiangsu Key Laboratory of Brain Disease Bioinformation, Department of Physiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570671; the Open Research Fund Program of the Jiangsu Key Laboratory of Brain Disease Bioinformation, No. JSBL0804.

Correspondence to: Professor Jian-Fu Zhang, Department of Physiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China. zjf\_xz@sina.com

Received: 2009-05-05 Revised: 2009-06-13

Accepted: 2009-06-15 Published online: 2009-07-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the molecular mechanism underlying the role of JNK in mediating the effects of oxytocin (OT) microinjected into the paraventricular nucleus (PVN) on gastric ischemia-reperfusion (GI-R) injury.

**METHODS:** Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: vehicle group, OT group, atosiban group and OT plus atosiban group. GI-R injury was induced in rats

by clamping the celiac artery for 30 min and then reperfusion for 1 h. A cannula was inserted into the unilateral PVN for microinjection of OT. The expression of p-JNK, Bax and Bcl-2 proteins in rat gastric mucosa was examined by Western blot and immunohistochemistry.

**RESULTS:** Compared with the vehicle group, microinjection of OT (600 ng) into PVN significantly decreased the expression of p-JNK and Bax proteins but increased the expression of Bcl-2 protein in gastric mucosa following GI-R (all  $P < 0.01$ ). Pre-administration of atosiban (an OT receptor antagonist) into the lateral cerebral ventricle could prevent the effects of OT ( $F = 56.33$ ,  $P < 0.01$ ;  $F = 145.2$ ,  $P < 0.01$ ,  $F = 49.32$ ,  $P < 0.01$ ), increase the expression of p-JNK and Bax proteins, and decrease the expression of Bcl-2 protein when compared with the OT group.

**CONCLUSION:** Microinjection of OT into PVN attenuates GI-R injury through down-regulation of p-JNK protein, which in turn leads to a decrease in Bax expression and an increase in Bcl-2 expression.

**Key Words:** Gastric ischemia-reperfusion; Paraventricular nucleus; Oxytocin; p-JNK

Zhang YM, Zhang WW, Zhang JF. JNK mediates the effects of oxytocin microinjected into the paraventricular nucleus on gastric ischemia-reperfusion in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1919-1924

### 摘要

**目的:** 观察胃黏膜细胞c-Jun氨基末端激酶(JNK)在室旁核(PVN)内微量注射催产素(OT)对大鼠胃缺血-再灌注(GI-R)损伤调控中的作用及机制。

**方法:** 将SD大鼠随机分为4组: vehicle组, OT组, OT+atosiban组, atosiban组。采用夹闭大鼠腹腔动脉30 min, 去除动脉夹再灌注1 h的GI-R损伤模型, 于单侧PVN微量注射OT。运用免疫组织化学及免疫印迹等实验技术, 观

### ■背景资料

OT是下丘脑室旁核、视上核神经元产生的一种最早被阐明一级结构, 并能人工合成的肽类激素。OT参与了维持人体心血管和神经内分泌及体液平衡的调节, 同时又是脑内重要的应激激素之一。PVN既是内脏活动的整合中枢, 又是内分泌系统的调控枢纽, 他具有丰富的传入、传出联系, 与脑干和脊髓侧角有直接的纤维投射。PVN大细胞区内有丰富的OT能神经元胞体, 并分布有较高密度的OT受体。

### ■同行评议者

戈之铮, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科

## ■研发前沿

机体在出血性休克、颅脑外伤、重大手术、严重感染时均可引起不同程度的胃组织缺血而造成胃黏膜的损伤,如何减轻GI-R损伤已逐渐引起人们的关注。然而,目前对GI-R的研究多集中于胃黏膜局部致损伤因素及其治疗上,而缺乏整体情况下对其调控机制的研究。

察了PVN微量注射OT对GI-R后胃黏膜细胞p-JNK、Bax和Bcl-2蛋白表达的影响。

**结果:**与vehicle组相比,PVN内微量注射OT(600 ng)能明显减少GI-R后胃黏膜细胞p-JNK及Bax的表达(均 $P<0.01$ ),增加Bcl-2的表达( $P<0.01$ )。侧脑室给予OT受体特异性拮抗剂atosiban后,可取消OT的效应,与OT组比较,差异有统计学意义( $F=56.33, P<0.01$ ;  $F=145.2, P<0.01, F=49.32, P<0.01$ ),胃黏膜细胞p-JNK及Bax的表达较OT组明显增加,而Bcl-2的表达减少。

**结论:**PVN微量注射OT减轻GI-R损伤的调控机制,在胃黏膜局部是通过抑制胃黏膜细胞p-JNK和Bax的表达,促进Bcl-2的表达实现的。

**关键词:**胃缺血-再灌注;室旁核;催产素;p-JNK

张咏梅, 张文文, 张建福. JNK在室旁核内微量注射催产素对大鼠胃缺血-再灌注调控中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1919-1924

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1919.asp>

## 0 引言

催产素(oxytocin, OT)主要是在下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)和视上核的大细胞神经元中合成的,与机体的氧化应激反应密切相关。在下丘脑PVN大细胞区内有丰富的OT能神经元胞体,并分布有较高密度的OT受体<sup>[1-4]</sup>,刺激PVN及PVN内微量注射OT能够减少胃酸分泌,减轻胃溃疡<sup>[5]</sup>。我们以前的研究发现电刺激PVN可减轻胃缺血-再灌注(gastric ischemia-reperfusion, GI-R)损伤<sup>[6-7]</sup>,并进一步发现PVN内微量注射OT可剂量依赖性减轻GI-R损伤<sup>[8]</sup>,那么,OT减轻GI-R损伤的局部分子机制是什么?近年来,在研究缺血器官的细胞凋亡及增殖修复的细胞信号转导通路中,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号转导通路备受关注。MAPKs是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是公认的与细胞增殖分化凋亡调控密切相关的细胞内信号转导酶类<sup>[9-10]</sup>,其中,c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal protein kinase, JNKs)通路是MAPK中重要的通路之一,是细胞应激反应诱导细胞凋亡的主要信号转导途径。JNK通路被激活后,伴有活化蛋白1(activator protein-1, AP-1)与cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)调控凋亡相关基因家族成员的差异性表达,如Bad、Bax的表达上调与Bcl-2、Bcl-xL的

表达下调<sup>[11-13]</sup>。近来研究表明心肌、肾脏和脑等重要脏器缺血或缺血-再灌注均可引起p-JNK的活化<sup>[14-16]</sup>,我们的研究也表明GI-R后30 min、1、3和6 h均可促进p-JNK在胃黏膜的表达,电刺激PVN后,通过抑制胃黏膜p-JNK的表达,从而减轻GI-R损伤<sup>[17]</sup>。但有关JNK是否参与了OT对GI-R的调控作用尚未见报道,因此,本文通过建立GI-R模型,应用核团微量注射、免疫组织化学、免疫印迹等方法,探讨了p-JNK在PVN内微量注射OT对GI-R损伤调控中的作用及其机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 成年健康的Sprague-Dawley(SD)大鼠(220-240 g),雌雄不拘,由徐州医学院实验动物中心(使用许可号:SYXK[su]2002-0038)提供。OT购自上海第一生化药业有限公司;atosiban购自深圳翰宇生物工程有限公司。P-JNK小鼠mAb以及Bax、Bcl-2兔多克隆抗体、PowerVision™二步法免疫组织化学检测系统、DAB显色试剂盒、枸橼酸盐缓冲盐溶液、碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG和羊抗鼠IgG、多聚赖氨酸溶液购自北京中杉生物技术有限公司;碱磷酶底物NBT/BCIP显色浓缩液购自美国Promega Technology。其他试剂均为市售化学纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:**实验前禁食24 h,自由饮水。将SD大鼠随机分为4组,每组6只:PVN内微量注射生理盐水0.3  $\mu$ L后进行GI-R组(vehicle组),PVN内微量注射OT 600 ng/0.3  $\mu$ L后进行GI-R组(OT组),侧脑室内微量注射atosiban 1.2  $\mu$ g/5  $\mu$ L后再进行PVN内微量注射OT 600 ng/0.3  $\mu$ L,然后制备GI-R组(OT+atosiban组),侧脑室内微量注射atosiban 1.2  $\mu$ g/5  $\mu$ L后进行GI-R组(atosiban组)。

**1.2.2 PVN或侧脑室微量注射:**动物在麻醉下(10%水合氯醛400 mg/kg ip)固定于脑立体定位仪上,按照Paxinos和Watson脑图谱<sup>[18]</sup>及我们以前的方法<sup>[3]</sup>定位PVN(坐标:AP 1.5 mm, R 0.4 mm, H 7.7-7.8 mm,门齿瓣低于耳间连线3.3 mm)和侧脑室(坐标:AP 1.0 mm, L 1.5 mm, H 4.5 mm.),在2 min内将OT 600 ng/0.3  $\mu$ L微量注射到PVN或将atosiban 1.2  $\mu$ g/5  $\mu$ L注射到侧脑室。vehicle组注射等体积的生理盐水。

**1.2.3 GI-R动物模型的制备:**按Wada *et al*<sup>[19]</sup>方法进行。实验大鼠水合氯醛麻醉后,仔细分离腹腔动脉与周围组织,用小动脉夹夹闭腹腔动脉30 min后去除动脉夹恢复血流再灌注60 min。实验结束后取胃计数胃黏膜损伤指数,测量完损伤

## ■相关报道

Zhou *et al*发现氧化应激引起小肠上皮细胞凋亡时JNK1/2表达迅速增加,抑制JNK信号通路的激活可减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的细胞凋亡。Mitsuyama *et al*发现酒精引起胃黏膜损伤形成过程中,JNK可被快速激活后高水平表达。

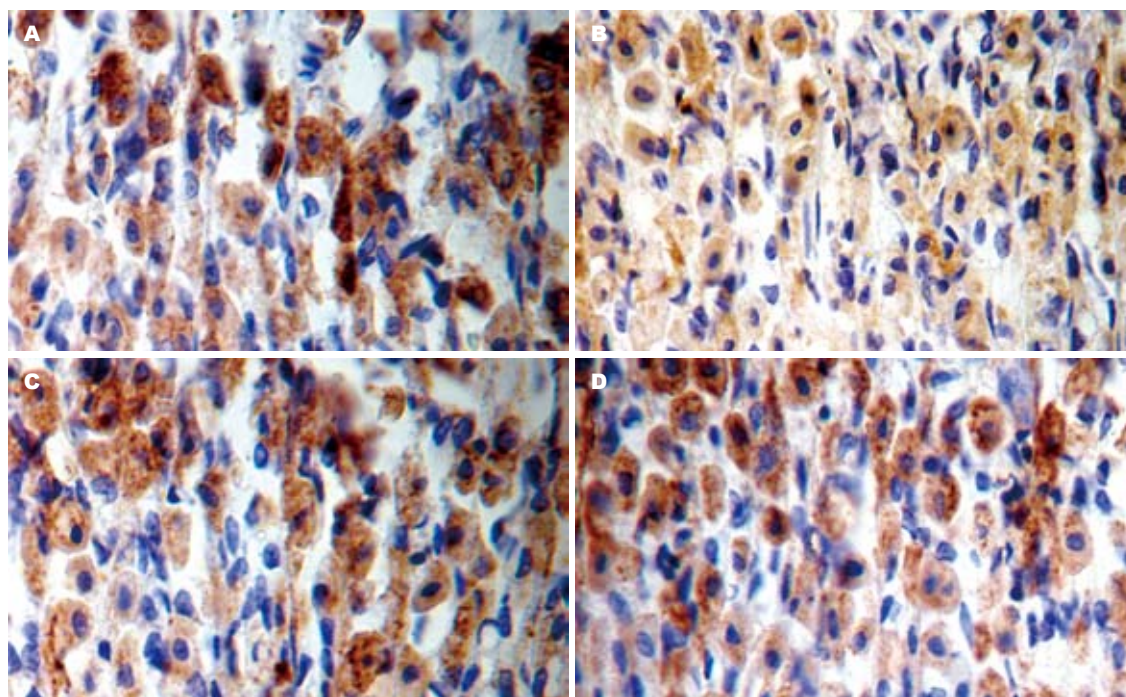


图 1 PVN内微量注射OT对GI-R后胃黏膜p-JNK表达的影响( $\times 400$ ). A: vehicle组; B: OT组; C: atosiban+OT组; D: atosiban组.

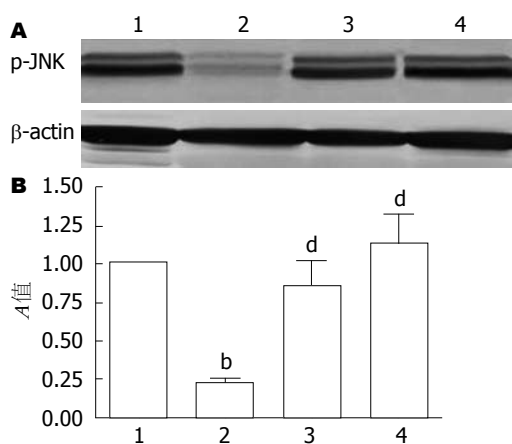


图 2 PVN内微量注射OT对GI-R后胃黏膜p-JNK水平的影响. 1: vehicle组; 2: OT组; 3: atosiban+OT组; 4: atosiban组. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 1组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 2组.

指数后将胃组织在10%中性甲醛溶液内固定, 石蜡包埋切片后用于免疫组织化学染色.

**1.2.4 免疫组织化学染色法:** 按照北京中杉生物技术有限公司提供的PowerVision™二步法免疫组织化学检测系统进行. DAB显色, 苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 中性树胶封片. 光镜下观察到胞质内有棕色颗粒者即为阳性细胞. 用Image-Pro Plus图像分析系统对阳性细胞数进行半定量分析. 以高倍视野下累积吸光度(I<sub>A</sub>)作为分析指标. 对照实验以PBS缓冲液代替一抗. 每例3张间断切片, 每张切片随机选取10个视野, 取平均值.

**1.2.5 蛋白免疫印迹法测定p-JNK、Bax蛋白表达**

量: 将已制备的细胞蛋白提取液测其蛋白浓度后, 经100℃水浴变性5 min, 按每孔30 μL蛋白上样, 经10% SDS-PAGE分离后, 以湿转移法转至NC膜上, 室温封闭3 h, 加入一抗(p-JNK 1:200、Bax 1:800), 4℃过夜, 洗膜后加入相应的碱性磷酸酶标记的二抗, 室温孵育2 h, 洗膜后加入显色剂(NBT/BCIP显色试剂盒), 反应达到要求后流水洗涤终止反应. 条带经图像处理仪行激光扫描后测各条带吸光度(A), 以相应区带的A值相对于对照组的倍数表示.

**统计学处理** 采用SPSS9.0 for Windows统计软件包, 数据以mean±SD表示, 多组间比较采用完全随机设计方差分析法(One-way ANOVA).  $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 分别表示两组数据间有显著性差异或有非常显著性差异.

## 2 结果

**2.1 PVN内微量注射OT对GI-R后胃黏膜p-JNK表达水平的影响** p-JNK阳性细胞主要表达在胃黏膜上层细胞胞质中, PVN微量注射OT(600 ng)可明显减少GI-R 1 h(vehicle组)后p-JNK蛋白的表达水平( $P < 0.01$ ), 而atosiban可取消OT的这种效应, 与vehicle组无明显差异( $F = 56.33$ , 图1-2).

**2.2 PVN内微量注射OT对GI-R后胃黏膜Bax表达水平的影响** Bax阳性细胞主要表达在胃黏膜中下层胃底腺细胞胞质中, 在黏膜上皮细胞中表达不明显. GI-R 1 h(vehicle组)后胃黏膜

### ■创新盘点

本研究首次报道PVN内微量注射OT后, 通过抑制胃黏膜细胞p-JNK的激活, 促进Bcl-2的表达, 抑制Bax的表达, 从而减轻GI-R损伤.



### ■应用要点

本研究对阐明GI-R损伤的中枢及外周机制具有重要价值,为临床防治GI-R损伤提供了实验基础和理论依据,并为临床治疗胃黏膜损伤提供了可能的药物作用靶点。

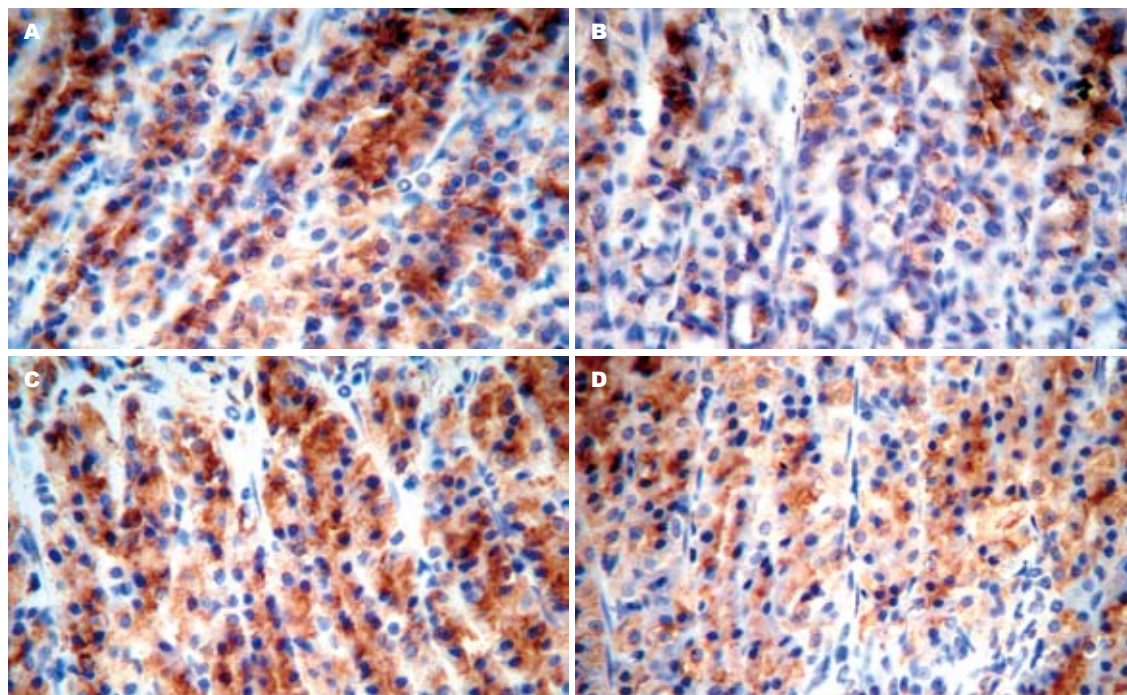


图3 PVN内微量注射OT对GI-R后胃黏膜Bax表达的影响( $\times 400$ )。A: vehicle组; B: OT组; C: atosiban+OT组; D: atosiban组。

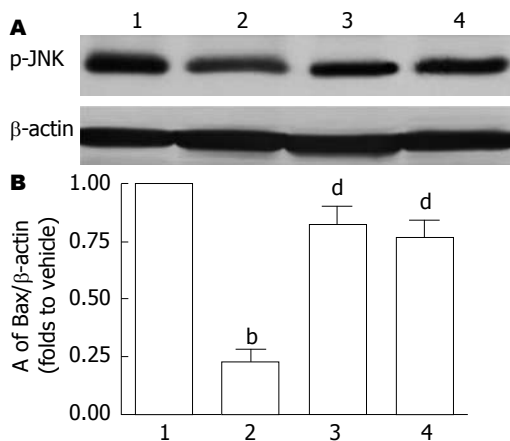


图4 PVN内微量注射OT对GI-R后胃黏膜Bax水平的影响。1: vehicle组; 2: OT组; 3: atosiban+OT组; 4: atosiban组。  
<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 1组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 2组。

Bax蛋白水平较高, PVN微量注射OT(600 ng)后, Bax蛋白水平较vehicle组明显减少( $P<0.01$ ), 而atosiban可阻断OT的这种效应( $F=145.2$ ,  $P<0.01$ , 图3-4)。

**2.3 PVN内微量注射OT对GI-R后胃黏膜Bcl-2表达的影响** 大鼠胃黏膜Bcl-2阳性细胞主要表达在胃黏膜中下层胃底腺细胞胞质中, 在黏膜上皮细胞中表达不明显。GI-R 1 h后(vehicle组)胃黏膜Bcl-2蛋白水平较低, PVN微量注射OT(600 ng, OT组)后, Bcl-2蛋白水平较vehicle组明显升高( $P<0.01$ ), 而atosiban可阻断OT的这种效应( $F=49.32$ ,  $P<0.01$ , 图5)。

### 3 讨论

我们最近的研究已经发现GI-R 1 h可引起胃黏膜片状、条索状、点状的出血性损伤, 单侧微量注射OT到PVN后, 能明显减轻GI-R损伤, 并且有剂量依赖性。将OT受体拮抗剂atosiban侧脑室注射后, 可阻断OT对GI-R损伤的保护效应, 胃黏膜损伤明显加重, 表明OT对GI-R损伤的保护作用, 是通过PVN内的OT受体实现的<sup>[8]</sup>。但参与这种保护效应的局部因素尚不清楚。

本研究发现PVN内微量注射OT能够明显减少p-JNK在胃黏膜细胞中的表达, 并降低Bax的蛋白水平, 增加Bcl-2的蛋白表达。脑室内注射OT受体拮抗剂atosiban可取消这些效应。表明PVN内微量注射OT后, 在胃黏膜局部通过抑制黏膜细胞JNKs信号通路的激活, 从而对GI-R损伤产生保护作用。

GI-R导致的胃黏膜细胞损伤实际上是一种氧化应激反应, 在缺血-缺氧、氧自由基、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 等胞外刺激信号的作用下, 可激活MAPKs信号蛋白通路。在哺乳动物细胞内已明确了5条MAPK信号转导通路, 分别为细胞外信号调节激酶(ERK1/ERK2, 也称为p44/42 MAPK)、c-Jun氨基末端激酶(JNK1/JNK2)、p38 MAPK( $\alpha$ 、 $\beta$ )、ERK5/BMK1和ERK3/4通路。在多种脏器如心、脑、肾等缺血-再灌注后均可激活JNK信号转导通路<sup>[11,14-15]</sup>。Zhou *et al*发现氧化应激引起小肠上皮细胞凋亡时JNK1/2表达迅速

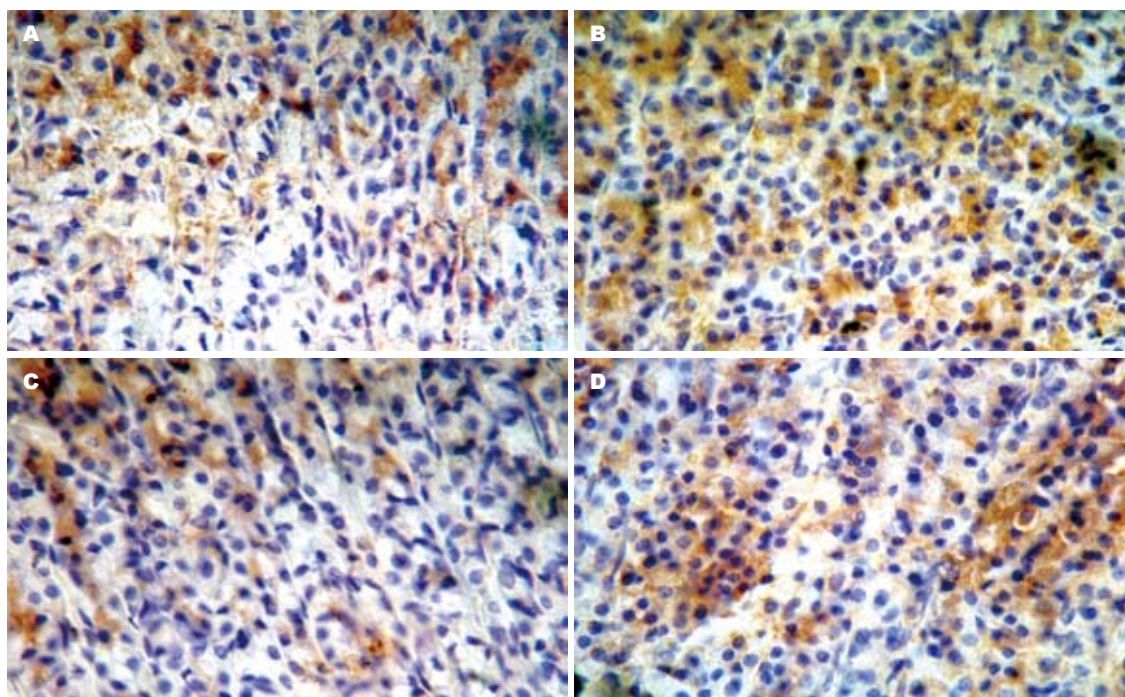


图 5 PVN内微量注射OT对GI-R后Bcl-2表达的影响( $\times 400$ ). A: vehicle组; B: OT组; C: atosiban+OT组; D: atosiban组.

#### ■同行评价

本研究选题新颖, 设计合理, 结果可靠, 对临床具有一定的指导意义.

增加, 抑制JNK信号通路的激活可减轻 $H_2O_2$ 诱导的细胞凋亡<sup>[20]</sup>. Mitsuyama *et al*发现酒精引起胃黏膜损伤形成过程中, JNK可被快速激活后高水平表达<sup>[21]</sup>, 我们前期的研究也证实p-JNK的激活参与缺血-再灌注后胃黏膜细胞的损伤, 是重要的致损伤因素之一<sup>[17]</sup>. 在本研究中进一步发现PVN微量注射OT能通过抑制GI-R胃黏膜细胞p-JNK的激活, 从而减轻GI-R损伤.

此外, JNK与细胞凋亡的关系密切, 他参与了多种凋亡相关基因的转录调控. 与细胞凋亡和增殖有关的基因中, Bcl-2和Bax基因是重要的调节因子<sup>[22-27]</sup>. 现在发现了一系列与Bcl-2基因相关的基因, 统称为Bcl-2家族, 其基因家族产物包括抗凋亡(Bcl-2、Bcl-x)和促凋亡(Bax、Bad、Bak)2类蛋白. Bcl-2和Bax蛋白水平的高低与凋亡调控直接相关, Bax表达增多占优势时, Bax之间同型二聚体增多, 诱导细胞凋亡发生. Bcl-2表达增多时, 将阻止Bax之间形成同型二聚体, 而形成Bcl-2/Bax二聚体, 使细胞凋亡减少、增殖增加. Bcl-2/Bax蛋白之间的比例, 是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素, Bcl-2和Bax协同调节细胞凋亡, 影响胃黏膜损伤过程<sup>[28-30]</sup>. 本研究发现, PVN微量注射OT后, 使GI-R的胃黏膜细胞中Bcl-2表达升高, 同时抑制了Bax的表达. 表明PVN微量注射OT通过抑制Bax的表达, 促进Bcl-2的表达, 从而减轻GI-R损伤.

总之, PVN内微量注射OT后, 在胃黏膜局部通

过抑制胃黏膜细胞p-JNK的激活, 从而促进Bcl-2的表达, 抑制Bax的表达, 进而促进细胞增殖、抑制细胞凋亡, 发挥对GI-R胃黏膜的保护作用.

#### 4 参考文献

- Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 2001; 81: 629-683
- Neumann ID. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 858-865
- Herman JP, Flak J, Jankord R. Chronic stress plasticity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Prog Brain Res* 2008; 170: 353-364
- Yang Z, Han D, Coote JH. Cardiac sympatho-excitatory action of PVN-spinal oxytocin neurones. *Auton Neurosci* 2009; 147: 80-85
- Asad M, Shewade DG, Koumaravelou K, Abraham BK, Vasu S, Ramaswamy S. Effect of centrally administered oxytocin on gastric and duodenal ulcers in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 488-492
- Zhang YM, Wei EQ, Li L, Qiao WL, Wang L, Zhang JF. Extracellular signal-regulated kinase pathways may mediate the protective effect of electrical stimulation of the paraventricular nucleus against ischaemia-reperfusion injury of the gastric mucosa. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 742-752
- Zhang JF, Zhang YM, Yan CD, Zhou XP. Neuroregulative mechanism of hypothalamic paraventricular nucleus on gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci* 2002; 71: 1501-1510
- 张咏梅, 张文文, 张建福. Akt参与室旁核内注射微量催产素减轻大鼠胃缺血-再灌注损伤. *基础医学与临床* 2009; 29: 234-237
- 王玉, 孙黎光, 夏春辉, 叶丽平, 张莹. 在Fas诱导Bel-7402细胞凋亡中p38MAPK调节Bcl-2的表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3184-3189
- Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase



- signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; 268: 14553-14556
- 11 Hu BR, Wieloch T. Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia. *J Neurochem* 1994; 62: 1357-1367
  - 12 Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 1061-1095
  - 13 Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008; 27: 6245-6251
  - 14 Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin-Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M. Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 1998; 18: 5124-5135
  - 15 House SL, Branch K, Newman G, Doetschman T, Schultz Jel J. Cardioprotection induced by cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 is mediated by the MAPK cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H2167-H2175
  - 16 Kunduzova OR, Bianchi P, Pizzinat N, Escourrou G, Seguelas MH, Parini A, Cambon C. Regulation of JNK/ERK activation, cell apoptosis, and tissue regeneration by monoamine oxidases after renal ischemia-reperfusion. *FASEB J* 2002; 16: 1129-1131
  - 17 Li L, Zhang YM, Qiao WL, Zhang JF, Wang L. Role of mitogen-activated protein kinases in the regulation of paraventricular nucleus to gastric ischemia-reperfusion injuries. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 1082-1087
  - 18 Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2<sup>nd</sup> ed. Sydney: Academic Press, 1986: F23-F26
  - 19 Wada K, Kamisaki Y, Kitano M, Kishimoto Y, Nakamoto K, Itoh T. A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach. *Life Sci* 1996; 59: PL295-PL301
  - 20 Zhou Y, Wang Q, Evers BM, Chung DH. Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatr Res* 2005; 58: 1192-1197
  - 21 Mitsuyama K, Tsuruta O, Matsui Y, Harada K, Tomiyasu N, Suzuki A, Takaki K, Masuda J, Handa K, Satoh Y, Bennett BL, Toyonaga A, Sata M. Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) signalling in experimentally induced gastric lesions in rats. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 24-29
  - 22 欧希龙, 颜芳, 关云艳, 孙为豪, 杨柳, 陈国胜, 产松苗, 陈宝安. 血管生成素-1对胃癌细胞Bcl-2和Bax表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3605-3609
  - 23 郭文娟, 王爱英. 凋亡抑制基因Bcl-xL的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2871-2876
  - 24 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326
  - 25 Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* 2009; 122: 437-441
  - 26 Susnow N, Zeng L, Margineantu D, Hockenbery DM. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin Cancer Biol* 2009; 19: 42-49
  - 27 Knudson CM, Brown NM. Mitochondria potential, bax "activation," and programmed cell death. *Methods Mol Biol* 2008; 414: 95-108
  - 28 Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 488-496
  - 29 Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Pajdo R, Konturek JE, Kwiecień S, Taut A, Hahn EG. Apoptosis in gastric mucosa with stress-induced gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 211-225
  - 30 Konturek PC, Pierzchalski P, Konturek SJ, Meixner H, Faller G, Kirchner T, Hahn EG. Helicobacter pylori induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of Bax expression in humans. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 375-383

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 汤姆森—路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-06-20)

# 脂联素及其受体2在非酒精性脂肪性肝炎发病过程中的表达

钱晓武, 范竹萍, 汪晓红, 盛黎, 奚志峰, 邱德凯

钱晓武, 泰州市人民医院老年医学科 江苏省泰州市 225300  
范竹萍, 汪晓红, 盛黎, 奚志峰, 邱德凯, 上海交通大学医学院附属仁济医院 上海消化疾病研究所 上海市 200001  
钱晓武, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的脂肪性肝炎的研究。  
作者贡献分布: 钱晓武与范竹萍对此文所作贡献均等; 此课题由范竹萍与钱晓武设计; 研究过程由范竹萍与钱晓武操作完成; 动物饲养由钱晓武进行, 标本提取由钱晓武、汪晓红、盛黎及奚志峰共同完成; 研究所用新试剂及分析工具由范竹萍与邱德凯提供; 数据分析由钱晓武完成; 本论文写作由钱晓武与范竹萍完成。  
通讯作者: 范竹萍, 主任医师, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海消化疾病研究所. jstzqianxw99@163.com  
收稿日期: 2009-04-29 修回日期: 2009-06-10  
接受日期: 2009-06-15 在线出版日期: 2009-07-08

## Expression of adiponectin and its receptor 2 during the development of nonalcoholic steatohepatitis

Xiao-Wu Qian, Zhu-Ping Fan, Xiao-Hong Wang, Li Sheng, Zhi-Feng Xi, De-Kai Qiu

Xiao-Wu Qian, Department of Geriatrics, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China  
Zhu-Ping Fan, Xiao-Hong Wang, Li Sheng, Zhi-Feng Xi, De-Kai Qiu, Department of Gastroenterology, Shanghai Institute of Digestive Disease, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China

Correspondence to: Dr. Xiao-Wu Qian, Department of Gastroenterology, Shanghai Institute of Digestive Disease, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China. jstzqianxw99@163.com

Received: 2009-04-29 Revised: 2009-06-10

Accepted: 2009-06-15 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of adiponectin and adiponectin receptor 2 (AdipoR2) in the liver during the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) resulting from a methionine-choline deficient (MCD) diet.

**METHODS:** Rats were fed either MCD or CS diets and sacrificed at weeks 3, 5, 8 and 12, respectively, to take liver samples. Liver slices were stained to assess the effects of these diets. After total RNA was extracted from frozen liver tissue, RT-PCR was performed to determine the mRNA expression of adiponectin and AdipoR2 genes. The ex-

pression levels of adiponectin and AdipoR2 genes relative to  $\beta$ -actin were then determined.

**RESULTS:** In rats fed the CS diet, the expression of adiponectin and AdipoR2 genes showed no significant changes with the prolongation of feeding duration (all  $P > 0.05$ ). In rats fed the MCD diet, the expression of adiponectin and AdipoR2 genes gradually declined at weeks 3, 5 and 8, with a very significant difference ( $1.004 \pm 0.08$  vs  $1.25 \pm 0.09$ ,  $0.83 \pm 0.06$  vs  $1.26 \pm 0.07$ ,  $0.68 \pm 0.10$  vs  $1.24 \pm 0.08$ ;  $1.00 \pm 0.06$  vs  $1.24 \pm 0.07$ ,  $0.84 \pm 0.07$  vs  $1.22 \pm 0.09$ ,  $0.75 \pm 0.09$  vs  $1.19 \pm 0.05$ , all  $P < 0.05$ ). At week 12, liver fibrosis was observed, and the expression of both AdipoR2 and adiponectin genes significantly declined ( $P = 0.073$ ).

**CONCLUSION:** The expression of adiponectin and AdipoR2 genes in the liver declines during the development of NASH, suggesting that they may be involved in the pathogenesis of NASH. Further study on adiponectin and AdipoR2 genes will deepen our understanding of the pathogenesis of NASH and may provide new treatments for this disease.

**Key Words:** Nonalcoholic steatohepatitis; Adiponectin; Adiponectin receptor 2; Liver

Qian XW, Fan ZP, Wang XH, Sheng L, Xi ZF, Qiu DK. Expression of adiponectin and its receptor 2 during the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1925-1930

## 摘要

**目的:** 观察蛋氨酸胆碱缺乏饮食(MCD)引起的大鼠NASH模型中, 各个时期肝脏中脂联素及其受体2的表达。

**方法:** 大鼠普通饲料喂养1 wk后随机分为对照组与NASH模型组, 分别给予MCD和胆碱补充饮食(CS)。均在第3、5、8、12周处死。肝脏切片作染色, 评估NASH模型效果。取肝脏抽提总RNA, 作RT-PCR测定脂联素及脂联素受体2的mRNA水平, 与标准化的 $\beta$ -actin条带作对比后测定其表达。

## ■背景资料

NASH是进展性疾病, 可以发展为肝硬化、肝功能衰竭和肝癌, 与全球的肥胖化趋势同步, NASH的发病率逐渐升高, 对于NASH机制和防治的研究成为近年来的热点。脂肪细胞因子在NASH发病机制中的作用是目前热点之一。

## ■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院消化内科



## ■研究前沿

对于NASH的发病机制,目前尚不完全清楚,脂肪细胞因子参与的二次打击学说目前还比较流行,对于炎症细胞因子脂联素及其受体的在NASH发病机制中的作用是目前较受关注的。

**结果:**随着时间的延长,对照组中,脂联素及其受体2的表达无明显变化(均 $P>0.05$ )。而NASH模型组中,在3、5、8 wk,脂联素和脂联素受体2的表达均逐渐下降,大多有极显著差异( $1.004\pm 0.08$  vs  $1.25\pm 0.09$ ,  $0.83\pm 0.06$  vs  $1.26\pm 0.07$ ,  $0.68\pm 0.10$  vs  $1.24\pm 0.08$ ;  $1.00\pm 0.06$  vs  $1.24\pm 0.07$ ,  $0.84\pm 0.07$  vs  $1.22\pm 0.09$ ,  $0.75\pm 0.09$  vs  $1.19\pm 0.05$ , all  $P<0.05$ );到12 wk发生肝脏纤维化,脂联素受体2表达较第8周显著减少,脂联素表达下降,较第8周水平呈现临界性差异( $P=0.073$ )。

**结论:**在NASH发生和发展过程中,肝脏中脂联素及其受体2表达下降,进一步研究可加深对NASH发病机制的了解,可能为治疗提供新的靶点。

**关键词:** 非酒精性脂肪性肝炎; 脂联素; 脂联素受体2; 肝脏

钱晓武, 范竹萍, 汪晓红, 盛黎, 奚志峰, 邱德凯. 脂联素及其受体2在非酒精性脂肪性肝炎发病过程中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1925-1930  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1925.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是包括肝脏单纯脂肪变性、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、脂肪性肝纤维化等一系列疾病总称<sup>[1-2]</sup>。NASH是进展性疾病<sup>[3-6]</sup>,其具体机制尚不完全清楚。NASH发病机制的“二重打击”理论认为胰岛素抵抗是第1次打击<sup>[7]</sup>,导致肝脏对多种损伤因素敏感;第2次打击如脂质过氧化、炎症、内毒素等损伤因子导致脂肪变的肝脏发生炎症、坏死和纤维化。很多学者均认为NASH实际上为代谢综合征的肝脏表现<sup>[8]</sup>,而胰岛素抵抗是其中心环节,因此胰岛素抵抗在NASH发病中起到重要的作用。

流行病学研究表明肥胖是NASH的独立危险因素<sup>[9-11]</sup>。肥胖现被认为是一种慢性炎症状态,多存在胰岛素抵抗。肥胖者存在脂肪尤其是腹部内脏脂肪的过度堆积,脂肪是活性内分泌器官,可以分泌多种脂肪细胞因子,而胰岛素抵抗常与脂肪细胞因子的分泌异常引起的继发性改变有关。这些细胞因子包括瘦素、脂联素、TNF- $\alpha$ 、IL-6等。脂肪细胞因子脂联素(adiponectin)是一种由244个氨基酸组成的蛋白质,与TNF- $\alpha$ 结构相似,在1995年首次报道<sup>[12]</sup>,具有胰岛素增敏作用。血清脂联素水平和BMI指数呈现负相关<sup>[13]</sup>,低脂联素血症为2型糖尿病<sup>[14]</sup>、高血压<sup>[15]</sup>、动脉粥

样硬化<sup>[16]</sup>、NASH<sup>[17]</sup>等的独立危险因素。有学者认为<sup>[17]</sup>,低脂联素血症应该是NASH的特征性标志。同时脂联素还具有很强的抗炎作用<sup>[18]</sup>。2003年,Yamauchi *et al*发现了脂联素受体(AdipoR)<sup>[20]</sup>。AdipoR1在体内广泛分布,但在骨骼肌中最丰富,AdipoR2主要在肝脏中表达<sup>[20]</sup>。现认为AdipoR为提高胰岛素敏感性的重要靶位<sup>[19-21]</sup>。本文对NASH发病过程中脂联素和AdipoR2在大鼠肝脏中的分泌趋势和表达进行研究,探讨其在NASH发病过程中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级SD大鼠52只,♂,体质量120-140 g,由中国科学院上海实验动物中心提供。大鼠饲养于仁济医院动物房,保持恒温于20℃-22℃,12 h光照和黑夜循环,水和食物均为随意摄取。TRIzol试剂: Invitrogen公司产品。M-MLV逆转录酶试剂盒: Promega公司产品。Rnase Inhibitor ToYoBo公司产品。Taq DNA Polymerase试剂盒: TaKaRa公司产品。随机引物Oligo-DT: 上海生工公司合成。PCR引物(P1, P2): 上海生工公司、赛百盛公司合成。异丙醇、氯仿均为分析纯,上海维峰化工有限公司产品。Marker赛百盛、天为时代公司产品。Goldview核酸染料: 北京赛百盛生物技术公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 大鼠普通饲料喂养1 wk后随机分为2组。第1组(对照组,  $n=20$ )喂养胆碱添加饮食(CS),分别在第3、5、8、12周随机选择5只处死。第2组(NASH模型组,  $n=32$ )用蛋氨酸胆碱缺乏饮食(MCD)喂养的NASH模型组,分别在第3、5、8、12周随机选择8只处死。MCD及CS自行配制。

**1.2.2 一般情况观察:** 大鼠编号后每周称1次体质量,每2 wk连续3 d称进食质量。处死前称体质量,观察食欲行为、状态、毛发。处死前大鼠隔夜禁食,第2天称体质量,麻醉后固定,腹部皮肤消毒后切开,推开内脏后从下腔静脉取血,迅速切下肝脏,称湿质量。肝脏迅速置于液氮中冻存。

**1.2.3 NAFLD活动度积分评估:** NASH的病理诊断标准采用亚太地区非酒精性脂肪性肝病诊断与治疗共识所推荐的美国国立卫生研究院NASH临床研究网络病理委员会2005年所定指南<sup>[22]</sup>,根据其制定的NAFLD活动度积分(NAFLD activity score, NAS)进行评估。

**1.2.4 RT-PCR抽提:** 称取冻干肝脏组织100 mg加TRIzol液后,按照顺序加入氯仿和异丙醇抽提总RNA。随机引物Oligo-DT 1  $\mu$ L和总RNA 2  $\mu$ g

表 1 基因的引物序列和反应条件

目的基因	引物序列	编号	大小(bp)	反应条件
Actin	CCCATCTATGAGGGTTACGCG CTGGAAGGTGGACAGTGAGGC	BC063166	510	94℃(5 min)–94℃(30 s)– 62℃(30 s)–72℃(30 s)– 72℃(10 min) 32循环
脂联素	AGGATCCATGCTACTGTTGCAAGCGCTC GAAGCTTGTTGGTATCATGGTAGAGAAGG	NM_144744	750	94℃(5 min)–94℃(45 s)– 55℃(45 s)–68℃(45 s)– 68℃(7 min) 35循环
AdipoR2	ACAACCACCACGGAGATTT AGAACAACCCGAAGACCAC	DQ148392	456	94℃(5 min)–94℃(45 s)– 61℃(45 s)–72℃(45 s)– 72℃(10 min) 35循环

进行RT反应, 扩增cDNA. 比色后取cDNA 1  $\mu$ g加引物后作PCR反应扩增, 扩增后的mRNA在含goldview显色剂的20 g/L的琼脂糖胶上作电泳. 在FR-200紫外与可见分析装置上拍照, 以SmartView 2000生物电泳图像分析软件(上海复日科技有限公司产品)获取图像, 使用Image J图像分析软件对条带密度进行定量分析, 对条带密度进行定量分析. 与标准化的 $\beta$ -actin条带定量值作对比后测定其表达. 引物具体见表1.

**统计学处理** 计数资料用mean $\pm$ SD表示, 两组之间的比较用独立t检验, 多组之间比较用单因素方差分析, 统计学显著性用双侧检验 $P<0.05$ 检测. 使用SPSS11.5软件包进行统计学分析.

## 2 结果

**2.1 一般情况** 各组大鼠均无死亡, 食欲、习性、毛发均无差异.

**2.2 肝脏的病理学改变** 对照组大鼠肝脏外观和组织学无异常表现. NASH模型组大鼠随着时间发展逐渐出现脂肪浸润, 并逐渐出现脂肪性肝炎的表现, 到第12周有纤维化表现. NASH模型组根据NAS评分标准, 符合NASH的诊断标准.

**2.3 脂联素、AdipoR2的表达** 在对照组大鼠中, 随着时间的延长, 脂联素、AdipoR2的表达无明显变化( $P>0.05$ ). 而在NASH组大鼠中, 可以发现随着时间的延长, 肝脏炎症逐渐加重, 肝脏脂联素和AdipoR2 mRNA表达逐渐减少(图1). 3、5、8 wk脂联素和AdipoR2的表达均逐渐显著下降, 大多有极显著差异( $P<0.01$ ); 到12 wk发生肝脏纤维化, AdipoR2表达较第8周显著减少( $P<0.01$ ), 脂联素表达下降与第8周水平呈现临界性差异( $P=0.073$ , 表2, 图2). 表达的趋势见图1, 在NASH组中随着炎症和纤维化的发展, 脂联素和AdipoR2呈现逐渐下降趋势.

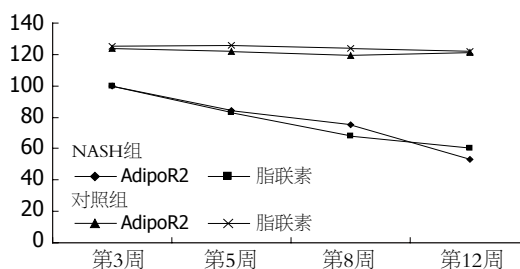


图 1 脂联素及其受体2 mRNA表达趋势图.

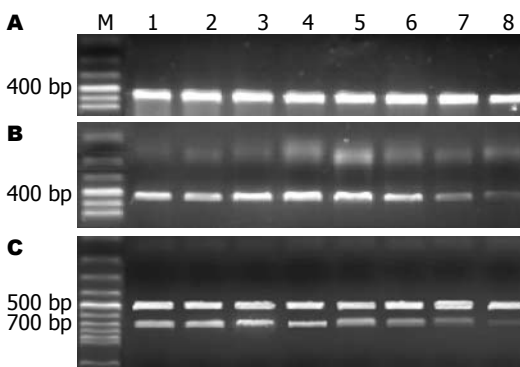


图 2 基因表达灰度图. A: actin; B: AdipoR2; C: 脂联素; 1–4: 对照组; 5–8: NASH组; 2组分别在第3、5、8、12周处死.

## 3 讨论

脂肪细胞因子脂联素主要来源于脂肪细胞<sup>[25]</sup>, 后发现骨髓<sup>[26]</sup>、胎儿组织<sup>[27]</sup>、心肌细胞<sup>[28]</sup>和肝脏内皮细胞<sup>[29-30]</sup>也能分泌脂联素. 脂联素在血清中浓度很高(3-30 mg/L), 占总血清蛋白浓度的0.01%, 可以通过激活协调代谢和能量平衡的腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)来促进 $\beta$ 氧化并通过减少循环脂肪酸和肝脏肌肉中甘油三酯水平等几个方面来直接增加胰岛素敏感性<sup>[25]</sup>. 脂联素基因敲除小鼠表现出胰岛素抵抗和糖尿病也证实了脂联素的胰岛素增敏作用. 由于脂联素和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ),

### ■ 相关报道

有研究发现, 在CCl<sub>4</sub>诱导的肝脏纤维化小鼠中, 在肝细胞外基质存在大量的脂联素积聚和黏附, 这提示脂联素拮抗TNF- $\alpha$ 抗炎作用同时, 可能直接作为一种抗炎因子参与由CCl<sub>4</sub>引起肝脏损伤的修复过程, 具有直接抗炎作用.

# ■创新盘点

本文对NASH发病过程中脂联素和AdipoR2在大鼠肝脏中的分泌趋势和表达进行研究,发现在MCD饮食的NASH模型中,肝脏中脂联素和AdipoR2的表达下降,随着他们表达的减少,肝脏的炎症和纤维化进一步加重,提示AdipoR2可能存在直接的肝脏保护作用。

表 2 目的基因mRNA表达 (mean ± SD, 灰度值)

	对照组		NASH模型组	
	脂联素	AdipoR2	脂联素	AdipoR2
第3周	1.25 ± 0.09	1.24 ± 0.07	1.004 ± 0.08	1.00 ± 0.06
第5周	1.26 ± 0.07	1.22 ± 0.09	0.83 ± 0.06	0.84 ± 0.07 <sup>a</sup>
第8周	1.24 ± 0.08	1.19 ± 0.05	0.68 ± 0.10	0.75 ± 0.09 <sup>a</sup>
第12周	1.22 ± 0.08	1.21 ± 0.06	0.60 ± 0.12	0.53 ± 0.11

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组同指标。

TNF- $\alpha$ )结构相似,体内外的实验均表明TNF- $\alpha$ 和脂联素能相互抑制对方的产生并在对方的靶组织内拮抗对方的作用,因此脂联素通过拮抗TNF- $\alpha$ 对胰岛素通路信号传导途径的干扰,增加胰岛素敏感性,同时还可以拮抗TNF- $\alpha$ 诱导的核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)途径<sup>[31]</sup>,起到抗炎作用,从两个方面减轻/阻断对肝脏的打击。近来,有研究提示脂联素在大脑中也能发挥作用,增加能量的消耗,使体质量下降<sup>[46]</sup>,减轻NASH的发生和发展。

我们主要观察在NASH发病过程中,肝脏中脂联素的表达。在本实验中可以发现,CS饮食大鼠的肝脏无脂肪浸润和炎症发生<sup>[23]</sup>,脂联素和AdipoR2的表达随时间延长无显著改变。而在MCD饮食组中,随着时间的延长,肝脏的脂肪浸润越来越明显,并逐渐出现肝细胞气球样变和嗜酸小体等,逐渐形成了NASH,纤维化亦逐渐加重。而在此过程中,肝脏内的脂联素和AdipoR2的表达也逐渐减少。肝脏脂联素减少和既往报道的血中脂联素的表达逐渐减少是相似的。

肝脏中脂联素主要由肝内皮细胞分泌<sup>[29]</sup>,脂肪细胞分泌的脂肪细胞因子包括脂联素亦可少量通过门静脉进入肝脏发挥作用。肝内皮细胞层呈筛孔状结构(即肝筛),在调节肝窦血流与周围组织的物质交换中起中枢性的作用,同时还有清除变性大分子脂质、向T淋巴细胞递呈抗原的功能,并在维持肝细胞的代谢及氧供中起着重要作用。因此在肝脏的脂肪变和炎症过程中,由于损伤因子导致了肝内皮细胞功能的下降,导致了其在维持代谢、清除脂质、分泌脂联素等的功能下降,之前有研究表明肝内皮细胞损伤可导致脂肪肝、肝纤维化和肝硬化。脂联素作为重要的抗炎介质,受到肝内皮细胞损伤影响,分泌减少,进一步加重了肝脏损伤,形成了恶性循环。提示肝内皮细胞在NASH的发展过程中起重要作用。因此进一步探

讨肝内皮细胞和脂联素在NASH发病过程中的具体机制应该是值得关注的。

有研究发现,在CCl<sub>4</sub>诱导的肝脏纤维化小鼠中,在肝细胞外基质存在大量的脂联素积聚和黏附,这提示脂联素拮抗TNF- $\alpha$ 抗炎作用同时,可能直接作为一种抗炎因子参与由CCl<sub>4</sub>引起肝脏损伤的修复过程<sup>[32]</sup>,具有直接抗炎作用。NASH患者中常常存在小肠细菌的过度生长<sup>[33]</sup>,可产生内毒素,作为细菌内毒素主要成分的脂多糖参与NASH的发病<sup>[34-35]</sup>;最近发现在由脂多糖诱导的急性肝炎小鼠模型中,脂联素可以通过诱导Kupffer细胞中的抗炎细胞因子IL-10的表达来抑制脂多糖的作用而减轻肝脏损伤<sup>[36]</sup>。近来还有研究通过测定尿中8-异前列腺素F-2 $\alpha$ 这一反应氧应激(ROS)的指标,发现当发生低脂联素血症时,系统氧应激显著升高,表明脂联素可以抑制氧应激<sup>[37-38]</sup>。

以上证据均表明脂联素可以减轻包括促炎症细胞因子、炎症内毒素、氧应激等多种可导致肝脏损伤的第2次打击作用因子,我们的实验表明,肝脏中脂联素表达与外周血中存在的低脂联素血症可能是相互平行的,而肝脏中的脂联素减少可能在NASH发病过程中起到更重要的作用。

我们的实验同时提示肝脏在向纤维化发展过程中肝内脂联素表达也显著减少。关于脂联素在肝脏纤维化发展中的作用,有研究表明脂联素可以减轻由CCl<sub>4</sub>诱导的肝脏纤维化<sup>[32]</sup>,现又发现脂联素通过抑制肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)中转录因子Smad2的核内迁移来抑制其增殖和活化<sup>[39]</sup>,同时可以诱导活化HSCs的凋亡,由于肝星状细胞在肝脏纤维化中起核心作用,加上脂联素还可以减弱由于转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)对于纤维生成基因的作用<sup>[39]</sup>。因此提示脂联素在肝脏纤维化时,有很强的减轻肝脏纤维化作用。有

临床研究表明, 肝脏纤维化分级和低脂联素血症有密切相关<sup>[40]</sup>. 也表明脂联素在NASH的进一步发展为肝纤维化时起到保护作用. 流行病学研究表明肝硬化在肥胖人群中的发病率是一般人群中的发病率的6倍, 而且肥胖伴低脂联素血症是包括NASH、酒精性肝病、慢性丙型肝炎等慢性肝病患者发生肝纤维化的独立危险因素<sup>[10-11]</sup>. 因此人群中脂联素的下降应该在肝脏纤维化和肝硬化的发病过程中起到重要作用. 我们的研究表明不仅在血液中, 在肝脏中同样随着纤维化的发展, 脂联素表达也是显著下降的, 提示其保护作用逐渐减弱.

关于脂联素受体, 现认为脂联素对脂肪细胞的反馈调节作用至少有部分是通过AdipoR来进行的<sup>[21]</sup>, 我们选择了主要在肝脏中表达的AdipoR2进行研究. 有研究表明在肝细胞和肌细胞中, 胰岛素可以通过磷脂酰肌醇3-激酶/叉头(PI3K/FOXO)依赖途径减少AdipoR2的表达<sup>[24,41]</sup>, 因此当发生胰岛素抵抗时, 过多的胰岛素可导致AdipoR2的减少, 这导致了其介导的脂联素作用的下降. 本实验发现随着NASH的发展, 肝脏中AdipoR2的表达和脂联素一样也是逐渐下降的, 在进一步向肝脏纤维化发展时, AdipoR2的表达同样也是逐渐下降的, 这可能与NASH发病过程中逐渐加重的全身和/或局部胰岛素抵抗有关. 有研究显示<sup>[10]</sup>脂联素主要位于人肝脏门静脉和肝窦的内皮细胞, 而AdipoR2则主要位于肝细胞胞质内, 脂联素和AdipoR2的分布位置的不同, 提示有可能存在旁分泌途径来起作用. 当发生NASH时, 此种途径可能遭到了破坏, 阻断了脂联素的作用而导致NASH的发展. 分布位置的不同, 也可以推断AdipoR2在介导脂联素的作用时候, 可能也存在着直接的肝脏保护作用. 我们的研究证实以上的推论. 但是具体的机制尚需进一步研究.

在本实验中, 我们发现在MCD饮食的NASH模型中, 脂联素和AdipoR2的表达是下降的, 随着他们表达的减少, 肝脏的炎症和纤维化进一步加重, 提示AdipoR2可能存在直接的肝脏保护作用. 对于脂联素和AdipoR2的进一步研究可以进一步加深对于NASH发病机制的了解, 可能为治疗提供新的靶点.

#### 4 参考文献

- 1 Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219
- 2 Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol*

- Hepatol* 2002; 17: 1136-1143
- 3 Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438
- 4 Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419
- 5 Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705-1725
- 6 McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 255-262
- 7 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 8 Varela-Rey M, Embade N, Ariz U, Lu SC, Mato JM, Martínez-Chantar ML. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 969-976
- 9 Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163
- 10 Yalniz M, Bahcecioglu IH, Ataseven H, Ustundag B, Ilhan F, Poyrazoglu OK, Erensoy A. Serum adipokine and ghrelin levels in nonalcoholic steatohepatitis. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 34295
- 11 Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36: 403-409
- 12 Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 26746-26749
- 13 Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79-83
- 14 Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1595-1599
- 15 Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Kobayashi H, Hiraoka H, Komai N, Kaibe M, Rakugi H, Ogihara T, Matsuzawa Y. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 2003; 42: 231-234
- 16 Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100: 2473-2476
- 17 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A,

#### ■同行评价

本研究选题新颖, 设计合理, 结果可靠, 具有一定的研究价值.



- George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54
- 18 Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996; 271: 10697-10703
- 19 Civitarese AE, Jenkinson CP, Richardson D, Bajaj M, Cusi K, Kashyap S, Berria R, Belfort R, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Ravussin E. Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004; 47: 816-820
- 20 Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769
- 21 English PJ, Coughlin SR, Hayden K, Malik IA, Wilding JP. Plasma adiponectin increases postprandially in obese, but not in lean, subjects. *Obes Res* 2003; 11: 839-844
- 22 Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-1321
- 23 钱晓武, 范竹萍, 汪晓红, 盛黎, 奚志峰, 邱德凯. 建立改良蛋氨酸胆碱缺乏饮食喂养的非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2983-2989
- 24 Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; 279: 30817-30822
- 25 Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 286-289
- 26 Yokota T, Meka CS, Medina KL, Igarashi H, Comp PC, Takahashi M, Nishida M, Oritani K, Miyagawa J, Funahashi T, Tomiyama Y, Matsuzawa Y, Kincade PW. Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. *J Clin Invest* 2002; 109: 1303-1310
- 27 Corbetta S, Bulfamante G, Cortelazzi D, Barresi V, Cetin I, Mantovani G, Bondioni S, Beck-Peccoz P, Spada A. Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2397-2402
- 28 Piñero R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* 2005; 579: 5163-5169
- 29 Wolf AM, Wolf D, Avila MA, Moschen AR, Berasain C, Enrich B, Rumpold H, Tilg H. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J Hepatol* 2006; 44: 537-543
- 30 Jonsson JR, Moschen AR, Hickman IJ, Richardson MM, Kaser S, Clouston AD, Powell EE, Tilg H. Adiponectin and its receptors in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005; 43: 929-936
- 31 Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000; 102: 1296-1301
- 32 Yoda-Murakami M, Taniguchi M, Takahashi K, Kawamata S, Saito K, Choi-Miura NH, Tomita M. Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 372-377
- 33 Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 206-211
- 34 Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
- 35 Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2557-2562
- 36 Matsumoto H, Tamura S, Kamada Y, Kiso S, Fukushima J, Wada A, Maeda N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Shimomura I, Hayashi N. Adiponectin deficiency exacerbates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3352-3358
- 37 Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 264-271
- 38 Neumeier M, Weigert J, Schäffler A, Weiss TS, Schmidl C, Büttner R, Bollheimer C, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C. Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 731-735
- 39 Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005; 166: 1655-1669
- 40 Musso G, Gambino R, Biroli G, Carello M, Fagà E, Pacini G, De Micheli F, Cassader M, Durazzo M, Rizzetto M, Pagano G. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2438-2446
- 41 Shimizu A, Takamura T, Matsuzawa N, Nakamura S, Nabemoto S, Takeshita Y, Misu H, Kurita S, Sakurai M, Yokoyama M, Zen Y, Sasaki M, Nakanuma Y, Kaneko S. Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line. *Metabolism* 2007; 56: 1478-1485

# PTD-NBD多肽对大鼠胰腺腺泡细胞炎症反应的抑制作用

刘学进, 龙友明, 陈 垦, 谢文瑞, 王 晖

刘学进, 河南省周口市中心医院消化内科 河南省周口市 466000

龙友明, 陈 垦, 谢文瑞, 广东药学院临床学院 广东省广州市 510080

王晖, 广东药学院中药学院 广东省广州市 510080

刘学进, 硕士, 主要从事急性胰腺炎发病机制及其治疗的基础和临床研究。

广东省自然科学基金资助项目, No. 04009624

广东省卫生厅课题基金资助项目, No. A2007304

作者贡献分布: 刘学进、龙友明及陈垦对此文所作贡献均等; 本课题由陈垦与龙友明设计; 研究过程由刘学进与龙友明操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由谢文瑞与王晖提供; 数据分析由刘学进完成; 本论文写作由刘学进与龙友明完成。

通讯作者: 陈 垦, 教授, 510080, 广东省广州市, 广东药学院临床学院. chenkenck@126.com

电话: 020-34055856

收稿日期: 2009-03-30 修回日期: 2009-06-18

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-08

## Inhibitory effects of cell-permeable PTD-NBD peptide on lipopolysaccharide-induced inflammation of pancreatic acinar cell line AR42J

Xue-Jin Liu, You-Ming Long, Ken Chen, Wen-Rui Xie, Hui Wang

Xue-Jin Liu, Department of Gastroenterology, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou 46600, Henan Province, China  
You-Ming Long, Ken Chen, Wen-Rui Xie, the Clinical College of Guangdong Pharmacological University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Hui Wang, the Chinese Medicine College of Guangdong Pharmacological University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 04009624; and the Research Foundation of Guangdong Public Health Department, No. A2007304

Correspondence to: Professor Ken Chen, the Clinical College of Guangdong Pharmacological University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. chenkenck@126.com

Received: 2009-03-30 Revised: 2009-06-18

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To explore the effects of cell permeable PTD-NBD peptide on rat pancreatic acinus AR42J cell induced by lipopolysaccharide.

