

CT结肠造影的应用现状及前景

周碧, 程英升, 赵俊功

周碧, 赵俊功, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海交通大学影像医学研究所 上海市 200233

程英升, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心 上海市 200072

程英升, 教授, 主任医师, 主要从事胃肠影像诊断学和血管与介入放射学研究。

作者贡献分布: 本文写作由周碧完成; 指导及审校由程英升与赵俊功完成。

通讯作者: 程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心, cjr.chengysh@vip.163.com

电话: 021-66301136

收稿日期: 2009-07-24 修回日期: 2009-08-24

接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-08-28

Current status and future prospects of the clinical application of computed tomography colonography

Bi Zhou, Ying-Sheng Cheng, Jun-Gong Zhao

Bi Zhou, Jun-Gong Zhao, Department of Radiology, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University; Institute of Medical Imaging, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Ying-Sheng Cheng, Medical Imaging Center, the Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

Correspondence to: Professor Ying-Sheng Cheng, Medical Imaging Center, the Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China. cjr.chengysh@vip.163.com

Received: 2009-07-24 Revised: 2009-08-24

Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-08-28

Abstract

Computed tomography colonography (CTC) is a recently developed technique for colonic and rectal diseases. After using the multi-slice spiral CT (MSCT) to rapidly scan the aerated colon and rectum, the original images are post-processed using advanced imaging software to acquire a series of reconstruction images. Possessing the advantages of simpleness, rapidness, safety and noninvasiveness, CTC is more easily accepted by patients. As MSCT technology and computed software are constantly being improved, the image quality and diagnostic reliability of CTC have been enhanced greatly. CTC not only has high sensitivity and specificity for detecting polyps over one centimeter but also shows clear advantage in accurate preoperative diagnosis

and staging of colorectal carcinoma.

Key Words: Computed tomography colonography; Colorectal carcinoma; Colorectal polyps

Zhou B, Cheng YS, Zhao JG. Current status and future prospects of the clinical application of computed tomography colonography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2439-2443

摘要

CT结肠造影(computed tomography colonography, CTC)为新近发展起来地结直肠癌病变检查手段, 是用多排螺旋CT技术将充气扩张的全结肠薄层扫描后的原始数据经相应的计算机软件处理后获得的一系列重建图像。因其简单、快速、安全、非侵入性等优点, 易于被患者接受。随着多层螺旋CT(multi-slice spiral computed tomography, MSCT)的应用和计算机软件不断改进, CTC的图像质量和分析能力有了明显改善, CTC对1 cm以上息肉有很高的敏感性和特异性, 且在结直肠癌的准确诊断和正确的术前分期中显示了明显的优势。

关键词: CT结肠造影; 结直肠癌; 结直肠息肉

周碧, 程英升, 赵俊功. CT结肠造影的应用现状及前景. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2439-2443

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2439.asp>

0 引言

CT结肠造影(computed tomography colonography, CTC)是将多排螺旋CT技术(4排以上)和相应的计算机软件结合, 对全结肠薄层扫描后的数据资料进行二维和三维重建, 在较大范围内显示结肠结构性病变的技术^[1]。因其操作简单、扫描成像快捷、安全无痛苦、患者耐受性好、检出率高以及并发症少等优点, 在结肠疾病的检测和诊断中发挥着越来越重要的作用^[2-6]。1994年, CTC在23届世界胃肠放射学年会上首次展现后, 立即受到放射界和医学界的重视, 近十几年来许多学者对此进行了动物实验及临床研究^[7-10], 目前该技术相对较成熟并日益普及。本文归纳

■背景资料

CT结肠造影(CTC)是将多排螺旋CT技术和相应的计算机软件结合, 对充气扩张的全结肠薄层扫描后的数据资料进行各种后处理, 在较大范围内显示结肠结构性病变的技术。因其操作简单、扫描成像快速、患者耐受性好、检出率高及并发症少等优势, 在结肠疾病的诊断中发挥着越来越重要的作用。

■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; 王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

■研发前沿

随着CT扫描设备和计算机技术的迅速发展,许多新技术如:数字减影肠道清洁术、异物及粪便电子标记、自动寻找息肉的计算机软件等正逐渐用于CTC检查中,成为CTC检查的研究热点。

国内外文献资料对CTC的检查方法、图像后处理、临床应用现状及前景作一综述。

1 检查方法

1.1 肠道准备 良好的肠道准备对于获得高质量CTC图像十分重要,一般要求肠道清洁、干燥、充分扩张,肠腔内尽可能少的液体和粪便,以降低诊断的假阳性率和假阴性率^[2,7-8]。国内一般于检查前2 d无渣饮食或少渣饮食,检查前1 d流质饮食,检查前当晚口服20%甘露醇500 mL配加5%葡萄糖1000 mL。也有检查前晚口服硫酸镁50-100 g,并饮水1000-2000 mL。国外多于检查前1 d口服4 L稀释的聚乙二醇电解质溶液^[11-12],或磷酸苏打溶液:45 mL亚硫酸钠,加服4片比沙可啶缓泻片(便塞停)以及1片比沙可啶栓剂^[13-17]。Macari *et al*^[14]研究发现,口服磷酸苏打溶液可使结肠黏膜清洁的同时变干燥,对比聚乙二醇电解质溶液能明显减少肠腔残留液体,更有利于CTC检查。

研究表明扫描前5-10 min肌肉注射解痉药(如654-2 10-20 mg或胰高血糖素1 mg),可以降低胃肠道张力,抑制肠蠕动,减轻肠痉挛,改善肠道扩张,从而提高图像质量^[18]。因此,无禁忌证患者应尽量使用平滑肌松弛剂改善图像质量。CT扫描前应经肛门注入足量气体使肠壁充分扩张舒展,并形成强对比密度差,可提高CTC检查的敏感性^[19]。一般根据患者的耐受程度,左侧卧位,经直肠导管(最好为带气囊导管)注入空气1000-2000 mL,直至患者有明显腹胀感,可根据CT定位扫描图像确认肠腔气体充盈程度。有报道^[19]称注入CO₂优于空气,可减少肠道痉挛。

1.2 扫描方法 联合应用仰卧位和俯卧位^[20],使肠腔内残留的粪便、液体及肠管内气体质量新分布,有利于萎陷肠管的复张,而且容易区分粪便和息肉样病变,从而大大增加CTC检查敏感度,减少假阳性的发生。Fletcher *et al*^[21]研究发现,仰卧位加俯卧位扫描后CTC对>1.0 cm息肉的敏感性由70%上升至85%,对0.5-1.0 cm息肉的敏感性由75%上升至88%。扫描参数一般采用管电压120 kV,管电流50-100 mA,矩阵512×512,FOV 35-40 cm,螺距1.5-2.0,扫描层厚3.0 mm,重建间隔1.25-2.0 mm。扫描范围包括直肠、盲肠和整个结肠,也可以根据解决问题的需要扫描特定部分。扫描时嘱患者屏气,以减少呼吸伪影。

1.3 图像后处理

1.3.1 多平面重建(multiplanar reformation, MPR):

将原始容积数据经小间隔重建处理,然后利用计算机处理软件获得任意层厚的多方位(冠状位、矢状位及任意角度)的二维重建图像,可显示肠腔内、外及肠壁的结构,且用曲线法将结肠拉直,并可测量病变的长度及到痔环的距离,有助于指导结肠癌手术计划的制订。

1.3.2 CT仿真结肠镜(CT virtual colonoscopy, CTVC): 使用专门的软件,利用影像后处理功能可在任意CT断面上进入任何肠腔,形成模拟内镜影像,向头端或尾端方向,在腔内循腔道“漫游”,显示该节段内肠腔的内部结构,并赋以伪彩色。CTVC是把观察点置于肠腔内,能更直观地从任意方向观察病变,类似于肠镜检查。

1.3.3 表面遮盖显示(shaded surface display, SSD): SSD可显示整个结肠外形及病变肠管的狭窄,并结合切割法较好地显示病变向肠腔内突出的情况,类似于单对比结肠造影检查。该技术快速简便,但被观察物表面下方的结构缺乏解剖细节。

1.3.4 透明显示: 该技术是将透视法与容积再现技术结合起来,把视点置于充气结肠腔内,建成自内部观察结构的三维图像。克服SSD影像对病变的遮盖,能清楚显示管腔狭窄、肠壁增厚及肠腔内软组织肿块,产生类似结肠气钡双重造影效果,并通过三维旋转可从任意方向观察病变。

2 CTC的临床应用

2.1 对息肉的诊断 息肉是突出于黏膜面隆起性病变的总称,其中腺瘤性息肉被公认为结肠癌最主要的癌前病变,且腺瘤性息肉愈大,数目愈多,恶变机率就愈大。直径>10 mm的息肉恶变率为10%,>20 mm的息肉恶变率为30%,而<5 mm的息肉恶变率小于0.1%^[10],故对大于10 mm息肉的预防性摘除可大大增加结肠癌患者的生存率。因此,CTC对息肉的诊断价值,成为众多学者研究的重点。Iannaccone *et al*^[22]在CTC与常规结肠镜(conventional colonoscopy, CC)对比研究中发现:CTC对息肉的敏感性分别为100%(≥10 mm),83.3%(6-9 mm)及51.3%(≤5 mm)。Sosna *et al*^[23]对1324名患者总计1411枚息肉进行统计学分析得出:CTC对息肉的敏感性为95%(≥10 mm),85%(6-9 mm)及65%(≤5 mm)。Pickhardt *et al*^[24]报道:CTC对息肉的敏感性为97.4%(≥10 mm),95%(≥8 mm)及84.6%(≥6 mm),特异性分别为96.0%,92.2%及79.6%。Macari *et al*对68例无症状的普通人群CTC和CC检查结果对比认为:CTC对直径≥10 mm息肉的敏感度和特异度很高,真

阴性率也较高(达到89.7%), 而对于直径 <5 mm和6-9 mm的息肉不够理想, 敏感度分别为11.5%和52.9%^[25-26]。总体而言, CTC对检测恶变率较高的息肉(直径 ≥ 10 mm)具有良好的价值, 但对小腺瘤(≤ 5 mm)及扁平息肉的发现较困难^[27-29]。同时, 也应注意在CTC检查结肠息肉时, 由于肠道充气不足、投影错误、扁平息肉或呼吸运动伪影等原因可能会引起误诊偏差, 造成假阳性结果偏高。此外, 需要和正常结肠结构、粪便、脂肪瘤等相鉴别。

2.2 对结肠癌的诊断 癌表现为腔内不对称的或环周性的肠壁增厚或大的息肉样充盈缺损。CTC各种成像方法综合使用能够准确定位结肠癌的部位, 清晰显示组织密度、肿瘤大小、侵犯肠壁的范围和相邻脏器是否受累、腹腔淋巴结及远处脏器是否转移^[30-33](这点明显优于传统结肠镜检查), 为肿瘤进行准确的分型、分期提供依据。有文献报道^[34]称CTC对明显的结肠癌阳性检出率为100%, 且无假阳性和假阴性。

结肠癌术后患者一般主张每6-9 mo随访1次, 以尽早发现复发以及新生的小病灶, 结肠镜由于其痛苦性而使多数人拒绝, CTC成为重要的替代者。有文献报道^[35]增强CTC对浸润性结肠癌术后局部复发的诊断准确率为94%。

2.3 对传统结肠镜失败患者的诊断 由于部分患者一般情况差, 无法忍受结肠镜的痛苦或是结肠腔严重狭窄均能导致结肠镜检查失败, 有5%-15%的患者在结肠镜检查时不能完整观察整个结肠, 而CTC检查可以弥补结肠镜失败的不足。Fenlon *et al*^[36-37]对29例梗阻性肠癌的患者进行了CTC检查, 结果发现17个梗阻远端肠袢并发新生物, 包括2个腺瘤和5个 >1.0 cm的息肉。Royster *et al*^[38]研究了20例患者CTC与传统结肠镜的结果显示: CTC能检查全部患者的完整肠腔, 而传统结肠镜仅能完整检查12例患者的肠腔。Neri *et al*^[39]对34例结肠镜检查失败的患者进行CT结肠成像, 显示全部病例均能顺利完成检查, 结肠镜漏检10个肿瘤和3个伴发肿瘤, CTC全部检测出。由于结肠癌不全性肠管狭窄行结肠镜检查的检测敏感度和特异度仅为56%和92%, 而CTC分别为100%和90%, 明显优于结肠镜。因此CTC技术是一项对阻塞性结肠癌术前评估整个结肠的有效方法。

2.4 对结肠外病变的诊断价值 CTC不仅可以用于检查结肠内病变的情况, 而且还可评估结肠外组织和邻近的腹腔、盆腔器官, 这是纤维结

肠镜及钡灌肠等不具有的优点。诸如: 肝脏、卵巢、淋巴结等组织器官有无转移; 腹主动脉瘤、肾癌、囊肿等伴发疾病, 有些发现具有重要临床意义, 影响治疗计划和治疗方案。Hara *et al*^[40]对264例患者行CTC检查, 约50%的患者发现了肠外病变。其中有重要临床意义的占11%, 包括2例 >4 cm的腹主动脉瘤, 2例无症状的肾上腺腺瘤和肠管腹股沟疝。其他的发现如不定性的肺结节、肾上腺肿物、气胸等。Hellström *et al*^[41]研究发现85%病例有结肠以外的额外所见, 其中23%的患者有重要所见, 13%的患者有自己所不知道的重要所见。这些结肠外病变的早期发现有助于患者的早期治疗, 同时也节约了患者的医疗费用。

2.5 对结肠癌普查的价值 对结肠癌发病高危人群进行早期筛查和干预, 可降低大肠癌的发生率及病死率。传统的大便潜血试验方法虽简单, 但检查敏感性和特异性均较低, 且受试验方法、样本留置、检测间隔时间等影响变异较大, 另外假阳性率较高, 普查价值不大。乙状结肠镜仅可对乙直肠部分作检测, 不能显示整个结肠, 并有10%-15%乙状结肠肿瘤漏诊, 且并发结肠穿孔率为1/20 000^[36,42]。结肠双对比造影操作复杂, 对操作者的经验、技巧要求较高, 且部分患者可有不适感以及结肠穿孔的危险。结肠镜检查准确性高, 可检查整个结肠, 同时进行活检和息肉摘除, 但检查费用高, 具有创伤性, 患者难以耐受, 有5%-15%患者行结肠镜检查失败, 且有结肠穿孔、息肉摘除后的出血等并发症。CTC对于发现恶变率高的息肉(≥ 10 mm)的敏感性和特异性均较高, 近乎可以和结肠镜媲美, 而且创伤小、无并发症危险, 检查过程快、作出结论快, 费用较低, 将其用于普查方法容易被患者接受, 但不能摘除息肉和对病变组织进行活检。从理论上讲, CTC较目前的其他结肠肠普查方法有明显的优势, 随着扫描和采集速度的提高、软件系统的改进等技术进展, CTC将会更加有效。德国已于2002-10实行结直肠癌的CTC筛查, 英国也有36%的单位可提供CTC检查。

3 CTC的优缺点

3.1 CTC的优点 (1)为非侵入性检查、检查方便快捷、耐受性好、患者乐于接受, 尤适用于年老体弱和有严重心、脑、肺部疾患不能耐受结肠镜者。(2)全结肠(自直肠至盲肠)的腔内检查成功率高(纤维内窥镜约为60-80%, CTC为90%),

■创新盘点

本文综述了CTC的基本操作方法、各种后处理方法, 以及在各种结肠病变中的诊断价值, 尤其是在结直肠癌普查及术前分期中的临床应用, 信息量较全面, 总结CTC的应用现状, 提出了其应用前景。

■应用要点

本文介绍并指出了CTC各种后处理图像的特点及优劣势,对放射科医生在观察不同病变及不同观察目的时选择恰当的后处理方法有一定帮助。

对梗阻性肠癌患者在内窥镜检查无法越过病变时段时,可显示狭窄上方肠腔情况^[27-28]。(3)利于观察结肠镜难以发现的盲区病变,包括结肠袋、结肠皱襞后方、结肠折曲处、回盲部等^[42]。(4)可评估结肠外组织和邻近的腹腔、盆腔器官情况。(5)对直径>1.0 cm大小的腺瘤诊断特异性和敏感性较高,可用于结肠癌的普查^[36,42-43]。(6)几乎无肠穿孔、出血等并发症。

3.2 CTC的缺点 (1)组织特异性较差,不能显示病变颜色,不能发现充血水肿等炎性病变。(2)影像分辨率不够,对直径<0.5 cm的病变及较平坦病变(病灶隆起≤2 mm)容易遗漏^[44-45]。(3)对肠道准备要求较高,粪渣残留、充气不足可造成误诊;患者呼吸、移动伪影可造成假象。(4)无法替代纤维结肠镜检查活检和息肉摘除功能。(5)具有一定的电离辐射性。

4 结论

与纤维结肠镜相比,CTC的应用还处于初级阶段,其检查的可行性、安全性和患者良好的顺应性已得到相当程度的肯定,但其深度及广度尚有待进一步探索和提高。近年来,随着CT扫描设备和计算机技术的飞速发展,计算机软件对异物、粪便的标记和电子净化技术的运用,自动寻找息肉软件的开发,我们有理由相信,CTC在结肠肿瘤的早期诊断中具有广泛的临床应用范围和令人振奋的发展前景。

5 参考文献

- Vos FM, van Gelder RE, Serlie IW, Florie J, Nio CY, Glas AS, Post FH, Truyen R, Gerritsen FA, Stoker J. Three-dimensional display modes for CT colonography: conventional 3D virtual colonoscopy versus unfolded cube projection. *Radiology* 2003; 228: 878-885
- Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ahlquist DA, Nelson H, Ehman RL, McCollough CH, Ilstrup DM. Detection of colorectal polyps by computed tomographic colography: feasibility of a novel technique. *Gastroenterology* 1996; 110: 284-290
- Johnson CD, Hara AK, Reed JE. Computed tomographic colography (Virtual colonoscopy): a new method for detecting colorectal neoplasms. *Endoscopy* 1997; 29: 454-461
- Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ahlquist DA, Nelson H, MacCarty RL, Harmsen WS, Ilstrup DM. Detection of colorectal polyps with CT colography: initial assessment of sensitivity and specificity. *Radiology* 1997; 205: 59-65
- Fenlon HM, Nunes DP, Clarke PD, Ferrucci JT. Colorectal neoplasm detection using virtual colonoscopy: a feasibility study. *Gut* 1998; 43: 806-811
- Vining DJ. Virtual endoscopy: is it reality? *Radiology* 1996; 200: 30-31
- Dachman AH, Lieberman J, Osnis RB, Chen SY, Hoffmann KR, Chen CT, Newmark GM, McGill J. Small simulated polyps in pig colon: sensitivity of CT virtual colography. *Radiology* 1997; 203: 427-430
- Hara AK, Johnson CD, MacCarty RL, Welch TJ, McCollough CH, Harmsen WS. CT colonography: single- versus multi-detector row imaging. *Radiology* 2001; 219: 461-465
- van Gelder RE, Venema HW, Serlie IW, Nio CY, Determann RM, Tipker CA, Vos FM, Glas AS, Bartelsman JF, Bossuyt PM, Laméris JS, Stoker J. CT colonography at different radiation dose levels: feasibility of dose reduction. *Radiology* 2002; 224: 25-33
- Beaulieu CF, Jeffrey RB Jr, Karadi C, Paik DS, Napel S. Display modes for CT colonography. Part II. Blinded comparison of axial CT and virtual endoscopic and panoramic endoscopic volume-rendered studies. *Radiology* 1999; 212: 203-212
- Edwards JT, Mendelson RM, Fritschi L, Foster NM, Wood C, Murray D, Forbes GM. Colorectal neoplasia screening with CT colonography in average-risk asymptomatic subjects: community-based study. *Radiology* 2004; 230: 459-464
- van Gelder RE, Birnie E, Florie J, Schutter MP, Bartelsman JF, Snel P, Laméris JS, Bonsel GJ, Stoker J. CT colonography and colonoscopy: assessment of patient preference in a 5-week follow-up study. *Radiology* 2004; 233: 328-337
- Fenlon HM, Ferrucci JT. Virtual colonoscopy: what will the issues be? *AJR Am J Roentgenol* 1997; 169: 453-458
- Macari M, Lavelle M, Pedrosa I, Milano A, Dicker M, Megibow AJ, Xue X. Effect of different bowel preparations on residual fluid at CT colonography. *Radiology* 2001; 218: 274-277
- Chen SC, Lu DS, Hecht JR, Kadell BM. CT colonography: value of scanning in both the supine and prone positions. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172: 595-599
- McFarland EG, Brink JA. Helical CT colonography (virtual colonoscopy): the challenge that exists between advancing technology and generalizability. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 549-559
- Macari M, Berman P, Dicker M, Milano A, Megibow AJ. Usefulness of CT colonography in patients with incomplete colonoscopy. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 561-564
- Taylor SA, Halligan S, Goh V, Morley S, Bassett P, Atkin W, Bartram CI. Optimizing colonic distention for multi-detector row CT colonography: effect of hyoscine butylbromide and rectal balloon catheter. *Radiology* 2003; 229: 99-108
- Macari M, Bini EJ. CT colonography: where have we been and where are we going? *Radiology* 2005; 237: 819-833
- Laks S, Macari M, Bini EJ. Positional change in colon polyps at CT colonography. *Radiology* 2004; 231: 761-766
- Fletcher JG, Johnson CD, Welch TJ, MacCarty RL, Ahlquist DA, Reed JE, Harmsen WS, Wilson LA. Optimization of CT colonography technique: prospective trial in 180 patients. *Radiology* 2000; 216: 704-711
- Iannaccone R, Catalano C, Mangiapane F, Murakami T, Lamazza A, Fiori E, Schillaci A, Marin

- D, Nofroni I, Hori M, Passariello R. Colorectal polyps: detection with low-dose multi-detector row helical CT colonography versus two sequential colonoscopies. *Radiology* 2005; 237: 927-937
- 23 Sosna J, Morrin MM, Kruskal JB, Lavin PT, Rosen MP, Raptopoulos V. CT colonography of colorectal polyps: a metaanalysis. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 181: 1593-1598
- 24 Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, Butler JA, Puckett ML, Hildebrandt HA, Wong RK, Nugent PA, Mysliwiec PA, Schindler WR. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med* 2003; 349: 2191-2200
- 25 Macari M, Megibow AJ. Pitfalls of using three-dimensional CT colonography with two-dimensional imaging correlation. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 176: 137-143
- 26 Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ehman RL, Ilstrup DM. Colorectal polyp detection with CT colonography: two- versus three-dimensional techniques. Work in progress. *Radiology* 1996; 200: 49-54
- 27 Macari M, Bini EJ, Jacobs SL, Naik S, Lui YW, Milano A, Rajapaksa R, Megibow AJ, Babb J. Colorectal polyps and cancers in asymptomatic average-risk patients: evaluation with CT colonography. *Radiology* 2004; 230: 629-636
- 28 Kay CL, Evangelou HA. A review of the technical and clinical aspects of virtual endoscopy. *Endoscopy* 1996; 28: 768-775
- 29 Kay CL, Kulling D, Hawes RH, Young JW, Cotton PB. Virtual endoscopy--comparison with colonoscopy in the detection of space-occupying lesions of the colon. *Endoscopy* 2000; 32: 226-232
- 30 孔祥林, 陈岩, 宋冰, 张文婧, 孙涛, 郝明利, 姜缤, 温连庆, 夏爽, 沈文. 应用螺旋CT结肠成像方法诊断结肠占位病变. *天津医药* 2005; 33: 240-241
- 31 孔祥林, 宋冰, 张文婧, 顾建华, 郝明利, 姜缤, 温连庆, 夏爽, 沈文. 螺旋CT结肠成像术在结肠癌分型中的应用. *天津医药* 2006; 34: 811-812
- 32 Nicholson FB, Barro JL, Bartram CI, Dehmeshki J, Halligan S, Taylor S, Kamm MA. The role of CT colonography in colorectal cancer screening. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2315-2323
- 33 Filippone A, Ambrosini R, Fuschi M, Marinelli T, Genovesi D, Bonomo L. Preoperative T and N staging of colorectal cancer: accuracy of contrast-enhanced multi-detector row CT colonography--initial experience. *Radiology* 2004; 231: 83-90
- 34 Morrin MM, Farrell RJ, Keogan MT, Kruskal JB, Yam CS, Raptopoulos V. CT colonography: colonic distention improved by dual positioning but not intravenous glucagon. *Eur Radiol* 2002; 12: 525-530
- 35 Fletcher JG, Johnson CD, Krueger WR, Ahlquist DA, Nelson H, Ilstrup D, Harmsen WS, Corcoran KE. Contrast-enhanced CT colonography in recurrent colorectal carcinoma: feasibility of simultaneous evaluation for metastatic disease, local recurrence, and metachronous neoplasia in colorectal carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 178: 283-290
- 36 Fenlon HM, McAneny DB, Nunes DP, Clarke PD, Ferrucci JT. Occlusive colon carcinoma: virtual colonoscopy in the preoperative evaluation of the proximal colon. *Radiology* 1999; 210: 423-428
- 37 Fenlon HM, Ferrucci JT. First International Symposium on Virtual Colonoscopy. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 565-569
- 38 Royster AP, Fenlon HM, Clarke PD, Nunes DP, Ferrucci JT. CT colonoscopy of colorectal neoplasms: two-dimensional and three-dimensional virtual-reality techniques with colonoscopic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 1997; 169: 1237-1242
- 39 Neri E, Giusti P, Battolla L, Vagli P, Boraschi P, Lencioni R, Caramella D, Bartolozzi C. Colorectal cancer: role of CT colonography in preoperative evaluation after incomplete colonoscopy. *Radiology* 2002; 223: 615-619
- 40 Hara AK, Johnson CD, MacCarty RL, Welch TJ. Incidental extracolonic findings at CT colonography. *Radiology* 2000; 215: 353-357
- 41 Hellström M, Svensson MH, Lasso A. Extracolonic and incidental findings on CT colonography (virtual colonoscopy). *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182: 631-638
- 42 Rubin GD, Beaulieu CF, Argiro V, Ringl H, Norbash AM, Feller JF, Dake MD, Jeffrey RB, Napel S. Perspective volume rendering of CT and MR images: applications for endoscopic imaging. *Radiology* 1996; 199: 321-330
- 43 Spinzi G, Belloni G, Martegani A, Sangiovanni A, Del Favero C, Minoli G. Computed tomographic colonography and conventional colonoscopy for colon diseases: a prospective, blinded study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 394-400
- 44 Rogalla P, Meiri N, Rückert JC, Hamm B. Colonography using multislice CT. *Eur J Radiol* 2000; 36: 81-85
- 45 Pescatore P, Glücker T, Delarive J, Meuli R, Pantoflickova D, Duvoisin B, Schnyder P, Blum AL, Dorta G. Diagnostic accuracy and interobserver agreement of CT colonography (virtual colonoscopy). *Gut* 2000; 47: 126-130

同行评价

本综述全面系统地介绍了CTC的原理、检查方法及临床应用,并客观地评价了其优缺点,使医务工作者可以较为全面地了解这一技术,对临床实践具有较好的指导意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

联合应用TGF- β 、TGF- β R siRNA对小鼠急性肝损伤TGF- β /Smad信号传导通路相关基因表达的抑制

黄顺玲, 谭德明, 张涛, 彭忠田, 孙克伟, 刘菲, 傅荣泉, 郭光辉

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化、肝癌的必经病理过程。体外研究和肝硬化动物模型研究表明, 乙型肝炎病毒和血吸虫均能促进TGF- β 表达, TGF- β /Smad信号传导通路是各种致病因子引发肝纤维化的主要的信号传导途径, 与肝纤维化的发生、发展密切相关。

黄顺玲, 谭德明, 刘菲, 中南大学湘雅医院感染病科 湖南省长沙市 410008

张涛, 孙克伟, 湖南中医药大学附一医院感染病科 湖南省长沙市 410011

彭忠田, 南华大学第一附属医院感染病科 湖南省衡阳市 421001

傅荣泉, 瑞安市人民医院 浙江省瑞安市 325200

郭光辉, 深圳市龙岗区中心医院 广东省深圳市 518116

黄顺玲, 主任医师, 主要研究病毒性肝炎和肝纤维化的发病机制、诊断和治疗。

湖南省科技厅基金资助项目, No. 06SK3003

作者贡献分布: 黄顺玲、谭德明及孙克伟对此文所作贡献均等; 此课题由黄顺玲、谭德明及孙克伟设计; 研究过程由黄顺玲、张涛、彭忠田、刘菲、傅荣泉及郭光辉操作完成; 数据分析由黄顺玲与张涛完成; 本论文写作由黄顺玲、谭德明及张涛完成。

通讯作者: 谭德明, 教授, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院感染病科, dmt2008@yahoo.com.cn

电话: 0731-84327221

收稿日期: 2009-06-15 修回日期: 2009-08-15

接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-08-28

Combined use of siRNAs specific for TGF- β 1, TGF- β 1 RI and TGF- β 1 RII synergistically inhibits the TGF- β /Smad signaling pathway in rats with acute liver injury

Shun-Ling Huang, De-Ming Tan, Tao Zhang, Zhong-Tian Peng, Ke-Wei Sun, Fei Liu, Rong-Quan Fu, Guang-Hui Guo

Shun-Ling Huang, De-Ming Tan, Fei Liu, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Tao Zhang, Ke-Wei Sun, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410011, Hunan Province, China

Zhong-Tian Peng, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Rong-Quan Fu, Ruian People's Hospital, Ruian 325200, Zhejiang Province, China

Guang-Hui Guo, Shenzhen Longgang Central Hospital, Shenzhen 518116, Guangdong Province, China

Supported by: the Foundation of Hunan Provincial Science & Technology Department, No. 06SK3003

Correspondence to: Professor De-Ming Tan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. dmt2008@yahoo.com.cn

Received: 2009-06-15 Revised: 2009-08-15

Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-08-28

■同行评议者

宣世英, 教授, 山东省青岛市市立医院肝病内科; 张绪清, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

combined use of small interfering RNAs (siRNAs) specific for transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) and transforming growth factor beta 1 receptors (TGF- β 1 RI and TGF- β 1 RII) on the TGF- β /Smad signaling pathway in rats with acute liver injury.