**METHODS:** AR42J cell lines were stimulated by lipopolysaccharide with a dose of 10 mg/L for 24 h. The wild type PTD-NBD peptide was incubated with AR42J cells with different concentrations

( $10^{-1}$ - $10^2$  mg/L) before the inflammation induced by lipopolysaccharide. At the same time, the mutant type PTD-NBD peptide, PTD and NBD peptide were used as control peptide fragments. The expressions of ICAM-1 and IL-1 $\beta$  mRNA were detected using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and IL-1 $\beta$  protein was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** The PTD-NBD (WT) peptide inhibited the expression of ICAM-1 and IL-1 $\beta$  mRNA ( $0.449 \pm 0.088$ ,  $0.526 \pm 0.077$ ), but also decreased the IL-1 $\beta$  protein level ( $278.82 \pm 61.80$  ng/L) in a dose-dependent manner. NBD ( $1.132 \pm 0.069$ ), PTD-NBD (MT) ( $1.158 \pm 0.095$ ) and PTD ( $1.206 \pm 0.078$ ) did not inhibit the expression of ICAM-1 mRNA. NBD ( $0.993 \pm 0.065$ ), PTD-NBD (MT) ( $1.143 \pm 0.086$ ) and PTD ( $1.128 \pm 0.117$ ) did not inhibit the expression of IL-1 $\beta$  mRNA. NBD ( $898.08 \pm 74.65$  ng/L), PTD-NBD (MT) ( $945.25 \pm 42.49$  ng/L) and PTD ( $947.86 \pm 38.66$  ng/L) failed to inhibit the expression of IL-1 $\beta$  protein.

**CONCLUSION:** The wild type PTD-NBD peptide is able to inhibit the expression of ICAM-1 and IL-1 $\beta$  induced by LPS on AR42J cell lines in a dose-dependent manner. We confirmed PTD-NBD peptide can take effect on acinus cell directly. The result showed the early event and new therapeutic pathway of acute pancreatitis.

**Key Words:** Acute pancreatitis; Lipopolysaccharide; Cytokine; Acinus cell; Peptide

Liu XJ, Long YM, Chen K, Xie WR, Wang H. Inhibitory effects of cell-permeable PTD-NBD peptide on lipopolysaccharide-induced inflammation of pancreatic acinar cell line AR42J. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1931-1935

## 摘要

**目的:** 探讨透细胞性PTD-NBD多肽对脂多糖诱导的炎症效应的干预与作用机制。

**方法:** 以脂多糖刺激大鼠胰腺腺泡细胞AR42J, 构建急性胰腺炎的体外模型。不同浓度免疫缺

## ■背景资料

目前普遍认为LPS是单核巨噬细胞的强烈激活剂, 诱导促炎细胞因子如IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8和ICAM-1等的分泌。已有多项研究表明小剂量LPS可以诱导腺泡细胞凋亡增加, 减轻AP的病理过程, 而大剂量LPS可引起腺泡细胞水肿, 出现膜连接性空泡及胞质膜的断裂, 腺细胞和溶酶体的破坏。但LPS对胰腺腺泡细胞因子表达的影响国内外学者研究较少。

## ■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

## ■研发前沿

一种具有“TTLDWSWLQME”氨基酸序列的小分子肽能阻断NF- $\kappa$ B活化通路上游激酶复合物中的调节亚基(NEMO)的N末端 $\alpha$ 螺旋区。目前被应用于鼠的AP模型及关节炎动物模型治疗,具有良好的抗炎效应。该结构的小分子肽能否直接影响胰腺腺泡细胞炎性反应目前尚不清楚。

陷性病毒PTD多肽蛋白转导功能区与野生型NBD多肽融合成PTD-NBD多肽,对AR42J细胞进行预处理,突变型PTD-NBD(MT)多肽、PTD、NBD为对照。RT-PCR法观察ICAM-1及IL-1 $\beta$  mRNA的表达;定量酶联免疫吸附法检测培养液上清中IL-1 $\beta$ 蛋白浓度的改变。

**结果:**透细胞性PTD-NBD多肽可以抑制脂多糖诱导的AR42J炎症细胞因子ICAM-1和IL-1 $\beta$  mRNA及蛋白的表达,且呈剂量依赖方式。PTD-NBD(WT)多肽与单纯NBD多肽、突变型PTD-NBD(MT)多肽及PTD组比较(相对灰度值:  $0.449 \pm 0.088$  vs  $1.132 \pm 0.069$ ,  $1.158 \pm 0.095$ ,  $1.206 \pm 0.078$ ),能够抑制ICAM-1 mRNA表达。上述4组的IL-1 $\beta$  mRNA相对灰度值分别为 $0.526 \pm 0.077$ ,  $0.993 \pm 0.065$ ,  $1.143 \pm 0.086$ 和 $1.128 \pm 0.117$ , IL-1 $\beta$ 蛋白表达分别为 $278.82 \pm 61.80$  ng/L、 $898.08 \pm 74.65$  ng/L、 $945.25 \pm 42.49$  ng/L和 $947.86 \pm 38.66$  ng/L,结果显示后3组不能抑制IL-1 $\beta$  mRNA及其蛋白的表达。

**结论:**PTD-NBD(WT)多肽可以呈剂量依赖方式抑制LPS诱导的AR42J促炎细胞因子IL-1 $\beta$ 和ICAM-1的表达,其可直接影响胰腺腺泡细胞炎性反应。

**关键词:**急性胰腺炎;脂多糖;细胞因子;腺泡细胞;多肽

刘学进, 龙友明, 陈垦, 谢文瑞, 王晖. PTD-NBD多肽对大鼠胰腺腺泡细胞炎性反应的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1931-1935

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1931.asp>

## 0 引言

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)已证实参与了急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的病理生理过程, LPS可以结合在单核细胞CD14受体上,从而激活单核巨噬细胞释放多种炎症介质,同时还可以通过直接影响胰腺腺泡细胞而发挥作用,包括空泡的形成、核改变以及胰腺炎相关蛋白mRNA、细胞因子如白介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)等和淀粉酶mRNA表达而发挥作用,可促使多器官功能不全综合征和系统性炎症反应综合征的发生<sup>[1-2]</sup>。我们的实验证实, LPS刺激大鼠胰腺腺泡细胞(AR42J细胞)后,不仅通过核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)活化介导上

调ICAM-1促炎基因的表达,而且ICAM-1促炎因子的表达反过来又以一种正反馈调节的方式激活NF- $\kappa$ B,促进细胞因子的进一步释放,使炎症信号和细胞因子反应得以放大和持续<sup>[3]</sup>。一种具有“TTLDWSWLQME”氨基酸序列的小分子肽能阻断NF- $\kappa$ B活化通路上游激酶复合物中的调节亚基(NF- $\kappa$ B essential modulator, NEMO)的N末端 $\alpha$ 螺旋区<sup>[4]</sup>。目前被应用于鼠的AP模型及关节炎动物模型治疗,具有良好的抗炎效应<sup>[5-6]</sup>。该结构的小分子肽能否直接影响胰腺腺泡细胞炎性反应目前尚不清楚。本实验利用人工合成的上述透细胞膜性小分子多肽预处理AR42J细胞,观察其对LPS诱导的细胞因子炎性反应的影响,为AP的治疗与研究提供新的途径。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胰腺腺泡AR42J细胞株(ATCC Number: CRL-1492)由武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)从美国典型培养物保藏中心(ATCC)引进。大鼠IL-1 $\beta$  ELISA定量试剂盒,广州晶美生物公司; F12培养基, Gibco USA; 胎牛血清, 杭州四季青; 琼脂糖, Promega USA; LPS, Sigma USA; 胰蛋白酶, 广州威佳科技有限公司; DNA Marker, 北京华美生物工程公司; RNase抑制剂, Promega USA; PCR引物, 上海博亚生物技术有限公司; TRIzol<sup>TM</sup> Reagent, 美国Invitrogen公司; EX Taq酶, 日本TaKaRa公司; M-MLV逆转录酶, Promega USA; NBD多肽, 西安美联生物有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:**用含200 mL/L灭活胎牛血清F12培养基(pH7.2-7.4),于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养,3-4 d换液1次,用2.5 g/L胰蛋白酶(trypsin)和0.03% EDTA消化,1:3-1:4传代。本实验使用第20-26代对数生长期细胞,以 $1-2 \times 10^6$ 细胞/孔(1.8 mL)接种于6孔培养板,在50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中37℃孵育12 h,细胞贴壁后,分别加入0.2 mL的无血清无双抗的培养基F12及100 mg/L浓度(终浓度10 mg/L)的LPS溶液,孵育24 h后,分别收集细胞和培养液上清备用。每组设3个平行孔。

**1.2.2 多肽设计及合成:**具有细胞穿透性的小分子NBD多肽序列根据参考文献[4]设计。其为蛋白转导多肽PTD与NBD多肽的融合性多肽,简称为PTD-NBD多肽,委托西安美联生物公司合成。其序列为: YGRKKRRQRRR-G-TTLDWSWLQME,由于此连接的NBD肽和野生

## ■相关报道

May *et al*设计了一种跨越NBD全长的可通过细胞膜的多肽(称为小分子NBD多肽),发现在Hela细胞中这种小分子多肽可抑制TNF- $\alpha$ 诱导的IKK活性,抑制NF- $\kappa$ B的核易位和DNA结合活性,下调依赖NF- $\kappa$ B的炎症细胞因子mRNA转录,而且, NBD多肽可以轻度上调NF- $\kappa$ B的基础生理功能。

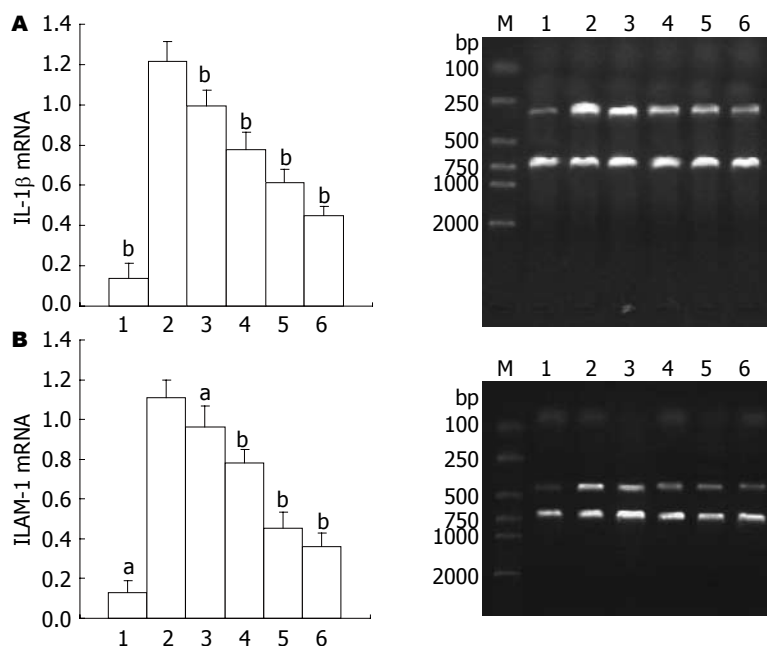


图 1 各组AR42J细胞IL-1 $\beta$ 及ICAM-1 mRNA的表达. A: IL-1 $\beta$ ; B: ICAM-1; 1: 对照组; 2: LPS; 3: 0.1 mg/L PTD-NBD(WT); 4: 1 mg/L PTD-NBD(WT); 5: 10 mg/L PTD-NBD(WT); 6: 100 mg/L PTD-NBD(WT); M: Marker. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs LPS组.

#### ■创新盘点

本研究通过合成野生型NBD多肽和具有透膜作用的PTD多肽融合, 可以抑制NF- $\kappa$ B的抑制物的激酶活化, 继而抑制NF- $\kappa$ B的活化, 导致细胞因子的下调, 可直接影响胰腺腺泡细胞炎症反应, 为AP的早期细胞事件及其治疗研究提供理论依据.

型(WT)NBD序列一致, 简称为PTD-NBD(WT). 为分析NBD多肽和NEMO结合的特异性我们设计一条突变型(MT)的PTD-NBD(MT), 其序列为: YGRKKRRQRRR-G-TTLDASALQME融合性多肽. 为了分析PTD对多肽的细胞导入作用, 另外单独合成了PTD和NBD多肽. 使用前用无血清无双抗的培养基分别配制0.1、1、10、100 mg/L不同浓度的多肽溶液.

**1.2.3 RNA的抽提及RT-PCR:** 总RNA的提取参照Invitrogen公司的TRIzol试剂说明书进行. 引物的设计与合成: 按照文献公布的GenBank上大鼠 $\beta$ -Actin(Gi: 42475962)、ICAM-1(Gi: 220778)和IL-1 $\beta$ (Gi: 13928691)cDNA序列, 借助于Primer Premier 5.0生物软件设计他们各自特异的引物, 委托上海博亚生物技术有限公司合成. 内参照 $\beta$ -actin扩增片段长度701 bp, 正义为: 5'-gccaacgtgaaagatga-3', 反义为: 5'-gccaggatagaccacaaat-3'. ICAM-1扩增片段长度433 bp, 正义为: 5'-aacgacgcttctttgtctc-3', 反义为: 5'-ctctggcggtaataggtgtaa-3'. IL-1 $\beta$ 扩增片段长度307 bp, 正义为: 5'-ggatgatgacgacctgctagtgt-3', 反义为: 5'-cttcttgggPTDgtttggga-3'. RT-PCR采用二步法. Gel 100凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司)紫外灯下观察电泳结果和摄影, 并用其自带的Quantity 4.5.1软件进行吸光度分析, 分别计算出ICAM-1、IL-1 $\beta$ 与 $\beta$ -actin(内参照)的吸光度积分值比作为ICAM-1、IL-1 $\beta$ 表达的相对表达量.

**1.2.4 定量ELISA法测定培养液上清细胞因子的浓度:** 按照晶美生物公司ELISA试剂盒说明书进行.

表 1 各组AR42J细胞IL-1 $\beta$ 及ICAM-1 mRNA和IL-1 $\beta$ 蛋白表达( $n = 3$ , mean  $\pm$  SD)

分组	IL-1 $\beta$		ICAM-1 mRNA
	mRNA	蛋白(ng/L)	
对照组	0.141 $\pm$ 0.072 <sup>b</sup>	69.62 $\pm$ 28.76 <sup>b</sup>	0.132 $\pm$ 0.059 <sup>b</sup>
LPS	1.217 $\pm$ 0.981	1205.30 $\pm$ 72.63	1.112 $\pm$ 0.085
PTD-NBD(mg/L)			
0.1	0.995 $\pm$ 0.076 <sup>a</sup>	864.07 $\pm$ 62.15 <sup>a</sup>	0.964 $\pm$ 0.102 <sup>a</sup>
1	0.778 $\pm$ 0.085 <sup>a</sup>	649.19 $\pm$ 56.61 <sup>a</sup>	0.780 $\pm$ 0.069 <sup>a</sup>
10	0.615 $\pm$ 0.064 <sup>a</sup>	474.13 $\pm$ 35.36 <sup>a</sup>	0.456 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>
100	0.451 $\pm$ 0.043 <sup>a</sup>	298.16 $\pm$ 31.09 <sup>a</sup>	0.361 $\pm$ 0.069 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs LPS组.

**统计学处理** 计量资料用mean  $\pm$  SD表示, SPSS11.0统计软件进行方差分析, 预先进行正态性检验和方差齐性检验.  $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 多肽对AR42J细胞的IL-1 $\beta$ mRNA的影响

**2.1.1 PTD-NBD(WT)多肽对AR42J细胞IL-1 $\beta$  mRNA表达的影响:** RT-PCR检测结果表明(表1, 图1), AR42J细胞可表达少量IL-1 $\beta$  mRNA, 10 mg/L的LPS刺激24 h后IL-1 $\beta$  mRNA表达上调( $P < 0.01$ ). 0.1 mg/L的PTD-NBD(WT)多肽预处量2 h即可以抑制LPS诱导的IL-1 $\beta$  mRNA表达( $P < 0.05$ ), 且以剂量依赖方式地抑制IL-1 $\beta$  mRNA的表达, 在100 mg/L浓度时达到高峰. 我们进一步分别用10 mg/L的PTD-NBD(WT)、NBD、PTD-NBD(MT)或PTD肽孵育AR42J细



# 应用要点

PTD-NBD(WT)多肽可以呈剂量依赖方式地抑制LPS诱导的AR42J促炎细胞因子IL-1 $\beta$ 和ICAM-1的表达, 因而其可直接影响胰腺腺泡细胞炎症反应, 为AP的早期细胞事件及的治疗研究提供理论依据.

表 2 PTD-NBD(WT)多肽与各对照肽段对AR42J细胞IL-1 $\beta$ 及ICAM-1 mRNA和IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响 ( $n=3$ , mean  $\pm$  SD)

分组	IL-1 $\beta$ mRNA	IL-1 $\beta$ (ng/L)	ICAM-1 mRNA
对照组	0.146 $\pm$ 0.080 <sup>a</sup>	73.12 $\pm$ 38.77 <sup>a</sup>	0.123 $\pm$ 0.056 <sup>a</sup>
LPS	1.156 $\pm$ 0.085	943.61 $\pm$ 71.33	1.230 $\pm$ 0.094
PTD-NBD(WT)	0.526 $\pm$ 0.077 <sup>b</sup>	278.82 $\pm$ 61.80 <sup>b</sup>	0.449 $\pm$ 0.088 <sup>b</sup>
NBD	0.993 $\pm$ 0.065	898.08 $\pm$ 74.65	1.132 $\pm$ 0.069
PTD-NBD(MT)	1.143 $\pm$ 0.086	945.25 $\pm$ 42.49	1.158 $\pm$ 0.095
PTD	1.128 $\pm$ 0.117	947.86 $\pm$ 38.66	1.206 $\pm$ 0.078

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs LPS组.

胞2 h后, 再用10 mg/L LPS刺激24 h, 观察肽段的作用特异性. 结果表明(表2), NBD、PTD-NBD(MT)或PTD肽都不能抑制LPS诱导的IL-1 $\beta$  mRNA的表达.

2.1.2 PTD-NBD(WT)多肽对AR42J细胞IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响: 不同浓度PTD-NBD(WT)多肽孵育AR42J细胞2 h后, 再用10 mg/L刺激24 h, 其变化ELISA检测结果表明(表1), AR42J细胞表达IL-1 $\beta$ 蛋白, LPS可刺激IL-1 $\beta$ 蛋白的上调( $P<0.01$ ), 0.1 mg/L以上的PTD-NBD(WT)多肽以剂量依赖方式抑制LPS诱导的IL-1 $\beta$ 蛋白的合成, 并在100 mg/L浓度时达到高峰( $P<0.01$ ). 特异性实验: 分别用10 mg/L的PTD-NBD(WT)、NBD、PTD-NBD(MT)或PTD肽孵育AR42J胞2 h后, 再用10 mg/L LPS刺激24 h, 培养液上清中IL-1 $\beta$ 蛋白的变化结果表明NBD多肽、PTD-NBD(MT)或PTD肽都不能抑制LPS刺激IL-1 $\beta$ 蛋白的合成(表2).

2.2 多肽对AR42J细胞的ICAM-1 mRNA表达的影响

2.2.1 不同浓度PTD-NBD(WT)多肽对AR42J细胞ICAM-1 mRNA表达的影响: RT-PCR检测结果表明(表1, 图1), AR42J细胞表达ICAM-1 mRNA, LPS可刺激ICAM-1 mRNA表达的上调( $P<0.01$ ), 0.1 mg/L的PTD-NBD(WT)多肽即可以抑制LPS刺激ICAM-1 mRNA的表达( $P<0.05$ ), 且呈剂量依赖方式抑制ICAM-1 mRNA的表达, 并在100 mg/L浓度时达到高峰( $P<0.01$ ).

2.2.2 PTD-NBD(WT)多肽与各对照肽段对AR42J细胞ICAM-1 mRNA表达的影响: 分别用10 mg/L的PTD-NBD(WT)、NBD、PTD-NBD(MT)或PTD肽孵育AR42J细胞2 h后, 再用10 mg/L LPS刺激24 h, ICAM-1 mRNA表达的变化. RT-PCR检测结果表明(表2), PTD-NBD(WT)多肽可以抑制LPS诱导ICAM-1 mRNA的表达, 而NBD多肽、PTD-NBD(MT)或PTD肽均不能

抑制ICAM-1 mRNA的表达.

## 3 讨论

LPS是G细菌细胞壁的主要成分, 已证实参与了AP的病理生理过程. 但AP时细胞的早期事件腺泡细胞损伤的确切机制尚未完全阐明<sup>[3]</sup>. 目前普遍认为LPS是单核巨噬细胞的强烈激活剂, 诱导促炎细胞因子如IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8和ICAM-1等的分泌. 已有多项研究表明小剂量LPS可以诱导腺泡细胞凋亡增加, 减轻AP的病理过程, 而大剂量LPS可引起腺泡细胞水肿, 出现膜连接性空泡及胞质膜的断裂, 腺细胞和溶酶体的破坏. 但LPS对胰腺腺泡细胞因子表达的影响国内外学者研究较少. AR42J为大鼠胰腺腺泡细胞株, 具有正常胰腺腺泡细胞的大部分功能, 如合成及分泌消化酶; 胞膜受体的表达和信号转导机制也与正常胰腺腺泡细胞相平行, 被较多应用于胰腺体外实验研究. 既往我们的研究显示, 在LPS刺激下, AR42J表达ICAM-1 mRNA及蛋白均明显增高, 呈时间依赖性<sup>[3]</sup>. 本次实验亦证实, LPS刺激后的IL-1 $\beta$ , ICAM-1增高, 结果与文献报道一致, 提示胰腺腺泡AR42J细胞产生、释放的促炎细胞因子在AP炎症反应的启动、放大和维持方面可能起着重要的作用, 他不但是产生炎症介质的细胞, 同时也是炎症介质的靶细胞<sup>[7]</sup>.

ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6及IL-8等多种细胞因子的启动子区域含有NF- $\kappa$ B的特异性结合位点( $\kappa$ B位点), NF- $\kappa$ B调节着包括ICAM-1、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 在内的多种细胞因子和炎症介质基因的转录, 在机体的免疫和炎症反应、凋亡调控等方面发挥重要作用. 上游激酶(inhibition of I $\kappa$ B kinase, IKK)的活化是激活NF- $\kappa$ B信号通路的主要限速步骤, 其复合物中的调节亚基(NF- $\kappa$ B essential modulator, NEMO)的N末端 $\alpha$ 螺旋区, 被称为NEMO结合区(NBD区,

序列为Leu- Asp-Trp-Ser- Trp-Leu), 是IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 和NEMO(IKK $\gamma$ )相互作用从而维持IKK活性的结构基础. 利用外源性氨基酸片竞争结合这一区域是抑制NF- $\kappa$ B通路的新方法. 有研究已经证实, 外源性NBD多肽和NEMO结合后, 封闭了NEMO与IKK催化亚基IKK $\alpha$ 和IKK $\beta$ 的结合位点, 进而下调IKK激酶的活性, 从而选择性抑制NF- $\kappa$ B的DNA结合活性, 为炎症/免疫性疾病的治疗提供了新的途径<sup>[8]</sup>. May *et al*设计了一种跨越NBD全长的可通过细胞膜的多肽(称为小分子NBD多肽), 发现在Hela细胞中这种小分子多肽可抑制TNF- $\alpha$ 诱导的IKK活性, 抑制NF- $\kappa$ B的核易位和DNA结合活性, 下调依赖NF- $\kappa$ B的炎症细胞因子mRNA转录, 而且, NBD多肽可以轻度上调NF- $\kappa$ B的基础生理功能<sup>[8]</sup>. Ethridge *et al*发现这种野生型NBD多肽预处理蛙皮素诱发的急性水肿性胰腺炎后, 可降低胰腺和肺的炎症反应程度, 同时减少致炎细胞细胞因子的表达<sup>[5-6]</sup>.

本研究设计合成了NBD(WT)多肽, 并与具有透膜作用的PTD融合成野生型PTD-NBD多肽(WT), 结果发现0.1 mg/L的PTD-NBD多肽处理时即可显著抑制LPS刺激的IL-1 $\beta$ 和ICAM-1 mRNA的表达, 且呈量效关系. 同时亦发现, 伴随着IL-1 $\beta$  mRNA表达的明显下调, 其蛋白的表达亦明显下调, 与PTD-NBD多肽呈量效关系. 证实了PTD-NBD多肽可直接作用胰腺腺泡细胞, 抑制LPS诱导的细胞因子相关的炎症反应. 同时为证实NBD多肽作用是序列特异的, 我们设立一个突变型的NBD多肽并且和PTD进行融合, 突变型的PTD-NBD多肽(MT)是739及741位色氨酸被酪氨酸所替代, 从而失去了与NEMO的结合活性. 结果表明PTD-NBD多肽(MT)没有抑制细胞因子IL-1 $\beta$ 和ICAM-1的表达. 同时设置了不

和PTD融合的NBD多肽组作为对照, 观察PTD多肽是否能促进NBD透膜作用, 结果发现与单纯PTD组或NBD组相比, 单纯无透膜作用NBD多肽不能抑制细胞因子IL-1 $\beta$ 和ICAM-1基因的表达. PTD-NBD多肽对胰腺腺泡上述作用, 是否经过NF- $\kappa$ B活化通路起作用, 需要我们作更深入的研究.

总之, 我们的研究结果表明, PTD-NBD(WT)多肽可以呈剂量依赖方式地抑制LPS诱导的AR42J促炎细胞因子IL-1 $\beta$ 和ICAM-1的表达, 因而其可直接影响胰腺腺泡细胞炎症反应, 为AP的早期细胞事件及的治疗研究提供理论依据.

#### 4 参考文献

- 1 Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 420-430
- 2 Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002; 122: 448-457
- 3 刘学进, 陈垦, 龙友明, 林振河, 谢文瑞. 核因子- $\kappa$ B在脂多糖诱导的大鼠胰腺腺泡细胞AR42J炎症效应中的作用. *胰腺病学* 2006; 6: 204-207
- 4 Dai S, Hirayama T, Abbas S, Abu-Amer Y. The IkappaB kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks osteoclastogenesis and bone erosion in inflammatory arthritis. *J Biol Chem* 2004; 279: 37219-37222
- 5 Strickland I, Ghosh S. Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation. *Ann Rheum Dis* 2006; 65 Suppl 3: iii75-iii82
- 6 Ethridge RT, Hashimoto K, Chung DH, Ehlers RA, Rajaraman S, Evers BM. Selective inhibition of NF-kappaB attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *J Am Coll Surg* 2002; 195: 497-505
- 7 Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175: 76-83
- 8 May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glöckner J, Pober JS, Ghosh S. Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 2000; 289: 1550-1554

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

#### ■同行评价

本研究立题依据充分, 设计合理, 技术难度较大, 研究重点突出, 结果可靠, 对急性胰腺炎病情加重的炎症因子反应提供了理论依据, 对临床的急性胰腺炎的防治有参考意义.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 中国科技期刊引证报告(核心版)发布《世界华人消化杂志》 2007年影响因子 0.568

本刊讯 2007年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位. 2007年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位. 即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54. (编辑: 程剑侠 2009-07-08)

# 左金丸及其主要单体成分对大肠癌的干预作用

文彬, 黄秋凌, 龚艳青, 陈蔚文

## ■背景资料

现代药理学研究表明, 左金丸对消化系统有广泛的作用: 镇痛、抗炎、抑菌, 还有明显的抗溃疡和抑制胃酸分泌等。近年来, 许多学者对左金丸及其主要单体成分对抑制肿瘤细胞生长迁移、促进肿瘤细胞的凋亡做了大量研究, 结果表明黄连素(小檗碱)和吴茱萸碱均可阻断促癌物质对潜在癌变细胞的作用, 因而对一些类型的肿瘤细胞(如肝癌、肺癌、白血病、淋巴瘤等)都有一定的作用。

文彬, 黄秋凌, 龚艳青, 陈蔚文, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405

文彬, 副研究员, 主要从事消化系统肿瘤分子药理学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30400602; No. 30672687  
作者贡献分布: 本实验由文彬设计; 研究过程由文彬、黄秋凌及龚艳青操作完成; 数据分析由文彬完成; 论文写作由文彬完成; 实验指导和写作指导由陈蔚文完成。

通讯作者: 文彬, 副研究员, 510405, 广东省广州市机场路12号, 广州中医药大学脾胃研究所。wen\_bin04@yahoo.com.cn  
电话: 020-36585077

收稿日期: 2009-04-28 修回日期: 2009-05-26

接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-08

## ***In vitro* and *in vivo* anti-colorectal carcinoma activities of Zuojin Pill and its major constituents**

Bin Wen, Qiu-Lin Huang, Yan-Qing Gong, Wei-Wen Chen

Bin Wen, Qiu-Lin Huang, Yan-Qing Gong, Wei-Wen Chen, Spleen-stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No.30400602 and 30672687

Correspondence to: Dr. Bin Wen, Spleen-stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. wen\_bin04@yahoo.com.cn

Received: 2009-04-28 Revised: 2009-05-26

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-08

## **Abstract**

**AIM:** To investigate the intervention effect of Zuojin Pill and its major constituents against colorectal carcinoma *in vitro* and *in vivo*.

**METHODS:** Cultured HT29 cells in the logarithmic growth phase were treated with berberine (26.25, 52.5, 105, 210 and 420  $\mu\text{mol/L}$ , respectively) and evodiamine (5, 10, 15, 20, 25 and 30  $\mu\text{mol/L}$ , respectively) for 24, 48, 72 and 96 h, respectively, to determine the optimal concentration and duration of treatment. Under optimal conditions, the inhibitory effects of berberine and evodiamine on the proliferation of HT29 cells were examined by a viable cell count method, and the telomerase activity of the treated cells was determined by the TRAP method. The single cell suspension of HT29 cells was then

prepared and subcutaneously injected into the left abdominal region of nude mice at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/0.2 mL to produce tumor-bearing nude mice. These mice were randomly divided into four groups, namely, control group (injection with saline), Zuojin Pill group, AZT (Azidothymidine) group and Zuojin Pill plus AZT group. The effects of Zuojin Pill and AZT on tumor growth and telomerase activity were observed. Additionally, a rat model of colorectal carcinoma was induced with 1, 2-dimethylhydrazine (DMH). The rats were also randomly divided into four groups, treated in the same manner as described above, and killed at weeks 11, 21 and 34, respectively, to observe the effects of Zuojin Pill and AZT against the progression of rat colorectal carcinoma.

**RESULTS:** Evodiamine and berberine dose-dependently inhibited the proliferation of HT29 cells *in vitro*. The suppression ratios achieved using evodiamine (7.5, 15 and 30  $\mu\text{mol/L}$ , respectively) were  $39.3\% \pm 2.13\%$ ,  $52.8\% \pm 5.34\%$  and  $64.1\% \pm 7.19\%$ , respectively, while those achieved using berberine (52.5, 105, 210  $\mu\text{mol/L}$ ) were  $44.1\% \pm 3.97\%$ ,  $55.9\% \pm 4.12\%$  and  $65.3\% \pm 6.94\%$ , respectively. Moreover, berberine and evodiamine could effectively inhibit the telomerase activity of HT29 cells. In tumor-bearing nude mice, Zuojin Pill and AZT had no significant influence on tumor size but had weak effect on telomerase activity. In DMH-induced rat colon cancer model, the tumor incidences observed at week 11 in the control group, Zuojin Pill group, AZT group and Zuojin Pill plus group were 20%, 0%, 10% and 10%, respectively. In contrast, the tumor incidences at week 34 showed no significant difference among different groups.

**CONCLUSION:** The major constituents of Zuojin Pill can suppress the proliferation and telomerase activity of HT29 cells *in vitro*. In DMH-produced rat model, Zuojin Pill can effectively repress the development and progression of early-stage carcinoma, but has no obvious effect against late-stage carcinoma.

**Key Words:** Zuojin Pill; Berberine; Evodiamine;

## ■同行评议者

李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科; 姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

## Colorectal carcinoma; HT29 cells

Wen B, Huang QL, Gong YQ, Chen WW. *In vitro* and *in vivo* anti-colorectal carcinoma activities of Zuojin Pill and its major constituents. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1936-1941

## 摘要

**目的:** 探讨左金丸及其主要单体成分在体内体外对大肠癌发生发展的干预作用。

**方法:** 培养人大肠癌细胞株HT29, 选择处于对数生长期的细胞, 分别用不同浓度的盐酸小檗碱(26.25、52.5、105、210、420  $\mu\text{mol/L}$ )、吴茱萸碱(5、10、15、20、25、30  $\mu\text{mol/L}$ )处理HT29细胞24、48、72、96 h, 筛选最适作用浓度与时间, 在这一浓度与时间作用下, 用活细胞计数法检测左金丸的主要单体成分小檗碱和吴茱萸碱对HT29细胞增殖的抑制作用, TRAP法检测HT29细胞端粒酶活性, 取HT29细胞, 用生理盐水制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/0.2 \text{ mL}$ , 注射于裸鼠左侧胁腹部皮下, 制作HT29细胞荷瘤裸鼠肿瘤模型。随机将裸鼠分为4组: 对照组、左金丸组、AZT组和协同组, 观察左金丸和叠氮胸苷(AZT)对瘤体生长及端粒酶活性的影响。利用致癌剂1, 2-二甲基酰肼(DMH, 25 mg/kg)诱导大鼠大肠癌模型, 同样随机将大鼠分为4组, 观察左金丸和AZT对大鼠大肠癌发生发展的干预作用。

**结果:** 在离体实验中, 处理24-72 h, 105  $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱和15  $\mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱对HT29细胞增殖的抑制作用呈成正向的线性量效关系, 吴茱萸碱(7.5、15、30  $\mu\text{mol/L}$ )作用后的抑制率分别为 $39.3\% \pm 2.13\%$ ,  $52.8\% \pm 5.34\%$ 和 $64.1\% \pm 7.19\%$ , 盐酸小檗碱(52.5、105、210  $\mu\text{mol/L}$ )作用后的抑制率分别为 $44.1\% \pm 3.97\%$ ,  $55.9\% \pm 4.12\%$ 和 $65.3\% \pm 6.94\%$ 。105  $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱和15  $\mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱处理HT29细胞72 h, 小檗碱和吴茱萸碱可以有效抑制HT29细胞端粒酶的活性。在荷瘤裸鼠实验中, 左金丸和AZT对瘤体大小无明显影响, 对端粒酶活性有微弱影响。第11周, 对照组、左金丸组、AZT组和协同组大鼠肿瘤发生率分别为20%、0%、10%和10%, 左金丸作用优于AZT, 但34 wk各组间无明显差异。

**结论:** 离体实验中, 左金丸的主要成分可以有效抑制HT29细胞的增殖和端粒酶的活性; 裸鼠移植瘤实验中, 观察不到左金丸的药效; 1, 2-DMH诱导大肠癌实验模型中, 左金丸可以

有效阻碍早期癌症的发生和发展。

**关键词:** 左金丸; 小檗碱; 吴茱萸碱; 大肠癌; HT29细胞

文彬, 黄秋凌, 龚艳青, 陈蔚文. 左金丸及其主要单体成分对大肠癌的干预作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(19): 1936-1941  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1936.asp>

## 0 引言

左金丸最早收录于《丹溪心法》, 由黄连、吴茱萸按6:1配比组成。黄连苦寒, 清心泻肝, 吴茱萸辛热, 引热下行, 二药一主一辅, 一寒一热, 相反相成。现代药理研究表明, 左金丸对消化系统有广泛的作用: 镇痛、抗炎、抑菌, 还有明显的抗溃疡和抑制胃酸分泌等<sup>[1-2]</sup>。近些年来, 许多学者对左金丸及其主要单体成分对抑制肿瘤细胞生长迁移、促进肿瘤细胞的凋亡做了大量研究<sup>[3-9]</sup>, 结果表明黄连素(小檗碱)和吴茱萸碱均可阻断促癌物质对潜在癌变细胞的作用, 因而对一些类型的肿瘤细胞(如肝癌、肺癌、白血病、淋巴瘤等)都有一定的作用。我们研究小组对黄连、吴茱萸、青黛为主药的加味左金丸(复方连黛片)及其主要成分盐酸小檗碱、靛玉红和吴茱萸碱防治消化系肿瘤的药理作用及临床已进行了十余年的研究<sup>[10-15]</sup>。研究表明, 这些药物能降低MNNG诱发大鼠胃及十二指肠癌的发生, 减轻病理损伤, 明显抑制癌细胞的增殖, 促进细胞分化, 降低肿瘤转移, 抑制一些癌基因的表达等。端粒酶具有逆转录酶活性, 逆转录酶抑制剂叠氮胸苷(Azidothymidine, AZT)可以抑制端粒酶活性<sup>[16-17]</sup>, 本文以AZT作为对照受试药物, 分别在离体条件下探讨小檗碱和吴茱萸碱对HT29细胞的增殖的抑制作用和对端粒酶活性的影响; 制作荷瘤裸鼠模型和DMH致大肠癌模型探讨左金丸对肿瘤发生发展的干预作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 黄连和吴茱萸购自广州中医药大学第一附属医院。盐酸小檗碱、吴茱萸碱、AZT和1, 2-二甲基酰肼(1, 2-DMH)均购自美国Sigma公司; 培养基RPMI 1640干粉为美国Gibco公司产品; 活细胞计数CCK-8试剂盒购自上海同仁化学研究所(为株式会社日本同仁化学研究所产品); 端粒酶检测试剂盒为北京鼎国生物科技公司产品。HT29细胞购自中国科学院上海生化和细胞生物研究所; SPF级BALB/C裸鼠和SPF级健康Wistar

## ■创新盘点

本文以AZT作为对照受试药物, 分别在离体条件下探讨小檗碱和吴茱萸碱对HT29细胞的增殖的抑制作用和对端粒酶活性的影响; 制作荷瘤裸鼠模型和DMH致大肠癌模型探讨左金丸对肿瘤发生发展的干预作用。



## ■相关报道

Fiala认为DMH是经肝脏转化、经胆汁分泌到肠,经肠道细菌的作用下水解游离出甲基氧化偶氮甲醇,且进一步转化才具有致癌活性的。Genn *et al*认为,肠道中的DMH代谢物除来源于胆汁外,还可能来自肝静脉或不经肝脏的途径。

大鼠均购于并饲养于广州中医药大学动物中心(动物合格证号分别为:0014754,0017087)。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养:人结肠癌细胞株HT29是原发人类大肠癌培养的细胞系,将细胞接种于无菌培养瓶中,加入含100 g/L小牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液,置于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养,细胞呈单层贴壁生长,每周换液2-3次,密度为80%-90%时进行传代,利用细胞增殖实验检测细胞的对数生长期,取对数生长期细胞用于实验研究。

1.2.2 药物对细胞增殖的抑制作用:取对数生长期的HT29细胞,调整细胞浓度,以每孔 $2 \times 10^4$ 个/100  $\mu$ L密度接种于96孔板培养,24h后吸除原培养液,加入含不同浓度中药的培养液:吴茱萸碱(培养液配制后用超声波震荡处理成微粒直径小于10  $\mu$ m的均匀悬浮液)取3.75、7.5、15、30、60  $\mu$ mol/L 5个剂量组;盐酸小檗碱(用培养液制备)取26.25、52.5、105、210、420  $\mu$ mol/L 5个剂量组;设培养液不加药物为空白对照组。各组均设5个平行孔( $n = 5$ ),按活细胞计数CCK-8试剂盒说明书进行操作,按下列公式计算细胞生长抑制率(R): $R(\%) = (\text{空白对照组}A_{450} - \text{实验组吸光度}A_{450}) / \text{空白对照组吸光度}A_{450} \times 100\%$ 。

1.2.3 造模:人大肠癌细胞株HT29裸小鼠移植瘤模型制作:BAAL/c裸鼠50只,18-22 g,雌雄各半。人工条件下培养HT29细胞,待细胞生长至铺满培养瓶80%-90%,用2.5 g/L的胰酶消化后收集,悬浮于生理盐水中,制成单细胞悬液,调整细胞浓度,于每只裸鼠左侧胁腹部皮下注射0.2 mL,细胞量 $5 \times 10^5$ 。将50只裸鼠随机分为3组:(1)对照组(生理盐水组):10只,每日生理盐水0.5 mL灌胃1次;(2)左金丸组:20只,中药汤剂1.4 g/kg灌胃,相当于成人常用量的20倍,每日1次;(3)AZT组:20只,于注射细胞的第2天开始每日1次AZT 10.5 mg/kg灌胃,每组连续灌胃1 mo,灌胃结束后的第2天,将裸鼠断颈处死,取瘤体。用游标卡尺测量接种后不同时期肿瘤大小。肿瘤体积计算公式: $V = ab^2/2$ , $V$ 为体积, $a$ 为长径, $b$ 为横径。(2)DMH诱导Wistar大鼠大肠癌模型制作:DMH诱导大肠癌大鼠模型主要参考Aguilar *et al* 2005年的研究报道<sup>[18]</sup>。致癌剂DMH现配现用。健康雌雄各半Wistar大鼠共240只、随机均分为4组:对照组、左金丸组、AZT组和左金丸与AZT的协同组。在每只大鼠左肩胛骨侧皮下,分别注射1,

2-二甲基酰肼(1, 2-DMH):25 mg/kg,每周1次,连续注射12 wk。从第1次注射DMH第2天开始,中药组每天以中药汤剂1.4 g/kg灌胃;AZT组每天以10.5 mg/kg灌胃;对照组灌同等体积的生理盐水,每日1次,连续34 wk。

1.2.4 标本的采集:从灌胃11 wk开始,分批处死大鼠,开腹分离整段大肠,剖开,冰冻生理盐水冲洗干净,平展于过滤白纸上,描述肠上皮形态变化(包括息肉数量、颜色、部位、大小形态),切取肉眼所见表皮发生变化或病变部位(含周围相当于息肉直径范围肠组织),用40 g/L的中性甲醛溶液固定后,常规脱水、浸蜡、透明、包埋,切片,做病理学观察。其余病变部位组织迅速冷冻于液氮中,后转至-70℃冰箱保存,留待检测。

1.2.5 结肠组织病理形态学观察:切片HE染色后以Olympus显微镜观察并拍照。

1.2.6 病理分级:采用改良的Dukes *et al*<sup>[19]</sup>大肠癌分期及预后分期标准:A:肿瘤限于黏膜层(重度上皮内瘤变);B1:肿瘤侵及肌层,但未穿透,无淋巴结转移;B2:肿瘤穿透肌层,但无淋巴结转移;C1:肿瘤未穿透肌层,但有区域性无血管根部淋巴结转移;C2:肿瘤穿透肠壁,并伴有肠系膜淋巴结转移;D:有远隔脏器转移。

1.2.7 端粒酶活性检测:用端粒重复序列扩增法(TRAP法)检测端粒酶活性(北京鼎国生物科技公司提供)。(1)提取端粒酶:取组织块用液氮研磨至粉碎(贴壁细胞胰酶消化后离心收集,取 $5 \times 10^6$ 细胞)。加入1 mL缓冲溶液A,混匀,4℃放置15 min;12000 g,4℃离心5 min,去上清;加入100-200  $\mu$ L缓冲溶液B,混匀,4℃放置30 min,其间振动数次;然后12000 g,4℃离心15 min,弃沉淀,留取上清。(2)PCR扩增:取2  $\mu$ L上清,加入22  $\mu$ L PCR反应液(包括引物,缓冲溶液, dNTPs)。20℃保温40 min,90℃保温3 min;上述反应体系中加入1  $\mu$ L荧光标记引物(FITC),1  $\mu$ L Taq酶,按下列程序做PCR扩增:94℃ 2 min;94℃ 30s,55℃ 30 s,72℃ 1 min(35 cycles);72℃ 5 min;取上述PCR产物2  $\mu$ L,加入2  $\mu$ L上样缓冲液,95℃变性2 min。(3)聚丙烯酰胺-尿素变性电泳,分析结果。

**统计学处理** 数据处理采用SPSS11.5统计软件,单因素分析用 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结果

2.1 盐酸小檗碱、吴茱萸碱体外对HT29细胞增殖的抑制作用 茱萸碱(7.5、15、30  $\mu$ mol/L)和

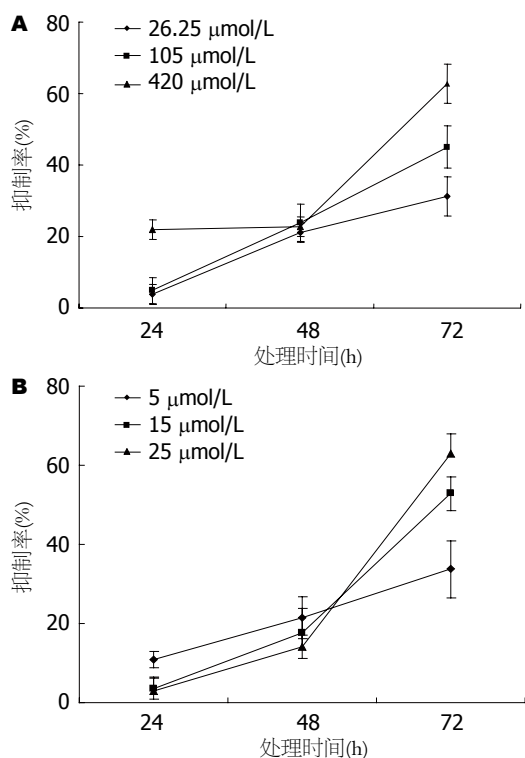


图1 盐酸小檗碱和吴茱萸碱对HT29细胞增殖的抑制作用。  
A: 盐酸小檗碱; B: 吴茱萸碱。

盐酸小檗碱(52.5、105、210  $\mu\text{mol/L}$ )作用后的抑制率分别为 $39.3\% \pm 2.13\%$ ,  $52.8\% \pm 5.34\%$ ,  $64.1\% \pm 7.19\%$ (均 $P < 0.01$ )和 $44.1\% \pm 3.97\%$ ,  $55.9\% \pm 4.12\%$ ,  $65.3\% \pm 6.94\%$ (均 $P < 0.01$ )。在24-72 h内, 105  $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱和15  $\mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱对HT29细胞增殖的抑制作用呈成正向的线性量效关系(图1)。

**2.2 盐酸小檗碱、吴茱萸碱对HT29细胞端粒酶活性的影响** 105  $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱和15  $\mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱对HT29细胞增殖的抑制作用呈成正向的线性量效关系(图1), 选取105  $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱、10  $\mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱和72 h作为最适作用条件, 进行对端粒酶活性影响的检测。结果表明, 105  $\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱和15  $\mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱均能抑制HT29细胞端粒酶活性, 吴茱萸碱的作用略强于盐酸小檗碱(图2)。

**2.3 左金丸和AZT对裸鼠移植瘤组织大小及端粒酶活性的影响** 选取 $5 \times 10^5/0.2 \text{ mL}$ 的HT29细胞接种于BALA/c裸小鼠肩胛骨左上方的皮下, 在植入细胞的第2天开始灌胃, 每日1次连续5 wk。实验发现, 左金丸和AZT对瘤体大小没有明显的影响, 进一步检测左金丸瘤体端粒酶活性的影响(图3), 可见AZT和左金丸对癌肿的端粒酶活性都只有较微弱的影响, AZT的影响略强于

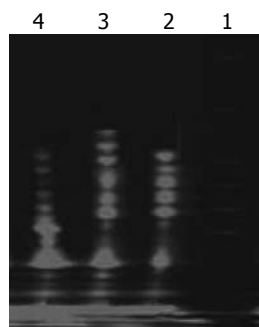


图2 吴茱萸碱和盐酸小檗碱对HT29细胞端粒酶活性的影响。1: 标准分子质量; 2: 盐酸小檗碱105  $\mu\text{mol/L}$ ; 3: 对照组; 4: 吴茱萸碱15  $\mu\text{mol/L}$ 。

**■应用要点**  
在DMH诱导大肠癌的过程中, 左金丸可以很显著地干预癌症的发生, 在癌症发展的进程中, 左金丸可以有效地延缓癌症的进程。

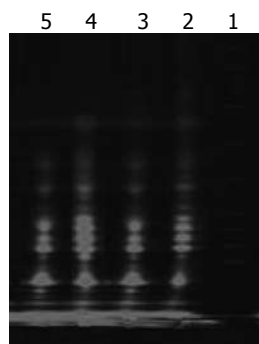


图3 左金丸组和AZT对裸鼠移植瘤端粒酶活性的影响。1: 标准分子质量; 2: 对照组; 3: 左金丸组; 4: 对照组; 5: AZT组。

中药组。

**2.4 Wistar大鼠肿瘤发展过程中肿瘤数量和发生率** 实验表明, 在肿瘤发生的早期(11 wk), 左金丸对肿瘤的发生进程有明显的影响, 左金丸组肿瘤发生率为0%, 大鼠大肠表面也有一些白色的结节, 但病理检测均正常, 尚没有发展成癌; 而对照组、AZT组以及同时灌服左金丸和AZT的协同组均有早期腺癌出现(表1)。第21周, 左金丸肿瘤发生率均显著低于对照组(表1); 第34周, 除协同组肿瘤发生率略低外( $P < 0.05$ ), 各组之间癌肿的发生率无明显差异( $P > 0.05$ ), 但对照组大鼠癌肿处于中晚期(B2-C2期)的比例较多, 而左金丸组的大鼠多处于早期(A)的中期(表1)。

**2.5 整个造模过程大肠以外其他部位发生病变的情况** 将不同造模时期的大鼠肿瘤发生例数和发生部位情况进行一个粗略综合性统计, 在整个造模过程中, 仅大肠部位发生癌变, 计数为0; 其他部位发生癌变计为1; 若同一只鼠在小肠、肝脏2处同时发生肿瘤病变, 计数为2, 以此类推。我们意外发现, 左金丸组癌变部位发生在大肠以外的概率(3.8%)明显低于其他组( $P < 0.01$ , 表2)。

### 3 讨论

结直肠癌手术在近50年来发展迅速, 针对不同病期、肿瘤部位、转移状况、患者全身情况可选各种不同术式, 但多年来, 结直肠癌5年生存率并未因手术进步得到显著提高, 仍停留在50%左右<sup>[20]</sup>。中医药治疗恶性肿瘤的优越性已为广

## ■同行评价

本文选题尚可,设计合理,结果可靠,具有较好的学术价值。

表 1 DMH诱导大鼠大肠癌变的发生率

分组	n	病理分级						发生率(%)
		A	B1	B2	C1	C2	D	
11 wk								
对照组	20	4	0	0	0	0	0	20.0
左金丸组	20	0	0	0	0	0	0	0.0 <sup>b</sup>
AZT组	20	2	0	0	0	0	0	10.0 <sup>a</sup>
协同组	20	2	0	0	0	0	0	10.0 <sup>a</sup>
21 wk								
对照组	18	4	2	2	0	0	0	44.4
左金丸组	16	2	0	0	0	0	0	12.5 <sup>b</sup>
AZT组	20	4	2	0	0	0	0	30.0 <sup>a</sup>
协同组	18	4	0	2	0	0	0	33.3 <sup>a</sup>
34 wk								
对照组	20	1	3	4	4	2	0	70.0
左金丸组	16	2	2	4	2	0	0	62.5
AZT组	22	4	2	6	2	0	0	63.6
协同组	18	4	2	4	0	0	0	55.6 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

大医患所认同,中西医结合治疗在提高生存质量、阻断癌前病变等方面有独特的优势。我们用不同的实验模型研究表明,左金丸对肿瘤细胞的增殖和癌的进程都有一定的干预作用。在离体情况下,盐酸小檗碱和吴茱萸碱对HT29细胞增殖及端粒酶活性均有较为明显的抑制作用。在荷瘤裸鼠的实验中,由于中药的药效不能强烈到有效阻碍瘤体的生长,因此,长时间饲养,瘤体表面会发生溃烂,这一原因使我们不能造模时间过长,在这一实验中,我们仅发现了左金丸对端粒酶活性微弱的抑制作用,这可能由于我们造模时间较短(5 wk),但也可能是由于此模型不适合研究中药缓慢释放药效的作用特点,这一点在我们进一步的大鼠实验中得到一定的佐证。在DMH诱导大肠癌的过程中,左金丸可以很显著地干预癌症的发生,在癌症发展的进程中,左金丸可以有效地延缓癌症的进程。

端粒酶抑制剂AZT是单环 $\beta$ 内酰胺类药物,作为核苷类似物,AZT可以和正常的单核苷酸竞争端粒酶的核苷酸结合位点,抑制细胞内部逆转录酶活性,使逆转录过程停止,从而抑制端粒的合成<sup>[16-17]</sup>。在离体实验中,我们看到AZT和小檗碱、吴茱萸碱均可以抑制端粒酶的活性,在荷瘤裸鼠实验中,这种抑制作用微弱一些,这可能与模型适应性有关,但通过DMH诱癌大鼠实验,我们可以看到左金丸和AZT对肿瘤的发生发展干预作用明显不同,在肿瘤发生的初期(11

表 2 整个造模过程中大肠以外其他部位病变

分组	n	发生部位				发生率(%)
		小肠	肝脏	腹腔泛发	耳部	
对照组	58	4	4	2	2	20.68
左金丸组	52	2	0	0	0	3.8 <sup>b</sup>
AZT组	62	12	0	2	0	22.58
协同组	56	4	2	2	2	17.86

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

wk), AZT组和对照组肿瘤发生率并没有什么区别,而这个时候,左金丸的作用最明显,到21 wk,左金丸对肿瘤发生的阻碍作用也比AZT要好,再往后,2组的肿瘤发生率又没有区别,这提示左金丸和AZT抑癌作用的机制可能不同,这从一个侧面再次了反应中医药治病整体观念,单纯从某一个酶或某一基因来研究中药的作用机制并不合适。

DMH诱发肿瘤,在皮下给药而肿瘤发生在远端器官大肠<sup>[20-21]</sup>,Druchrey据此提出“器官特异性化学致癌”的概念。一般认为DMH为间接致癌剂,他本身并不致癌,Fiala认为DMH是经肝脏转化、经胆汁分泌到肠,经肠道细菌的作用下水解游离出甲基氧化偶氮甲醇,且进一步转化才具有致癌活性的。Genn *et al*认为,肠道中的DMH代谢物除来源于胆汁外,还可能来自肝静脉或不经肝脏的途径。以DMH诱发肿瘤时,除了肿瘤主要发生大肠,小肠肿瘤的发生率较高(有报道达36%)。在我们的实验中,我们发现在大鼠小肠、肝脏、耳部和整个腹腔都有肿瘤发生,除大肠部位以外,若其他部位有一处发生肿瘤,我们计数为1,若同一只大鼠在小肠、肝脏、耳部3处均有肿瘤发生,计数为3,即使这样粗略统计,我们意外发现左金丸组在大肠以外发生肿瘤的机率明显低于其他组,这其中的机制还需要进一步研究。

## 4 参考文献

- 1 李盛青,刘明平. 左金丸药理与应用. 时珍国医国药 2000; 11: 471-473
- 2 陈蔚文,蓝韶清,李茹柳,徐颂芬. 左金丸抗溃疡及抑制胃液分泌的实验研究. 广州中医学院学报 1991; 8: 224-226
- 3 谭宇蕙,吴映雅,钟富有,胡岳山,宁昇真,李杰芬. 吴茱萸碱对小鼠肝癌细胞生长的抑制和诱导凋亡作用. 中药药理与临床 2006; 22: 33-35
- 4 何菱,郑保忠,胥佩菱. 小檗碱类衍生物的全合成及抗癌活性的研究. 华西药理学杂志 1987; 2: 61-63
- 5 田道法,於南平,唐发清,陈协云. 不同组方对黄连抑制HNE3细胞rDNA活性效应的影响. 湖南中医学院

- 学报 1994; 3: 38-40
- 6 林菁. 小檗碱对K562细胞生长的抑制作用. 福建医学院学报 1996; 30: 309-312
- 7 洗励坚, 梁永能, 张启威, 李永强. 小檗碱等20个植物药对肿瘤细胞DNA多聚酶及细胞生长的影响. 肿瘤 2000; 20: 1-3
- 8 Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Inhibitory effects of evodiamine on in vitro invasion and experimental lung metastasis of murine colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 917-920
- 9 Ogasawara M, Suzuki H. Inhibition by evodiamine of hepatocyte growth factor-induced invasion and migration of tumor cells. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 578-582
- 10 马伟, 王建华, 陈蔚文, 石兴华. 盐酸小檗碱促进胃癌细胞系分化的作用. 中药新药与临床药理 1998; 9: 90-91
- 11 谭宇蕙, 陈蔚文, 周本杰, 李茹柳. 连黛片对大鼠溃疡性胃癌RAS基因点突变的影响. 中药药理与临床 2001; 17: 27-28
- 12 周本杰, 徐勤, 谭宇蕙, 陈蔚文, 王建华. 连黛片对大鼠溃疡性胃癌相关癌基因蛋白表达的影响. 中药新药与临床药理 2001; 12: 249-251
- 13 陈蔚文, 陈蔚文, 李茹柳, 徐勤, 叶富强, 徐颂芬, 潘怀耿, 赵军宁, 王建华. 连黛片抗大鼠胃癌及对p21ras, c-erbB2, Rb和p53基因蛋白表达的影响. 中国中西医结合杂志 1998; S1: 252-254
- 14 杨传标, 陈蔚文, 王建华, 张礼康. 连黛胶囊对胃肠病P21ras和突变型P53蛋白表达调节作用的临床研究. 中国中西医结合杂志 2001; 21: 736-738
- 15 谭宇蕙, 陈冠林, 郭淑杰, 李燕红, 陈蔚文. 小檗碱对人胃癌MGC-803细胞生长抑制及诱导凋亡的作用. 中国药理学通报 2001; 17: 40-43
- 16 Melana SM, Holland JF, Pogo BG. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 693-696
- 17 Murakami J, Nagai N, Shigemasa K, Ohama K. Inhibition of telomerase activity and cell proliferation by a reverse transcriptase inhibitor in gynaecological cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1027-1034
- 18 Noguera Aguilar JF, Amengual Antich I, Plaza Martínez A, Ibarra de la Rosa J, Tortajada Collado C, Gamundí Gamundí A, Pujol Tugores JJ. Cyclooxygenase-2 inhibition in colon experimental carcinogenesis. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 637-647
- 19 郑树. 结直肠癌肿瘤-基础研究与临床实践. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 397-398
- 20 吴亚平, 李英. 1,2-二甲胍诱发实验性大肠癌. 国际肿瘤学杂志 1984; 3: 167-171
- 21 邹移海, 张永斌, 连志诚. 实验性大肠癌动物模型研究述评. 广州中医药大学学报 1997; 14: 277-280

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 2009-07-08)



# 谷氧还蛋白1在高糖诱导的血管内皮细胞凋亡中的作用及其机制

于海涛, 张春晶, 岳丽玲, 于英君

## ■背景资料

血管内皮细胞损伤为糖尿病血管病变的原发性因素, 高血糖可引起氧化应激并导致细胞凋亡。氧化应激可产生谷胱甘肽化蛋白质(Pr-S-S-G)结构, 细胞中Pr-S-S-G的堆积是引起细胞凋亡损伤及衰老途径的启动因子。谷氧还蛋白(Grx)催化Pr-S-S-G还原的效力及特异性高, 对其作用机制的阐明将有助于探讨氧化应激和谷胱甘肽化蛋白质在各种相关疾病中的作用。

于海涛, 张春晶, 岳丽玲, 齐齐哈尔医学院生物遗传教研室、生物化学与分子生物学教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042

于英君, 黑龙江中医药大学生物化学与分子生物学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150040

于海涛, 在读博士, 主要从事生物大分子功能研究。

黑龙江省自然科学基金项目资助, No. ZA2006-03

黑龙江省教育厅面上项目基金资助, No. 11541407

作者贡献分布: 此课题由于海涛与张春晶设计; 研究过程由于海涛、张春晶及岳丽玲操作, 于英君指导完成; 本论文写作由于海涛与张春晶完成。

通讯作者: 于海涛, 副教授, 161042, 黑龙江省齐齐哈尔市, 齐齐哈尔医学院. yht422@yahoo.com.cn

电话: 0452-2663711

收稿日期: 2009-03-04 修回日期: 2009-06-10

接受日期: 2009-06-18 在线出版日期: 2009-07-08

## Mechanism underlying the protective effects of glutaredoxin-1 against high glucose-induced apoptosis of umbilical vein endothelial cells

Hai-Tao Yu, Chun-Jing Zhang, Li-Ling Yue, Ying-Jun Yu

Hai-Tao Yu, Chun-Jing Zhang, Li-Ling Yue, Department of Biological Genetics and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161042, Heilongjiang Province, China

Ying-Jun Yu, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province of China, No. ZA2006-03; and the Scientific Research Fund of Heilongjiang Provincial Education Department, No. 11541407

Correspondence to: Hai-Tao Yu, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, Heilongjiang Province, China. yht422@yahoo.com.cn

Received: 2009-03-04 Revised: 2009-06-10

Accepted: 2009-06-18 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the mechanism underlying the protective effects of glutaredoxin-1 (Grx1) against high glucose-induced apoptosis of umbilical vein endothelial cells.

**METHODS:** The apoptosis of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was induced under high glucose conditions.

HUVECs were then divided into three groups, namely, control group, high glucose group and Grx1 plus high glucose group. The cells were observed under an inverted light microscope to examine their morphological changes. The proliferation of cells was measured by MTT assay. The influence of Grx1 on the apoptosis of HUVECs was determined by flow cytometry with annexin V-FITC/PI double staining. The expression levels of p-JNK and p-Akt proteins were evaluated by Western blot.

**RESULTS:** Compared to the high glucose group, cells in the Grx1 plus high glucose group showed a significant improvement in morphology and growth state, a remarkable increase in viability ( $59\% \pm 2\%$  vs  $78\% \pm 3\%$ ,  $P < 0.05$ ), as well as an obvious decrease in early ( $0.4156\% \pm 0.0374\%$  vs  $0.2360\% \pm 0.0156\%$ ,  $P < 0.05$ ) and late ( $0.3689\% \pm 0.0083\%$  vs  $0.2433\% \pm 0.0278\%$ ,  $P < 0.05$ ) apoptotic rates. Compared to the normal control group, the expression level of p-JNK protein in cells in the high glucose group significantly increased ( $0.48 \pm 0.03$  vs  $0.64 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ) while that of p-Akt protein significantly decreased ( $0.69 \pm 0.11$  vs  $1.29 \pm 0.035$ ,  $P < 0.01$ ). After pretreatment with hGrx1, the expression level of p-JNK protein decreased ( $0.64 \pm 0.07$  vs  $0.39 \pm 0.05$ ,  $P < 0.05$ ) while that of p-Akt protein increased ( $0.69 \pm 0.11$  vs  $1.07 \pm 0.13$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Grx1 is able to antagonize high glucose-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells through inhibition of JNK and activation of the Akt signaling pathway.

**Key Words:** Glutaredoxin 1; High glucose; Apoptosis; Endothelial cell; Signal transduction

Yu HT, Zhang CJ, Yue LL, Yu YJ. Mechanism underlying the protective effects of glutaredoxin1 against high glucose-induced apoptosis of umbilical vein endothelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1942-1946

## 摘要

**目的:** 观察谷氧还蛋白1(glutaredoxin1, Grx1)

## ■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

在高糖诱导的血管内皮细胞凋亡中的作用及其机制。

**方法:** 在高糖环境中培养人脐静脉内皮细胞, 制备人脐静脉内皮细胞损伤模型。细胞分为正常对照组、损伤组、Grx1预保护组。倒置显微镜下观察细胞形态。MTT比色法检测细胞活力以初步观察Grx1对细胞损伤的作用; 采用Annexin V-FITC/PI 双染法, 流式细胞仪检测Grx1对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响; 利用Western blot法分析Grx1对Akt、JNK蛋白水平表达的影响。

**结果:** Grx1预保护组与损伤组比较, 细胞状态明显改善。与高糖损伤组比较, Grx1预保护组的细胞存活率显著提高( $78\% \pm 3\%$  vs  $59\% \pm 2\%$ ,  $P < 0.05$ ), 早期凋亡率( $0.2360\% \pm 0.0156\%$  vs  $0.4156\% \pm 0.0374\%$ ,  $P < 0.05$ )和晚期凋亡率( $0.2433\% \pm 0.0278\%$  vs  $0.3689\% \pm 0.0083\%$ ,  $P < 0.05$ )均明显降低。与正常对照组相比, 高糖组p-JNK相对含量明显增多( $0.64 \pm 0.07$  vs  $0.48 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ), 而高糖组p-Akt水平较正常对照组显著降低( $1.29 \pm 0.035$  vs  $0.69 \pm 0.11$ ,  $P < 0.01$ )。同时, hGrx1保护后p-JNK蛋白水平较高糖组显著降低( $0.39 \pm 0.05$  vs  $0.64 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ); 而p-Akt蛋白水平较高糖组显著增高( $0.69 \pm 0.11$  vs  $1.07 \pm 0.13$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** Grx1可通过抑制JNK激活及激活Akt通路来拮抗高糖诱导的内皮细胞凋亡。

**关键词:** 谷氧还蛋白1; 高糖; 凋亡; 内皮细胞; 信号转导

于海涛, 张春晶, 岳丽玲, 于英君. 谷氧还蛋白1在高糖诱导的血管内皮细胞凋亡中的作用及其机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1942-1946  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1942.asp>

## 0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一组由遗传和环境因素相互作用而引起的临床综合征, 临床以高血糖为主要标志。糖尿病的危害主要来自糖尿病并发症如冠心病、脑血管疾病、糖尿病肾病等。近年来大量研究证实, 高糖环境下自由基产生增多和抗氧化能力减弱二者并存, 是糖尿病血管并发症的重要发病机制。如何在降血糖的同时调整糖尿病患者体内的氧化应激状态成为糖尿病治疗的新思路<sup>[1-2]</sup>。

在氧化应激引起的损伤中蛋白质的损伤最为重要, 可产生谷胱甘肽化蛋白质(Pr-S-S-G)结

构, 细胞中Pr-S-S-G的堆积是引起细胞凋亡损伤及衰老途径的启动因子。目前已报道了I型及II型糖尿病等很多疾病与蛋白质的谷胱甘肽化密切相关<sup>[3]</sup>, 因此对谷胱甘肽化的深入研究将为相关疾病的机制研究和治疗提供新的思路。谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx)是目前发现的能特异而有效地催化Pr-S-S-G还原的酶蛋白, Grx还原体系近几年已成为国内外研究抗氧化防御的热点<sup>[4-5]</sup>。目前在糖尿病患者血清中已观察到Grx浓度增高, 并且显微注射重组Grx能加强NADPH对胰岛素颗粒胞吐作用的影响<sup>[6]</sup>, 提示Grx在糖尿病的治疗中可能具有一定的作用。Murata *et al*<sup>[7]</sup>研究表明Grx可通过调节Akt的氧化还原状态保护细胞免于凋亡。Daily *et al*<sup>[8]</sup>研究表明*E. coli* Grx2可通过上调Ref-1的表达激活NF- $\kappa$ B的DNA结合活性来抵抗小脑颗粒神经元的凋亡。进一步分析发现, 重组人Grx1和*E. coli* Grx2通过同时激活Ras/PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B途径和JNK/AP-1途径发挥抗凋亡作用<sup>[9]</sup>。基于以上论述, 我们推测如果能够人为增加Grx1的表达水平及含量将有助于提高内皮细胞抗高糖和高游离脂肪酸的氧化损伤能力, 发挥保护内皮细胞的作用, 并且Grx抑制内皮细胞凋亡作用的机制可能是通过调节Akt、JNK表达水平实现的。但是Grx在高糖诱导的内皮细胞凋亡中的保护作用及其作用机制, 目前国内外均尚未见相关报道。因此, 本实验以血管内皮细胞为实验对象, 高糖为损伤因素, 研究人Grx1对高糖诱导的血管内皮细胞凋亡抑制作用及机制, 为进一步阐明Grx的生理功用、作用机制及其今后在糖尿病治疗、预防糖尿病血管病变等方面的应用研究奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人脐静脉内皮细胞(本室分离培养), 胎牛血清为Hyclone产品、DMEM为Invitrogen产品。2.5 g/L胰酶-0.02% EDTA为吉诺生物医药技术有限公司产品。MTT(美国Sigma公司), Grx1(本室纯化<sup>[10]</sup>), DP10倒置显微镜(日本Olympus公司), Hoest33258(Sigma分装), 荧光倒置显微镜(德国), 其他试剂均为进口或国产分析纯; Sanyo CO<sub>2</sub>培养箱, SAFIRE2多功能酶标仪, Annexin V-PI双染试剂盒(普利莱公司), BD FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司), 兔抗p-Akt抗体(Cell signaling公司)、兔抗p-JNK(Santa Cruz公司)HRP-标记的羊抗兔抗体(北京中杉金桥有限公司)。

## ■ 研发前沿

近年来大量研究证实, 高糖环境下自由基产生增多和抗氧化能力减弱二者并存, 是糖尿病血管并发症的重要发病机制。如何在降血糖的同时调整糖尿病患者体内的氧化应激状态成为糖尿病治疗的新思路。

## ■ 相关报道

最近的研究表明, 正常生理状态下细胞内蛋白质能发生谷胱甘肽化, 其中这些蛋白质中很多是介导细胞内氧化还原信号转导中的重要蛋白质。

# ■创新盘点

本文以分离培养的人脐静脉内皮细胞为实验模型,通过观察细胞生长形态、增殖状况、凋亡反应以及信号转导通路中重要功能蛋白水平等方面的变化,证明了Grx1蛋白对高糖环境所诱导血管内皮细胞凋亡具有一定保护作用,并初步探讨了相关作用机制。

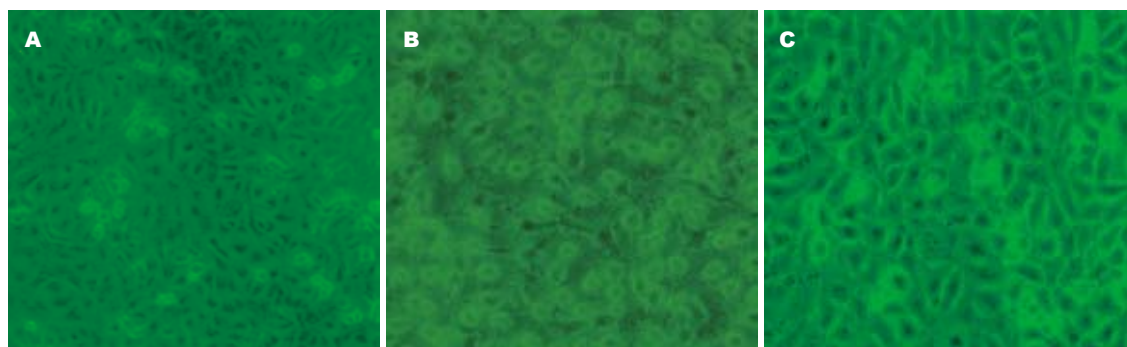


图1 倒置显微镜下各组细胞的形态。A: 正常对照组; B: 高糖组; C: Grx1预保护组。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞常规培养及分组: 人脐静脉内皮细胞在含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中, 于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 用2.5 g/L胰酶-0.2 g/L EDTA消化、传代。取增殖旺盛、状态良好的细胞用于实验研究。细胞分组: 正常对照组(Glu 5 mmol/L), 高糖组(损伤组加入终浓度Glu 25 mmol/L)、Grx1预保护组(高糖+Grx组: Glu 25 mmol/L+hGrx1), hGrx1提前6 h加入至终浓度15 mg/L。

1.2.2 hGrx1对高糖损伤的人脐静脉内皮细胞形态学观察: 人脐静脉内皮细胞接种于25 mL培养瓶中, 每瓶含 $6.0 \times 10^5$ 个细胞, 培养24 h后, 细胞分组及给药同上, 每组3瓶, 48 h后倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.3 MTT法检测细胞活力: 将人脐静脉内皮细胞以 $2 \times 10^4$ 个/孔的密度接种于96孔培养板中, 用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液于37℃、含50 mL/L CO<sub>2</sub>的孵箱中培养24 h, 弃培养液, 换不含血清的新鲜DMEM培养液培养12 h, 使细胞同步化。分组给药同上, 每组设6个平行孔, 继续培养48 h, 加入50  $\mu$ L新鲜配制的1 g/L MTT, 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养4 h后, 弃去培养液, 每孔加入100  $\mu$ L DMSO, 37℃轻摇10 min溶解紫色结晶。30 min内置酶标仪于490 nm波长下测定吸光度(A)值, 以计算细胞活力。细胞活力百分数 = 实验组吸光度平均值/对照组吸光度平均值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率: 收集细胞, 加入500  $\mu$ L的Binding Buffer悬浮细胞; 加入5  $\mu$ L Annexin V/FITC混匀后, 加入5  $\mu$ L Propidium Iodide, 混匀; 室温避光反应15 min; 流式细胞仪上机分析。流式细胞仪检测: 采用15 mW氩离子激光, 激发光波长为488 nm, 发射波长为530 nm, CELLQuest软件自动获取 $10^4$ 个细胞/样品。流式细胞仪定量分析, 计算annexin V-FITC及PI双染

阳性细胞百分含量。

1.2.5 Western blot分析p-JNK、p-Akt表达水平: 收集并裂解细胞, 提取蛋白。以每泳道40  $\mu$ g总蛋白上样进行10% SDS-PAGE电泳, 空白孔加入1 $\times$ SDS上样缓冲液。电泳结束后转移至NC膜上, 1 $\times$ TBST洗膜后, 用含TBST配制的50 g/L的脱脂奶粉37℃封闭90 min, 1:1000的兔抗p-JNK、抗p-Akt抗体4℃过夜孵育。之后, 1:2000的HRP-标记的羊抗兔抗体室温下孵育1 h, 1 $\times$ TBST洗膜, ECLplus检测。同时以 $\beta$ -actin作内参照, 采用YLN2000凝胶成像普通染色分析系统对Western blot结果进行分析。

统计学处理 运用SPSS13.0软件分析数据。计量资料的数据以mean $\pm$ SD表示, 组间差异采用 $t$ 检验进行处理,  $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Grx1对高糖损伤的人脐静脉内皮细胞形态学影响 正常对照组细胞贴壁生长并呈鹅卵石样规则排列, 细胞呈短梭形或多角形镶嵌排列, 说明细胞生长状态良好, 增殖旺盛; 损伤组细胞排列紊乱, 细胞间隙增宽, 细胞联结解离、核固缩、部分胞质肿胀、严重者细胞脱落; 在高糖作用下的Grx1保护组细胞形态基本接近于对照组(图1)。

2.2 Grx1对高糖损伤的人脐静脉内皮细胞活性的影响 损伤组细胞与正常组进行比较, 差异有统计学意义( $t = 0.039$ ,  $P < 0.05$ ); 以高糖损伤组为对照, 在有Grx1预保护的细胞中, 细胞的存活率显著提高, 可由高糖损伤组的 $59\% \pm 2\%$ 增加到 $78\% \pm 3\%$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图2)。

2.3 流式细胞仪对各组细胞凋亡的定量分析 图3中左下象限为活细胞(FITC-/PI-), 右下象限为早期凋亡细胞(FITC+/PI-), 右上象限为晚期凋亡细胞(FITC+/PI+); 流式细胞仪检测结果显示, 高糖组可明显使细胞凋亡, 而Grx1预保护组



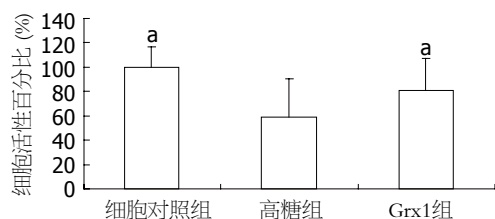


图2 Grx1对高糖损伤的人脐静脉内皮细胞活性的影响。  
\* $P < 0.05$  vs 高糖组。

表1 各组血管内皮细胞凋亡率比较 ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SD, %)

分组	早期凋亡率	晚期凋亡率
正常对照组	0.1360 $\pm$ 0.0051 <sup>a</sup>	0.1869 $\pm$ 0.0707 <sup>a</sup>
高糖组	0.4156 $\pm$ 0.0374	0.3089 $\pm$ 0.0083
Grx1预保护组	0.2360 $\pm$ 0.0156 <sup>a</sup>	0.2433 $\pm$ 0.0278 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 高糖组。

#### ■应用要点

Grx1可通过抑制JNK激活及激活Akt通路来拮抗高糖诱导的内皮细胞凋亡。

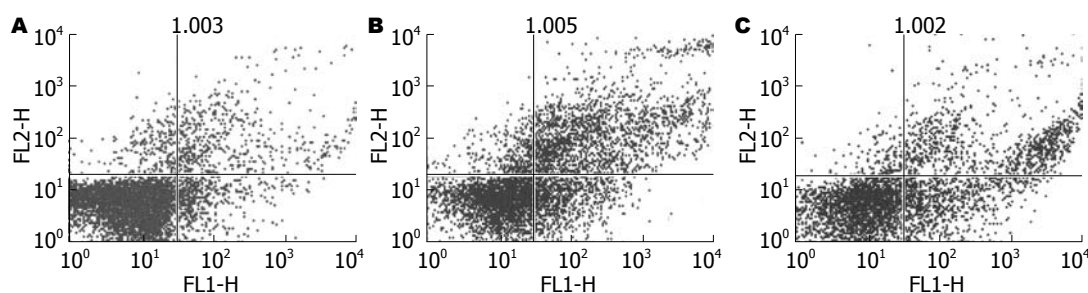


图3 流式细胞仪对各组细胞凋亡的定量分析。A: 正常对照组; B: 高糖组; C: Grx1预保护组。

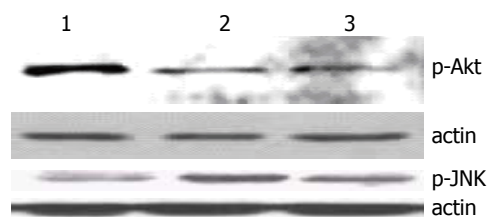


图4 Western blot分析内皮细胞中p-JNK、p-Akt表达水平。1: 正常对照组; 2: 高糖组; 3: Grx1预保护组。

凋亡细胞明显减少。定量分析结果表明体外培养的血管内皮细胞经高糖模拟损伤后无论是早期还是晚期凋亡率明显高于正常组细胞, 加入Grx1预保护后凋亡率发生相应变化, 其早期和晚期凋亡率均较模型组明显降低( $P < 0.05$ ), 进一步证实了Grx1具有抗凋亡效应(表1, 图3)。

**2.4 Western blot分析Grx1对高糖诱导的内皮细胞中p-JNK、p-Akt表达水平的影响** 与正常对照组相比, 高糖组p-JNK相对含量明显增多( $0.64 \pm 0.07$  vs  $0.48 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ), 而高糖组p-Akt水平较正常对照组显著降低( $0.69 \pm 0.11$  vs  $1.29 \pm 0.035$ ,  $P < 0.01$ )。同时, hGrx1保护后p-JNK蛋白水平较高糖组显著降低( $0.39 \pm 0.05$  vs  $0.64 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ); 而p-Akt蛋白水平较高糖组显著增高( $1.07 \pm 0.13$  vs  $0.69 \pm 0.11$ ,  $P < 0.01$ , 图4)。

### 3 讨论

研究表明, 高糖可以抑制内皮细胞生长, 延长细胞周期, 诱导内皮细胞凋亡, 这可能在糖尿病进展中起重要作用。因此, 抑制高糖诱导的内皮细

胞凋亡, 可能是防治糖尿病血管并发症的有效途径。糖尿病的慢性高血糖和急性高血糖均能促进组织中氧化应激的产生。动物实验显示, 血管内皮细胞损伤为糖尿病血管病变的原发性因素, 高血糖可引起氧化应激并导致细胞凋亡。细胞凋亡可从多条途径和多个层面进行调控, 若能阐明高血糖致血管内皮细胞凋亡的机制, 则可进行早期干预, 预防或延缓糖尿病血管并发症的发生发展。

最近的研究表明, 正常生理状态下细胞内蛋白质能发生谷胱甘肽化, 其中这些蛋白质中很多是介导细胞内氧化还原信号转导中的重要蛋白质<sup>[2]</sup>。MEKK1(MAPK/ERK kinase kinase, MAP3K)是一种重要的蛋白激酶, 参与细胞增殖、分化与凋亡, 在ERK1/2、JNK、p38MAPK途径中均发挥作用。Cross和Templeton发现用甲萘醌作用于细胞, 可以诱导MEKK1激酶结构域中Cys1238发生谷胱甘肽化, 从而抑制他的激活<sup>[11]</sup>。

凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)和Akt(一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶)均是细胞信号转导途径中的重要激酶。二者均受磷酸化-去磷酸化调控, 且存在相互作用, Akt通过磷酸化ASK1的Ser83而抑制其活性<sup>[12]</sup>。磷酸酶-A(PP-A)可使Akt去磷酸化失活, PP-A可受谷胱甘肽化调节<sup>[7]</sup>。因此ASK1和Akt的活性可直接或间接地受谷胱甘肽化的调控。

谷胱甘肽化的逆反应称为去谷胱甘肽化, 这一过程可由体内的巯基-二硫键氧化还原酶催



# 同行评价

本研究设计合理, 创新性强, 结果可靠, 具有较好的学术价值。

化, 这些酶主要包括Grx, 硫氧还蛋白(Trx)以及蛋白质二硫键异构酶(PDI)。研究表明, 这3种酶中, Grx催化Pr-S-S-G还原的效力及特异性最高。细胞内氧化还原调控主要是由谷氧还蛋白系统和硫氧还蛋白系统完成。研究者发现了糖尿病相关的多个氧化应激标志物如血液中的Trx等与血糖升高相关<sup>[13-14]</sup>。但研究发现葡萄糖终浓度为5 mmol/L和25 mmol/L的培养基均可导致rMC-1细胞中Grx的选择性上调(与Trx相比), 并且Shelton *et al*通过向rMC-1细胞中以腺病毒为载体转染Grx1和RNAi技术发现Grx1可促进NF- $\kappa$ B的转位和细胞内黏附分子ICAM-1的表达, 提示Grx可能成为抑制糖尿病视网膜病变的新的治疗靶点<sup>[15]</sup>。

Grx目前被认为是细胞内一种重要的抗凋亡因子, 在调节细胞生长和凋亡的多条信号通路中发挥作用<sup>[16-18]</sup>。研究还发现, Grx1通过调节Akt的氧化还原状态可阻止由过氧化氢诱导的细胞凋亡; Grx也可以通过NF- $\kappa$ B途径抑制神经递质多巴胺(DA)对细胞氧化应激损伤所介导的凋亡。本实验发现Grx1保护组细胞, 其细胞形态较损伤组明显改善; 初步证实Grx1在一定程度上能抵御高糖对细胞的氧化损伤; MTT实验表明, Grx1保护组细胞的存活率较损伤组细胞显著提高, 而与正常对照组比较有所降低, 表明Grx1能有效增加细胞的增殖活力; 即Grx1对高糖所诱导的人脐静脉内皮细胞损伤有明确的保护作用; 流式细胞术检测显示, 凋亡细胞明显减少, 进一步证实了Grx1具有抗凋亡效应。Western blot显示在Grx1存在下, p-Akt表达水平显著升高, p-JNK表达被抑制, 说明Grx1通过调节JNK及Akt磷酸化活性拮抗高糖诱导的内皮细胞凋亡。

Grx1作为细胞中一种重要的抗氧化剂和细胞氧化还原信号传导途径中的重要调控因子, 对其作用机制的阐明将有助于探讨氧化应激和谷胱甘肽化蛋白质在各种相关疾病中的作用, 为今后hGrx1临床应用奠定基础, 这对于人类氧化应激相关疾病的预防和治疗有重要的意义。

## 参考文献

- 1 刘云峰, 杨川, 程桦, 黎明涛. 高糖诱导人内皮细胞凋亡及其JNK、AKT信号途径的作用机制. 基础医学与临床 2005; 25: 163-168
- 2 Ghezzi P, Bonetto V, Fratelli M. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 964-972
- 3 Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-

Donne I. S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 201-212

- 4 Gul M, Atalay M, Gul HI, Nakao C, Lappalainen J, Hanninen O. The effects of some Mannich bases on heat shock proteins HSC70 and GRP75, and thioredoxin and glutaredoxin levels in Jurkat cells. *Toxicol In Vitro* 2005; 19: 573-580
- 5 Xiao R, Lundström-Ljung J, Holmgren A, Gilbert HF. Catalysis of thiol/disulfide exchange. Glutaredoxin 1 and protein-disulfide isomerase use different mechanisms to enhance oxidase and reductase activities. *J Biol Chem* 2005; 280: 21099-21106
- 6 Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renström E, Schuit FC. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes* 2005; 54: 2132-2142
- 7 Murata H, Ihara Y, Nakamura H, Yodoi J, Sumikawa K, Kondo T. Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J Biol Chem* 2003; 278: 50226-50233
- 8 Daily D, Vlamis-Gardikas A, Offen D, Mittelman L, Melamed E, Holmgren A, Barzilai A. Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF-kappa B via Ref-1. *J Biol Chem* 2001; 276: 1335-1344
- 9 李民, 冯银刚, 高杨, 吴庆余. 谷氧还蛋白系统及其对细胞氧化还原态势的调控. 生物物理学报 2007; 23: 343-350
- 10 张春晶, 周宏博, 邹朝霞, 董钦, 于海涛. 人谷氧还蛋白基因的分子克隆及表达. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1558-1561
- 11 Cross JV, Templeton DJ. Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem J* 2004; 381: 675-683
- 12 Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 893-901
- 13 张军霞, 向光大. 糖尿病与抗氧化应激治疗. 临床内科杂志 2007; 24: 790-792
- 14 Thirunavukkarasu M, Penumathsu SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, Bagchi D, Das DK, Maulik N. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 720-729
- 15 Shelton MD, Kern TS, Mיעyal JJ. Glutaredoxin regulates nuclear factor kappa-B and intercellular adhesion molecule in Müller cells: model of diabetic retinopathy. *J Biol Chem* 2007; 282: 12467-12474
- 16 Song JJ, Rhee JG, Suntharalingam M, Walsh SA, Spitz DR, Lee YJ. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H2O2. *J Biol Chem* 2002; 277: 46566-46575
- 17 Song JJ, Lee YJ. Effect of glucose concentration on activation of the ASK1-SEK1-JNK1 signal transduction pathway. *J Cell Biochem* 2003; 89: 653-662
- 18 Daily D, Vlamis-Gardikas A, Offen D, Mittelman L, Melamed E, Holmgren A, Barzilai A. Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by dual activation of the ras-phosphoinositide 3-kinase and jun n-terminal kinase pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 21618-21626

# 乳源 $\beta$ -酪啡肽7对大鼠葡萄糖吸收的影响及其作用机制

宋晓丹, 左伟勇, 范英兰, 张源淑

宋晓丹, 范英兰, 张源淑, 南京农业大学农业部生理生化重点开放实验室 江苏省南京市 210095

左伟勇, 江苏畜牧兽医职业技术学院 江苏省泰州市 210031  
宋晓丹, 2006级硕士在读, 主要从事生物活性肽的研究。

山东省中青年科学家奖励基金资助项目, No. 2006BSA12001

作者贡献分布: 宋晓丹与张源淑对此文所作贡献均等; 此课题由张源淑与宋晓丹设计; 课题资助由左伟勇提供; 研究过程由宋晓丹与范英兰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张源淑提供; 数据分析由宋晓丹完成; 本文写作由宋晓丹与张源淑共同完成。

通讯作者: 张源淑, 教授, 210095, 江苏省南京市, 南京农业大学农业部生理生化重点开放实验室。zhangyuanshu@njau.edu.cn  
电话: 025-84379184

收稿日期: 2009-03-04 修回日期: 2009-03-24

接受日期: 2009-03-30 在线出版日期: 2009-07-08

## Effect of $\beta$ -casomorphin-7 from milk on the absorption of glucose *in vitro* and its mechanism

Xiao-Dan Song, Wei-Yong Zuo, Ying-Lan Fan, Yuan-Shu Zhang

Xiao-Dan Song, Ying-Lan Fan, Yuan-Shu Zhang, the Animal Physiology and Biochemistry Laboratory of the Ministry of Agriculture in Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Wei-Yong Zuo, College of Animal Husbandry and Veterinary in Jiangsu, Taizhou 210031, Jiangsu Province, China

Supported by: the Science Foundation for Young Scholars of Shandong Province, No. 2006BSA12001

Correspondence to: Professor Yuan-Shu Zhang, the Animal Physiology and Biochemistry Laboratory of the Ministry of Agriculture in Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China. zhangyuanshu@njau.edu.cn

Received: 2009-03-04 Revised: 2009-03-24

Accepted: 2009-03-30 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To detect the influence of major peptide  $\beta$ -casomorphin-7 ( $\beta$ -CM7) from milk on the absorption of glucose, and its mechanism in the diet and healthy food.

**METHODS:** In this study healthy adult SD rats were divided into control group (0 mol/L  $\beta$ -CM7), low-dose group ( $7.5 \times 10^{-7}$  mol/L  $\beta$ -CM7), middle-dose group ( $7.5 \times 10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -CM7) and high-dose group ( $7.5 \times 10^{-5}$  mol/L  $\beta$ -CM7). Reverted sacs of adult rats *in vitro* were performed which were dipped into culture sample includ-

ing  $\beta$ -CM7 and glucose and we designed a few tests: (1) the concentration of glucose in reverted sacs was detected using oxidase method of glucose; (2) the activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in small intestinal mucosa was observed with colorimetric method; (3) the mRNA expressions of sodium-glucose transporter (SGLT-1) and facilitative glucose transporter (GLUT-2) in small intestinal mucosa were analyzed using the Real-time PCR.

**RESULTS:** Compared with control group,  $\beta$ -CM7 of  $7.5 \times 10^{-7}$ – $7.5 \times 10^{-5}$  mol/L significantly induced glucose concentration *in vitro* (1.09, 1.24, 1.12 *vs* 1.74,  $P = 0.01, 0.04, 0.02$ ); the activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  was reduced (85.73, 112.06, 109.68 *vs* 114.93,  $P = 0.004, 0.73, 0.54$ ); the mRNA expressions of SGLT-1 and GLUT-2 were also significantly reduced (0.77, 0.58, 0.46 *vs* 1.11,  $P = 0.20, 0.05, 0.02$ ; 0.50, 0.66, 0.85 *vs* 1.14,  $P = 0.30, 0.14, 0.03$ ), compared with control group.

**CONCLUSION:** The present data demonstrated that  $\beta$ -CM7 was able to reduce the absorption of glucose through inhibiting activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  and the mRNA expression level of SGLT-1, GLUT-2 in small intestine of rats.

**Key Words:**  $\beta$ -Casomorphin-7; Rats; Absorption of glucose;  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ; Sodium/glucose cotransporter-1; Facilitative glucose transporter-2

Song XD, Zuo WY, Fan YL, Zhang YS. Effect of  $\beta$ -casomorphin-7 from milk on the absorption of glucose *in vitro* and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1947-1951

## 摘要

**目的:** 探讨乳源活性肽 $\beta$ -酪啡肽-7( $\beta$ -Casomorphin-7,  $\beta$ -CM7)应用于食品时对葡萄糖吸收的影响及其作用机制。

**方法:** 选用健康成年SD大鼠, 分为对照组(0 mol/L  $\beta$ -CM7), L低剂量组、M中剂量组、H高剂量组(终浓度分别为 $7.5 \times 10^{-7}$ ,  $7.5 \times 10^{-6}$ ,  $7.5 \times 10^{-5}$  mol/L)。利用翻转离体小肠囊模型进行实验: (1)葡萄糖氧化酶法测定翻转后小肠内液葡萄糖含量; (2)比色法测定小肠

## ■背景资料

如何对糖尿病患者进行治疗和日常保健, 特别是随着功能性食物的开发和研究, 研究食物源性生物活性肽等腔内因子对血糖的影响作用及机制开始受到人们的关注。乳蛋白主要有酪蛋白和乳清蛋白,  $\beta$ -酪啡肽-7是 $\beta$ -酪蛋白经酶解释放出的乳源活性肽。已有研究报道乳清蛋白能够降低血糖, 其机制还不明确, 也有发现 $\beta$ -酪啡肽-7能够降低血糖, 但相关深入研究还未见报道。本研究探讨了乳中 $\beta$ -酪啡肽-7应用于饮食和健康保健食品中对葡萄糖吸收的影响及其作用机制。

## ■同行评议者

曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

## ■研发前沿

富含类降血糖等功能肽的乳及其产品还未有明确的报道,目前的研究尚处在体外阶段,进一步的体内研究亟待进行。

黏膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力;(3)荧光定量PCR法分析小肠黏膜组织中钠葡萄糖共转运载体(SGLT-1)和葡萄糖协助扩散转运载体(GLUT-2)mRNA的表达。

**结果:**在离体环境下 $\beta\text{-CM7}$ 在 $7.5 \times 10^{-7}$ ~ $7.5 \times 10^{-5}$  mol/L浓度下对葡萄糖的吸收均有一定的抑制作用(1.09 mol/L, 1.24 mol/L, 1.12 mol/L vs 1.74 mol/L,  $P = 0.01, 0.04, 0.02$ ),能够降低 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力(85.73, 112.06, 109.68 vs 114.93,  $P = 0.004, 0.73, 0.54$ );荧光定量PCR结果发现:与对照组相比, $\beta\text{-CM7}$ 能够显著降低SGLT-1及GLUT-2 mRNA水平(0.46, 0.58, 0.77 vs 1.11,  $P = 0.20, 0.05, 0.02$ ; 0.50, 0.66, 0.85 vs 1.14,  $P = 0.30, 0.14, 0.03$ )。

**结论:** $\beta\text{-CM7}$ 可以通过降低 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力及下调SGLT-1、GLUT-2 mRNA水平,减少大鼠小肠对葡萄糖的吸收。

**关键词:** $\beta\text{-酪啡肽-7}$ ; 大鼠; 葡萄糖吸收;  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶; 钠葡萄糖共转运载体-1; 葡萄糖协助扩散转运载体-2

宋晓丹, 左伟勇, 范英兰, 张源淑. 乳源 $\beta\text{-酪啡肽-7}$ 对大鼠葡萄糖吸收的影响及其作用机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1947-1951  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1947.asp>

## 0 引言

糖是生命活动中的重要能源,机体所需能量的70%是食物中的糖所提供的。人体每日所摄入的淀粉类食物(占食物的大部分),最终分解为葡萄糖,然后被吸收进入血液循环。机体吸收葡萄糖的整个过程由2个家族的跨膜转运载体蛋白-钠葡萄糖共转运载体系统(sodium/glucose cotransporters, SGLTs)和葡萄糖协助扩散转运载体系统(facilitative glucose transporters, GLUTs)来完成<sup>[1-2]</sup>。其中起主导作用的是SGLT-1,该蛋白在细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶作用下逆浓度梯度并偶联 $\text{Na}^+$ 主动转运葡萄糖,同时消耗能量<sup>[3-4]</sup>。SGLT-1载体数量的多少,是葡萄糖吸收的决定因素。GLUT-2是以易化扩散方式顺葡萄糖的浓度梯度从胞外将葡萄糖运到胞内,其转运过程不消耗能量<sup>[5]</sup>。如此,肠道葡萄糖的跨膜吸收主要涉及SGLT-1、GLUT-2及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶3个蛋白。

$\beta\text{-酪啡肽-7}$ ( $\beta\text{-casomorphin7}$ ,  $\beta\text{-CM7}$ )是 $\beta\text{-酪}$ 蛋白经酶降解释放出的一类最具代表性的乳源

活性肽,1979年由Brantl *et al*<sup>[6]</sup>首先从牛乳酪蛋白的酶解产物中分离出,并证明其产物具有阿片肽活性,能够被纳洛酮所逆转。Froetsehel *et al*<sup>[7]</sup>已证实 $\beta\text{-CMs}$ 能在动物胃肠道被完整地吸收,产生与内源性阿片肽类似的生理调节功能如刺激胰岛素、生长抑素释放,调节肠运动,提高采食量,促进肠道水分与电解质的吸收,此外还影响动物的行为、呼吸、睡眠等<sup>[8-9]</sup>。根据其刺激胰岛素分泌的作用,推测其可能有降血糖作用。宗亚峰<sup>[10]</sup>的研究证实 $\beta\text{-CM7}$ 体外能够抑制小肠对葡萄糖的吸收,但其作用机制还不明确。为了探讨主要的乳源活性肽 $\beta\text{-CM7}$ 应用于饮食和保健食品中对葡萄糖吸收的影响及其作用机制,本研究以大鼠为研究对象,采用体外翻转的离体小肠囊模型,观察了 $\beta\text{-CM7}$ 对小肠葡萄糖吸收的影响,并从影响葡萄糖转运的主要载体SGLT-1、GLUT-2及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶3个方面探讨其对葡萄糖吸收影响的机制,为挖掘酪啡肽等食物源活性肽辅助降血糖的作用提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $\beta\text{-CM7}$ (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile)色谱纯(纯度>97%),美国凤凰药业有限公司产品;葡萄糖为上海伯奥公司产品;葡萄糖检测试剂盒、ATP酶试剂盒购自南京建成生物工程研究所;荧光酶购自南京博飞有限公司;PCR引物由上海英俊公司合成;MMLV反转录酶, RNA抑制剂,随机引物为南京生兴生物工程研究所。实验动物由上海实验动物中心提供。实验鼠用颗粒饲料购于南京协同医药生物工程有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 翻转离体小肠囊的制作:**SD大鼠,雌雄不拘,质量200 g左右,自由采食和饮水,断颈处死后,取出小肠,参照陈其才 *et al*<sup>[11]</sup>的实验方法制作翻转离体小肠囊模型。

**1.2.2 不同浓度 $\beta\text{-CM7}$ 对离体小肠葡萄糖吸收的影响:**翻转制作的离体小肠囊,剪去约10 cm左右的十二指肠,余下的小肠段用4℃预冷的无糖Kreb's液冲洗3次。取4段长约7 cm的小肠段,放在干净的滤纸上,吸取表面液体。用眼科镊将其黏膜面翻转出,一端固定于底部膨大的插管上,另一游离端用手术线扎紧,向肠囊内注入1 mL无糖Kreb's液。实验分为对照组(含0 mol/L  $\beta\text{-CM7}$ , 15 mmol/L葡萄糖的Kreb's液);实验组分为3个不同剂量组:L低剂量组、M中剂量组、H高剂量组,终浓度分别为 $7.5 \times 10^{-7}$  mol/L,  $7.5$

## ■相关报道

Blouet *et al*研究发现用富含乳清蛋白中主要成分的 $\alpha\text{-乳白蛋白}$ 配制成营养混悬液喂食雄性Wistar大鼠,其餐后2 h内的血糖明显低于其他蛋白配方饮食组大鼠的血糖。

表1 SGLT-1、GLUT-2目的基因和 $\beta$ -actin内标基因引物参数

基因	引物序列	产物(bp)
SGLT-1	正义引物 5'-CATTGCCATGGGTGGCTTC-3'	134
	反义引物 5'-GCTTGCCTCCAAATCGCTTC-3'	
GLUT-2	正义引物 5'-CCAGCCTGTGTATGCAACCATC-3'	156
	反义引物 5'-ACCAGTCCCAGCGACATGAAG-3'	
$\beta$ -actin	正义引物 5'-CCCTGTGCTGCTACCGA-3'	170
	反义引物 5'-ACAGTGTGGGTGACCCCGTC-3'	

$\times 10^{-6}$  mol/L和 $7.5 \times 10^{-5}$  mol/L的15 mmol/L葡萄糖的Kreb's液, 将肠囊放入预热的25℃无糖的Kreb's液中温浴10 min后, 转入37℃上述实验用的Kreb's液中立即通入氧气, 用100  $\mu$ L微量进样器每隔10 min吸取肠囊内液体, 再补充同体积的无糖Kreb's液, 总时间为60 min. 按照试剂盒说明检测小肠囊内溶液的葡萄糖浓度.

**1.2.3  $\beta$ -CM7对小肠 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活力的影响:**将上述肠囊取出, 用干净滤纸吸干水分, 用刀片刮取肠囊上黏膜, 一部分按照试剂盒说明检测其 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活力; 另一部分于-70℃冰箱中保存备用. ATP酶可分解ATP生成ADP及无机磷, 测定无机磷的量可判断ATP酶活力的高低. 本研究规定: 每小时每毫克组织蛋白的组织中ATP酶分解ATP产生1  $\mu$ mol无机磷的量为一个ATP酶活力单位, 即 $\mu$ mol Pi/(mg protein·h).

**1.2.4  $\beta$ -CM7对小肠上皮SGLT-1及GLUT-2 mRNA表达的影响:** (1)样品总RNA提取和RNA电泳: 采用TRIzol(北京赛百盛基因技术有限公司)一步抽提法提取小肠黏膜的总RNA, 紫外比色法测定总RNA的浓度和纯度(Eppendorf BioPhotometer 260 nm). (2)反转录: 分别准确量取1 g/L各样品的总RNA 2  $\mu$ L进行反转录. 建立各样品RNA的cDNA(RT product). 反转录反应体积为25  $\mu$ L, 其中含Oligo dT(18)5  $\mu$ mol/L引物, 4 mmol/L dNTP, 加DEPC水至10  $\mu$ L, 70℃变性5 min, 冰上冷却. 再加入8 U RNA酶抑制剂, 100 U反转录酶, 5  $\mu$ L 5 $\times$ RT Buffer(含250 mmol/L Tris-HCl pH8.3, 150 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 375 mmol/L KCl, 50 mmol/L DTT), 补充DEPC水至25  $\mu$ L, 37℃反应60 min, 95℃变性5 min, 反转录产物(RT Products)-20℃保存备用. (3)目的基因引物设计: PCR引物采用Primer 5.0软件设计, 由上海英俊技术有限公司合成, 引物序列及参数见表1. (4)SGLT-1和GLUT-2 mRNA的Real-time PCR分析: 以 $\beta$ -actin管家基因作为内标, 对SGLT-1和GLUT-2进行相对定量分析. PCR反应在

Mx3000P Real-time PCR仪(Stratagene, USA)上进行, 使用的荧光酶为SYBR Green Real-time PCR Master Mix(ToYoBo, Japan). PCR反应总体系为25  $\mu$ L. 其中引物2  $\mu$ L(浓度5 pmol), SYBR Green 12.5  $\mu$ L; 三蒸水8.5  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L; 以最小的Ct值和最高的荧光值( $\Delta$ Rn)及溶解曲线不出现非特异性峰为标准, 分别对退火温度、引物浓度进行优化. 最终扩增反应按94℃预变性1 min, 94℃变性20 s, 62℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共45圈进行, SGLT-1、GLUT-2基因反应条件相同.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件进行统计, 差异显著性检验采用独立样本t检验和单因子方差分析(One way ANOVA, LSD), 所有数值以mean $\pm$ SD表示.

## 2 结果

**2.1  $\beta$ -CM7对离体肠囊葡萄糖吸收的影响** 在没有 $\beta$ -CM7存在的情况下, 可以看出小肠囊对葡萄糖的吸收在60 min内一直呈上升趋势, 说明小肠囊对葡萄糖的吸收没有达到饱和. 有 $\beta$ -CM7存在时, 发现小肠囊对葡萄糖的吸收趋于平缓, 即 $\beta$ -CM7对小肠葡萄糖的吸收有一定的抑制作用, 与对照组比较, 不同浓度( $7.5 \times 10^{-7}$ ,  $7.5 \times 10^{-6}$ ,  $7.5 \times 10^{-5}$  mol/L)的 $\beta$ -CM7对小肠囊葡萄糖吸收均起到抑制作用(1.09, 1.24, 1.12 vs 1.74,  $P = 0.01, 0.04, 0.02$ , 图1).

**2.2  $\beta$ -CM7对小肠 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活力的影响** 葡萄糖跨膜转运是细胞摄取葡萄糖过程的主要限速步骤之一. 而 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶为钠葡萄糖共运载体提供能量, 可以反映机体对葡萄糖吸收的能力. 与对照组相比, 不同浓度( $7.5 \times 10^{-7}$ ,  $7.5 \times 10^{-6}$ ,  $7.5 \times 10^{-5}$  mol/L)的 $\beta$ -CM7能够降低 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活力(85.73, 112.06, 109.68 vs 114.93,  $P = 0.004, 0.73, 0.54$ , 图2).

**2.3  $\beta$ -CM7对小肠SGLT-1及GLUT-2 mRNA水平的影响** SGLT-1载体在机体葡萄糖吸收中起着主导作用, 其载体数量的多少, 是葡萄糖吸收的决

## ■创新盘点

本研究通过制作翻转离体小肠囊模型研究 $\beta$ -酪啡肽-7对葡萄糖吸收影响, 首次证实乳中 $\beta$ -CM7可以通过影响小肠葡萄糖吸收关键因子, 抑制小肠葡萄糖的转运, 从而减少小肠对葡萄糖的吸收, 可能具有降低血糖的作用.



## ■应用要点

β-CM7可以通过降低Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力及下调SGLT-1、GLUT-2 mRNA水平,减少大鼠小肠对葡萄糖的吸收。

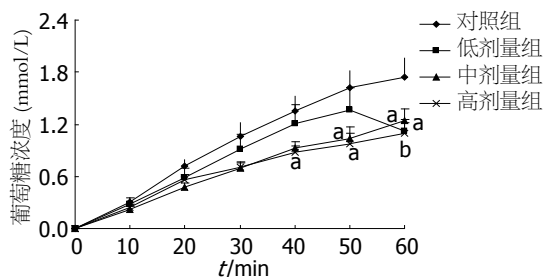


图1 β-CM7对小肠葡萄糖吸收的影响( $n = 9$ ). <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

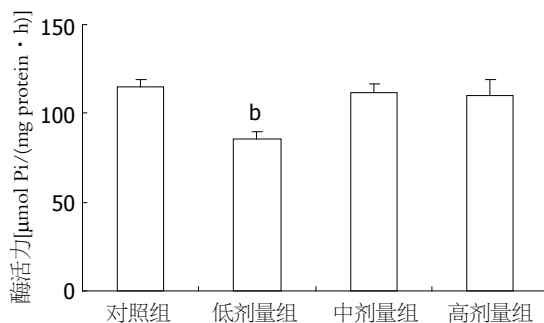


图2 β-CM-7对小肠Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活力的影响( $n = 6$ ). <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

定因素. 与对照组相比, 不同剂量β-CM7实验组均可以降低小肠黏膜SGLT-1 mRNA水平(0.46, 0.58, 0.77 vs 1.11,  $P = 0.05, 0.17, 0.67$ ). GLUT-2载体在葡萄糖转运过程中可以顺葡萄糖浓度梯度协助转运其进入组织间隙液. 与对照组相比, 不同剂量β-CM7实验组均可以降低小肠黏膜GLUT-2 mRNA水平(0.50, 0.66, 0.85 vs 1.14,  $P = 0.03, 0.14, 0.30$ , 图3-4).

### 3 讨论

随着功能性食物或饲料的开发和研究, 研究食物源性生物活性肽等腔内因子对血糖的影响作用及机制开始受到人们的关注. 乳作为哺乳动物提供优质的蛋白质来源, 主要的钙磷来源、乳源活性肽的重要来源受到优先关注. 有一些相关的研究, 如日本国立健康营养研究所最新研究发现, 同时食用米饭和牛奶可以降低血糖指标, 对防治糖尿病很有帮助, 但作用的有效成分并不明确. Blouet *et al*<sup>[12]</sup>研究发现用富含乳清蛋白中主要成分的α-乳白蛋白配制成营养混悬液喂食雄性Wistar大鼠, 其餐后2 h内的血糖明显低于其他蛋白配方饮食组大鼠的血糖. Fird *et al*<sup>[13]</sup>对14名II型糖尿病患者进行的实验观察中发现, 乳清蛋白能降低其早餐后2 h和午餐后3 h内的血糖升高程度. 但就现有研究看来,

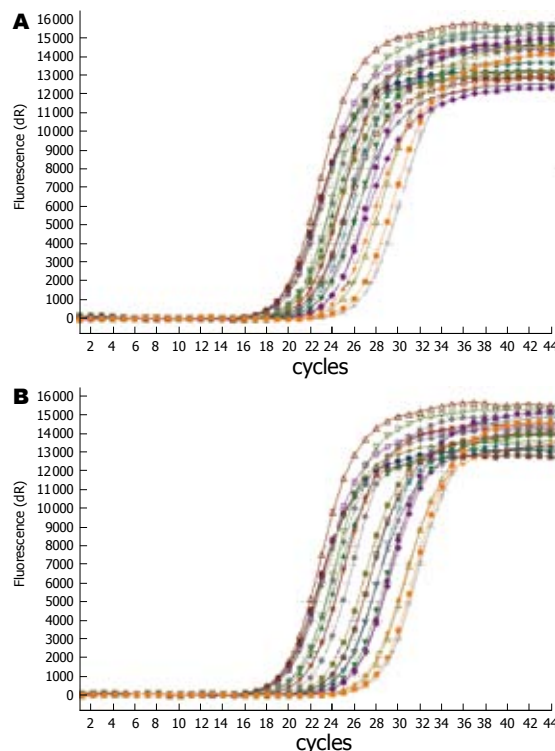


图3 不同浓度的β-CM7对离体小肠SGLT-1及SGLT-2 mRNA水平的RT-PCR示意图. A: SGLT-1; B: GLUT-2.

乳清蛋白降低血糖的具体机制还不甚清楚, 有待继续深入研究.

β-CM7是由酪蛋白酶解产生的一类肽, 是乳源活性肽的重要成员之一, 其结构为Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile. 因其相对分子质量较小, 在小肠内可以以完整肽段的形式被机体吸收, 且不会引起机体的免疫排斥反应, 加之其食物源的安全性, 已越来越多地引起人们的重视<sup>[14]</sup>. 宗亚峰博士研究发现β-CM7在62.5、125、250 mg/L浓度下, 对小肠吸收葡萄糖的量均有一定抑制作用, 其抑制效应呈现一定的剂量关系<sup>[10]</sup>, 有关的机制不详. 在本研究中, 我们发现β-CM7在浓度为 $7.5 \times 10^{-7}$ – $7.5 \times 10^{-5}$  mol/L浓度范围内均能够抑制小肠对葡萄糖的吸收, 这一结果与宗亚峰博士的结果相一致.

葡萄糖在小肠黏膜的吸收机制已基本阐明, 在葡萄糖的吸收转运过程中, 起主导作用的是钠/葡萄糖共转运载体1(sodium/glucose cotransporter 1, SGLT-1). 肠道中的葡萄糖是通过位于肠细胞膜上钠/葡萄糖共转运载体进行主动转运和细胞旁路进行的被动转运的2种方式, 从十二指肠到回肠的肠轴上分布有不同的钠/葡萄糖共转运载体亚型. SGLT-1载体在空肠绒毛细胞膜顶部完全表达, 直接参与D-葡萄糖的

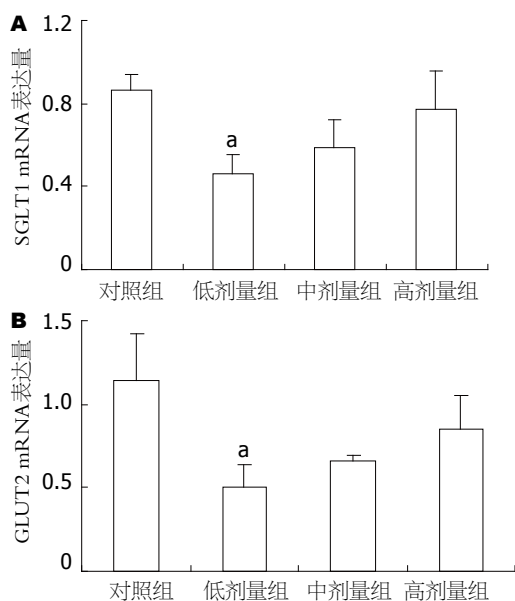


图 4 不同浓度的 $\beta$ -CM7对离体小肠囊SGLT-1及GLUT-2 mRNA水平的影响( $n = 6$ )。A: SGLT-1; B: GLUT-2,  $^aP < 0.05$  vs 对照组。

转运。在葡萄糖转运过程中, 首先由位于刷状缘的 SGLT-1与 $\text{Na}^+$ 和葡萄糖耦联, 形成 $\text{Na}^+$ 载体-葡萄糖复合物, 顺 $\text{Na}^+$ 的浓度梯度进入细胞,  $\text{Na}^+$ 被 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 泵出, 以维持细胞内外 $\text{Na}^+$ 的浓度平衡; 随着肠黏膜细胞内葡萄糖的聚集, 由位于基底膜的协助扩散转运载体GLUT-2, 顺葡萄糖浓度梯度协助转运其进入组织间隙液<sup>[15-17]</sup>。本研究通过制作离体肠囊, 结果发现 $\beta$ -CM7可以降低 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力, 与对照组相比, SGLT-1、GLUT-2 mRNA水平均下降, 特别是低浓度的 $\beta$ -CM7组, 差异极显著。本研究证实 $\beta$ -CM7可以通过降低 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力、下调SGLT-1和GLUT-2 mRNA表达, 抑制小肠葡萄糖的转运, 从而降低了小肠对葡萄糖的吸收。我们的研究结果也提示食用米饭和牛奶降低血糖指标, 乳中产生的 $\beta$ -CM7可能是其有效成分,  $\beta$ -CM7抑制小肠对葡萄糖的吸收可能是其主要机制。

#### 4 参考文献

- Gould GW, Holman GD. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* 1993; 295 (Pt 2): 329-341
- Joost HG, Wandel S, Schurmann A. Structure-

function relationship of glucose transporters catalyzing facilitated diffusion. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102: 434-438

- Dyer J, Daly K, Salmon KS, Arora DK, Kokrashvili Z, Margolskee RF, Shirazi-Beechey SP. Intestinal glucose sensing and regulation of intestinal glucose absorption. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1191-1194
- Zhou L, Cryan EV, D'Andrea MR, Belkowski S, Conway BR, Demarest KT. Human cardiomyocytes express high level of  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter 1 (SGLT1). *J Cell Biochem* 2003; 90: 339-346
- Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr* 2008; 28: 35-54
- Brantl V, Teschemacher H, Henschen A, Lottspeich F. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1979; 360: 1211-1216
- Froetschel MA. Bioactive peptides in digesta that regulate gastrointestinal function and intake. *J Anim Sci* 1996; 74: 2500-2508
- Ohtani S, Ogawara K, Higaki K, Kimura T. Casein enhances stability of peptides in intestinal lumen: role of digested products of casein. *Pharm Res* 2003; 20: 1746-1751
- Zoghbi S, Trompette A, Claustre J, El Homsy M, Garzón J, Jourdan G, Scoazec JY, Plaisancié P. beta-Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a mu-opioid pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G1105-G1113
- 宗亚峰.  $\beta$ 酪啡肽在胃肠道内的释放、吸收和稳定特性及其对胃肠机能的影响. 南京: 南京农业大学 2007: 104-107
- 陈其才, 严定友, 吴政星. 生理学实验. 第1版. 北京: 科学出版社, 1995: 110-113
- Blouet C, Mariotti F, Mikogami T, Tome D, Huneau JF. Meal cysteine improves postprandial glucose control in rats fed a high-sucrose meal. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 519-524
- Frid AH, Nilsson M, Hoist JJ, Björck IM. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 69-75
- 张源淑, 邓艳, 宋晓丹, 邹思湘. 酪啡肽及其酪蛋白水解肽对早期断奶仔猪分泌型免疫球蛋白A和细胞因子水平的影响. *动物营养学报* 2008; 20: 196-199
- Rodriguez SM, Guimaraes KC, Matthews JC, McLeod KR, Baldwin RL 4th, Harmon DL. Influence of abomasal carbohydrates on small intestinal sodium-dependent glucose cotransporter activity and abundance in steers. *J Anim Sci* 2004; 82: 3015-3023
- Wright EM. Renal  $\text{Na}^+$ -glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F10-F18
- Reuss L. One-hundred years of inquiry: the mechanism of glucose absorption in the intestine. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 939-946

#### 同行评价

本文选题较好, 科学性较强, 对降低血糖治疗可能有一定的临床意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# EMMPRIN、HER-2蛋白表达与胃癌侵袭转移的关系

高俊, 陈洪雷, 薛敬玲, 朱润庆

## ■背景资料

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 患者就诊时多数已属中晚期, 常形成深度浸润或难治的复发及转移, 死亡率较高。胃癌的浸润转移是多步骤、多因素参与的复杂过程, 多种相关基因的激活是导致肿瘤细胞发生浸润转移的重要因素。而量子点是一种新型的生物荧光探针。本研究采用量子点免疫荧光组织化学和组织芯片技术检测人胃癌组织中EMMPRIN和HER2的蛋白表达, 并分析其与临床病理特征的相关性。

高俊, 陈洪雷, 薛敬玲, 朱润庆, 武汉大学基础医学院病理学教研室 湖北省武汉市430071

高俊, 在职硕士, 主要从事胃癌侵袭转移机制的研究。

作者贡献分布: 高俊与陈洪雷对此文所作贡献均等; 此课题由高俊、陈洪雷、薛敬玲及朱润庆设计; 研究过程由高俊与薛敬玲操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈洪雷提供; 数据分析由高俊、陈洪雷及朱润庆完成; 本论文写作由高俊与陈洪雷完成。

通讯作者: 陈洪雷, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路185号, 武汉大学基础医学院病理学教研室. chenhongleiwh@126.com  
电话: 027-68759735 传真: 027-87331241

收稿日期: 2009-04-10 修回日期: 2009-06-24

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-07-08

## Correlation of the expression of EMMPRIN and HER-2 proteins with the invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma

Jun Gao, Hong-Lei Chen, Jing-Ling Xue, Run-Qing Zhu

Jun Gao, Hong-Lei Chen, Jing-Ling Xue, Run-Qing Zhu, Department of Pathology, College of Basic Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China  
Correspondence to: Hong-Lei Chen, Department of Pathology, College of Basic Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China. chenhongleiwh@126.com  
Received: 2009-04-10 Revised: 2009-06-24  
Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the correlation of the expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2/neu) with the invasiveness and metastasis of human gastric carcinomas, as well as the correlation between the expression of these two proteins in human gastric carcinoma.

**METHODS:** The expression of EMMPRIN and HER-2 proteins was detected by quantum dot-based immunofluorescence histochemistry using 150 tissue microarrays containing 70 gastric carcinoma specimens and 5 normal gastric mucosal specimens to analyze the correlation of their expression with the clinicopathologic characteristics of gastric carcinoma.

**RESULTS:** The positive rate of EMMPRIN pro-

tein in the gastric carcinoma was significantly higher than that in normal gastric mucosa (72.86% vs 20.00%,  $P = 0.029$ ), whereas no significant difference ( $P = 0.063$ ) was observed in the positive rate of HER-2 protein though the rate in the gastric carcinoma (47.14%) was higher than that in normal gastric mucosa. EMMPRIN and HER-2 protein expression was not correlated with patient age and sex, the degree of differentiation, the depth of tumor invasion and clinical TNM stage ( $P > 0.05$ ), but significantly associated with lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). Moreover, a positive correlation was observed between the expression of EMMPRIN and HER-2 proteins in 70 gastric carcinoma specimens ( $r = 0.383$ ,  $P = 0.001$ ).

**CONCLUSION:** EMMPRIN and HER-2 may synergistically promote the lymph node metastasis of gastric carcinomas.

**Key Words:** Gastric carcinoma; Extracellular matrix metalloproteinase inducer; Human epidermal growth factor receptor 2; Tissue microarray; Quantum dot

Gao J, Chen HL, Xue JL, Zhu RQ. Correlation of the expression of EMMPRIN and HER-2 proteins with the invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1952-1956

## 摘要

**目的:** 探讨细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)、人表皮生长因子受体2(HER-2/neu)蛋白表达与人胃癌侵袭转移的关系, 以及2种蛋白表达之间的关系。

**方法:** 应用量子点免疫荧光组织化学技术检测人胃癌组织芯片150芯(包括70例胃癌组织和5例正常胃黏膜组织)中EMMPRIN和HER2的蛋白表达, 并分析他们与临床病理特征的相关性。

**结果:** 胃癌和正常胃黏膜组织中的EMMPRIN阳性表达率分别为72.86%和20.00%, 差异有显著性( $P = 0.029$ )。在胃癌组织中HER-2蛋白的阳性率为47.14%(33/70), 高于正常

## ■同行评议者

刘勇钢, 副主任医师, 天津市传染病医院病理科

胃黏膜组织, 但差异无显著性( $P = 0.063$ ). EMMPRIN、HER-2蛋白表达与胃癌患者年龄、性别、分化程度、肿瘤的浸润深度以及临床TNM分期之间差异均无显著性( $P > 0.05$ ), 仅与淋巴结转移显著相关( $P < 0.05$ ). 在70例胃癌组织中EMMPRIN与HER-2蛋白表达之间呈显著正相关( $r = 0.383, P = 0.001$ ).

**结论:** EMMPRIN与HER-2/neu可能协同促进了胃癌的淋巴结转移.

**关键词:** 胃癌; 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; 人表皮生长因子受体2; 组织芯片; 量子点

高俊, 陈洪雷, 薛敬玲, 朱润庆. EMMPRIN、HER-2蛋白表达与胃癌侵袭转移的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1952-1956  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1952.asp>

## 0 引言

胃癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤之一. 胃癌的扩散及转移是导致患者死亡的重要原因. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN)属于免疫球蛋白超家族, 在多种肿瘤细胞和组织中高表达, 通过诱导基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的分泌促进肿瘤的浸润、转移<sup>[1]</sup>. 人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2/neu)基因是一种原癌基因. 体内外研究证实HER-2癌基因也是肿瘤转移驱动因子, 即HER-2过度表达的恶性肿瘤具有更强的侵袭、转移能力, 预后较差<sup>[2]</sup>. 关于EMMPRIN和HER-2联合检测与人胃癌侵袭转移的关系国内外鲜见相关报道. 本研究利用新型量子点(quantum dots, QDs)免疫荧光组织化学技术检测EMMPRIN和HER-2蛋白在人胃癌组织芯片上的表达及其与胃癌侵袭转移的关系, 以及EMMPRIN和HER-2蛋白表达之间的相关性, 为胃癌侵袭转移及预后判断提供客观指标.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** STC150芯片4张由桂林泛谱生物技术有限公司构建, 15×10点阵, 每点直径1.1 mm, 4 μm厚, 其中包括70例胃癌组织, 5例正常胃黏膜组织, 每例组织均有2点. 所有组织来自临床外科切除标本, 经40 g/L中性甲醛溶液固定24 h. 胃癌患者中, 男47例, 女23例, 年龄26-80(平均56.8)岁. 参照

1997年美国癌症委员会(AJCC)拟订的胃癌TNM分期标准: I+II期59例, III+IV期11例. 伴有淋巴结转移的胃癌组织36例, 不伴有淋巴结转移的胃癌组织34例. 根据癌细胞分化程度: 高分化11例, 中分化26例, 低分化33例. 兔抗人EMMPRIN多克隆抗体、鼠抗人HER-2 mAb(Santa Cruz公司, 工作浓度均为1:100); 羊抗兔/鼠生物素化二抗; 量子点超敏荧光试剂盒(Quantum dots streptavidin conjugate, QDs-SA)以上试剂均购自武汉珈源量子点技术开发有限责任公司.

**1.2 方法** 采用量子点免疫荧光组织化学方法检测胃癌组织芯片中EMMPRIN和HER-2的蛋白表达. 操作步骤严格按试剂盒说明书进行. 组织芯片滴加900 mL/L甘油封片后, 上荧光显微镜蓝光激发QDs, 以细胞内出现橙红色的荧光颗粒为阳性. 用TBS代替一抗作阴性对照, 以已知阳性片作阳性对照. 镜下观察显示EMMPRIN和HER-2蛋白阳性信号主要定位于细胞膜内. 参照文献[3]方法, 在高倍镜下取4个不同视野, 各计数200个细胞, 按阳性细胞所占的百分比计算: “-”为阴性, “+”为阳性细胞≤10%, “++”为11%-50%, “+++”为>51%. “++”及以上则判断为阳性表达.