METHODS: Thirty rats were given two intraperitoneal injections of carbon tetrachloride (CCl_4 ; 6 mL/kg) to induce acute liver injury and initiate the TGF- β /Smad signaling pathway. The rats were then divided into five groups: TGF- β 1 siRNA intervention group (T), TGF- β 1 siRNA plus TGF- β 1 RI siRNA intervention group (T+R1), TGF- β 1 siRNA plus TGF- β 1 RII siRNA intervention group (T+R2), TGF- β 1 siRNA plus TGF- β 1 RI siRNA plus TGF- β 1 RII siRNA intervention group (T+R1+R2) and model control group (M). Serum samples were taken to determine serum ALT, AST and HA. The pathological changes in the liver were evaluated by HE staining. Quantitative detection of α -SMA, collagen I and III, TGF- β 1, Smad3, PCNA and TGF- α mRNAs was performed by RT-PCR. The expression of α -SMA, collagen I and III, TGF- β 1, Smad3, PCNA and TGF- α in the liver was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: After acute liver injury rats were transfected with plasmids harboring specific siRNA, serum ALT, AST and HA levels compared with that of model control group decreased significantly (ALT: 592.80 ± 98.4 IU/L, 440.80 ± 91.9 IU/L, 461.61 ± 120.0 IU/L, 284.00 ± 49.0 IU/L vs 949.5 ± 196.1 IU/L; AST: 686.80 ± 112.3 IU/L, 591.00 ± 99.87 IU/L, 607.50 ± 84.8 IU/L, 398.30 ± 61.9 IU/L vs 985.67 ± 274.8 IU/L and HA: 5682.80 ± 824.14 $\mu\text{g/L}$, 2871.26 ± 394.68 $\mu\text{g/L}$, 3004.29 ± 354.25 $\mu\text{g/L}$, 1982.12 ± 402.71 $\mu\text{g/L}$ vs 8444.65 ± 812.15 $\mu\text{g/L}$, respectively; all $P < 0.05$). The best effect was achieved in the T+R1+R2 group. Compared with nonspecific siRNA transfection, siRNAs specific for TGF- β 1, TGF- β 1 RI and TGF- β 1 RII could significantly inhibit the expression of TGF- β 1, Smad3, α -SMA, collagen I and collagen III mRNAs in the liver (all $P < 0.05$). The best effect was achieved in the T+R1+R2

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of

group. Similar results were observed for protein expression.

CONCLUSION: Combined use of siRNAs specific for TGF- β 1, TGF- β 1 RI and TGF- β 1 RII can synergistically inhibit the TGF- β /Smad signaling pathway and reduce liver injury in rats with acute liver injury.

Key Words: siRNA; Hepatic fibrosis; Transforming growth factor- β 1; Transforming growth factor- β 1 receptor I; Transforming growth factor- β 1 receptor II

Huang SL, Tan DM, Zhang T, Peng ZT, Sun KW, Liu F, Fu RQ, Guo GH. Combined use of siRNAs specific for TGF- β 1, TGF- β 1 RI and TGF- β 1 RII synergistically inhibits the TGF- β /Smad signaling pathway in rats with acute liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2444-2450

摘要

目的: 探讨TGF- β 1、TGF- β 1R siRNA联合应用对小鼠急性肝损伤TGF- β /Smad信号传导通路的干预作用。

方法: 清洁级健康大鼠36只分为2组: 正常对照组($n = 6$, 注射生理盐水)与实验组($n = 30$)。实验组动物在实验第1天和第5天腹腔注射CCl₄花生油溶液6 mL/kg, 造成急性肝损伤并启动TGF- β /Smad信号传导通路。实验分为TGF- β 1 shRNA干预组(T); TGF- β 1 siRNA+T β R I shRNA干预组(T+R1); TGF- β 1 shRNA+T β R II siRNA干预组(T+R2); TGF- β 1 siRNA+T β R I shRNA+T β R II shRNA干预组(T+R1+R2)和模型对照组(M)。观察各实验组血清ALT、AST、HA; 肝组织学RT-PCR和免疫组织化学检测肝组织中 α -SMA、COL-1、COL-3、TGF- β 1、Smad3、PCNA和TGF- α mRNA及蛋白的表达。

结果: 经shRNA质粒DNA干预的4个治疗组与模型组比较, 均能显著降低血清ALT、AST及HA的水平(ALT: 592.80 \pm 98.4 IU/L, 440.80 \pm 91.9 IU/L, 461.61 \pm 120.0 IU/L, 284.00 \pm 49.0 IU/L vs 949.5 \pm 196.1 IU/L; AST: 686.80 \pm 112.3 IU/L, 591.00 \pm 99.87 IU/L, 607.50 \pm 84.8 IU/L, 398.30 \pm 61.9 IU/L vs 985.67 \pm 274.8 IU/L; HA: 5682.80 \pm 824.14 μ g/L, 2871.26 \pm 394.68 μ g/L, 3004.29 \pm 354.25 μ g/L, 1982.12 \pm 402.71 μ g/L vs 8444.65 \pm 812.15 μ g/L, $P < 0.05$)的测定值; 4个治疗组两两比较, T+R1+R2组疗效明显高于其他3组($P < 0.01$)。与模型组比较, shRNA质粒DNA干预能明显抑制TGF- β 1, Smad3, α -SMA, COL-1及COL-3的mRNA与蛋白的表达(均

$P < 0.05$)。其抑制效果以T+R1+R2组最明显。对蛋白水平表达的作用也有相似趋势。

结论: 针对TGF- β R I 及其 I 型受体(T β R I)、II 型受体(T β R II)的siRNA联合治疗对小鼠肝损伤中TGF- β /Smad信号传导通路相关的基因表达的抑制具有协同作用。

关键词: 小干扰RNA; 肝纤维化; 转化生长因子- β 1; 转化生长因子- β 受体 I; 转化生长因子- β 受体 II

黄顺玲, 谭德明, 张涛, 彭忠田, 孙克伟, 刘菲, 傅荣泉, 郭光辉. 联合应用TGF- β 、TGF- β R siRNA对小鼠肝损伤TGF- β /Smad信号传导通路相关基因表达的抑制. *世界华人消化杂志* 2009; 17(24): 2444-2450
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2444.asp>

0 引言

我国是慢性病毒性肝炎(包括乙型和丙型肝炎)高发地区, 慢性肝炎常伴有肝纤维化, 他是各种慢性肝病发展为肝硬化、肝癌的必经病理过程^[1]。体外研究和肝硬化动物模型研究表明乙型肝炎病毒和血吸虫均能促进转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)表达^[2-4], TGF- β /Smad信号传导通路与肝纤维化的发生、发展密切相关, 是肝纤维化发生的主要信号传导途径^[5-8]。利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)高效沉默靶基因的原理, 阻断纤维化的关键环节TGF- β /Smad信号传导通路及相应的调节基因的表达, 应能够高效阻断或逆转肝纤维化。本文联合应用特异性沉默TGF- β 1和TGF- β 1受体(transforming growth factor-beta1 receptor, TGF- β 1R)的shRNA治疗肝纤维化早期的大鼠模型, 探讨这些特异性shRNA单独和联合应用对TGF- β /Smad信号传导通路及相应的调节基因的表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康SD大鼠36只, 体质量300 \pm 50 g, 雌雄各半, 由湖南农业大学动物实验中心提供(合格证号sck(湘)2003-0003); 表达TGF- β 1, T β R I 和T β R II siRNA质粒DNA: 采用pGenesil-1 vector与目的基因(表1)重组, 由武汉晶赛生物工程技术有限公司构建重组质粒TGF- β 1/pGenesil-1, T β R I /pGenesil-1和T β R II shRNA/pGenesil-1以及placeb/pGenesil-1; 分析纯CCl₄, 无水乙醇(湖南师大化学试剂厂); Regaud苏木素染液, 酸性品红染液(BASO公司); 兔抗大

■ 研发前沿

siRNA技术是基因沉默新的基因抑制治疗技术, 被证明能阻止基因过度表达所致的病理生理反应, 应用TGF- β 1 siRNA能减轻肺和肾纤维化。

■相关报道

有研究表明能对肝纤维化治疗有效的药物,治疗后显示疗效均伴有TGF- β 1表达的下落,一些体外和肝纤维化动物模型的研究表明阻断TGF- β 1信号传导,包括药物,基因治疗(反义寡核苷酸技术,缺陷性TGF- β 1受体基因表达产物等)均能抑制TGF- β 1表达,阻断TGF- β 1信号传导,伴随着肝脏的细胞外基质减少和肝纤维化的病理学改变。

鼠TGF- β 1、Smad3、COL-1、COL-3、TGF- α 、PCNA亲和抗体(武汉博士德生物工程有限公司);抗鼠 α -SMA(DATA SHEET公司);SABC试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);RT-PCR引物(表2,日本TaKaRa生物技术有限公司合成);RT-PCR反应体系(Promega, USA)。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药:清洁级健康大鼠36只分正常对照组($n = 6$,注射生理盐水)和实验组($n = 30$)。实验组动物在实验当天和第5天腹腔注射CCl₄花生油溶液6 mL/kg,造成急性肝损伤并启动TGF- β /Smad信号传导通路。在完成第2次CCl₄腹腔注射后,尾静脉注射shRNA质粒DNA溶液50 μ g/2 mL;实验组分为:TGF- β 1 shRNA干预组(T);TGF- β 1 siRNA+T β R I shRNA干预组(T+R1);TGF- β 1 shRNA+T β R II siRNA干预组(T+R2);TGF- β 1 siRNA+T β R I shRNA+T β R II shRNA干预组(T+R1+R2)和模型对照组(M):注射placeb/pGenesil-1质粒DNA。尾静脉注射shRNA质粒DNA溶液48 h后处死动物,取血清和肝组织待检测。

1.2.2 血清ALT、AST和血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)检测和肝组织病理学观察:血清ALT、AST检测采用全自动生化分析仪测定;HA检测采用放射免疫分析法(RIA)检测;肝组织标本用100 g/L中性甲醛固定,石蜡包埋,按常规方法进行组织病理学检查。

1.2.3 RT-PCR检测肝组织中 α -SMA、COL-1、COL-3、TGF- β 1、Smad3、PCNA和TGF- α mRNA的表达:将超低温冰箱冷冻的肝组织100 mg,放入经DEPC处理过的玻璃匀浆器中,组织磨碎后加1 mL TRIzol将组织充分匀浆,并提取肝组织总RNA。应用M-MLV RT反应系统和Oligo(dT)合成cDNA。然后经特异性引物聚合酶链反应(PCR)扩增相应的cDNA。PCR条件:预变性95 $^{\circ}$ C, 5 min;变性94 $^{\circ}$ C, 30 s,退火58 $^{\circ}$ C, 30 s,延伸72 $^{\circ}$ C, 30 s,共30个循环,最后72 $^{\circ}$ C, 10 min。PCR产物电泳并经凝胶电泳处理系统扫描半定量分析。用凝胶图像分析系统检测灰度值。

1.2.4 免疫组织化学检测肝组织中 α -SMA、COL-1、COL-3、TGF- β 1、Smad3、PCNA和TGF- α 蛋白的表达:经100 g/L甲醛液固定,石蜡包埋肝组织标本常规切片、脱蜡、30 mL/L双氧水溶液灭活内源性过氧化物酶和经正常山羊血清封闭液封闭。处理过的肝组织切片先后与抗原特异性一抗(α -SMA、COL-1、COL-3、

TGF- β 1、Smad3、PCNA和TGF- α), 37 $^{\circ}$ C, 孵育30 min后4 $^{\circ}$ C过夜;生物素二抗37 $^{\circ}$ C, 恒温30 min;亲和素一过氧化物酶溶液37 $^{\circ}$ C, 20 min;DAB显色和苏木素复染;中性树胶封片镜检,并用全自动图像分析仪计算 α -SMA、COL-1、COL-3、TGF- β 1、Smad3、PCNA和TGF- α 的阳性信号和相对含量。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件。先进行正态性分布及方差齐性检验,若呈正态分布,方差齐,各组之间采用多重比较:各治疗组分别与模型组比较时采用Dunnett法;各治疗组间比较采用Sidak法。方差不齐者进行H检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 各实验组动物血清ALT、AST及HA测定结果 模型组与空白对照组比较,ALT(949.5 ± 196.1 IU/L vs 52.7 ± 11.0 IU/L)、AST(985.67 ± 274.8 IU/L vs 108.8 ± 20.4 IU/L)及HA(8444.65 ± 812.15 μ g/L vs 111.45 ± 24.24 μ g/L)测定值的差异有显著性意义($P < 0.01$)。经shRNA质粒DNA干预的4个治疗组与模型组比较,均能显著降低血清ALT($P < 0.05$)、AST($P < 0.05$)及HA($P < 0.05$)的测定值(表3);4个治疗组两两比较,T+R1+R2组疗效明显高于其他3组,T组疗效最差($P < 0.05$,表3),T+R1组与T+R2组疗效差异没有统计学意义($P > 0.05$,表3)。

2.2 肝组织病理学改变 各治疗组相对模型组,肝组织损伤及纤维增生情况明显减轻,可见肝细胞再生及胆小管的增生,肝细胞病变以胞质疏松、脂肪变性及炎性细胞浸润为主,纤维增生少见;各治疗组间T+R1+R2组肝组织学的改善明显好于其他3组,T组肝组织情况相对最差,T+R1组与T+R2组比较差别不明显(图1)。

2.3 α -SMA、COL-1、COL-3、TGF- β 1、Smad3、PCNA和TGF- α mRNA的表达 α -SMA、COL-1、COL-3、TGF- β 1、Smad3 mRNA的表达的结果显示,模型组与空白对照组比较mRNA的表达明显增强;4个治疗组与模型组比较,mRNA的表达明显下降;4个治疗组之间,mRNA的表达量以T组>T+R1组 = T+R2组>T+R1+R2组。PCNA和TGF- α mRNA的表达显示,模型组与空白对照组比较mRNA的表达无明显差别;4个治疗组之间,mRNA的表达强度以T+R1+R2组>T+R1组 = T+R2>T组(表4)。

2.4 α -SMA、COL-1、COL-3、TGF- β 1、

表 1 TGF-β1及其受体siRNA序列

基因	siRNA基因序列
TGF-β1	
正义链: 5'-GUCAACUGUGGAGCAACACD TDT-3'	
反义链: 5'-GUGUUGCUCCACAGUUGACD TDT-3'	
TβR I	
正义链: 5'-AGUCGGUUAACAGCGAUCU-3'	
反义链: 5'-UUUCAGCCAAUUGUCGCUAGA-3'	
TβR II	
正义链: 5'-GUCUUGCAUGAGCAACUGC-3'	
反义链: 5'-UUCAGAACGUACUCGUUGACG-3'	
无关siRNA	
正义链: 5'-GACUUCAUAAGGCGCAUGC-3'	
反义链: 5'-UUCUGAAGUAUCCGCGUACG-3'	

Smad3、PCNA和TGF-α蛋白的表达 免疫组织化学检测的结果表明: 肝细胞内所检测的蛋白表达, 以细胞质或细胞核及部分细胞膜, 呈界限清楚的棕黄色或深棕色反应为阳性细胞. 与空白组比较, 模型组α-SMA、COL-1、COL-3、TGF-β1、Smad3蛋白在炎性细胞浸润区、坏死灶、汇管区及纤维间隔等地方的阳性细胞表达明显增强, PCNA、TGF-α的阳性细胞表达差别不明显; 各治疗组与模型组比较, α-SMA、COL-1、COL-3、TGF-β1、Smad3蛋白阳性细胞染色强度明显下降; 而PCNA、TGF-α蛋白的阳性细胞表达明显增强; 各治疗组间比较, α-SMA、COL-1、COL-3、TGF-β1、Smad3蛋白的阳性细胞表达强度以T组>T+R1组 = T+R2组>T+R1+R2组; PCNA、TGF-α蛋白的阳性细胞表达强度以T+R1+R2组>T+R1组 = T+R2组>T组(表5).

3 讨论

肝纤维化是指由多种慢性疾病引起的肝脏持续的创伤修复反应而导致的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积和肝脏功能的受损. 对肝纤维化的细胞及分子机制研究表明, 多种细胞和细胞因子参与肝纤维化形成的病理生理过程, 其中TGF-β被认为是最关键的细胞因子^[9-10].

TGF-β来源广泛, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)、Kupffer细胞、内皮细胞、肝细胞等都可以分泌. 目前认为TGF-β至少有6种亚型, 哺乳动物主要是TGF-β1-3 3种亚型, 其中TGF-β1与肝纤维化的发生和发展的关系最为密切. TGF-β1是促进肝纤维化形成过程中主要细

表 2 有关基因扩增用RT-PCR引物序列及产物大小

名称	引物序列	PCR产物(bp)
α-SMA	ACT GGG ACG ACA TGG AAA AG GAT GGA TGG GAA AAC AGC C	368
I 型胶原	CAT AAA GGG TCA TCG TGG CTT C GTG ATA GGT GAT GTT CTG GGA G	789
III 型胶原	AAC CCA GTA TTC TCC ACT CTT CGA GGT AAC AGA GGT GAA AGA	349
TGF-β1	CAA AGA CAT CAC ACA CAG TA AGG TGT TGA GCC CTT TCC AG	441
Smad3	AAG GGC GAG CAG AAC GGG GGG ATG GAA TGG CTG TAG TC	425
PCNA	AAC TTG GAA TCC CAG AAC A AGA CAG TGG AGT GGC TTT T	293
TGF-α	ACC TGC AGG TTT TTG GTG CAG GCA GAC GAG GGC ACG GCA CCA	239
GAPDH	GGT GAA GGT CGG TGT GAA CGG A TGT TAG TGG GGT CTC GCT CCT G	245
β-actin	GCT GTC CCT GTA TGC CTC T GGT CTT TAC GGA TGT CAA CG	461

胞, HSCs的增殖和产生ECM, 形成肝纤维化, 破坏肝组织结构, 乃至肝硬化, 也能增强HSCs的移行能力^[11-12]. 有研究表明, HSCs受TGF-β1刺激活化后, 其移动能力增加4.1倍^[12]. HSCs移动更促进了肝纤维化形成的范围和程度^[12-13].

TGF-β1激活HSCs, 启动和形成肝纤维化的过程有赖于信号传导通路的通畅. TGF-β1信号转导主要通过受体丝氨酸/酪氨酸激酶途径及胞内的Smad蛋白途径, 后者被认为是介导TGF-β信号进入细胞核内的最主要途径^[9,14-15]. TGF-β1必须通过其特异的膜受体结合后, 其生物信息才能通过Smad蛋白信号传递途径下传, 激活靶细胞, 发挥生物学效应. 目前已确定TGF-β1有TβR I、TβR II、TβR III 3种受体, 其中TβR I、TβR II在传导TGF-β1作用的信号通道中起主要作用, 两者缺一不可. 在TGF-β信号传导通路中, TGF-β1必须首先与TβR II结合, 结合后的受体配体复合物再导致TβR I的活化, 产生病理生理效应^[16]; Smads是TGF-β1受体唯一的作用底物, 是一族传递TGF-β信号的分子. 根据Smad蛋白在TGF-β信号转导中的作用, 可将其分为3类: (1)膜受体激活的Smads(receptor-activated Smads, R-Smads), 包括Smad 1, 2, 3, 5和8; (2)通用Smad(common mediator Smads, Co-Smad), 目前发现的只有Smad4; (3)抑制性Smad(inhibitory Smads, I-Smads), 包括Smad6、7, 为TGF-β/Smad

■创新盘点

本文通过应用TGF-β1和其受体的siRNA, 多位点使TGF-β1和其受体表达受到抑制, 阻断TGF-β1的信号传导, 观察多位点阻断.

■应用要点

本研究结果证明多位点的基因沉默具有协同作用. 对于今后在抗肝纤维化的治疗策略中, 如何发挥最大的治疗效应应具有指导作用.

表 3 不同shRNA干预组ALT、AST及HA的测定结果 (mean ± SD)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	HA(μg/L)
N组	52.70 ± 11.0	108.80 ± 20.4	111.45 ± 24.24
M组	949.50 ± 196.1 ^b	985.67 ± 274.8 ^b	8444.65 ± 812.15 ^b
T组	592.80 ± 98.4 ^d	686.80 ± 112.3 ^d	5682.80 ± 824.14 ^d
T+R1组	440.80 ± 91.9 ^d	591.00 ± 99.87 ^d	2871.26 ± 394.68 ^d
T+R2组	461.61 ± 120.0 ^d	607.50 ± 84.8 ^d	3004.29 ± 354.25 ^d
T+R1+R2组	284.00 ± 49.0 ^{df}	398.30 ± 61.9 ^{df}	1982.12 ± 402.71 ^{df}

^b*P*<0.01 vs N组; ^d*P*<0.01 vs M组; ^f*P*<0.01 vs T组.

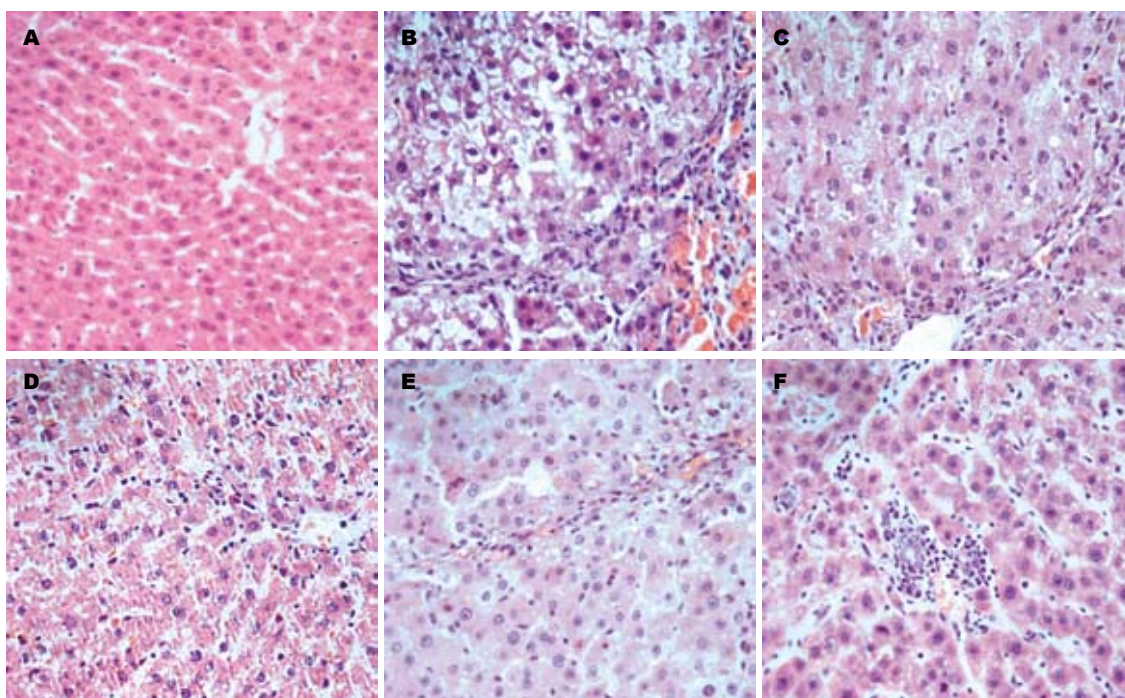


图 1 各实验组肝组织HE染色(×400). A: 正常对照组; B: 肝损伤模型对照组; C: TGF-β1 siRNA干预组; D: T+R1干预组; E: T+R2干预组; F: T+R1+R2干预组.