**统计学处理** 采用 $\chi^2$ 检验和四格表的精确概率法判断EMMPRIN、HER-2蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系, 并运用Spearman等级相关系数来判断EMMPRIN、HER-2蛋白表达之间的相互关系.  $P < 0.05$ 具有统计学意义. 所有数据均在SPSS13.0软件上进行.

## 2 结果

**2.1 EMMPRIN的蛋白表达** EMMPRIN蛋白主要表达在癌细胞膜和胞质, 其表达呈明显的异质性, 在肿瘤浸润的边缘部位阳性细胞数有相对增加的趋势, 而在癌旁正常腺体和间质细胞中也有少量表达(图1). 胃癌和正常胃黏膜组织中的EMMPRIN蛋白的阳性表达率分别为72.86%和20.00%, 差异有显著性( $P = 0.029$ , 表1). EMMPRIN蛋白表达阳性率与胃癌患者年龄、性别、肿瘤浸润深度、分化程度和临床TNM分期之间的差异均无显著性( $P > 0.05$ ). 有淋巴结转移的癌组织中EMMPRIN蛋白的阳性表达率明显高于无淋巴结转移组(83.33% vs 61.76%,  $P = 0.043$ , 表2).

**2.2 HER-2的蛋白表达** HER-2蛋白主要表达于癌细胞膜, 而在正常胃黏膜和癌旁组织中均为阴

## ■ 研发前沿

随着分子生物学技术的进展, EMMPRIN和HER2对肿瘤的发生、发展、浸润和转移以及预后和指导作用逐渐被人们所重视, 研究EMMPRIN和HER2的作用机制及其信号转导途径将会是今后研究的热点, 相信阻断其表达或功能将能更有效地抑制肿瘤的浸润和转移.

## ■ 相关报道

相关研究表明, EMMPRIN是一类属于免疫球蛋白超家族的跨膜糖蛋白, 已被证实是一种在肿瘤细胞中高度表达的胞膜监视分子, 能刺激肿瘤细胞周围的成纤维细胞及肿瘤细胞产生基质金属蛋白酶(MMPs), 从而促进肿瘤细胞的浸润和转移. 目前大量的研究发现, HER-2在胎盘、胚胎上皮组织及许多恶性肿瘤(乳腺、卵巢、肺、胃、前列腺等)细胞中呈高表达, 而在正常组织中为阴性或微量表达. HER-2表达水平及其活性的变化, 增加了肿瘤细胞的浸润和转移, 并且与其预后不良有关.



### ■应用要点

本课题采用量子点免疫荧光和组织芯片技术对EMMPRIN和HER2蛋白在正常胃黏膜和胃癌组织中的表达进行了分析,结果提示EMMPRIN和HER2可能协同促进了胃癌的淋巴结转移。量子点免疫荧光组织化学技术能很好地检测石蜡包埋组织中诸多抗原的表达。

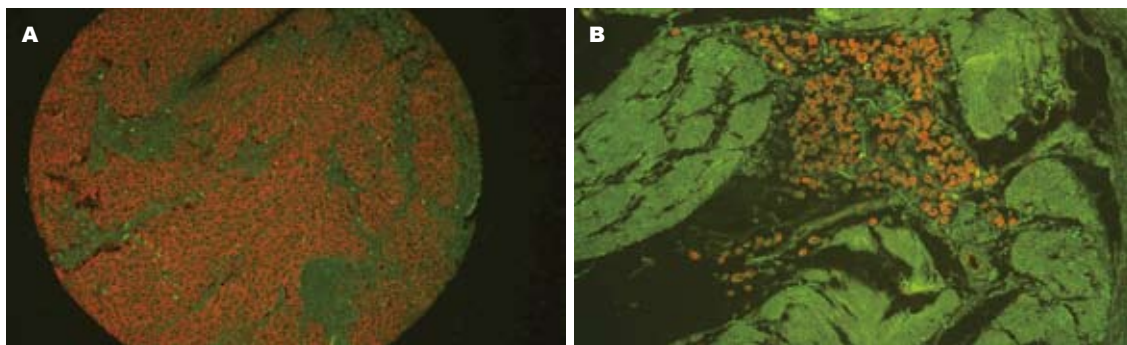


图1 量子点免疫荧光技术检测胃癌组织中EMMPRIN的蛋白表达. A: EMMPRIN主要定位于胞膜( $\times 100$ ); B: EMMPRIN在胃癌组织表达( $\times 200$ ).

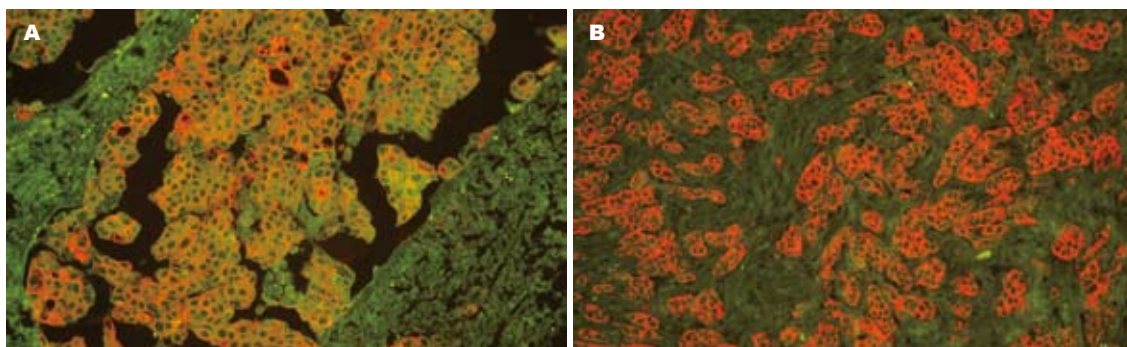


图2 量子点免疫荧光技术检测胃癌组织中HER-2的蛋白表达. A: HER-2定位于胞膜( $\times 400$ ); B: HER-2定位于胞膜( $\times 200$ ).

表1 EMMPRIN、HER-2在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达(n)

分组	n	EMMPRIN		HER-2	
		-	+	-	+
正常胃组织	5	4	1	5	0
胃癌组织	70	19	51	37	33

性(图2). 在70例胃癌标本中HER-2蛋白阳性率为47.14%,与正常胃黏膜组织相比,差异无显著性( $P = 0.063$ , 表1). HER-2蛋白表达与临床病理特征的关系见表2. HER-2蛋白表达阳性率与患者的性别、年龄、分化程度、肿瘤的浸润深度以及临床TNM分期均无相关性( $P > 0.05$ ),而淋巴结转移呈显著相关( $P = 0.016$ ).

**2.3 胃癌组织中EMMPRIN与HER-2蛋白表达之间的关系** 在70例人胃癌组织中有51例EMMPRIN蛋白呈阳性表达,其中HER-2有30例也呈阳性,EMMPRIN蛋白阴性表达的19例中,HER-2有16例也呈阴性,二者呈显著正相关( $P = 0.001$ ,  $r = 0.383$ ).

### 3 讨论

组织芯片又称为组织微阵列技术,他的特点是

体积小,信息含量高,一次性实验即可获大量结果.本研究采用150芯胃癌组织芯片,双芯布阵,仅用几张芯片即完成了全部实验,极大节约了研究经费和降低了工作量,在最短的时间内获得了胃癌中EMMPRIN和HER-2蛋白表达的全部数据.与传统的病理学技术方法相比,所得结果均一可靠,可比性强,具有省时、经济、信息量大等优点,有十分广阔的应用前景.新型荧光半导体纳米微晶体-量子点与传统的有机荧光标记试剂相比,其激发光谱宽而连续,吸光系数大,荧光强度高,荧光发射峰窄而对称,具有耐光漂白,可以经受反复多次的激发,并点亮了病理学,可用于肿瘤的分子诊断和影像学检查<sup>[4]</sup>.

EMMPRIN在人体内广泛分布,具有多种不同的功能,而他在肿瘤的生长、浸润和转移中的作用是目前肿瘤细胞生物学领域的研究热点之一. EMMPRIN在人胃癌组织中的研究报道鲜见, Zheng *et al*<sup>[5]</sup>在胃癌中的研究认为, EMMPRIN的表达水平与微血管密度(MVD)呈正相关, EMMPRIN表达的上调有助于胃癌的发生发展和局部浸润. EMMPRIN表达也是肠型胃癌具有高增殖和发生肝转移的分子基础<sup>[6]</sup>.

在本研究中,胃癌和正常黏膜组织中的

表 2 EMMPRIN、HER-2蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	EMMPRIN		P值	HER-2		P值
		-	+		-	+	
性别				0.315			0.729
男	47	11	36		25	21	
女	23	8	15		12	12	
年龄(岁)				0.363			0.358
≤60	38	12	26		22	16	
>60	32	7	25		15	17	
肿瘤浸润深度				0.194			0.607
T1	4	1	3		3	1	
T2	18	2	16		10	8	
T3	48	16	32		24	24	
分化程度				0.745			0.678
高	11	4	7		7	4	
中	26	7	19		14	12	
低	33	8	25		16	17	
TNM分期				0.715			0.064
I + II	59	17	42		34	25	
III + IV	11	2	9		3	8	
淋巴结转移				0.043			0.016
有	36	6	30		14	22	
无	34	13	21		23	11	

EMMPRIN蛋白的阳性表达差异有显著性, 表明EMMPRIN蛋白与胃癌组织产生的异质性蛋白有关联。EMMPRIN蛋白表达阳性率与胃癌患者年龄、性别和分化程度之间, 差异均无统计学意义, 提示EMMPRIN蛋白表达与胃癌患者的性别和年龄无关, 也与胃癌细胞的分化程度没有相关性。胃癌不同临床分期和肿瘤浸润深度中的EMMPRIN蛋白的表达均有所不同, 但差异均无显著性, 仅在伴有淋巴结转移的癌组织中EMMPRIN蛋白的阳性表达率为83.33%(30/36)明显高于无淋巴结转移组61.76%(21/34)( $P = 0.043$ ), 表明EMMPRIN蛋白表达与胃癌向深层浸润关系不明显但与淋巴结的转移密切相关, 与文献报道结果部分相同<sup>[5,7]</sup>。还需扩大病例数继续深入研究EMMPRIN与胃癌浸润深度和临床TNM分期的关系。

HER-2在正常人体腔上皮、腺上皮等组织中可有微弱的表达, 但无基因扩增, 其在组织中的过度表达与细胞的癌变有关, 因此, 检测组织中过度表达的HER-2蛋白产物, 便可间接反映HER-2癌基因的扩增<sup>[8]</sup>。而在某些人类肿瘤中有HER-2过表达, 其表达在某些肿瘤的发生和发展中起重要作用, 并对肿瘤的预后和治疗产生

影响。但有关HER-2基因与胃癌关系的研究较少, 且结论不一, 有学者认为该基因的过表达与胃癌组织的不同分化程度之间显著相关, 而与肿瘤大小、TNM分期和预后无明显关系<sup>[9]</sup>, 还有学者认为该基因的过表达与胃癌患者良好预后相关<sup>[10]</sup>。Lee *et al*<sup>[11]</sup>认为HER-2的表达与胃癌的早期发生和组织学类型相关。大多数研究表明, HER-2是胃癌的一个不良的预后因素和治疗靶点<sup>[12]</sup>。

大多数免疫组织化学染色结果报道表明, 胃癌组织中HER-2蛋白定位于胞膜的阳性率为10%-45%<sup>[13-14]</sup>。而本研究中HER-2蛋白在正常胃黏膜中均未见阳性表达, 而在70例胃癌中表达率为47.14%, 表明HER-2的过表达可能与胃癌的发生有关, 他可作为胃癌诊断的辅助指标。本研究中, HER-2蛋白表达与患者的性别、年龄和肿瘤的浸润深度无明显相关性( $P > 0.05$ ), 表明癌基因HER-2在胃癌中的表达无性别和年龄的差异, 随着原发肿瘤向深处浸润, HER-2蛋白表达的阳性率差异无显著性, 提示胃黏膜一旦发生癌变, 即可有稳定的HER-2表达; HER-2蛋白表达的阳性率在高、中和低分化的胃癌中、不同临床TNM分期之间差异均无显著性( $P > 0.05$ ), 揭示了HER-2蛋白与胃癌的细胞分化程度和临床TNM分期均无关。以上结果与Oshima *et al*<sup>[14]</sup>的报道一致。本研究还发现在伴有局部淋巴结转移的36例胃癌中, HER-2阳性表达22例(61.11%), 而在不伴有局部淋巴结转移的34例胃癌中, HER-2阳性表达11例(32.35%), 两组间差异有显著性( $P = 0.016$ ), 提示HER-2蛋白表达与胃癌的淋巴结转移密切相关。

虽然EMMPRIN在肿瘤细胞中呈高表达, 但在肿瘤进展中诱导他表达的因子人们知道得很少。研究表明, 双调蛋白(amphiregulin, AR)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是一种能诱导EMMPRIN表达的调节效应剂, 可以通过EGFR酪氨酸蛋白激酶的激活诱导EMMPRIN表达, 同时AR和EGF的反义cDNA可以抑制EMMPRIN的表达和MMP活性, 从而证实EGFR信号在此调节过程中具有决定性的作用<sup>[15]</sup>。本研究发现, EMMPRIN与HER-2在胃癌各临床病理特征分组中, 有着相似的表现。EMMPRIN和HER-2在胃癌细胞中多同时表达, 联合表达率为42.86%(30/70), EMMPRIN和HER-2表达具有显著正相关, 提示EMMPRIN和HER-2可能通过共同调节MMPs的活性协同促进胃癌的淋巴结转

## ■名词解释

量子点(QD): 是一种由II-VI族或III-V族元素组成, 粒径约为2 nm -6 nm, 能够接受激发光产生荧光的半导体纳米微晶体, 目前研究较多的主要是CdX(X = S、Se、Te)。与传统的荧光标记试剂如罗丹明6G相比, 量子点具有以下特性: (1)荧光强度高, 是罗丹明6G的20倍; (2)荧光稳定, 是罗丹明6G的100倍以上, 耐光漂白; (3)颜色丰富, 不同粒径大小的量子点具有不同的颜色, 用同一波长的光可激发多种颜色的量子点, 使多组分同时检测成为可能。这些独特的光学特性, 使量子点成为一种最佳的荧光标记物应用于生物医学领域。

## ■同行评价

本研究选题新颖, 研究内容重要, 对临床医师有一定的参考价值。

移。鉴于EMMPRIN和HER-2均阳性表达与胃癌淋巴结转移的密切关系, 对EMMPRIN和HER-2阻抑剂进一步探索, 可能成为抑制胃癌浸润转移的一条新途径, 对于改善胃癌患者预后具有重要意义。

## 4 参考文献

- 1 Dalberg K, Eriksson E, Enberg U, Kjellman M, Bäckdahl M. Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. *World J Surg* 2000; 24: 334-340
- 2 Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Masciaux C, Verdebout JM, Delmotte P, Lafitte JJ, Sculier JP. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer* 2003; 89: 959-965
- 3 陈斌, 罗荣城, 崔斐, 钱新宇. 胃癌HER-2/neu基因表达与预后的相关性. *南方医科大学学报* 2006; 26: 344-347
- 4 Tholouli E, Sweeney E, Barrow E, Clay V, Hoyland JA, Byers RJ. Quantum dots light up pathology. *J Pathol* 2008; 216: 275-285
- 5 Zheng HC, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Nomoto K, Miwa S, Tsuneyama K, Takano Y. Upregulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis. *Br J Cancer* 2006; 95: 1371-1378
- 6 Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Miwa S, Tsuneyama K, Takano Y. Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray. *J Clin Pathol* 2007; 60: 273-277
- 7 唐忠辉, 陈华生, 邹宗楷, 蔡韶滨, 苏海燕, 沈洪武, 吴文乔, 林莉, 王元亨. TFF3和CD147在不同胃黏膜病变中的表达及其与血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3631-3636
- 8 Lohrisch C, Piccart M. An overview of HER2. *Semin Oncol* 2001; 28: 3-11
- 9 Lee KE, Lee HJ, Kim YH, Yu HJ, Yang HK, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 173-179
- 10 Jain S, Filipe MI, Gullick WJ, Linehan J, Morris RW. c-erbB-2 proto-oncogene expression and its relationship to survival in gastric carcinoma: an immunohistochemical study on archival material. *Int J Cancer* 1991; 48: 668-671
- 11 Lee SW, Kang SB, Kim YS, Nam SW, Lee DS, Lee HK, Han SW. [Expression of c-erbB-2 and c-met proteins in gastric adenoma and adenocarcinoma] *Korean J Gastroenterol* 2007; 49: 152-157
- 12 Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008; 19: 1523-1529
- 13 Kim MA, Jung EJ, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 2007; 38: 1386-1393
- 14 Oshima CT, Lanzoni VP, Iriya K, Forones NM. C-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma: correlation with clinical stage and prognosis. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 250-254
- 15 Menashi S, Serova M, Ma L, Vignot S, Mourah S, Calvo F. Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res* 2003; 63: 7575-7580

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 2009-07-08)



# 胃十二指肠黏膜防护研究进展

吴成跃, 张传勇

吴成跃, 张传勇, 武警8690部队医院消化内科 江苏省宜兴市 214206

作者贡献分布: 本文由吴成跃综述, 张传勇审校。

通讯作者: 张传勇, 主任医师, 214206, 江苏省宜兴市, 武警8690部队医院消化内科。wj2szy@163.com

电话: 0510-87075000

收稿日期: 2008-11-25 修回日期: 2009-03-02

接受日期: 2009-03-09 在线出版日期: 2009-07-08

## Advance in gastroduodenal mucosal defense

Cheng-Yue Wu, Chuan-Yong Zhang

Cheng-Yue Wu, Chuan-Yong Zhang, Department of Gastroenterology, 8690 Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Yixing 214206, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Chuan-Yong Zhang, Department of Gastroenterology, 8690 Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Yixing 214206, Jiangsu Province, China. wj2szy@163.com

Received: 2008-11-25 Revised: 2009-03-02

Accepted: 2009-03-09 Published online: 2009-07-08

## Abstract

The gastrointestinal tract has developed multiple mechanisms of protection from intrinsic and extrinsic injury, including but not limited to drugs, ischemic/reperfusion injuries, and infections such as *Helicobacter pylori*. These range from mucosal blood flow and strengthening the epithelial barrier to luminal factors such as  $\text{HCO}_3^-$  secretion and regulating epithelial cell-surface pH. We reviewed recent development in host defense against *Helicobacter pylori*, duodenal bicarbonate secretion, protection from nonsteroidal anti-inflammatory drugs induced gastrointestinal injury, and apoptosis, as well as newer therapies.

**Key Words:** Bicarbonate; Cyclooxygenase inhibitors; Leptin; Matrix metalloproteinase; Orexins; Survivin; Stomach; Duodenum

Wu CY, Zhang CY. Advance in gastroduodenal mucosal defense. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1957-1961

## 摘要

胃肠道对于药物、缺血及再灌注、*H pylori*感染等内源性和外源性损伤具有多重保护机制,

包括胃黏膜血流、上皮细胞屏障、碳酸氢盐分泌调节上皮细胞表面pH值等。本文就近来宿主对*H pylori*感染的防御、十二指肠花生四烯酸分泌、非甾体类消炎药诱发的胃肠道损伤的保护、凋亡及治疗进行综述。

**关键词:** 花生四烯酸; 环氧合酶抑制剂; 来普汀; 基质金属蛋白酶; 食欲素; 存活素; 胃; 十二指肠

吴成跃, 张传勇. 胃十二指肠黏膜防护研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1957-1961

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1957.asp>

## 0 引言

胃肠道通过多层黏膜防御机制免于酸损伤, 包括黏膜血流, 上皮屏障,  $\text{HCO}_3^-$ 分泌调节黏膜pH, 非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)通过COX-1抑制前列腺素的合成<sup>[1]</sup>. COX-2通常是在炎症中表达的诱导酶, 产生介导炎症的前列腺素, 最近研究结果弱化了COX-1、COX-2的这种区别. 黏膜损伤其他原因包括胃酸、*H pylori*感染. 十二指肠黏膜主要的防御机制是DBS( $\text{HCO}_3^-$ 分泌), 保护组织免于胃酸损伤<sup>[2]</sup>. 三叶肽和黏蛋白与胰腺、肝脏、上皮细胞的 $\text{HCO}_3^-$ 分泌进入黏膜层中和胃酸. 除了这些经典的防御机制, 近几年, 研究还发现了其他一些机制.

## 1 *H pylori*感染

20世纪80年代以来, *H pylori*感染的研究主要集中在上消化道黏膜损伤相关的发病机制. 目前, 对*H pylori*感染的治疗颇为有效, 溃疡发病率亦呈下降趋势. 关于*H pylori*为何产生黏膜损伤, 为何致癌尚在进一步研究中.

**1.1 Capsaicin** 小剂量的Capsaicin通过激活肠传入神经元的活性, 对胃起保护作用<sup>[3]</sup>, 另外他对*H pylori*感染的胃上皮细胞有抗炎效果, Capsaicin阻断*H pylori*诱发的IL-8的合成及减少IL-8基因转录. *H pylori*感染增加I $\kappa$ B激酶(IKK)的活性, Capsaicin预处理经抑制IKK和

## ■背景资料

胃肠道通过多层黏膜防御机制免于酸损伤, 包括黏膜血流, 上皮屏障,  $\text{HCO}_3^-$ 分泌调节黏膜pH, 非甾体抗炎药(NSAIDs)通过COX-1抑制前列腺素的合成. 黏膜损伤其他原因包括胃酸、*H pylori*感染. 十二指肠黏膜主要的防御机制是DBS( $\text{HCO}_3^-$ 分泌), 保护组织免于胃酸损伤. 三叶肽和黏蛋白与胰腺、肝脏、上皮细胞的 $\text{HCO}_3^-$ 分泌进入黏膜层中和胃酸. 除了这些经典的防御机制, 近几年, 研究还发现了其他一些机制.

## ■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科



## ■研发前沿

目前,对*H pylori*感染的治疗颇为有效,溃疡发病率亦呈下降趋势。关于*H pylori*为何产生黏膜损伤,为何致癌尚在进一步研究中。

降解IkB $\alpha$ 来预防NF- $\kappa$ B信号激活,因此认为Capsaicin在*H pylori*感染中有抗炎特性。

1.2 *H pylori*感染对细胞增殖的影响 Schmees *et al*<sup>[4]</sup>发现*H pylori*分泌的GGT和胃黏膜持续*H pylori*感染相关。*H pylori*感染使Ras依赖的信号中断, G<sub>1</sub>细胞周期停滞,抑制T细胞扩增。VacA是一种由VacA基因分泌的空泡细胞毒素,在50%的*H pylori*菌株中存在, VacA抑制人类胃上皮细胞由G<sub>1</sub>期向S期的进化, VacA过度表达通过激活受体介导的凋亡caspase-8,尤其是线粒体凋亡途径caspase-9,诱导上述细胞的凋亡。因此, GGT、VacA、Hsp8可能是抗*H pylori*的靶点。

1.3 宿主的防护和免疫 与胃窦活检黏膜中性粒细胞浸润有关的肥大细胞密度,在*H pylori*感染的患者中明显增加(尤其cagA, vacAs1/m1, babA2阳性菌株)<sup>[5]</sup>,肥大细胞高密度同时和抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-x表达减少及促凋亡蛋白Bax、caspase-3表达增加相关,所以,肥大细胞可能诱发了胃上皮细胞的凋亡。因此,*H pylori*感染的患者,胃窦部组织检测肥大细胞的数量可预示疾病的活动性。

*H pylori*可诱导诱生型NO合酶(iNOS)合成NO,杀死体外的*H pylori*。然而,*H pylori*能够在人体胃内存活。Bussiere *et al*<sup>[6]</sup>证明L-精氨酸限制iNOS翻译,体内内源性L-精氨酸的数量不足以产生杀死*H pylori*的NO。

*H pylori*通过MyD88(TLR衔接蛋白)信号通路<sup>[7]</sup>诱导细胞介导的免疫。*H pylori*诱发的适应性免疫中,TLRs激活树突状细胞,控制抗原提呈、共同刺激和细胞因子分泌。TLR、T细胞激活依赖于MyD88。*H pylori*激活TLR可更好的理解*H pylori*免疫机制。

## 2 环氧合酶和前列腺素

环氧化酶抑制仍是上消化道黏膜损害的主要原因。目前对于缓和黏膜损伤的选择性COX抑制和抗分泌药物使用尚存争议。

2.1 动物研究 COX-1具有胃保护作用,COX-2有促炎作用。最近研究显示COX-1减少大肠埃氏菌LPS诱导小鼠胃iNOS的增加,具有临床意义,iNOS和黏膜损伤易感性增加有关<sup>[8]</sup>,LPS减少PGE<sub>2</sub>合成,上调胃黏膜iNOS和COX-2表达。非选择性COX抑制剂和选择性COX-1抑制剂均加重LPS诱导的胃损伤,尽管外源性PGE<sub>2</sub>可逆转COX抑制的作用。研究认为非选择性NSAIDs在怀疑LPS激活的患者中如脓血症应慎用。

COX-2衍生的PGE<sub>2</sub>对于溃疡自愈有决定性

作用,而COX-1衍生的PGE<sub>2</sub>意义不大<sup>[9]</sup>。非选择性COX和选择性COX-2抑制剂降低溃疡自愈率。COX-2和非选择性COX抑制剂可逆转溃疡中COX-2表达及PGE<sub>2</sub>水平的增加。COX-1受抑制,黏膜PGE<sub>2</sub>含量减少,但不损害溃疡愈合,也不促进溃疡愈合。COX-2衍生的PGE<sub>2</sub>通过激活EP<sub>4</sub>受体和上调VEGF、血管再生而增加溃疡愈合。尽管COX-1不促进胃溃疡愈合,Starodub *et al*<sup>[10]</sup>发现COX-1<sup>-/-</sup>和COX-1<sup>+/-</sup>小鼠有缓慢胃上皮损害。COX-1对于早期细胞脱落增加损害的微观事件中有保护胃上皮的作用。

胆汁酸牛磺胆酸盐诱发的胃黏膜损害,伴有管腔碱化的抑制和酸分泌。在损伤的鼠胃中,COX-1衍生的前列腺素抑制酸分泌。这种前列腺素诱导的酸抑制是由激活的PGE<sub>2</sub>/EP<sub>3</sub>和PGI<sub>2</sub>/前列环素受体介导的。

2.2 环氧合酶抑制剂的临床应用 随机前瞻性研究评估选择性COX-2抑制剂(coxib)lumiracoxib,对于骨关节炎患者胃肠道的安全性<sup>[11]</sup>,服用NSAIDs和lumiracoxib并发溃疡的危险因素包括年龄 $\geq 65$ ,男性,非白色人种,有胃肠出血或溃疡病史。BMI $< 27$ 被认为是NSAIDs服用者的危险因素,而低剂量的阿司匹林、吸烟、*H pylori*阳性认为是服用lumiracoxib的危险因素。对于未服用阿司匹林而有胃肠并发症高风险的患者,lumiracoxib比传统的NSAIDs较少出现胃肠并发症,可用于骨关节炎的长期治疗。

先前研究比较长期服用传统的NSAIDs和coxib的胃肠结果,却没有比较二者加上胃保护综合治疗的效果。非随机队列研究证实NSAIDs和PPI的综合治疗比coxib单药治疗明显减少NSAIDs服用者消化性溃疡的住院率,有趣的是萘普生服用者的住院率最高,而布洛芬和罗非考昔相当<sup>[12]</sup>。coxib和PPI综合治疗可提供最好的胃保护。在服用阿司匹林的患者中,联合coxib和PPI胃保护作用明显优于单用coxib或PPI。研究显示,服用NSAIDs高风险患者应服用PPI综合治疗或者是用coxibs。假如布洛芬或不伴PPI的联合用药比较安全,则coxib的需求重新考虑。

## 3 NSAIDs诱发的胃肠损伤的治疗

NSAIDs相关的胃十二指肠病仍是上消化道黏膜损伤的主要病因。先前研究认为奥美拉唑、枸橼酸铋对于NSAIDs诱发的溃疡、糜烂及症状均有相同的预防作用,奥美拉唑维持治疗复发率低。最近研究发现,瑞巴派特增加胃黏液,刺

激内源性前列腺素合成, 在预防NSAIDs诱发的消化性溃疡与枸橼酸铋有相同的疗效<sup>[13]</sup>. 瑞巴派特可加速溃疡愈合, 抑制超氧化物形成, 具有抗炎活性. 研究认为尽管瑞巴派特和枸橼酸铋对于NSAIDs诱发的胃肠道毒性预防具有相同的保护作用, 但前者不良反应少, 包括腹泻、下腹疼痛、恶心、腹胀. 比较瑞巴派特和硫糖铝治疗慢性糜烂性胃炎的研究发现, 瑞巴派特比硫糖铝能明显抑制*H pylori*感染的炎症, 增加黏膜PGE2的合成. 因此瑞巴派特和PPI可作为NSAIDs诱发损伤的治疗或预防的选择用药.

雷贝拉唑第2代PPI, 在保护阿司匹林诱发的胃十二指肠糜烂、溃疡能快速发挥作用. 先于阿司匹林初始用药5 h口服雷贝拉唑, 第2-4天内镜检查发现糜烂溃疡较少. 研究<sup>[14]</sup>证明雷贝拉唑和H<sub>2</sub>受体拮抗剂雷尼替丁比较, 明显增加胃黏膜PGE2和COX-2 mRNA的表达, 炎症介质LT-B4的表达明显减少.

遗传在药物代谢中起重要作用, 包括NSAIDs诱发的胃十二指肠出血<sup>[13]</sup>, NSAIDs和COX-2选择性抑制剂由CYP2C9代谢, CYP2C9-3变异比CYP2C9-2明显降低酶的活性, NSAIDs诱发的胃肠道出血在CYP2C9-1, 2和CYP2C9-1, 3基因型比CYP2C9-1, 1野生型更多见. CYP2V9-2, 3与出血不相关. 纯合子CYP2C9-2, 2和CYP2C9-3, 3很少见. 有趣的是CYP2C93等位基因与较高的出血风险一致, CYP2C92等位基因与出血风险不相关. 通过基因测定可避免NSAIDs诱发的胃十二指肠出血的发作.

除了NSAIDs诱发的胃损伤, 胃肠道还经常受到氧化损伤. COX非选择性抑制剂消炎痛诱发的胃黏膜损伤和活性氧及凋亡信号激活有关. 最近动物实验研究硫氧还蛋白-1(thioredoxin-1, Trx-1)抗氧化和氧化还原调节功能可用来治疗NSAIDs诱发的胃肠道溃疡<sup>[16]</sup>. Trx-1转基因小鼠, 消炎痛诱发的出血性黏膜损害小, 野生型小鼠损害则较大. 这种胃保护作用可能与PGE2和COX无关, 因为消炎痛在野生型及Trx-1转基因型的小鼠中对PGE2的合成均有抑制. 人重组Trx-1抑制消炎痛诱发的小鼠胃黏膜(RGM)细胞内ROS的增加, 在Trx-1转基因小鼠及rt Trx-1预处理的细胞中, 消炎痛诱发的抗凋亡蛋白生存素的下调及凋亡抑制的Akt磷酸化受抑制, Trx-1抑制磷酸化和弹力蛋白同系物(PTEN), PTEN在染色体10被删除促进凋亡. Trx-1还通过磷酸肌醇对Akt激活起负性调节作用. 因此, 清除活

性氧, 调节PTEN/Akt/存活素通路, Trx-1及Trx-1诱导剂如替普瑞酮为胃肠黏膜损伤的治疗预防可提供吸引人的治疗选择.

#### 4 存活素-抗凋亡蛋白

存活素, 凋亡蛋白抑制剂家族, 对于胚胎、胎儿发育、组织再生及致癌具有关键性作用. 消炎痛降低存活素在胃黏膜上皮和培养的胃上皮RGM-1细胞的表达机制最近才阐明. 消炎痛诱发的存活素下调发生在转录后水平, 降低存活素蛋白而不是mRNA, 另外还降低存活素蛋白的半衰期. 存活素通过泛素化及蛋白酶通路降解(消炎痛治疗后存活素蛋白泛素化及总量增加), 蛋白酶抑制剂延长存活素半衰期. 蛋白酶抑制剂的预处理预防消炎痛诱发的存活素下调. 过度表达存活素的细胞株可抵抗消炎痛诱发的损害和凋亡.

存活素同时对乙醇诱发的胃上皮细胞损伤也有保护作用<sup>[17]</sup>. 在用小剂量、细胞保护性乙醇浓度预处理的RGM-1细胞中, 总的及磷酸化的存活素蛋白表达增加; 这牵涉到新的蛋白合成, 无新生的mRNA, 这些预处理细胞显示出p34cdc2细胞周期蛋白依赖性激酶活性增加, 使存活素磷酸化并稳定其作用. 抑制p34cdc2可逆转用乙醇预处理引起的存活素蛋白表达的增加, 并降低由乙醇诱发的细胞毒的保护作用. 存活素蛋白表达下降同时也减弱对乙醇诱发的细胞毒及凋亡的细胞保护作用. 相反, 存活素过度表达, 抵抗损伤的能力增强. 因此, 认为小鼠胃黏膜暴露于乙醇时, p34cdc2酶作为存活素磷酸化的主要介质, 对胃黏膜细胞保护有着至关重要的作用.

#### 5 食欲素

Bengtsson *et al*<sup>[18]</sup>研究发现了胃肠道和中枢神经系统间有趣的联系. 食欲素-A, 一种在十二指肠黏膜表达的食欲调控肽, 刺激小鼠十二指肠碳酸氢盐分泌(DBS). 这是由外周食欲素受体-1(OX-1)介导的, 不依赖于胆碱能通路. 禁食减少十二指肠黏膜OX1、OX2受体mRNA表达, 和禁食过夜后OX诱发的DBS减少相一致. 可口可乐等碳酸饮料也增加鼠类胃和十二指肠DBS, 被消炎痛和乙酰唑胺抑制. 因此认为碳酸饮料诱发的HCO<sub>3</sub>的分泌可能系饮料中的酸和高PCO<sub>2</sub>产生的碳酸酐酶和内源性前列腺素介导的.

#### 6 Mucin-1

Mucin-1在胃肠道的重要性近来尤其突出<sup>[19]</sup>. 空肠弯曲杆菌感染快速增加正常小鼠MUC-1胃肠

#### ■ 相关报道

Motawi *et al*报道消炎痛处理的小鼠胃溃疡指数、胃液酸度、组织髓过氧化物酶活性、血清NO、组织共轭烯增加, 同时组织NO、组织谷胱甘肽、谷胱甘肽还原酶、超氧化物歧化酶活性下降. 胃液黏蛋白含量及组织谷胱甘肽过氧化物酶活性无变化.

## ■应用要点

至2008年,发现了新的关于来普汀、存活素、MMP的胃十二指肠防护机制, DBS调节的新机制,对于*H pylori*感染如何损伤黏膜有了新的理解. 胃十二指肠黏膜防御机制的新发现将为临床提供更有效的治疗.

表达. *Muc-1*<sup>-/-</sup>小鼠感染后1 wk细菌全身性播散, *MUC-1*<sup>+/+</sup>小鼠却没有. *Muc-1*<sup>-/-</sup>小鼠凋亡增加, 上皮细胞及绒毛上皮脱落较常见. *Muc-1*<sup>-/-</sup>定居的*H pylori* 5倍于野生型小鼠, *Muc-1*<sup>-/-</sup>小鼠定居量居于*MUC-1*<sup>+/+</sup>和*Muc-1*<sup>-/-</sup>小鼠之间<sup>[19]</sup>. 野生型小鼠感染*H pylori*后2 mo发生轻度胃炎, 而*Muc-1*<sup>-/-</sup>鼠壁细胞丢失发展成萎缩性胃炎. 总之, 细胞表面黏蛋白, 尤其*MUC-1*在针对感染的动态黏膜防护中有重要的作用.

## 7 来普汀及其潜在的胃保护作用

来普汀, 由脂肪细胞产生的饱肽, 在消化系中的功能不明确, Motawi *et al*<sup>[20]</sup>报道消炎痛处理的小鼠胃溃疡指数、胃液酸度、组织髓过氧化物酶、活性、血清NO、组织共轭烯增加, 同时组织NO、组织谷胱甘肽、谷胱甘肽还原酶、超氧化物歧化酶活性下降. 胃液黏蛋白含量及组织谷胱甘肽过氧化物酶活性无变化. 来普汀预处理增加黏蛋白和组织NO合成减低胃溃疡指数及中性粒细胞浸润. 同时来普汀还可恢复谷胱甘肽还原酶及超氧化物歧化酶活性. 然而, 胃液酸度、血清NO、谷胱甘肽及共轭二烯无变化. 根据这些结果, 来普汀通过减轻中性粒细胞浸润、NO合成、氧化应激对消炎痛诱发的黏膜损伤具有保护作用.

## 8 基质金属蛋白酶在胃保护中的作用

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的重塑. 在胃上皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞发现的一种炎症蛋白MMP-9的表达, 和胃溃疡严重程度相关<sup>[21]</sup>. 乙醇诱发胃溃疡的严重程度和前MMP-9的上调及MMP-2分泌的下调一致. 此外, 炎症因子TNF- $\alpha$ 在乙醇诱发的溃疡中触发MMP-9的分泌. 法莫替丁和抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸、二甲亚砜通过减少小鼠胃组织中TNF- $\alpha$ 及IL-6表达而减少前MMP-9的分泌. 抗氧化剂减少MMP-9基因表达, 抑制炎症细胞浸润和髓过氧化物酶催化反应, 抑制脂质过氧化反应和蛋白羧基化作用, 从而保护胃黏膜. 褪黑色素抑制前MMP-9的活性, 上调组织金属蛋白酶抑制因子(TIMP-1、TIMP-2)对乙醇诱发的氧化损伤具有胃保护作用<sup>[22]</sup>. 褪黑色素同时通过抑制TNF- $\alpha$ 下调MMP-9. 和野生型小鼠相比, *MMP-9*<sup>-/-</sup>的小鼠杯状细胞数量增加, *MUC-2*表达增加, 主要由杯状细胞分泌的黏蛋白形成肠黏液层. Kruppel样因子(kruppel-like factor 4,

KLF-4)和Ets样因子(Ets-like factor 3, Elf-3)(参与杯状细胞终末分化的转录因子)也上调, *MMP-9*过度表达预防杯状细胞分化, 增加细菌黏附, 结果导致感染易感性增加. 因此, *MMP-9*通过调节小肠结肠杯状细胞分化来调节*MUC-2*的表达.

## 9 碳酸氢盐分泌

关于碳酸氢盐分泌的调节有新的进展. 动脉内及管腔内尿苷、鸟苷蛋白以及内源性鸟苷酸环化酶[GCC, 一种囊性纤维化跨膜传输调节子(CFTR)]配体刺激离体DBS<sup>[23]</sup>, 给鼠注射鸟苷蛋白, DBS由选择性褪黑色素拮抗剂2-苯基-N-乙酰色胺和外周毒蕈碱拮抗剂硝酸甲酯阿托品逆转, 认为注射给予鸟苷蛋白诱发的DBS是通过褪黑色素和胆碱能介质介导通路. 当腔内灌注鸟苷蛋白时, 2-苯基-N-乙酰色胺和阿托品对于碳酸氢盐分泌没有作用或很小作用, 认为腔内鸟苷蛋白直接刺激碳酸氢盐分泌.

DBS也受十二指肠刷状缘小肠碱性磷酸酶(IAP)活性的影响<sup>[24]</sup>. 首次离体评估IAP活性依赖于腔内*H pylori*和DBS, 认为IAP活性受催化部位局部pH影响. 酶的最适pH大于9, IAP活性也受局部pH的调节, IAP的抑制增加DBS. 另有观点认为, P2选择性拮抗剂苏拉明降低DBS, 因此, DBS可能由结合到P2受体表面的管腔外生嘌呤信号系统、ATP释放, pH调节的磷酸酶活性调节.

PGE2增加十二指肠黏膜磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K), 通过新的循环的AMP、Ca<sup>2+</sup>、PI3K依赖性信号通路刺激DBS. 在鼠科的十二指肠, PGE2经由EP3、EP4、NOR3受体增加HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>分泌. 非选择性磷酸二酯酶抑制剂(PDE)参与了PGE2和NOR3的反应, 在鼠类的十二指肠, PDE1、PDE3参与调节HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>的分泌, 两个同工酶均参与PGE2/cAMP的反应, PDE1调节对NO/cGMP的反应. GCC敲除的小鼠, 大肠埃氏菌热稳定肠毒素(STa)刺激DBS, 表明在十二指肠存在非GCC受体. STa、尿苷蛋白、鸟苷蛋白刺激GCC敲除小鼠的DBS, 尿苷蛋白、鸟苷蛋白诱发的DBS由格列苯脲(CFTR抑制剂)抑制, 而STa诱发的DBS由DIDS抑制. 因此, 尿苷蛋白、鸟苷蛋白刺激的DBS是CFTR依赖性的, STa诱发的DBS是不依赖于CFTR<sup>[25]</sup>. 这些研究为囊性纤维病提供了新的分子治疗靶点.

## 10 结论

至2008年, 发现了新的关于来普汀、存活素、MMP的胃十二指肠防护机制, DBS调节的新机制, 对于*H pylori*感染如何损伤黏膜有了新的理

解. 胃十二指肠黏膜防御机制的新发现将为临床提供更有效安全的治疗. 未来, 我们还要研究胃十二指肠黏膜针对酸和毒物损伤的防护方式, 在治疗上取得更多的进展.

## 11 参考文献

- Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. *Eur J Med Chem* 2001; 36: 109-126
- Allen A, Flemström G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C1-C19
- Holzer P. Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: Blood flow regulation and tissue protection. *Auton Neurosci* 2006; 125: 70-75
- Schmees C, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Volland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM, Gerhard M. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* 2007; 132: 1820-1833
- Hofman V, Lassalle S, Selva E, Kalem K, Steff A, Hébuterne X, Sicard D, Auberger P, Hofman P. Involvement of mast cells in gastritis caused by *Helicobacter pylori*: a potential role in epithelial cell apoptosis. *J Clin Pathol* 2007; 60: 600-607
- Chaturvedi R, Asim M, Lewis ND, Algood HM, Cover TL, Kim PY, Wilson KT. L-arginine availability regulates inducible nitric oxide synthase-dependent host defense against *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2007; 75: 4305-4315
- Rad R, Brenner L, Krug A, Volland P, Mages J, Lang R, Schwendy S, Reindl W, Dossumbekova A, Ballhorn W, Wagner H, Schmid RM, Bauer S, Prinz C. Toll-like receptor-dependent activation of antigen-presenting cells affects adaptive immunity to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 150-163.e3
- West SD, Suliburk JW, Helmer KS, Mercer DW. Cyclooxygenase-1 suppresses lipopolysaccharide-induced changes in rat gastric inducible nitric oxide synthase. *Crit Care Med* 2008; 36: 572-579
- Hatazawa R, Tanaka A, Tanigami M, Amagase K, Kato S, Ashida Y, Takeuchi K. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G788-G797
- Starodub OT, Demitrack ES, Baumgartner HK, Montrose MH. Disruption of the Cox-1 gene slows repair of microscopic lesions in the mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C223-C232
- Hawkey CJ, Weinstein WM, Smalley W, Gitton X, Sallstig P, Stricker K, Krammer G, Mellein B, Richard D, Matchaba P. Effect of risk factors on complicated and uncomplicated ulcers in the TARGET lumiracoxib outcomes study. *Gastroenterology* 2007; 133: 57-64
- García Rodríguez LA, Barreales Tolosa L. Risk of upper gastrointestinal complications among users of traditional NSAIDs and COXIBs in the general population. *Gastroenterology* 2007; 132: 498-506
- Park SH, Cho CS, Lee OY, Jun JB, Lin SR, Zhou LY, Yuan YZ, Li ZS, Hou XH, Zhao HC, Kachintorn U, Kositchaiwat C, Lertkupun C. Comparison of Prevention of NSAID-Induced Gastrointestinal Complications by Rebamipide and Misoprostol: A Randomized, Multicenter, Controlled Trial-STORM STUDY. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40: 148-155
- Okazaki M, Shimizu I, Ishikawa M, Fujiwara S, Yamamoto H, Shiraishi T, Horie T, Iuchi A, Ito S. Gastric mucosal levels of prostaglandins and leukotrienes in patients with gastric ulcer after treatment with rabeprazole in comparison to treatment with ranitidine. *J Med Invest* 2007; 54: 83-90
- Pilotto A, Seripa D, Franceschi M, Scarcelli C, Colaizzo D, Grandone E, Niro V, Andriulli A, Leandro G, Di Mario F, Dallapiccola B. Genetic susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drug-related gastroduodenal bleeding: role of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Gastroenterology* 2007; 133: 465-471
- Tan A, Nakamura H, Kondo N, Tanito M, Kwon YW, Ahsan MK, Matsui H, Narita M, Yodoi J. Thioredoxin-1 attenuates indomethacin-induced gastric mucosal injury in mice. *Free Radic Res* 2007; 41: 861-869
- Jones MK, Padilla OR, Webb NA, Norng M. The anti-apoptosis protein, survivin, mediates gastric epithelial cell cytoprotection against ethanol-induced injury via activation of the p34(cdc2) cyclin-dependent kinase. *J Cell Physiol* 2008; 215: 750-764
- Bengtsson MW, Mäkelä K, Sjöblom M, Uotila S, Akerman KE, Herzig KH, Flemström G. Food-induced expression of orexin receptors in rat duodenal mucosa regulates the bicarbonate secretory response to orexin-A. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G501-G509
- McGuckin MA, Every AL, Skene CD, Linden SK, Chionh YT, Swierczak A, McAuley J, Harbour S, Kaparakis M, Ferrero R, Sutton P. Muc1 mucin limits both *Helicobacter pylori* colonization of the murine gastric mucosa and associated gastritis. *Gastroenterology* 2007; 133: 1210-1218
- Motawi TK, Abd Elgawad HM, Shahin NN. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. *J Biomed Sci* 2008; 15: 405-412
- Lempinen M, Inkien K, Wolff H, Ahonen J. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in indomethacin-induced rat gastric ulcer. *Eur Surg Res* 2000; 32: 169-176
- Swarnakar S, Mishra A, Ganguly K, Sharma AV. Matrix metalloproteinase-9 activity and expression is reduced by melatonin during prevention of ethanol-induced gastric ulcer in mice. *J Pineal Res* 2007; 43: 56-64
- Bengtsson MW, Jedstedt G, Flemström G. Duodenal bicarbonate secretion in rats: stimulation by intra-arterial and luminal guanylin and uroguanylin. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; 191: 309-317
- Akiba Y, Mizumori M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD. Duodenal brush border intestinal alkaline phosphatase activity affects bicarbonate secretion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G1223-G1233
- Sellers ZM, Mann E, Smith A, Ko KH, Giannella R, Cohen MB, Barrett KE, Dong H. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (StA) can stimulate duodenal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion via a novel GC-C- and CFTR-independent pathway. *FASEB J* 2008; 22: 1306-1316

## ■同行评价

本文内容丰富, 参考文献引用合理, 具有较好的可读性.



# 气体信号分子在肝硬化门静脉高压形成中的作用

宋丽秀, 郑勇

## ■背景资料

一氧化氮(NO)、一氧化碳(CO)、硫化氢(H<sub>2</sub>S)是可以导致血管舒张的3种气体信号分子, 近年来关于这3种气体分子与肝硬化门静脉高压的研究开始受到诸多学者的重视, 然而仍有很多问题未解决, 对于现有研究的回顾将会对更深层次的研究提供依据和思路。

宋丽秀, 郑勇, 石河子大学医学院第一附属医院消化科 新疆维吾尔自治区石河子市 832000  
国家自然科学基金资助项目, No. 30850004  
作者贡献分布: 本文综述由宋丽秀完成; 郑勇审校。  
通讯作者: 郑勇, 主任医师, 832000, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院第一附属医院消化科. silia623@sina.com  
电话: 0993-2858573  
收稿日期: 2009-05-06 修回日期: 2009-06-14  
接受日期: 2009-06-15 在线出版日期: 2009-07-08

## Role of gaseous signal molecules in the development of hepatic cirrhosis with portal hypertension

Li-Xiu Song, Yong Zheng

Li-Xiu Song, Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30850004

Correspondence to: Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. silia623@sina.com

Received: 2009-05-06 Revised: 2009-06-14

Accepted: 2009-06-15 Published online: 2009-07-08

## Abstract

Nitrogen monoxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide are three types of endogenous gas molecules that are able to exert diverse biological effects. As they can dilate blood vessels and suppress platelet aggregation and cell multiplication, the research on these gas signal molecules has become active. Their role in the development of hepatic cirrhosis with portal hypertension has gradually attracted more attention. Here, we will review the role of these gas signal molecules in the development of hepatic cirrhosis with portal hypertension.

**Key Words:** Gas signal molecule; Hepatic cirrhosis; Portal hypertension

Song LX, Zheng Y. Role of gaseous signal molecules in the development of hepatic cirrhosis with portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1962-1966

## 摘要

内源性气体分子一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化碳(carbon monoxide, CO)和硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)是具有广泛生物学效应的3种气体信号分子, 由于他们具有舒张血管、抑制血小板聚集和抑制细胞增殖等生物功能, 使得近几年来关于气体信号分子的研究逐步活跃起来, 其在肝硬化门静脉高压中的作用已经逐渐引起人们的重视, 现就此作一综述。

**关键词:** 气体信号分子; 肝硬化; 门静脉高压

宋丽秀, 郑勇. 气体信号分子在肝硬化门静脉高压形成中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(19): 1962-1966

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1962.asp>

## 0 引言

门静脉高压症是以门静脉系统血流动力学异常为特征, 主要表现为门静脉压力的异常增高、脾大、腹水和门体侧支循环形成等的一组临床综合征, 而高动力循环是肝硬化门脉高压的特征性改变, 表现为: 动脉血压降低, 心率加快, 心输出量增加, 外周血管阻力下降. 动脉血压降低, 心率加快是肝硬化患者高动力循环的主要特征. 这种高动力循环的状态的发生机制中, 目前国内外的研究结果已经达成共识, 即内脏及外周血管广泛扩张是其主要原因所在, 可能与血管扩张物质增多、缩血管物质相对减少以及血管对内源性缩血管物质反应性降低有关<sup>[1-2]</sup>. 迄今发现有3种气体信号分子即NO、CO和H<sub>2</sub>S参与血管张力的调节, 这3种气体信号分子在肝硬化门静脉高压中的作用越来越受到重视。

## 1 内源性NO的生成调节及舒血管效应

NO是一种活性很强的自由基, 具有氧化、还原特性. 内源性NO是由左旋精氨酸(L-Arg)通过一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的催化, 脱去胍基末端氮原子与氧结合而成. 在NO合成过程中, NOS是一重要的限速酶, 目前已经确定的NOS有3型: 神经原型NOS(neuronal NOS,

## ■同行评议者

于则利, 教授, 首都医科大学附属北京同仁医院外科; 郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

nNOS)、诱导型NOS(inducible NOS, iNOS)和内皮型NOS(endothelial NOS, eNOS). I型为神经型(nNOS), 主要分布在神经元细胞, 参与神经信息传递; II型为诱导型(iNOS), 分布广泛, 主要参与炎症反应; III型为内皮型(eNOS), 主要分布于内皮细胞, 起着维持血液和淋巴循环的作用. nNOS、eNOS在静息期细胞持续表达, 产生低浓度的NO, 发挥生理性调节作用, 所以也统称为结构型NOS(constitutive NOS, cNOS), 受 $\text{Ca}^{2+}$ -钙调素(calmodulin, CaM)调控. 而iNOS在静息期细胞不表达, 在细胞受到各种刺激因子例如内毒素、白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )等作用后可诱导激活iNOS, 以不依赖 $\text{Ca}^{2+}$ -CaM调控的方式促进NO的快速合成, 发挥特定的病理生理调节作用. L-精氨酸类似物NG-单甲基-L-精氨酸、N $\omega$ -硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、NG-硝基-L-精氨酸及N-亚胺基己基-L-鸟氨酸等均是NOS的竞争性抑制剂, 可抑制内源性NO的产生.

NO的生物效应主要通过靶细胞膜上的受体介导, 推测受体可能为酶或酶分子中的 $\text{Fe}^{2+}$ , 或血红素, NO和受体结合后, 激活靶细胞膜上的鸟苷酸环化酶, 使三磷酸鸟苷酸(guanosine triphosphate, GTP)转化成3',5'环化鸟苷酸(guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate, cGMP), 进而激活cGMP依赖性蛋白激酶, 使cGMP合成增加, 并发挥第二信使作用, 如降低胞内游离钙、扩张血管、抑制血小板的聚集和黏附等<sup>[3]</sup>. 而胞内钙浓度降低又可减少 $\text{Ca}^{2+}$ -钙调素-肌球蛋白轻链激酶复合物形成, 肌球蛋白轻链脱磷酸化, 从而使血管平滑肌舒张, 扩张血管, 调节人体血压和血流分布.

## 2 内源性CO的生成调节及舒血管效应

CO是生理条件下产生的低相对分子质量物质. 人体内75%的CO来源于循环中红细胞的分解代谢, 18%来源于肝脏血红素酶系统, 7%来源于无效红细胞的分解代谢. 人类和哺乳动物内源性CO的产生途径至少有2条: 一是依赖NADPH的微粒体的脂质过氧化产生的; 另一种是依赖NADPH和细胞色素P450的血红素氧合酶(HO)催化血红素分解产生的. 细胞色素P450还原酶供应电子给HO, HO将血红素降解为CO、胆绿素, 这2种产物也已经被认为具有影响神经元活动的多种功能<sup>[4]</sup>. HO是哺乳动物和啮齿动物组

织细胞微粒体中的一种蛋白酶, 他有3种异构型: HO-1、HO-2和HO-3<sup>[5-7]</sup>. HO-1为诱生型(inducible), 编码基因位于染色体22q12, 主要分布于网状内皮细胞丰富的组织中, 肝、脾最多, 大鼠中HO-1主要分布在Kupffer细胞, HO-1可被许多药物和刺激诱导, 包括金属离子、血红素、有机溶剂、激素、细菌毒素、烷基化药物. HO-1及其产物有抗氧化应激、抗凋亡、抗炎症及改善微循环等作用. 有研究表明HO-1参与胚胎和血管的发育<sup>[8-9]</sup>, 另外HO-1不仅在机体生理状态下发挥作用, 更主要是在机体的其他非正常状态或应激状态发挥作用, HO-1也被称为热休克蛋白或应激蛋白, 在机体的应激状态下, HO-1可被激活产生CO<sup>[10]</sup>. HO-2和HO-3为原生型, HO-2编码基因位于染色体16q13.3, 主要分布于脑、睾丸和肝组织中, 在大鼠肝细胞中HO-2含量最丰富, 与HO-1不同, HO-2只能被肾上腺皮质激素诱导, 目前已经证明了HO-2有调节神经递质的释放和维持肝窦的低张力状态. HO-3在脾、肝、脑、睾丸、心、肾、前列腺中均有发现, 其催化活性最弱, 功能尚不清楚<sup>[11]</sup>. HO的作用底物本质上是铁原卟啉(FePP), HO仅能辨认卟啉环, 不能辨认环内金属, 所以与FePP结构极其相似的非生理性金属原卟啉如锌原卟啉(ZnPP)、锡原卟啉(SnPP)、铜原卟啉(CuPP)等均能与FePP竞争而抑制HO的活性.

CO主要通过可溶性鸟苷酸环化酶-环磷酸鸟苷(sGC-cGMP)途径参与调节血管的舒张效应. CO与sGC的亚铁血红素部分有很高的亲和力, 可以相互结合产生一种CO-亚铁血红素(CO-heme), 他可以与该酶的卟啉部分相结合, 在其催化部位附近导致构型改变, 从而激活cGMP, 导致cGMP生成增多, 发挥细胞内第二信使的效应<sup>[12]</sup>.

## 3 内源性H<sub>2</sub>S的生成调节及舒血管效应

H<sub>2</sub>S是继NO、CO后发现的第3种内源性气体信号分子, 带有特征性的臭鸡蛋气味, 并一直被认为是毒性气体, 但自20世纪90年代以来的研究发现, 内源性的H<sub>2</sub>S存在于哺乳动物的多种组织、器官<sup>[13-14]</sup>, 通过多种调节方式和信号转导形式发挥多种生理病理作用: 松弛血管及消化道平滑肌<sup>[15]</sup>、改变对海马的长时程增强(LTP)作用的诱导<sup>[16]</sup>、调节下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)的释放<sup>[17]</sup>、抑制血管平滑肌细胞的增殖效应<sup>[18]</sup>、调节人海绵体平滑肌的松弛<sup>[19]</sup>. 内源性H<sub>2</sub>S在哺乳动物体内的产生有3条途径, 其中两

### ■研发前沿

目前, 关于一氧化氮、一氧化碳在肝硬化门静脉高压形成中的作用已经研究了多年, 并得出了较一致的结论, 但关于新出现的气体信号分子-硫化氢在此方面的研究国内外并不多见, 尤其是关于三者之间的网络调节机制, 目前尚不明确.

### ■相关报道

有学者研究发现: 外源性给予H<sub>2</sub>S的供体NaHS后, 门静脉压力并没有降低, 反而增加, 这在理论上与其他学者的研究有分歧. 因此, 关于硫化氢的具体作用机制仍需进一步深入研究.

### ■应用要点

本文进一步研究肝硬化发生发展的机制,为肝硬化门静脉高压的临床治疗提供理论基础。

条是5'-磷酸吡哆醛的酶依赖调途径,即:胱硫醚- $\beta$ -合成酶(CBS)和胱硫醚- $\gamma$ -裂解CSE途径<sup>[14]</sup>,第3条是通过半胱氨酸转移酶途径,含硫的氨基酸如半胱氨酸、蛋氨酸和同型半胱氨酸等为底物催化而生成。生成的硫化氢1/3以H<sub>2</sub>S气体形式、2/3以硫氢化钠(NaHS)形式存在,NaHS体内可解离为钠离子和硫氢根离子,后者与体内氢离子结合生成H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>S和NaHS之间形成动态平衡。在一些组织中生成H<sub>2</sub>S时CBS、CSE二者是必需的;在另一些组织中,仅有一个酶即可。因此,CBS和CSE的表达是组织特异性的。神经系统内主要有CBS分布,而没有CSE表达<sup>[20]</sup>;回肠、肝脏和肾脏则同时有CBS和CSE表达;在主动脉、肺动脉、肠系膜动脉、尾动脉和门静脉上有CSE表达而无CBS分布。

H<sub>2</sub>S诱导的血管舒张与NO和CO不同,其诱导的血管舒张效应不是由鸟苷酸环化酶cGMP通路介导的,可能与以下机制有关:(1)通过KATP通道途径使容量血管平滑肌舒张;(2)由KATP通道和内皮源性超极化因子共同参与对阻力血管的舒张作用;(3)细胞外Ca<sup>2+</sup>依赖性Ca<sup>2+</sup>的跨膜转运对平滑肌的收缩具有直接的作用,H<sub>2</sub>S的舒血管效应可能由外Ca<sup>2+</sup>依赖性机制所介导。

### 4 肝硬化门静脉高压形成时NO的产生及作用

Vallance及Moncada曾假设肝硬化时,有强大扩血管活性的NO可能与血流动力学的紊乱有关,内源性NO在肝硬化高动力循环中的作用引起了人们的极大注意。近年来研究表明NO在肝硬化高血流动力学状态及门静脉高压的形成、维持和加重中起着重要作用。在正常情况下大鼠门静脉血和下腔静脉血均可测到NO,肝组织内也有少量NOS活性,但主要以eNOS表达为主。NOS在肝硬化时表达明显增强,而且肝硬化早、中、晚期的表达逐渐增强,与肝功能Child分级呈正相关。Lee *et al*<sup>[21]</sup>和Shears *et al*<sup>[22]</sup>研究发现,用eNOS基因治疗动脉移植物能起到对移植物的保护作用,而用缺乏eNOS表达活性的移植物后再转染iNOS基因,同样能起到保护作用。

NO作为一种重要的细胞内信使,他在体内的大量异常生成可导致肝硬化门静脉高压形成,已为许多基础和临床研究所证实。目前普遍认为其大量产生的原因主要是因为肝硬化时门-体侧支循环的形成及脾动-静脉分流使门静脉循环始终存在内毒素,这些内毒素未经肝脏处理直

接进入体循环,从而增加了iNOS表达,使NO大量合成和释放。

### 5 肝硬化门静脉高压形成时CO的产生及作用

肝脏实质细胞产生的CO不仅在维持门脉舒张、保持肝窦松弛中起着关键的作用,而且在防止肝细胞的凋亡和保护肝细胞方面有着重要的作用。Pannen *et al*<sup>[23]</sup>用ZnPP(HO抑制剂)消除内源性CO,能引起肝血管阻力的明显升高,而L-NAME(NOS抑制剂)仅能引起肝血管阻力轻微上升,说明NO对肝窦的调节是很小的。有学者<sup>[24-25]</sup>用双荧光染色法证明了CO是通过作用于肝窦周围的肝星状细胞起作用的。郑勇 *et al*研究了不同时期肝硬化大鼠下腔静脉和门静脉血中的CO浓度,发现:肝硬化早期,下腔静脉血及门静脉血CO浓度无明显改变,只在II期以后CO浓度才明显升高,但III期下腔静脉血及门静脉血CO浓度却低于II期大鼠;另外此项研究还发现了肝硬化大鼠门静脉血中CO浓度明显高于下腔静脉,进一步说明了CO与门静脉高压有密切的关系<sup>[26-27]</sup>。

肝硬化门静脉高压时,CO过量产生,一方面可以松弛肝血窦、对抗血管阻力增加;另一方面也可引起内脏血管过度扩张、血管阻力下降、血流量增加,引起并加重门静脉高压的高动力循环。目前CO过量产生的原因尚不清楚,可能由于肝硬化时有内毒素血症、肿瘤坏死因子及NO升高,刺激HO-1的高表达,其下游产物CO可能相应增加。

### 6 肝硬化门静脉高压形成时H<sub>2</sub>S的产生及作用

内源性H<sub>2</sub>S作为重要的新型气体信号分子参与调节平滑肌的舒张功能,已经证明了内源性H<sub>2</sub>S水平的降低在自发性高血压的形成、心血管系统功能与结构的调节上起了重要的作用。CSE/H<sub>2</sub>S通路参与许多心血管系统疾病的病理生理过程,如低氧性肺动脉高压、高肺血流性肺动脉高压。H<sub>2</sub>S作为重要的血管活性因子,在门静脉高压症的发病中也日益引起重视。

国外2003年报道<sup>[28]</sup>,含H<sub>2</sub>S的混合气体可引起大鼠肝脏生化结构重组,长期(>2 wk)暴露于低剂量和短期暴露于高剂量含H<sub>2</sub>S的混合气体可导致肝细胞可逆性变化。Fiorucci *et al*<sup>[29]</sup>近期又发现CSE在肝细胞和星状细胞内表达,而窦细胞则不表达,星状细胞活化时,CSE的mRNA表达下调,CSE含量降低,H<sub>2</sub>S的合成减少,由于H<sub>2</sub>S能够抑制I、III型前胶原的合成,因此星状

细胞H<sub>2</sub>S的减少对I、III型胶原的抑制也降低,这在肝硬化和门脉高压的形成中具有重要意义。虽然H<sub>2</sub>S在肝硬化门静脉高压方面已有相关研究报道,但其对肝硬化门静脉高压的发生作用和机制目前尚不清楚。有学者<sup>[30]</sup>推测H<sub>2</sub>S可能通过以下途径在门静脉高压中发挥作用:(1)H<sub>2</sub>S参与调节平滑肌的舒张;(2)H<sub>2</sub>S抑制血管平滑肌细胞的增殖;(3)H<sub>2</sub>S诱导血管平滑肌细胞的凋亡。

## 7 气体信号分子在肝硬化门静脉高压形成时的相互作用

大量的研究已经证明了NO、CO和H<sub>2</sub>S这3种气体信号分子各自在肝硬化门静脉高压形成中所扮演的重要角色,但他们的作用机制并不相同。在肝硬化门静脉高压的形成过程中,他们相互之间是否存在网络调控的关系呢?

**7.1 NO与CO在肝硬化门静脉高压形成中的相互关系** NOS/NO系统和HO/CO系统在生物活性及功能上具有许多类似之处,并且他们的调节作用是密切相关的。刘秀梅 *et al*<sup>[31]</sup>通过复制门静脉高压大鼠和假手术大鼠模型,发现门静脉高压组NO、CO较假手术组明显增高,且与门静脉压力呈正相关,与外周动脉血管压力及门静脉血流量呈负相关。说明了NO、CO的过度形成和释放对门静脉高压的形成和维持起重要作用。郑勇 *et al*<sup>[32]</sup>研究发现正常人的外周血和门静脉中均可测定NO、CO,且浓度接近,但肝硬化组的门静脉和下腔静脉中NO、CO水平较正常人明显升高,进一步说明了NO、CO在肝硬化门静脉高压形成中的作用。Hotezel *et al*<sup>[33]</sup>证明了给予NO抑制剂后,可上调肝脏HO-1水平。

**7.2 NO与H<sub>2</sub>S在肝硬化门静脉高压形成中的相互关系** 实验证明<sup>[13]</sup>了NO可以促进H<sub>2</sub>S的产生,并且增强其舒血管作用:单独应用H<sub>2</sub>S引起的血管舒张效应很微弱,而在NO存在的情况下,舒张效应可以增加13倍,而其他内源性硫化物如L-半胱氨酸、谷胱甘肽本身或与NO协同都不能引起血管平滑肌舒张。病理状态下,NO对H<sub>2</sub>S/CSE体系表现出抑制作用<sup>[34]</sup>。但H<sub>2</sub>S对NO的影响目前还不清楚。有研究者认为内源性H<sub>2</sub>S可抑制肺动脉内皮细胞的血管内皮NOS(eNOS)表达,血清NO含量下降;当用CSE抑制剂(PPG)阻断内源性H<sub>2</sub>S生成时,体内的NO水平升高,内皮细胞eNOS蛋白表达亦增高。国内学者何春萍 *et al*<sup>[35]</sup>研究发现:外源性给予H<sub>2</sub>S的供体NaHS后,门静脉压力并没有降低,反而增加,考虑可能与H<sub>2</sub>S影响了

NO/iNOS体系变化有关。虽然NO、H<sub>2</sub>S在肝硬化门静脉高压中的作用机制目前还不清楚,但一些实验却证明了两者在肝硬化门静脉高压方面确实存在交叉作用。

**7.3 CO与H<sub>2</sub>S在肝硬化门静脉高压形成中的相互关系** 李晓惠 *et al*<sup>[36]</sup>发现外源性给予H<sub>2</sub>S的供体NaHS后,肺组织CO和HO-1蛋白表达明显升高;王燕飞 *et al*<sup>[37]</sup>研究证明了CO可以上调大鼠胸主动脉中硫化氢/胱硫醚-γ-裂解酶体系,Zhu *et al*<sup>[38]</sup>发现CO、H<sub>2</sub>S在心肌缺血再灌注损伤中起了保护性的作用;但CO与H<sub>2</sub>S在肝硬化门静脉高压形成中的作用机制确未见报道。

## 8 结论

NO、CO、H<sub>2</sub>S这3种气体信号分子均参与了肝硬化门静脉高压的形成。他们在体内共同形成了一个独特的气体信号网络,既相互独立又以网络调节的方式共同参与肝硬化门静脉高压的发生。但气体分子之间的调节机制以及他们之间涉及信号转导还需进一步深入研究。H<sub>2</sub>S作为一种新型气体信号分子,对他的深入了解及他与其他气体信号分子之间相互作用的进一步探讨,将是今后研究工作的重要方向之一。

## 9 参考文献

- 1 Kiel JW, Pitts V, Benoit JN, Granger DN, Shepherd AP. Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portal-hypertensive rats. *Am J Physiol* 1985; 248: G192-G195
- 2 Erario MA, Gonzales S, Romay S, Eizayaga FX, Castro JL, Lemberg A, Tomaro ML. Role of heme oxygenase/carbon monoxide pathway on the vascular response to noradrenaline in portal hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 196-201
- 3 Secchi A, Ortanderl JM, Schmidt W, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats. *J Surg Res* 2000; 89: 26-30
- 4 Stevens CF, Wang Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase. *Nature* 1993; 364: 147-149
- 5 Shibahara S, Muller R, Taguchi H, Yoshida T. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 7865-7869
- 6 Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986; 261: 411-419
- 7 McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997; 247: 725-732
- 8 Watanabe S, Akagi R, Mori M, Tsuchiya T, Sassa S. Marked developmental changes in heme

### ■名词解释

气体信号分子:能够通过第二信使的作用实现复杂生理功能调节作用的简单气体分子,称为气体信号分子。



# ■同行评价

本文对于肝硬化门静脉高压形成过程中一氧化氮、一氧化碳以及硫化氢三种信号分子的调节作用、作用机制等进行了较为系统的综述, 阐述清晰、明了, 内容系统、完整, 对于临床更好地理解门静脉高压形成机制及其防治具有借鉴意义。

- oxygenase-1 (HO-1) expression in the mouse placenta: correlation between HO-1 expression and placental development. *Placenta* 2004; 25: 387-395
- 9 Fernandez M, Bonkovsky HL. Vascular endothelial growth factor increases heme oxygenase-1 protein expression in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 634-640
- 10 史源, 李华强, 覃世文, 潘捷, 潘凤, 沈际泉. 一氧化碳和一氧化氮在新生儿缺氧缺血性脑病发病中的作用. *中国实用儿科杂志* 1998; 13: 349-350
- 11 Suematsu M, Ishimura Y. The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary function. *Hepatology* 2000; 31: 3-6
- 12 Christodoulides N, Durante W, Kroll MH, Schafer AI. Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation* 1995; 91: 2306-2309
- 13 Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 527-531
- 14 Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 1982; 206: 267-277
- 15 Zhuo M, Small SA, Kandel ER, Hawkins RD. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science* 1993; 260: 1946-1950
- 16 Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 1996; 16: 1066-1071
- 17 Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol* 2002; 26: 13-19
- 18 Chen XB, Du JB, Zhang CY, Tang CS, Zhou WJ. [Effect of hydrogen sulfide, a new gaseous signal molecule, on pulmonary vascular smooth muscle cell apoptosis in rats] *Beijing Daxue Xuebao* 2004; 36: 341-344
- 19 d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F, De Palma R, Ignarro LJ, Cirino G. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 4513-4518
- 20 Eto K, Kimura H. The production of hydrogen sulfide is regulated by testosterone and S-adenosyl-L-methionine in mouse brain. *J Neurochem* 2002; 83: 80-86
- 21 Lee PC, Wang ZL, Qian S, Watkins SC, Lizonova A, Kovesdi I, Tzeng E, Simmons RL, Billiar TR, Shears LL 2nd. Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 2000; 69: 1186-1192
- 22 Shears LL, Kawaharada N, Tzeng E, Billiar TR, Watkins SC, Kovesdi I, Lizonova A, Pham SM. Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis. *J Clin Invest* 1997; 100: 2035-2042
- 23 Pannen BH, Kohler N, Hole B, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* 1998; 102: 1220-1228
- 24 Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1333-1337
- 25 Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998; 101: 604-612
- 26 郑勇, 周婷, 孙侃, 杨军, 王吉耀. 不同时期肝硬化大鼠下腔静脉与门静脉血中一氧化碳浓度比较. *农垦医学* 2003; 25: 5-7
- 27 李睿, 郑勇, 周婷, 孙侃, 陈卫刚, 常向云, 杨军, 王吉耀. HO-1及CO在肝硬化大鼠不同时期的表达研究. *石河子大学学报(自然科学版)* 2005; 23: 24-26
- 28 Poliakov VA, Shakhramov VA, Stadnikov AA, Solnyshkova TG. [Structural-biochemical reorganization of rat liver caused by hydrogen sulfide-containing gas mixture] *Morfologiya* 2003; 124: 84-87
- 29 Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, Rizzo G, Distrutti E, Shah V, Morelli A. The third gas: H<sub>2</sub>S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 42: 539-548
- 30 乌剑利, 杨镇, 曾凡军, 张爱龙, 肖亮, 王超, 李崇健. 门静脉高压症患者血浆内源性硫化氢含量的变化和意义. *微循环杂志* 2008; 18: 53-55
- 31 刘秀梅, 王天才. 肝前性门静脉高压大鼠NO、CO与高动力循环的关系. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002; 11: 23-24
- 32 郑勇, 李睿, 孙侃, 常向云, 周婷, 王吉耀. 肝硬化患者一氧化氮、一氧化碳浓度与门静脉压力的关系. *中华消化杂志* 2006; 26: 424-425
- 33 Hoetzel A, Welle A, Schmidt R, Loop T, Humar M, Ryter SW, Geiger KK, Choi AM, Pannen BH. Nitric oxide-deficiency regulates hepatic heme oxygenase-1. *Nitric Oxide* 2008; 18: 61-69
- 34 张清友, 杜军保, 张春雨, 闫辉, 唐朝枢. 内源性一氧化氮对低氧大鼠肺动脉硫化氢脱氢酶-γ-裂解酶体系的影响. *实用儿科临床杂志* 2003; 18: 865-867
- 35 何春萍, 田德安, 王波, 刘梅, 但自力, 罗敏, 梅凡, 徐湖波, 梁扩寰. 硫化氢供体对实验性门静脉高压及内源性一氧化氮/一氧化氮合酶体系的影响. *胃肠病学和肝病学杂志* 2007; 16: 572-575
- 36 李晓惠, 杜军保, 丁亚光, 金红芳, 卜定方, 汤秀英, 唐朝枢. 硫化氢供体对实验性高肺血流性肺动脉高压及内源性一氧化氮/血红素氧合酶体系的影响. *北京大学学报(医学版)* 2006; 38: 135-139
- 37 王燕飞, 杜军保, 唐朝枢. CO上调大鼠胸主动脉中硫化氢/胱硫醚-γ-裂解酶体系. *基础医学和临床* 2006; 26: 809-811
- 38 Zhu JC, Shao JL, Ma H, Wang JK. [Interaction between endogenous cystathionine synthase/hydrogen sulfide and heme oxygenase-1/carbon monoxide systems during myocardial ischemic-reperfusion: experiment with rats] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 3222-3225

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# 胆管乳头状瘤病研究进展

杨丽, 杨锦林, 胡兵, 王一平

杨丽, 杨锦林, 胡兵, 王一平, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041

作者贡献分布: 杨丽、杨锦林、胡兵及王一平对此文所作贡献均等; 本综述由杨丽、杨锦林及胡兵查阅整理文献资料; 杨丽完成写作, 杨锦林与王一平审校。

通讯作者: 杨锦林, 副主任医师, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院消化内科。mouse-577@163.com 电话: 028-80818920

收稿日期: 2009-04-20 修回日期: 2009-06-18

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-08

## Advances in research on biliary papillomatosis

Li Yang, Jin-Lin Yang, Bing Hu, Yi-Ping Wang

Li Yang, Jin-Lin Yang, Bing Hu, Yi-Ping Wang, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Jin-Lin Yang, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. mouse-577@163.com

Received: 2009-04-20 Revised: 2009-06-18

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-08

### Abstract

Biliary papillomatosis is a rare disease that occurs more commonly in elderly males. The usual presentation of this disease is obstructive jaundice or recurrent cholangitis. Characterized by multiple papillary adenomas involving extensive areas of the biliary tree, biliary papillomatosis has a high recurrence rate and a significant risk of malignant transformation. Here, we will review the pathogenesis, clinical features, diagnosis and therapy of biliary papillomatosis.

Key Words: Biliary papillomatosis; Pathogenesis; Diagnosis; Therapy

Yang L, Yang JL, Hu B, Wang YP. Advances in research on biliary papillomatosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1967-1971

### 摘要

胆管乳头状瘤病临床上较为少见, 多发生于老年男性, 常以梗阻性黄疸或反复发作的胆管炎为临床表现。临床常呈多发性, 广泛累及胆管系统, 极易复发, 组织学上为良性病变, 但恶变

率高。现通过查询回顾胆管乳头状瘤病相关文献, 总结其发病机制, 临床表现, 诊断及治疗方面的特点。

关键词: 胆管乳头状瘤病; 发病机制; 诊断; 治疗

杨丽, 杨锦林, 胡兵, 王一平. 胆管乳头状瘤病研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(19): 1967-1971

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1967.asp>

### 0 引言

胆管乳头状瘤病临床上较为少见。随着诊断技术的提高, 有关此病的报道逐渐增多。本病的命名尚未统一, 国内称胆管乳头状瘤、多发性乳头状瘤或胆管乳头状瘤病, 国外称胆管乳头状瘤病。朱冠宝 *et al*<sup>[1]</sup>认为由于本病具有多发性, 双侧性和广泛累及胆管树的特点命名为胆管乳头状瘤病较为合理。胆管乳头状瘤病常呈多发性, 广泛累及胆管系统, 极易复发, 恶变率高。根据是否分泌黏液可将本病分为黏液分泌型和非黏液分泌型, 两者在大体观察和显微镜下观察无明显区别<sup>[2]</sup>。本文通过检索复习文献资料, 总结胆管乳头状瘤病的病因, 临床表现等, 以增加对本病的认识, 提高本病的诊断与治疗。目前国内文献有关胆管乳头状瘤病的病例报道37例, 英文文献中有关胆管乳头状瘤病的报道156例, 其中Lee *et al*<sup>[2]</sup>报道的58例胆管乳头状瘤病是目前例数最多的1篇病例报道。

### 1 胆管乳头状瘤病的病因及发病机制

本病病因尚不清楚, 现有文献报道本病和多种胆道疾病相关。其中最常见为胆道结石和炎症, Lee *et al*<sup>[2]</sup>报道的58例胆管乳头状瘤病病例中有21例(36%)发现有胆道结石, 11例(19%)有支睾吸虫病病史。也有一些与先天异常疾病相关。Iwasaki *et al*<sup>[3]</sup>报道了1例胆管乳头状瘤病起源于先天性胆总管囊肿合并有胆管与胰管结合的先异常(anomalous junction of the pancreatobiliary ductal system, AJPDS), 我们认为AJPDS导致胰液的反流, 引起了胆道肿瘤; 还有报道本病

### ■背景资料

胆管乳头状瘤病常呈多发性, 广泛累及胆管系统, 极易复发, 恶变率高。根据是否分泌黏液可将本病分为黏液分泌型和非黏液分泌型, 两者在大体观察和显微镜下观察无明显区别。本文通过检索复习文献资料, 总结胆管乳头状瘤病的病因, 临床表现等, 以增加对本病的认识, 提高本病的诊断与治疗。

### ■同行评议者

胡和平, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆医院消化科; 崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

## ■研究前沿

胆管乳头状瘤病临床上较为少见。随着诊断技术的提高,有关此病的报道逐渐增多。本病的命名尚未统一,国内称胆管乳头状瘤、多发性乳头状瘤或胆管乳头状瘤病,国外称胆管乳头状瘤病。

与先天性肝内胆管扩张(caroli's disease)有关<sup>[4]</sup>。Vassiliou *et al*<sup>[5]</sup>报道的1例胆管乳头状瘤病的患者在行肠镜筛查时发现一巨大肠息肉,病理检查示管状腺瘤和管状绒毛状腺瘤伴轻到中度不典型增生。Jazrawi *et al*<sup>[6]</sup>报道了1例诊断为胆管乳头状瘤病的患者有15年的溃疡性结肠炎病史。也有报道胆管乳头状瘤病合并有乙型肝炎,丙型肝炎后继发性肝硬化的病例<sup>[7]</sup>。现在没有证据支持胆管乳头状瘤病的发生是否与上述疾病相关,也可能与上述疾病的同时出现是巧合。本病的发病机制尚不清楚,现普遍认为胆管结石和炎症及胰液的长期刺激可导致胆管上皮细胞增生,组织异位,进一步引起乳头状增生甚至乳头状瘤。现文献显示亚洲病例报道占多数,但仍不能确定此病的发生是否与种族、地理位置有关。

## 2 胆管乳头状瘤病的病理

胆管乳头状瘤可以发生在整个胆道系统的任何位置。肉眼观胆管内有多发性的灰白色乳头状或息肉状肿物,带蒂或无蒂,附于胆管内膜上,质软较脆而易脱落,可有较多的胶冻状黏液,部分患者可无肉眼可见的黏液。病变中间可见正常胆管组织。常伴肿瘤近端和远端胆管的扩张或/和胆囊增大。镜检见扩张的胆管内上皮增生,呈乳头状或腺管状。乳头中可见纤细纤维血管心,上皮细胞呈单层柱状或立方状,核圆形或椭圆形,位于基底部。部分病例的上皮细胞可有不同程度异型增生,但不浸润管壁或周围肝组织,肝脏汇管区呈慢性炎以及急性胆管炎改变。胆管乳头状瘤病组织学上是良性,但术后约70%可复发,长期病程可致恶性病变,最高癌变率可达64%。Amaya *et al*<sup>[39]</sup>用免疫组织化学方法根据7例患者的胆管乳头状瘤病及伴有癌灶病变的黏液核心蛋白MUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC及糖蛋白T1、Tn、Sialoy Tn的表达,认为胆管乳头状瘤病是一个具有恶性潜能的交界性肿瘤。

## 3 胆管乳头状瘤病的临床特点

国内有37例胆管乳头状瘤病的病例报告<sup>[8-22]</sup>,其中16例只报告了本病的MRI特点<sup>[22]</sup>,Yeung *et al*<sup>[23]</sup>总结了2003年前英文文献中78例病例,我们检索的2003-2008年英文文献中也有78例<sup>[2-3,5-7,24-30]</sup>。我们收集到胆管乳头状瘤病较完整报道的国内外病例共177例:除了1例没有说明性别外,有117例男性,59例女性,男女发病比例约2:1;在已报道的病例中年龄最小是6岁,我国报道的病

例中年龄最小的是14岁,发病的平均年龄约61(6-83)岁。本病的实际发病率尚不清楚。

在所有病例中,34例患者(19%)病变仅累及肝外胆管,70例患者(40%)病变仅累及肝内胆管,70例(40%)患者病变广泛累及肝内外胆管,2例患者仅胆囊受累,1例患者未说明病变部位。由于文献结果记录不完整,目前我们尚不能计算同时累积左右半肝的病例数。在177例患者中病理结果呈恶性改变的有103例患者(57%)。

本病临床表现无特异性,主要表现为梗阻性黄疸,反复发作的胆管炎,也有报道患者无任何临床症状,而在腹部B超、CT或体检时偶然发现<sup>[2]</sup>。这使本病很难与胆道结石病和胆管炎相鉴别,容易导致漏诊和误诊。黄疸是本病最常见的症状,除21例临床表现不清楚外,在详细描述了临床表现的156例中,84例(54%)出现黄疸,为波动性或持续性的黄疸,以波动性黄疸多见。可能与肿瘤组织的脱落,坏死组织及分泌的胶冻状黏液堵塞胆管有关。在156例患者中82例(53%)出现腹痛,多为右上腹绞痛。39例(25%)患者出现发热,有时伴有寒战。2例患者以瘙痒为主要症状。也有患者仅表现为乏力不适,体质量减轻。多数患者伴有胆囊结石或/和胆管结石。胆道出血<sup>[20,25]</sup>,较少见,Kim *et al*<sup>[25]</sup>报道了1例上腹痛的患者,无黑便,便血病史,在行ERCP检查时见肿大的十二指肠乳头被血凝块堵塞,插管后引流出大量的血凝块和化脓的胆汁,该患者术后诊断为胆管乳头状瘤。胰腺炎<sup>[24-25]</sup>,较少见,可能与黏液,肿瘤碎片,血凝块导致胰管的暂时堵塞和十二指肠液的反流有关。Ohtsubo *et al*<sup>[31]</sup>报道了1例胆管乳头状瘤病患者在行胃镜时在胃体前壁发现包含胆汁的黏液分泌物,经超声内镜检查诊断为胆管胃瘘。考虑原因可能为肝左叶与胃相连,由于术后改变及肿瘤分泌的黏液压力等突破胃壁形成胆管胃瘘。晚期患者可出现胆汁性肝硬化,门静脉高压等表现。

## 4 胆管乳头状瘤病的诊断

本病临床表现无特异性,术前诊断困难。常规B超、CT、MR检查多提示肝内外胆管扩张,胆管内肿瘤不易发现,多误诊为胆石症,乳头状或壶腹部癌。ERCP下影像表现为胆道内充盈缺损,由于结石、炎症、血凝块、气泡等影响,使本病诊断困难。目前认为胆道镜可以直接观察胆道内部情况,是诊断本病最好的方法。

4.1 血液检查 无特征性,多为胆道梗阻、出血所致的常见表现。有时可伴有肿瘤标志物CEA,

CA199的升高.有病例报道CA199>1200 kU/L.

**4.2 B超** 有时仅可看到肝内外胆管扩张,无确切病变;有时可发现胆管内多发的边界清楚的强回声光团,自管壁突入扩张的胆管腔内<sup>[1]</sup>;有时可探及条索状实性回声,胆道结石,肿瘤占位.检查结果无特异性,很难确诊.有文献认为超声内镜诊断准确性和特异性高于经腹超声和CT、ERCP诊断率相近<sup>[32]</sup>,不过关于超声内镜在胆管乳头状瘤病中的报道较少,其价值需进一步评估.

**4.3 CT** 可显示边界清楚的实质性肿块向肝内外扩张的胆管内延伸,增强扫描肿块可有不规则的强化.

**4.4 MRI、MRCP** 在MRI横轴面上可见胆管系统的扩张.病变充盈管腔内,在T1WI信号略低于或等于脾脏的信号,T2WI稍高于肝脏的信号,即高于胰腺的信号,部分病例可看到完整的胆管壁,借此往往可以与胆管癌、胰头癌相区别.增强扫描,胆管内病变呈轻度不均匀强化,胆管壁强化稍明显.通过MRCP的重建,可以看到病变呈弥漫性生长方式充满胆管系统,但管壁尚可见,有作者称之为树枝状生长,并认为为本病的特征性表现,病变在MRCP的T2WI上呈中等高信号<sup>[22]</sup>.

**4.5 ERCP** 可见乳头口流出胶冻状黏液或胆管内抽出胶冻状黏液,造影后扩张的胆管内充满不规则、絮状漂浮状充盈缺损影.如检查中发现胆管或十二指肠腔内有胶冻状黏液,应高度警惕本病存在,胆管内的胶冻状黏液是本病的特征,其他胆系疾病极少见到此种胶冻状黏液<sup>[10]</sup>.

**4.6 胆道镜** 目前认为通过胆道镜的直观观察和活检是诊断本病最好的方法.

因本病常有肝内胆管的显著扩张,胆道镜能探查至肝内胆管及其二级以下分支,可见到附于胆管壁的息肉样赘生物,胆道镜直视下的活检即可明确诊断.有较多病例报道在胆道术后不能夹闭T管,行胆道镜明确病因时确诊为胆管乳头状瘤病.

## 5 胆管乳头状瘤病的治疗

由于本病呈多发性,广泛性,易恶变,复发率高,治疗较为困难.现仍以手术治疗为主,根据术前影像学检查,术中超声或术中胆道镜,明确病变的范围,决定手术方法和范围,尽量行根治性手术,将病变完全切除.若患者病变范围广泛,不能或不愿手术治疗时,可考虑内镜下治疗.据文

献报道根治性手术切除患者的平均生存期28 mo高于姑息性治疗患者的平均生存期11 mo,但患者生存期的长短与病理的良恶性关系不密切<sup>[23]</sup>.

### 5.1 手术治疗

**5.1.1 根治性手术切除:**仍是现在首选的治疗方法,在177例患者中有88例(50%)行根治性手术治疗.胆管乳头状瘤病的复发多与肿瘤组织是否完全切除密切相关,由于胆管乳头状瘤的多发性,术前很难完全诊断出所有病变,术中B超、胆道镜可以提高病变的检出率,增加病变的切除率.

**5.1.2 肝移植:**由于本病的多发性,广泛性使病变很难完全切除,累计肝左右两叶的病变,复发的病变很难再行根治性手术治疗,有作者提出了肝移植是根治此病唯一的方法.现文献报道的肝移植病例有6例<sup>[28,30,33-36]</sup>,但随访期限很短,其有效性还有待进一步评价.但理论上说肝移植是现在根治本病唯一的方法.

**5.1.3 姑息性手术:**在患者不能行根治性手术治疗时,可行姑息性手术治疗与引流,不过患者在短期内容易复发.

### 5.2 非手术治疗

**5.2.1 ERCP治疗:**患者不能或不愿手术治疗时,可以行ERCP下肿瘤刮除,十二指肠乳头切开,鼻胆管引流帮助胆汁引流缓解症状;恶性者可安置支架引流等对症治疗<sup>[10,40-41]</sup>.

**5.2.2 胆道镜:**焦成文 *et al*<sup>[12]</sup>报道在胆道镜下行肿瘤电凝灼烧治疗+T管内灌注5-FU治疗,患者症状有一定好转,但3 mo后症状加重,死于肝衰竭. Baughman *et al*<sup>[37]</sup>报道在胆道镜下行激光肿瘤切除术,胆道造影示肿瘤完全切除. Jazrawi *et al*<sup>[6]</sup>胆道镜下行氩等离子束凝固术治疗胆管乳头瘤病患者,取得一定疗效,但复查仍有残留病变,并很快复发出新的病变,最后等待肝移植.当患者不能手术治疗可以选择行经皮经肝胆汁引流缓解胆汁淤积等症状. Gunven *et al*<sup>[38]</sup>报道采用胆管内iridium-192放疗加电凝疗法治疗使患者6年无复发.

## 6 胆管乳头状瘤病的预后

由于现有随访资料的不完全或者随访时间太短,还不能准确的评价本病的生存时间. Lee *et al*报道的58例患者中非黏液分泌型和黏液分泌型胆管乳头状瘤患者的1年生存率分别为89%和69%,3年生存率分别为57%和37%,5年生存率分别为52%和19%.平均生存期在非黏液分泌型和黏液分泌型胆管乳头状瘤病患者中分别为52.27±

### ■相关报道

Lee *et al*报道的58例患者中非黏液分泌型和黏液分泌型胆管乳头状瘤患者的1年生存率分别为89%和69%,3年生存率分别为57%和37%,5年生存率分别为52%和19%.平均生存期在非黏液分泌型和黏液分泌型胆管乳头状瘤病患者中分别为52.27±6.72 mo和30.84±8.36 mo.



## ■应用要点

胆管乳头状瘤病比较少见, 临床表现缺乏特异性, 容易导致漏诊, 误诊。对反复发生的胆道感染和梗阻性黄疸, 特别是在ERCP检查时未发现结石的患者, 应把本病作为鉴别诊断, 以早期诊断, 早期治疗本病。

6.72 mo和 $30.84 \pm 8.36$  mo. 但两组患者的差异无统计学意义( $P = 0.1555$ )。根治性手术治疗和姑息性治疗的平均生存期分别为 $60.87 \pm 5.86$  mo和 $36.72 \pm 6.61$  mo, 两组间差异具有统计学意义( $P = 0.0103$ )。Yeung *et al*的报道显示在恶性胆管乳头状瘤病的患者中, 根治性手术治疗与姑息性治疗平均生存期分别为28 mo和10.6 mo; 在良性胆管乳头状瘤病的患者中, 根治性手术治疗与姑息性治疗平均生存期分别为28 mo和21 mo. 患者的生存期与病理的良恶性关系不密切, 而与是否进行根治性切除相关。

## 7 结论

胆管乳头状瘤病比较少见, 临床表现缺乏特异性, 容易导致漏诊, 误诊。对反复发生的胆道感染和梗阻性黄疸, 特别是在ERCP检查时未发现结石的患者, 应把本病作为鉴别诊断, 以早期诊断, 早期治疗本病。由于目前关于胆管乳头状瘤病的临床资料仍较少, 对本病的认识仍不充分, 仍需更多的资料, 研究以明确本病的病因, 发病机制, 探索更好的治疗方法。

## 8 参考文献

- 1 朱冠保, 程骏, 陈宗静. 胆管乳头状瘤病. 肝胆外科杂志 1999; 7: 118-120
- 2 Lee SS, Kim MH, Lee SK, Jang SJ, Song MH, Kim KP, Kim HJ, Seo DW, Song DE, Yu E, Lee SG, Min YI. Clinicopathologic review of 58 patients with biliary papillomatosis. *Cancer* 2004; 100: 783-793
- 3 Iwasaki Y, Shimoda M, Furihata T, Rokkaku K, Sakuma A, Ichikawa K, Fujimori T, Kubota K. Biliary papillomatosis arising in a congenital choledochal cyst: report of a case. *Surg Today* 2002; 32: 1019-1022
- 4 Payan MJ, Choux R, Sahel J, Laugier R, Kennedy R, Sastre B, Sarles H. Caroli's disease associated with pancreatic heterotopia and biliary papillomatosis. *Histopathology* 1985; 9: 1001-1006
- 5 Vassiliou I, Kairi-Vassilatou E, Marinis A, Theodosopoulos T, Arkadopoulos N, Smyrniotis V. Malignant potential of intrahepatic biliary papillomatosis: a case report and review of the literature. *World J Surg Oncol* 2006; 4: 71
- 6 Jazrawi SF, Nguyen D, Barnett C, Tang SJ. Novel application of intraductal argon plasma coagulation in biliary papillomatosis (with video). *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 372-374
- 7 Mourra N, Hannoun L, Rousvoal G, Parc R, Flejou JF. Malignant intrahepatic biliary papillomatosis associated with viral C cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 369-371
- 8 钱立新, 王建新, 余之刚, 付勤桦. 肝内胆管乳头状肿瘤6例分析. 中华消化内镜杂志 1999; 16: 292-294
- 9 党永康, 张自顺. 肝外胆管全程多发弥漫性乳头状瘤癌变一例. 中华普通外科杂志 2000; 15: 507
- 10 刘思德, 姜泊, 周殿元. 肝内胆管乳头状瘤影像学特点-附1例报道. 现代消化及介入诊疗 2006; 11:

107-108

- 11 叶国良, 陆振一, 盛红, 贺海珍. 肝内胆管乳头状瘤一例. 中华消化杂志 2005; 25: 472
- 12 焦成文, 皋岚雅, 王坚, 蔡珍福, 张大治. 胆道镜下试用电凝治疗胆管乳头状瘤病1例. 肝胆胰外科杂志 2008; 20: 369-370
- 13 徐怀阳, 黄侠. 胆管乳头状瘤1例分析. 肝胆胰外科杂志 2008; 20: 96, 100
- 14 陶自坚, 刘志, 凌莉. 胆管乳头状瘤病的临床病理. 安徽医药 2005; 9: 680-681
- 15 朱冠保, 程骏, 陈宗静. 胆管乳头状瘤病二例. 中华普通外科杂志 1999; 14: 316
- 16 郭玲玲, 郝春燕, 戴勇. 胆管乳头状瘤病一例. 中华肝胆外科杂志 2005; 11: 334
- 17 于永政, 黄秋林, 吴子安. 胆管乳头状瘤病一例. 临床外科杂志 2007; 15: 864
- 18 高瑞岗, 张雪松, 方登华, 杨浩雷, 郑磊. 肝内胆管乳头状瘤1例. 中国普通外科杂志 2000; 9: 551
- 19 尹冬青, 章华元, 罗婉芬, 陈培辉. 肝内胆管乳头状瘤病伴癌变1例报告. 实用肿瘤杂志 2005; 20: 446-447
- 20 韩育才, 胡本书, 赵崇娥. 肝内胆管乳头状瘤并胆道出血1例. 陕西医学杂志 1990; 19: 63
- 21 孟翔凌, 朱化刚, 杨文奇, 徐阿曼, 熊茂明, 李永翔, 胡孔旺. 肝内胆管乳头状瘤的诊治. 中华肝胆外科杂志 2004; 10: 107, 110
- 22 郭献日, 殷薇薇, 李又成, 温新东, 黎金林. 肝外胆管乳头状瘤的MRI诊断. 中华肝胆外科杂志 2005; 11: 586-588
- 23 Yeung YP, AhChong K, Chung CK, Chun AY. Biliary papillomatosis: report of seven cases and review of English literature. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 390-395
- 24 Antila KM, Makisalo H, Arola J, Numminen K. Best cases from the AFIP: biliary papillomatosis. *Radiographics* 2008; 28: 2059-2063
- 25 Kim JD, Lee KM, Chung WC, Chang UI, Lee BI, Lee JS, Kim HJ, Yang JM, Choi KY, Chung IS. Acute pancreatitis and cholangitis caused by hemobilia from biliary papillomatosis. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 177-180
- 26 Chung DJ, Lee SK, Ha HK, Kim PN, Lee MG. Multiple biliary papillomatosis: comparison of MR cholangiography with endoscopic retrograde cholangiography. *J Comput Assist Tomogr* 2002; 26: 968-974
- 27 Park JH, Park do H, Park SH, Lee SH, Kim SJ, Cho HD. Non-mucin-producing biliary papillomatosis diagnosed by transpapillary endoscopic curettage (with video). *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 519-520, discussion 520
- 28 Imvrios G, Papanikolaou V, Lalountas M, Patsiaoura K, Giakoustidis D, Fouzas I, Anagnostara E, Antoniadis N, Takoudas D. Papillomatosis of intra- and extrahepatic biliary tree: Successful treatment with liver transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13: 1045-1048
- 29 Gulluoglu MG, Ozden I, Poyanli A, Cevikbas U, Ariogul O. Intraductal growth-type mucin-producing peripheral cholangiocarcinoma associated with biliary papillomatosis. *Ann Diagn Pathol* 2007; 11: 34-38
- 30 Ciardullo MA, Pekolj J, Acuna Barrios JE, Gadano A, Mullen E, Castaing D, de Santinanes E. [Multifocal biliary papillomatosis: an indication for liver transplantation] *Ann Chir* 2003; 128: 188-190
- 31 Ohtsubo K, Ohta H, Sakai J, Mouri H, Nakamura S, Ikeda T, Kifune K, Yoshikawa J, Harada K, Nakanuma Y, Watanabe H, Motoo Y, Okai T,

- Sawabu N. Mucin-producing biliary papillomatosis associated with gastrobiliary fistula. *J Gastroenterol* 1999; 34: 141-144
- 32 Lai R, Freeman ML, Mallery S. EUS in multiple biliary papillomatosis. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 121-125
- 33 Dumortier J, Scoazec JY, Valette PJ, Ponchon T, Boillot O. Successful liver transplantation for diffuse biliary papillomatosis. *J Hepatol* 2001; 35: 542-543
- 34 Marion-Audibert AM, Guillet M, Rode A, Barnoud R, Mesnil A, Ducerf C, Bancel B, Pere-Verge D, Mabrut JY, Viale JP, Souquet JC. [Diffuse biliary papillomatosis: a rare indication for liver transplantation] *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 33: 82-85
- 35 Beavers KL, Fried MW, Johnson MW, Zacks SL, Gerber DA, Weeks SM, Fair JH, Odell P, Shrestha R. Orthotopic liver transplantation for biliary papillomatosis. *Liver Transpl* 2001; 7: 264-266
- 36 Charre L, Boillot O, Goffette P, Geubel A, Gigot JF, Sempoux C, Lerut J. Long-term survival after isolated liver transplantation for intrahepatic biliary papillomatosis. *Transpl Int* 2006; 19: 249-252
- 37 Baughman SM, Bishoff JT, Zimmerman MK, Carter MR, Kerby JD, Watkins KT. Case report: serial percutaneous cholangioscopy with laser ablation for the management of locally recurrent biliary intraductal papillary mucinous tumor. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 215-218
- 38 Gunven P, Gorsetman J, Ohlsen H, Ruden BI, Lundell G, Skoog L. Six-year recurrence free survival after intraluminal iridium-192 therapy of human bilobar biliary papillomatosis. A case report. *Cancer* 2000; 89: 69-73
- 39 Amaya S, Sasaki M, Watanabe Y, Tsui WM, Tsuneyama K, Harada K, Nakanuma Y. Expression of MUC1 and MUC2 and carbohydrate antigen Tn change during malignant transformation of biliary papillomatosis. *Histopathology* 2001; 38: 550-560
- 40 Seo DW, Lee SK, Kim MH. Biliary papillomatosis. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 67
- 41 D'Abrigeon G, Blanc P, Bauret P, Diaz D, Durand L, Michel J, Larrey D. Diagnostic and therapeutic aspects of endoscopic retrograde cholangiography in papillomatosis of the bile ducts: analysis of five cases. *Gastrointest Endosc* 1997; 46: 237-243

## ■同行评价

本文选题较好, 内容丰富, 具有一定的研究意义和临床指导意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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版权转让给本刊编辑部。

**2 稿件修改**

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

**3 版权**

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑: 张海宁 2009-07-08)

# 胶囊内镜与其他小肠检查技术的比较

辛磊, 廖专, 李兆申

## ■背景资料

胶囊内镜的问世填补了小肠无创性、可视化检查的空白, 逐渐成为诊断小肠疾病的重要手段。广泛用于不明原因消化系出血、小肠克罗恩病、家族性腺瘤性息肉病等小肠疾病的诊断和监测。但是, 胶囊内镜也表现出特异性不足的缺点, 发现的部分异常并不具有临床意义, 而且使用前需排除小肠梗阻等。

辛磊, 廖专, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433

作者贡献分布: 本综述由辛磊与廖专整理完成; 李兆申审校。

通讯作者: 李兆申, 教授, 主任医师, 200433, 上海市杨浦区长海路168号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科。  
zhaoshenli@hotmail.com

电话: 021-81873241 传真: 021-55620081

收稿日期: 2009-04-15 修回日期: 2009-05-21

接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-08

## Comparison of capsule endoscopy with other imaging modalities in small bowel

Lei Xin, Zhuan Liao, Zhao-Shen Li

Lei Xin, Zhuan Liao, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China  
Correspondence to: Professor Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China. zhaoshenli@hotmail.com

Received: 2009-04-15 Revised: 2009-05-21

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-08

## Abstract

Until only a few years ago, most of the small bowel was beyond the range of conventional examinations because of its special anatomical position. The advent of capsule endoscopy (CE) represents a significant breakthrough for non-invasive and visual diagnosis of diseases in the small bowel. Since CE permits direct acquisition of images from the mucosa with high sensitivity and safety, it has become an important tool for diagnosis and surveillance of obscure gastrointestinal bleeding, Crohn's disease, familial adenomatous polyposis and other small bowel diseases. However, CE also has some weakness such as low specificity and risk of retention. In this review, we will compare CE with other imaging modalities in small bowel.

Key Words: Capsule endoscopy; Small bowel follow-through; Push enteroscopy; Double-balloon enteroscopy; Intraoperative enteroscopy; Computed tomography enteroclysis; Magnetic resonance enteroclysis; Small bowel angiography

Xin L, Liao Z, Li ZS. Comparison of capsule endoscopy

with other imaging modalities in small bowel. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(19): 1972-1977

## 摘要

由于小肠解剖结构特殊, 传统技术对大部分小肠的检查受到很大限制。胶囊内镜的问世填补了小肠无创性、可视化检查的空白。胶囊内镜能够直接观察全小肠黏膜, 且敏感性高、安全无创, 逐渐成为诊断小肠疾病的重要手段, 广泛用于不明原因消化系出血、小肠克罗恩病、家族性腺瘤性息肉病等小肠疾病的诊断和监测。但是, 胶囊内镜也表现出特异性不足的缺点, 发现的部分异常并不具有临床意义, 而且其使用前需排除小肠梗阻等情况。现就近年来胶囊内镜的应用与其他小肠检查技术进行阐述。

关键词: 胶囊内镜; 小肠钡餐; 推进式小肠镜; 双气囊小肠镜; 术中小肠镜; CT灌肠造影; MR灌肠造影; 小肠血管造

辛磊, 廖专, 李兆申. 胶囊内镜与其他小肠检查技术的比较. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1972-1977

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1972.asp>

## 0 引言

小肠位于消化系中段, 因其解剖结构特殊, 传统的检查技术受到很大限制。世界上首粒胶囊内镜(capsule endoscopy, CE)于1999年问世, 2001年获得FDA批准上市。CE填补了小肠无创性、可视化检查的空白, 在临床应用中得到迅速发展。本文就CE与其他小肠检查技术的比较研究综述如下。

## 1 CE与小肠钡餐

小肠钡餐(small bowel follow-through, SBFT)是小肠影像学检查的常规方法, 可以对全小肠的形态进行评估, 但钡剂显影对扁平或轻微隆起的病灶辨别能力较低, 且成像重叠, 敏感性差。荟萃分析表明, CE对小肠疾病的诊断能力优于SBFT<sup>[1]</sup>。

美国胃肠病协会的技术评论认为, SBFT对

## ■同行评议者

戈之铮, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

消化系出血的病灶检出率极低, 随着CE技术的发展, SBFT不应再作为不明原因消化系出血(obscure gastrointestinal bleeding, OGIB)的检查手段<sup>[2]</sup>. 对3项临床试验的荟萃分析表明, CE对小肠病变的检出率较SBFT提高59%(CE: 67%, SBFT: 8%), 其中对有临床意义的出血病灶的检出率提高36%(CE: 42%, SBFT: 6%)<sup>[3]</sup>.

目前对2种检查手段的比较集中于克罗恩病(Crohn's disease, CD). 曾有研究认为SBFT诊断CD的敏感度为85%-95%, 特异度为89%-94%, 是CD的首选检查方式<sup>[4-5]</sup>. 但近几年的研究表明, SBFT容易漏检以红斑或口疮样溃疡为早期病变的CD, 而CE则可以直接观察全小肠黏膜, 能够发现SBFT检查为阴性的早期病变<sup>[6]</sup>, 其诊断率显著高于SBFT<sup>[7-9]</sup>. 这一结论得到了荟萃分析的支持<sup>[10]</sup>. 这项分析包括250例不伴有肠道狭窄的CD患者, 结果表明CE的病变发现率比SBFT提高40%. 但是, 进一步的亚组分析显示, CE主要对症状复发的确诊CD患者具有较高的病变检出率, 对疑似CD的初发患者, CE的检出率虽高于SBFT, 但并无显著差异. 因此研究者认为将CE作为CD的首选诊断方式, 应主要限于症状复发的确诊CD患者, CE对疑似CD的初发患者的诊断价值仍需进一步临床试验证实<sup>[10]</sup>.

值得注意的是, 目前的研究大多在CE检查之前排除肠道狭窄. 但CD患者常伴有无症状小肠狭窄, 存在CE滞留的可能. 一项回顾性研究表明, 在CD确诊患者的CE检查中, CE滞留率为13%, 疑似患者的滞留率为1.6%<sup>[11]</sup>. Solem *et al*<sup>[12]</sup>也认为由于需要影像学检查排除肠道梗阻, 限制了CE作为CD的一线检查方法. 而小肠钡餐能对整个小肠的形态进行评估, 尤其是能检出小肠存在的较大憩室和狭窄, 因此在CE检查之前行SBFT可以预先排除肠道狭窄, 防止发生CE滞留<sup>[6,12-13]</sup>.

## 2 CE与推进式小肠镜的比较

在过去20年中, 推进式小肠镜(push enteroscopy, PE)是检查和治疗OGIB等小肠疾病的重要手段, 其诊断率为12%-80%<sup>[14-22]</sup>. 但是, PE最大的缺点是检查范围只能到达屈氏韧带以下120 cm以内, 而临床实践提示, 内镜检查的范围与小肠病变的检出率呈正比, 因此CE较PE具有明显优势. 此外, PE对操作者要求较高, 患者在检查中痛苦大, 都限制了PE的临床应用.

一项包括14项研究的荟萃分析表明, CE和

PE对OGIB患者的小肠病变检出率分别为63%和28%, CE的诊断能力显著优于PE<sup>[3]</sup>. 进一步比较二者对具有临床意义的出血病灶的检出能力, CE仍显著高于PE(CE: 56%, PE: 26%). 分析还表明, CE对血管性和炎症性病灶的检出能力显著高于PE, 但二者对小肠肿瘤的检出能力无统计学差异. 2项研究表明, OGIB患者接受CE检查1年内, 输血次数、内镜检查、住院时间都显著减少, 提高了患者的长期受益<sup>[23-24]</sup>. 研究者认为由于CE检查的敏感性较高, 将其作为首选检查方式后, 如结果为阴性, 可避免进一步PE检查, 减少额外检查与医疗费用<sup>[24]</sup>.

此外, 在对CD的诊断能力上, CE也显著高于PE<sup>[3]</sup>. 目前对CE与PE在家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)的诊断能力上尚有不同意见. 部分研究者认为, CE不能准确反映FAP患者息肉数量, 对大息肉的检查结果不够准确, 尤其是对壶腹周围及十二指肠息肉效果不如PE等内镜检查<sup>[25-26]</sup>.

## 3 CE与双气囊小肠镜的比较

双气囊小肠镜(double-balloon enteroscopy, DBE)由日本山本博德教授发明, 于2003年投入临床<sup>[27]</sup>. DBE可选择经口经肛2种方式进镜, 检查范围覆盖全小肠, 操作者能够主动控制镜头移动, 选择最佳观察视角, 提供的图片质量高, 诊断率达43%-60%<sup>[28-30]</sup>, 并可以进行活检及治疗, 是一种有效的小肠检查手段, 近年来得到较快发展.

CE与DBE的相继问世对小肠疾病, 尤其是小肠出血的诊断具有深刻意义, 二者能够提供全小肠黏膜的直接观察图像, 且安全性高. 对397例小肠疾病的荟萃分析表明, CE与DBE对小肠疾病的诊断率分别为0.60与0.57, 没有显著差异<sup>[31]</sup>. 而且对血管性病变、炎性疾病、息肉/肿瘤的分层分析都显示二者具有相似的诊断能力. 但是, 进一步对3项前瞻性研究的敏感性分析显示, CE对具有临床意义的病灶检出率比DBE高19%<sup>[31]</sup>. 另一项荟萃分析表明, 如DBE未采用经口和经肛联合检查, 对小肠病变的检出率为50.2%, 显著低于CE(62.6%). 因此, 研究者认为对累及多肠段或多中心起源的小肠疾病, 如CD、肠道息肉病等, 应采取DBE经口和经肛联合检查<sup>[32]</sup>.

CE与DBE检查的一致性为61%-74%<sup>[2]</sup>. Mehdizadeh *et al*进一步对各种病变进行一致性分析, 结果显示, CE和DBE对溃疡病灶具有高度一致性( $\kappa = 0.74$ )、对体积较大的肿块及血管扩张具

## ■研究前沿

胶囊内镜与双气囊小肠镜的比较研究是该领域的热点问题, 尤其是对哪种检查应作为全小肠检查的首选方式尚存在争议.



## ■相关报道

Gölder *et al*对36例疑似小肠疾病患者进行前瞻性研究显示, CE对确诊或疑似CD患者中上段小肠病灶的检查能力明显优于MRE; CE能在36% OGIB患者中检出病灶, 而MRE没有检出任何异常. 而Crook *et al*对19例疑似小肠疾病患者的前瞻性试验则显示, CE与MRE的敏感性分别为92.9%和71.4%, 特异性为80%和60%, 均无统计学差异.

有中等一致性( $\kappa = 0.59$ 、 $0.42$ ), 而对黏膜息肉的一致性较差( $\kappa = 0.20$ ). 研究者推测原因在于CE对黏膜隆起病变的诊断能力较低<sup>[33]</sup>.

CE和DBE的自然属性和检查能力提示二者存在互补性. Arakawa *et al*<sup>[34]</sup>对OGIB患者的回顾性研究显示, 4例CE检查阳性而DBE检查阴性患者存在小肠粘连、癌性腹膜炎等病变, 阻碍DBE通过小肠中段; 11例DBE检查阳性而CE检查阴性的患者中, 6例病灶位于十二指肠、空肠近段, 因CE通过过快而被忽略, 另外5例病灶位于Roux-en-Y吻合空肠襻或憩室, CE未能靠近. 研究者建议联合使用这2种检查手段, 以相互弥补, 优化小肠疾病诊断. Fukumoto *et al*<sup>[35]</sup>的前瞻性试验中, DBE与CE的一致性较高( $\kappa = 0.76$ ), 不同的检查结果大多因为病灶过小或超出CE或DBE的检查范围. 值得注意的是, DBE检出的1例较大的空肠平滑肌瘤被CE忽视. 研究者认为主要原因是CE不能像DBE一样通过注气而透过黏膜层分辨黏膜下病灶. 之前的多篇报道也表明CE存在遗漏小肠肿块的可能<sup>[36-38]</sup>. 因此在临床使用中, 必须考虑到CE遗漏病灶, 尤其是黏膜下病灶的可能, 必要时应再次行DBE检查.

多项研究认为, 对小肠疾病患者首先进行CE检查, 为下一步DBE治疗确定进镜方式. 而DBE可在CE检查阳性结果的患者中实施, 以取得活检或实施治疗; 如果CE检查阴性但仍高度怀疑有小肠病灶, 仍应当实施DBE检查<sup>[31,35,39]</sup>.

## 4 CE与术中小肠镜

术中小肠镜(intraoperative enteroscopy, IOE)可在手术中使用内镜对消化系统疾病, 尤其是消化系统出血的病因进行检查. 操作者可经口、经肛或经肠管切口套入内镜, 同时观察肠壁及内镜图像. 既往研究表明, IOE对OGIB患者的诊断率为70%-100%, 是小肠影像学检查的金标准<sup>[40]</sup>. 但是, 作为有创检查, IOE伴有黏膜撕裂、肠内血肿、穿孔、肠梗阻等并发症. 据统计, 操作相关死亡率高达11%<sup>[41]</sup>. 随着CE技术的发展, 术中小肠镜的诊断价值逐渐下降.

Hartmann *et al*<sup>[42]</sup>对47例OGIB患者的前瞻性试验显示, CE和IOE对病变的检出率无显著差异, 分别为74.5%和72.3%. 其中, CE检查漏检1例有显性出血史患者的病灶, 且对3例有多处病灶的患者检出不足; 而IOE也漏检2处CE检查阳性的病灶. Douard *et al*<sup>[43]</sup>的研究包括自2000-11/2007-01因OGIB而行术中小肠镜探查

的18例患者, 这些患者在接受探查前均CE检查, 发现小肠出血部位15例(83.3%). 在这15例阳性患者中, 80%(12/15)在IOE检查中也发现了小肠病变, 被IOE遗漏的3例患者分别由剖腹手术发现动静脉畸形、胃镜检查发现Dieulafoy溃疡; 而3例CE检查阴性的患者, IOE也未发现小肠病变. 研究还表明IOE对OGIB的治疗有效率为73%(11/15). 研究者认为, CE已经取代IOE对OGIB诊断的地位, CE提示小肠病变时, IOE可作为OGIB进一步治疗的选择之一; 相反, 当CE结果阴性时则不主张行进一步的IOE检查.

## 5 CE与CT灌肠造影和MR灌肠造影

CE能够在直视下检查小肠黏膜, 敏感性较高. 然而很多小肠疾病不仅发生黏膜病变, 而且还穿透肠壁累及肠外. 多层螺旋CT和磁共振成像结合小肠造影技术形成的CT小肠灌肠造影(computed tomography enteroclysis, CTE)和MR小肠灌肠造影(magnetic resonance enteroclysis, MRE), 具有良好的软组织对比度及三维成像能力, 不仅可以观察黏膜, 还能够分析肠壁和肠外结构, 为小肠疾病的诊断提供了新的检查手段.

Triester *et al*<sup>[10]</sup>的荟萃分析显示, CE对CD患者小肠病变的检出率比CTE高38%. 但最近Solem *et al*<sup>[12]</sup>的研究结果显示, CE与CTE对CD患者小肠病变的敏感度无统计学差别(CE: 83%, CTE: 82%), 而CE的特异度仅为53%, 显著低于CTE(CE: 53%, CTE: 89%). 因此统计显示CE的准确性也低于CTE(CE: 67%, CTE: 85%). 与以往研究不同, 这项研究并非将所有异常发现都作为检出结果, 而是限于与临床症状有关的病变, 排除了CE的假阳性检查结果. 研究者认为, 特异度较低和检查前需要排除小肠梗阻限制了CE作为CD的一线使用.

目前对CE与MRE诊断能力进行比较的研究较少, 且存在不同观点. Gölder *et al*<sup>[44]</sup>对36例疑似小肠疾病患者进行前瞻性研究显示, CE对确诊或疑似CD患者中上段小肠病灶的检查能力明显优于MRE; CE能在36% OGIB患者中检出病灶, 而MRE没有检出任何异常. 而Crook *et al*<sup>[45]</sup>对19例疑似小肠疾病患者的前瞻性试验则显示, CE与MRE的敏感性分别为92.9%和71.4%, 特异性为80%和60%, 均无统计学差异. CE检出4例被MRE遗漏的黏膜病变, MRE发现被CE遗漏的1例小肠粘连. 但两项研究都表明, CE对黏膜病变的诊断价值高于MRE, MRE的优

势在于提供肠壁和肠腔外的信息. 二者互补性好, 应在临床中联合使用<sup>[44-45]</sup>.

## 6 CE与小肠血管造影

选择性小肠血管造影可用于对OGIB的定位、定性诊断, 在小肠出血时可表现出造影剂外溢的直接征象或间接显示原发病变. 但血管造影的诊断能力受出血量、插管水平以及肠蠕动等多种因素影响, 且在出血间歇期阳性率较低, 因此其临床应用较局限.

一项前瞻性试验显示, 25例OGIB患者先后接受CE和肠系膜血管造影检查, CE检出率为72%, 高于肠系膜血管造影56%的检出率. 在肠系膜血管造影检查阴性的11例患者中, 6例(55%) 在CE检查中得到阳性结果<sup>[46]</sup>. 另一项试验中, 41例急性OGIB患者随机接受CE或小肠血管造影检查. 随访显示, CE阳性检出率为55%(11/20), 小肠血管造影为9.5%(2/21), 3例小肠血管造影结果阴性的患者出现再次出血, 经CE检查发现病灶<sup>[47]</sup>. 上述研究一致认为, CE对病灶的检出能力显著优于小肠血管造影, 且操作简单、适用性好, 对OGIB患者应先于血管造影检查使用<sup>[31-32]</sup>. 但值得注意的是, 血管造影的诊断能力与受检对象是否为活动性出血密切相关, 而这2项研究没有明确提供小肠血管造影与末次出血的时间关系, 可能低估了小肠血管造影真实的临床价值.

## 7 结论

与其他小肠检查技术相比, CE能够直接观察全小肠黏膜, 且敏感性高、安全无创, 是诊断小肠疾病首选方法之一. 成本效益分析也支持CE作为OGIB的首选检查手段<sup>[48]</sup>. 但是, CE在提高对病灶敏感性的同时表现出特异性不足, 发现的部分异常并不具有临床意义, 而且需要排除小肠梗阻等情况, 因此应在诊断中联合其他手段, 以达到最佳效果.

## 8 参考文献

- Marmo R, Rotondano G, Piscopo R, Bianco MA, Cipolletta L. Meta-analysis: capsule enteroscopy vs. conventional modalities in diagnosis of small bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 595-604
- Raju GS, Gerson L, Das A, Lewis B. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on obscure gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology* 2007; 133: 1697-1717
- Leighton JA, Triester SL, Sharma VK. Capsule endoscopy: a meta-analysis for use with obscure gastrointestinal bleeding and Crohn's disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2006; 16: 229-250
- Bernstein CN, Boult IF, Greenberg HM, van der

- Putten W, Duffy G, Grahame GR. A prospective randomized comparison between small bowel enteroclysis and small bowel follow-through in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 113: 390-398
- Kelvin FM, Maglente DD. Enteroclysis or small bowel follow-through in Crohn's diseases? *Gastroenterology* 1998; 114: 1349-1351
- Park CH, Kim JO, Choi MG, Kim KJ, Kim YH, Kim YS, Kim TI, Do JH, Ryu JK, Moon JS, Park SH, Shim KN, Lee KM, Lee IS, Chun HJ. Utility of capsule endoscopy for the classification of Crohn's disease: a multicenter study in Korea. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1405-1409
- Eliakim R, Suissa A, Yassin K, Katz D, Fischer D. Wireless capsule video endoscopy compared to barium follow-through and computerised tomography in patients with suspected Crohn's disease--final report. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 519-522
- Chong AK, Taylor A, Miller A, Hennessy O, Connell W, Desmond P. Capsule endoscopy vs. push enteroscopy and enteroclysis in suspected small-bowel Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 255-261
- Hara AK, Leighton JA, Heigh RI, Sharma VK, Silva AC, De Petris G, Hentz JG, Fleischer DE. Crohn disease of the small bowel: preliminary comparison among CT enterography, capsule endoscopy, small-bowel follow-through, and ileoscopy. *Radiology* 2006; 238: 128-134
- Triester SL, Leighton JA, Leontiadis GI, Gurudu SR, Fleischer DE, Hara AK, Heigh RI, Shiff AD, Sharma VK. A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients with non-stricturing small bowel Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 954-964
- Cheifetz AS, Kornbluth AA, Legnani P, Schmelkin I, Brown A, Lichtiger S, Lewis BS. The risk of retention of the capsule endoscope in patients with known or suspected Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2218-2222
- Solem CA, Loftus EV Jr, Fletcher JG, Baron TH, Gostout CJ, Petersen BT, Tremaine WJ, Egan LJ, Faubion WA, Schroeder KW, Pardi DS, Hanson KA, Jewell DA, Barlow JM, Fidler JL, Huprich JE, Johnson CD, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Small-bowel imaging in Crohn's disease: a prospective, blinded, 4-way comparison trial. *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 255-266
- Buchman AL, Miller FH, Wallin A, Chowdhry AA, Ahn C. Videocapsule endoscopy versus barium contrast studies for the diagnosis of Crohn's disease recurrence involving the small intestine. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2171-2177
- Sidhu R, McAlindon ME, Kapur K, Hurlstone DP, Wheelton MC, Sanders DS. Push enteroscopy in the era of capsule endoscopy. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 54-58
- Saurin JC, Delvaux M, Gaudin JL, Fassler I, Villarejo J, Vahedi K, Bitoun A, Canard JM, Souquet JC, Ponchon T, Florent C, Gay G. Diagnostic value of endoscopic capsule in patients with obscure digestive bleeding: blinded comparison with video push-enteroscopy. *Endoscopy* 2003; 35: 576-584
- Adler DG, Knipschild M, Gostout C. A prospective comparison of capsule endoscopy and push enteroscopy in patients with GI bleeding of obscure origin. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 492-498
- Van Gossum A, Hittlet A, Schmit A, Francois E,

## ■创新盘点

本文对近几年对小肠检查手段的前瞻性研究、荟萃分析进行综述, 不仅包括检出率的比较, 还着眼于并发症、漏检病灶特点等, 较为全面地反映了胶囊内镜的临床价值.