表 4 不同siRNA干预后肝组织中各项指标mRNA表达量与GADPH基因或β-actin基因表达量的比值 (mean ± SD)

分组	α-SMA	COL-1	COL-3	TGF-β1	Smad3	PCNA	TGF-α
N组	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.05	0.29 ± 0.06	0.31 ± 0.06
M组	0.91 ± 0.26 ^b	0.87 ± 0.11 ^b	0.95 ± 0.16 ^b	0.96 ± 0.11 ^b	0.91 ± 0.15 ^b	0.30 ± 0.07	0.25 ± 0.04
T组	0.65 ± 0.14 ^c	0.55 ± 0.10 ^c	0.71 ± 0.11 ^c	0.78 ± 0.10 ^c	0.67 ± 0.13 ^c	0.43 ± 0.11 ^c	0.42 ± 0.09 ^c
T+R1组	0.43 ± 0.08 ^c	0.40 ± 0.08 ^c	0.55 ± 0.06 ^c	0.65 ± 0.09 ^c	0.41 ± 0.08 ^c	0.59 ± 0.12 ^c	0.64 ± 0.11 ^c
T+R2组	0.41 ± 0.07 ^c	0.38 ± 0.09 ^c	0.53 ± 0.05 ^c	0.63 ± 0.10 ^c	0.42 ± 0.07 ^c	0.58 ± 0.08 ^c	0.59 ± 0.15 ^c
T+R1+R2组	0.26 ± 0.09 ^{ce}	0.20 ± 0.06 ^{ce}	0.28 ± 0.06 ^{ce}	0.48 ± 0.06 ^{ce}	0.28 ± 0.04 ^{ce}	0.72 ± 0.14 ^{ce}	0.76 ± 0.15 ^{ce}

^b*P*<0.01 vs N组; ^c*P*<0.05 vs M组; ^e*P*<0.05 vs T组.

信号通路的抑制分子. TGF-β与其受体结合后可激活Smad2和Smad3并磷酸化, 其与Smad4形成异源三聚体复合物易位入核, 与DNA结合, 通过和转录因子的相互作用调节靶基因表达, 活化

HSCs^[14,17].

针对肝纤维化的发病机制和病理生理基础, 对肝纤维化, 乃至肝硬化的治疗有了很大的进展. 临床上, 有大量的证据说明针对慢性乙

表 5 免疫组织化学测定不同siRNA干预后肝组织中各项指标的蛋白表达 (mean \pm SD)

分组	α -SMA	COL-1	COL-3	TGF- β 1	Smad3	PCNA	TGF- α
N组	29.3 \pm 9.1	62.1 \pm 14.9	80.7 \pm 17.2	44.9 \pm 12.3	65.6 \pm 11.6	73.5 \pm 11.6	65.9 \pm 13.7
M组	634.7 \pm 33.9 ^b	457.4 \pm 31.7 ^b	515.2 \pm 31.3 ^b	589.1 \pm 38.9 ^b	482.9 \pm 31.2 ^b	79.6 \pm 12.4	74.7 \pm 15.9
T组	489.4 \pm 24.5 ^c	321.8 \pm 21.6 ^c	386.9 \pm 26.7 ^c	434.8 \pm 31.0 ^c	367.1 \pm 27.6 ^c	347.5 \pm 25.1 ^c	343.2 \pm 25.7 ^c
T+R1组	401.6 \pm 17.8 ^c	225.2 \pm 16.9 ^c	302.4 \pm 22.7	343.8 \pm 25.0 ^c	282.7 \pm 23.1 ^c	436.8 \pm 26.2 ^c	429.6 \pm 26.1 ^c
T+R2组	394.5 \pm 16.2 ^c	237.7 \pm 15.9 ^c	298.3 \pm 21.3 ^c	361.4 \pm 24.7 ^c	286.0 \pm 22.1 ^c	431.8 \pm 23.6 ^c	446.3 \pm 23.3 ^c
T+R1+R2组	297.1 \pm 13.5 ^{ce}	151.4 \pm 12.6 ^{ce}	214.5 \pm 19.5 ^{ce}	285.6 \pm 22.1 ^{ce}	205.7 \pm 16.8 ^{ce}	501.3 \pm 22.9 ^{ce}	512.5 \pm 21.7 ^{ce}

^b $P < 0.01$ vs N组; ^c $P < 0.05$ vs M组; ^e $P < 0.05$ vs T组.

型肝炎的抗病毒治疗能阻断肝纤维化的病程进展, 甚至能逆转肝纤维化程度^[18-19]. Moucari *et al*^[20]对接受干扰素治疗获得了持续病毒学应答(sustained virological response; SVR)的25例HBeAg阳性的慢性乙型肝炎患者进行了长达14年的随访, 随访结束后64%患者获得了HBsAg血清转换, 发生了HBsAg血清转换的患者中70%的患者肝纤维化得到了明显的改善. Lin *et al*^[21]对台湾接受干扰素治疗的慢性乙型肝炎的患者进行了15年的随访也得到了相似的结果, 肝硬化的发生率在干扰素治疗组为17.8%, 明显低于未用干扰素治疗的对照组(33.7%). Liaw *et al*^[22]报道长期应用拉米夫定治疗肝炎肝硬化患者能明显延缓病情进展和肝硬化并发症及肝癌的发生率. 治疗3年后治疗组的病情明显进展及肝癌的累计发生率分别为7.8%和3.4%, 明显的低于安慰剂治疗组的17.7%和7.4%. 除病原治疗能明显延缓肝纤维化的进展, 甚至逆转肝纤维化外, 抗肝纤维化的中成药也能改善肝纤维化^[23]. 抗肝纤维化的药物, 包括针对TGF- β 1的基因治疗, 均能通过减低TGF- β 1的表达, 阻断星状细胞的活化和改善肝硬化大鼠模型的病理改变和提高肝硬化大鼠的存活率^[24-30]. 本研究组曾报道应用TGF- β 1 siRNA能在体外明显减少HSCs Smad3、Smad7 mRNA表达, 并抑制HSCs的活化^[31]. 本文的研究也证明TGF- β 1 siRNA能减少肝损伤小鼠肝组织中TGF- β 1和Smad的表达, 并明显减少了与HSCs活化相关的 α -SMA表达和肝纤维化相关的ECM, 如COL-1、COL-3的表达. 这种抑制作用能通过联合应用针对TGF- β 1及其受体的siRNA所增强. 研究结果说明TGF- β /Smad信号传导通路在激活HSCs, 启动和促进肝纤维化形成过程中起非常重要的作用. 同时也证明多靶位的TGF- β 1、T β R I和T β R II的shRNA的联合应用具有阻断TGF- β /Smad信号传

导通路, 抑制HSCs活化和肝纤维化形成的协同或相加作用.

我们同时注意到在本研究的肝损伤动物模型中, 通过TGF- β 1、T β R I和T β R II的shRNA对其相应的基因沉默后, 还可以观察到肝细胞内PCNA和TGF- α 的表达明显增强. 这两种因子的表达增强均具有促使细胞内DNA的合成, 导致细胞增殖、分化, 从而促进了肝细胞的增殖和修复^[32-33]. 因此, 我们的结果提示阻断TGF- β /Smad信号传导不仅具有抗肝纤维化的作用, 而且在急性肝损伤时可能也具促肝细胞增殖的作用. 但针对TGF- β 1 shRNA和T β R I、T β R II的shRNA在抗急性肝损伤和促进肝细胞增殖的意义还有待进一步研究.

4 参考文献

- 中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
- 哈明昊, 饶慧瑛, 刘峰, 潘孝本, 封波, 陈红松, 魏来. 乙型肝炎病毒促进CTGF和TGF- β 1在肝星状细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16: 924-928
- 哈明昊, 饶慧瑛, 刘峰, 潘孝本, 封波, 陈红松, 魏来. 乙型肝炎病毒促进 I 型胶原和 III 型胶原在肝星状细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2031-2035
- 王红群, 丁向东, 吴强, 张晴, 黄焰, 杨枫. 小鼠日本血吸虫肝纤维化组织TGF- β 1及Smads的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16: 929-934
- 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. TGF- β /Smad信号转导通路与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1601-1605
- Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35: 49-61
- 陈达凡, 李建英, 郑伟达, 陈治新, 王小众. 外源性转化生长因子 β 1对大鼠原代肝星状细胞活化的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 211-215
- 吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 秦建平, 徐辉. 肝纤维化大鼠肝组织Smads基因表达状况及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1037-1041
- Kong L, Zhang YG, Wang RQ, Yao SK. [The effects of transforming growth factor beta1/Smads

■同行评价

本研究立意新颖, 思路清晰, 方法得当, 数据可靠, 引用参考文献合理, 结论对肝脏疾病的治疗有一定的指导意义.

- signaling pathway changes on the pathogenesis of liver fibrosis] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2006; 14: 842-844
- 10 谭淑萍, 吴晓东. 肝纤维化与TGF- β 和以其为靶位点的治疗策略. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3126-3130
- 11 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34: 859-867
- 12 杨长青, 常义忠, 陈锡美. 致纤维化生长因子对肝星状细胞移行的影响. *中华消化杂志* 2006; 26: 793-796
- 13 Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159
- 14 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- 15 Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001; 187: 117-123
- 16 Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994; 370: 341-347
- 17 Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGF β signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001; 502: 4-10
- 18 European Association For The Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 227-242
- 19 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539
- 20 Moucari R, Korevaar A, Lada O, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Mackiewicz V, Dauvergne A, Cardoso AC, Asselah T, Nicolas-Chanoine MH, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P. High rates of HBsAg seroconversion in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients responding to interferon: a long-term follow-up study. *J Hepatol* 2009; 50: 1084-1092
- 21 Lin SM, Yu ML, Lee CM, Chien RN, Sheen IS, Chu CM, Liaw YF. Interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2007; 46: 45-52
- 22 Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, Tanwandee T, Tao QM, Shue K, Keene ON, Dixon JS, Gray DF, Sabbat J. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521-1531
- 23 刘平, 胡义扬, 刘成, 徐列明, 刘成海, 孙克伟, 胡德昌, 尹有宽, 周霞秋, 万谟彬, 蔡雄, 张志清, 叶军, 唐宝璋, 贺佳. 扶正化瘀胶囊干预慢性乙型肝炎肝纤维化作用的多中心临床研究. *中西医结合学报* 2003; 1: 89-98, 102
- 24 付德才, 杨世忠, 孙钰玮, 于春艳, 毛丽珍, 姜相莲, 关瑞峰. 甲珠对肝纤维化大鼠 α -SMA和TGF- β 1表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 253-258
- 25 杨悦杰, 黄芬, 胡静, 马力, 李智伟. IL-10对TGF- β 1诱导的大鼠肝星状细胞CTGF表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2154-2157
- 26 齐晓艳, 高润平, 王淑华, 张瑞娟, 包万国, 金清龙, 辛桂杰, 杨永广. 靶向CTGF锤头核酶对TGF- β 1作用下人肝星状细胞合成I型胶原的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2587-2591
- 27 陈益平, 卢朝升, 汪洪姣, 徐志伟, 陈均亚, 石海矾, 狄军波. 肝素对大鼠肝星状细胞中转化生长因子 β 1和I型胶原的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3629-3632
- 28 甄茂川, 王效民, 尹震宇, 汪谦, 刘平果, 吴国洋, 俞可克, 李岗山. EGCG对肝纤维化大鼠TGF- β 1和CTGF表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3828-3834
- 29 汪玲, 胡国龄, 谭德明, 刘双虎. TGF- β II型受体部分基因表达质粒对实验性大鼠肝纤维化的影响. *中华传染病杂志* 2002; 20: 168-171
- 30 蒋伟, 王吉耀, 杨长青, 刘文滨, 王逸青, 贺伯明. 反义转化生长因子 β II型受体表达质粒对实验性肝纤维化的影响. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 137-140
- 31 付荣泉, 谭德明, 彭忠田. TGF β 1 siRNA对肝星状细胞Smad3、Smad7 mRNA表达的影响. *医学临床研究* 2006; 23: 875-878
- 32 Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990; 96 (Pt 1): 121-129
- 33 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立. 肝硬变大鼠肝部分切除术后残肝TGF- α 、HGF、PCNA和IGFBP-1s mRNA的变化. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 434-443

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

柴胡皂甙D对DEN致大鼠肝癌免疫功能的影响

程延安, 王宝峰, 刘振国, 党双锁, 马红兵, 杨扬

程延安, 刘振国, 党双锁, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科 陕西省西安市 710004

王宝峰, 马红兵, 西安交通大学医学院第二附属医院肿瘤科 陕西省西安市 710004

杨扬, 西安交通大学医学院第二附属医院药剂科 陕西省西安市 710004

程延安, 教授, 硕士生导师, 主要从事肝病的临床与基础研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471982

作者贡献分布: 王宝峰与程延安对此文所作贡献均等; 此课题由程延安、王宝峰、刘振国、党双锁、马红兵及杨扬设计; 研究过程由王宝峰、刘振国及马红兵操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由程延安、马红兵及党双锁提供; 数据分析由王宝峰、马红兵及刘振国完成; 本论文写作由王宝峰、刘振国、党双锁及杨扬完成。

通讯作者: 王宝峰, 硕士, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学医学院第二附属医院肿瘤科。

wangbf1680@sohu.com

电话: 029-87679789

收稿日期: 2009-06-06 修回日期: 2009-08-04

接受日期: 2009-08-10 在线出版日期: 2009-08-28

Immunoregulatory effects of saikosaponin-d in rats with experimental hepatocarcinoma

Yan-An Cheng, Bao-Feng Wang, Zhen-Guo Liu, Shuang-Suo Dang, Hong-Bing Ma, Yang Yang

Yan-An Cheng, Zhen-Guo Liu, Shuang-Suo Dang, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Bao-Feng Wang, Hong-Bing Ma, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Yang Yang, Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471982

Correspondence to: Bao-Feng Wang, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. wangbf1680@sohu.com

Received: 2009-06-06 Revised: 2009-08-04

Accepted: 2009-08-10 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To investigate the immunoregulatory effects of saikosaponin-d (SSd) in rats with diethylnitrosamine (DEN)-induced experimental hepatocarcinoma and explore whether such immunoregulatory effects are associated with the antitumor effects of SSd.

METHODS: Ninety Sprague-Dawley male rats,

weighting 248.18 ± 12.32 g, were divided into five groups randomly: normal control group ($n = 10$), model control group ($n = 20$) and three treatment groups ($n = 20$ in each group). Except the normal control group, rats in other groups were administrated with 2 mg/L DEN at a dose of 10 mg/kg bodyweight five times one week for sixteen weeks. Meanwhile, rats in the treatment groups were injected intraperitoneally with SSd at different doses (1.0, 1.5 and 2.0 mg/kg, respectively) once daily for sixteen weeks. Rats were anesthetized and killed at the end of last week. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to examine the pathological changes in the liver. T lymphocyte subsets ($CD3^+ CD4^+$ %, $CD3^+ CD8^+$ % and $CD3^+ CD4^+ / CD3^+ CD8^+$ ratio) were measured by flow cytometry.

RESULTS: Both tumor volume and tumor number were significantly reduced in the three SSd treatment groups when compared with the model control group. According to criteria of Edmondson and Steiner, the majority of tumors in the model group were histologically classified as grade III while those in the three SSd treatment groups were classified as grades I-II. The tumors in the treatment groups were well differentiated while those in the model control group were poorly differentiated. Compared with the control group, the percentage of $CD4^+$ T lymphocytes and $CD4^+ / CD8^+$ ratio significantly decreased in the model control group while the percentage of $CD8^+$ T lymphocytes markedly increased ($33.56\% \pm 4.16\%$ vs $45.50\% \pm 4.03\%$, 1.06 ± 0.56 vs 1.93 ± 0.28 and $30.62\% \pm 3.65\%$ vs $22.88\% \pm 3.15\%$, respectively; all $P < 0.05$). In contrast, a significant increase in the percentage of $CD4^+$ T lymphocytes and $CD4^+ / CD8^+$ ratio and a marked decrease in the percentage of $CD8^+$ T lymphocytes were noted in the three SSd treatment groups (especially in high-dose SSd treatment group) when compared with the model control group ($39.06\% \pm 3.98\%$ vs $33.56\% \pm 4.16\%$, 1.55 ± 0.29 vs 1.06 ± 0.56 and $18.99\% \pm 3.09\%$ vs $30.62\% \pm 3.65\%$, respectively; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: SSd has inhibitory effects on DEN-induced hepatocarcinogenesis in rats per-

■背景资料

肝癌术后复发和转移率极高, 目前尚无较好的治疗方法。肿瘤细胞的抗原性已被证实, 提高宿主的免疫功能疗法在多种肿瘤的治疗中已显示出诱人的前景。目前, 中药单体在抗肿瘤的治疗中具有一定的优势, 进一步探讨其在肿瘤宿主免疫功能中的作用具有重要的意义。

■同行评议者

邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

■研究前沿

柴胡皂甙D是从传统中药柴胡中提取的有效单体成分,具有显著的抗炎、抗肿瘤作用。本研究初步观察柴胡皂甙D对肝癌大鼠免疫功能的调节作用及对肝癌形成的影响。

haps through exerting an immunoprotective effect.

Key Words: Saikosaponin-d; hepatocellular carcinoma; Diethylnitrosamine

Cheng YA, Wang BF, Liu ZG, Dang SS, Ma HB, Yang Y. Immunoregulatory effects of saikosaponin-d in rats with experimental hepatocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2451-2455

摘要

目的: 观察柴胡皂甙D(saikosaponin-d, SSd)对二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)致大鼠肝癌免疫功能的影响,并探讨其与SSd抗肝肿瘤作用的关系。

方法: 清洁级♂SD大鼠90只,平均体质量 248.18 ± 12.32 g,随机分为5组:模型组($n = 20$),对照组($n = 10$)及SSd大、中、小剂量治疗组(均 $n = 20$)。除对照组给予等量生理盐水灌胃外,其余各组大鼠均给予2 mg/L DEN灌胃,按体质量10 mg/kg给药,每周5次,同时各治疗组每天给予不同浓度SSd(2.0、1.5、1.0 mg/kg)腹腔注射,至16 wk停药,麻醉后处死大鼠。HE染色观察实验大鼠肝组织病理学结构的改变,应用流式细胞仪测定大鼠外周血T淋巴细胞亚群($CD3^+ CD4^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 及 $CD3^+ CD4^+/CD3^+ CD8^+$ 比值)。

结果: SSd各治疗组大鼠癌结节数及灶的大小均小于模型组。镜下单纯造模组癌细胞呈多形性,异形性明显,Edmondson分级多数属于Ⅲ级;相反,SSd各干预组癌细胞分化程度高,异形性较低,分级多为Ⅰ-Ⅱ级;肝癌模型组与正常对照组T淋巴细胞亚群比较 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 明显下降, $CD8^+$ 上升,差异有统计学意义($33.56\% \pm 4.16\%$ vs $45.50\% \pm 4.03\%$; 1.06 ± 0.56 vs 1.93 ± 0.28 ; $30.62\% \pm 3.65\%$ vs $22.88\% \pm 3.15\%$; 均 $P < 0.05$);而SSd各组与肝癌模型组T淋巴细胞亚群比较 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 明显回升, $CD8^+$ 下降,差异有统计学意义,尤其以SSd大剂量组明显($39.06\% \pm 3.98\%$ vs $33.56\% \pm 4.16\%$; 1.55 ± 0.29 vs 1.06 ± 0.56 ; $18.99\% \pm 3.09\%$ vs $30.62\% \pm 3.65\%$; 均 $P < 0.05$)。

结论: SSd对DEN诱发大鼠肝癌形成有一定的免疫保护作用。

关键词: 柴胡皂甙D; 肝细胞癌; 二乙基亚硝胺

程延安, 王宝峰, 刘振国, 党双锁, 马红兵, 杨扬. 柴胡皂甙D对DEN致大鼠肝癌免疫功能的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(24): 2451-2455

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2451.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)术后复发和转移率极高,目前尚无较好的治疗办法。肿瘤细胞的抗原性已被证实,提高宿主的免疫功能疗法在多种肿瘤的治疗中已显示出诱人的前景。柴胡皂甙D(saikosaponin-d, SSd)是从传统中药柴胡中提取的有效单体成分,具有显著的抗炎、抗肿瘤作用^[1-4]。本研究通过二乙基亚硝胺(DEN)诱导大鼠肝癌模型,初步观察SSd对大鼠肝癌形成的影响及免疫功能的调节作用。

1 材料和方法

1.1 材料 DEN,纯度 >0.99 kg/L(Sigma公司),柴胡皂甙D(SSd,江西本草天工科技有限责任公司),二甲基亚砷(DMSO, Sigma公司),台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂),隔水式电热恒温干燥箱(上海医疗器械厂),FACSCalibur型流式细胞仪,美国Becton Dickinson公司产品。♂清洁级SD大鼠90只,平均体质量 248.18 ± 12.32 g,由西安交通大学医学院动物实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 分组: 将大鼠随机分为5组:正常对照组10只,肝癌模型组及SSd大、中、小剂量治疗组每组20只。

1.2.2 溶液的配制: 称取SSd 40、30、20 mg,分别溶于DMSO 3 mL中,静止10 min,然后用生理盐水稀释至100 mL,避光保存;2 mg/L DEN溶液的配制:500 mL生理盐水加1 mL DEN,振荡混匀,避光保存。

1.2.3 造模: 模型组与治疗组均给予2 mg/L DEN灌胃,按体质量10 mg/kg给药,每只1.5-2.0 mL/d,每周5次,至16 wk停药,对照组给予等量生理盐水灌胃;造模同时,治疗组大鼠分别给以不同浓度SSd ip(按0.50 mL/100 g)干预,每天1次,共16 wk。每天观察动物的精神状态、饮食状况及背毛等一般情况的变化,每周称体质量1次,记录1次进水量和进食量。灌胃给药严格遵循操作规则及剂量要求,减少由操作不当引起的动物死亡,16 wk后麻醉处死动物。

1.2.4 大鼠外周血T淋巴细胞亚群测定: 取肝素抗凝全血100 μ L置12 mm \times 75 mm专用试管中;加10 μ L特异性荧光双标抗体(Mouse anti Rat CD3FITC/CD4RPE, Mouse anti Rat CD3FITC/CD8RPE)与全血充分混匀;25 $^{\circ}$ C左右,避光染色15-30 min;加2 μ L红细胞裂解液作用10 min;1000 r/min,离心5 min,弃上清液;加入

■相关报道

Yang *et al*的研究发现,肝癌周围可见 $CD4^+ CD25^+$ T淋巴细胞数目增加,其可抑制肿瘤中 $CD8^+$ T淋巴细胞活性,与肿瘤的浸润、转移密切相关。

500 μ L PBS洗液重悬成单细胞悬液, 上流式细胞仪分析。

1.2.5 FICT和RPE的荧光强度检测: 全部数据用流式细胞仪和软件CELL QUEST进行荧光参数获取和分析。在前散射和测散射的二维Dot-plot图中, 划出淋巴细胞区, 然后对淋巴细胞作FICT和RPE的荧光强度检测, 荧光 I (FL1)为FITC, 滤光片为 480 ± 10 nm带通, 荧光 II (FL2)为RPE, 滤光片为 480 ± 10 nm带通。数据分析时, 在确定每次检测阳性细胞百分率之前, 根据Isotype的非特异性荧光强度设定界限, 以确定双阳性、双阴性和单阳性区。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件包进行统计分析, 显著性水平 $\alpha \leq 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠肝癌病理变化 正常对照组大鼠肝脏表面光滑, 色淡红, 边缘锐利, 质地软。随着诱癌过程的进行, 实验经历肝炎、肝硬化阶段进而形成肝癌。实验结束时, 单纯造模组大鼠肝脏表面粗糙, 可见多个大小不一的灰白色癌结节, 最大者 $1.5 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm} \times 0.8 \text{ cm}$, 切面呈结节状, 可见出血和坏死, 癌周肝脏常伴有结节或肝硬化改变; 相反, SSd各治疗组癌结节数及灶的大小均小于对照组。镜下观: 对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞索排列整齐, 细胞核清晰。单纯造模组正常肝小叶结构被破坏, 大体观白色结节处为肝癌细胞, 瘤细胞呈多形性, 异形性明显, 胞核增大, 胞质少, 嗜碱性。根据Edmondson分级法^[5]多数属于III级; 相反, SSd各干预组镜下癌细胞分化程度高, 异形性低, 分级多为I-II级(图1), 提示SSd能够抑制肝癌的形成与发展。

2.2 大鼠外周血T淋巴细胞亚群 肝癌模型组与正常对照组T淋巴细胞亚群比较 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ 明显下降, $\text{CD}8^+$ 上升, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而SSd各组与肝癌模型组T淋巴细胞亚群比较 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ 明显回升, $\text{CD}8^+$ 下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1, 图2)。

3 讨论

DEN具有很强的化学毒性, 所含的亚硝胺基因具有中毒剂和诱癌剂的双重效应^[6], 并且其诱发的肿瘤多为HCC, 和人HCC比较相似。我们每周5次给予SD大鼠2 mg/L DEN, 按体质量10 mg/kg给药, 诱癌16 wk后, 病理结果证实大鼠肝癌形成, 所诱发出的肝癌多数是结节型肝癌, 而人肝

表1 各组大鼠外周血T淋巴细胞亚群数值的比较 (mean \pm SD)

分组	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照组	45.50 \pm 4.03	22.88 \pm 3.15	1.93 \pm 0.28
模型组	33.56 \pm 4.16 ^a	30.62 \pm 3.65 ^a	1.06 \pm 0.56 ^a
SSd大剂量组	39.06 \pm 3.98 ^a	18.99 \pm 3.09 ^c	1.55 \pm 0.29 ^c
SSd中剂量组	38.46 \pm 4.00 ^a	19.12 \pm 3.01 ^c	1.59 \pm 0.31 ^c
SSd小剂量组	37.98 \pm 3.95 ^a	17.96 \pm 3.17 ^c	1.53 \pm 0.25 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 肝癌模型组。

癌也是以结节型最为常见^[7-8]。因此, 通过间断小剂量DEN灌胃诱发肝肿瘤是一种经典的建立大鼠肝癌的模型。

造模同时, 我们给予SSd干预治疗, 发现SSd各治疗组大鼠饮食、精神、活动均比单纯造模组改善, 死亡率降低; 肉眼下SSd各治疗组癌结节数及灶的大小均小于对照组^[3]。镜下可见单纯造模组正常肝小叶结构破坏, 瘤细胞呈多形性, 异形性明显, 胞核增大, 胞质少, 嗜碱性。根据Edmondson分级法^[5]多数属于III级; 相反, SSd各干预组镜下癌细胞分化程度高, 异形性较低, 分级多为I-II级, 提示SSd具有抵抗DEN对大鼠的毒性作用, 抑制肝癌的形成与发展。

肿瘤免疫的概念于1906年建立, 肿瘤细胞的抗原性已被证实, 宿主免疫功能状态在肿瘤的发生、发展过程中不断地相互影响, 双方各种因素的消长对病情发展变化和预后起重要的作用。而细胞免疫是机体抗肿瘤免疫效应的主要机制, T淋巴细胞在细胞免疫中起主导作用, 外周血T淋巴细胞亚群是反映肿瘤患者免疫状态的最佳指标^[9-12]。他是机体免疫系统中最重要的一大细胞群, 通过各亚群间相互作用维持着机体正常的免疫应答, 肿瘤患者T淋巴细胞亚群数量异常与功能紊乱时常造成机体的免疫抑制, 当不同T淋巴细胞亚群数量、功能发生异常时将直接影响肿瘤的发生、发展及预后^[13-15]。研究证实, $\text{CD}3^+$ 分布于成熟的T淋巴细胞表面, 根据细胞表面标志物的不同, 大部分成熟T细胞可划分为 $\text{CD}4^+$ 和 $\text{CD}8^+$ 细胞, $\text{CD}3^+ \text{CD}4^+$ T淋巴细胞能通过其免疫辅助作用增强和扩大机体的免疫应答, 相反, $\text{CD}3^+ \text{CD}8^+$ T淋巴细胞通过其细胞毒性作用抑制机体的免疫应答过程。两种作用相反的T淋巴细胞借助相互拮抗, 调节机体的免疫应答。通过 $\text{CD}3^+ \text{CD}4^+$ 和 $\text{CD}3^+ \text{CD}8^+$ T淋巴细胞亚群的检测可了解不同情况下机体的免疫功能状态, 对肿瘤的发生发展及免疫治疗具有重要