## ■应用要点

本文对胶囊内镜与其他小肠检查手段的检出率、并发症等优缺点进行综述,尤其是胶囊内镜与双气囊小肠镜的对比研究为临床中全小肠检查时的选择提供参考。

- 21 Devière J. A prospective comparative study of push and wireless-capsule enteroscopy in patients with obscure digestive bleeding. *Acta Gastroenterol Belg* 2003; 66: 199-205
- 22 Mylonaki M, Fritscher-Ravens A, Swain P. Wireless capsule endoscopy: a comparison with push enteroscopy in patients with gastroscopy and colonoscopy negative gastrointestinal bleeding. *Gut* 2003; 52: 1122-1126
- 23 Hartmann D, Schilling D, Bolz G, Hahne M, Jakobs R, Siegel E, Weickert U, Adamek HE, Riemann JF. Capsule endoscopy versus push enteroscopy in patients with occult gastrointestinal bleeding. *Z Gastroenterol* 2003; 41: 377-382
- 24 Lewis BS, Swain P. Capsule endoscopy in the evaluation of patients with suspected small intestinal bleeding: Results of a pilot study. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 349-353
- 25 Ell C, Remke S, May A, Helou L, Henrich R, Mayer G. The first prospective controlled trial comparing wireless capsule endoscopy with push enteroscopy in chronic gastrointestinal bleeding. *Endoscopy* 2002; 34: 685-689
- 26 Mata A, Bordas JM, Feu F, Ginés A, Pellisé M, Fernández-Esparrach G, Balaguer F, Piqué JM, Llach J. Wireless capsule endoscopy in patients with obscure gastrointestinal bleeding: a comparative study with push enteroscopy. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 189-194
- 27 Leighton JA, Sharma VK, Hentz JG, Musil D, Malikowski MJ, McWane TL, Fleischer DE. Capsule endoscopy versus push enteroscopy for evaluation of obscure gastrointestinal bleeding with 1-year outcomes. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 891-899
- 28 de Leusse A, Vahedi K, Edery J, Tiah D, Fery-Lemonnier E, Cellier C, Bouhnik Y, Jian R. Capsule endoscopy or push enteroscopy for first-line exploration of obscure gastrointestinal bleeding? *Gastroenterology* 2007; 132: 855-862; quiz 1164-1165
- 29 Wong RF, Tuteja AK, Haslem DS, Pappas L, Szabo A, Ogara MM, DiSario JA. Video capsule endoscopy compared with standard endoscopy for the evaluation of small-bowel polyps in persons with familial adenomatous polyposis (with video). *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 530-537
- 30 Iaquinto G, Fornasari M, Quaia M, Giardullo N, D'Onofrio V, Iaquinto S, Di Bella S, Cannizzaro R. Capsule endoscopy is useful and safe for small-bowel surveillance in familial adenomatous polyposis. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 61-67
- 31 Yamamoto H, Sugano K. A new method of enteroscopy--the double-balloon method. *Can J Gastroenterol* 2003; 17: 273-274
- 32 Hadithi M, Heine GD, Jacobs MA, van Bodegraven AA, Mulder CJ. A prospective study comparing video capsule endoscopy with double-balloon enteroscopy in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 52-57
- 33 Nakamura M, Niwa Y, Ohmiya N, Miyahara R, Ohashi A, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Preliminary comparison of capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy in patients with suspected small-bowel bleeding. *Endoscopy* 2006; 38: 59-66
- 34 Matsumoto T, Esaki M, Moriyama T, Nakamura S, Iida M. Comparison of capsule endoscopy and enteroscopy with the double-balloon method in patients with obscure bleeding and polyposis. *Endoscopy* 2005; 37: 827-832
- 35 Pasha SF, Leighton JA, Das A, Harrison ME, Decker GA, Fleischer DE, Sharma VK. Double-balloon enteroscopy and capsule endoscopy have comparable diagnostic yield in small-bowel disease: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 671-676
- 36 Chen X, Ran ZH, Tong JL. A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to double-balloon enteroscopy in patients with small bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4372-4378
- 37 Mehdizadeh S, Ross A, Gerson L, Leighton J, Chen A, Schembre D, Chen G, Semrad C, Kamal A, Harrison EM, Binmoeller K, Waxman I, Kozarek R, Lo SK. What is the learning curve associated with double-balloon enteroscopy? Technical details and early experience in 6 U.S. tertiary care centers. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 740-750
- 38 Arakawa D, Ohmiya N, Nakamura M, Honda W, Shirai O, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Maeda O, Ando T, Goto H. Outcome after enteroscopy for patients with obscure GI bleeding: diagnostic comparison between double-balloon endoscopy and videocapsule endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 866-874
- 39 Fukumoto A, Tanaka S, Shishido T, Takemura Y, Oka S, Chayama K. Comparison of detectability of small-bowel lesions between capsule endoscopy and double-balloon endoscopy for patients with suspected small-bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 857-865
- 40 Baichi MM, Arifuddin RM, Mantry PS. Small-bowel masses found and missed on capsule endoscopy for obscure bleeding. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1127-1132
- 41 Chong AK, Chin BW, Meredith CG. Clinically significant small-bowel pathology identified by double-balloon enteroscopy but missed by capsule endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 445-449
- 42 Madisch A, Schimming W, Kinzel F, Schneider R, Aust D, Ockert DM, Laniado M, Ehninger G, Miehke S. Locally advanced small-bowel adenocarcinoma missed primarily by capsule endoscopy but diagnosed by push enteroscopy. *Endoscopy* 2003; 35: 861-864
- 43 Ell C, May A. Mid-gastrointestinal bleeding: capsule endoscopy and push-and-pull enteroscopy give rise to a new medical term. *Endoscopy* 2006; 38: 73-75
- 44 Zuckerman GR, Prakash C, Askin MP, Lewis BS. AGA technical review on the evaluation and management of occult and obscure gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology* 2000; 118: 201-221
- 45 Lewis BS, Wenger JS, Wayne JD. Small bowel enteroscopy and intraoperative enteroscopy for obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 171-174
- 46 Hartmann D, Schmidt H, Bolz G, Schilling D, Kinzel F, Eickhoff A, Huschner W, Möller K, Jakobs R, Reitzig P, Weickert U, Gellert K, Schultz H, Guenther K, Hollerbuhl H, Schoenleben K, Schulz HJ, Riemann JF. A prospective two-center study comparing wireless capsule endoscopy with intraoperative enteroscopy in patients with obscure GI bleeding. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 826-832
- 47 Douard R, Wind P, Berger A, Maniere T, Cellier C, Cugnenc PH. What is the role of intraoperative enteroscopy in the management of obscure GI bleeding after the development of video capsule

- endoscopy? *Gastrointest Endosc* 2008; 67: AB274
- 44 Gölder SK, Schreyer AG, Endlicher E, Feuerbach S, Schölmerich J, Kullmann F, Seitz J, Rogler G, Herfarth H. Comparison of capsule endoscopy and magnetic resonance (MR) enteroclysis in suspected small bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 97-104
- 45 Crook DW, Knuesel PR, Froehlich JM, Eigenmann F, Unterwieser M, Beer HJ, Kubik-Huch RA. Comparison of magnetic resonance enterography and video capsule endoscopy in evaluating small bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 54-65
- 46 Saperas E, Dot J, Videla S, Alvarez-Castells A, Perez-Lafuente M, Armengol JR, Malagelada JR. Capsule endoscopy versus computed tomographic or standard angiography for the diagnosis of obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 731-737
- 47 Leung WK, Ho SS, Lau JY, Suen B, Lai L, Wong G, Chiu PW, Ng S, Ng EK, Yu S. Immediate capsule endoscopy or mesenteric angiogram in patients with acute overt obscure gastrointestinal bleeding: interim results of a prospective randomized trial. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: AB128
- 48 Marmo R, Rotondano G, Rondonotti E, de Franchis R, D'Inca R, Vettorato MG, Costamagna G, Riccioni ME, Spada C, D'Angella R, Milazzo G, Faraone A, Rizzetto M, Barbon V, Occhipinti P, Saetone S, Iaquinio G, Rossini FP. Capsule enteroscopy vs. other diagnostic procedures in diagnosing obscure gastrointestinal bleeding: a cost-effectiveness study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 535-542

#### ■同行评价

本文对近年来胶囊内镜与其他小肠检查技术的比较研究进行了全面介绍和分析, 对临床具有良好指导意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

## 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨 国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知

本刊讯 由广东省中西医结合学会脾胃消化病专业委员会、广东省中医药学会消化病专业委员会主办的2009年脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班将于2009-09-25/27在广东省广州市召开, 现将会议征文有关事项通知如下:

### 1 征稿内容

中西医结合、中医治疗消化系统疾病的基础理论研究、临床经验总结、诊治的新进展, 名老中医、西医和中西医结合专家个人诊治特色总结。

### 2 征稿要求

论文资料务必真实可靠, 书写规范, 简明扼要, 每篇以3000字以内为宜, 并附800字左右的摘要1份; 来稿请用电脑打印, 用word软件编入, 并附软盘, 或发送电子邮件, 文稿中请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码及联系电话。截稿日期: 2009-07/30

### 3 交流方式

专题报告、论文宣读与讨论答疑相结合。入选论文并参会者给予记I类学分6分, 另外将择优编入《现代消化及介入诊疗》杂志。参加继续教育研讨班者另给予国家级一类学分12分。

### 4 投稿地址

(1)E-mail: zhangwdcn@163.com; (2)全文、摘要并附软盘寄至广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化编辑部罗永华同志(邮编: 510105); 并注明脾胃消化病学术会议投稿。无论文者也欢迎参会或报名参加研讨班。

### 5 联系方式

姚永莉, 510105, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院消化内科, 电话: 13189096556



# 胃康舒宁对大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变癌相关细胞因子的影响

杨丽萍, 张文娴, 蒋时红, 刘旺根, 王琦, 王雪萍

## ■背景资料

胃癌的发生是从慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→非典型增生→胃癌的多阶段发展过程。单纯性慢性萎缩性胃炎属胃癌前状态,伴有肠化生或不典型增生者被认为是癌前病变。近年来,PLGC的转化与逆转渐受关注,中医药对此辨证施治比现代医学更具有优势。

杨丽萍, 张文娴, 蒋时红, 刘旺根, 王琦, 王雪萍, 河南中医学院基础医学院 河南省郑州市 450003

刘旺根, 郑州大学基础医学院 河南省郑州市 450001

河南省教育厅自然科学基金资助项目, No. 2008A360021  
作者贡献分布: 此课题由刘旺根设计; 研究过程由杨丽萍、张文娴、蒋时红、刘旺根、王琦及王雪萍操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由蒋时红与王琦提供; 数据分析由杨丽萍完成; 本论文写作由杨丽萍与张文娴完成。

通讯作者: 刘旺根, 讲师, 450008, 河南省郑州市金水路1号, 河南中医学院基础医学院。agle28@tom.com

电话: 0371-65680256

收稿日期: 2009-04-11 修回日期: 2009-05-21

接受日期: 2009-05-21 在线出版日期: 2009-07-08

## Impact of Weikang Shuning Decoction on cytokines involved in the development of gastric precancerous lesions in rats with chronic atrophic gastritis

Li-Ping Yang, Wen-Xian Zhang, Shi-Hong Jiang, Wang-Gen Liu, Qi Wang, Xue-Ping Wang

Li-Ping Yang, Wen-Xian Zhang, Shi-Hong Jiang, Wang-Gen Liu, Qi Wang, Xue-Ping Wang, College of Basic Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Wang-Gen Liu, College of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Henan Provincial Education Department, No. 2008A360021

Correspondence to: Wang-Gen Liu, College of Basic Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, 1 Jinshui Road, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. agle28@tom.com

Received: 2009-04-11 Revised: 2009-05-21

Accepted: 2009-05-21 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the impact of Weikang Shuning Decoction on cytokines involved in the development of gastric precancerous lesions in rats with chronic atrophic gastritis.

**METHODS:** Sixty Wistar rats were randomly divided into four groups, namely, normal control group, model control group, Vitacoenzyme group and Weikang Shuning decoction group. A rat model of gastric precancer-

ous lesions was created by administration of *N*-methyl-*N*-nitroso-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) via drinking water. After the rats were treated with Vitacoenzyme and Weikang Shuning Decoction for 12 weeks, respectively, the levels of serum EGF, TGF- $\alpha$ , GH, TNF- $\alpha$ , IGF-II and bFGF were determined by radioimmunoassay (RIA).

**RESULTS:** The levels of serum GH, TNF- $\alpha$  and IGF-II in the Weikang Shuning Decoction group were significantly higher than those in the model control group ( $0.24 \pm 0.10 \mu\text{g/L}$  vs  $0.11 \pm 0.04 \mu\text{g/L}$ ,  $91.46 \pm 7.63 \mu\text{g/L}$  vs  $83.64 \pm 3.75 \mu\text{g/L}$  and  $0.38 \pm 0.12 \mu\text{g/L}$  vs  $0.27 \pm 0.17 \mu\text{g/L}$ , respectively,  $P < 0.05$  or  $0.01$ ). In contrast, the levels of serum EGF, TGF- $\alpha$  and bFGF in the Weikang Shuning Decoction group were significantly lower than those in the model control group ( $0.40 \pm 0.11 \mu\text{g/L}$  vs  $0.56 \pm 0.15 \mu\text{g/L}$ ,  $0.021 \pm 0.006 \mu\text{g/L}$  vs  $0.029 \pm 0.012 \mu\text{g/L}$  and  $1.44 \pm 0.37 \mu\text{g/L}$  vs  $3.26 \pm 0.45 \mu\text{g/L}$ , respectively;  $P < 0.05$  or  $0.01$ ).

**CONCLUSION:** Weikang Shuning Decoction has a good therapeutic effect against gastric precancerous lesions in rats, and its efficacy is superior to that of Vitacoenzyme. Regulation of serum EGF, TGF- $\alpha$ , GH, TNF- $\alpha$ , IGF-II and bFGF levels may be one of the mechanisms underlying the therapeutic effect of Weikang Shuning Decoction against gastric precancerous lesions.

**Key Words:** Weikang Shuning Decoction; Chronic atrophic gastritis; Precancerous lesions of gastric cancer; Cancer-related cytokines; Rats

Yang LP, Zhang WX, Jiang SH, Liu WG, Wang Q, Wang XP. Impact of Weikang Shuning Decoction on cytokines involved in the development of gastric precancerous lesions in rats with chronic atrophic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1978-1981

## 摘要

**目的:** 探讨胃康舒宁对胃癌前病变(PLGC)大鼠血清多种癌相关细胞因子的影响。

## ■同行评议者

管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验医学教研室

**方法:** 将60只Wistar大鼠随机分为4组: 正常组、模型组、维酶素组和胃康舒宁组。采用饮用 $N$ -甲基- $N$ -亚硝基- $N$ -硝基胍(MNNG)建立大鼠胃癌前病变模型, 用维酶素和胃康舒宁治疗12 wk后, 用放射免疫法检测各组大鼠血清中表皮生长因子(EGF)、转化生长因子- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )、生长激素(GH)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、胰岛素样生长因子-II(IGF-II)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的水平。

**结果:** 与模型组大鼠相比, 胃康舒宁组大鼠血清GH, TNF- $\alpha$ , IGF-II水平显著增高( $0.24 \pm 0.10 \mu\text{g/L}$  vs  $0.11 \pm 0.04 \mu\text{g/L}$ ,  $91.46 \pm 7.63 \mu\text{g/L}$  vs  $83.64 \pm 3.75 \mu\text{g/L}$ ,  $0.38 \pm 0.12 \mu\text{g/L}$  vs  $0.27 \pm 0.17 \mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.05$ 或 $0.01$ ), EGF, TGF- $\alpha$ , bFGF水平明显降低( $0.40 \pm 0.11 \mu\text{g/L}$  vs  $0.56 \pm 0.15 \mu\text{g/L}$ ,  $0.021 \pm 0.006 \mu\text{g/L}$  vs  $0.029 \pm 0.012 \mu\text{g/L}$ ,  $1.44 \pm 0.37 \mu\text{g/L}$  vs  $3.26 \pm 0.45 \mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.05$ 或 $0.01$ )。

**结论:** 胃康舒宁对大鼠胃癌前病变具有良好的治疗和逆转作用, 其疗效优于维酶素, 而调节EGF, TGF- $\alpha$ , GH, TNF- $\alpha$ , IGF-II, bFGF的分泌水平是其防治慢性萎缩性胃炎的作用机制之一。

**关键词:** 胃康舒宁; 慢性萎缩性胃炎; 胃癌前病变; 癌相关细胞因子; 大鼠

杨丽萍, 张文娟, 蒋时红, 刘旺根, 王琦, 王雪萍. 胃康舒宁对大鼠慢性萎缩性胃炎前病变癌相关细胞因子的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1978-1981

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1978.asp>

## 0 引言

近年来, 胃癌前病变(precancerous lesions of gastric cancer, PLGC)的转化与逆转渐受关注, 中医药对此辩证施治更具有较大优势。本课题组立足于补气养阴、化浊解毒为治则, 自拟胃康舒宁方, 临床应用及试验研究提示本方对不同病程的萎缩性胃炎具有良好疗效<sup>[1]</sup>。本文进一步观察胃康舒宁对PLGC大鼠血清癌相关细胞因子的影响, 探讨其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级 $\delta$  Wistar大鼠60只, 体质量 $110 \pm 10$  g, 动物及清洁级动物专用饲料均由河南省实验动物中心提供。 $N$ -甲基- $N$ -亚硝基- $N$ -硝基胍( $N$ -methyl- $N'$ -nitro- $N$ -nitrosoguanidine, MNNG)为Fluka公司产品; 各种癌相关细胞因子由郑州大

学第一附属医院放免室检测。

### 1.2 方法

**1.2.1 药物配制:** (1)维酶素溶液的配制: 将90片维酶素剥去糖衣, 充分研碎后溶于220 mL制成0.79%的溶液, 入瓶后将药瓶于沸水中加压蒸40 min, 石蜡封口, 4℃冰箱保存备用, 给药前复温, 并保证用药期间每周配药1次。(2)胃康舒宁水煎剂的配制: 太子参15 g、石斛15 g、白术10 g、当归10 g、白芍15 g、竹茹12 g、土元10 g等, 均购自河南中医学院第三附属医院, 经水煎、600 g/L乙醇沉淀48 h、过滤, 用前按课题设置要求浓缩成所需剂量的溶液, 保存方法同维酶素。

**1.2.2 分组及用药:** 雄性Wistar大鼠60只, 先将动物随机分为2组: 正常对照组12只, 常规饲养24 wk后, 每日灌胃蒸馏水2 mL, 直至实验结束; 余大鼠采用限期饮水给药法建立大鼠PLGC模型, 每日将新鲜配制浓度为100 g/L的MNNG饮用液供大鼠自由饮用, 连续24 wk。造模中死亡5只, 造模结束时(24 wk末)随机抽检7只了解PLGC的发生, 剩余36只存活大鼠即为有效动物。再将36只存活大鼠随机分为3组, 分别按下面方法处理12 wk: 模型组12只, 每日1次灌服自来水2 mL; 维酶素组: 12只已造模大鼠, 每日1次按成人等效剂量的10倍灌服维酶素溶液2 mL; 胃康舒宁组: 12只已造模大鼠, 给予生药含量相当于成人等效剂量10倍的胃康舒宁溶液灌胃, 每日1次, 每次2 mL。各组灌胃均12 wk。

**1.2.3 取材:** 所有大鼠于末次给药后禁食12 h, 观察记录一般情况, 乙醚麻醉, 称取体质量, 心尖取血后处死, 分离血清, -20℃保存, 待检。

**1.2.4 指标测定:** 采用放免法分别检测血清中表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子- $\alpha$ (transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ )、生长激素(growth hormone, GH)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、胰岛素样生长因子-II(insulin-like growth factor-II, IGF-II)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)含量, 各项指标检测均由郑州大学第一附属医院放免室完成。

**统计学处理** 将所有实验数据用Excel建立数据库, 计数资料用 $\chi^2$ 检验, 计量资料用方差分析 $t$ 检验。

## 2 结果

与模型组大鼠相比, 用药组大鼠血清GH、

### ■研发前沿

胃癌是我国最常见的癌症之一, 胃癌前病变(PLGC)的研究一直是消化科、肿瘤科热点。现代中医药应用研究表明: 胃癌前病变是可以逆转的, 因此中医药对本病的研究, 既是优势, 也是热点。

### ■应用要点

本方用药轻灵, 清热而不伤胃, 养阴而不恋邪, 且无壅滞之弊, 寓治于养之中, 是治疗不同证候萎缩性胃炎之较好方剂, 在多年临床应用该药治疗慢性萎缩性胃炎的实践中, 取得了良好疗效。

# ■名词解释

癌前状态：指易恶变的全身性或局部的疾病或状态，而癌前病变则是病理学概念。胃癌的癌前状态有：(1)慢性萎缩性胃炎；(2)胃息肉；(3)残胃炎；(4)恶性贫血胃体有显著萎缩者；(5)少数胃溃疡患者。而胃癌前病变是一个组织病理学概念，主要包括2个方面，即胃黏膜肠上皮化生(IM)和异性增生(Dys)。癌前病变也和癌前状态一样，有较轻度的，也有较重度的，轻度的可以逆转消失，或发展为重度的，但重度的癌前病变也不一定都发展成为胃癌，在适当的条件下或合理的治疗之后，逆转而趋向于正常分化。

表 1 各组大鼠血清癌相关细胞因子的变化 (mean ± SD, μg/L)

分组	n	EGF	TGF-α	GH	TNF-α	IGF- II	bFGF
正常组	12	0.35 ± 0.12	0.020 ± 0.009	0.26 ± 0.13	98.45 ± 11.44	0.53 ± 0.21	1.32 ± 0.27
模型组	11	0.56 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.029 ± 0.012 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.04 <sup>b</sup>	83.64 ± 3.75 <sup>b</sup>	0.27 ± 0.17 <sup>b</sup>	3.26 ± 0.45 <sup>b</sup>
维酶素组	11	0.52 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.019 ± 0.007 <sup>c</sup>	0.14 ± 0.06 <sup>b</sup>	86.33 ± 4.12 <sup>be</sup>	0.33 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.44 ± 0.42 <sup>ac</sup>
胃康舒宁组	12	0.40 ± 0.11 <sup>ad</sup>	0.021 ± 0.006 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.10 <sup>df</sup>	91.46 ± 7.63 <sup>ace</sup>	0.38 ± 0.12 <sup>ac</sup>	1.44 ± 0.37 <sup>cf</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 正常组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs 造模对照组; <sup>e</sup>P<0.05, <sup>f</sup>P<0.01 vs 维酶素组。

TNF-α、IGF- II水平显著增高( $P<0.05$ 或 $0.01$ )，EGF、TGF-α、bFGF水平明显降低( $P<0.05$ 或 $0.01$ )。各组大鼠血清癌相关细胞因子的变化见表1。

## 3 讨论

胃癌的发生是从慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→非典型增生→胃癌的多阶段发展过程。单纯性慢性萎缩性胃炎属胃癌前状态，伴有肠化生或不典型增生者被认为是癌前病变。近年来，PLGC的转化与逆转渐受关注，中医药对此辩证施治比现代医学更具有优势。现代中医认为，慢性萎缩性胃炎的病因多为胃阴不足，脾气虚弱，肝郁气滞，湿浊毒邪蕴于血分而成，病位在脾胃肝胆，牵及肺肾。本课题组立足于补气养阴、化浊解毒为治则，自拟胃康舒宁方，具有“升脾阳，泻阴火，活血滞，化湿浊，标本同治，气阴双补”的功效。本方用药轻灵，清热而不伤胃，养阴而不恋邪，且无壅滞之弊，寓治于养之中，是治疗PLGC的较好方剂。本项目前期研究结果也显示：胃康舒宁对PLGC大鼠胃黏膜萎缩、肠上皮化生、非典型增生状况均有显著地改善作用<sup>[1]</sup>。

近年来，随着分子生物学的发展，人们发现了许多促进不同类型细胞分裂和分化的生长因子，如EGF、TGF、TNF、IGF、VEGF及FGF等，他们受基因调控，通过与细胞膜上特异性受体结合而在调节细胞分化、增殖，维持上皮完整性中扮演重要角色<sup>[3]</sup>。

EGF主要由颌下腺、十二指肠勃氏(Brunner)腺和胰腺分泌，对于促进胃肠道黏膜上皮的增生，增加胃黏膜血流量、表面黏液和碳酸氢盐的分泌，抑制胃酸分泌等有重要作用，对消化道的生长、分化及成熟具有重要的调节作用，与胃癌的发生、发展有着密切的关系<sup>[4-5]</sup>。研究证实，慢性萎缩性胃炎状态下，长期炎症刺激使原癌基因C-erb-1的活化而过度表达癌基因产物

表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)，后者与表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)结合后，使细胞的分裂与增殖异常，引起胃黏膜的胃黏膜肠上皮化生、异型增生，最后导致胃癌发生<sup>[6-7]</sup>。TGF-α是维持胃黏膜完整性的最重要肽类物质。其作用主要是促进上皮迁移和增殖，促进局部血液循环，抑制胃酸分泌，保护胃肠道黏膜细胞。生理水平的TGF-α主要参与胃黏膜损伤后修复，但过高水平的TGF-α在多种上皮组织中有促增殖作用而表现出潜在的致癌作用。bFGF是一种重要的细胞分裂原，具有促进细胞分化和增生，血管生成以及创伤愈合等多种生物学效应。研究发现：大肠癌、肺癌、垂体腺瘤、黑色素瘤、前列腺癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌和消化系统的神经内分泌瘤有不同程度的bFGF蛋白表达，并与某些肿瘤的血管密度，转移趋势有关<sup>[8]</sup>。Rogeli *et al*<sup>[9]</sup>也发现bFGF参与细胞恶性转化。因此，此3种细胞因子对于胃黏膜的作用被认为具有“双刃性”，即在生理水平下可维持或促进胃黏膜损伤后修复，过高水平分泌却表现出致癌作用。本研究发现，PLGC模型组大鼠血清EGF、TGF-α、bFGF水平较正常组大鼠明显增高( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )，表明上述3种细胞因子可能参与了PLGC的发生和转化过程。经胃康舒宁治疗后血清EGF水平明显降低，表明中药胃康舒宁可以下调内源性EGF、TGF-α、bFGF的分泌而逆转PLGC胃黏膜的增殖异常，从而阻断其向胃癌转化。

TNF-α由单核巨噬细胞、淋巴细胞分泌，具有抗肿瘤、抗病毒、参与多种免疫调节过程的球蛋白，能特异地杀伤肿瘤细胞，而对正常细胞无不良影响。研究表明，中草药的抗肿瘤活性和增强机体免疫作用都与其能诱导TNF有关<sup>[10-11]</sup>。GH是由脑垂体远侧部嗜酸性细胞分泌的含氮类激素，除了对胃肠道黏膜上皮细胞的代谢、生长和分化有直接的调节作用，还可刺激多种组织产生IGF，通过胰岛素样生长因子介导而起

作用, 所以GH与胃泌素一样被认为是胃黏膜的主要营养因子, 对整个胃黏膜生长和修复有极重要的作用<sup>[12]</sup>. IGF-II是由67个氨基酸组成的多肽, 通过自分泌或旁分泌作用促细胞转化, 刺激DNA与蛋白合成, 促进细胞有丝分裂, 而在细胞增殖、分化、凋亡及突变等过程中起重要作用<sup>[13]</sup>. 本研究发现, PLGC模型大鼠存在着血清GH、TNF- $\alpha$ 、IGF-II水平低下( $P<0.01$ ), 表明PLGC的发生和转化可能与三者缺乏造成的胃黏膜营养匮乏、上皮修复障碍及机体免疫力低下有关. 经胃康舒宁治疗后, 大鼠胃黏膜炎症和萎缩程度明显减轻, 血清GH、TNF- $\alpha$ 、IGF-II水平显著增高( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ), 提示促使上述3种细胞因子的分泌增加, 可能是其逆转PLGC胃黏膜的增殖异常, 从而阻断其向胃癌转化的作用机制之一. 但对TNF- $\alpha$ 、IGF-II的作用仍未调节到接近正常水平, 提示本研究对该药的应用可能尚未达到最佳量效和/或时效关系. 对此, 本课题组也将继续进行关注和深入研究.

#### 4 参考文献

- 1 刘旺根, 王琦, 冯黎. 胃康舒宁对大鼠胃癌前病变胃黏膜病理形态及细胞凋亡指数影响的研究. 中外健康文摘 2007; 4: 469-470
- 2 刘旺根, 王守东, 冯黎. 胃康舒宁对胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及其相关调控基因表达的影响. 河南中医 2007; 27: 20-21
- 3 Jankowski J, al-Rawi HJ, Johnston DA, Hopwood D, Filipe MI, Coghil G, Wormsley KG. Growth regulatory peptides in gastric mucosa. *Clin Sci (Lond)* 1992; 82: 581-587
- 4 Konturek JW, Bielanski W, Konturek SJ, Bogdal J, Oleksy J. Distribution and release of epidermal growth factor in man. *Gut* 1989; 30: 1194-1200
- 5 章宏, 姒建敏, 王开明, 袁笑萍, 丁伟, 黄怀德. 表皮生长因子及其受体在慢性萎缩性胃炎中的表达和致癌变意义的探讨. 中国肿瘤临床 1998; 25: 85-93
- 6 蔡锦莲, 李爱娣, 曾兰英. 萎胃散对慢性萎缩性胃炎患者EGF和GH的影响. 中医药学刊 2006; 24: 1266-1268
- 7 刘旺根, 蒋时红. 黄芪建中汤干预脾虚型慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜表皮生长因子含量、诱导型一氧化氮合成酶和表皮生长因子受体基因的表达. 中国临床康复 2006; 10: 123-125
- 8 Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, Kobrin MS, Korc M. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 1993; 53: 5289-5296
- 9 Ikeguchi R, Kakinoki R, Matsumoto T, Yamakawa T, Nakayama K, Morimoto Y, Tsuji H, Ishikawa J, Nakamura T. Basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in a C- $\alpha$ -ion-implanted silicon chamber. *Brain Res* 2006; 1090: 51-57
- 10 Yamashiki M, Nishimura A, Nomoto M, Suzuki H, Kosaka Y. Herbal medicine 'Sho-saiko-to' induces tumour necrosis factor- $\alpha$  and granulocyte colony-stimulating factor in vitro in peripheral blood mononuclear cells of patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 137-142
- 11 王冠福, 李伟毅, 张敏, 程丽萍, 陈广洁, 孙福梅, 朱云凤. 灵苓胶囊对小鼠特异性体和肿瘤坏死因子产生以及抗S<sub>180</sub>肉瘤的作用. 上海免疫学杂志 1995; 15: 233-235
- 12 马阿火, 任疆, 王晓丽, 潘颖颖, 吕文嫦, 姒建敏. 慢性萎缩性胃炎患者血清生长激素水平的研究. 慢性萎缩性胃炎患者血清生长激素水平的研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003; 12: 553-555
- 13 Iizuka N, Oka M, Tamesa T, Hamamoto Y, Yamada-Okabe H. Imbalance in expression levels of insulin-like growth factor 2 and H19 transcripts linked to progression of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 4085-4089

#### ■同行评价

本文在前期临床报道的基础上, 从癌细胞相关因子方面探讨了胃康舒宁对大鼠胃癌前病变(PLGC)的作用机制, 对于进一步揭示其防治的分子机制做了有益的探索, 具有一定的临床指导意义与科学探索价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-08)



# GABA及GABA<sub>A</sub>受体激动剂对胰腺癌细胞增殖及MMP-2表达的影响

张利凡, 余胜利, 王 营, 费素娟

## ■背景资料

γ-氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统内的一种抑制性递质, 在人脑能量代谢过程中起重要作用。近年来研究发现, GABA作为神经递质参与了消化系统肿瘤的发生和转移过程, 国内有研究者利用流式细胞技术检测了GABA作用于胰腺癌SW1990细胞后细胞周期的变化, 发现其能促进SW1990细胞的生长, 但未能明确通过哪一受体介导。

张利凡, 湖北黄石四医院内科 湖北省黄石市 435006  
余胜利, 王营, 费素娟, 江苏徐州医学院附属医院消化内科  
江苏省徐州市 221000  
通讯作者: 张利凡, 435006, 湖北黄石市, 湖北黄石四医院内科。  
ysl71759379@126.com  
电话: 0714-5433546  
收稿日期: 2009-02-25 修回日期: 2009-05-30  
接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-08

## Effect of GABA and GABA<sub>A</sub> receptor activator on the proliferation of pancreatic cancer cells and the expression of MMP-2 in cancer cells

Li-Fan Zhang, Sheng-Li Yu, Ying Wang, Su-Juan Fei

Li-Fan Zhang, the Forth Hospital of Huangshi, Huangshi 435006, Hubei Province, China  
Sheng-Li Yu, Ying Wang, Su-Juan Fei, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Li-Fan Zhang, the Forth Hospital of Huangshi, Huangshi 435006, Hubei Province, China. ysl71759379@126.com  
Received: 2009-02-25 Revised: 2009-05-30  
Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the influence of γ-aminobutyric acid (GABA) and GABA<sub>A</sub> receptor activator on proliferation of pancreatic cancer cells and the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in cancer cells.

**METHODS:** The effect of GABA, THIP on proliferation of pancreatic cancer cell line SW-1990 was investigated using MTT assay, and the effect of different concentrations of GABA (80, 160, 320 μmol/L) and GABA (80 μmol/L) + THIP (20, 40, 80 μmol/L) receptor activator on the expression of MMP-2 in cancer cells was explored. The expression of MMP-2 protein was determined using Real-time quantitative PCR.

**RESULTS:** GABA and THIP promoted the proliferation of SW-1990 cell and showed a dose-dependent manner. Compared with the control

group, cells were promoted by GABA and THIP significantly ( $P < 0.01$  or  $0.05$ ). Compared with the control group, the expression of MMP-2 in SW-1990 cell was promoted by GABA, THIP significantly ( $60.15 \pm 4.16$ ,  $66.28 \pm 4.27$ ,  $71.23 \pm 4.30$  vs  $26.04 \pm 4.54$ ;  $75.01 \pm 4.64$ ,  $80.86 \pm 4.67$ ,  $86.35 \pm 4.89$  vs  $26.04 \pm 4.54$ ,  $P < 0.01$  or  $0.05$ ), and the expression of MMP-2 mRNA was increased markedly ( $39.35 \pm 3.24$ ,  $52.46 \pm 4.16$ ,  $63.45 \pm 5.12$  vs  $7.34 \pm 2.75$ ;  $78.3 \pm 5.39$ ,  $84.27 \pm 7.64$ ,  $97.38 \pm 6.64$  vs  $7.34 \pm 2.75$ ,  $P < 0.01$  or  $0.05$ ).

**CONCLUSION:** GABA could promote the proliferation of SW-1990 cell probably through GABA<sub>A</sub> receptor, GABA can promote SW-1990 cell invasion through up-regulating expressions of MMP-2.

**Key Words:** γ-aminobutyric acid; Pancreatic cancer cell; Matrix metalloproteinase-2

Zhang LF, Yu SL, Wang Y, Fei SJ. Effect of GABA and GABA<sub>A</sub> receptor activator on the proliferation of pancreatic cancer cells and the expression of MMP-2 in cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1982-1985

## 摘要

**目的:** 探讨γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)及其A受体激动剂THIP对胰腺癌SW1990细胞系增殖及表达基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的调控作用。

**方法:** MTT法检测SW1990细胞的生长; 免疫共聚焦技术观察不同浓度GABA(80、160、320 μmol/L)、GABA(80 μmol/L)+THIP(20、40、80 μmol/L)作用细胞后MMP-2表达强度; 通过荧光定量PCR(real-time PCR)检测MMP-2 mRNA的表达。

**结果:** GABA、THIP作用细胞后, 均能促进其生长, 且呈剂量依赖性, GABA组与对照组比差异显著( $P < 0.01$ 或 $0.05$ ); 与对照组比较, GABA、THIP作用后细胞中MMP-2的表达明显增强( $60.15 \pm 4.16$ ,  $66.28 \pm 4.27$ ,  $71.23 \pm 4.30$  vs  $26.04 \pm 4.54$ ;  $75.01 \pm 4.64$ ,  $80.86 \pm 4.67$ ,

## ■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

86.35±4.89 vs 26.04±4.54,  $P<0.01$ 或0.05), MMP-2 mRNA表达也明显增强(39.35±3.24, 52.46±4.16, 63.45±5.12 vs 7.34±2.75; 78.3±5.39, 84.27±7.64, 97.38±6.64 vs 7.34±2.75,  $P<0.01$ 或0.05).

**结论:** GABA可能是通过A受体介导胰腺癌SW1990细胞增殖, 并通过促进MMP-2蛋白的表达来影响胰腺癌SW1990细胞的侵袭和转移.

**关键词:**  $\gamma$ -氨基丁酸; 胰腺癌细胞; 基质金属蛋白酶-2

张利凡, 余胜利, 王莹, 费素娟. GABA及GABA<sub>A</sub>受体激动剂对胰腺癌细胞增殖及MMP-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1982-1985  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1982.asp>

## 0 引言

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是中枢神经系统内的一种抑制性递质, 在人脑能量代谢过程中起重要作用. 近年来研究发现, GABA作为神经递质参与了消化系统肿瘤的发生和转移过程, 国内有研究者<sup>[1]</sup>利用流式细胞技术检测了GABA作用于胰腺癌SW1990细胞后细胞周期的变化, 发现其能促进SW1990细胞的生长, 但未能明确通过哪一受体介导. Johnson *et al*<sup>[2]</sup> RT-PCR法检测胰腺癌和正常组织, 发现癌组织GABA<sub>A</sub>受体mRNA过度表达, 而正常组织没有. 研究表明, 胰腺癌细胞的侵袭转移是通过控制MMPs的分泌而实现的, 因MMP-2是胰腺癌细胞侵袭的关键酶, 本研究旨在探讨GABA及A受体激动剂THIP对胰腺癌SW1990细胞系增殖及其表达MMP-2的调控作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胰腺癌SW1990细胞, 上海交通大学附属第一医院王兴鹏教授惠赠. GABA、THIP购自上海舒伯伟化工仪器有限责任公司. Sigma产品, 鼠抗人MMP-2单抗及FITC标记羊抗鼠单抗, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司. MMP-2引物和探针由中山大学达安基因中心设计合成, 激光共聚焦显微镜(奥林巴斯, 日本).

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 胰腺癌SW1990细胞系, RPMI 1640培养基, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱37℃培养.

**1.2.2 GABA及A受体激动剂THIP对细胞生长影响的检测:** 分为GABA组(80、160、320  $\mu$ mol/L)、

表 1 MMP-2引物和探针序列

引物和探针序列	
引物	正义 5'-GGCCCCACAGGAGGAGAA-3' 反义 5'-GGTGCTGGCTGAGTAGATCCA-3'
探针	5'-FAM-CTGTGTTCTTTCAGGGAATGAAT-TAMRA-3'

GABA(80  $\mu$ mol/L)+THIP组(20、40、80  $\mu$ mol/L)和对照组, 对照组为培养液, 其余各成分与实验组相同. 应用MTT法, 每孔10<sup>5</sup>个细胞接种, GABA、THIP终末浓度梯度分别为80、160、320  $\mu$ mol/L; 20、40、80  $\mu$ mol/L. 培养12、24、48 h后加入MTT液20  $\mu$ L/孔, 37℃培养4 h时终止反应, 置酶标仪上570 nm波长测定各孔的吸光度(A值). 实验重复3次.

**1.2.3 免疫荧光共聚焦技术:** 培养的SW1990细胞加入GABA、THIP处理48 h后终止培养, 固定液(丙酮: 甲醇 = 1: 1)室温固定15 min. 加入抗MMP-2, 4度过夜. PBS室温洗涤, 加入FITC标记抗鼠二抗, 于37℃孵育30 min; 而后碘化丙啶复染细胞核, 激光共聚焦扫描显微镜下双通道观察, 绿色通道波长488 nm, 红色通道波长568 nm. 每个视野扫描5个层面, 计算机重建图像取图, 并定量分析阳性信号荧光强度, 重复实验3次.

**1.2.4 RNA提取和cDNA合成:** 用Tiandz公司的RNAout提取细胞总RNA, 测RNA的 $A_{260}$ 、 $A_{280}$ 的吸光度值,  $1.8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2.0$ , 计算出RNA含量, 将提取的RNA样本按 20  $\mu$ L反应体系逆转录RNA, 反应条件为37℃ 1 h, 95℃ 3 min, 合成cDNA, 置 -20℃保存备用.

**1.2.5 Real-time PCR:** MMP-2引物和探针由中山大学达安基因中心设计合成(表1). 50  $\mu$ L反应体系中 5×定量Buffer 10  $\mu$ L, MMP-2上下游引物各 1  $\mu$ L, 荧光探针各1  $\mu$ L, Taq酶1.5  $\mu$ L, dNTP 0.5  $\mu$ L, cDNA模板5  $\mu$ L和ddH<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L, 同时将定量模板稀释做标准曲线, 在Amp5700型实时检测扩增仪上进行扩增, 反应条件为: 93℃ 2 min, 93℃ 1 min, 55℃ 1 min, 共40个循环. 检测结果根据标准曲线由计算机软件计算后给出样本荧光定量反应的绝对定量值. 定量的单位是B = 拷贝数/ $\mu$ L cDNA.

**统计学处理** 所有数据用SPSS11.5软件进行t检验,  $P<0.05$ 为有显著统计学意义.

## 2 结果

**2.1 MTT结果** 胰腺癌SW1990细胞培养48 h后,

### ■ 研发前沿

GABA及其受体与胰腺癌的研究才刚刚起步, 其具体的作用方式及机制还有待于进一步研究.

## ■相关报道

国外研究资料表明,人胃癌组织中GABA含量增高,GAD活性增强,且GABA可影响大鼠胃癌的生长,而国内研究结果显示GABA能促进胰腺癌细胞的增殖.尽管后者研究提示GABA与胰腺癌细胞的增殖有关,但未能进一步揭示其介导途径.

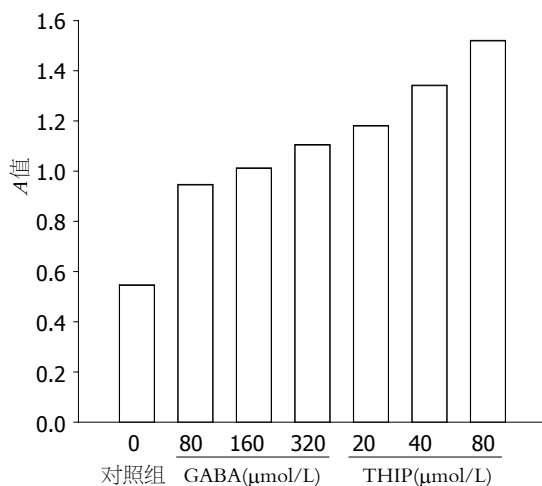


图1 GABA、THIP对SW1990细胞生长的影响.

表2 在SW细胞中GABA、THIP对MMP-2 mRNA表达强度的影响 (mean ± SD)

分组	MMP-2 mRNA
对照组	7.34 ± 2.75
GABA(μmol/L)	
80	39.35 ± 3.24 <sup>b</sup>
160	52.46 ± 4.16 <sup>b</sup>
320	63.45 ± 5.12 <sup>b</sup>
GABA(80 μmol/L)+THIP(μmol/L)	
20	78.37 ± 5.39 <sup>b</sup>
40	84.27 ± 7.64 <sup>b</sup>
80	97.38 ± 6.64 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组.

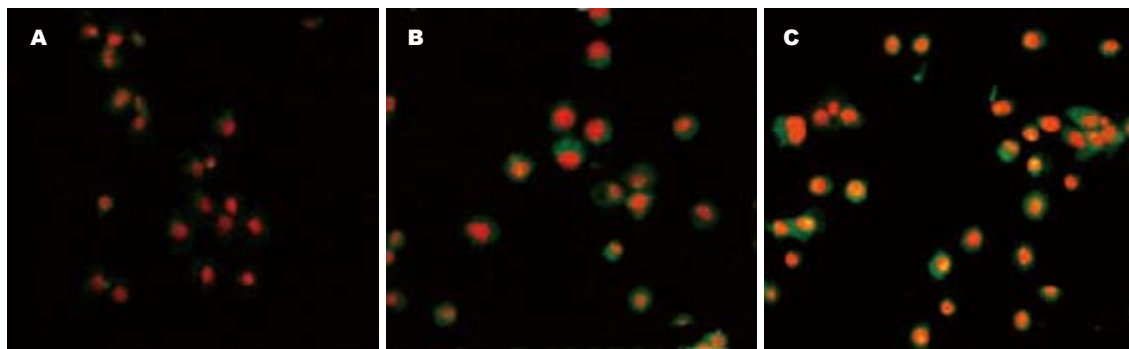


图2 MMP-2在SW1990细胞中的表达(×200). A: 对照组; B: GABA(80 μmol/L); C: THIP(20 μmol/L).

GABA组A值从 $0.947 \pm 0.022$ 增加到 $1.106 \pm 0.024$ ,与对照组比较差异显著( $P<0.01$ ); THIP组A值从 $1.182 \pm 0.031$ 增加到 $1.521 \pm 0.034$ ,与GABA组相比差异显著( $P<0.05$ ,图1).

2.2 GABA、THIP对胰腺癌SW1990细胞MMP-2表达强度的影响 免疫荧光共聚焦结果显示:对照组SW1990细胞表达MMP-2水平为 $26.04 \pm 4.54$ ; GABA处理后,其表达水平分别为 $60.15 \pm 4.16$ 、 $66.28 \pm 4.27$ 、 $71.23 \pm 4.30$ ,与对照组比较差异显著( $P<0.01$ ); THIP处理后,其表达水平分别为 $75.01 \pm 4.64$ 、 $80.86 \pm 4.67$ 、 $86.35 \pm 4.89$ ,与对照组、GABA组相比差异显著( $P<0.05$ ,图2).

2.3 GABA、THIP对胰腺癌SW1990细胞MMP-2 mRNA表达的影响 荧光定量PCR结果显示,SW细胞经GABA、THIP处理后,MMP-2表达强度明显增加,GABA组与对照组比较差异显著( $P<0.01$ ),且随着GABA浓度的增加,MMP-2 mRNA表达强度依次增加; THIP组与GABA组相比差异显著( $P<0.05$ ),也随着THIP浓度的增加,MMP-2 mRNA表达强度依次增加(表2).

### 3 讨论

Gilon *et al*<sup>[3]</sup>首次报道了GABA与细胞分化之间的关系,他们的研究表明,在发育胚胎的胰腺和十二指肠快速生长及成熟后可检测到一个GABA高峰,这一结果与以往关于大脑发育的研究是一致的<sup>[4]</sup>.已有的研究发现,GABA在消化系统肿瘤的发病机制上起重要作用,且其作用存在组织差异性,国外研究资料表明,人胃癌组织中GABA含量增高,GAD活性增强<sup>[5]</sup>,且GABA可影响大鼠胃癌的生长<sup>[6]</sup>,而国内<sup>[1]</sup>研究结果显示GABA能促进胰腺癌细胞的增殖.尽管后者研究提示GABA与胰腺癌细胞的增殖有关,但未能进一步揭示其介导途径;研究表明MMP-2分解基底膜的主要成分IV型胶原,是参与胰腺癌侵袭和转移的关键酶<sup>[7]</sup>.但对GABA与MMP-2的关系未作研究.

本研究表明,GABA能促进胰腺癌SW1990细胞的生长.随着浓度的提高,A值亦依次增加,加入GABA<sub>A</sub>受体激动剂THIP后,与GABA组相比,A值增加更为显著,这一结果提示,GABA对胰腺癌SW1990细胞的促生长作用可能是通

过A受体介导的;同时,本研究发现,在胰腺癌SW1990细胞培养技术基础上,应用GABA、THIP处理细胞,通过免疫荧光共聚焦技术和荧光定量PCR检测,发现MMP-2表达强度和MMP-2 mRNA表达增加,呈现一定的浓度效应.初步表明了GABA在胰腺癌SW1990细胞中对MMP-2的表达起促进作用.

上述研究表明,GABA可能是通过A受体介导胰腺癌SW1990细胞增殖的,并通过促进MMP-2蛋白的表达,从而影响胰腺癌SW1990细胞的侵袭和转移.GABA及其受体与胰腺癌的研究才刚刚起步,其具体的作用方式及机制还有待于进一步研究.

#### 4 参考文献

1 王莹,余胜利,刘军权,费素娟,陈剑群,许统俭,王人

- 灏,刘伟. GABA对胰腺癌细胞株SW1990生长的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2337-2339
- 2 Johnson SK, Haun RS. The gamma-aminobutyric acid A receptor pi subunit is overexpressed in pancreatic adenocarcinomas. *JOP* 2005; 6: 136-142
- 3 Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1995; 46: 423-462
- 4 Ong J, Kerr DI. GABA-receptors in peripheral tissues. *Life Sci* 1990; 46: 1489-1501
- 5 Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 2002; 213: 1-47
- 6 Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Nakaizumi A, Ichii M, Taniguchi H. Inhibition by gamma-amino-n-butyric acid and baclofen of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Res* 1990; 50: 4931-4934
- 7 王爱东,吕光成. 胃癌组织中MMP-9表达、微血管生成与胃癌侵袭和转移. *肿瘤* 2002; 22: 57-59

#### ■同行评价

本文对GABA促进SW细胞增殖的途径进行了探讨,得出初步结论,具有一定的科学性.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》计量单位标准

**本刊讯** 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa( $M$ 大写斜体,  $r$ 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ ( $A$ 大写斜体,  $r$ 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 $u$ (小写正体). 计量单位在+、-、 $\pm$ 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ,  $45.6 \pm 24$ 岁,  $56.4 \pm 0.5$  d.  $3.56 \pm 0.27$  pg/ml应为 $3.56 \pm 0.27$  ng/L,  $131.6 \pm 0.4$  mmol/L,  $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$ , WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm $\times$ 6 cm $\times$ 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B<sub>12</sub>用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5  $\mu\text{g}$ , hr改成h, 重量 $\gamma$ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg $\cdot$ d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-08)



# HepG2细胞在不同琼脂糖浓度下克隆形成能力的比较

丁洁, 魏德全, 蒋吉英, 王宝松, 姜栋栋, 于树娜, 王晓萃

## ■背景资料

软琼脂克隆形成实验是一种可用于分离具有不同增殖能力的细胞的方法。通过将单个细胞在软琼脂中形成集落, 可以筛选不同增殖能力的细胞。

丁洁, 魏德全, 蒋吉英, 王宝松, 姜栋栋, 于树娜, 王晓萃, 潍坊医学院人体解剖教研室 山东省潍坊市 261042  
山东省“泰山学者”建设工程专项基金资助项目  
山东省科技攻关计划基金资助项目, No. 2006GG3202016  
作者贡献分布: 丁洁与蒋吉英对此文所作贡献均等; 此课题由丁洁、魏德全、蒋吉英及于树娜共同设计; 研究所用试剂及分析工具由丁洁、魏德全、蒋吉英及王晓萃提供; 数据分析由丁洁、魏德全、王宝松及姜栋栋完成; 本论文写作由丁洁、魏德全及蒋吉英完成。  
通讯作者: 蒋吉英, 教授, 261042, 山东省潍坊市, 潍坊医学院人体解剖教研室. jiangjiying2002@163.com  
电话: 0536-2602504  
收稿日期: 2009-04-07 修回日期: 2009-06-12  
接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-08

## Comparison of colony-forming capacity of HepG2 cells in different soft agar systems

Jie Ding, De-Quan Wei, Ji-Ying Jiang, Bao-Song Wang, Dong-Dong Jiang, Shu-Na Yu, Xiao-Cui Wang

Jie Ding, De-Quan Wei, Ji-Ying Jiang, Bao-Song Wang, Dong-Dong Jiang, Shu-Na Yu, Xiao-Cui Wang, Department of Anatomy, Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong Province, China

Supported by: the Shandong Provincial Special Fund for "Mount Tai scholars"; the Key Science and Technology Program of Shandong Province, No. 2006GG3202016

Correspondence to: Professor Ji-Ying Jiang, Department of Anatomy, Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong Province, China. jiangjiying2002@163.com

Received: 2009-04-07 Revised: 2009-06-12

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To determine the optimal cell density and agar concentration for separation of cell clones and thereby provide a reference for screening of tumor stem cells.

**METHODS:** HepG2 cells were mixed with 10 g/L agarose and inoculated in 2 g/L (group A) and 3 g/L (group B) soft agar at different densities. After 14 days of culture, the number of cell clones was counted and the rate of colony formation was calculated.

**RESULTS:** The number of clones formed in group A was significantly higher than that in group B ( $t = 4.36, P < 0.05$ ). The rates of colony formation observed in both group A and group

B increased with the increase in cell density that varied between 100 and 500 cells per well. In contrast, the rate of colony formation decreased with the increase in cell density that varied between 600 and 1000 cells per well.

**CONCLUSION:** The optimal concentration of agar in the upper layer for colony formation is 3 g/L, with 10% agarose as a stock agar. The maximum rate of colony formation is achieved when cells are inoculated at a density of 500 cells per well.

**Key Words:** Soft agar cloning; HepG2 cell line; Rate of colony formation

Ding J, Wei DQ, Jiang JY, Wang BS, Jiang DD, Yu SN, Wang XC. Comparison of colony-forming capacity of HepG2 cells in different soft agar systems. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1986-1989

## 摘要

**目的:** 探讨分离细胞克隆的最佳细胞密度和最适琼脂浓度, 为肿瘤干细胞的筛选提供更广阔的思路。

**方法:** 将HepG2单细胞悬液与10 g/L的琼脂糖相混合, 在2 g/L(A组)和3 g/L(B组)琼脂中接种不同密度的HepG2细胞, 14 d后观察克隆形成。

**结果:** 100-1000个/孔的各个实验组中, A组细胞的克隆数高于B组, 差异有统计学意义( $t = 4.36, P < 0.05$ ); 在细胞密度为100-500个/孔时, A、B组细胞克隆形成率随着细胞密度的增加逐渐增加; 600-1000个/孔, A、B组均随着细胞密度的逐渐加大, 克隆形成率呈现下降趋势。

**结论:** 在进行软琼脂克隆形成实验时, 可以采用2 g/L的上层琼脂浓度, 并采用10 g/L的琼脂糖凝胶作为储备胶, HepG2细胞在500个/孔时的克隆形成率最高。

**关键词:** 软琼脂克隆; HepG2细胞; 克隆形成率

丁洁, 魏德全, 蒋吉英, 王宝松, 姜栋栋, 于树娜, 王晓萃. HepG2细胞在不同琼脂糖浓度下克隆形成能力的比较. 世界华人消化

## ■同行评议者

梁力建, 教授, 中山大学附属第一医院肝胆外科

杂志 2009; 17(19): 1986-1989

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1986.asp>

## 0 引言

软琼脂克隆形成实验作为体外检测细胞增殖能力和致瘤性的一种常规方法, 常用来分离和纯化肿瘤细胞<sup>[1]</sup>, 单克隆抗体杂交瘤细胞的克隆筛选以及抗肿瘤药物体外抑瘤能力的评价<sup>[2-4]</sup>, 随着肿瘤干细胞学说的兴起, 也被用来筛选具有干细胞性质的细胞<sup>[5]</sup>, 为此, WHO及美国FDA等机构认为可采用软琼脂克隆法等体外方法检测细胞的致瘤性. 但以往报道中所采用的凝胶浓度以及细胞密度不尽相同, 从而使克隆形成率不一致<sup>[6-7]</sup>. 因此, 本课题对不同细胞密度和不同琼脂糖浓度下HepG2细胞的克隆形成能力进行了比较.

## 1 材料和方法

1.1 材料 DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司; 低熔点琼脂购自上海YITO Bio-instrument公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司; HepG2细胞株由本校免疫学教研室梁淑娟博士惠赠.

### 1.2 方法

1.2.1 制备底层琼脂: (1)50 g/L储备胶的制备: 称取琼脂糖粉末0.5 g, 溶于装有10 mL D-Hanks液的青霉素小瓶中, 高压灭菌备用. (2)10 g/L储备胶的制备: 称取琼脂糖粉末0.1 g, 溶于装有10 mL D-Hanks液的青霉素小瓶中, 高压灭菌备用. (3)6 g/L底层琼脂的制备: 将10 g/L的琼脂糖凝胶置于沸水浴中融化, 待冷却至50℃时取出6份与4份预热至37℃的新鲜培养基充分混匀后迅速倒入24孔培养板中, 每孔0.8 mL, 室温静置冷却备用.

1.2.2 制备上层琼脂: (1)不同密度细胞悬液的制备: 取对数生长期的HepG2细胞, 用2.5 g/L的胰蛋白酶消化后, 用细胞计数板计数, 调整细胞密度为 $1 \times 10^7$ /L. (2)2 g/L上层琼脂的制备: 将10 g/L的琼脂糖凝胶置于沸水浴中融化后, 待冷却至50℃时, 用刻度吸管取出0.48 mL迅速分别与预热至37℃的1.92 mL的不同密度的细胞悬液相混合, 制备2 g/L上层琼脂, 同法制备3 g/L上层琼脂, 分别为A组和B组. 然后分别将各组的琼脂迅速倒入到24孔板中, 每孔0.8 mL, 每种细胞密度重复接种3个孔, 调节6种细胞密度最终分别为100、300、500、600、800、1000个/孔. 所有的实验组重复3次.

1.2.3 细胞培养及结果观察: 在各孔添加适当的完全培养基覆盖琼脂表面, 防止表面干燥, 然后放入37℃, 含50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养, 每隔1-2 d补加适量培养基, 连续培养至14 d, 参考Li *et al*<sup>[8]</sup>的方法, 将 $\geq 50 \mu\text{m}$ 或50个细胞的细胞团视为一个克隆, 观察所形成的克隆数目, 并计算克隆形成率. 克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数  $\times$  100%.

统计学处理 统计数据用SAS 8.2软件进行处理, 采用 $t$ 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

在培养的第1-2天, 细胞呈单个、散在的均匀分布; 第3天时开始形成克隆, 此时的克隆呈桑葚状, 由4-6个细胞组成, 随着克隆的增长, 克隆中心细胞相互重叠, 克隆边缘有不规则的互相延续的单个细胞存在(图1). 随着培养时间的延长, 细胞在2 g/L的上层琼脂中的克隆增殖速度大于其在3 g/L的上层琼脂中的克隆增殖速度.

在克隆培养14 d时, 100、300、500个/孔的3个实验组在2 g/L的上层琼脂中的克隆形成数分别为 $35.04 \pm 2.11$ 个、 $170.37 \pm 4.23$ 个、 $294.00 \pm 7.65$ 个, 克隆形成率分别为 $35.04\% \pm 2.11\%$ 、 $56.79\% \pm 1.53\%$ 、 $58.80\% \pm 1.41\%$ ; 其在3 g/L的上层琼脂中的克隆形成数分别为 $28.56 \pm 2.31$ 个、 $149.19 \pm 4.74$ 个、 $260.50 \pm 7.50$ 个, 克隆形成率分别为 $28.56\% \pm 2.31\%$ 、 $49.73\% \pm 1.58\%$ 、 $52.10\% \pm 1.50\%$ . 随着细胞密度的增加, HepG2细胞在2种浓度的上层胶中克隆形成率逐渐增加. 600、800、1000个/孔的3个实验组在2 g/L的上层琼脂中的克隆形成数分别为 $326.22 \pm 11.28$ 个、 $427.92 \pm 18.88$ 个、 $523.30 \pm 12.90$ 个, 克隆形成率分别为 $54.37\% \pm 1.88\%$ 、 $53.49\% \pm 2.36\%$ 、 $52.33\% \pm 1.29\%$ ; 其在3 g/L的上层琼脂中的克隆形成数分别为 $305.34 \pm 11.46$ 个、 $400.48 \pm 11.20$ 个、 $489.6 \pm 13.30$ 个, 克隆形成率分别为 $50.89\% \pm 1.91\%$ 、 $50.06\% \pm 1.40\%$ 、 $48.96\% \pm 1.33\%$ . 随着细胞密度的逐渐加大, 在2种不同浓度的上层胶中细胞克隆形成率均呈现下降趋势. 从100个/孔到1000个/孔的各个实验组中, HepG2细胞在2 g/L的上层琼脂中的克隆形成率均高于其在3 g/L的上层琼脂中克隆形成率, 经统计学处理, 差异显著( $t = 4.36$ ,  $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

对于储备胶的制备, 以往文献报道不一, 有研究

### ■创新盘点

本研究通过软琼脂克隆形成实验分离出克隆形成细胞, 并探索了分离细胞克隆的最佳细胞密度和最佳琼脂浓度.

## ■应用要点

软琼脂克隆形成实验可用于分离不同增殖能力的细胞,为肿瘤的基础与临床研究提供基础。

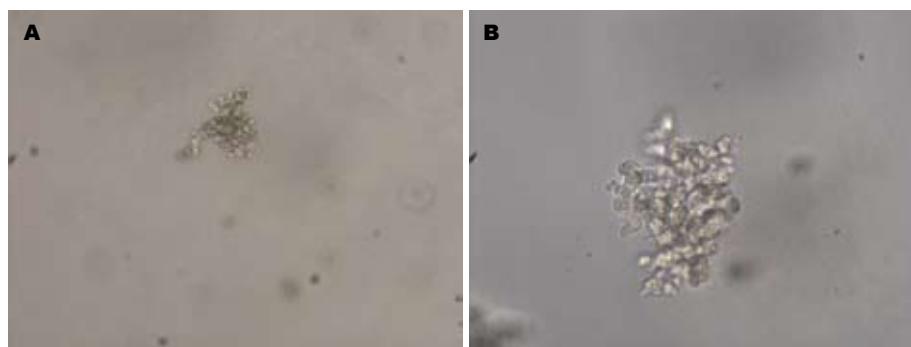


图1 HepG2在软琼脂中形成的克隆。  
A: 10×; B: 20×。

者<sup>[9]</sup>使用50 g/L的琼脂糖凝胶作为储备胶,亦有人<sup>[10-11]</sup>使用10 g/L的琼脂糖凝胶作为储备胶,本课题组通过实验发现50 g/L的凝胶融化速度较慢,而且由于胶的浓度较大,在与培养基混合时容易形成小的凝块,不利于使细胞分布均匀,从而影响克隆的生长和分离。10 g/L的琼脂糖凝胶由于浓度低,不易形成凝块,细胞分布也较均匀,因此在进行软琼脂克隆形成实验时,可以采用10 g/L的琼脂糖凝胶作为储备胶。

祝葆华 *et al*<sup>[12]</sup>采用上层琼脂糖浓度为3 g/L的琼脂, HepG2细胞密度为400个/孔,其结果显示细胞的克隆形成率为50.40%±3.21%。张鸽文 *et al*<sup>[13]</sup>发现,在相同的上层琼脂糖浓度下,细胞密度为500个/孔, HepG2细胞的克隆形成率为33.24%±1.91%,二者的结果提示在上层琼脂糖浓度不变的情况下,同一细胞的克隆形成率随着细胞密度的改变而发生变化。

本研究结果显示,在2 g/L的上层琼脂中细胞的克隆数明显多于其在上层琼脂为3 g/L中的克隆数,提示上层胶浓度增大不利于细胞克隆的形成。另外,我们在预实验中发现,由于1 g/L上层琼脂的硬度较小,在移动培养板时,克隆容易移位,从而与其周围的克隆或细胞混合。因此在进行软琼脂克隆形成实验时,可以采用2 g/L的上层琼脂浓度。本实验还发现,在细胞密度为100-500个/孔时, HepG2细胞的克隆形成数和克隆形成率随着细胞浓度的增加而逐渐增加;在细胞密度在500-1000个/孔时,细胞克隆形成数和克隆形成率均随细胞浓度的升高呈现下降趋势,表明细胞的克隆形成率并非是随着细胞数量的增加而增加,而是存在着一个最佳的细胞浓度, HepG2细胞在500个/孔时的克隆形成率最高。

细胞克隆可采用眼科镊挑取<sup>[14]</sup>或是加样器吸取的方法分离,然后将取出的单克隆放在96孔板中培养,而后放入12孔板、6孔板直至培养瓶中扩大培养。本实验发现,在上层胶浓度比较稀时,可以用微量加样器吸取的方法分离克隆,

但用吸取时要注意吸引的力度,以避免克隆群落边缘细胞向克隆方向的扩散;在上层胶的浓度较大时,琼脂具有一定的硬度,可用眼科镊挑取克隆的方法进行分离。

## 4 参考文献

- 1 Helgason CD, Miller CL. Basic cell culture protocols. 3rd ed. New Jersey: Humana Press, 2002: 72
- 2 谢斌, 左莉, 江志奎, 徐大林, 朱华庆, 周青, 胡若磊, 桂淑玉, 汪渊. 全反式维甲酸诱导HepG2细胞分化和降低软琼脂克隆形成. 安徽医科大学学报 2007; 42: 143-146
- 3 Hansen NJ, Wylie RC, Phipps SM, Love WK, Andrews LG, Tollefsbol TO. The low-toxicity 9-cis UAB30 novel retinoid down-regulates the DNA methyltransferases and has anti-telomerase activity in human breast cancer cells. *Int J Oncol* 2007; 30: 641-650
- 4 Ikezoe T, Hisatake Y, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Yang Y, Said JW, Taguchi H, Koeffler HP. HIV-1 protease inhibitor, ritonavir: a potent inhibitor of CYP3A4, enhanced the anticancer effects of docetaxel in androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2004; 64: 7426-7431
- 5 Dou J, Pan M, Wen P, Li Y, Tang Q, Chu L, Zhao F, Jiang C, Hu W, Hu K, Gu N. Isolation and identification of cancer stem-like cells from murine melanoma cell lines. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 467-472
- 6 Zhu BH, Yao ZX, Luo SJ, Jiang LM, Xiao JW, Liu SC, Liu JB, Sun JM, Pei ZY. Effects of antisense oligonucleotides of PKC-alpha on proliferation and apoptosis of HepG2 in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 75-79
- 7 Simile MM, De Miglio MR, Muroni MR, Frau M, Asara G, Serra S, Muntoni MD, Seddaiu MA, Daino L, Feo F, Pascale RM. Down-regulation of c-myc and Cyclin D1 genes by antisense oligodeoxy nucleotides inhibits the expression of E2F1 and in vitro growth of HepG2 and Morris 5123 liver cancer cells. *Carcinogenesis* 2004; 25: 333-341
- 8 Li X, Pan Y, Fan R, Jin H, Han S, Liu J, Wu K, Fan D. Adenovirus-delivered CIAPIN1 small interfering RNA inhibits HCC growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1587-1593
- 9 乔玲, 徐治立, 谭旭, 叶丽虹, 张晓东. 间充质干细胞释放Dkk-1抑制乳腺癌细胞Wnt/ $\beta$ -catenin途径的实验研究. 生物化学与生物物理进展 2007; 34: 702-708
- 10 孟淑芳, 林林, 李修兰, 冯建平, 王佑春, 李德富. 软琼

- 脂克隆法与裸鼠体内接种法检测细胞致瘤性的比较. 中国生物制品学杂志 2006; 19: 516-519
- 11 范钰, 郑树, 赵刚. 青蒿琥酯对乳腺癌MCF-7细胞抗失巢凋亡的影响. 中国病理生理杂志 2006; 22: 748-751
- 12 祝葆华, 姚榛祥, 江黎明, 吴平, 杨展, 何惠娟. 10-羟基喜树碱对HepG2体外生长及其小鼠肾包膜下移植瘤的影响. 中华实验外科杂志 2004; 21: 286-287
- 13 张鸽文, 汤恢煊, 王志明, 冯超, 魏伟. Survivin反义寡核苷酸对人肝癌细胞的抑制作用. 中国普通外科杂志 2007; 16: 646-649
- 14 章静波, 张世馥, 黄东阳. 组织和细胞培养技术. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 154-155

## ■同行评价

本研究选题实用, 设计尚可, 结果可靠, 具有很好的参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 2007 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	19	44	-0.98	0.059	44	-0.89
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	4431	1	3.46	0.745	10	0.38
G803	肝脏	467	28	-0.53	0.537	17	-0.01
G938	国际呼吸杂志	521	25	-0.48	0.386	32	-0.29
G415	国际内分泌代谢杂志	654	20	-0.34	0.520	19	-0.04
G939	国际脑血管病杂志	662	19	-0.33	0.480	22	-0.11
G501	临床肝胆病杂志	497	26	-0.50	0.318	36	-0.41
G291	临床骨科杂志	689	18	-0.31	0.455	25	-0.16
G658	临床荟萃	1169	13	0.18	0.233	40	-0.57
G257	临床内科杂志	651	21	-0.35	0.367	34	-0.32
G855	临床消化病杂志	292	36	-0.71	0.394	30	-0.27
G261	临床心血管病杂志	866	17	-0.13	0.474	24	-0.12
G293	临床血液学杂志	341	34	-0.66	0.347	35	-0.36
G491	岭南心血管病杂志	157	41	-0.84	0.110	43	-0.79
G662	内科急危重症杂志	276	37	-0.72	0.318	36	-0.41
G746	实用肝脏病杂志	297	35	-0.70	1.100	3	1.04
G190	世界华人消化杂志	2353	5	1.37	0.568	15	0.05
G800	胃肠病学	376	33	-0.62	0.372	33	-0.31
G326	胃肠病学和肝病学杂志	468	27	-0.53	0.399	29	-0.26
G451	现代消化及介入诊疗	84	43	-0.92	0.230	41	-0.58
G083	心肺血管病杂志	214	40	-0.78	0.206	42	-0.62
G419	心血管病学进展	467	28	-0.53	0.419	27	-0.23
G260	心脏杂志	523	24	-0.47	0.392	31	-0.28
G610	胰腺病学	223	38	-0.78	0.282	38	-0.48
G234	中国动脉硬化杂志	869	16	-0.13	0.521	18	-0.04
G422	中国脑血管病杂志	223	38	-0.78	0.503	21	-0.07
G267	中国实用内科杂志	2121	7	1.13	0.601	13	0.11
G211	中国糖尿病杂志	1284	11	0.29	0.931	7	0.72
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	616	23	-0.38	0.599	14	0.11
G633	中国血液净化	449	31	-0.55	0.478	23	-0.12
G119	中国循环杂志	643	22	-0.35	0.411	28	-0.24
G231	中华肝脏病杂志	2746	4	1.76	1.056	4	0.95
G235	中华高血压杂志	982	15	-0.01	0.757	9	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	143	42	-0.86	0.235	39	-0.57
G876	中华老年心脑血管病杂志	465	30	-0.53	0.431	26	-0.20
G150	中华老年医学杂志	1010	14	0.02	0.510	20	-0.06
G155	中华内分泌代谢杂志	1548	9	0.56	1.032	5	0.91
G156	中华内科杂志	3238	3	2.26	0.847	8	0.57
G161	中华肾脏病杂志	1477	10	0.49	1.018	6	0.88
G285	中华消化内镜杂志	1271	12	0.28	0.607	12	0.12
G168	中华消化杂志	2249	6	1.26	1.123	2	1.08
G892	中华心律失常学杂志	384	32	-0.61	0.568	15	0.05
G170	中华心血管病杂志	3705	2	2.73	1.217	1	1.25
G172	中华血液学杂志	1632	8	0.64	0.633	11	0.17
	平均值	994			0.541		

以上数据摘自《中国科技期刊引证报告》(2008年版). 科学技术文献出版社, 160-161.



## 不同类型单纯性肥胖者近端胃功能特征分析67例

常丽丽, 姚树坤, 任锡玲, 郝顺霞, 赵英丽, 秦素丽, 王静玲, 高富贵

### ■背景资料

肥胖是当前最广泛的严重威胁人类健康的疾病之一。其发病的基本机制是食物摄入量超过能量消耗, 而决定食物摄入量的主要因素是胃容量及胃排空速度。肥胖者胃容量的变化国内外报道结果不一, 本课题组对不同类型单纯性肥胖者进行了胃容量和胃顺应性的检测, 探讨了不同类型单纯性肥胖者近端胃功能特征, 以进一步阐明肥胖的发病机制。

常丽丽, 赵英丽, 秦素丽, 王静玲, 石家庄市第一医院消化内科 河北省石家庄市 050011  
姚树坤, 卫生部中日友好医院 北京市 100029  
任锡玲, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050051  
郝顺霞, 高富贵, 河北省卫生厅卫生监督局 河北省石家庄市 050071  
石家庄市科技局2008年石家庄市科学技术研究与发展基金资助项目, No. 08146483  
作者贡献分布: 常丽丽为课题负责人; 姚树坤与任锡玲指导课题; 郝顺霞与赵英丽负责测压; 秦素丽、王静玲及高富贵收集资料。  
通讯作者: 高富贵, 050071, 河北省石家庄市, 河北省卫生厅卫生监督局: guifugao@163.com  
收稿日期: 2009-04-13 修回日期: 2009-05-28  
接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-08

### Proximal gastric function in volunteers with different types of simple obesity: an analysis of 67 cases

Li-Li Chang, Shu-Kun Yao, Xi-Ling Ren, Shun-Xia Hao, Ying-Li Zhao, Su-Li Qin, Jing-Ling Wang, Fu-Gui Gao

Li-Li Chang, Ying-Li Zhao, Su-Li Qin, Jing-Ling Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China  
Shu-Kun Yao, China-Japan Friendship Hospital, the Ministry of Health, Beijing 100029, China  
Xi-Ling Ren, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China  
Shun-Xia Hao, Fu-Gui Gao, Health Supervision Office, Health Department of Hebei Province, Shijiazhuang 050071, Hebei Province, China  
Supported by: the Science and Technology Development Program of Shijiazhuang, No. 08146483  
Correspondence to: Fu-Gui Gao, Hebei Province Hygiene Hall Sanitary Supervision Bureau, Shijiazhuang 050071, Hebei Province, China. guifugao@163.com  
Received: 2009-04-13 Revised: 2009-05-28  
Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-08

### Abstract

**AIM:** To analyze the characteristics of changes in proximal gastric function in volunteers with different types of simple obesity.

**METHODS:** Sixty-seven volunteers with simple obesity were divided into three groups, namely, group A (volunteers with binge eating), group B (volunteers with normal diet) and group C (volunteers with functional dyspepsia). Thirty-two non-obese healthy volunteers formed the

control group (group D). Gastric barostat studies were then performed to record the changes in gastric capacity, intragastric pressure and gastric compliance in response to mechanical distension.

**RESULTS:** The initial volume (IV) and maximal tolerance volume (MV) in group A were significantly larger than those in group D ( $t = -6.63$  and  $-5.20$ , respectively; both  $P < 0.01$ ), whereas these two parameters in group C were significantly lower than those in group D ( $t = 3.48$  and  $2.11$ , respectively; both  $P < 0.01$ ). The initial intragastric pressure (IP) and the maximal tolerance pressure (MP) in group C were significantly lower than those in group D ( $t = 2.09$  and  $2.08$ , respectively; both  $P < 0.05$ ). The initial gastric compliance (IC) and the maximal tolerance compliance (MC) in group A were significantly higher than those in group D ( $t = 2.44$  and  $-5.56$ , respectively; both  $P < 0.01$ ), whereas these two parameters in group C were significantly lower than those in group D ( $t = 2.44$  and  $2.32$ , respectively; both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The main reason for the development of obesity in binge eaters is due to an increase in gastric capacity, compliance and accommodation as well as a delay in satiety.

**Key Words:** Simple obesity; Gastric capacity; Intragastric pressure; Compliance; Accommodation

Chang LL, Yao SK, Ren XL, Hao SX, Zhao YL, Qin SL, Wang JL, Gao FG. Proximal gastric function in volunteers with different types of simple obesity: an analysis of 67 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1990-1992

### 摘要

**目的:** 探讨不同类型单纯性肥胖者近端胃功能的变化特征。

**方法:** 将67例单纯性肥胖志愿者根据饮食行为分为3组: 肥胖伴暴食组(A组)、肥胖饮食正常组(B组)、肥胖伴功能性消化不良组(C组); 采用电子恒压器, 对3组肥胖者和D组(32例正常体质量健康志愿者)进行胃底机械性扩张, 观察其可耐受容积和压力及顺应性的变化。

### ■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

**结果:** A组初始容积和最大耐受容积显著大于D组( $t = -6.63, -5.20$ , 均 $P < 0.01$ ), 而C组显著低于D组( $t = 3.48, 2.11$ , 均 $P < 0.01$ ). C组初始胃内压、最大耐受胃内压低于D组( $t = 2.09, 2.08$ , 均 $P < 0.05$ ); A组初始及最大耐受顺应性显著大于D组( $t = 2.44, -5.56$ , 均 $P < 0.01$ ), C组显著低于D组( $t = 2.44, 2.32$ , 均 $P < 0.05$ ).

**结论:** 暴食患者肥胖形成的主要原因是胃容积增加、顺应性增高、容受性增强及饱感延迟发生.

**关键词:** 单纯性肥胖; 胃容积; 胃内压; 顺应性; 容受性

常丽丽, 姚树坤, 任锡玲, 郝顺霞, 赵英丽, 秦素丽, 王静玲, 高富贵. 不同类型单纯性肥胖者近端胃功能特征分析67例. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1990-1992  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1990.asp

## 0 引言

食物摄入量直接与近端胃的功能有关. 胃容积增大, 顺应性增高及容受性增强在肥胖形成中可能起重要作用, 但研究发现并非所有肥胖者均存在胃容积增大, 顺应性增高及容受性增强<sup>[1]</sup>. 本试验对67例单纯性肥胖志愿者根据饮食行为分成3组, 进行胃底机械性扩张, 探讨了不同类型单纯性肥胖者近端胃功能的特征变化.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 从志愿者中选取单纯性肥胖者(体质指数BMI $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>)67例, 男35例, 女32例, 平均年龄 $24.12 \pm 5.98$ 岁, BMI为 $31.88 \pm 2.05$  kg/m<sup>2</sup>为肥胖组. 每位志愿者均填写每日进餐次数, 每餐进食量, 有无早饱或易饥饿感, 根据饮食行为分为肥胖伴暴食组(A组)28例, 肥胖饮食正常组(B组)21例及肥胖伴功能性消化不良组(C组)18例. 正常体质质量(BMI 18-24.9 kg/m<sup>2</sup>)健康志愿者32例为对照组(D组), 男15例, 女17例, 平均年龄 $22.56 \pm 6.23$ 岁, BMI为 $21.28 \pm 1.84$  kg/m<sup>2</sup>. 所有受试对象没有胃肠道疾病史, 没有消化系手术史, 女性受试对象均在月经期结束3 d后接受试验, 2 wk内无服用避孕药史. 排除标准: (1)继发于神经-内分泌-代谢紊乱基础上的伴肥胖症, 如下丘脑病、垂体病、胰岛疾病、甲状腺功能减退症、肾上腺皮质功能亢进症及性腺功能低下症; (2)女性受试者在妊娠期、哺乳期.

**1.2 方法** 禁食12 h后, 早晨嘱受试者排尽大小便, 坐位经口插入聚乙烯双腔气囊导管(气囊最大容量为1500 mL), 使气囊位于胃底部. 用内脏电子刺激器/电子气压泵(SVS/barostat, 瑞典Medtronic synectice公司), 首先向气囊内注入气体30 mL, 使

表 1 不同组单纯性肥胖者与正常体重组胃容积比较 (mL, mean  $\pm$  SD)

分组	n	初始容积	最大耐受容积
A	28	550.72 $\pm$ 204.45 <sup>b</sup>	900.50 $\pm$ 402.74 <sup>b</sup>
B	21	305.12 $\pm$ 98.78	548.76 $\pm$ 139.25
C	18	156.25 $\pm$ 37.80 <sup>b</sup>	410.00 $\pm$ 102.24 <sup>b</sup>
D	32	263.44 $\pm$ 126.89	500.00 $\pm$ 156.02

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs D组.

表 2 不同组单纯性肥胖与正常体重组胃内压比较 (mmHg, mean  $\pm$  SD)

分组	MDP	初始胃内压	最大耐受胃内压
A	5.05 $\pm$ 1.08	9.05 $\pm$ 2.06	10.89 $\pm$ 3.76
B	4.87 $\pm$ 1.86	9.09 $\pm$ 3.25	11.37 $\pm$ 3.28
C	5.67 $\pm$ 1.91	7.16 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	8.78 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>
D	5.07 $\pm$ 1.58	9.17 $\pm$ 4.01	10.44 $\pm$ 3.31

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs D组.

气囊张开, 测出气囊内压力水平, 即为受试者胃最小扩张压力(MDP). 然后从0开始, 采用阶梯样等容注气方式, 每次增加容积50 mL, 并持续2 min, 同时记录相应的胃内气囊压力. 囊内气体容积达到初始容积时(即受试者在接受胃扩张刺激时, 开始感觉到上腹不适应或胀满时的容积), 记录胃内气囊压力变化. 等容扩张达到最大耐受容积时(即受试者在接受胃扩张刺激时, 开始感觉到上腹疼痛或难以忍受时的容积), 记录气囊内相应的压力变化, 并记录胃的顺应性(胃容积/胃内压).

**统计学处理** 计量资料数据以mean  $\pm$  SD表示, 采用STATA 8.0软件, 两样本均数间比较采用 $t$ 检验, 方差不齐采用 $t'$ 检验.

## 2 结果

**2.1 胃容积比较** A组初始胃容积和最大耐受胃容积较D组显著增大( $t = -6.63$ 和 $-5.20$ ,  $P < 0.01$ ); B组初始胃容积和最大耐受胃容积与D组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); C组初始胃容积和最大耐受胃容积显著低于D组( $t = 3.48$ 和 $2.11$ ,  $P < 0.01$ , 表1).

**2.2 胃内压比较** A组、B组、C组MDP与D组相比无差异( $P > 0.05$ ); A组、B组初始胃内压、最大耐受胃内压与D组比较无差异( $P > 0.05$ ); C组初始胃内压和最大耐受胃内压均显著低于D组( $P < 0.05$ , 表2).

**2.3 胃顺应性比较** 最小扩张压时A、B、C三组肥胖者胃顺应性与D组相比无差异( $P > 0.05$ ). 初始顺应性、最大耐受顺应性A组显著大于对照

## ■研究前沿

国内外对肥胖者胃容量的变化研究报道不多, 且结论不一. 有报道肥胖者胃容量增大, 也有报道肥胖者胃容量与正常体者无差别, 可能与入选的肥胖者饮食行为有关, 将肥胖者按饮食行为分组, 进行胃容量和胃顺应性的检测和对比分析, 目前尚无研究报道.

## ■相关报道

国内外有学者报道肥胖者存在胃容量增大, 胃感觉障碍, 对胃扩张产生的饱感信号不能及时启动, 即胃敏感性降低, 亦有学者报道重度肥胖者MDP增大, 而胃容积、顺应性、容受性、感觉阈值均正常.

### ■同行评价

本研究选题较好,设计合理,结果准确,具有一定的学术价值。

表 3 不同组单纯性肥胖者与正常体质量组顺应性比较 (mL/mmHg, mean  $\pm$  SD)

分组	MDP时顺应性	初始顺应性	最大耐受顺应性
A	9.15 $\pm$ 4.29	66.86 $\pm$ 19.45 <sup>b</sup>	99.29 $\pm$ 39.66 <sup>b</sup>
B	9.48 $\pm$ 1.44	38.95 $\pm$ 14.82	62.36 $\pm$ 30.28
C	9.02 $\pm$ 1.98	24.08 $\pm$ 16.01 <sup>a</sup>	38.07 $\pm$ 10.82 <sup>a</sup>
D	9.25 $\pm$ 2.96	34.56 $\pm$ 13.76	52.47 $\pm$ 24.95

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs D组。

组( $P < 0.01$ ); B组与D组相比无差异( $P > 0.05$ ); C组显著低于对照组( $P < 0.05$ , 表3)。

### 3 讨论

肥胖是全世界关注的公共健康问题,由于肥胖导致的相关疾病发病率的升高<sup>[1-3]</sup>,亦成为公众关心的难点和热点话题。其发病机制至今尚未阐明。胃容量和胃排空可能对肥胖的形成有重要的作用,且受自主神经的调控和影响<sup>[4-5]</sup>。国内外有学者报道肥胖者存在胃容量增大,胃感觉障碍,对胃扩张产生的饱感信号不能及时启动,即胃敏感性降低<sup>[6-10]</sup>,亦有学者报道重度肥胖者MDP增大,而胃容积、顺应性、容受性、感觉阈值均正常<sup>[11-12]</sup>。我们将67例单纯性肥胖志愿者根据饮食行为分为3组,进行胃底机械性扩张的检测,结果显示单纯性肥胖伴暴食组初始容积、最大耐受容积较对照组显著增大,胃内压无变化,近端胃顺应性增高,容受性增强,饱感延迟发生;肥胖饮食正常组胃内压、胃顺应性、初始容积、最大耐受容积与对照组无差异;肥胖伴功能性消化不良组初始容积、初始胃内压、最大耐受容积、最大耐受胃内压、顺应性均显著低于对照组,有内脏敏感性增高趋势。以往对肥胖者胃功能的研究,之所以得出不同的结论,主要是由于入选的肥胖受试者所处的状态不同所致。如肥胖属于原发还是继发,处于发展期还是终末期,有无合并症或并发症,伴或不伴暴食行为,伴或不伴功能性消化不良,是否喜食甜腻食品等。本研究发现肥胖伴暴食行为者,进餐速度快,其中,10%进餐次数增多,易饥饿,但每次进餐量并不大,初始胃容积、最大耐受胃容积并不增加,只是胃排空加快;而90%进餐次数增多或不增多,但一次进餐量较正常体质量者显著增加,说明胃容积增加、顺应性增高,容受性增强,造成饱感延迟发生,主要是伴暴食行为患者肥胖形成的原因。肥胖饮食正常组初始容积、最大耐受容积和胃顺应性无明显增加,说明

饮食正常的肥胖者发病机制与胃容量、顺应性及容受性关系不如肥胖伴暴食行为者密切,可能还有其他机制参与。而肥胖伴功能性消化不良者,进餐量明显减少,且出现早饱、腹胀等症状,胃容量、顺应性及容受性均较正常体重者降低,主要与功能性消化不良形成机制有关,而与肥胖无直接关系。进餐量减少但仍能保持肥胖,可能与进餐能量过高或消耗过少或其他原因所致。

总之,单纯性肥胖者近端胃功能的变化存在异质性,胃容积增加、顺应性增高,容受性增强,饱感延迟发生,主要是伴暴食行为患者肥胖形成的原因。有研究表明,肥胖伴暴食行为者胃排空速率显著快于正常体质量者<sup>[12-15]</sup>,说明胃排空加快和胃容量增大及顺应性增高对肥胖的形成起协同作用。

### 4 参考文献

- 1 Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3540-3553
- 2 Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4199-4206
- 3 Piretta L, Alghisi F, Anzini F, Corazzini E. Prevalence of overweightedness in patients with gastro-esophageal reflux. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4602-4605
- 4 Park MI, Camilleri M. Gastric motor and sensory functions in obesity. *Obes Res* 2005; 13: 491-500
- 5 常丽丽, 姚树坤, 任锡玲, 高富贵, 周晓娜, 张淑梅, 刘润. 单纯性肥胖者进餐前后自主神经功能的变化特征. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2955-2957
- 6 Csendes A, Burgos AM. Size, volume and weight of the stomach in patients with morbid obesity compared to controls. *Obes Surg* 2005; 15: 1133-1136
- 7 常丽丽, 姚树坤. 单纯性肥胖症近端胃功能变化. *中华消化杂志* 2006; 26: 783-784
- 8 Wisén O, Hellström PM. Gastrointestinal motility in obesity. *J Intern Med* 1995; 237: 411-418
- 9 Geliebter A, Yahav EK, Gluck ME, Hashim SA. Gastric capacity, test meal intake, and appetitive hormones in binge eating disorder. *Physiol Behav* 2004; 81: 735-740
- 10 Geliebter A, Hashim SA. Gastric capacity in normal, obese, and bulimic women. *Physiol Behav* 2001; 74: 743-746
- 11 Klatt S, Pieramico O, Güthner C, Ditschuneit HH, Glasbrenner B, Beckh K, Adler G. Proximal gastric motility functions are normal in severe obesity. *Digestion* 1997; 58: 115-119
- 12 Kim DY, Camilleri M, Murray JA, Stephens DA, Levine JA, Burton DD. Is there a role for gastric accommodation and satiety in asymptomatic obese people? *Obes Res* 2001; 9: 655-661
- 13 刘红芬, 刘丽, 常丽丽, 范亚坤. 单纯性肥胖伴暴食行为者胃排空速率的变化特征. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 705-707
- 14 王宝西, 王茂贵. 儿童单纯性肥胖症和营养不良胃排空分析. *第四军医大学学报* 2003; 24: 472-474
- 15 Lee JS. [Obesity and gastrointestinal motility] *Korean J Gastroenterol* 2006; 48: 89-96

编辑 李军亮 电编 何基才

www.wjgnet.com



# 藏、回、汉族胃癌患者发病特征分析1165例

姬发祥, 赵久达, 沈国双, 曹成珠, 贺菊香, 马新福, 王丽娟, 李进章, 耿排力

姬发祥, 赵久达, 沈国双, 马新福, 王丽娟, 李进章, 青海大学附属医院肿瘤内科 青海省西宁市 810001  
曹成珠, 贺菊香, 耿排力, 青海大学医学院基础部 青海省西宁市 810001

国家自然科学基金资助项目, No. 30860259

青海大学中青年科研基金资助项目, No. 2008-QY-09

通讯作者: 赵久达, 主治医师, 810001, 青海省西宁市, 青海大学附属医院肿瘤内科. jiadazhao@126.com

电话: 0971-6162732

收稿日期: 2009-03-22 修回日期: 2009-05-07

接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-08

## Morbidity features among Tibet, Hui and Han nationalities with gastric cancer: an analysis of 1165 cases

Fa-Xiang Ji, Jiu-Da Zhao, Guo-Shuang Shen, Cheng-Zhu Cao, Ju-Xiang He, Xin-Fu Ma, Li-Juan Wang, Jin-Zhang Li, Pai-Li Geng

Fa-Xiang Ji, Jiu-Da Zhao, Guo-Shuang Shen, Xin-Fu Ma, Li-Juan Wang, Jin-Zhang Li, Department of Oncology, Qinghai University Hospital, Xining 810001, Qinghai Province, China

Cheng-Zhu Cao, Ju-Xiang He, Pai-Li Geng, Qinghai University Hospital, Xining 810001, Qinghai, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30860259; and the Scientific Research Funds for Middle Age and Young of Qinghai University, No. 2008-QY-09

Correspondence to: Jiu-Da Zhao, Department of Oncology, Qinghai University Hospital, Xining 810001, Qinghai Province, China. jiadazhao@126.com

Received: 2009-03-22 Revised: 2009-05-07

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the morbidity features of sex, age, *H pylori* infection, smoking, alcohol consumption and location among Tibet, Hui and Han nationalities with gastric cancer in Qinghai area.

**METHODS:** A total of 1165 patients with gastric cancer including 389 Tibet, 385 Hui and 391 Han nationalities at Qinghai University Hospital were selected. All patients were divided into three groups by age:  $\leq 35$ , 36-59,  $\geq 60$ . The differences in sex, age, *H pylori* infection, smoking, alcohol consumption and location among three groups were investigated.

**RESULTS:** The high plateau of three gastric cancer groups were all 36-59 years old, but the age distribution was different, the morbidity age of Tibet was lower than those of Hui and Han ( $\chi^2 = 0.00$ ,  $P = 0.00$ ). Sex distribution and *Hp* infection were the same among three groups ( $\chi^2 = 0.06$ ,  $P = 0.97$ ,  $\chi^2 = 0.32$ ,  $P = 0.85$ ). However, the smoking and alcohol consumption were lower in Hui than in Tibet or in Han nationalities with gastric cancer ( $\chi^2 = 187.91$ ,  $P = 0.00$ ;  $\chi^2 = 89.79$ ,  $P = 0.00$ ). The location sequence of three groups was the same as follows: body of stomach, cardia and fundus of stomach and antral of the stomach, but the portion of cardia and fundus of stomach was lower in Tibet than in Hui and Han nationalities ( $\chi^2 = 7.31$ ,  $P = 0.03$ ).

**CONCLUSION:** The morbidity age of Tibet is lower than in Hui and Han, the smoking and alcohol consumption in Tibet and Han are higher apparently than in Hui nationality, and the portion of cardia and fundus of stomach is lower in Tibet than in Hui or Han nationalities.

**Key Words:** Gastric cancer; Nationality; Morbidity feature

Ji FX, Zhao JD, Shen GS, Cao CZ, He JX, Ma XF, Wang LJ, Li JZ, Geng PL. Morbidity features among Tibet, Hui and Han nationalities with gastric cancer: an analysis of 1165 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1993-1995

## 摘要

**目的:** 分析青海地区藏、回、汉族胃癌患者的性别、年龄、*H pylori*感染、烟酒嗜好和发病部位特征。

**方法:** 抽取我院经胃镜检查 and 病理证实的胃癌患者1165例, 包括藏族389例, 回族385例, 汉族391例, 将患者分为 $\leq 35$ 岁、36-59岁、 $\geq 60$ 岁3个年龄段组, 分析患者性别、年龄、*H pylori*感染、烟酒嗜好和部位的差异。

**结果:** 3个民族胃癌患者构成均以36-59岁为主, 但民族间患病年龄不同, 藏族发病年龄较回族和汉族早( $\chi^2 = 0.00$ ,  $P = 0.00$ ), 性别构

## ■背景资料

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤, 全世界约有35%的胃癌病例发生在我国。青海省地处高原, 其死亡率在全国最高。胃癌的发病在世界各地及各民族之间存在差异, 可能与他们所处的环境及遗传背景有关。

## ■同行评议者

欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科



## ■相关报道

有文献报道胃癌发生部位在种族之间有所不同,在西方国家胃癌的发病率逐渐降低,但近端(胃底及胃体)胃癌的发病率升高,并且在种族之间有差异。

成上3个民族间差异无显著性( $\chi^2 = 0.06, P = 0.97$ ); *H pylori*感染率差异无显著性( $\chi^2 = 0.32, P = 0.85$ ),但是吸烟和饮酒方面具有显著差异性:回族较藏族和汉族少( $\chi^2 = 187.91, P = 0.00$ ;  $\chi^2 = 89.79, P = 0.00$ );同时3个民族组患者发病部位依次均为胃体、贲门胃底、胃窦,但是藏族较回族和汉族贲门胃底癌构成比低( $\chi^2 = 7.31, P = 0.03$ ).

**结论:**胃癌患者中藏族发病年龄较回、汉族早,藏、汉族有烟酒嗜好者明显多于回族,藏族较回族和汉族贲门胃底癌构成比低。

**关键词:** 胃癌; 民族; 发病特征

姬发祥, 赵久达, 沈国双, 曹成珠, 贺菊香, 马新福, 王丽娟, 李进章, 耿排力. 藏、回、汉族胃癌患者发病特征分析1165例. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1993-1995

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1993.asp>

## 0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤,全世界约有35%的胃癌病例发生在我国<sup>[1]</sup>.青海省地处高原,其死亡率在全国最高.胃癌的发病在世界各地及各民族之间存在差异,可能与他们所在的环境及遗传背景有关<sup>[2-3]</sup>.我们抽取2003-01/2008-12在我院就诊的胃癌患者1165例,其中藏族389例、回族385例、汉族391例,对临床和病理资料进行分析,以探讨3民族胃癌发病的特点。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 抽取2003-01/2008-12青海大学附属医院确诊的胃癌患者1165例,其中藏族389例,年龄94-18岁,回族385例,年龄80-23岁,汉族391例,年龄84-23岁。

**1.2 方法** 抽调所有胃癌病例的原始病案,统一重新制表登记,为确保资料的真实性,填表工作由高年资医师和讲师组成专职调查小组,并集中培训,统一填报标准.有关数据输入计算机数据库,进行分类统计.为避免重复填报的现象,在输入计算机时剔除姓名、性别、住址和病案号相同的报表,再经人工复核,如确认是同一患者,则取消其重复资料.复阅1165例病例的临床与病理资料,患者分为 $\leq 35$ 岁、36-59岁、 $\geq 60$ 岁3个年龄段,分别将2组的性别、年龄、发病部位、烟酒嗜好等因素进行对比分析。

**统计学处理** 用SPSS11.0统计软件,行 $\chi^2$ 检验,并行卡方检验和T检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异具

有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 不同民族胃癌患病年龄段分布及性别特点** 3个民族胃癌患者的年龄构成均以36-59岁为主,但民族间患病年龄不同,藏族平均患病年龄最小51.45岁,汉族为52.94岁,回族为53.25岁,3者相比差异具有显著性( $\chi^2 = 0.00, P = 0.00$ ).青年人胃癌在藏族中明显高于回族和汉族.性别构成比3个民族间差异无显著性( $\chi^2 = 0.06, P = 0.97$ ,表1)。

**2.2 不同民族胃癌*H pylori*感染、性别、烟酒嗜好** 3个民族胃癌患者*H pylori*感染率差异无显著性( $\chi^2 = 0.32, P = 0.85$ ),但是吸烟和饮酒差异具有显著性,回族较藏族和汉族少( $\chi^2 = 187.91, P = 0.00$ ;  $\chi^2 = 89.79, P = 0.00$ ,表2)。

**2.3 不同民族胃癌病理特征** 3个民族组患者发病部位均依次为贲门胃底、胃体、胃窦,但是藏族与回族和汉族贲门胃底癌构成比不同( $\chi^2 = 7.31, P = 0.03$ ,表3)。

## 3 讨论

藏、回、汉族胃癌患者不同患病年龄性别特征分析.胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,不论男性女性其发病率和死亡率均居恶性肿瘤前2位.青海是胃癌高发区,本次分析结果显示青海藏、回、汉族胃癌患者男性均为女性的4倍多,各民族间差异无显著性,但是与多数人报道的2-3:1相比为高<sup>[4]</sup>,可能与男性劳动强度高、精神紧张、压力大及吸烟、酗酒等不良生活习惯有关,当然也不能排除遗传因素.从发病年龄分析3个民族有2个明显的特征:(1)胃癌平均患病年龄藏族最小,为51.45岁,汉族次之,为52.94岁,回族最大,为53.25岁,3者相比差异具有显著性.(2)35岁以下的青年人胃癌在藏族中明显高于回族和汉族.这两个特点我们考虑与藏族遗传易感性和吸烟饮酒等生活习惯有关,因为我们统计的3个民族间的*H pylori*差异无显著性,以往研究表明青年胃癌的家族遗传背景因素和遗传性胃癌家族因素都明显高于中老年<sup>[5]</sup>,而且已有文献报道藏族胃癌检出率高于汉族<sup>[6]</sup>。

藏、回、汉族胃癌患者*H pylori*感染、烟酒嗜好特点分析:青海藏族主要居住在高寒草原牧区地区,而回汉族主要居于青海东部农业地区,饮食方面,藏族主要以肉类、牛奶及奶油拌炒面为主,缺乏蔬菜,回族饮食成分中蔬菜也较少,汉

■同行评价  
本研究选题新颖, 设计合理, 病例数较多, 具有较好的学术价值。

表 1 不同民族胃癌患者的年龄性别分布 *n*(%)

年龄段	藏族	回族	汉族	<i>P</i> 值
≤35	22(5.66)	10(2.56)	10(2.60)	0.0292
36-59	222(57.07)	188(51.41)	201(48.83)	0.4259
≥60	145(37.27)	187(46.03)	180(48.57)	0.1110
男/女	4.89 : 1	4.66 : 1	4.67 : 1	0.9959

表 2 不同民族胃癌*H.pylori*感染、性别、烟酒嗜好特点 *n*(%)

	藏族	回族	汉族	<i>P</i> 值
<i>H.pylori</i>	255(65.55)	237(61.56)	245(62.66)	0.8530
吸烟	261(66.75)	14(3.64)	257(65.73)	0.0000
饮酒	286(73.52)	88(22.86)	301(76.98)	0.0000

族饮食无特殊. 由于整个青海省经济较落后, 一些卫生条件相对滞后, 造成3民族间*H.pylori*阳性率均较高, 而近年来的研究已表明*H.pylori*的代谢产物、细菌DNA整合入宿主细胞的DNA以及炎症介质的基因毒作用等均可能直接促发胃黏膜癌变. 虽然3民族间*H.pylori*阳性率差异无显著性, 但是回族由于宗教信仰信奉伊斯兰教大部分无烟酒嗜好, 而藏族和汉族大部分均有烟酒嗜好, 国内外大部分学者的研究结果揭示吸烟与胃癌有较强联系, 其相对危险度在1.3-2.5, 并呈中等强度的剂量反应关系<sup>[7]</sup>, 在饮酒的高危人群中其患胃癌的归因危险百分比为50.74<sup>[8]</sup>. 因此, 烟酒嗜好可能与藏汉族胃癌患病年龄较回族早有关.

藏、回、汉族胃癌患者病变部位特点分析: 从研究结果可见3民族胃癌好发部位顺序相同, 均依次为胃体、贲门胃底、胃窦和其他, 3个民族胃窦癌比例都较小. 但是贲门胃底癌在回族和汉族高于藏族, 差异具有显著性. 研究表明近年来胃癌的发病部位上移, 贲门、胃底癌发病率上升, 而胃窦癌的发病率有下降的趋势, 且随年龄增长这种趋势愈加明显, 回族汉族胃癌发病符合这个特点. 有文献报道胃癌发生部位在种族之间有所不同, 在西方国家胃癌的发病率逐渐降低, 但近端(胃底及胃体)胃癌的发病率升高, 并且在种族之间有差异; 美国的亚洲人、西班牙人胃腺癌的癌灶出现在远端的比近端多, 并且预后较好<sup>[9]</sup>. 藏族胃癌以低位多见, 青海大

表 3 不同民族病变部位一览表 *n*(%)

	藏族	回族	汉族	<i>P</i> 值
贲门胃底	85(21.85)	112(29.09)	130(33.25)	0.0258
胃体	246(63.24)	229(59.48)	199(50.89)	0.1761
胃窦	33(8.48)	25(6.49)	29(7.42)	0.6200
其他	25(6.43)	19(4.94)	33(8.44)	0.1152

部分地区都是农牧业区, 3个民族中藏、回和汉族生活环境没有大的区别, 造成藏与回族和汉族胃癌患者病变部位的差异主要考虑是民族间遗传因素的差别.

总之, 青海藏、回、汉族胃癌患者有其自己的流行病学特点, 这些特点除与*H.pylori*感染、饮食卫生习惯等综合因素有关外, 与种族因素可能也存在密切关系, 目前我们已经开展相关易感基因的筛查, 争取对本地区胃癌防治有一定指导作用, 从而尽可能提高本地区的胃癌早期诊断和治疗水平, 提高本地区各民族的生活水平.

4 参考文献

1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543

2 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 4-9

3 Wiggins CL, Perdue DG, Henderson JA, Bruce MG, Lanier AP, Kelley JJ, Seals BF, Espey DK. Gastric cancer among American Indians and Alaska Natives in the United States, 1999-2004. *Cancer* 2008; 113: 1225-1233

4 周丽雅, 薛艳, 林三仁, 孟灵梅, 李传凤, 闫秀娥, 高娜, 王琨, 段卓洋. 北京地区25年来消化性溃疡及胃癌发病情况的演变. *中华内科杂志* 2005; 44: 431-434

5 汪海丹, 任军, 张燕军, 斯晓明, 宫卫东. 青年胃癌247例发病与病理特点. *第四军医大学学报* 2005; 26: 749-751

6 范钟麟, 聂晴, 铁玉萍. 青海地区世居者与移居者胃癌检出率分析. *中华消化内镜杂志* 2000; 17: 177

7 Koizumi Y, Tsubono Y, Nakaya N, Kuriyama S, Shibuya D, Matsuoka H, Tsuji I. Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Int J Cancer* 2004; 112: 1049-1055

8 张栓虎. 我国居民饮酒与胃癌发病关系的Meta分析. *预防医学论坛* 2007; 13: 388-390

9 Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg Oncol Clin N Am* 2002; 11: 235-256

10 王学红, 王胜利. 青海高原藏族胃癌212例胃镜分析. *高原医学杂志* 2005; 15: 29-31

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者外周血HBcAg特异性CTL的影响

闫杰, 谢雯, 蔺亚辉, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军

## ■背景资料

HBV特异性CTL应答在乙型肝炎发病机制中的作用已受到广泛关注。在未经治疗的慢性乙型肝炎患者中, 往往存在T细胞的低反应。新型核苷(酸)类似物是否能够影响机体对HBV的免疫应答, 尚无确切研究结论。

闫杰, 谢雯, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军, 北京地坛医院 北京市 100015

蔺亚辉, 中国医学科学院基础医学研究所 北京市 100005

首都医学发展科研基金资助项目, No. 2003-3066

作者贡献分布: 此课题由闫杰与谢雯设计; 蔺亚辉、冯鑫及王蓓蓓完成课题实验室操作工作; 肖江、欧蔚妮及王艳斌完成临床资料收集; 闫杰完成数据分析; 论文写作由闫杰与谢雯完成; 成军在课题设计、论文写作中进行指导。

通讯作者: 谢雯, 主任医师, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院。xiewen6218@163.com

电话: 010-84322816

收稿日期: 2009-04-21 修回日期: 2009-05-22

接受日期: 2009-05-25 在线出版日期: 2009-07-08

## Effect of adeforvir dipivoxil on the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells in patients with chronic hepatitis B

Jie Yan, Wen Xie, Ya-Hui Lin, Xin Feng, Bei-Bei Wang, Jiang Xiao, Wei-Ni Ou, Yan-Bin Wang, Jun Cheng

Jie Yan, Wen Xie, Xin Feng, Bei-Bei Wang, Jiang Xiao, Wei-Ni Ou, Yang-Bin Wang, Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

Ya-Hui Lin, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China

Supported by: the Capital Medical Development and Research Foundation, No. 2003-3066

Correspondence to: Wen Xie, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China. jieyan@bbsn.cn

Received: 2009-04-21 Revised: 2009-05-22

Accepted: 2009-05-25 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of adeforvir dipivoxil on HBcAg-specific cytotoxic T cells in patients with chronic hepatitis B (CHB).

**METHODS:** The frequency of circulating HBcAg-specific cytotoxic T cells in 11 HLA-A2+ chronic hepatitis B patients were studied longitudinally before and after adeforvir dipivoxil therapy by HLA-A2/peptide tetramer staining.

**RESULTS:** The frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells ranged from 0.074% to 0.937%. The frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells in chronic hepatitis B patients was lower than that in acute hepatitis B patients. No signifi-

cant difference was observed in the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells between before and after adeforvir dipivoxil therapy. Subgroup analysis indicated that, after therapy with adeforvir dipivoxil for 48 hours, HBV DNA or ALT levels had no effect on the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells.

**CONCLUSION:** Adeforvir dipivoxil probably exerts no effect on the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells in patients with CHB.

**Key Words:** Adeforvir dipivoxil; Chronic hepatitis B; Cytotoxic T lymphocyte; MHC class I-peptide tetramer

Yan J, Xie W, Lin YH, Feng X, Wang BB, Xiao J, Ou WN, Wang YB, Cheng J. Effect of adeforvir dipivoxil on the frequency of HBcAg-specific cytotoxic T cells in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 1996-1999

## 摘要

**目的:** 探讨阿德福韦酯(ADV)对慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血中HBcAg特异性CTL数量的影响。

**方法:** 选择应用ADV治疗48 wk的HLA-A2阳性CHB患者11例作为研究对象, 应用Tetramer流式细胞技术检测治疗前后PBMC中的HBcAg特异性CTL细胞频率。

**结果:** HBcAg特异性CTL为0.074%-0.937%。CHB患者体内的特异性CTL频率远低于急性乙型肝炎。经ADV治疗CHB患者48 wk后, 其BcAg特异性CTL较治疗前无明显变化; 亚组分析也表明无论治疗48 wk后HBV DNA是否转阴、ALT是否恢复正常, 对特异性CTL均无影响。

**结论:** 应用ADV治疗48 wk, 对CHB患者体内HBcAg特异性CTL细胞频率无明显影响。

**关键词:** 阿德福韦酯; 慢性乙型肝炎; 细胞毒性T淋巴细胞; MHC-I-肽四聚体

## ■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

闫杰, 谢雯, 简亚辉, 冯鑫, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军. 阿德福韦酯对慢性乙型肝炎患者外周血HBcAg特异性CTL的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 1996-1999  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1996.asp

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)应答在乙型肝炎发病机制中的作用已受到广泛关注. 在未经治疗的慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者中, 往往存在T细胞的低反应<sup>[1-2]</sup>, 现有研究结果提示, CHB患者体内的高病毒载量和高抗原量的抑制作用可能是其重要原因之一<sup>[3]</sup>. 阿德福韦酯是一种新型核苷酸类似物, 已广泛应用于CHB治疗中. 为了探讨该药物在降低HBV病毒载量的同时是否伴有HBV特异性CTL活性的恢复, 我们采用了MHC-I限制的HLA-A2病毒抗原表位的四聚体技术, 建立了体外直接检测特异性CTL的方法, 并用该方法研究ADV对CHB患者外周血中HBcAg特异性CTL频率的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2005-2006年北京地坛医院肝炎二科门诊应用阿德福韦酯治疗48 wk的HBeAg阳性CHB患者40例, 其中男33例, 平均年龄 $29.91 \pm 9.11$ , 女7例, 平均年龄 $26.5 \pm 5.83$ , 诊断符合2000年《病毒性肝炎防治方案》中病毒性肝炎诊断标准<sup>[4]</sup>. 所有病例符合下列条件: (1)HBV DNA(荧光定量) $\geq 10^8$  copies/L; (2)HBV血清标志物(HBVMs)为: HBsAg阳性, HBeAg阳性, 抗-HBe阳性. 抗-HBs阴性, 抗-HBe阴性; (3)ALT $\geq 80$  U/L且ALT $\leq 500$  U/L血清总胆红素水平(SB) $<40$   $\mu$ mol/L(20  $\mu$ mol/L为正常值); (4)排除由药物、酒精和其他因素所致的肝功能异常; (5)女性排除妊娠. 除收集临床资料外, 每例患者均保留治疗前后空腹静脉采集全血标本(肝素抗凝)4 mL用于特异性CTL检测<sup>[5]</sup>.

### 1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞的分离: 将临床采集的全血标本在4 h内用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 于-80℃保存, 待测.

1.2.2 HLA-A2型别鉴定: 应用顺序特异引物聚合酶链反应技术(polymerase chain reaction-sequence special primer, PCR-SSP)<sup>[6]</sup>对全部病例进行筛选, 将鉴定获得的HLA-A2阳性患者治疗前后PBMC

用于特异性CTL检测.

1.2.3 Tetramer流式细胞技术检测HBcAg特异性CTL: HBcAg特异性HLA-肽四聚体(Tetramer)购自美国Sanquin生物技术有限公司, 其特异性肽段为HBVcore18-27短肽(氨基酸序列为FLPSDFFPSV), 以藻红蛋白(PE)标记, 用于流式细胞术检测. 将每份PBMC标本融化复苏后, 用PE标记的Tetramer和APC标记的CD8抗体(BD公司产品)双染色后应用流式细胞仪进行检测, 以淋巴细胞设门, 计数50 000个CD8<sup>+</sup>阳性细胞, 同时计数CD8<sup>+</sup>和Tetramer双阳性细胞为特异性CD8<sup>+</sup>细胞, 并以占总计数CD8<sup>+</sup>细胞的百分比表示.

统计学处理 数据以mean $\pm$ SD表示, 治疗前后均数比较采用独立样本 $t$ 检验, 使用SPSS10.0软件进行统计学分析.

## 2 结果

2.1 流式细胞术检测效果 本次实验共检测11例CHB患者治疗前后PBMC标本22份, 测得HBcAg特异性CTL为0.074%-0.937%. CHB患者体内的特异性CTL频率远低于急性乙型肝炎, 本实验数据与以往研究数据相符(图1).

2.2 基本资料 40例患者中鉴定获得HLA-A2型11例, 其中男7例, 女4例, 治疗后血清HBV DNA、ALT、AST及白蛋白水平较治疗前出现明显改善(表1), 其中2例出现HBV DNA阴转( $<5 \times 10^5$  copies/L), 6例出现ALT复常.

2.3 治疗前后特异性CTL的变化 纳入研究的11例CHB患者经ADV治疗48 wk后的HBcAg特异性CTL较治疗前无明显变化. 随后进行的亚组分析也表明: 无论治疗48 wk后HBV DNA是否转阴、ALT是否恢复正常, 对特异性CTL均无影响(表2).

## 3 讨论

对于HBV感染者而言, 特异性CTL应答是机体清除肝细胞内HBV的主要途径, 但是不充分的特异性CTL应答不仅不能清除病毒, 反而却通过介导非特异性T细胞应答引起肝脏损害. 因此, 检测CHB患者特异性CTL水平对于阐明乙型肝炎慢性化的免疫病理机制以及研发更为有效的治疗药物均有重大意义. 但是由于CHB患者外周血中特异性CTL水平极低, 应用传统免疫学研究技术难以进行准确检测. 1992年Garboczi *et al*<sup>[7]</sup>建立了MHC-抗原肽四聚体技术, 并将该技术同流式细胞术相结合, 使得准确检测PBMC中极低细胞频率的特异性CTL成为可

### ■ 相关报道

1992年Garboczi *et al*建立了MHC-抗原肽四聚体技术, 并将该技术同流式细胞术相结合, 使得准确检测PBMC中极低细胞频率的特异性CTL成为可能.



### ■创新亮点

本文应用MHC-抗原肽四聚体技术检测CHB患者外周血中的特异性CTL, 克服了传统免疫学技术对极低水平的特异性CTL难以精确计量的方法学难题, 从而保证了结果的准确可信。

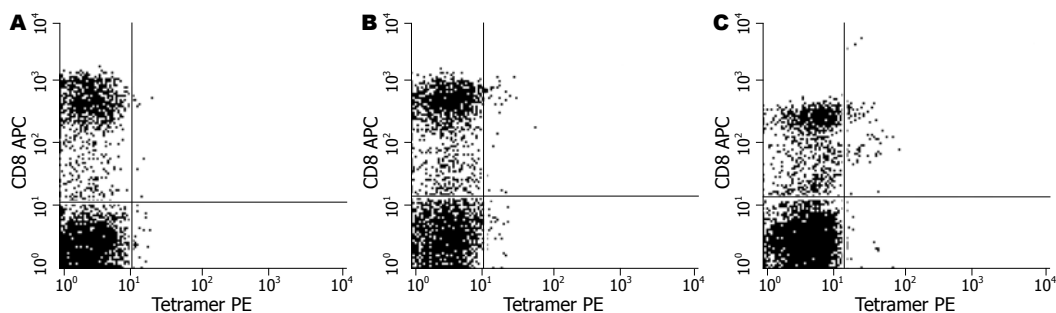


图1 Tetramer流式细胞技术检测HBcAg特异性CTL. A: 正常人PBMC所做的阴性对照(Tetramer/CD8 = 0.003%); B: 特异性CTL频率较低的标本(Tetramer/CD8 = 0.074%); C: 特异性CTL频率较高的标本(Tetramer/CD8 = 0.937%).

表1 ADV治疗前后CHB患者肝功能及HBV DNA的变化

	治疗前	治疗48 wk后	P值
ALT(U/L)	183.00 ± 98.45	74.45 ± 73.15	0.024
AST(U/L)	90.46 ± 50.37	46.36 ± 43.07	0.027
TBIL(μmol/L)	27.63 ± 33.73	16.56 ± 7.26	0.331
ALB(g/L)	44.22 ± 3.87	46.96 ± 1.87	0.043
IgHBV DNA(Ig10)	7.04 ± 1.26	4.59 ± 1.84	0.001

表2 ADV治疗前后HBcAg特异性CTL的变化 (%)

	n	治疗前	治疗48 wk后	P值
全部患者	11	0.276 ± 0.206	0.238 ± 0.254	0.695
HBV DNA转阴者	2	0.332 ± 0.160	0.189 ± 0.013	0.402
HBV DNA未转阴者	9	0.263 ± 0.222	0.249 ± 0.282	0.900
ALT复常者	6	0.225 ± 0.142	0.279 ± 0.335	0.878
ALT未复常者	5	0.337 ± 0.270	0.189 ± 0.122	0.725

能。我们选用已经证实为MHC I 类分子关键结合序列的HBcAg18-27肽段<sup>[8]</sup>与HLA-A2构建四聚体, 用于CHB患者PBMC中特异性CTL细胞频率的检测。结果显示, 该方法可检测到细胞频率低至0.074%的HBcAg特异性CTL, 而阴性对照(未受HBV感染的健康人PBMC标本)结果仅为0.003%, 表明四聚体技术联合流式细胞术检测CHB患者特异性CTL的灵敏度和特异度均较高, 适于低水平细胞频率的检测。

既往认为核苷(酸)类似物仅仅通过抑制HBV DNA多聚酶的活性达到抗病毒治疗目的, 对CHB患者的免疫状态不产生直接或间接的影响。2001年Boni *et al*<sup>[9]</sup>报道, 经过拉米夫定(LAM)治疗后, CHB患者外周血中的HBV特异性CD4<sup>+</sup>细胞和HBV特异性CD8<sup>+</sup>细胞频率明显升高, 表明LAM能够使CHB患者的HBV特异性CTL功能得到一定程度的恢复。后续研究显示, LAM仅在最初治疗的1-2 wk可增加CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞反应,

而在治疗6 mo时, CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞反应又恢复到治疗前水平; 表明经LAM治疗恢复的HBV特异性CTL反应无法长期维持<sup>[10]</sup>。Wu *et al*<sup>[11]</sup>通过检测3型鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus type 3, MHV-3)诱导的小鼠肝炎模型血清细胞因子水平, 以评价替比夫定(telbivudine, LdT)对机体免疫的影响, 结果显示: 在LdT治疗组中TNF-α、IL-12、IL-18和IFN-γ等Th1细胞因子水平明显升高, 而Th2细胞因子(IL-10、IL-4)则明显受到抑制, 提示LdT对于慢性肝炎患者可能具有免疫调节作用, 但尚需进一步研究证实。为研究ADV对CHB患者外周血中HBV特异性CTL水平的影响, 我们采用四聚体技术检测11例经ADV治疗48 wk的CHB患者治疗前后的PBMC, 结果显示, ADV治疗48 wk后的HBcAg特异性CTL较治疗前无明显变化; 亚组分析也表明无论治疗48 wk后HBV DNA是否转阴、ALT是否恢复正常, 对特异性CTL均无影响。这一结果同既往研究中

LAM对CHB患者特异性CTL的影响基本一致, 说明ADV治疗对CHB患者特异性CTL的恢复也无明显影响。

#### 4 参考文献

- 1 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60
- 2 Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 215-229
- 3 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50
- 4 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 5 王艳斌, 谢雯, 欧蔚妮. 阿德福韦酯对HBeAg(+)慢性乙型肝炎的治疗作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2666-2668
- 6 谭建明, 唐孝达, 谢桐, 徐琴君, 丁言德. 人类白细胞抗原-I类抗原的DNA分型与临床应用. 中华医学杂志 1998; 78: 763-767
- 7 Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and

- 8 complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3429-3433
- 9 Penna A, Chisari FV, Bertoletti A, Missale G, Fowler P, Giuberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991; 174: 1565-1570
- 10 Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertoletti A, Pilli M, Cavallo C, Cavalli A, Urbani S, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001; 33: 963-971
- 11 Boni C, Penna A, Bertoletti A, Lamnaca V, Rapti I, Missale G, Pilli M, Urbani S, Cavalli A, Cerioni S, Panebianco R, Jenkins J, Ferrari C. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39: 595-605
- 12 Wu Z, Yan W, Guo W, Zou Y, Wang H, Ning Q. Telbivudine preserves Th1 cytokine and inhibits Th2 cytokine production in MHV-3 induced viral hepatitis model. The 59th Annual Meeting of AASLD, Moscone West Convention Center, San Francisco, Oct 31-Nov 4, 2008: Abstract 18

#### ■同行评价

本研究选题为热点问题, 对临床医师有较好的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成t<sub>1/2</sub>或T<sub>1/2</sub>, V<sub>max</sub>不能V<sub>max</sub>, 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-甲基乙酰胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, Vd, T<sub>1/2</sub> CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-08)

# 癌-睾丸抗原SSX基因在肝细胞癌中的表达及临床意义

张小静, 范蓉, 何少健, 罗彬, 李顺, 罗国容, 谢小薰

## ■背景资料

癌-睾丸抗原(CT抗原)是一类可在多种肿瘤组织中表达,而在睾丸以外的其他正常组织几乎不表达的抗原,又称为肿瘤特异性共享抗原。利用这一表达特点,一些CT抗原的肿瘤疫苗(如NY-ESO-1, MAGE)已试用于临床治疗并取得较好的效果。然而,由于CT抗原在一些肿瘤中表达频率不高又限制了其疫苗在这些肿瘤中的应用。

张小静, 新乡医学院基础医学院组织学与胚胎学教研室 河南省新乡市 453003  
范蓉, 广西中医学院组织学与胚胎学教研室 广西壮族自治区南宁市 530021  
何少健, 罗彬, 李顺, 罗国容, 谢小薰, 广西医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室 广西壮族自治区南宁市 530021  
国家自然科学基金资助项目, No. 30760055  
广西高发疾病研究创新性团队基金资助项目, No. 桂教人[2007-71]号  
河南省教育厅自然科学研究计划基金资助项目, No. 2008B310006  
新乡医学院高学历人才科研启动项目基金资助项目, No. 2006G010  
作者贡献分布: 张小静与谢小薰对此文所作贡献均等; 此课题由张小静、范蓉与谢小薰设计; 研究过程由张小静、范蓉、罗彬、李顺及何少健完成; 研究所用新试剂及分析工具由范蓉与李顺提供; 数据分析由张小静、何少健、罗彬、李顺及罗国容完成; 本论文写作由张小静与谢小薰完成。  
通讯作者: 谢小薰, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室。  
xiexiaoxun@yahoo.com  
电话: 0771-5358577  
收稿日期: 2009-04-21 修回日期: 2009-05-18  
接受日期: 2009-05-25 在线出版日期: 2009-07-08

## Clinical significance of SSX mRNA expression in hepatocellular carcinoma

Xiao-Jing Zhang, Rong Fan, Shao-Jian He, Bin Luo, Qi Li, Guo-Rong Luo, Xiao-Xun Xie

Xiao-Jing Zhang, Department of Histology and Embryology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Rong Fan, Department of Histology and Embryology, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Shao-Jian He, Bin Luo, Qi Li, Guo-Rong Luo, Xiao-Xun Xie, Department of Histology and Embryology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30760055; the Innovative Team Foundation for Research on Highly Occurring Diseases in Guangxi, Gui Jiao Ren No. 2007-71; the Natural Science Research Program of Henan Provincial Education Department, No. 2008B310006; and the Scientific Research Foundation for High-level Talents in Xinxiang Medical College, No. 2006G010

Correspondence to: Professor Xiao-Xun Xie, Department of Histology and Embryology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. xiexiaoxun@yahoo.com

Received: 2009-04-21 Revised: 2009-05-18

Accepted: 2009-05-25 Published online: 2009-07-08

## ■同行评议者

王鲁, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝外科

## Abstract

**AIM:** To investigate the mRNA expression

of cancer-testis (CT) antigens SSX1-5 in hepatocellular carcinoma (HCC) and discuss the possibility of applying these antigens as targets for specific immunotherapy for HCC.

**METHODS:** The mRNA expression levels of CT antigens SSX1-5 were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in 61 HCC specimens and 52 normal adjacent specimens. The correlation between the expression of CT antigens SSX1-5 and clinical parameters was then evaluated. Positive RT-PCR products were sequenced randomly.

**RESULTS:** In 61 HCC tissues detected, the positive rates of SSX1, SSX2, SSX4 and SSX5 mRNAs were 42.6% (26/61), 8.2% (5/61), 39.3% (24/61) and 6.6% (4/61), respectively. Approximately 50.8% (31/61), 32.8% (20/61), 9.8% (6/61) and 3.3% (2/61) of HCC specimens positively expressed at least one, two, three, and four members of SSX1, SSX2, SSX4 and SSX5, respectively. In addition, no expression of SSX1-5 mRNAs was detected in all 52 normal adjacent specimens. In HCC tissues, the expression of SSX1 mRNA was correlated with the formation of cancer embolus in the portal vein while the expression of SSX4 mRNA was correlated with patient age ( $P < 0.05$ ). DNA sequencing confirmed the identity of RT-PCR products.

**CONCLUSION:** Though the positive rates of CT antigens SSX1, SSX2, SSX4 and SSX5 in HCC are different, their expression is high specific. Thus, they are possible promising targets for antigen-specific immunotherapy for HCC.