■创新盘点

本研究提示柴胡皂甙D能够提高大鼠肝癌 $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ T淋巴细胞亚群比例, 降低 $\text{CD}8^+$ 的数目, 具有显著的免疫保护及抗肿瘤作用, 为其临床应用提供理论依据。

■应用要点

提高宿主免疫功能是研究中药抗肝肿瘤治疗的一个重要内容, 本研究表明柴胡皂甙D能够提高宿主免疫功能达到抑制肝肿瘤生长, 诱导分化, 有望作为一种不良反应小的新的天然抗肝肿瘤药物投入临床应用, 具有良好应用前景。

■名词解释

柴胡皂甙D(SSd): 是从传统中药柴胡中提取的有效单体成分, 具有糖皮质激素(GC)样甾环结构, 能够抑制花生四烯酸等代谢产物的生成, 具有显著的抗炎、抗肿瘤作用。

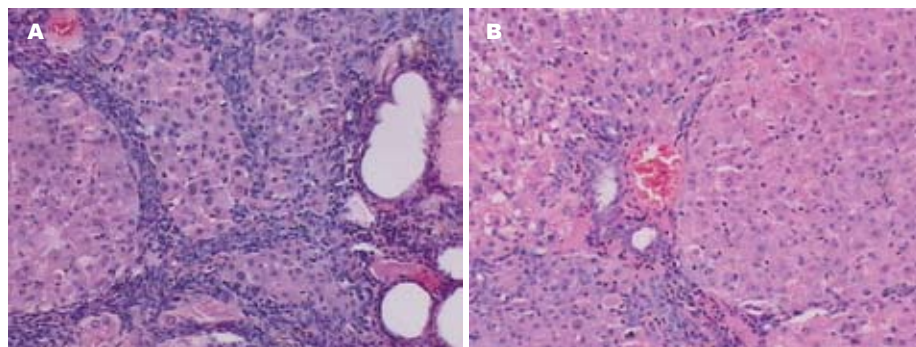


图1 大鼠16 wk肝癌病理变化(HE × 100). A: 模型组; B: SSd大剂量组。

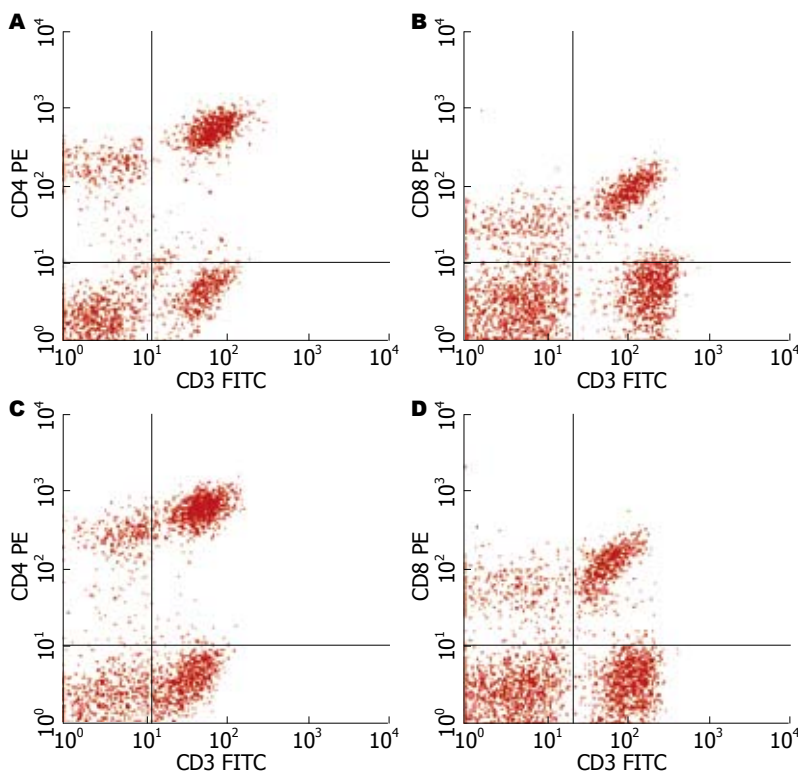


图2 各组大鼠外周血T淋巴细胞亚群流式图变化(%). A: 肝癌模型组CD3⁺ CD4⁺; B: 肝癌模型组CD3⁺ CD8⁺; C: SSd治疗组CD3⁺ CD4⁺; D: SSd治疗组CD3⁺ CD8⁺.

的意义。

本实验采用DEN诱发大鼠肝癌模型, 探讨SSd对大鼠肝癌免疫功能的影响。结果显示, 肝癌模型组与正常对照组T淋巴细胞亚群比较CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺明显下降, CD8⁺ T淋巴细胞上升, 差异有显著统计学意义($P < 0.05$), 造成T淋巴细胞功能障碍的原因目前尚不完全清楚, 推测与以下因素有关: (1)大鼠肝癌自身免疫缺陷, 使免疫系统自身调节机能发生障碍, 造成CD8⁺ T淋巴细胞升高; (2)肝癌细胞代谢产物(免疫抑制因子、AFP、细胞因子等)使活化的CD4⁺ T淋巴细胞祖细胞数量或增殖能力下降或诱导产生更多的CD8⁺ T淋巴细胞; (3)T淋巴细胞在肿瘤局部聚集可降低外周血T细胞(CD3⁺)水平或肿瘤代谢产物抑制了T细胞的活化。这一实验结果提示肝癌大鼠免疫调节和监视功能减弱, 肿瘤细胞易于逃避免疫系统的清除, 最终诱发了肿瘤

的无止境生长及复发、转移。

SSd是从传统中药柴胡中提取的有效单体成分, 具有显著的抗肿瘤及免疫调节作用, 被认为是一种生物反应调节剂。越来越多的证据表明SSd通过激活巨噬细胞和淋巴细胞功能, 增强机体非特异性和特异性免疫反应, 从而起到免疫调节作用。SSd既可诱导Ts细胞活性, 又可激活Th细胞活性, 增强K、LAK、NK细胞的活性, 从而用于肿瘤的免疫治疗之中^[16-18]。本实验结果也显示, SSd各剂量组与肝癌模型组T淋巴细胞亚群比较CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺明显回升, CD8⁺下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与文献报道一致。进一步证实了SSd对大鼠肝癌的免疫功能有一定的改善作用, 具有一定的抑制大鼠肝癌形成的作用, 但其内在作用机制尚未完全阐明。因此, SSd对大鼠肝癌免疫功能的内在调节机制有待进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Dang SS, Wang BF, Cheng YA, Song P, Liu ZG, Li ZF. Inhibitory effects of saikosaponin-d on CCl₄-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 557-563
- 2 王宝峰, 程延安, 党双锁, 刘振国, 贾晓黎, 马红兵, 王西京. 柴胡皂甙-d对鸡胚新生血管形成抑制作用的研究. *中国中西医结合杂志* 2009; 29: 425-429
- 3 王宝峰, 程延安, 王西京, 刘振国, 马红兵, 白明华, 党双锁, 贾晓黎. 柴胡皂甙D对实验性大鼠肝癌血管形成的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1273-1280
- 4 Fan J, Li X, Li P, Li N, Wang T, Shen H, Siow Y, Choy P, Gong Y. Saikosaponin-d attenuates the development of liver fibrosis by preventing hepatocyte injury. *Biochem Cell Biol* 2007; 85: 189-195
- 5 Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954; 7: 462-503
- 6 Okubo H, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y. Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growth factor during DEN-induced carcinogenesis in the rat. *Hepatol Res* 2002; 24: 385-394
- 7 Helmberger T, Hoffmann RT, Jakobs T, Leibecke T, Lubienski A, Reiser M. [Liver tumor ablation] *Radiologe* 2005; 45: 55-62
- 8 Okubo H, Takei Y, Serizawa N, Enomoto N, Ikejima K, Sato N. Orthotopic hepatocellular carcinoma model with a controlled and reproducible tumorigenicity. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 423-428
- 9 Hsu YL, Kuo PL, Lin CC. The proliferative inhibition and apoptotic mechanism of Saikosaponin D in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sci* 2004; 75: 1231-1242
- 10 Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, Zhang Z, Yang H, Zhang H, Zhou C, Yao J, Jin L, Wang H, Yang Y, Fu YX, Wang FS. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 2007; 132: 2328-2339
- 11 Marotta F, Vangieri B, Cecere A, Gattoni A. The pathogenesis of hepatocellular carcinoma is multifactorial event. Novel immunological treatment in prospect. *Clin Ter* 2004; 155: 187-199
- 12 Krüger C, Greten TF, Korangy F. Immune based therapies in cancer. *Histol Histopathol* 2007; 22: 687-696
- 13 Lotze MT, Finn OJ. Recent advances in cellular immunology: implications for immunity to cancer. *Immunol Today* 1990; 11: 190-193
- 14 Lynch DH. The promise of 4-1BB (CD137)-mediated immunomodulation and the immunotherapy of cancer. *Immunol Rev* 2008; 222: 277-286
- 15 Zhou J, Ding T, Pan W, Zhu LY, Li L, Zheng L. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* 2009; 125: 1640-1648
- 16 Kato M, Pu MY, Isobe K, Iwamoto T, Nagase F, Lwin T, Zhang YH, Hattori T, Yanagita N, Nakashima I. Characterization of the immunoregulatory action of saikosaponin-d. *Cell Immunol* 1994; 159: 15-25
- 17 He Y, Hu ZF, Li P, Xiao C, Chen YW, Li KM, Guo JZ, Pan L, Xiong JP. [Experimental study of saikosaponin-D (SSd) on lipid peroxidation of hepatic fibrosis on rat] *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2008; 33: 915-919
- 18 Wong VK, Zhou H, Cheung SS, Li T, Liu L. Mechanistic study of saikosaponin-d (Ssd) on suppression of murine T lymphocyte activation. *J Cell Biochem* 2009; 107: 303-315

■同行评价

本文立意新颖, 实验方法路线准确, 结果结论真实可靠, 学术价值较好。

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》中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度, 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征, 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准, 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

MMP3基因Lys45Glu单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系

欧阳刚, 姚品芳, 胡文娟, 黄环元, 王红, 王朝元, 陈思礼, 王立东, 李劲

■背景资料

食管癌是世界十大恶性肿瘤之一, 在我国食管癌居癌症死因第4位。我国的河南、河北、山西3省交界的太行山区(林县、磁县、阳城县), 其发病率高达100/10万以上。

欧阳刚, 胡文娟, 王红, 王朝元, 陈思礼, 李劲, 中南民族大学生命科学学院 湖北省武汉市 430074

姚品芳, 黄环元, 湖北省肿瘤医院肿瘤研究所 湖北省武汉市 430079

王立东, 郑州大学基础医学院癌症研究室 河南省郑州市 450052

欧阳刚, 中南民族大学生命科学学院硕士, 主要从事肿瘤分子生物学的研究。

国家民委自然科学基金资助项目, No. MZY07004

作者贡献分布: 欧阳刚与姚品芳对此文所作贡献均等; 此课题由李劲、欧阳刚及姚品芳设计; 研究过程欧阳刚、姚品芳、胡文娟及王红操作完成; 数据分析由李劲与欧阳刚、王朝元、陈思礼及王立东完成; 本论文写作由欧阳刚与李劲完成。

通讯作者: 李劲, 430074, 湖北省武汉市, 中南民族大学生命科学学院。lijin@mail.scuec.edu.cn

电话: 027-67843181

收稿日期: 2009-05-22 修回日期: 2009-07-20

接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-28

Association of the single nucleotide polymorphism (Lys45Glu) in exon 2 of the matrix metalloproteinase-3 gene with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma

Gang Ouyang, Pin-Fang Yao, Wen-Juan Hu, Huan-Yuan Huang, Hong Wang, Chao-Yuan Wang, Si-Li Chen, Li-Dong Wang, Jin Li

Gang Ouyang, Wen-Juan Hu, Hong Wang, Chao-Yuan Wang, Si-Li Chen, Jin Li, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Pin-Fang Yao, Huan-Yuan Huang, Cancer Institute, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Li-Dong Wang, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer Research, College of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of State Ethnic Affairs Commission of China, No. 07ZN09

Correspondence to: Jin Li, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, Hubei Province, China. lijn@mail.scuec.edu.cn

Received: 2009-05-22 Revised: 2009-07-20

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-28

polymorphism (SNP) rs679620 (Lys45Glu) in exon 2 of the matrix metalloproteinase-3 (MMP3) gene.

METHODS: The SNP rs679620 (Lys45Glu) in exon 2 of the MMP3 gene was genotyped by PCR-RFLP analysis in 1127 samples, of which 317 were collected from ESCC patients (227 from Henan Province and 90 from Hubei Province) and 810 were collected from control populations (432 from Hubei Province, 197 from Henan Province and 181 from Henan emigrants in Hubei Province).

RESULTS: The frequencies of G/G, G/A and AA genotypes in SNP rs679620 were significantly different between emigrants from an area of high incidence of ESCC in Henan Province and healthy population in Hubei Province (all $P < 0.01$). A significant difference was observed in the AA genotype frequency between ESCC patients from Henan Province and healthy controls from Hubei Province ($P < 0.05$). Significant differences were also noted in the frequencies of GG and AA genotypes between healthy controls from Hubei Province and Henan Province (43.1% vs 54.5% and 14.8% vs 8.5%, respectively; both $P < 0.01$).

CONCLUSION: The SNP rs679620 (Lys45Glu) in exon 2 of the MMP3 gene may be associated with susceptibility to ESCC.

Key Words: Chelex-100; DNA extraction; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; SNP genotyping; Esophageal squamous cell carcinoma; Genetic susceptibility

Ouyang G, Yao PF, Hu WJ, Huang HY, Wang H, Wang CY, Chen SL, Wang LD, Li J. Association of the single nucleotide polymorphism (Lys45Glu) in exon 2 of the matrix metalloproteinase-3 gene with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2456-2462

■同行评议者

刘彬彬, 副研究员, 复旦大学附属中山医院、复旦大学肝癌研究所

Abstract

AIM: To investigate the association of genetic susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) with the single nucleotide

摘要

目的: 探讨基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase 3, MMP3)基因外显子2中

Lys45Glu(rs679620)单核苷酸多态性与食管癌遗传易感的关系。

方法: Chelex-100法提取DNA模板; PCR-RFLP方法对1127例包括湖北省、河南省食管鳞癌患者与两地正常对照及河南移民样本的该SNP进行基因分型正常对照人群。

结果: 河南高发易感移民人群组与湖北正常人群对照组在GG、GA、AA 3种基因型频率上均有极显著差异(均 $P<0.01$); 河南高发区鳞癌组与湖北正常人群对照组在A/A基因型频率上有显著差异($P<0.05$); 湖北人群与河南人群在GG和AA基因型频率上差异极显著(43.1% vs 54.5%; 14.8% vs 8.5%, 均 $P<0.01$)。

结论: MMP3基因外显子2中Lys45Glu单核苷酸多态性与食管鳞癌的遗传易感性似有明显相关。

关键词: Chelex-100; 基因组DNA提取; 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性; SNP基因分型; 食管癌; 遗传易感

欧阳刚, 姚品芳, 胡文娟, 黄环元, 王红, 王朝元, 陈思礼, 王立东, 李劲. MMP3基因Lys45Glu单核苷酸多态性与食管鳞癌遗传易感性的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2456-2462
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2456.asp

0 引言

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类依赖锌离子的蛋白水解酶, 迄今为止在人基因组中已经发现了26种. MMPs可在细胞核内通过对基因的转录调控调节细胞的生长和凋亡, 影响血管生成和免疫监视等途径, 在肿瘤发生早期起重要作用^[1-2]; 也能够降解细胞外基质和基底膜, 涉及肿瘤浸润和转移, 在肿瘤的发展中起关键作用. MMP3基因位于人染色体11q22.3, 因为其启动子区-1171存在5A和6A的基因多态性与肿瘤易感性相关, 国内外对其进行了大量研究. Ghilardi *et al*^[3]研究结果表明, 5A基因型与乳腺癌易感性相关. Zinzindohoué *et al*^[4]认为, 5A基因型与头部和颈部鳞状细胞癌易感性相关. Tu *et al*^[5]研究结果表明, 5A基因型与口腔黏膜下纤维化(oral submucous fibrosis, OSF)患病风险相关, 与口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)患病风险不相关. 国内学者Zhang *et al*^[6]研究结果表明, 5A基因型与食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)易感呈相关性, 但他与贲门癌(gastric cardiac

adenocarcinoma, GCA)易感性不相关. 因此, 作为癌症遗传易感候选基因, MMP3应被更深入研究. 利用NCBI数据库查询MMP3基因, 8个外显子上共有10个cSNP(coding SNP), 其中存在氨基酸变化的SNP有4个, 他们分别是Lys45Glu、Trp109Gly、His113Pro及Arg248Trp. MMP3含有的多个核定位信号(nuclear localization signal, NLS)介导MMP3的细胞核内定位, MMP3第44-56位氨基酸的NLS₀(LK KDV KQF VRRKD)中含有SNP Lys45Glu(rs679620). MMP3第25-87位氨基酸区域是一种重要的蛋白多糖结合域(putative peptidoglycan binding domain, PG_binding_1), 该结合域有3个 α 螺旋, 具有PG_binding_1功能, N端为基质催化结合域^[7-9]. 在MMP3基因外显子2中, 第45位氨基酸, 存在一个Lys变为Glu(SNP编号为rs679620)的多态性位点, 其中Lys为带正电荷的氨基酸, Glu是带负电荷氨基酸. 第45位氨基酸正好在PG_binding_1中, 这种存在于编码区中的带电荷氨基酸和电荷性质的明显改变有可能会致MMP3蛋白结构的改变和功能的异常^[6]. 然而, MMP3基因外显子2中Lys45Glu的SNP多态性与食管癌的相关性尚未见报道. 本研究利用PCR-RFLP技术, 对湖北省食管鳞癌散发患者、高发易感移民人群及正常人群和河南省高发区食管鳞癌患者的SNP分型进行分析, 研究MMP3基因外显子2中Lys45Glu单核苷酸多态性与食管鳞癌的遗传易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 湖北省ESCC散发患者的EDTA抗凝静脉血, 由湖北省肿瘤医院收集, 患者病理检查证实均为ESCC; 湖北省钟祥的河南高发区(淅川)移民人群的EDTA抗凝静脉血, 由湖北省肿瘤医院收集, 经胃镜检查 and 活检病理证实为无食管炎等食管良性疾病; 河南高发区(安阳)食管癌患者和当地正常对照人群的EDTA抗凝静脉血, 由郑州大学基础医学院癌症研究室提供, 患者病理检查证实均为ESCC; 湖北正常对照为在中国人民解放军广州军区武汉总医院和武汉市中医院收集的EDTA抗凝静脉血, 为非癌症患者并经胃镜检查 and 活检病理证实为无食管炎等食管良性疾病. 所有标本均于-70℃保存. Chelex-100为Sigma分装, 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成, dNTP是ToYoBo的产品, Taq聚合酶购于天根生化科技(北京)公司, Taq I 限制性内切酶

■研究前沿

食管癌的发生与遗传、环境、饮食及某些微生物的感染密切相关, 食管癌是多因素作用, 多基因参与, 多阶段发展的疾病. 对食管癌的发生和发展的分子遗传机制的研究是我国癌症研究的热点之一。

■相关报道

国内学者王立东 *et al* 为了进一步探讨遗传和环境因素对食管和贲门癌变的影响, 对河南林州居民和山西长治林州移民食管、贲门和胃窦部癌前病变和癌的发生情况进行了检测分析, 提示环境和时间变化未明显影响食管和贲门癌前病变和癌的发生率, 提示遗传因素对食管和贲门癌变起重要作用。

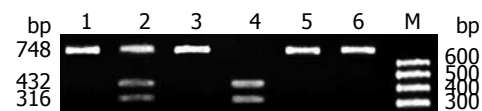


图1 MMP3基因外显子2 SNP(Lys45Glu-)区域PCR产物酶切分型的电泳图。1、3、5: 不同样品56℃未经酶切的PCR产物; 2、4、6: 1、3、5样品经过Taq I 酶切产物; M: Marker。

购于TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 分组: 本研究所用血样样本按来源和病理诊断共分5组。其中, 河南高发区(安阳)的ESCC患者有227例(男163例, 女64例); 河南高发区(安阳)的正常对照样本有197例(男135例, 女62例); 湖北省内河南浙川移民(来自2个移民自然村)正常对照样本有181例(男129例, 女52例); 湖北散发ESCC患者有90例(男65例, 女25例); 湖北的正常对照样本有432例(男281例, 女151例)。各实验组的个体年龄均大于40岁。各肿瘤组与各对照组相互间在性别、年龄的分布上均无统计学意义差异($P>0.05$)。

1.2.2 基因多态性分析: (1)引物设计及PCR模板制备: 正向引物为5'-CAACACCATAGCAGTAGCAGC-3'; 反向引物为5'-CAGCCTCTCCTTCATACAGCC-3'。Chelex-100法制备PCR模板见参考文献[10-13]。(2)PCR反应体系及反应程序: 按照Taq聚合酶使用说明书配制反应体系。PCR反应循环程序为: 94℃预变性5 min, 94℃变性1 min, 56℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 35个循环, 72℃延伸10 min。(3)PCR产物酶切及琼脂糖凝胶电泳检测: 分别取食管癌散发患者、高发易感移民人群、高发区患者和对照组正常人群的抗凝全血提取DNA, 进行PCR扩增, 按Taq I 限制内切酶使用说明书配制反应体系, PCR产物酶切后经琼脂糖凝胶电泳鉴定带型。PCR产物酶切非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及其银染检测见参考文献[14-18]。

统计学处理 各实验组的基因型分布利用Hardy-Weinberg平衡软件进行遗传平衡检验, 患者及对照组SNP基因型分布比较采用软件进行 χ^2 检验。将5个组3个分型的结果进行分类统计, 计算和比较各实验组基因型频率和基因频率。并与NCBI数据库中已知的不同人群G:A比值作比较(NCBI数据库中ss38804849和ss52088121所提供的中国北京市人群G:A比值为0.689:0.311; 欧洲人群G:A比值为0.433:0.567)。

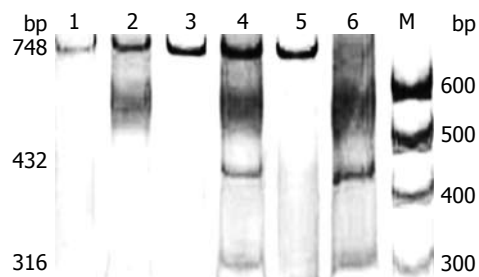


图2 MMP3编码区-748 bp 54℃ PCR后37℃酶切非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染结果。1、3、5: 未经酶切的PCR产物; 2、4、6: 1、3、5的Taq I 酶切产物; M: Marker。

2 结果

2.1 PCR产物酶切基因分型的琼脂糖凝胶电泳结果 本研究通过对湖北ESCC散发人群组, 河南高发易感移民人群组, 河南高发区ESCC人群组和湖北及河南正常人群对照组大量样本进行PCR-RFLP分析, 由于人类等位基因的存在, 样本中特异扩增的PCR产物经Taq I 完全酶切后可产生3种结果: (1)3种片段748、432、316 bp, 即杂合型半数酶切; (2)2种片段432、316 bp, 即纯和型完全酶切; (3)1种片段748 bp, 即纯和型不能酶切。在图1中分别显示为2、4、6号泳道的带型。其中, 随机抽样上述3种PCR产物的10%进行DNA测序验证, 其结果与酶切结果相符合。因此, 根据酶切结果产生片段可判断样品的基因型, 即在所研究的SNP位点处等位基因有GA、GG、AA分型。

2.2 PCR产物酶切基因分型的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的银染结果 2号泳道的基因型为纯合型, 2个等位基因为AA; 4号泳道的基因型为杂合型, 即2个等位基因为GA; 6号泳道的基因型为另一种纯合型, 即2个等位基因为GG。对照实验显示, 图2中500 bp和600 bp之间的略弥散条带, 是由酶切反应体系中的限制性内切酶Taq I 经银染后产生的。

2.3 基因分型的相关数据统计 MMP3 SNP rs679620基因多态性Lys45Glu在除河南浙川高发易感移民人群组外的其他各人群组基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$), 他表明实验中随机选择的湖北、河南两地正常对照和ESCC患者人群均能反映各对应人群的MMP3基因SNP Lys45Glu(rs679620)的基因型频率的自然分布状况。由表1的统计结果可知, 湖北正常人群的MMP3 SNP Lys45Glu(rs679620)基因频率G:A为0.651:0.349, 湖北散发病例的G:A为0.600:0.400; 河南安阳高发区正常人群的

表 1 实验分组人群的MMP3 SNP rs679620基因分型统计结果

分组	n	GG		GA		AA		Hardy-Weinberg 平衡(P值)	G : A
		n	%	n	%	n	%		
湖北正常人群	432	192	44.4	178	41.2	62	14.4	0.0511	0.651 : 0.349
湖北散发病例	90	33	36.7	42	46.6	15	16.7	0.0694	0.600 : 0.400
河南高发区正常	197	116	58.9	64	32.5	17	8.6	0.0665	0.751 : 0.249
河南高发区病例	227	115	50.6	93	41.0	19	8.4	0.9741	0.711 : 0.289
高发易感移民人群	181	54	29.8	117	64.6	10	5.5	4.86E-07	0.621 : 0.378

表 2 实验分组人群的MMP3 SNP rs679620基因分型

组间比较		GG		GA		AA	
		P值	χ^2 值	P值	χ^2 值	P值	χ^2 值
湖北散发病例组	湖北正常组	>0.05	1.84	>0.05	0.91	>0.05	0.32
河南高发区病例组	河南高发区正常组	>0.05	2.88	>0.05	3.25	>0.05	0.01
湖北正常组	河南高发区正常组	<0.01	11.29	>0.01	4.34	>0.01	4.03
湖北正常组	河南高发区病例组	>0.05	2.31	>0.05	0.00	>0.01	4.94
湖北散发病例组	河南高发区正常组	<0.01	12.21	>0.01	5.33	>0.01	4.03
湖北散发病例组	河南高发区病例组	>0.01	5.07	>0.05	0.86	>0.01	4.63
湖北散发病例组	高发易感移民组	>0.05	1.29	<0.01	8.01	<0.01	8.91
湖北正常组	高发易感移民组	<0.01	11.33	<0.01	28.07	<0.01	10.77
河南高发区病例组	高发易感移民组	<0.01	18.00	<0.01	22.59	>0.05	1.23
河南高发区正常	高发易感移民组	<0.01	32.17	<0.01	39.08	>0.05	1.23

表 3 湖北与河南人群的MMP3 SNP-rs679620基因分型统计

分组	n	GG		GA		AA		Hardy-Weinberg 平衡(P值)	G : A
		n	%	n	%	n	%		
湖北人群 (湖北病例+正常人群)	522	225	43.1	220	42.1	77	14.8	0.0567	0.642 : 0.358(1.8)
河南人群 (河南病例+正常人群)	424	231	54.5	157	37.0	36	8.5	0.2108	0.730 : 0.270(2.7)
P值		<0.01		>0.05		<0.01			
χ^2 值		12.13		2.56		8.72			

G : A为0.751 : 0.249, 河南安阳高发区病例的G : A为0.711 : 0.289, 安阳人群的G : A值偏高; 而河南淅川高发易感移民人群的G : A为0.621 : 0.378, 其比例偏低。

经 χ^2 检验, (1)河南高发区癌症组与湖北正常人群对照组在AA基因型频率上有显著差异($P<0.05$); 河南高发区癌症组与湖北散发癌症组在AA基因型频率上也有显著差异($P<0.05$)。 (2)河南高发易感移民人群组与湖北正常人群对照组

在GG、GA、AA基因型频率上均有极显著差异($P<0.01$); 并且河南高发易感移民人群组与湖北散发癌症组在除GG外的GA、AA基因型频率上也有显著极差异($P<0.01$)。 (3)而湖北正常人群对照组与湖北散发癌症组及河南高发区正常人群对照组和河南高发区病例组在GG、GA、AA基因型频率上均无显著差异($P>0.05$); 但河南高发区的正常人群和病例组与河南高发易感移民人群组在AA基因型频率上无显著差异($P>0.05$, 表2)。

■创新盘点

本研究发现在基质金属蛋白酶3的第45个氨基酸的同一位置上拥有赖氨酸的人比具有谷氨酸的人更容易患食管癌并且也更快的导致癌症的转移。这也是食管癌高发区特别是一些高发家族里有较多人患食管癌并且预后很差的原因之一。

■同行评价

本研究样本量大, 结果可信, 表述清晰, 具有较好的学术价值。

表 4 自然人群的MMP3 SNP-rs679620基因分型统计结果

分组	n	GG		GA		AA		Hardy-Weinberg 平衡(P值)	G : A
		n	%	n	%	n	%		
北京人(NCBI)	90	46	51.1	32	35.6	12	13.3	0.1057	0.689 : 0.311
美国黑人(NCBI)	124	44	35.5	60	48.4	20	16.1	0.9520	0.597 : 0.403
欧洲人(NCBI)	120	16	13.3	72	60.0	32	26.7	0.0151	0.433 : 0.567

表3显示的人群基因型频率中, 河南人群的A/A纯合型较湖北人群偏少(8.5% vs 14.8%), 而河南人群的G/G纯合型偏多, 湖北人与河南人的总G/A是1.8 : 2.7. 两地人群在GG和AA基因型频率上差异极显著, 在GA型上无差异。

2.4 MMP3 SNP-rs679620基因分型与其他地区人群的比较 湖北与河南两地人群的3种基因型频率与北京人群相比均无明显差异; 但与NCBI数据库提供的美国黑人和欧洲人基因频率G : A比0.597 : 0.403和0.433 : 0.567相比有明显不同. 表4中不同自然人群MMP3基因SNP Lys45Glu(rs679620)的基因型频率和基因频率呈现出由小到大的规律性排序. 除GA型北京人群(35.6%)与河南人群(37.0%)的基因型频率很接近而可认为差别不大外, 其余的排序皆为: 河南人群→北京人群→湖北人群→美国黑人→欧洲人群(表4)。

3 讨论

湖北省钟祥柴湖乡在50多年前因整体迁入河南淅川食管癌高发区居民(约4万人)而成为一个新的相对封闭的食管癌高发区. 这一特殊的人群为研究环境、遗传与食管癌的关系提供了极佳的样本. 2004年初湖北省肿瘤医院对钟祥柴湖乡进行的流行病学调查结果显示, 该迁移人群人口已增长至10万多人, 其食管癌的发病率、死亡率较20世纪70年代仍呈上升趋势(>131/10万)^[19-20]. 在普查的过程中, 利用电子内窥镜检查发现, 移民村的居民与湖北当地的土著居民相比较食管生理结构存在明显异常. 对湖北钟祥柴湖乡河南移民居住地的饮用的地下水情况和上千份的流行病学问卷调查初步显示, 地下水各项指标经专业部门检测未见污染超标, 该人群的生活习惯和生活水平也与40多年前有较大改变. 仅少数人喜食腌菜和烫食. 尤为突出的是家族食管癌高发现象, 一些家族食管癌的发病率、死亡率远远高于131/10万. 与环境因素相比, 极为明显的食管癌的家族聚集趋势提示家系遗

传因素在食管癌变过程中起着重要作用^[19-20].

显著的地域性分布差异是食管癌显著的流行病学特征, 高低发区发病率和死亡率可相差500倍. 环境和遗传因素在食管癌发病中起重要作用. 国内学者王立东 *et al* 为了进一步探讨遗传和环境因素对食管和贲门癌变的影响, 对河南林州居民和山西长治林州移民食管、贲门和胃窦癌前病变和癌的发生情况进行了检测分析^[21]. 他们发现, 移居到200 km以外的山西长治韩店镇的林州居民后裔的食管癌和贲门癌的人群检出率与河南食管癌高发区林州市姚村镇相似, 而韩店镇移民贲门重度癌前病变DYS和IM检出率高于林州居民. 这些居民已在山西长治连续4代居住100年, 生活习惯、环境已与山西当地情况相似, 与林州地区的生活环境已有较大变化. 说明环境和时间变化未明显影响食管和贲门癌前病变和癌的发生率, 提示遗传因素对食管和贲门癌变起重要作用. 了解这些移民的食管癌和癌前病变的发生状况, 并与林州地区和移民当地居民进行比较, 将提供非常有价值的有关食管癌发病因素的信息^[21].

MMP3又叫间质溶素1, 其基因位于11q22, 作用于细胞外基质(extra cell matrix, ECM)和基底膜(basement membrane, BM)中的IV型胶原, 并可激活其他MMPs如激活MMP1前体成为MMP1, 而MMP1可降解I、II、III型胶原, 所以MMP3在肿瘤的浸润、转移中起重要作用^[22]. 早期认为, MMPs仅参与肿瘤的侵袭和转移, 近年研究显示, MMPs可通过调节细胞生长和凋亡、影响血管生成和免疫监视等途径, 在肿瘤形成早期起重要作用^[1]. MMP3可以降解层粘连蛋白和纤粘连蛋白, 对肿瘤发生和肿瘤生长具有重要意义.

近来有学者报道, MMP3也存在于肝细胞核内并且参与细胞凋亡的过程^[2]. 进一步的研究表明, MMP3含有的多个NLS介导MMP3的细胞核内定位; 其多肽链C末端的PEX区域参与核内DNA的结合, 并证实了MMP3作为反式因子参

与细胞核内基因的转录调控^[23]. 其中, MMP3第44-56位氨基酸的NLS₀(LKDVDKQFVRRKD)中含有SNP Lys45Glu(rs679620), 他的多态性对NLS₀的影响及其后续的转录调控和细胞凋亡的改变可能与癌症的发生和发展相关.

已发现MMP1、MMP2、MMP3基因多态性与一些肿瘤的遗传易感性相关, 进一步研究MMPs家族其他成员与肿瘤易感性的关系将为肿瘤的预防和早期诊断及治疗提供更完善的分子生物学基础^[22]. 随着MMPs在肿瘤发生、发展和转移中的作用机制研究的进展, 将会进一步了解有关基因编码区单核苷酸多态性对MMPs蛋白功能、酶活性和在细胞代谢调控中的影响, 进而揭示其在诱发肿瘤及其导致肿瘤转移中的作用机制. 迄今为止, 对MMPs与肿瘤的关系的研究大都集中在研究基因启动子区域的SNP现象, 比如MMP1、MMP3、MMP9, 而对结构基因的SNP筛查和研究报道甚少^[24].

利用NCBI数据库查询发现, MMP3的第25-87位氨基酸是一个重要的PG_binding_1. 利用NCBI和网上生物软件motif scan(网址: http://hits.isb.ch/cgi-bin/motif_scan)分析MMP3的氨基酸序列, 在PG_binding_1涵盖的25-87位氨基酸中发现3个重要的位点, 他们分别为: 第36-42位氨基酸为酪氨酸蛋白激酶磷酸化位点; 第54-57位氨基酸为cAMP磷酸化位点; 第76-78位氨基酸为蛋白激酶C磷酸化位点. 基因多态位点Lys45Glu恰好位于PG_binding_1内, 并且在第36-42位氨基酸为酪氨酸蛋白激酶磷酸化位点附近, Lys为带正电荷的氨基酸, Glu是带负电荷氨基酸, 这种存在于编码区的通常参与信号转导过程的氨基酸的电荷的改变可能会导致MMP3蛋白相应三维结构的变化, 从而引起其功能的改变, 如信号转导异常, 最终导致个体对特定环境或病因的反应敏感性改变^[6].

本研究统计结果显示, 除河南浙川高发易感移民人群组外的其他各人群组基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$). 他表明实验中随机选择的湖北、河南两地正常对照人群和两地ESCC患者人群均能反映各对应人群的MMP3基因SNP Lys45Glu(rs679620)的基因型频率的自然分布状况. 但河南浙川高发易感移民人群组的遗传不平衡结果结合我们在当地的流行病学调查的情况, 反映出与其人群的相对封闭狭小(2个全河南人的移民自然村)和普遍的族群内部通婚(大多为沙姓大家族)引起的遗传漂

移有关. 两村40岁以上200多人的电子胃镜普查发现有2例ESCC原位癌加上食管组织轻度及重度增生各1例; 与大多土著湖北人食管壁较光滑不同, 很多被筛查的移民自然村村民的食管壁呈现较多小突起状颗粒. 值得注意的是, 河南浙川移民人群与河南高发区(安阳)癌症组和正常组在基因型GG和GA上有显著差异($P<0.01$), 但在AA基因型上无差异($P>0.05$)且移民人群组AA型比例最低(5.5%).

河南高发易感移民人群组(河南浙川4万人移民至湖北柴湖^[19])与湖北正常人群对照组在GG、GA、AA 3种基因型频率上均有极显著差异($P<0.01$); 河南高发区癌症组与湖北正常人群对照组在AA基因型频率上有显著差异($P<0.05$). 提示SNP(Lys45Glu)与食管癌的遗传易感性有明显相关. 河南高发区正常组与河南高发区病例组在GG、GA、AA 3种基因型频率上均无显著差异($P>0.05$); 同样, 湖北正常人群对照组与湖北散发癌症组在GG、GA、AA 3种基因型频率上也无显著差异($P>0.05$); 并且湖北散发癌症组与河南高发易感移民人群组在除GG外的GA、AA 2种基因型频率上都有极显著差异. 似乎提示, 非SNP(-Lys45Glu-)因素(环境因素或其他遗传因素)是湖北散发癌症组人群患食管癌的原因, 也即湖北与河南人群罹患食管癌的机制可能是有所不同的. 统计结果显示湖北与河南两地人群(包括正常组与癌症组)在MMP3 SNP(rs679620)的GG和AA基因型频率上差异极显著, 也提示ESCC的河南人高发群发机制与湖北人低发散发的机制是有所不同的.

河南高发易感移民人群组(浙川)与河南高发区癌症组(安阳)在SNP(rs679620)基因型GG和GA上有显著差异, 在AA基因型上无显著差异; 结合湖北人群(包括正常人群和散发癌症患者)在A/A基因型上与河南人群(包括浙川正常人群和安阳散发癌症患者)的显著差异(14.9% vs 5.42%), 表明河南人群在MMP3基因外显子-2的SNP Lys45Glu中具有明显较低的AA基因型频率可能与其食管鳞癌的遗传易感有一定的关联性. 这种不同人群中SNP的由G变为A的改变导致MMP3氨基端的PG_binding_1中带正电荷的Lys改变为带负电荷的Glu, 暗示其对MMP3在细胞核内定位、核内基因的转录调控和细胞凋亡的过程中作用的影响及其与肿瘤的高发和易感性有某种关联. 而河南人群较高的GG基因型频率似乎提示他可能与ESCC的浸润和转移及预后

很差有关。

另外, 河南高发区癌症组(安阳)与湖北散发癌症组在GG、GA 2种基因型频率上均无显著差异($P>0.05$), 可能与湖北散发癌症组的样本数量(90例)较少而存在统计误差有关, 他会在以后的研究深入过程中, 通过扩大样本的收集量而得到修正。

本研究结果与已报道的这些不同人群的ESCC的发病率和易感性从高到低的排列顺序相吻合^[25]。这种趋势似乎提示, GG型MMP3对食管鳞癌的发生和发展有某种促进作用, 而AA型MMP3则正好相反。当然, 这还需进一步的实验来证实。

总之, 通过对1127例食管癌和正常对照样本的SNP分型及统计分析表明, MMP3基因外显子2中Lys45Glu单核苷酸多态性与ESCC的部分人群高发和遗传易感性呈现明显的相关性。

4 参考文献

- 1 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174
- 2 Si-Tayeb K, Monvoisin A, Mazzocco C, Lepreux S, Decossas M, Cubel G, Taras D, Blanc JF, Robinson DR, Rosenbaum J. Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol* 2006; 169: 1390-1401
- 3 Ghilardi G, Biondi ML, Caputo M, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3820-3823
- 4 Zinzindohoué F, Blons H, Hans S, Lorient MA, Houllier AM, Brasnu D, Laccourreye O, Tregouet DA, Stucker I, Laurent-Puig P. Single nucleotide polymorphisms in MMP1 and MMP3 gene promoters as risk factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 2021-2026
- 5 Tu HF, Liu CJ, Chang CS, Lui MT, Kao SY, Chang CP, Liu TY. The functional (-1171 5A-->6A) polymorphisms of matrix metalloproteinase 3 gene as a risk factor for oral submucous fibrosis among male areca users. *J Oral Pathol Med* 2006; 35: 99-103
- 6 Zhang J, Jin X, Fang S, Li Y, Wang R, Guo W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wei L, Kuang G, Dong Z. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric cardiac adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2519-2524
- 7 Foster SJ. Cloning, expression, sequence analysis and biochemical characterization of an autolytic amidase of *Bacillus subtilis* 168 trpC2. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 1987-1998
- 8 Dideberg O, Charlier P, Dive G, Joris B, Frère JM, Ghuysen JM. Structure of a Zn²⁺-containing D-alanyl-D-alanine-cleaving carboxypeptidase at 2.5 Å resolution. *Nature* 1982; 299: 469-470
- 9 Gooley PR, O'Connell JF, Marcy AI, Cuca GC, Salowe SP, Bush BL, Hermes JD, Esser CK, Hagmann WK, Springer JP. The NMR structure of the inhibited catalytic domain of human stromelysin-1. *Nat Struct Biol* 1994; 1: 111-118
- 10 欧阳刚, 胡文娟, 姚品芳, 王红, 陈思礼, 王朝元, 李劲. PCR-RFLP中Chelex-100制备DNA模板的方法建立及其条件的优化. *中南民族大学学报(自然科学版)* 2009; 28: 38-41
- 11 张源明, 钟良军, 陈晓涛, 南晓红, 朱子彤. Chelex 100法从颊粘膜拭子提取DNA进行基因型分析的研究. *新疆医科大学学报* 2003; 26: 430-431
- 12 周月琴, 朱伟, 刘志萍, 吴文庆. 用Chelex-100快速提取微量血痕中的DNA. *复旦学报(医学版)* 2003; 30: 379-380
- 13 庾蕾, 庄志雄, 叶小明, 甘永霞, 杨学艳. 血痕Chelex 100抽提DNA用于人类TNF- α 基因启动子区SNP分型. *生物技术通报* 2005; 4: 43-45
- 14 J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 1716
- 15 Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991; 196: 80-83
- 16 方卫国, 韦宇拓, 裴炎. 一种新的DNA银染方法. *遗传* 2000; 22: 167-168
- 17 韩永亮, 常金华. 聚丙烯酰胺凝胶电泳的两种染色方法对SSR标记的影响. *杂粮作物* 2006; 26: 176-177
- 18 关海涛, 徐世昌, 郭玉华. 两种聚丙烯酰胺凝胶银染方法的比较. *沈阳农业大学学报* 2006; 37: 86-87
- 19 姚品芳, 黄环元, 付由高, 李广灿, 夏和顺, 杨小玲, 王瑞勤, 王锡印, 沙聚伟. 湖北钟祥河南移民与湖北本地居民食管鳞状细胞癌组织中HPV感染的比较. *肿瘤防治研究* 2005; 32: 46-48
- 20 Yao PF, Li GC, Li J, Xia HS, Yang XL, Huang HY, Fu YG, Wang RQ, Wang XY, Sha JW. Evidence of human papilloma virus infection and its epidemiology in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1352-1355
- 21 王立东, 刘宾, 冯常伟, 张延瑞, 张彦霞, 李苹娟, 常扶保, 李吉林, 高福生, 冯笑山, 高珊珊, 何欣, 范宗民, 狄霞, 吴会芳, 焦新英, 常志伟, 王俊宽, 刘小莉, 邵珊, 吕晓东, 王苒, 孙哲, 周建伟, 江亚南, 杜芳, 韩涛, 李琮宇, 刘卫娜, 秦豫培, 王能超, 李韶华, 周丽, 温巍, 张广平, 邹大余, 樊宇靖, 杜娟娟. 山西长治林州移民与河南林州居民食管、贲门和胃窦内镜病理结果比较. *郑州大学学报(医学版)* 2006; 41: 5-9
- 22 金霞, 张健慧. 基质金属蛋白酶基因多态性的研究进展. *国外医学·遗传分册* 2005; 28: 76-79
- 23 Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 2391-2413
- 24 葛金梅, 张忠英, 彭宣宪, 任建林. SNP的研究现状及在MMPs研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2128-2137
- 25 张汝刚, 高宗人, 赫捷. 食管癌. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 51

编辑 李军亮 电编 何基才

多药耐药基因产物在大肠癌组织中的表达及临床意义

魏学明, 顾国利, 任力, 李德昌, 王石林, 宁守斌, 熊梅

魏学明, 顾国利, 王石林, 中国人民解放军空军总医院普通外科 北京市 100142

任力, 李德昌, 熊梅, 中国人民解放军空军总医院病理科 北京市 100142

宁守斌, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100142

魏学明, 副主任医师, 主要从事胃肠肿瘤外科的临床和基础研究。
作者贡献分布: 魏学明与顾国利对此文所作贡献均等; 此课题由魏学明、顾国利及任力共同设计; 宁守斌负责肠镜检查与标本收集; 试验过程由熊梅、李德昌及顾国利完成; 试验结果判定由任力和李德昌完成; 临床资料收集和数据统计分析由魏学明、顾国利及宁守斌完成; 本论文写作由魏学明与顾国利完成。

通讯作者: 魏学明, 副主任医师, 100142, 北京市, 中国人民解放军空军总医院普通外科. kzwxm@163.com

电话: 010-66928302

收稿日期: 2009-06-30 修回日期: 2009-08-11

接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-08-28

Clinical significance of the expression of multidrug resistance gene products in colorectal carcinoma

Xue-Ming Wei, Guo-Li Gu, Li Ren, De-Chang Li, Shi-Lin Wang, Shou-Bin Ning, Mei Xiong

Xue-Ming Wei, Guo-Li Gu, Shi-Lin Wang, Department of General Surgery, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Li Ren, De-Chang Li, Mei Xiong, Department of Pathology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Shou-Bin Ning, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China

Correspondence to: Xue-Ming Wei, Department of General Surgery, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China. kzwxm@163.com

Received: 2009-06-30 Revised: 2009-08-11

Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To detect the expression of multidrug resistance gene product in colorectal carcinoma (CRC) and analyze their significance in the chemotherapy for CRC.

METHODS: Fifty-six CRC patients who underwent radical surgery from May 2007 to May 2009 at our hospital were randomly selected. Ten healthy subjects who underwent colonoscopy and biopsy were randomly selected as controls. The streptavidin-peroxidase (SP) immunohistochemistry was used to detect the expression of GST- π , P-gp, Topo-II, TS and MRP in CRC

tissues and normal mucosal tissues. The clinicopathological data of the patients were analysed retrospectively.

RESULTS: The expression of GST- π , P-gp, Topo-II, TS and MRP proteins showed significant differences between CRC patients and control patients (all $P < 0.01$ or 0.05). The positive expression rates of GST- π , P-gp, Topo-II, TS and MRP proteins in CRC were 73.2% (41/56), 66.1% (37/56), 48.2% (27/56), 41.1% (23/56) and 37.5% (21/56), respectively. The positive expression rates of these proteins were closely correlated with histological type and degree of differentiation, but not correlated with patient sex, age, tumors site, tumor size, invasive depth and lymph node metastasis.

CONCLUSION: The expression of GST- π , P-gp, Topo-II, TS and MRP proteins in CRC shows obvious heterogeneity. The overexpression of these protein underlies the multidrug resistance in CRC.

Key Words: Colorectal carcinoma; Multidrug resistance; Chemotherapy; Immunohistochemistry

Wei XM, Gu GL, Ren L, Li DC, Wang SL, Ning SB, Xiong M. Clinical significance of the expression of multidrug resistance gene products in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2463-2468

摘要

目的: 探讨大肠癌组织中多药耐药基因产物的表达特点及其对大肠癌化疗的指导意义。

方法: 随机选取2007-05/2009-05空军总医院普通外科行根治性手术的大肠癌患者56例组成试验组, 选取在消化内科门诊健康体检行肠镜活检患者10例组成对照组。应用免疫组织化学法检测两组标本中GST- π 、P-gp、Topo-II、TS和MRP的表达, 并结合其临床病理资料进行回顾性分析。

结果: GST- π 、P-gp、Topo-II、TS和MRP在实验组和对照组间的表达差异显著($P < 0.01$ 或 < 0.05), GST- π 、P-gp、Topo-

■背景资料

大肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 化疗是治疗进展期大肠癌的重要措施, 其成败将直接关系到大肠癌患者的预后。目前临床上虽然对大肠癌患者提倡进行个性化的联合化疗方案, 但具体疗效仍不尽人意; 肿瘤的多药耐药性(MDR)是最主要的原因。

■同行评议者

谢敏, 主任医师, 南京大学医学院附属鼓楼医院普外科; 傅华群, 教授, 南昌大学第二附属医院普外科; 沈柏用, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

■创新盘点

本研究采用免疫组织化学SP法联合检测GST- π 、P-gp、Topo-II、TS和MRP在大肠癌肿瘤组织中的表达,探讨多药耐药基因产物的表达与大肠癌的临床病理特征的关系,为临床上判定大肠癌对化疗的敏感性提供客观的参考指标。同时,也为大肠癌患者制定个性化化疗方案提供理论指导。

II、TS和MRP在大肠癌中的阳性表达率依次为73.2%(41/56)、66.1%(37/56)、48.2%(27/56)、41.1%(23/56)和37.5%(21/56)。他们的表达与性别、年龄、肿瘤部位、大小、侵袭深度和转移与否均无关,而与肿瘤的分化程度和组织学类型密切相关。

结论: GST- π 、P-gp、Topo-II、TS和MRP在大肠癌表达存在明显的异质性,其高表达是大肠癌多药耐药产生的基础。

关键词: 结直肠肿瘤; 多药耐药性; 化疗; 免疫组织化学

魏学明, 顾国利, 任力, 李德昌, 王石林, 宁守斌, 熊梅. 多药耐药基因产物在大肠癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志. 2009; 17(24): 2463-2468

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2463.asp>

0 引言

大肠癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一,化疗是进展期大肠癌治疗的重要临床措施^[1-2]。术前新辅助化疗可降低大肠癌分期、改善术式选择、提高近期疗效;术后化疗可抑制大肠癌复发、治疗肿瘤转移。因此,化疗的成败将直接关系到大肠癌患者的预后^[3]。其疗效取决于肿瘤对化疗药物的敏感程度,这由肿瘤自身的生物学特性决定^[4]。虽然目前临床上对大肠癌提倡进行个性化联合化疗方案,但临床疗效仍不十分满意;肿瘤的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是最主要的原因^[5]。因此,明确相关耐药基因产物在大肠癌肿瘤组织中的表达特点对了解大肠癌的生物学特性、指导大肠癌患者个性化医疗具有重要的临床意义。研究发现^[6-10]: 胎盘型谷胱甘肽-S-转移酶- π (glutathione-s-transferase π , GST- π)、P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、拓扑异构酶II(topoisomerase II, Topo-II)、胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)和多药耐药相关蛋白(multidrug resistance related protein, MRP)与肿瘤化疗的多药耐药密切相关。我们采用免疫组织化学方法联合检测大肠癌肿瘤组织中GST- π 、P-gp、Topo-II、TS和MRP的表达特点,探讨其与临床病理特征的关系,为临床判定大肠癌对化疗的敏感性提供客观的参考指标。同时,也为大肠癌患者制定个性化化疗方案提供理论依据。