**Key Words:** hepatocellular carcinoma; Cancer testis antigen; Immunotherapy; Synovial sarcoma X break-point

Zhang XJ, Fan R, He SJ, Luo B, Li Qi, Luo GR, Xie XX. Clinical significance of SSX mRNA expression in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 2000-2004

## 摘要

**目的:** 检测癌-睾丸抗原SSX1-5 mRNA在肝细

胞癌(HCC)组织中的表达, 探讨其用于HCC免疫治疗的可能性。

**方法:** 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术, 检测61例HCC组织及52例配对的HCC癌旁组织中SSX1-5 mRNA, 结合临床相关指标进行统计学分析。随机抽取PCR阳性产物进行DNA测序。

**结果:** SSX1、SSX2、SSX4和SSX5 mRNA在HCC中的表达率分别为42.6%(26/61)、8.2%(5/61)、39.3%(24/61)和6.6%(4/61); 未检测到SSX3的表达。在癌旁组织中, 未检测到SSX1-5 mRNA; HCC组织中, 至少表达1个SSX基因者达50.8%(31/61); 表达2个或2个以上者达32.8%(20/61), 表达3个或3个以上者达9.8%(6/61), 同时表达4个者达3.3%(2/61)。SSX的表达与临床相关指标关系的分析结果显示: 门静脉癌栓形成与SSX1的表达、患者的年龄与SSX4的表达均具有显著性差异( $P<0.05$ ); DNA测序证实PCR阳性产物为目的基因。

**结论:** SSX1、SSX2、SSX4和SSX5在HCC组织中表达频率不尽相同, 但具有较强的特异性, 提示有可能成为HCC免疫治疗的靶抗原。

**关键词:** 肝细胞癌; 癌-睾丸抗原; 免疫治疗; 滑膜肉瘤X断裂点基因

张小静, 范蓉, 何少健, 罗彬, 李颀, 罗国容, 谢小薰. 癌-睾丸抗原SSX基因在肝细胞癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 2000-2004

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2000.asp>

## 0 引言

癌-睾丸抗原(cancer testis antigen, CT抗原)是一类可在多种肿瘤组织中表达, 而在睾丸以外的其他正常组织几乎不表达的抗原, 又称为肿瘤特异性共享抗原(shared tumor specific antigen)。利用这一表达特点, 一些CT抗原的肿瘤疫苗(如NY-ESO-1, MAGE)已试用于临床治疗并取得较好的效果<sup>[1-2]</sup>。然而, 由于CT抗原在一些肿瘤中表达频率不高又限制了其疫苗在这些肿瘤中的应用。因此, 在该研究领域中, 一方面不断地利用各种新技术寻找和鉴定更多的CT抗原, 另一方面则是对已报道的CT抗原进一步深入的研究, 了解其表达特征, 评价这些新发现的CT抗原用于肿瘤免疫治疗的可能性<sup>[3-5]</sup>。SSX基因又称滑膜肉瘤X断裂点基因(synovial sarcoma X breakpoint, SSX), 是个多基因家族, 其中一些成员被

认为是CT抗原<sup>[6]</sup>。本研究利用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术, 检测肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织及相应癌旁组织的mRNA, 以了解这些抗原的表达及其与临床相关指标的关系, 探讨将这些抗原用于HCC免疫治疗的可行性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HCC组织标本61例, 其中男55例, 女6例, 所有标本均来源于广西医科大学第一附属医院, 并经病理诊断证实; HCC癌旁组织(距癌灶边缘 $\geq 5$  cm)52例, 其中47例为癌及癌旁配对组织。所有HCC患者均来自广西各地区。收集患者的年龄、性别、肿瘤大小、病理分级(Edmondson标准)、血清AFP水平、门静脉癌栓(肉眼所见)、肝病背景和TNM分期(国际抗癌联盟(UICC)1997年第5版TNM分期标准)等临床资料。

### 1.2 方法

**1.2.1 总RNA提取及cDNA合成:** 取约300 mg,  $-70^{\circ}\text{C}$ 保存的组织, 利用异硫氰酸胍-酚-氯仿法提取组织总RNA。所得RNA经琼脂糖凝胶电泳和测定A值, 确定无降解后, 取3  $\mu\text{g}$ 总RNA, 用逆转录酶(MBI公司)合成cDNA。所得cDNA通过PCR扩增看家基因以检测cDNA的质量<sup>[7]</sup>。将合格的cDNA分装,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

**1.2.2 靶基因的RT-PCR检测:** SSX1、SSX2、SSX3和SSX5的总反应体积为30  $\mu\text{L}$ , 取cDNA 1  $\mu\text{L}$ ; SSX4的总反应体积为25  $\mu\text{L}$ , 取cDNA 2  $\mu\text{L}$ 。PCR循环数均为35个循环。靶基因SSX1-5的引物序列、退火温度和扩增片段长度见表1。每次PCR反应中, 均采用睾丸cDNA为阳性对照, 不加模板为阴性对照。PCR完毕后, 取5  $\mu\text{L}$ 产物行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察拍照。

**1.2.3 DNA测序:** 随机选取SSX1-5阳性的PCR产物, 经纯化后进DNA测序(ABI3100自动测序仪, 美国)。

**统计学处理** 应用SPSS for Windows 11.5统计学分析软件, 对所得数据进行统计学处理。样本率的比较用 $\chi^2$ 检验, 样本均数的比较用 $t$ 检验。

## 2 结果

**2.1 SSX基因mRNA的表达** SSX1-5 PCR扩增产物电泳图见图1。在HCC组织中, SSX1表达率(42.6%)最高, 其次为SSX4(39.3%), 随后为SSX2(8.2%)和SSX5(6.6%), 未检测到SSX3; 在癌旁组织中, 未检测到SSX1-5 mRNA。

### ■创新盘点

目前, 有关广西HCC组织中SSX基因mRNA的表达仅有一些报道, 但存在着一些不足, 如: 例数较少, 临床相关指标的分析有限等。基于以上情况, 本研究扩大样本例数, 检测SSX家族的5个成员(SSX1-5), 并结合多项临床指标进行分析。



### ■应用要点

由于SSX1、2、4和SSX5在HCC中的表达具有较强的特异性及具有共表达等特性,因此均有可能作为HCC免疫治疗的靶抗原,通过研发SSX的多价疫苗,可扩大免疫治疗的适用范围,并且可以提高疗效。

表 1 靶基因引物序列、退火温度和扩增长度

基因		引物序列	退火温度(°C)	产物大小(bp)
SSX1	正义:	5'-CTA AAG CAT CAG AGA AGA GAA GC-3'	54	421
	反义:	5'-AGA TCT CTT ATT AAT CTT CTC AGA AA-3'		
SSX2	正义:	5'-GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC-3'	58	434
	反义:	5'-TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G-3'		
SSX3	正义:	5'-GGA AGA GTG GGA AAA GAT GAA AGT-3'	58	381
	反义:	5'-CCC CTT TTG GGT CCA GAT ATC A-3'		
SSX4	正义:	5'-AAA TCG TCT ATG TGT ATA TGA AGC T-3'	60	415
	反义:	5'-GGG TCG CTG ATC TCT TCA TAA AC-3'		
SSX5	正义:	5'-GTT CTC AAA TAC CAC AGA AGA TG-3'	58	324
	反义:	5'-CTC TGC TGG CTT CTC GGG CG-3'		

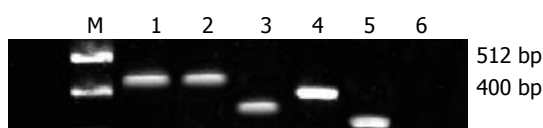


图 1 SSX1-5的PCR扩增产物电泳图. M: DNA分子质量标记; 1: SSX1(421 bp); 2: SSX2(434 bp); 3: SSX3(381 bp); 4: SSX4(415 bp); 5: SSX5(324 bp); 6: 阴性对照。

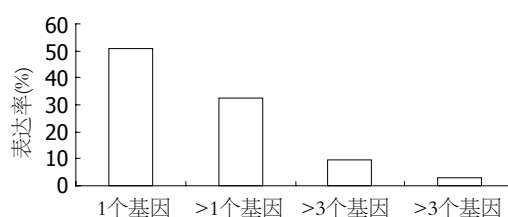


图 2 SSX基因在HCC组织中的共表达。

**2.2 SSX基因在HCC组织中的共表达** 在检测的HCC组织中,至少表达1个SSX基因者达50.8%(31/61);表达2个或2个以上者达32.8%(20/61);表达3个或3个以上者达9.8%(6/61);同时表达4个者达3.3%(2/61)(图2)。

**2.3 SSX基因mRNA的表达与临床相关指标的关系** 经 $\chi^2$ 检验及 $t$ 检验分析发现,在HCC组织中,除门静脉癌栓形成与SSX1的表达、患者的年龄与SSX4的表达具有显著性差异外( $P<0.05$ ),其余指标均与SSX1和SSX4的表达无显著性差异( $P>0.05$ )。SSX2和SSX5在HCC组织中表达与所分析的指标的差异均无显著性( $P>0.05$ ,表2)。

**2.4 DNA测序** 随机抽取PCR阳性产物进行DNA测序,所得序列与基因库检索序列一致,证实所扩增的产物为目的基因的片段。

### 3 讨论

广西是HCC的高发区,探讨如何将CT抗原用于HCC的辅助治疗有一定的临床意义。目前,有关广西HCC组织中SSX基因mRNA的表达仅有一些报道<sup>[4,8-9]</sup>,但存在以下不足: (1)SSX3和SSX5在HCC组织中的表达情况尚未见报道; (2)例数较少; (3)SSX表达与临床相关指标的分析有限。基于以上情况,本研究扩大样本例数,检测SSX家族的5个成员(SSX1-5),并结合多项临床指标进行分析。本研究结果显示SSX1(42.6%)和

SSX4(39.3%)的表达率较高,而SSX2(8.2%)和SSX5(6.6%)的表达率较低。SSX1和SSX2表达率低于先前报道<sup>[4,9]</sup>,而SSX4则明显高于Luo *et al*<sup>[8]</sup>的报道,这可能与不同的标本有关,但不排除与SSX家族成员在HCC中的表达异质性有关。本研究未发现1例表达SSX3,与SSX3在其他肿瘤组织中的表达率几乎为零的情况相似<sup>[10-11]</sup>。同一基因家族中,为何一些成员完全不表达,目前机制尚不清楚,有待进一步的研究探测。

对SSX基因表达与临床相关指标关系的分析发现,已有门静脉癌栓的HCC患者,SSX1的表达率明显高于无门静脉癌栓形成的HCC患者,提示SSX1阳性的患者HCC的复发及转移可能性较大,预后较差。目前已知随着年龄的增加,机体DNA甲基化程度逐渐降低,去甲基化程度逐渐增高<sup>[12]</sup>,而体外实验也发现在肿瘤细胞培养中加入去甲基化试剂可诱导SSX基因表达<sup>[13-14]</sup>。因此,SSX4的表达与患者年龄相关,这从另一方面提示SSX4的表达与可能去甲基化有关,此外,尽管本研究结果显示SSX基因的表达率与AFP值的无显著性差异,但在11例AFP值正常( $<20 \mu\text{g/L}$ )的HCC组织中,有6例表达SSX1、SSX4和SSX5。这一现象提示,SSX1、SSX4和SSX5的表达对HCC的辅助诊断可能有一定的意义。

SSX基因在其他肿瘤组织中存在共表达

表 2 HCC中SSX mRNA的表达及与临床指标的关系

临床指标	n	SSX1		SSX2		SSX4		SSX5	
		+	阳性率(%)	+	阳性率(%)	+	阳性率(%)	+	阳性率(%)
总数	61	27	44.2	5	8.2	24	39.3	4	6.60
性别									
男	55	24	43.6	5	9.1	23	41.8	4	7.20
女	6	3	50	0	0	1	16.7	0	0
HBV									
+	53	22	41.5	5	9.4	21	39.6	4	7.55
-	8	5	62.5	0	0.0	3	37.5	0	0.00
AFP(μg/L)									
≤25	11	3	27.3	0	0	4	36.3	1	9.10
>25	50	24	48.0	5	10.0	20	40.0	3	6.00
肿瘤大小(cm)									
≤5	11	4	36.4	1	9.1	4	36.4	1	9.10
>5	50	23	46.0	4	8.0	20	40.0	3	6.00
病理分级 <sup>E</sup>									
I / II	34	15	44.1	3	8.8	10	29.4	2	5.90
III / IV	27	12	44.4	2	7.4	14	51.9	2	7.40
癌栓									
+	17	12	70.6 <sup>a</sup>	0	0	10	58.8	2	11.80
-	44	15	34.1	5	11.4	14	31.8	2	4.80
肝硬化病史									
有	44	21	47.7	5	11.4	19	43.2	4	9.10
无	17	6	35.3	0	0	5	29.4	0	0
TNM <sup>G</sup>									
I / II	19	6	36.6	3	15.8	7	36.8	1	5.30
III / IV	42	21	50.0	2	4.8	17	40.5	3	7.10
平均年龄(岁)									
+		49.48 ± 11.07		53.00 ± 9.14		51.08 ± 11.04 <sup>a</sup>		46.75 ± 8.66	
-		45.50 ± 9.97		46.75 ± 10.61		44.81 ± 9.61		47.30 ± 10.76	

E: Edmondson分级; G: 国际抗癌联盟(UICC)1997年第5版的TNM分期; <sup>a</sup>P = 0.01 < 0.05.

现象<sup>[15]</sup>, 这一现象也同样存在于HCC组织中. 本研究结果显示至少表达1个SSX基因的占50.8%(31/61); 至少表达2个SSX基因的占32.8%(20/61); 至少表达3个SSX基因的占9.8%(6/61); 同时表达4个SSX基因的占3.3%(2/61). 这种共表达现象可能与CT抗原在组织中的相互作用有关, 因为当单个基因因去甲基化被激活后, 该基因可能以连锁反应的形式相继激活其他基因, 导致共表达现象的出现<sup>[13]</sup>. 尽管这一现象出现的机理尚不清楚, 但由于半数的HCC患者表达至少1个SSX基因, 以及一个个体中可同时表达多个SSX基因, 这将十分有利于SSX多价疫苗的应用.

本研究显示了SSX1-5在HCC组织中的表达率不尽相同, SSX1和SSX4的表达率较高, 而SSX2和SSX5的表达率偏低. 由于该家族成员在

核酸及蛋白水平均有较高的同源性, 并存在共同表达现象, 尤其是半数的HCC患者可表达至少一种SSX, 因此, SSX1、SSX2、SSX4和SSX5均有可能作为HCC免疫治疗的靶抗原, 通过研发SSX的多价疫苗, 不但可扩大免疫治疗的适用范围, 而且由于多价疫苗包含多个特异性抗原表位, 可以针对因肿瘤细胞异质性表达而致的免疫逃逸, 以达到提高疗效的目的.

#### 4 参考文献

- Old LJ. Cancer Vaccine Collaborative 2002: opening address. *Cancer Immun* 2003; 3 Suppl 1: 1
- 范蓉, 罗昱, 肖绍文. 肿瘤-睾丸抗原的特性及临床应用. *国外医学·肿瘤学分册* 2005; 32: 166-169
- Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 2004; 4: 1
- 谢小薰, 蓝玲, 黎鹏, 范蓉, 赵飞兰, 莫发荣, 肖绍文, 罗国容. 多种癌-睾丸抗原基因在广西肝细胞癌中的表

#### ■名词解释

1 癌-睾丸抗原(CTA): 一类在正常组织中(睾丸生精上皮除外)通常不表达, 而在多种肿瘤组织中广泛表达的肿瘤共享抗原.

2 SSX基因: 又称滑膜肉瘤X断裂点基因(SSX), 他的发现与滑膜肉瘤中的易位染色体t(X; 18)(p11.2; q11.2)有着密切的联系.

## ■同行评价

本研究选题新颖,设计合理,结果有一定的参考价值.

- 5 达. 中华消化杂志 2004; 24: 174-175
- 6 范蓉, 肖绍文, 罗昱, 廖兴胜, 张小静, 许涛, 谢小薰. 癌-睾丸抗原基因NY-SAR-35在人脑膜瘤中的表达. 中华神经外科杂志 2005; 21: 109
- 7 Zahn M. Cancer/Testis (CT) Gene Database. *Cancer Immunology online*. 2006-03-29, cited 2009-04-21; 1(1): 24 screens. Available from: URL: <http://www.cancerimmunity.org/CTdatabase/>
- 8 Xie X, Wacker HH, Huang S, Regitz E, Preuss KD, Romeike B, Parwaresch R, Tiemann M, Pfreundschuh M. Differential expression of cancer testis genes in histological subtypes of non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 167-173
- 9 Luo G, Huang S, Xie X, Stockert E, Chen YT, Kubuschok B, Pfreundschuh M. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Immun* 2002; 2: 11
- 10 陈红松, 覃柳亮, 从旭, 王瑜, 费然, 蒋栋, 曹骥, 苏建家, 魏来, 陈慰峰, 王宇. 肿瘤特异性肿瘤/睾丸抗原在肝癌组织中的表达. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 145-148
- 11 Türeci O, Chen YT, Sahin U, Güre AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Seitz G, Old LJ, Pfreundschuh M. Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer* 1998; 77: 19-23
- 12 Ayyoub M, Brehm M, Mettetz G, Talbot S, Dutoit V, Taub RN, Keohan ML, Gure AO, Chen YT, Williamson B, Jungbluth AA, Old LJ, Hesdorffer CS, Valmori D. SSX antigens as tumor vaccine targets in human sarcoma. *Cancer Immun* 2003; 3: 13
- 13 De Smet C, Lurquin C, Lethé B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7327-7335
- 14 dos Santos NR, Torensma R, de Vries TJ, Schreurs MW, de Bruijn DR, Kater-Baats E, Ruiter DJ, Adema GJ, van Muijen GN, van Kessel AG. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res* 2000; 60: 1654-1662
- 15 Güre AO, Wei JJ, Old LJ, Chen YT. The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. *Int J Cancer* 2002; 101: 448-453
- 16 Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1809-1814

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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,  $3.5 \pm 0.5$  mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq$ 100, 百分数到个位;  $101 \leq$ 分母 $\leq$ 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-08)

# 原发性胆管结石手术引流方式的分析及其再认识

陈水平, 余新, 邵江华, 邬林泉, 邹书兵, 傅华群

陈水平, 余新, 邵江华, 邬林泉, 邹书兵, 傅华群, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 此课题由邵江华设计; 研究过程由陈水平操作完成; 数据分析由陈水平完成, 余新与邬林泉协助收集及整理资料; 本论文写作由陈水平完成; 邹书兵与傅华群为本文的最终定稿提出了许多很好的建议。

通讯作者: 邵江华, 教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院肝胆外科. shao5022@163.com

电话: 0791-6265564

收稿日期: 2009-03-31 修回日期: 2009-05-12

接受日期: 2009-05-18 在线出版日期: 2009-07-08

## An analysis and re-evaluation of biliary drainage procedures for patients with primary bile duct stones

Shui-Ping Chen, Xin Yu, Jiang-Hua Shao, Ling-Quan Wu, Shu-Bing Zou, Hua-Qun Fu

Shui-Ping Chen, Xin Yu, Jiang-Hua Shao, Ling-Quan Wu, Shu-Bing Zou, Hua-Qun Fu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Jiang-Hua Shao, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. shao5022@163.com

Received: 2009-03-31 Revised: 2009-05-12

Accepted: 2009-05-18 Published online: 2009-07-08

## Abstract

**AIM:** To retrospectively evaluate the changes in biliary drainage procedures for patients with bile duct stones.

**METHODS:** The clinical records of 3691 patients with bile duct stones treated at our hospital from 1986 to 2007 were collected, while the clinical data of patients with bile duct stones reported in the literature between 1960 and 1980 were obtained by searching the Chinese Biomedical Literature Database (CBMDisc). The changes in biliary drainage procedures (e.g., T-Tube drainage and biliary-intestinal anastomosis) were analyzed. Moreover, the possible reasons behind such changes were explored.

**RESULTS:** During the periods from 1960 to 1980, 1986 to 1996 and 1997 to 2007, T-Tube drainage and biliary-intestinal anastomosis were used in

74.70% and 16.90%, 35.20% and 38.42%, 70.30% and 10.16% of patients undergoing surgical therapy, respectively.

**CONCLUSION:** Over the past 50 years, the changes in biliary drainage procedures for patients with bile duct stones in China can be divided into three different stages, namely, biliary tract exploration plus T-Tube drainage, biliary-intestinal anastomosis, and radical treatment of focal infection plus T-Tube drainage.

**Key Words:** Bile duct stones; Biliary tract exploration; T-Tube drainage; Biliary-intestinal anastomosis

Chen SP, Yu X, Shao JH, Wu LQ, Zhou SB, Fu HQ. An analysis and re-evaluation of biliary drainage procedures for patients with primary bile duct stones. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 2005-2009

## 摘要

**目的:** 探讨胆管结石手术引流方式随诊断技术和手术技巧的提高所发生的变迁。

**方法:** 收集1986-2007年南昌大学第二附属医院3691例胆管结石患者的临床资料, 并利用中国生物医学文献数据库检索20世纪60-80年代初胆管结石手术引流方式资料, 分析胆管结石手术引流方式-T管引流和胆肠吻合引流的变化趋势, 并分析其产生变化的原因。

**结果:** 20世纪60-80年代初、1986-1996年、1997-2007年这3个时间段胆管结石患者中T管引流和胆肠吻合引流在同期行手术治疗的患者中百分比分别是74.70%和16.90%、35.20%和38.42%、70.30%和10.16%。

**结论:** 近50年我国胆管结石患者手术引流方式经历了胆道探查+T管引流、胆肠吻合与病灶根治+T管引流3个阶段。

**关键词:** 胆管结石; 胆道探查; T管引流; 胆肠吻合

陈水平, 余新, 邵江华, 邬林泉, 邹书兵, 傅华群. 原发性胆管结石手术引流方式的分析及其再认识. *世界华人消化杂志* 2009; 17(19): 2005-2009  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2005.asp>

## ■背景资料

原发性胆管结石是指原发于胆管系统(包括肝内胆管)内的结石, 结石的性质大多为含有多量胆红素钙的色素性混合结石, 胆囊内可能存在结石。在我国, 原发性胆管结石占较大比例。因结石造成胆管梗阻, 可引发炎症、黄疸、肝功能损害和终末期肝病等并发症。同时结石发病率又相当高, 所以胆管结石的治疗一直是临床上的研究热点。

## ■同行评议者

韩天权, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所



## ■研发前沿

胆肠吻合手术方式经历一段时间的兴盛后,从20世纪90年代末期开始,随着时间的推移及临床病例的积累及较长时间的疗效观察,人们在实践中逐步认识到,肝肠吻合有一定并发症,并不能解决所有胆管结石的病理问题。

## 0 引言

胆管结石是指发生于肝内胆管和肝外胆管的结石性病变。胆管结石分为原发性和继发性2种。原发性胆管结石是指原发于胆管系统(包括肝内胆管)内的结石,结石的性质大多为含有多量胆红素钙的色素性混合结石,胆囊内一定存在结石。在我国,胆管结石多数属于这一类。因结石造成胆管梗阻,可引发炎症、黄疸、肝功能损害和胰腺炎等并发症。同时结石发病率又相当高,所以胆管结石的治疗一直是临床上的研究热点。胆管结石的外科治疗原则是“取净结石,解除梗阻,去除病灶,通畅引流”。而对于引流方式临床上主要有“胆管探查+T管外引流”和“胆肠吻合内引流”。随着时间的变迁,手术方式也发生着不同的变化。我院1986-2007年共收治胆管结石患者3691例,其中行手术治疗2763例,现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院于22年(1986-2007)中共收治原发性胆管结石患者(B超检查胆囊无结石)3691例,男1575、女2116例,年龄16-92(平均年龄48.9)岁。其中行手术治疗2763例。另作者利用中国生物医学文献数据库检索文献,以《中华外科学杂志》上最具代表性的2篇文章<sup>[1-2]</sup>中的资料进行汇总。

**1.2 方法** 原发性胆管结石的诊断是: B超提示胆囊无结石,手术中发现肝内或肝外胆管有结石。结石分布为: 分1986-01/1996-12期间和1997-01/2007-12期间两个阶段,统计左肝、右肝、胆总管、混合(指既有肝内胆管结石又有肝外胆管结石或(和)左、右肝管同时具有结石)、不明(病历资料中没有详细标明)各组结石发生例数和所占比例。手术引流方式: T管引流和胆肠吻合2种手术方式进行分组。同时为了寻找导致胆管结石手术引流方式的变迁原因,对收集到的我院病历资料进行分析,对比诊断技术和治疗方法在不同阶段的应用情况(某项检查或操作占总的手术患者的百分比)。

**统计学处理** 样本率的比较资料用SPSS13.0软件作 $\chi^2$ 分析。

## 2 结果

**2.1 一般资料分析** 本组资料中男女比例(表1)、结石的分布部位(表2)及发病年龄(图1)提示胆管结石女性多见,混合性、多发性常见,且发病年

表 1 不同年份胆管结石的男女分布

年份	1986-1996		1997-2007	
	<i>n</i>	百分比(%)	<i>n</i>	百分比(%)
男	524	41.80	1051	42.20
女	730	58.20	1386	57.80
合计	1254	100.00	2437	100.00

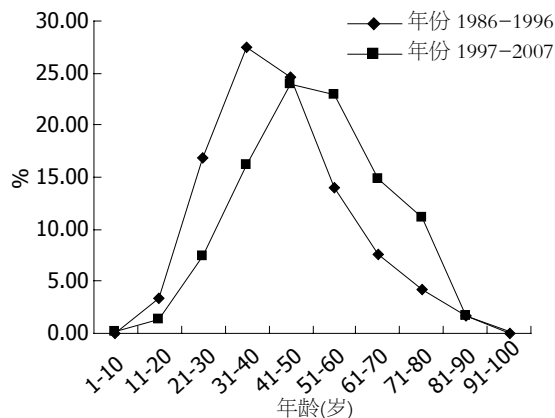


图 1 不同年份胆管结石的年龄段分布折线图。

表 2 胆管结石的分布部位

结石分布部位	1986-1996		1997-2007	
	<i>n</i>	百分比(%)	<i>n</i>	百分比(%)
左肝	188	15.00	292	12.00
右肝	64	5.10	105	4.30
胆总管	288	23.00	658	27.00
混合 <sup>1</sup>	602	48.00	1137	46.70
不明 <sup>2</sup>	112	8.90	245	10.00
合计	1254	100.00	2437	100.00

<sup>1</sup>: 指既有肝内胆管结石又有肝外胆管结石或(和)左、右肝管同时具有结石; <sup>2</sup>: 病例资料中没有详细标明。

龄高峰略有后移。

### 2.2 手术引流方式的变迁

**2.2.1 我院22年中每年胆管结石患者手术引流方式:** 将其每年T管引流和胆肠吻合分别占总手术治疗患者的百分比以折线图描述,提示T管引流术式近年来逐渐增加,而胆肠吻合术式则在近年急剧减少(图2)。

**2.2.2 根据折线图趋势分为2个时间段:** 1986-1996年和1997-2007年,并将这2个时间段进行汇总分别得到1986-1996年、1997-2007年胆管结石患者T管引流和胆肠吻合引流的百分比分别是: 35.20%和38.42%、70.30%和10.16%(表3-4)。同时由于20世纪60-80年代本院资料缺失或不

## ■相关报道

目前有多篇临床报道以“去除病灶,通畅引流”理念为基础,对近年来开展“病灶根治+T管引流”的经验进行总结,证实其能取得良好的治疗效果。如梁立建总结498例肝切除治疗肝内胆管结石,以及黄志强分析肝内胆管结石的治疗现状与展望,和对当代胆管外科发展方向中有关肝内胆管结石治疗的论述。

表 3 2个不同时间段T管引流率的 $\chi^2$ 分析

	T管引流	非T管引流	合计	采用率(%)	$\chi^2$ 值	P值
1986-1996组	401(636.22)	739(503.78)	1140	35.20	335.02	<0.001
1997-2007组	1141(905.78)	482(717.22)	1623	70.30		
合计	1542	1221	2763	56.92		

括号外为实际病例数, 括号内为四格表资料的理论频数.

表 4 2个不同时间段胆肠吻合引流率的 $\chi^2$ 分析

	胆肠吻合	非胆肠吻合	合计	采用率(%)	$\chi^2$ 值	P值
1986-1996组	438(248.79)	702(891.21)	1140	38.42	313.34	<0.001
1997-2007组	165(354.21)	1458(642.42)	1623	10.16		
合计	603	2160	2763	21.82		

括号外为实际病例数, 括号内为四格表资料的理论频数.

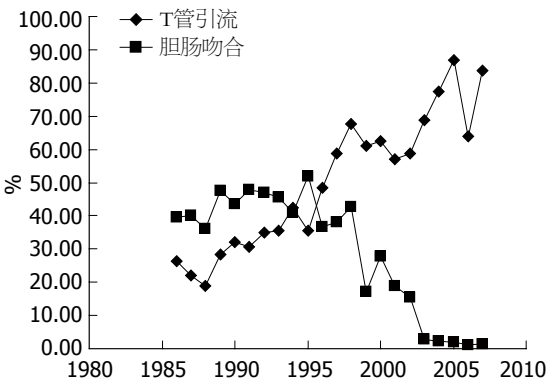


图 2 T管引流和胆肠吻合变化趋势图.

全, 为了解当时情况, 我们通过检索文献, 以《中华外科学杂志》上最具代表性的2篇文章中收集到的资料进行汇总求平均数得到当时的T管引流和胆肠吻合引流的大致百分比分别为: 74.70%和16.90%. 另外分别将这3个时间段的情况以条形图描述(图3).

2.2.3 我院资料: MRI、ERCP、等先进诊断设备的应用; 鼻胆管引流为胆管结石赢得了手术时机; 术中超声、胆道镜防止结石残留; 胆道专科的成立和肝切除技术的应用等因素是导致胆管结石手术引流方式变迁的主要原因(表5).

### 3 讨论

过去, 我国胆管结石外科治疗手术引流方式经历了胆道探查+T管引流、胆肠吻合、病灶根治+T管引流3个阶段. 在时间上分别为20世纪80年代以前、20世纪80-90年代中期、20世纪90年代末到现在这3个时间段. 这3个阶段中手术引流

**■创新盘点**  
本文首次总结3个阶段中手术引流方式从T管引流又回到T管引流, 终点又是起点, 但这并非简单的重复, 而是认识 and 技术的升华, 是人们在实践中对胆道疾病治疗方式的再认识结果.

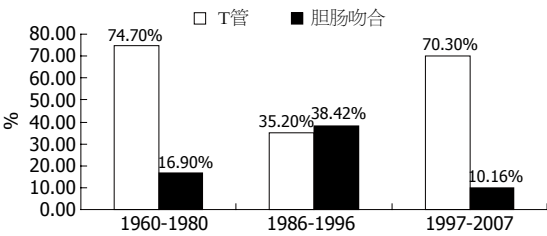


图 3 3个时间段两种手术方式的比例.

表 5 2时间段不同诊断技术和治疗方法与总例数百分比

	1986-1996年		1997-2007年	
	n	%	n	%
B超	940	82.4	1572	96.8
CT	320	28.1	726	44.7
MRI	0	0	197	12.1
ERCP+EST	0	0	115	7.0
术中造影	0	0	92	5.7
术中超声	95	8.3	105	6.5
胆道镜	0	0	142	8.7
肝段切除	98	8.6	275	16.9
鼻胆管	0	0	233	14.3
专科医生	0	0	524	32.2

方式从T管引流又回到T管引流, 终点又是起点, 但这并非简单的重复, 而是认识 and 技术的升华, 是人们在实践中对胆道结石的再认识结果.

20世纪80年代中期以前, 胆管结石外科治疗的主要手术方式是胆道探查+T管引流. 因此阶段影像学诊断技术落后, 疾病诊断主要依靠询问病史、体格检查及“三检一透”即血、尿、粪常规检查, 腹部或胸部X线透视. B超检查仪器

## ■应用要点

胆管结石的外科治疗手术引流方式经历了胆道探查+T管引流、胆肠吻合、病灶根治+T管引流3个阶段。出现这种变化是建立在医学发展的基础上,即诊断技术的进步、对胆道疾病认识的提高、手术技巧的提高、手术方式的改变。

1976年才开始引进。当时胆道探查+T管引流是解决胆道结石问题的首选。胆肠吻合在当时是技术要求较高的手术,因技术限制开展得并不广泛。魏北有<sup>et al<sup>[2]</sup></sup>报道1960-1981年收治胆管结石患者623例行T管引流手术588例,而胆肠吻合还不到20例。我院此阶段资料缺失,但从他们的资料中可以反映出当时手术引流以T管引流为主的治疗状况。

20世纪80-90年代中期胆道外科手术方式兴起了一股胆肠吻合术热。这主要由于:(1)胆道探查+T管引流术有其局限性,表现在不容易取净结石,特别是肝内胆管多发性结石、二、三级胆管结石以及泥沙样结石,患者术后往往有结石残留或结石复发而需要行二次手术甚至多次手术;(2)T管引流后局部并发症,如胆漏、T管折段、T管脱出、T管拔管后窦道形成不全、T管引流量过多造成电解质紊乱以及T管堵塞和术后胆管瘢痕性狭窄等<sup>[3]</sup>;(3)胆总管下段狭窄上段扩张、下段梗阻和Oddi's括约肌有病变者,也不适宜行T管引流。当时行单纯T管引流的效果不佳其主要原因是:(1)手术前缺乏清晰胆道影像资料,对胆道系统病变缺乏完整的了解;(2)重症胆管炎需行急诊手术;(3)高位胆管狭窄并发胆汁性肝硬化、门脉高压症、急性胆管炎等。同时这段时期我国的医学技术水平也大大提高,我院从1986-1996年中共有1140例胆管结石患者行手术治疗,其中有405例行胆肠吻合占总数的37%。就短期效果来说胆肠吻合术解决了胆管狭窄和胆汁引流问题。

胆肠吻合手术方式经历一段时间的兴盛后,从20世纪90年代末期开始,随着时间的推移及临床病例的积累及较长时间的疗效观察,人们在实践中逐步认识到其也具有很多缺点和并发症,甚至超过胆道探查+T管引流<sup>[4]</sup>。其原因是胆肠吻合破坏了胆道的正常解剖生理,失去了Oddi's括约肌这一生理性阀门<sup>[5-6]</sup>。在这些并发症中尤以失去Oddi's括约肌后造成的反流性胆管炎和结石复发为甚。此外黄志强<sup>[7]</sup>特别指出,良性胆道狭窄胆管空肠吻合术后胆管癌的发生率增高,胆肠吻合动物实验模型显示其可提高诱发胆管癌的易感性等事实,亦使我们重新审视肝内胆管结石的外科治疗,特别是胆管空肠吻合术的应用问题。据全国调查1460例肝内胆管结石再次手术的报告,9.75%为胆管肠道吻合后再手术<sup>[8]</sup>。此外,人们在实践中发现残存结石从胆肠吻合口中掉入肠道排出是几率很小。残留

的病灶还会导致结石的复发,胆肠吻合导致正常解剖结构的破坏,加大了二次胆道手术或再次胆道手术的难度。在我院收治的病例中二次或多次胆道手术中首次曾行胆肠吻合者超过40%。

20世纪90年代后影像诊断技术迅速发展,及在临床上广泛的应用,对于结石的诊断起得了很大的进步,特别是CT、MRI、MRCP、PTC、ERCP的应用对肝内胆管结石的定位上还有很大帮助,能得出清晰的胆树图像<sup>[9]</sup>。胆道镜能直接进入II、III级胆管看到结石并通过网篮取石,胆道镜还可以通过T管窦道取石<sup>[10]</sup>,使用术后纤维胆道镜对肝内胆管残石取石成功率达91.4%<sup>[11]</sup>。我们统计本院术中使用胆道镜患者106例,术后B超发现结石残留的只有9例。

经过20世纪90年代的临床与实验研究,逐步阐明肝内胆管结石的节段性的病理改变,肝内胆管结石临床病变特点是:(1)结石沿肝内病变胆管树呈区域性分布;(2)常合并病变胆管树的多重狭窄;(3)肝脏增生-萎缩复合征;(4)病程晚期继发肝胆管癌;(5)长期反复发作的胆道梗阻和(或)感染,以受累肝叶或肝段为单位呈局限性分布的不可逆性损害<sup>[12]</sup>。而对于肝脏解剖也有了更深层次认识,在此基础上针对早期肝内胆管结石的特点,提出系统性规则性肝段切除术(systemic regular segmentectomy)。因为手术是从段肝蒂开始分离及切断肝段的管道,所以能最大限度地保存正常胆管和对病变胆管进行必要的处理<sup>[13]</sup>。系统性规则性肝段切除术避免了非规则性肝段切除术所造成的遗留病变的胆管组织而导致手术后感染、胆瘘、窦道形成、再生结石甚至癌变等并发症。

手术技术的提高主要表现在规则性肝段切除术的完善,因而治疗的着眼点从肝叶切除、半肝切除转向选择性的规则性肝段、亚肝段或局部胆管树切除,以恢复正常的肝胆生理状态<sup>[14]</sup>。用肝部分切除技术来治疗肝胆管结石,起到清除结石,消灭病变场所的作用<sup>[15]</sup>。规则性肝段切除是完整地切除病变部位的肝内胆管支,完全保存正常的肝组织。此手术方法对早期肝内胆管结石应为“治愈”性的清除病灶,恢复胆道的生理状态,而非胆肠吻合术所能比拟。最近中山大学第一附属医院总结近14年来肝内胆管结石病例498例,其中有63.7%行肝切除术,2001年后肝切除比例为74.6%<sup>[16]</sup>。肝叶切除术结果优良率达到90%以上<sup>[17]</sup>。1986-1996年我院开展肝切除手术的患者只占胆管结石手术患者中的8.6%

而在1997-2007年却有16.9%。我们统计的数据还包括肝外胆管结石, 所以比例要低, 但总的来说肝段切除治疗结石的比率和效果逐年增加。Jan *et al*和Jeng *et al*两研究组<sup>[18-19]</sup>分别对比614例肝胆管结石手术与非手术治疗随访4-10年和103例合并肝胆管狭窄的双侧肝胆管结石患者切除与否的远期疗效, 结果证明行肝叶或肝段切除者的术后生活质量明显优于非手术组。通过部分肝叶的切除来治疗肝叶内多发结石, 也弥补了单纯胆道探查T管引流术不能取净结石的不足。因此黄志强提出肝内胆管结石时的早期的系统性肝段切除术, 以达到最大限度地消除病灶和保存功能性肝组织。对于广泛肝内胆管结石, 病灶不易根治者, 在晚期出现胆汁淤积性肝硬化伴严重肝功能障碍时, 可以采用肝移植。

手术技术的提高还表现在术前处理(如减黄、护肝、降低腹水); 术中采取肝门阻断, 减少出血量以及根据出血量采取的输血措施, 低温下肝门阻断技术的应用; 术后的对症支持治疗等。这些技术的改进, 使得肝切除技术日趋完善。而鼻胆管的应用, 可以使患者在炎症急性期免于手术, 减少了手术风险。此外, 在20世纪90年代后我院成立胆道专科, 由操作熟练医生来完成手术。

胆管结石的外科治疗手术引流方式经历了胆道探查+T管引流、胆肠吻合、病灶根治+T管引流3个阶段。出现上述变化其原因可归结为以下几点: (1)诊断技术的进步; (2)对胆道疾病认识的提高; (3)手术技巧的提高; (4)手术方式的改变。

#### 4 参考文献

- 1 王成恩. 肝内胆石症. 中华外科杂志 1983; 21: 332-334
- 2 魏北有, 陈起衡, 叶绍裘, 陈道恕, 程长铭, 郑长森, 何

- 协, 陈修溥, 林强. 623例肝胆管结石临床分析. 中华外科杂志 1983; 21: 335-337
- 3 赵登秋, 陈一尘, 朱克明, 郝立俊. 36例胆道探查T管引流术后并发症的原因及防治. 肝胆外科杂志 2005; 13: 294-296
- 4 巨邦律, 方驰华. 原发性肝内胆管结石的诊断和外科治疗. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1413-1415
- 5 窦科峰, 李海民. 肝胆管结石的综合治疗与个体化处理. 中国实用外科杂志 2004; 24: 70-72
- 6 吴硕东, 于宏, 王昊霖, 苏洋, 张振海, 孙韶龙, 孔静, 田雨, 田忠, 魏义, 金红旭, 金俊哲. Oddi括约肌与胆管色素结石形成关系的探讨. 中华外科杂志 2007; 45: 58-61
- 7 黄志强. 胆道疾病中的热点问题. 医学研究杂志 2007; 36: 1-3
- 8 梁力建. 努力避免非计划性的胆道再次手术. 中国实用外科杂志 2006; 26: 161-162
- 9 李坤成, 苏壮志. 胆管结石的影像学诊断及进展. 中国实用内科杂志 2007; 27: 170-174
- 10 刘树清, 陈书忠, 吴云光, 余明豪. 腹腔镜联合胆道镜治疗胆管结石160例. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2734-2736
- 11 孟翔凌, 徐阿曼, 高山城, 朱化刚, 杨文奇, 熊茂明, 胡孔旺, 李永翔. 肝内胆管结石1795例的外科治疗. 中华肝胆外科杂志 2001; 7: 587-589
- 12 董家鸿. 肝胆管结石临床病理类型与手术方式的选择. 外科理论与实践 2003; 8: 99-100
- 13 黄志强. 肝内胆管结石外科治疗的进展. 中国实用外科杂志 2004; 24: 65-66
- 14 郑光琪. 肝门区域血管阻断肝段切除335例报告. 中国实用外科杂志 2007; 27: 811-813
- 15 黄志强. 当今胆道外科的发展与方向. 中国现代普通外科进展 2007; 10: 93-95
- 16 梁力建, 李绍强, 彭宝岗, 赖佳明, 黎东明, 吕明德. 肝切除术治疗肝内胆管结石. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 796-800
- 17 黄志强. 肝内胆管结石治疗的现状与展望. 中国普外基础与临床杂志 2001; 8: 65-67
- 18 Jan YY, Chen MF, Wang CS, Jeng LB, Hwang TL, Chen SC. Surgical treatment of hepatolithiasis: long-term results. *Surgery* 1996; 120: 509-514
- 19 Jeng KS, Ohta I, Yang FS. Reappraisal of the systematic management of complicated hepatolithiasis with bilateral intrahepatic biliary strictures. *Arch Surg* 1996; 131: 141-147

#### ■同行评价

本研究临床资料宝贵, 具有一定的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 2009-07-08)



## 胶囊内镜对结肠的检查

王炳周, 吴灵飞, 李国平, 杨伟昂

### ■背景资料

胶囊内镜是近年来发展起来的新型消化系统检查器械, 主要用于小肠疾病的检查, 通常其对结肠检查价值较为有限, 因以往胶囊在工作时间内不能运行于整条结肠, 一方面因胶囊电池有效工作时间不够, 另一方面因胶囊在结肠运行困难, 通常大部分胶囊进入结肠后不再前进而是停留于回盲部处或在回盲部及升结肠来回运动。

王炳周, 吴灵飞, 李国平, 杨伟昂, 汕头大学医学院第二附属医院消化内科 广东省汕头市 515041

作者贡献分布: 王炳周、吴灵飞、李国平及杨伟昂对此文所作贡献均等; 此课题由王炳周、吴灵飞、李国平及杨伟昂设计; 研究过程由王炳周与杨伟昂操作完成; 数据分析由王炳周、吴灵飞、李国平及杨伟昂完成; 本论文写作由王炳周与杨伟昂完成。

通讯作者: 王炳周, 副主任医师, 515041, 广东省汕头市, 汕头大学医学院第二附属医院. w\_bzlx@163.com

电话: 0754-88915678

收稿日期: 2009-05-11 修回日期: 2009-06-13

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-08

### Use of capsule endoscopy to diagnose colon diseases

Bing-Zhou Wang, Ling-Fei Wu, Guo-Ping Li, Wei-Ang Yang

Bing-Zhou Wang, Ling-Fei Wu, Guo-Ping Li, Wei-Ang Yang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University, Shantou 515041, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Bing-Zhou Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University, Shantou 515041, Guangdong Province, China. w\_bzlx@163.com

Received: 2009-05-11 Revised: 2009-06-13

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-08

### Abstract

**AIM:** To explore the use of capsule endoscopy to detect colon disorders following the completion of small intestine disease diagnosis on the basis of implementation of energy consumption control for the endoscope, body position adjustment and food serving.

**METHODS:** Seventy-six patients who received capsule endoscopy examination to exclude ileus were divided into two study groups: Group 1 ( $n = 39$ ) and Group 2 ( $n = 37$ ). Patients in Group 1 were examined by ordinary procedures. In contrast, patients in Group 2 were examined by modified procedures. The endoscope was manipulated to reduce the frequency of photographing and the brightness of endoscopic image before the capsule reached the duodenum. Within two hours after the capsule traveled inside the duodenum, the position of the moving capsule was observed continuously while the patient's body position was adjusted. The

patients were laid flat with buttocks slightly elevated when the capsule moved into the colon. Meanwhile, the patients were served with food. When the capsule reached the hepatic flexure, the patients were laid on their left side. When the capsule reached the splenic flexure, the patients were laid in flat position. After the capsule battery was exhausted, the recorder was retrieved. The position of the capsule inside the patient's body was examined by X-ray.

**RESULTS:** Endoscopic capsules worked for  $4 \pm 0.9$  h in the colon in Group 1. The capsules reached the recta in only four cases, and remained in the ileocecum in the other 35 cases, of which two cases of ileocecal polypi were detected. In contrast, endoscopic capsules worked for  $5 \pm 0.7$  h in the colon in Group 2. The movement inside the colon was active after the patients took food. The capsules reached beyond the colon ascendens in 19 (51.4%) cases. Seven (18.9%) cases of colon diseases were detected in Group 2. Statistical differences were noted in the detection rate of colon diseases and the working duration of endoscopic capsules between the two groups (both  $P < 0.05$ ). Moreover, a significant difference was observed in the effective rate of colon detection between the two groups ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Implementation of battery energy control, patient position adjustment, and food serving during capsule endoscopy can effectively prolong the working duration of endoscopic capsules in the colon and increase the detection rate of colon diseases.

**Key Words:** Capsule endoscopy; Colon diseases; Position adjustment; Food serving; Energy saving

Wang BZ, Wu LF, Li GP, Yang WA. Use of capsule endoscopy to diagnose colon diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(19): 2010-2013

### 摘要

**目的:** 探讨节能控制、体位调整及适时进食在胶囊内镜完成小肠检查基础上对结肠检查

### ■同行评议者

邵先玉, 主任医师, 泰山医学院附属医院消化内科

的作用。

**方法:** 对我院内镜室2008-11/2009-05收治的76例患者进行胶囊内镜检查, 所有病例均排除肠梗阻。将患者分为2组: 第1组常规检查组( $n = 39$ ); 第2组体位控制组( $n = 37$ ), 患者吞服胶囊后, 在胃窦反复拍照过程中通过图文系统发送命令减少拍照频率及灯光亮度以节约电能, 观察进入小肠后让患者离开, 2 h再到内镜室观察, 若胶囊进入结肠则采取平卧且臀部稍高的位体, 同时进食普通食物观察胶囊运行, 进入肝曲后采用左侧卧位体, 过脾曲后改用平卧。所有患者胶囊电源耗尽后取回记录仪, 同时作X光透视, 了解胶囊在患者体内的位置。

**结果:** 对照组39例患者胶囊在结肠内工作时间为 $4 \pm 0.9$  h, 4例(10.3%)胶囊到达直肠, 35例胶囊停留于回盲部处。在回盲部处发现息肉2例(5.1%)。体位控制组胶囊在结肠工作时间 $5 \pm 0.7$  h, 进食后结肠运动活跃, 其中19例(51.4%)于工作时间内到达升结肠以外的结肠部位, 检出结肠阳性患者7例(18.9%)。2组胶囊内镜结肠运行时间和疾病检查阳性率差别有统计学意义( $P < 0.05$ ), 对结肠检查有效率差别有显著统计学意义( $P < 0.01$ )。

**结论:** 胶囊内镜检查过程采用节能控制、体位调整及进食刺激方法, 有助于增加胶囊内镜有效工作时间内在结肠的运行, 提高结肠疾病检出率。

**关键词:** 胶囊内镜; 结肠疾病; 体位调整; 进食刺激; 节能控制

王炳周, 吴灵飞, 李国平, 杨伟昂. 胶囊内镜对结肠的检查. 世界华人消化杂志 2009; 17(19): 2010-2013  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2010.asp>

## 0 引言

胶囊内镜是近年来发展起来的新型消化系检查器械, 主要用于小肠疾病的检查, 通常其对结肠检查价值较为有限, 因以往胶囊在工作时间内不能运行于整条结肠, 一方面因胶囊电池有效工作时间不够, 另一方面因胶囊在结肠运行困难, 通常大部分胶囊进入结肠后不再前进而是停留于回盲部处或在回盲部及升结肠来回运动。根据上述存在的2个阻碍胶囊内镜全面检查结肠的问题, 我们利用胶囊内镜的调节功能使其在保证图像质量的基础上尽量延长工作时间, 同时采用体位调整减少重力对胶囊前进的影响,

并结合进食刺激结肠运动, 以期望胶囊更好地在结肠内运行, 充分发挥胶囊内镜在结肠检查中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 对我院内镜室2008-11/2009-05收治的76例已排除肠梗阻的患者按检查号单双号随机分两组进行胶囊内镜检查。第1组常规检查组( $n = 39$ ), 第2组体位控制组( $n = 37$ ), 其中男41(21/20)例(括号内数字为第1组、第2组比例, 下同), 女35(18/17)例, 年龄18-82(平均56/58)岁; 腹胀不适12(6/6)例, 不明原因消化系出血10(5/5)例, 不明原因腹痛38(19/19)例, 不明原因腹泻5(3/2)例, 无明显消化系不适症状而自愿行检查以排除消化系疾患者11(6/5)例。2组性别、年龄及临床症状差别均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 1.2 方法

**1.2.1 胶囊内镜的检查:** 检查前2 d服用大黄苏打片及少渣饮食, 检查前晚进流质饮食, 21:00开水泡服潘泻叶5 g; 检查当天5:00服用复方聚乙二醇电解质散2盒, 检查前30 min服用西甲硅油20 mL。患者8:00用开水吞服胶囊后, 连接监视器实时观察, 待胶囊进入小肠后方可离开, 如1 h后仍不进入小肠, 则肌注胃复安10 mg, 并采用上身右倾30度体位, 以利胶囊顺利通过幽门进入小肠。

**1.2.2 体位控制:** 第1组常规检查组患者吞服胶囊后拍照速度与灯光不做调整, 胶囊进入小肠2 h后可进食糖盐水, 除剧烈运动外可自由活动。第2组体位控制组吞服胶囊后, 对于胃窦部反复拍照部分调整其拍摄速度为慢, 灯光在保证能清楚观察的情况下调整为较暗, 胶囊进入小肠后2 h回内镜室实时观察, 胶囊进入结肠后嘱患者进食食物以刺激结肠运动, 同时采用平卧, 抬高臀部体位, 并实时观察胶囊在结肠内运行情况, 如胶囊保持于一结肠袋内2 min以上, 则嘱患者轻微左右摆动体位, 使胶囊运动, 观察胶囊是否向前运行, 观察过程如果发现胶囊已进入肝曲(根据图像的淡蓝色判断), 则改为左侧卧位, 再观察1 h后患者可起身坐位或站位, 让胶囊继续工作至电源耗尽。所有病例电源耗尽后均作X光透视以了解胶囊所在部位。

**1.2.3 结果判定方法:** 胶囊电源耗尽时处于回盲部或在升结肠为结肠检查无效, 到达升结肠以外的结肠为结肠检查有效。

**统计学处理** 所有计量资料用mean  $\pm$  SD表

## ■ 研发前沿

一直以来, 胶囊内镜主要应用于小肠检查, 因其对胃及食管的检查不够全面, 只能观察到部分胃黏膜。对于结肠的检查, 胶囊内镜常常力不能及。

### ■相关报道

有研究设计利用休眠方法使胶囊在胃及小肠内休眠一段时间,以留出充足的时间让其在结肠内运行,但用这种方法检查结肠却使胶囊内镜失去主要检查小肠的功用。

示,组间比较用 $t$ 检验,样本率检验采用方差分析, $P<0.05$ 为有统计学意义, $P<0.01$ 为有显著统计学意义。

## 2 结果

第1组胶囊在食管、胃及小肠运行时间为 $4\pm 0.3$  h,在结肠内工作时间为 $4\pm 0.9$  h,39例中4例到达直肠,对结肠检查有效率10.3%,余35例停留于回盲部未能到达结肠其他部位;在结肠回盲部检查出息肉2例,对结肠疾病检查阳性率为5.1%。第2组胶囊在食管、胃及小肠运行时间为 $4\pm 0.8$  h,在结肠内工作时间为 $5\pm 0.7$  h;进食刺激后结肠运动加剧,37例胶囊有16例到达直肠,3例到达横结肠,对结肠检查有效率51.4%,18例在回盲部至升结肠处运行;检查到结肠息肉4例,结肠炎症2例,孤立溃疡1例,对结肠疾病检查阳性率为18.9%。两组胶囊内镜结肠运行时间和疾病检查阳性率差别有统计学意义( $P<0.05$ ),对结肠检查有效率差别有显著统计学意义( $P<0.01$ )。

## 3 讨论

自以色列2000年开发出胶囊内镜以来,胶囊内镜已渐广泛应用于临床<sup>[1-5]</sup>。我国自行生产研制的胶囊内镜也已应用于临床,并可控制拍照速度与灯光亮度<sup>[6-8]</sup>。一直以来,胶囊内镜主要应用于小肠检查<sup>[9-10]</sup>。因其对胃及食管的检查不够全面,只能观察到部分胃黏膜<sup>[11-14]</sup>。对于结肠的检查,胶囊内镜常常力不能及,一方面由于胶囊内镜到达结肠时已经耗尽电源,不能继续工作<sup>[15-17]</sup>;另一方面胶囊到达回盲部后,可能是结肠肠腔较大且胶囊于回盲部到升结肠是逆重力作用运行的原因而致胶囊难以向上运行到升结肠,加上清肠、禁食后结肠运动频率减少,因此胶囊停留于回盲部时间较长,不能继续前进,根本就不能观察到结肠的其他部分。有研究设计利用休眠方法使胶囊在胃及小肠内休眠一段时间,以留出充足的时间让其在结肠内运行<sup>[18]</sup>,但用这种方法检查结肠却使胶囊内镜失去主要检查小肠的功用。我们在临床使用胶囊内镜过程中发现大部分胶囊工作时间均超过8 h,如果充分利用其拍摄速度的控制及光强度的调节,则工作时间可达10 h,同时我们注意到大部分患者胶囊从咽入口到回盲部运行时间为4 h左右,则胶囊在结肠内运行时间可达6 h。因此我们设计上述方法,使胶囊在结肠运行避免逆重力作用,并有充分的时间在结肠内运行,希望在胶囊内镜充分检

查小肠的同时,能尽可能完成结肠检查。从上述结果看,体位控制组对结肠检查的有效率及对结肠疾病检出的阳性率均高于对照组。

我们体会到在检查过程中,提高胶囊工作时间是结肠检查成功较为关键的一步,当胶囊在胃内时,大都停留于胃窦幽门前区,此时反复大量拍摄照片没有多大意义,因此我们通过工作站发送命令,使胶囊保持较慢的拍照频率及较低的灯光亮度。如果胶囊在胃内停留30 min仍未进入十二指肠,我们给予肌注甲氧氯普胺10 mg,并保持右倾30度的体位,促进胶囊尽快进入十二指肠。从本组病例看,所有患者吞服胶囊后进入十二指肠的平均时间约1 h,这为胶囊在小肠、结肠内运行提供较多的时间。本组病例在小肠内运行平均时间约3 h。体位控制组胶囊到达回盲部仍有5-6 h的工作时间,当胶囊进结肠后,我们采用平卧体位,并抬高臀部,这样使胶囊在结肠回盲部处向升结肠运行由逆重力变为顺重力,有利于胶囊尽快向上运行。另一方面,胶囊内镜检查过程中,因怕进食影响观察常要求患者禁食,这时结肠的运动常较弱,也影响到胶囊在结肠内的运行。但我们观察到,当胶囊进入结肠后,进食食物不会赶上胶囊而影响观察。但进食后可刺激各种结肠运动,有利于胶囊在结肠内运行。从上述结果看,胶囊进入结肠后给予患者进食确实起到一定的促进胶囊在结肠内运行的作用,提高胶囊内镜对结肠疾病的检出率。同时,胶囊内镜要有比较满意的检查效果,良好的肠道准备非常重要,在通常的肠道准备方案中结肠常有较多浑浊的粪水影响观察,我们采用潘泻叶提前一晚给以预清肠,第2天清晨再服复方聚乙二醇电解质散2盒,检查前30 min服用西甲硅油20 mL,这样起到了良好的清肠作用,为满意的检查提供基础。

尽管我们采用上述方法,在胶囊内镜检查结肠方面的探讨取得一定的效果,但结肠检查成功率仍较低,仍有待于进一步的研究,以更好地发挥胶囊内镜在整个消化系检查中的作用。

## 4 参考文献

- 1 Iddan G, Meron G, Glukhovskiy A, Swain P. Wireless capsule endoscopy. *Nature* 2000; 405: 417
- 2 Rey JF, Ladas S, Alhassani A, Kuznetsov K. European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE). Video capsule endoscopy: update to guidelines (May 2006). *Endoscopy* 2006; 38: 1047-1053
- 3 Pennazio M, Eisen G, Goldfarb N. ICCE consensus for obscure gastrointestinal bleeding. *Endoscopy*

- 2005; 37: 1046-1050
- 4 Kavin H, Berman J, Martin TL, Feldman A, Forsey-Koukol K. Successful wireless capsule endoscopy for a 2.5-year-old child: obscure gastrointestinal bleeding from mixed, juvenile, capillary hemangioma-angiomatosis of the jejunum. *Pediatrics* 2006; 117: 539-543
- 5 杨伟昂, 王炳周, 吴灵飞. 胶囊内镜临床应用新进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 4081-4087
- 6 张齐联, 年卫东, 王化虹, 赵晓晏, 吴咏冬, 沈薇. OMOM胶囊内镜临床应用的初步评价. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 86-89
- 7 王雷, 李宜辉, 达四平, 赵晓晏. 国产胶囊内镜OMOM临床应用的进一步研究. 中华医学杂志 2006; 86: 421-423
- 8 Li CY, Zhang BL, Chen CX, Li YM. OMOM capsule endoscopy in diagnosis of small bowel disease. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9: 857-862
- 9 褚行琦, 周翠萍, 熊元治, 王建云, 马颖才, 杨永耿, 杨桂英, 沈有秀, 马丽莉, 杜娟. 胶囊内镜临床应用37例分析. 中华消化内镜杂志 2003; 8: 237-239
- 10 王琳, 任建林. 胶囊内镜的临床使用价值. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3226-3228
- 11 O'Loughlin C, Barkin JS. Wireless capsule endoscopy in the evaluation of the esophagus. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 210-212
- 12 Lapalus MG, Dumortier J, Fumex F, Roman S, Lot M, Prost B, Mion F, Ponchon T. Esophageal capsule endoscopy versus esophagogastroduodenoscopy for evaluating portal hypertension: a prospective comparative study of performance and tolerance. *Endoscopy* 2006; 38: 36-41
- 13 Ramirez FC, Hakim S, Tharalson EM, Shaukat MS, Akins R. Feasibility and safety of string wireless capsule endoscopy in the diagnosis of esophageal varices. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1065-1071
- 14 Bhuket T, Takami M, Fisher L. The use of wireless capsule endoscopy in clinical diagnostic gastroenterology. *Expert Rev Med Devices* 2005; 2: 259-266
- 15 蔡华容, 刘红专, 周雪梅. 17例无绳胶囊内镜检查临床分析. 西南军医 2006; 8: 23-24
- 16 Rondonotti E, Herrerias JM, Pennazio M, Caunedo A, Mascarenhas-Saraiva M, de Franchis R. Complications, limitations, and failures of capsule endoscopy: a review of 733 cases. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 712-716; quiz 752, 754
- 17 Ben-Soussan E, Savoye G, Antonietti M, Ramirez S, Lerebours E, Ducrotte P. Factors that affect gastric passage of video capsule. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 785-790
- 18 Sieg A, Friedrich K, Sieg U. Is PillCam COLON capsule endoscopy ready for colorectal cancer screening? A prospective feasibility study in a community gastroenterology practice. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 848-854

## ■同行评价

本研究选题实用, 对胶囊内镜检查有借鉴和指导意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 2009-07-08)



## 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!

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

曹志成 英国生物医学科学研究所院士

香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

迟宝荣 教授

吉林大学第一医院消化内科

崔云甫 教授

哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

范建高 教授

上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

范学工 教授

中南大学湘雅医院感染病科

房林 副教授

同济大学附属上海市第十人民医院普外科

戈之铮 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

管冬元 副教授

上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

郭晓钟 教授

中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

韩天权 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

胡和平 教授

中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆医院消化科

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

蓝宇 教授

北京积水潭医院消化科

李军祥 教授

北京中医药大学附属东方医院消化内科

梁力建 教授

中山大学附属第一医院肝胆外科

刘平 教授

南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)肿瘤科

刘勇钢 副主任医师

天津市传染病医院病理科

欧希龙 副教授

东南大学中大医院消化科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化内科

邵先玉 主任医师

泰山医学院附属医院消化内科

田字彬 教授

青岛大学医学院附属医院消化内科

王凤山 教授

中国医科大学附属第一医院肝胆外科

王鲁 副教授

复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

宣世英 教授

山东省青岛市市立医院肝病内科

叶红军 主任医师

广东省北京大学深圳医院消化内科

于则利 教授

首都医科大学附属北京同仁医院外科

郑鹏远 教授

郑州大学第二附属医院消化科

周霞秋 教授

上海瑞金医院感染科