1 材料和方法

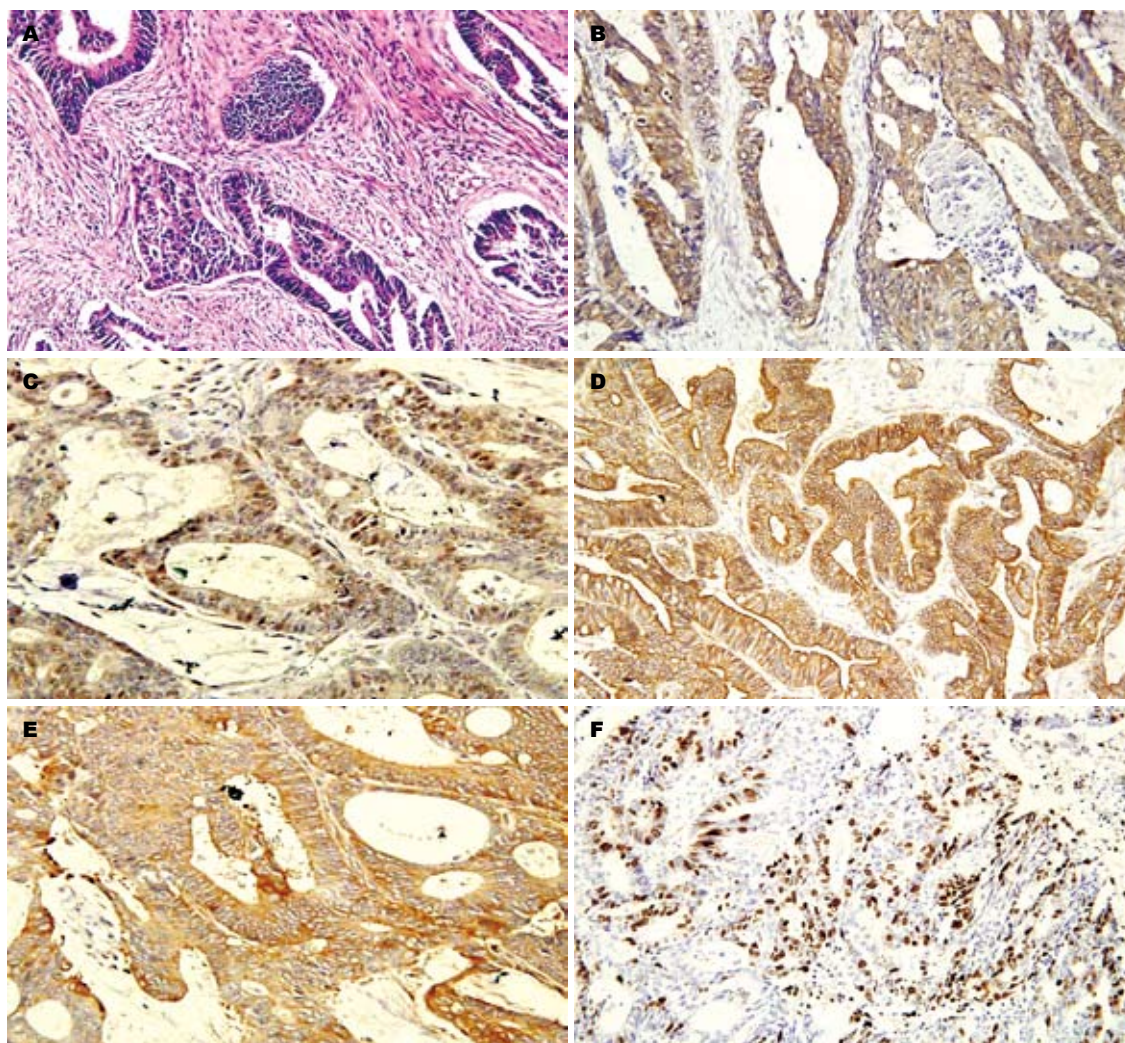
1.1 材料 随机选取2007-05/2009-05我院普通外

科行根治性手术的大肠癌患者56例组成试验组;消化内科门诊行肠镜检查、无结直肠肿瘤病史、组织学结果正常者10例组成对照组。所有病理标本均经甲醛固定、石蜡包埋,并经HE染色组织学确诊。全部病例术前均未行放化疗。即用型GST- π 鼠抗人mAb(产品编号: ZM-0110, 克隆号: LW29)、即用型P-gp鼠抗人mAb(产品编号: ZM-0179, 克隆号: C494)、即用型Topo-II鼠抗人mAb(产品编号: ZM-0245, 克隆号: 3F6)、即用型TS鼠抗人mAb(产品编号: ZM-0259, 克隆号: TS106)、即用型MRP鼠抗人mAb(产品编号: ZM-0345, 克隆号: OCRL-1)、通用型SP检测试剂盒(SP-9000)、DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。试验由LAB Vision Autostainer360自动染色仪系统(福建迈新公司)程控完成、镜下图像以Olympus Dp70图像采集分析仪进行采集、分析。

1.2 方法 切片常规脱蜡至水, PBS浸泡5 min; GST- π 无需抗原修复, P-gp、Topo-II经10 mmol/L pH6.0的EDTA修复液高压加热抗原修复, TS、MRP经1 mmol/L pH9.0的EDTA修复液高压加热抗原修复。30 mL/L H₂O₂孵育10 min, PBS冲洗, 2 min×3次。滴加正常山羊血清工作液孵育10 min; 倾去, 勿洗。滴加一抗37℃孵育1.5 h, PBS冲洗2 min×3次。滴加二抗37℃孵育20 min, PBS冲洗2 min×3次。滴加辣根酶标记链霉卵白素37℃孵育30 min, PBS冲洗2 min×3次。DAB显色, 冲洗, 复染, 脱水, 透明, 封片。PBS代替一抗作阴性对照, 正常大肠黏膜上皮表达作阳性对照。

GST- π 、TS定位于细胞质; P-gp、MRP定位于细胞膜和细胞质; Topo-II定位于细胞核。在200倍的视野下随机选取10个视野, 记数每个视野中肿瘤细胞的染色情况, 取平均值。结果判定^[11]: 以定位部位中出现粗细一致的棕黄色颗粒为阳性染色。按切片中阳性细胞占全部细胞数的百分数对表达强度进行分级: 阳性细胞数<10%定为阴性, 10%-25%阳性定为阳性(+), 25%-75%明显阳性定为中度阳性(++), >75%阳性则为强阳性(+++)。评分过程由两名高年资病理科医生独立完成。

统计学处理 应用SPSS15.0统计软件包进行统计分析。计数资料采用2个(或多个)样本率比较的 χ^2 检验, 正态分布的计量资料采用随机设计的两总体均数的t检验, 积分相关性采用Spearman等级相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。



■应用要点
联合检测 GST- π 、P-gp、Topo-II、TS和MRP在大肠癌肿瘤组织中的表达可作为判断大肠癌预后和对化疗敏感性的有效指标。这有助于为大肠癌患者制定和提供疗效更好、敏感性更高、不良反应更小的个体化治疗措施。

图1 GST- π 、P-gp、Topo-II、TS、MRP在大肠癌组织中的表达(SP \times 200)。A: 大肠中分化腺癌; B: GST- π 阳性表达; C: TS阳性表达; D: P-gp阳性表达; E: MRP阳性表达; F: Topo-II阳性表达。

2 结果

2.1 一般材料 试验组共有56例, 男31例, 女25例; 年龄39-83(中位年龄 61.42 ± 13.32)岁; 肿瘤大小2.6-11.2(平均 5.81 ± 2.16) cm; 部位: 结肠29例, 直肠27例; 分化类型: 高分化腺癌6例、中分化腺癌15例, 低分化腺癌21例、黏液腺癌14例。肿瘤组织侵及黏膜及黏膜下12例, 侵入肌层19例, 侵入浆膜或浆膜外25例; 无淋巴结转移28例, 1-5枚淋巴结转移19例, 5枚以上淋巴结转移9例。TNM分期: I期10例, II期17例, III期20例, IV期9例。对照组共10例, 男7例, 女3例; 年龄42-66(中位年龄 56.26 ± 8.47)岁; 结肠6例, 直肠4例。2组患者在性别、年龄、标本部位方面无统计学差异。

2.2 GST- π 、P-gp、Topo-II、TS和MRP在大肠癌肿瘤组织中的表达 GST- π 、TS蛋白呈棕黄色细颗粒表达于胞质(图1); 肿瘤间质不染色。P-gp、MRP主要表达于细胞膜和细胞质, 呈棕

褐色颗粒状; 肿瘤间质不染色(图1)。Topo-II主要表达于细胞核, 呈棕褐色颗粒状, 肿瘤间质不染色(图1)。大肠癌组中GST- π 、P-gp、Topo-II、TS、MRP的阳性表达率依次为: 73.2%(41/56)、66.1%(37/56)、48.2%(27/56)、41.1%(23/56)、37.5%(21/56)。除GST- π 有1例在正常大肠黏膜上有弱阳性表达外, 其余在正常大肠黏膜上均无阳性表达。2组间差异显著(GST- π : $\chi^2 = 12.05$, $P < 0.01$; P-gp: $\chi^2 = 12.47$, $P < 0.01$; Topo-II: $\chi^2 = 6.29$, $P < 0.05$; TS: $\chi^2 = 4.62$, $P < 0.05$; MRP: $\chi^2 = 4.03$, $P < 0.05$)。

2.3 GST- π 、P-gp、Topo-II、TS和MRP表达与大肠癌临床病理特点之间的关系 由表1可知, GST- π 、P-gp、Topo-II、TS、MRP的表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、大小、侵袭深度及转移与否均无关, 而与肿瘤分化类型密切相关: GST- π 、P-gp、Topo-II、TS、MRP随肿瘤分化

■同行评价

本研究选题较好,设计合理,结果可靠,具有很好的临床参考价值。

表 1 GST- π 、P-gp、Topo-II、TS、MRP表达与大肠癌临床病理参数之间的关系

因素	n	GST- π		P-gp		Topo-II		TS		MRP	
		(-)	(+)-(+++)	(-)	(+)-(+++)	(-)	(+)-(+++)	(-)	(+)-(+++)	(-)	(+)-(+++)
性别											
男	31	7	24	11	20	16	15	19	12	20	11
女	25	8	17	8	17	13	12	14	11	15	10
年龄(岁)											
≤45	13	5	8	7	6	9	4	9	4	8	5
46-60	29	4	25	11	18	12	17	15	14	17	12
>60	14	6	8	7	7	8	6	9	5	10	4
肿瘤大小(cm)											
≤5	21	7	14	10	11	11	10	12	9	15	6
>5	35	8	27	9	26	18	17	21	14	20	15
肿瘤部位											
结肠	29	6	23	15	14	14	15	16	13	16	13
直肠	27	9	18	14	13	15	12	14	10	19	8
分化											
高分化	6	4	2	4	2	5	1	6	0	6	0
中分化	15	8	7	10	5	14	1	14	1	15	0
低分化	21	2	19 ^a	3	18 ^a	7	14 ^a	3	14 ^a	8	13 ^a
黏液腺癌	14	1	13 ^a	2	12 ^a	3	11 ^a	6	8 ^a	6	8 ^a
侵袭深度											
浆膜内	31	8	23	10	21	17	14	17	14	19	12
浆膜及以外	25	7	18	9	16	12	13	16	9	16	9
淋巴结转移											
无	28	5	23	7	21	15	13	15	13	17	11
1-5枚	19	7	12	8	11	9	10	12	7	13	6
>5枚	9	3	6	4	5	5	4	6	3	5	4

^aP<0.05 vs 高分化、中分化。

程度的降低表达阳性率逐渐升高。统计学差异显著(高分化和中分化之间无差异,低分化和黏液腺癌之间无差异,但高中分化与低分化、黏液腺癌组间差异显著)。

3 讨论

肿瘤的MDR是指肿瘤细胞被一种药物诱发耐药后,同时对其他多种结构和作用机制完全不同的药物产生交叉耐药的一种现象^[12-14];这是导致大肠癌化疗失败的主要原因之一。MDR是一个多基因参与、涉及多种基因产物的复杂过程。目前已发现耐药谱明确的耐药基因有11种^[15],分为:药泵蛋白、药物代谢酶类、DNA修复酶、蛋白质合成限速酶等。不同肿瘤所具有的耐药表型各异,这可能是单种耐药基因或多种耐药基因同时表达的结果。目前已明确的MDR机制有以下4种^[16-17]:(1)典型MDR(由MDR1及其产物P-gp介导);(2)非典型MDR(由Topo-II介导);

(3)GST- π 表达;(4)TS表达。

P-gp与MRP分别由MDR1和MRP基因编码,同属三磷酸腺苷结合盒(ATP binding cassette, ABC)跨膜转运蛋白超家族^[18]。两者均通过与细胞内化疗药物结合、借助ATP供能将药物“泵”出细胞外,使细胞内化疗药物浓度下降、毒性减低或消失从而达到耐药作用。因此,P-gp与MRP具有相似的耐药谱,都是对疏水性抗癌药(如:蒽环类、长春碱类、表鬼臼毒素类、放线菌素D、米托蒽醌、紫杉碱等)起作用^[19],其中MRP对紫杉碱类更敏感。研究证实^[20]:P-gp高表达与肿瘤转移潜能、低缓解率、高复发率、化疗疗效差、生存期短等密切相关。本研究显示:P-gp在大肠癌中阳性表达率(高达66.1%)明显高于MRP,且与大肠癌的分化程度相关。这说明P-gp是大肠癌MDR的重要因素之一。

GST- π 属于GST家族成员,可与亲脂性细胞毒药物(如顺铂、阿霉素、丝裂霉素等)结合,促

使其代谢成无毒物质而排出体外, 从而降低药物的细胞毒作用, 增加细胞的耐药性. 另外, 由于MRP的“泵”作用与细胞内的谷胱甘肽浓度有关, 而GST- π 与谷胱甘肽的氧化还原状态及宿主细胞的分化、DNA修复、转录因子激活和损失保护密切相关^[20-21]. 因此, GST- π 也参与MRP介导的耐药作用. 所以, GST- π 所介导的MDR范围更广. 本研究显示: GST- π 的阳性表达率高达73.2%, 且随肿瘤分化程度降低而明显升高. 这说明GST- π 也是大肠癌MDR的重要因素之一, 其高表达也是大肠癌预后不佳的指标.

TS是胸苷酸合成的限速酶, 抑制该酶将阻止大肠癌细胞DNA合成、抑制肿瘤细胞分裂、诱导肿瘤细胞凋亡. TS是5-FU的作用靶点. 5-FU进入人体后先转变成FdUMP, 再与TS和四氢叶酸一起形成三元络合物, 阻止dTMP合成、干扰肿瘤细胞DNA的合成, 从而达到杀死肿瘤细胞的目的^[22-23]. 而TS的过表达将使FdUMP不能完全抑制TS的作用, 诱发肿瘤细胞对5-FU产生耐药. 5-FU是目前大肠癌临床化疗的主要药物, 而本研究显示: TS在大肠癌组织中的阳性表达率高达41.1%, 且随肿瘤的分化程度降低而明显增高. 因此, 有必要对大肠癌肿瘤细胞进行TS表达的相关检测以评价肿瘤对于5-FU的敏感性.

Topo- II 参与真核细胞DNA的转录、翻译、复制及染色体分离等过程, 能促进肿瘤细胞内DNA合成、提高肿瘤的增殖能力^[24-25]. 因此, Topo- II 含量的减少和(或)Topo- II 活性的降低将导致肿瘤的多药耐药. 目前临床上用于大肠癌化疗的Topo- II 抑制剂有阿霉素、依托泊苷、铂类以及5-FU等. 他们的抗癌活性不仅在于抑制酶活性本身, 而且还通过增加裂解复合物的稳定性来影响癌细胞的增殖、诱导肿瘤细胞凋亡. 本研究虽然发现大肠癌组织中Topo- II 的阳性表达率较高, 但未对其进行活性的检测. 因此, 尚不能仅由此结果就断言Topo- II 的阳性表达者一定对化疗敏感.

现代肿瘤学研究发现^[4,14]: 恶性肿瘤在发生时就已经决定了其生长、侵袭、转移等生物学行为特征. 本研究显示: 多药耐药基因产物的表达只与大肠癌的分化类型密切相关. 这说明大肠癌的MDR也是由其本身的生物学特征所决定, 与上述理论一致. 因此, 本研究有助于加深对大肠癌生物学特征的了解. 文献报道的GST- π 、P-gp、Topo- II、TS、MRP阳性率差别较大^[26-30]. 分析原因: (1)各指标的特异性较差;

(2)抗体因素: 单克隆抗体与多克隆抗体的敏感性不同, 克隆系和抗体滴度的不同也会影响试验结果. (3)试验操作因素: 试验温度、反应时间等因素干扰. 因此, 仅靠单一项目将无法承担评判大肠癌对于化疗敏感性的指标. 只有对大肠癌组织进行GST- π 、P-gp、Topo- II、TS、MRP等多基因产物的联合检测, 才能更客观、全面地筛选出针对不同耐药机制的高效低毒药物. 这有助于为大肠癌患者制定个体化化疗方案、前瞻性优化化疗药物、设计合理的药物逆转策略、减少化疗盲目性、提高疗效预见性、改善大肠癌患者的预后.

4 参考文献

- 1 崔恒官, 曹秀峰. 手术为主的大肠癌综合治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1774-1780
- 2 汪晓东, 曹霖, 曾天芳, 邱萌, 李立. 多学科协作诊治模式下新辅助/辅助化疗联合结直肠癌手术的临床效果. 中国普外基础与临床杂志 2008; 15: 615-619
- 3 Woodcock TM. Colorectal cancer chemotherapy. *J Ky Med Assoc* 2009; 107: 93-94
- 4 刘宝瑞, 钱晓萍. 大肠癌和胃癌个体化疗的现状与未来. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1979-1982
- 5 王恒毅, 陈孝平. 耐药蛋白差异性表达与肿瘤个体化化学治疗关系的研究进展. 中国现代普通外科进展 2008; 11: 336-338
- 6 Bandrés E, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Bitarte N, Gariá-Foncillas J. Pharmacogenomics in colorectal cancer: the first step for individualized-therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5888-5901
- 7 Tsavaris N, Lazaris A, Kosmas C, Gouveris P, Kavantzis N, Kopterides P, Papatheomas T, Agrogiannis G, Zorzos H, Kyriakou V, Patsouris E. Topoisomerase I and II α protein expression in primary colorectal cancer and recurrences following 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 391-398
- 8 Pohl A, Lenz HJ. Individualization of therapy for colorectal cancer based on clinical and molecular parameters. *Gastrointest Cancer Res* 2008; 2: S38-S41
- 9 Nishioka C, Sakaeda T, Nakamura T, Moriya Y, Okamura N, Tamura T, Nakahara T, Aoyama N, Kamigaki T, Ohno M, Kuroda Y, Kasuga M, Okumura K. MDR1, MRP1 and MRP2 genotypes and in vitro chemosensitivity in Japanese patients with colorectal adenocarcinomas. *Kobe J Med Sci* 2004; 50: 181-188
- 10 Gaitanarou E, Seretis E, Xinopoulos D, Paraskevas E, Arnoyiannaki N, Voloudakis-Baltatzis I. Immunohistochemical localization of glutathione S-transferase-pi in human colorectal polyps. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4179-4184
- 11 韩永, 徐燕杰, 杨波, 余琦, 周会芹. 多药耐药基因在大肠癌组织中的表达和临床研究. 山西医药杂志 2007; 51: 110-114
- 12 Jäeger W. Classical resistance mechanisms. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2009; 47: 46-48
- 13 朱言亮, 陈龙邦. 肿瘤干细胞与肿瘤多药耐药的关系. 实用癌症杂志 2009; 24: 218-220
- 14 孙颖, 胡梅洁. 肿瘤细胞多药耐药的发生机制. 胃肠病

- 学杂志 2009; 14: 184-187
- 15 Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14: 3-9
- 16 Otrubova K, McGuire KL, McAlpine SR. Scaffold targeting drug-resistant colon cancers. *J Med Chem* 2007; 50: 1999-2002
- 17 王艳红, 谢法红, 李艳丽. 肿瘤多药耐药机制的研究进展. *药物流行病学杂志* 2007; 16: 376-378, 383
- 18 Bow DA, Perry JL, Miller DS, Pritchard JB, Brouwer KL. Localization of P-gp (Abcb1) and Mrp2 (Abcc2) in freshly isolated rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 198-202
- 19 Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Knight LA, Gabriel FG, Whitehouse PA, Sharma S, Fernando A, Glaysher S, Di Palma S, Johnson P, Somers SS, Toh S, Higgins B, Lamont A, Gulliford T, Hurren J, Yiangou C, Cree IA. Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer* 2005; 5: 78
- 20 De Iudicibus S, De Pellegrin A, Stocco G, Bartoli F, Bussani R, Decorti G. ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2008; 28: 3921-3928
- 21 Müller J, Sidler D, Nachbur U, Wastling J, Brunner T, Hemphill A. Thiazolides inhibit growth and induce glutathione-S-transferase Pi (GSTP1)-dependent cell death in human colon cancer cells. *Int J Cancer* 2008; 123: 1797-1806
- 22 Jensen SA, Vainer B, Kruhøffer M, Sørensen JB. Microsatellite instability in colorectal cancer and association with thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression. *BMC Cancer* 2009; 9: 25
- 23 Uchida K, Danenberg PV, Danenberg KD, Grem JL. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, ERCC1, and thymidine phosphorylase gene expression in primary and metastatic gastrointestinal adenocarcinoma tissue in patients treated on a phase I trial of oxaliplatin and capecitabine. *BMC Cancer* 2008; 8: 386
- 24 Bidgoli SA, Azizi E, Zavarhei MD. Association between p53 expression and Bcl-2, P-glycoprotein, topoisomerase II alpha, thymidylate synthase and thymidine phosphorylase as potential therapeutic targets in colorectal cancer patients. *Pak J Biol Sci* 2007; 10: 3350-3355
- 25 Coss A, Tosetto M, Fox EJ, Sapetto-Rebow B, Gorman S, Kennedy BN, Lloyd AT, Hyland JM, O'Donoghue DP, Sheahan K, Leahy DT, Mulcahy HE, O'Sullivan JN. Increased topoisomerase IIalpha expression in colorectal cancer is associated with advanced disease and chemotherapeutic resistance via inhibition of apoptosis. *Cancer Lett* 2009; 276: 228-238
- 26 白美玲, 常永霞, 张凡, 张九鸿, 刘军超, 林媛媛, 成日青, 赵秀芳. 71例大肠癌患者耐药基因蛋白与预后关系的初步探讨. *河北北方学院学报(医学版)* 2009; 26: 10-15
- 27 郭威, 宋光, 吴国新, 杨淑梅. GST- π 、P-gp及Topo II在大肠癌中的表达及其多药耐药的临床研究. *齐齐哈尔医学院学报* 2007; 28: 269-272
- 28 牟江洪, 肖华亮, 王东, 李增鹏, 向德兵, 张沁宏. 耐药相关蛋白在大肠癌的表达及临床意义. *局解手术学杂志* 2005; 14: 376-377
- 29 Lee TB, Park JH, Min YD, Kim KJ, Choi CH. Epigenetic mechanisms involved in differential MDR1 mRNA expression between gastric and colon cancer cell lines and rationales for clinical chemotherapy. *BMC Gastroenterol* 2008; 8: 33
- 30 刘丽梅, 闫晓初, 郭德玉, 段光杰. 耐药表型GST- π 、P-gp及Topo II在大肠癌中的表达及其临床意义. *消化外科* 2004; 3: 118-121

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》投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/>在线提交未成功, 请通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d. 来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬). (科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

Rho蛋白与肝星状细胞

周雯, 杨玲, 胡胜军

周雯, 杨玲, 胡胜军, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
国家自然科学基金资助项目, No. 30500658
作者贡献分布: 本文综述由周雯、杨玲及胡胜军完成; 杨玲审校.
通讯作者: 杨玲, 副教授, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. yang_lng@yahoo.com.cn
电话: 027-85726113
收稿日期: 2009-05-22 修回日期: 2009-07-10
接受日期: 2009-07-13 在线出版日期: 2009-08-28

Rho proteins and hepatic stellate cells

Wen Zhou, Ling Yang, Sheng-Jun Hu

Wen Zhou, Ling Yang, Sheng-Jun Hu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500658
Correspondence to: Ling yang, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. yang_lng@yahoo.com.cn
Received: 2009-05-22 Revised: 2009-07-10
Accepted: 2009-07-13 Published online: 2009-08-28

Abstract

The Rho family small GTPases can act as molecular switches in eukaryotic signal transduction and exert diverse biological effects through a variety of downstream effector proteins. The actin cytoskeleton is important in maintaining cell shape, mediating many important biological functions in eukaryotic cells and controlling cell contraction, movement and survival. Hepatic stellate cells (HSCs) activation plays a key role in the formation of liver fibrosis and the regulation of portal blood flow. Rho proteins can direct activation-associated changes in HSC morphology via regulation of the actin cytoskeleton. In this article, we will review the mechanisms underlying the roles of Rho family small GTPases in regulating actin cytoskeleton remodeling and cell contractility, movement and survival in HSC cells. Furthermore, we explore the possibility that the Rho family small GTPase-associated signal pathway is used as a new target for treating hepatic fibrosis and portal hypertension.

Key Words: Actin cytoskeleton; Hepatic stellate cells; Contractility; Movement

Zhou W, Yang L, Hu SJ. Rho proteins and hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2469-2473

摘要

小G蛋白Rho家族是一类能结合GTP的蛋白质, 在细胞信号传导通路中发挥着“分子开关”的作用, 能通过下游蛋白产生多种生物学效应. 肌动蛋白细胞骨架是维持细胞形态, 介导真核细胞必需的生物学功能的重要结构, 参与细胞收缩、迁移和生存等多个过程. 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝纤维化形成过程和调节门脉血流的关键细胞, 其肌动蛋白细胞骨架的变化反映了HSCs的活化状态. 故本文重点介绍Rho家族在对HSCs的肌动蛋白细胞骨架重构、细胞收缩、迁移及生存方面的调控机制, 进而探讨对Rho家族及其信号途径的调控是否能成为抗门脉高压和肝纤维化治疗的新靶点.

关键词: 肌动蛋白细胞骨架; 肝星状细胞; 收缩; 游走

周雯, 杨玲, 胡胜军. Rho蛋白与肝星状细胞. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2469-2473
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2469.asp>

0 引言

Rho GTP酶家族是Ras超家族的成员, 是一类能结合GTP的蛋白质, 并能通过其下游效应蛋白介导发挥多种生物学效应, 在真核细胞的信号传递过程中发挥分子开关(molecular switches)的作用. 该家族成员众多, 其中重要的有Rho、Rac、Cdc42这3个亚家族, 这些小分子的G蛋白具有GTP酶的活性, 在细胞的信号转导通路中起重要作用: 主要调节细胞骨架结构, 参与细胞收缩、运动、增殖、凋亡等过程^[1]. 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝纤维化发生发展的关键细胞^[2]. 当HSCs受到氧化应激、炎症介质、细胞因子和细胞外基质的改变等刺激后发生表型转换, 活化为肌成纤维样细胞(myofibroblast-

■背景资料

Rho蛋白是Ras超家族成员, 在真核细胞的信号传递过程中发挥分子开关的作用. 肝星状细胞(HSCs)是肝纤维化发生发展过程中的关键细胞. Rho蛋白能通过其下游靶分子介导各种生物学效应, 参与HSCs收缩、迁移和生存等过程, 进而影响肝纤维化的形成与发展.

■同行评议者

王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科; 张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■研发前沿

本文大致介绍Rho蛋白介导的HSCs收缩、迁移和生存过程,也总结了近年来国内外专家学者在研究逆转肝纤维化中对Rho蛋白介导途径所取得的成果,尤其是在收缩和迁移过程,但目前仅针对HSCs的生存机制尚不十分明确,且Rho蛋白信号通路与其他通路的交叉调节也不清楚。

■相关报道

Laleman *et al*在体外利用应力松弛胶原晶格收缩模型观察HSCs收缩程度,结果表明Rho激酶抑制剂Y-27632和PKC抑制剂staurosporin能剂量依赖性的减少HSCs收缩力;Choi *et al*利用Rac转基因鼠研究发现,Rac能持续活化HSCs并加剧肝损伤和纤维化,其机制也与Rac活化NADPH氧化酶产生生活性氧成分相关,并提示Rac能作为治疗肝纤维化的一个靶点。

like cell),此过程中细胞形态改变,胞质内脂滴丢失,细胞收缩性增加,并表达 α -平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA),转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)等多种细胞因子及其受体,细胞大量增殖,合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM),最终造成ECM的大量沉积,导致肝纤维化。在整个活化过程中,HSCs在细胞学上的变化主要表现为细胞骨架的改变,进而使HSCs发生形态转化,收缩性、迁移及生存能力的改变。

1 细胞骨架与Rho蛋白

细胞骨架(cytoskeleton)是真核细胞中的蛋白质纤维网络结构,具有支撑和维持细胞形态,参与细胞运动、细胞物质运输等多种重要的生命活动。细胞骨架主要由微丝、微管和中间丝构成,微丝和微管主要起支撑和运动的功能,中间丝在不同细胞中的成分变化较大,主要是使细胞具有张力和抗剪切力。肌动蛋白是微丝的结构成分,单聚体的肌动蛋白外观呈哑铃状,称为球状肌动蛋白(G-actin),后者形成多聚体成为微丝则称为纤维状肌动蛋白(F-actin)。微丝能形成应力纤维和黏着斑等结构,使细胞与ECM黏附产生细胞形态改变、迁移运动等能力。微管是具有极性的细胞骨架,能维持细胞形态,保持细胞趋化性,并参与形成纺锤体调节细胞增殖分裂等。

小G蛋白Rho家族是一类能结合GTP的蛋白质,在细胞信号传导通路中发挥着“分子开关”的作用,当与GTP结合时呈激活状态,与GDP结合时呈失活状态。Rho小G蛋白活性的转化主要受鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)、GTPase活化蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)及鸟嘌呤核苷酸解离抑制剂(guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)调节。当Rho小G蛋白与GTP结合呈激活状态时,可作用于其下游靶蛋白发挥各种作用,其中主要是对细胞骨架的调节。也有很多实验数据显示Rho蛋白也参与转录调节^[1]。目前,Rho、Rac和Cdc42是研究最多的Rho家族成员。

2 Rho蛋白调节细胞收缩力

HSCs在肝脏疾病的病理生理发展过程中起重要作用。大量研究显示,在组织水平上,HSCs的收缩能驱动肝纤维化瘢痕收缩,进而调节肝血窦血流,构成了门脉高压的病理生理基础^[3-6],细

胞水平上,HSCs收缩张力的产生参与调节其形态、迁移及增殖等^[7]。因此,对HSCs收缩力产生机制的研究成为探讨肝脏疾病进行性发展的关键问题。

在平滑肌细胞中,20 kDa的肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC/LC20)磷酸化水平是决定其收缩力的主要因素。而MLC磷酸化水平又受到肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)和肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase, MLCP)的双重调节。MLCK的活性依赖于 Ca^{2+} -钙调蛋白(Ca^{2+} -calmodulin),参与细胞内 Ca^{2+} 水平增加进而产生收缩;MLCP主要由 Ca^{2+} 非依赖性(Ca^{2+} -independent)的PKC或Rho激酶(ROCK)调节。Rho被其上游信号活化后激活下游靶分子ROCK,从而介导一系列下游分子磷酸化/脱磷酸化过程。MLCP是Rho/ROCK信号途径的底物之一,他能接受ROCK的活化信号发生磷酸化使自身失活,失活的MLCP不能使活化的MLC脱磷酸化,导致细胞质内磷酸化的MLC水平增多,肌动肌球蛋白交联增加进而加强收缩,这种使MLC磷酸化和平滑肌细胞收缩进一步增强的现象称为“钙敏化”(Ca^{2+} sensitization)^[8]。而非平滑肌细胞收缩产生过程类似于平滑肌细胞,但是近些年通过使用抑制剂观察对HSCs收缩力影响的研究表明, Ca^{2+} 非依赖性途径在收缩产生过程中有不可忽视的作用^[9]。Laleman *et al*^[9]在体外利用应力松弛胶原晶格收缩模型(the stress-relaxed collagen lattice contraction model)观察HSCs收缩程度,结果表明Rho激酶抑制剂Y-27632和PKC抑制剂staurosporin能剂量依赖性的减少HSCs收缩力。Melton *et al*^[10]在研究中发现,内皮素-1(endothelin-1)刺激诱导收缩力的产生主要与 Ca^{2+} 非依赖性的Rho激酶途径有关,Y-27632能抑制内皮素-1引发的收缩效应。血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)也是通过Rho激酶介导的 Ca^{2+} 非依赖性途径诱导HSCs收缩^[11]。

3 Rho蛋白调节细胞迁移

细胞迁移参与组织胚胎生长发育、组织损伤修复、炎症反应和肿瘤转移等多种生理病理过程。在肝纤维化的发生发展进程中,损伤的肝细胞释放炎症介质,如血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein 1),Ang II等诱导HSCs趋化迁移至炎症活化区域,并分泌胶

原蛋白等促进纤维化发展^[12-15]。

一般来说细胞迁移过程可机械的分为4步: 细胞头部片状伪足的形成, 细胞前端伪足与细胞外基质发生黏着, 细胞体部收缩以及细胞尾部的分离。但有学者认为HSCs探测到趋化因子后随即发生黏着斑解聚, 然后才完成细胞头部伪足形成等一系列细胞迁移动作^[16]。Rho蛋白家族参与调节肌动蛋白细胞骨架的聚合、解聚和重新组装, 在协调细胞迁移过程中起不同的作用。

细胞头部片状伪足与丝状伪足的延伸是细胞迁移前进的驱动力, 该过程与Rac/Cdc42调节肌动蛋白的聚合有关。片状伪足主要受Rac调节, 细胞因子和ECM可诱导Rac发挥作用。细胞前缘丝状伪足的形成则由Cdc42调节, 但丝状伪足的功能尚不明确。活化的Rac/Cdc42可以通过与IRSp53、WAVE蛋白、PtdIns(4, 5)P2(4, 5二磷酸磷脂酰肌醇)等相互作用并分别与下游底物Arp2/3复合体和Capping蛋白结合来促进肌动蛋白丝聚合, 且可作用于下游靶分子P21激活激酶(P21 activated kinase, PAK)来激活LIM激酶(LIM kinase, LIMK), 进而使丝切蛋白Cofilin失活来抑制肌动蛋白丝的解聚, 从而实现细胞前缘伪足形成和延伸。然后, 随着整合素与细胞外基质配体结合, 并在Rho、Rac和Cdc42共同参与下开始了黏着斑装配, 细胞头部的片状伪足通过黏着斑与ECM发生黏着, 从而为细胞迁移提供了牵引动力。最后, Rho作用于下游靶分子P160ROCK和mDia促进肌动肌球蛋白聚合, 使细胞体收缩和尾部回缩, 完成细胞迁移运动。总之, Rho蛋白家族是通过下游靶蛋白调节肌动蛋白丝的组装进而完成细胞迁移动作: Rho通过P160ROCK和mDia促进肌动肌球蛋白交联聚合引发收缩, Rac和Cdc42通过WASP/Scar/Wave家族蛋白与Arp2/3形成复合物, 并通过p65PAK磷酸化LIMK进而磷酸化丝切蛋白Cofilin, 最后共同调节肌动蛋白聚合^[17]。

以上只是Rho蛋白参与调节细胞运动迁移的一个瞬时过程, 若要使细胞长距离有效的迁移到目的位置则需要稳定的细胞极性, 这种稳定则是通过对微管骨架的调节来实现的。Cdc42是针对细胞外基质环境来掌握细胞极性的关键蛋白。Ridley^[18]通过抑制巨噬细胞中Cdc42, 能阻断其对CSF-1的趋化性但是不会抑制细胞的运动能力。可见Cdc42是使细胞发挥趋化能力的重要蛋白, 但是其中的机制尚不明确。Rho可通过下游靶蛋白mDia直接作用微管维持其稳定性;

Rac则是通过P65PAK磷酸化使微管不稳定蛋白(microtubule destabilizing protein) stathmin失活, 从而提高微管骨架的延伸性^[17]。因此, Rho蛋白对微管骨架的调节也能影响细胞迁移的效率。

可以看出, Rho蛋白在HSCs的趋化迁移过程中是必需的, 任何影响Rho GTP酶信号途径的因素都能改变HSCs的趋化迁移特性。TGF- β 是HSCs激活和生成ECM最强烈的致纤维化细胞因子^[19], 且有实验发现TGF- β 的直接和趋化刺激可以增加HSCs迁移率^[20], 利用GST pull-down分析法(配体结合沉淀法)发现, TGF- β 调节肌动蛋白骨架系统主要是通过Cdc42和RhoA GTP酶信号途径而非Rac1途径^[21]。另有研究显示, 在对HSCs转染入Rac后能显著观察到HSCs迁移量增加并且对PDGF趋化迁移能力增加^[22]。Tongkijvanich *et al*^[23]在体外培养HSCs研究中显示, 活化的HSCs在自分泌和旁分泌ET-1的作用下, 通过ROCK途径调节肌动蛋白细胞骨架从而促进HSCs的迁移; ROCK选择性抑制剂Y-27632能减少HSCs中应力纤维、黏着斑的形成和肌动蛋白重构, 进而影响细胞迁移能力。另外, 法舒地尔(fasudil)也是一种ROCK途径的选择性抑制剂, 他能通过抑制ROCK下游蛋白肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化水平抑制HSCs迁移^[24]。

4 Rho蛋白调节HSCs的生存

目前研究表明HSCs的凋亡在肝纤维化逆转过程中起决定作用^[25]。在实验性大鼠肝纤维化模型中显示, 诱导HSCs凋亡能显著减轻大鼠肝纤维化程度^[27]。因此, 对HSCs生存机制的研究对阐明肝纤维化病理生理过程和确立肝纤维化的治疗方案有重要意义。

HSCs生存信号受到多种激酶和细胞因子的诱导, 如Rho/Rock途径、金属蛋白酶组织抑制剂-1(tissue inhibitors of metalloproteinases-1, TIMP-1), 神经生长因子(nerve growth factor, NGF), TGF- β 1, 和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF-1)等^[25-26]。而Rho/ROCK在HSCs中可能发挥着促存活(prosurvival)和抗凋亡作用^[28]。在大鼠HSCs研究中发现, ROCK抑制剂Y27632和Rho抑制剂C3可能通过抑制细胞铺展(cell spreading)和细胞黏附(cell attachment)来增加HSCs组蛋白关联的DNA片段和caspase-3的活力从而提高HSCs核染色质浓度, 导致HSCs凋亡^[29]。但是, 也有研究表明, ROCK抑制剂法舒地尔(fasudil)虽不能诱导大鼠HSCs凋亡, 但能抑制

■创新盘点

本文系统总结了Rho蛋白对HSCs收缩、迁移和生存3方面的调控, 并在各方面概括了新的观点, 如HSCs收缩的Ca²⁺非依赖途径, Cdc42在细胞极性和保持细胞趋化能力的作用, Rho蛋白信号通路在HSCs促生存和抗凋亡方面的调控等。

■应用要点

本文概述了Rho蛋白家族成员(主要为Rho、Rac和Cdc42)调节肝星状细胞在肝纤维化发生发展的重要作用, 这将为针对Rho蛋白信号通路进行干预、研制有效的药物延缓并逆转肝纤维化的发展提供理论依据。

■名词解释

1 小G蛋白(small G protein): 因分子量为20-30 kDa而得名, 具有GTP酶活性, 当结合了GTP时即成为活化形式, 这时可作用于下游靶分子使之活化, 而当GTP水解成为GDP时(自身为GTP酶)则恢复到非活化状态, 在多种细胞反应中起分子开关作用。

2 黏着斑(focal adhesion): 连接位于上皮细胞紧密连接的下方, 靠钙黏着蛋白同肌动蛋白相互作用, 将细胞与细胞外基质进行连接。

应力纤维的形成和细胞铺展, 减少 α -SMA的表达并同时抑制细胞增殖, 减少胶原形成和增强胶原酶活性^[30]。

5 结论

Rho蛋白家族调节HSCs收缩、迁移和凋亡过程中发挥了很重要的作用。但除此之外, 他还是HSCs活化后致纤维化过程的重要的信号通路。PDGF能与HSCs表达的PDGF受体结合, 并依赖Rac途径活化NADPH氧化酶产生活性氧成分从而促进肝损伤及纤维化等^[22,31-32]。其中活性氧成分(reactive oxygen species, ROS)是肝纤维化重要的调节因子^[33]。Choi *et al*^[34]利用Rac转基因鼠研究发现, Rac能持续活化HSCs并加剧肝损伤和纤维化, 其机制也与Rac活化NADPH氧化酶产生活性氧成分相关, 并提示Rac能作为治疗肝纤维化的一个靶点。瘦素(leptin)是一种重要的致纤维化因子, 能依赖Rho蛋白(主要是Rac1和RhoA)信号途径调节HSCs细胞骨架从而增强HSCs吞噬凋亡小体能力促进非酒精性脂肪肝纤维化的发展^[35]。另外, 活化的HSCs通过收缩调节肝内血流阻力, 是导致门脉高压的一个重要机制^[36-37]。在肝硬化大鼠模型中, 阿伐他汀(atocastatin)缓解门脉高压效应与抑制RhoA/ROCK途径相关^[38]。索非拉尼(sorafenib)能减轻行胆管结扎诱导的次级胆管硬化的大鼠模型(BDL rats)的肝内血流阻力, 降低门脉压力, 这与下调Rho激酶的表达有关^[39]。近来本课题组在研究 β -榄香烯对HSCs和肝纤维化的实验中表明, 中药莪术主要成分 β -榄香烯能抑制Ang II和RhoA/ROCK途径中RhoA和ROCK的表达, 延缓肝纤维化进程^[40], 这也间接证明了Rho蛋白在影响HSCs细胞骨架和肝纤维化发生发展过程中有重要作用。因此, Rho蛋白信号通路不仅能通过调节肌动蛋白细胞骨架发挥调节HSCs形态、收缩、迁移及凋亡作用外, 还是联系细胞内外各种反应的一个重要的信号途径。然而目前对该通路的调节机制以及与其他通路的交叉反应尚不十分明确, 仍需要更多更好的研究来补充阐述。本文大概讲述了Rho蛋白家族成员(主要为Rho、Rac和Cdc42)调节HSCs在肝纤维化发生发展的重要作用, 这将为针对Rho蛋白信号通路进行干预, 研制有效的药物延缓并逆转肝纤维化的发展提供了理论依据。

6 参考文献

1 Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and

- signaling networks. *Genes Dev* 1997; 11: 2295-2322
- 2 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
- 3 Laleman W, Landeghem L, Wilmer A, Fevery J, Nevens F. Portal hypertension: from pathophysiology to clinical practice. *Liver Int* 2005; 25: 1079-1090
- 4 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 5 Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* 2003; 37: 4-12
- 6 Saab S, Tam SP, Tran BN, Melton AC, Tangkijvanich P, Wong H, Yee HF Jr. Myosin mediates contractile force generation by hepatic stellate cells in response to endothelin-1. *J Biomed Sci* 2002; 9: 607-612
- 7 Yee HF Jr. Ca²⁺ and rho signaling pathways: two paths to hepatic stellate cell contraction. *Hepatology* 2001; 33: 1007-1008
- 8 Ihara E, MacDonald JA. The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 79-87
- 9 Laleman W, Van Landeghem L, Severi T, Vander Elst I, Zeegers M, Bisschops R, Van Pelt J, Roskams T, Cassiman D, Fevery J, Nevens F. Both Ca²⁺-dependent and -independent pathways are involved in rat hepatic stellate cell contraction and intrahepatic hyperresponsiveness to methoxamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G556-G564
- 10 Melton AC, Datta A, Yee HF Jr. [Ca²⁺]-independent contractile force generation by rat hepatic stellate cells in response to endothelin-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G7-13
- 11 Zhang XL, Xiao B, Li X, Huang ML, Meng Y, Li YF, Wang YY, Song WB. [Role of Rho-Rock pathways induced by angiotensin II in hepatic stellate cell contraction] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 2422-2426
- 12 Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383-1394
- 13 Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 1999; 29: 1760-1767
- 14 Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29: 140-148
- 15 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 16 Melton AC, Soon RK Jr, Park JG, Martinez L, Dehart GW, Yee HF Jr. Focal adhesion disassembly is an essential early event in hepatic stellate cell chemotaxis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G1272-G1280
- 17 Raftopoulos M, Hall A. Cell migration: Rho

- GTPases lead the way. *Dev Biol* 2004; 265: 23-32
- 18 Ridley AJ. Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility. *FEBS Lett* 2001; 498: 168-171
 - 19 Chen A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. *Biochem J* 2002; 368: 683-693
 - 20 Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159
 - 21 李蕾, 蒋伟, 王吉耀, 杨长青, 王逸青. 转化生长因子 β 1对肝星状细胞迁移及细胞内Rho三磷酸鸟苷酶表达的影响. *中华消化杂志* 2006; 26: 527-530
 - 22 Lee JS, Kang Decker N, Chatterjee S, Yao J, Friedman S, Shah V. Mechanisms of nitric oxide interplay with Rho GTPase family members in modulation of actin membrane dynamics in pericytes and fibroblasts. *Am J Pathol* 2005; 166: 1861-1870
 - 23 Tangkijvanich P, Tam SP, Yee HF Jr. Wound-induced migration of rat hepatic stellate cells is modulated by endothelin-1 through rho-kinase-mediated alterations in the acto-myosin cytoskeleton. *Hepatology* 2001; 33: 74-80
 - 24 Wang YZ, Jiang HQ, Hu CX, Chen X. [Fasudil inhibites HSC adhesion, migration and proliferation via Rho/ROCK pathway] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 821-823
 - 25 Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005; 10: 927-939
 - 26 Shen H, Fan J, Minuk G, Gong Y. Apoptotic and survival signals in hepatic stellate cells. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2007; 32: 726-734
 - 27 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549
 - 28 Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007; 55: 61-75
 - 29 Ikeda H, Nagashima K, Yanase M, Tomiya T, Arai M, Inoue Y, Tejima K, Nishikawa T, Omata M, Kimura S, Fujiwara K. Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G880-G886
 - 30 Fukushima M, Nakamuta M, Kohjima M, Kotoh K, Enjoji M, Kobayashi N, Nawata H. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase (ROCK) inhibitor, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005; 25: 829-838
 - 31 Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281
 - 32 Doanes AM, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T. A requirement for rac1 in the PDGF-stimulated migration of fibroblasts and vascular smooth cells. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 45: 279-287
 - 33 Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35: 297-306
 - 34 Choi SS, Sicklick JK, Ma Q, Yang L, Huang J, Qi Y, Chen W, Li YX, Goldschmidt-Clermont PJ, Diehl AM. Sustained activation of Rac1 in hepatic stellate cells promotes liver injury and fibrosis in mice. *Hepatology* 2006; 44: 1267-1277
 - 35 Jiang JX, Mikami K, Shah VH, Torok NJ. Leptin induces phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells via a Rho guanosine triphosphatase-dependent mechanism. *Hepatology* 2008; 48: 1497-1505
 - 36 Shah V. Cellular and molecular basis of portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 629-644
 - 37 Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 2-5
 - 38 Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 2007; 46: 242-253
 - 39 Hennenberg M, Trebicka J, Stark C, Kohistani AZ, Heller J, Sauerbruch T. Sorafenib targets dysregulated Rho kinase expression and portal hypertension in rats with secondary biliary cirrhosis. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 258-270
 - 40 Yang L, Dan D, Zhu R, Zhou W, Qian W, Ye J, Hou X. [Beta-elemene inhibits expression of ANG II and RhoA/ROCK signaling in hepatic stellate cells] *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2009; 34: 458-463

同行评价

本综述小结了小G蛋白Rho家族调节肝星状细胞收缩、迁移和凋亡的近年研究进展, 有一定参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

SDF-1/CXCR4轴在肝脏干细胞移植中的应用

高福来, 韩明子, 金世柱, 胡宗晶

■背景资料

急性慢性重症肝病的治疗一直是全球性的难题, 骨髓干细胞(BMSCs)具有多种分化潜能, 在一定条件下, 可分化为有功能的肝细胞。但是目前诱导BMSCs向肝细胞分化的各种方法的分化率均较低, 还不能满意地应用于临床。以往本课题组实验研究表明, SDF-1能促进骨髓单个核细胞向肝脏迁移并分化为肝细胞。本综述探讨了SDF-1及其受体在肝脏干细胞移植中的作用, 及其可能的作用机制, 有望在肝病治疗方面取得突破。

■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科; 仇毓东, 副教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科

高福来, 韩明子, 胡宗晶, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

金世柱, 吉林大学第一医院胃肠内科, 吉林省长春市 130021
作者贡献分布: 本文由高福来撰写; 文章构思由韩明子完成; 金世柱与胡宗晶对文章进行审校。

通讯作者: 韩明子, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 150086, 黑龙江哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科. hanmingzi@medical.com.cn

电话: 0451-55969203

收稿日期: 2009-05-13 修回日期: 2009-06-24

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-08-28

Stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine receptor-4 axis and hepatic stem cell transplantation

Fu-Lai Gao, Ming-Zi Han, Shi-Zhu Jin, Zong-Jing Hu

Fu-Lai Gao, Ming-Zi Han, Zong-Jing Hu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Shi-Zhu Jin, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Professor Ming-Zi Han, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. hanmingzi@medical.com.cn

Received: 2009-05-13 Revised: 2009-06-24

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-08-28

Abstract

The stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXC chemokine receptor-4 (CXCR4) axis consists of SDF-1 and its receptor CXCR4. In recent years, more and more studies suggest that the SDF-1/CXCR4 axis plays an important role in tissue repair after injury. In this review, we will focus on the biological characteristics of the SDF-1/CXCR4 axis and its relationship with hepatic stem cell transplantation.

Key Words: Stromal cell-derived factor-1; Stem cell; SDF-1/CXCR4 axis; Biological characteristics

Gao FL, Han MZ, Jin SZ, Hu ZJ. Stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine receptor-4 axis and hepatic stem cell transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2474-2477

摘要

基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)及其受体CXCR4构成SDF-1/CXCR4轴体系统。近年来随着该领域科研的不断深入, 越来越多的研究发现SDF-1/CXCR4轴体系统在组织损伤及修复中起着重要的作用。本文主要对SDF-1/CXCR4轴体系统的生物学特性及其在肝脏干细胞移植中的作用进行综述。

关键词: 基质细胞衍生因子; 干细胞; SDF-1/CXCR4轴体系统; 生物学特性

高福来, 韩明子, 金世柱, 胡宗晶. SDF-1/CXCR4轴在肝脏干细胞移植中的应用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(24): 2474-2477

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2474.asp>

0 引言

基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)主要由骨髓基质细胞和不成熟的成骨细胞分泌, 是一种对免疫细胞有趋化作用且相对分子质量较小的趋化因子蛋白。根据其氨基酸序列N端2个半胱氨酸被1个其他氨基酸隔开, 将其归为趋化因子CXC亚组, 系统命名CXCL12(CXC chemokine ligand-12), 他有2个异构体SDF-1 α 和SDF-1 β , 均来源于SDF-1基因的选择性片断并具备相似的生物学活性^[1]。Tashiro *et al*^[2]在1993年用信号序列追踪技术发现了骨髓基质细胞分泌SDF-1, 随后Nagasawa *et al*^[3]在PA6系小鼠骨髓基质细胞分泌的细胞因子中也发现了SDF-1, 由于SDF-1在前B细胞增生分化中发挥着重要作用, 故也被称为前B细胞生长刺激因子(Pre-B-cell growth stimulating factor, PBSF)。SDF-1基因位于10号染色体长臂, 其cDNA长1776 bp, 其非编码区富含A+T序列, 编码区仅含有1个核苷酸开放阅读框, 编码含有89个氨基酸碱基的多肽^[4]。

1 SDF-1/CXCR4轴体系统

SDF-1唯一的特异性受体是CXCR4, CXCR4

(CD184)是由352个氨基酸组成的保守的7次跨膜G蛋白偶联受体超家族的成员,他广泛表达在包括单核细胞、淋巴细胞及所有CD34⁺细胞表面,他与SDF-1之间有很高的亲和力和结合特异性,因此构成SDF-1/CXCR4生物轴,参与细胞间信息传递及细胞迁移,发挥多种生物学作用.表达CXCR4的骨髓干细胞能够沿着SDF-1的浓度梯度而定向迁移,在组织或器官损伤时,SDF-1能促进骨髓干细胞、炎症细胞募集到损伤部位,他既是调节组织或器官修复的关键细胞因子^[5],也是一个调节局部炎症的重要趋化因子^[6].因此,SDF-1在组织损伤中的修复中发挥着重要作用.近来研究证实^[7-11].SDF-1/CXCR4在肝损伤的修复中起重要作用.本文主要对SDF-1-CXCR4轴在肝脏干细胞移植中的应用作一综述.

2 SDF-1/CXCR4轴与肝损伤修复

成人肝细胞在正常时处于有丝分裂静止期,但是在肝损伤时却有较强的再生能力,当肝脏有慢性或者广泛损伤或者肝细胞增殖受到抑制时,肝脏干细胞-肝脏椭圆细胞(hepatic oval cell, HOCs)和造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)可参与损伤肝脏的修复^[12].在肝损伤时,SDF-1和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)能促进肝细胞动员;肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)通过增加人祖细胞的活力并协同干细胞因子(stem cell factor, SCF)促进SDF-1诱导的定向迁移^[13].Mavrier *et al*^[9]在2-乙酰氨基苄(2-acetylaminofluorene, AAF)处理后进行部分肝切除制成肝细胞再生动物模型发现,门静脉周围HOCs数目逐渐增加.在新形成的肝小管结构中,HOCs胞质大量表达SDF-1蛋白,在使用可结合并抑制SDF-1生物学作用的墨角藻聚糖后,大多数小鼠门静脉周围的HOCs数目明显减少,说明SDF-1与诱导HOCs参与损伤肝脏修复有关.干细胞通过自分泌或旁分泌途径,促进修复细胞迁移到损伤肝脏.最近对肝损伤动物模型的研究表明,SDF-1/CXCR4对调节骨髓干细胞进入损伤肝细胞起主要作用^[14].Jung *et al*^[15]将同种骨髓干细胞移植到CCl₄诱导的小鼠肝损伤模型内,观察发现移植后模型鼠的肝脾肿大及肝坏死均得到改善,肝酶降低,植入的骨髓干细胞特异地迁移到受损肝细胞,流式细胞计数仪及免疫组织化学法检测发现损伤肝组织内CXCR4和SDF-1的表达增加,从而验证了SDF-1/CXCR4的相互作用对移植的

干细胞定位到肝组织起到了关键作用,移植的骨髓干细胞在损伤肝组织中正性调节SDF-1的表达^[16].孙立影 *et al*^[17]研究证实SDF-1可以促进骨髓单个核细胞向肝脏迁移,并且迁移到肝脏的骨髓单个核细胞可以向干细胞分化.

2.1 SDF-1/CXCR4轴的信号传导途径 现已证实SDF-1-CXCR4轴调节CXCR4⁺造血干/祖细胞(hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)^[1],SDF-1与CXCR4结合激活CXCR4受体偶联的G蛋白;激活下游信号途径主要包括:(1)磷酸肌醇-3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)/核因子-κB(nuclear factor-kappaB, NF-κB)途径;(2)p42/44促丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-associated protein kinase, MAPK)/Elk-1途径;(3)黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、桩蛋白(paxillin)、富脯氨酸激酶-2(proline-rich kinase-2, Pyk-2)、p130Cas等;(4)Janus激酶(Janus kinase, JAK)/转录信号传导子与激活子(signal transducer and activator of transcription, STATs)途径;(5)酪氨酸磷酸酶 I (tyrosine phosphatase 1, SHP1)和SHP2^[18].

SDF-1-CXCR4轴的趋化作用的是通过几个互补的信号通路相互作用而不是激活某个单一的信号通路而实现的^[19].如SDF-1介导HSPCs的迁移与PI3K/PKC激活有关,而JAK2途径参与PI3K的激活和多种黏附斑蛋白酪氨酸磷酸化^[20-21].一系列黏附斑成分蛋白、细胞骨架蛋白的激活和肌动蛋白的聚合共同介导了HSPCs的迁移.

2.2 损伤部位SDF-1表达 急性肝损伤后,相关的损伤部位SDF-1的分泌会增加,组织损伤时产生许多因素调节SDF-1的表达,包括各种炎症介质、细胞外基质的变化和机械力量的改变,而组织缺血、缺氧往往总是伴随着组织损伤.缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是细胞缺氧反应的重要调节因子^[1].Ceradini *et al*^[22]发现,SDF-1的启动子中包含有2个HIF-1的连接位点,HIF-1连接这些位点后SDF-1的表达增加4倍.因为SDF-1对CXCR4⁺的肝卵圆细胞内皮细胞具有强大的趋化作用,吸引其参与组织的修复和重建^[23],这就意味着SDF-1是出生后组织修复的重要维持因子.

2.3 损伤部位CXCR4⁺干细胞的募集 组织损伤后修复和重建被认为与选择性募集组织中或者循环中的干细胞数量有关^[24],骨髓中存在着各种CXCR⁺的组织定向干细胞,他们的迁移受

■研发前沿

SDF-1能促进骨髓单个核细胞向肝脏迁移并分化为肝细胞,有望在肝病治疗方面取得突破.

■相关报道

Jung *et al*将同种骨髓干细胞移植到CCl₄诱导的小鼠肝损伤模型内,观察发现SDF-1/CXCR4的相互作用对移植的干细胞定位到肝组织起到了关键作用;孙立影 *et al*研究证实SDF-1可以促进骨髓单个核细胞向肝脏迁移,并且迁移到肝脏的骨髓单个核细胞可以向干细胞分化.

■创新盘点

本文主要对SDF-1/CXCR4轴体系统的生物学特性及在肝脏干细胞移植中的作用进行综述。在一定层面上阐释SDF-1/CXCR4轴体系统在肝损伤修复中可能的作用机制。

SDF-1、HGF等依赖的方式调控,在器官或组织损伤时,在SDF-1-CXCR4轴的作用下进入外周血,趋化迁移到损伤部位,参与组织的再生^[25]。

2.4 SDF-1/CXCR4轴与干细胞黏附 已知SDF-1可以通过激活在靶细胞表面的不同黏附分子调节细胞的黏附纤维蛋白原、粘连蛋白、基质和细胞^[26], Majka *et al*^[27]研究发现, SDF-1也激活巨核细胞表面 α II b/ β 3, 整合素(CD41), 使募集的干细胞黏附在损伤部位的内皮上。近来有人提出黏附分子可能也会引发信号加强CXCR4的表达和功能。激活CXCR4⁺细胞表面的L-选择素(L-selectin), CXCR4的表达和转导的信号得到上调, 据此推断出CXCR4和黏附分子相互作用可能是双向调节。CXCR4发出的信号调节细胞表面黏附分子的功能, 反过来某些黏附分子的激活可以加强CXCR4的信号或表达^[28]。

3 结论

现在随着对SDF-1-CXCR4轴系统研究的不断深入, SDF-1日趋成为研究的热点。本课题组用SDF-1诱导骨髓单个核细胞向肝脏细胞转化治疗肝损伤的小鼠模型研究, 已取得初步成效, 小鼠的转氨酶明显降低, 这更进一步证实SDF-1-CXCR4在肝脏干细胞移植中的重要作用。我们认为, 随着对SDF-1-CXCR4的研究的日趋成熟, 将来SDF-1会广泛的应用于临床, 并且有着广阔的前景。总之, 在生理或病理情况下, SDF-1-CXCR4轴与其他的许多信号转导通路相互交联, 共同有效的和特异的维持机体的平衡。在组织损伤时, SDF-1/CXCR4轴体系统在组织的损伤后修复起着重要的作用, 随着对SDF-1/CXCR4轴体研究的不断深入, 我们相信在不久的将来, SDF-1会更多的应用于临床, 挽救更多的肝病患者。

4 参考文献

- 1 江龙, 朱亚琴. SDF-1-CXCR4轴与组织损伤后修复. 上海交通大学学报(医学版) 2008; 11: 1467-1470
- 2 Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993; 261: 600-603
- 3 Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2305-2309
- 4 庞伟, 李玉明. 基质细胞衍生因子-1及其受体CXCR4对造血干细胞调控的研究进展. 武警医学院学报 2009; 11: 78-81
- 5 Kucia M, Ratajczak J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Tissue-specific muscle, neural

and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32: 52-57

- 6 Nanki T, Lipsky PE. Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4⁺ T cell activation. *J Immunol* 2000; 164: 5010-5014
- 7 Tang YL, Qian K, Zhang YC, Shen L, Phillips MI. Mobilizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal-cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha) treatment. *Regul Pept* 2005; 125: 1-8
- 8 Wojakowski W, Tendera M, Michałowska A, Majka M, Kucia M, Maślankiewicz K, Wyderka R, Ochała A, Ratajczak MZ. Mobilization of CD34/CXCR4⁺, CD34/CD117⁺, c-met⁺ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110: 3213-3220
- 9 Mavrier P, Martin N, Couchie D, Préaux AM, Laperche Y, Zafrani ES. Expression of stromal cell-derived factor-1 and of its receptor CXCR4 in liver regeneration from oval cells in rat. *Am J Pathol* 2004; 165: 1969-1977
- 10 Tögel F, Isaac J, Hu Z, Weiss K, Westenfelder C. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int* 2005; 67: 1772-1784
- 11 Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, Maeda M, Fagan SC, Carroll JE, Conway SJ. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 84-96
- 12 Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, Plevris JN. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J* 2005; 19: 1225-1231
- 13 冯帅南, 黄宏. 基质细胞衍生因子-1/CXCR4轴的特性及其在损伤修复中的作用. 创伤外科杂志 2008; 10: 471-473
- 14 Armbrust T, Batusic D, Xia L, Ramadori G. Early gene expression of hepatocyte growth factor in mononuclear phagocytes of rat liver after administration of carbon tetrachloride. *Liver* 2002; 22: 486-494
- 15 Jung YJ, Ryu KH, Cho SJ, Woo SY, Seoh JY, Chun CH, Yoo K, Moon IH, Han HS. Syngenic bone marrow cells restore hepatic function in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *Stem Cells Dev* 2006; 15: 687-695
- 16 金世柱, 孟祥伟, 韩明子. 促肝脏干细胞归巢的研究进展. 胃肠病学和肝病杂志 2009; 18: 316-318
- 17 孙立影, 韩明子, 金世柱, 耿莹, 祁金锋, 穆丽雅. 基质细胞衍生因子1对骨髓单个核细胞向肝脏迁移分化的影响. 胃肠病学和肝病杂志 2008; 17: 632-634
- 18 Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005; 23: 879-894
- 19 Roland J, Murphy BJ, Ahr B, Robert-Hebmann V, Delauzun V, Nye KE, Devaux C, Biard-Piechaczyk M. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* 2003; 101: 399-406
- 20 Wang JF, Park IW, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine

■应用要点

本研究总结并探讨了SDF-1及其受体在肝脏干细胞移植中的作用, 及其作用的可能机制, 有望将这一理论应用于临床。

- phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 2000; 95: 2505-2513
- 21 Zhang XF, Wang JF, Matczak E, Proper JA, Groopman JE. Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1 α -induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2001; 97: 3342-3348
 - 22 Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10: 858-864
 - 23 Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous--that is the question. *Exp Hematol* 2005; 33: 613-623
 - 24 Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160-169
 - 25 Kucia M, Wojakowski W, Reza R, Machalinski B, Gozdzik J, Majka M, Baran J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006; 54: 121-135
 - 26 Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107: 1322-1328
 - 27 Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Kowalska MA, Vialre G, Pan ZK, Honczarenko M, Marquez LA, Poncz M, Ratajczak MZ. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood* 2000; 96: 4142-4151
 - 28 Ding Z, Issekutz TB, Downey GP, Waddell TK. L-selectin stimulation enhances functional expression of surface CXCR4 in lymphocytes: implications for cellular activation during adhesion and migration. *Blood* 2003; 101: 4245-4252

■同行评价

本文对研究肝脏干细胞的发生、分化具有很重要的价值, 对未来细胞移植治疗肝脏疾病提供了很好的思路, 具有很好的学术价值。

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》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按 ●、○、■、□、▲、△ 顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$; 第 3 套为 ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

急性胰腺炎发病机制研究进展

陈婧华, 陈 垦, 王 晖

■背景资料

急性胰腺炎(AP)为临床上常见的急腹症,其发病急、进展快、死亡率高,且发病机制尚未完全阐明。对此,近年来各种学说都有不同程度的研究进展,这有助于人们更清楚的认识该病,并未今后对AP的预防和治疗提供理论指导。

陈婧华, 陈 垦, 广东药学院临床医学院内科学教研室 广东省广州市 510310

王晖, 广东药学院中药学院药理学教研室 广东省广州市 510006

广东省科学事业计划基金资助项目, No. 2007B030702004

广州市科学技术基金资助项目, No. 2007Z3-E5011

广东省自然科学基金资助项目, No. 8151022401000012

作者贡献分布: 本文综述由陈婧华完成; 由陈垦与王晖审校。

通讯作者: 陈 垦, 主任医师, 510310, 广东省广州市, 广东药学院临床医学院内科学教研室. chenkenck@126.com

电话: 020-34055856

收稿日期: 2009-06-09 修回日期: 2009-07-30

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-28

Advances in the pathogenesis of acute pancreatitis

Jing-Hua Chen, Ken Chen, Hui Wang

Jing-Hua Chen, Ken Chen, Department of Internal Medicine, College of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, Guangdong Province, China

Hui Wang, Department of Pharmacology, College of Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Supported by: the Scientific Research Program of Guangdong Province, No. 2007B030702004; the Science and Technology Foundation of Guangzhou, No. 2007Z3-E5011; and the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 8151022401000012

Correspondence to: Ken Chen, Department of Internal Medicine, College of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, Guangdong Province, China. chenkenck@126.com

Received: 2009-06-09 Revised: 2009-07-30

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-28

Abstract

Acute pancreatitis (AP), especially acute necrotizing pancreatitis, is a common clinical disorder presenting as an acute abdomen. As AP is often complicated with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure, the overall mortality rate in AP patients is high. At present, the research on the pathogenesis of AP has attracted wide attention though it has not been fully clarified yet. Of many theories to explain the pathogenesis of AP, "the theory of self-digestion of the pancreas" is the dominant hypothesis. In recent years, concerns have also been raised over "the theory of inflammatory mediators", "the theory of intestinal bacterial

translocation", "the theory of apoptosis" and "the theory of calcium overload of pancreatic acinar cells". In addition, extensive research on the relationship between hyperlipidemia, especially high triglycerides (TG), and AP has also been conducted. In this article, we will review the recent advances in the pathogenesis of AP.

Key Words: Acute pancreatitis; Pathogenesis; Inflammatory mediators; Hyperlipidemia

Chen JH, Chen K, Wang H. Advances in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2478-2483

摘要

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种临床上常见的急腹症,尤其是急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)由于全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)导致病情严重,死亡率高。其发病机制尚未完全阐明且一直为研究焦点。在众多学说中,“胰腺自身消化学说”一直是占主导地位的理論,近年来关于“炎症介质学说”、“肠道细菌易位学说”、“细胞凋亡学说”、“胰腺腺泡内钙超载学说”等也受到了关注和重视。另外,高脂血症尤其是高甘油三酯(TG)血症与AP的关系的研究正逐步深入。本文就AP发病机制的研究进展作一综述。

关键词: 急性胰腺炎; 发病机制; 炎症介质; 高脂血症

陈婧华, 陈 垦, 王 晖. 急性胰腺炎发病机制研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2478-2483

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2478.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是胰腺的急性炎性过程,在不同程度上波及临近组织和其他脏器系统。实践及研究表明, AP的发病机制是一个复杂的、多因素参与的病理生理过程,其发病机制至今尚未完全阐明。近年的研究进展很

■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

快, 提出了许多新学说, 对认识该疾病的发展过程和指导临床治疗起着重要的作用. 因此, 不断深入研究AP的发病机制, 认识参与其复杂病变过程中的各个因素, 是不断提高该病治疗效果的根本途径.

1 胰腺自身消化学说

正常胰腺分泌的消化酶有2种形式: 一种是有生物活性的酶; 另一种是以前体或酶原形式存在的无活性的酶. 在正常情况下, 合成的胰酶绝大多数是无活性的酶原, 酶原颗粒与细胞质是隔离的, 胰腺腺泡的胰管内含胰蛋白酶抑制物质, 灭活少量的有生物活性或提前激活的酶, 这是胰腺避免自身性消化的生理性防御屏障. 正常情况下, 当胰液进入十二指肠后, 在肠激酶原被激活为有生物活性的消化酶, 对食物进行消化. 任何原因造成酶原被提前激活都是发生AP的始动因素. 胰蛋白酶原激活肽(trypsinogen activation peptides, TAP)是胰蛋白酶原氨基末端的一段短肽, 在胰蛋白酶原激活后转变为活化的胰蛋白酶过程中可以被释放出来, 并直接被释放进入腹腔和血液循环及尿液中^[1]. AP时常伴有血清细胞因子和TAP升高, 因此检测血清细胞因子和TAP变化可直接反映胰蛋白酶原激活的程度, 是胰蛋白酶原激活的分子标志物, 并具有高度的特异性^[2]. 目前学者们认为^[3], 重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)早期患者的高死亡率与多器官功能衰竭综合征(multiple organ dysfunction syndromes, MODS)有关, 其主要原因是胰腺在自身消化的基础上产生循环障碍和全身炎性介质诱导的瀑布式的炎症反应. 胰蛋白酶是SAP中器官受损的主要原因, 被活化的胰蛋白酶破坏胰腺自身, 并引起胰腺组织的出血和坏死, 与此同时, 他通过经静脉回流流入血液循环, 并破坏血管的内皮屏障, 导致血管的通透性增高及, 以致大量的血性分泌物从血管中渗出, 导致患者早期出现循环紊乱、多器官出血及血性腹水和胸水. 因此, 如果减少血液中的胰蛋白酶就有以逐渐减轻各器官受损的趋势. 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)家族是多种细胞信号传导的重要枢纽, 其中p38MAPK是研究最为广泛的家族成员之一^[4], p38MAPK通路的激活可促进白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等多种促炎因子的表达和释放, 被认为是调控炎症反应的

中心环节, 与SAP的发生发展密切相关. Karrasch *et al*^[5]把p38MAPK 阻滞剂(CNI1493)应用到AP的试验中, 而且并未发现明显的不良反应, 预示着新型、高效的p38MAPK抑制剂具有临床应用前景. 胰酶的激活在AP过程起着关键作用, 减少胰酶的释放及对其的激活可控制AP的进展, 开发抑制胰酶释放和激活的新药仍是治疗AP的良好突破口.

2 炎性介质的作用

AP无论病因如何, 最终结果总是局部和全身性炎症反应, 这与炎性介质的过度生成有关, 细胞因子可以通过“扳机样作用”触发炎症介质的“瀑布样级联反应”, 使得AP易于从局部病变迅速发展成为全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)^[6].

2.1 TNF- α 基因多态 TNF是AP时最早升高的细胞因子并起着核心作用, 介导胰腺局部和全身的炎症反应. 研究表明^[7]当TNF浓度 $\geq 10^{-8}$ μ /mL时, TNF的产生超过了其受体数量, 可作用于各种炎症细胞, 亚细胞水平, 促进其他细胞因子的产生, 引起连锁和放大的“瀑布效应”, 造成全身组织损伤进一步加重. 最近有实验发现^[8], AP模型的早期存在相对肾上腺功能不全, TNF- α 、IL-1、IL-6可作用于其血管内皮细胞, 使其血栓调节蛋白活性降低, 加重肾脏缺血和形成血栓, 还使炎性细胞激活和NO与氧自由基释放, 直接损伤肾组织, 从而更易引起SAP以致更高的死亡率. TNF- α 是细胞因子网络的启动因子, 可诱导IL-6、IL-8等促炎因子的产生, 是一种重要的全身反应性介质, 在AP的发病过程中起着重要的作用. TNF- α 的产生受转录水平的调节, 其基因多态性在炎性疾病中的作用一直是近几年来研究的热点^[9]. Noh *et al*^[10]发现SAP与轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)患者基因型的比较有显著性差异, 在SAP患者中TNF- α 出现的频率较高. De-Madaria *et al*^[11]发现TNF(-238G/A)与AP患者器官功能衰竭有关. 在IL-6(-174C/C)与胆道性急性胰腺炎有关. 但也有研究表明^[12] TNF(-308G/A)基因多态性与AP发病易感性及病情的发展无关, TNF(-308G/A)不同基因型表达的TNF- α 血清水平在SAP和MAP中相比较也无显著性差别. 急性胆源性胰腺炎的发生发展与TNF-p基因多态性无关, 但TNF- α 、 β 基因多态性是否对TNF- α 、 β 转录表达存在影响尚难定

■研究前沿

近年来AP发病机制研究领域出现各种学说, 然而他们均未能全面阐述AP病变进程. 因此, 不断深入研究AP的发病机制, 认识参与其复杂病变过程中的各个因素, 是不断提高该病治疗效果的根本途径.

■相关报道

Wittel *et al*的研究显示, 在胆汁酸诱导的AP大鼠模型中, 胆汁酸降低了内质网膜上的钙泵活性, 使Ca²⁺升高, 进而导致胰腺水肿、坏死病理反应.

■创新盘点

本文在广度上从不同侧面综述急性胰腺炎发病机制的相关进展,包括经典的胰腺自身消化学说、炎症介质学说、肠道细菌易位学说、细胞凋亡学说、胰腺腺泡内钙超载学说、高脂血症学说;在深度上侧重于对炎症介质学说的阐述,突出了炎症反应在AP过程中的重要性并强调应引起重视。

论,因为血清TNF- β 的测定本身受到多种因素的影响,如TNF- α 、 β 半衰期短,血清TNF受体的干扰等。

2.2 趋化因子 近年研究显示许多炎症细胞参与AP的发生、发展,前炎症细胞因子和趋化因子(chemokines)对局部组织和远处脏器的损伤起着重要的作用^[13]。趋化因子是一种诱导蛋白,在急性炎症等病理情况下表达增加。趋化因子可分为组成性趋化因子和诱导性或炎症性趋化因子,前者在介导免疫细胞的正常迁徙和发育、血管形成及造血等方面起重要生理作用,而后者在多种因素的刺激和诱导下表达上调,参与组织的防御或炎症过程。因此,通过测定外周血液中相关趋化因子的含量,可能有助于AP的早期诊断和预后的判断。有实验证明^[14]缺乏C-C型趋化因子受体-5(C-C chemokine receptor 5, CCR-5)导致了AP趋化因子水平的增加和诱发更明显的胰腺炎症浸润,这意味着CCR-5的表达可以调节AP的严重程度。IL-8是人体一种强烈的中性粒细胞趋化和激活因子, Panek *et al*^[15]通过同步测定AP患者血清中IL-6、IL-8和TNF- α 水平,发现上述3种因子在入院后24 h即明显升高,且SAP患者显著高于MAP患者,可作为评估SAP的早期血清标志物。Zhang *et al*^[16]研究显示小剂量的多巴胺可有效地减少血清中的IL-6和TNF- α ,其有效作用可能与其增加胰腺循环血量和减少渗透性有关。单核细胞趋化蛋白-1(mononuclear chemotaxis protein 1, MCP-1)是CC型趋化蛋白的一种,对单核细胞有特异性的趋化作用。最近,有实验观察了68例AP患者MCP-1、MIP-1 α 和MIP-1 β 的变化,发现有胰腺局部并发症和(或)远处脏器功能不全的患者,血清和腹水中MCP-1含量明显升高,而且MCP-1水平与脏器功能不全的严重程度显著相关。

2.3 血小板活化因子 大量的血管活性物质如血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)、内皮素、缓激肽等均在胰腺微循环障碍中发挥着重要作用^[15]。PAF作为AP时最关键的强效脂质炎症介质,在加重胰腺微循环障碍,诱导胰腺持续缺血、坏死的同时,又在促进急性炎症反应中起到了中心枢纽的作用^[17]。PAF介导AP的机制可能是^[18]:(1)活化血小板,促使血小板黏附、聚集和血栓形成,导致胰腺的血流灌注不足,胰腺微循环障碍,继而缺血、缺氧、坏死;(2)刺激其他细胞因子及炎症介质,并形成细胞因子间网络调控,加重组织破坏;(3)导致胰腺内游离Ca²⁺

水平升高,损伤细胞,促进胰酶分泌和活化;(4)损伤肠道屏障,导致细菌易位,诱发肠源性感染和内毒素血症;(5)启动和促进中性粒细胞与内皮细胞间的相互作用,促进中性粒细胞和淋巴细胞进入组织间隙;(6)与中性粒细胞表面受体结合,激活其氧化代谢功能,释放超氧化物,促进白细胞黏附和聚集;(7)具有类似乙酰胆碱的作用,增加胰酶分泌。AP时PAF增加血管的通透性,液体渗出,导致浆膜腔积液,血容量不足,引起低血压、休克、循环衰竭。肾脏血液灌注量减少,导致肾前性急性肾衰竭;肺脏毛细血管通透性增加,液体渗出,导致肺间质水肿,急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS);脑血管通透性增加,引起脑水肿,颅内压增高,导致胰源性脑病;肠道的微循环屏障破坏,导致细菌易位;微循环障碍又进一步刺激PAF的产生,加重病情的发展。实验研究发现血小板活化因子受体拮抗剂(platelet-activating factor receptor antagonists, PAF-RA)可减少局部器官和全身炎症反应,预防性使用PAF-RA可减轻PAF介导的炎症损伤和改善AP预后^[19],但使用PAF-RA使用的时间窗,用量及有无全身不良反应等问题有待进一步研究。

炎症介质在AP启动及进展中均扮演着十分重要的作用,尤其是TNF- α 、IL-8、IL-6和PAF等炎症介质的释放,引起炎症级联放大效应,故阻断该类介质的释放及其介导的炎症效应可成为延缓和治疗AP的新作用靶点。

3 肠道细菌易位学说

肠道细菌移位必不可少的3个主要方面^[20]:小肠细菌过度生长、黏膜屏障破坏、免疫应答受损。肠道细菌易位是AP感染的主要原因,而肠道屏障的破坏是细菌易位的前提。正常情况下肠道含500余种常驻细菌,由于受到肠道屏障的阻隔,他们难以突破黏膜移位到肠外组织。肠黏膜缺血、缺氧或缺血-再灌注损伤是介导肠黏膜屏障损伤的重要机制。改善肠道微循环,可致肠黏膜的缺血-再灌注损伤,氧自由基和蛋白酶类的释放增加血管的通透性,造成组织水肿,屏障功能减弱。目前肠道细菌易位的发生途径尚未完全清楚,可能有以下途径^[21]:(1)经血液循环至其他组织;(2)经淋巴系统到淋巴结,再到其他组织;(3)细菌通过受损的肠黏膜直接进入腹腔;(4)肠道细菌通过胆道、胰胆管逆行感染。在调控肠道炎症介质的产生中,核糖聚合酶(poly

ADP-ribose polymerase, PARP)显得特别重要, 他的激活可诱导过氧亚硝基和羟自由基, 在胰腺炎的进展中他可诱导一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS). 有学者还认为细菌首先易位至肠系膜淋巴结再发生血行播散, 如果发生细菌易位、感染等并发症, 则可刺激巨噬细胞产生致炎症细胞因子, 引起循环中细胞因子高峰, 从而过度激活中性粒细胞, 引发多脏器损伤, 最终导致MODS. 由于MODS, 尤其是呼吸功能不全和肾功能障碍是SAP早期死亡的主要原因, 而感染、多器官功能衰竭和腹腔出血可能会影响晚期的死亡率^[6], 因此早期预防和正确的处理方法在降低风险因素上发挥关键作用, 并减少SAP的死亡率.

4 细胞凋亡学说

实验研究发现, 在SAP时细胞存在明显的坏死, 释放细胞内容物和炎症介质, 引起强烈炎症反应, 只有较少的细胞凋亡, 而在轻症胰腺炎中发现有大量的细胞凋亡. 因此, 在发生损伤时可以通过诱导胰腺细胞凋亡的方法, 减轻炎症反应、减少坏死, 而治疗SAP. 近期的研究发现^[22]胰腺腺泡细胞对损伤的反应在评价疾病严重程度中起重要作用. 从这些发现中可进一步推断: 凋亡可能是对AP胰腺腺泡细胞的有利反应, 腺泡细胞通过凋亡的方式死亡来阻止坏死发生的现象可能会降低AP的严重程度. 胰腺腺泡的凋亡指数与疾病的严重程度呈负相关^[23], 在SAP小鼠小肠内给予谷氨酰胺增加了内脏的血流, SAP时谷氨酰胺与凋亡的相互关系值得更进一步的研究. 有实验证实^[24]地塞米松可保护肠系膜淋巴结, 其机制可能通过降低血液中的内毒素、炎症介质及诱导淋巴细胞凋亡. Odinkova *et al*^[25]通过实验发现胰腺炎中细胞色素C的释放是细胞凋亡的中心环节. 细胞凋亡的范围与通过活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)和Ca²⁺与线粒体膜跨电位两者之间的调控有关. 稳定化处理线粒体对抗线粒体膜跨电位的缺失是减轻胰腺炎一项策略. 调控基因Bax和Bcl-2, 可能与胰腺细胞的凋亡有关^[26], 其在病理检测中具有省时和高代表性等优点. 所以, 阐明细胞凋亡在AP发病机制中的调控及作用, 将为AP的临床治疗和并发症防治提供新的思路.

5 胰腺腺泡内钙超载学说

人们很早就开始关注AP发病与血钙水平的关

系, 有研究提示AP时胰腺病损与Ca²⁺分布异常有关后, 腺泡细胞内钙离子浓度便成为研究的热点. Criddle *et al*^[27]证实当AP的超强刺激、酒精代谢物等破坏了Ca²⁺的体内平衡时, Ca²⁺储存池消耗殆尽, 胞液中持续的Ca²⁺升高将导致严重的结果-线粒体持续的去极化, 这可能是消化酶在细胞内过早地被激活并通过开放的线粒体通透转换微孔, 使得细胞内的ATP消耗, 并使能量依靠的Ca²⁺泵失活, 从而引起胞液中Ca²⁺超负荷, 依赖Ca²⁺的细胞继而发生坏死. 然而, 当腺泡细胞的应答不强烈时, Ca²⁺从储存池中释放不完全, 部分线粒体去极化, 细胞的坏死发生相对减少, 可见细胞质内空间性钙释放和腺泡细胞内酶原异常激活引起自身消化是AP发生的关键早期事件. Fischer *et al*^[28]和Wittel *et al*^[29]的研究显示, 在胆汁酸诱导的AP大鼠模型中, 胆汁酸降低了内质网膜上的钙泵活性, 使Ca²⁺升高, 进而导致胰腺水肿、坏死病理反应. Xue *et al*^[30]通过实验发现柴苓承气汤可以上调胰腺组织中Ca²⁺-ATPase(SERCA2) mRNA的表达, 减少细胞内钙超载, 从而减轻胰腺组织病变, 因此认为钙信号的改变直接参与了实验性胰腺炎的发生, 从细胞水平为腺泡细胞钙超载假说提供了直接证据. Criddle *et al*^[27]发现Ca²⁺的持续上升将抑制线粒体的功能, 使能量依靠的细胞膜Ca²⁺泵瘫痪, 而且可以过早的激活消化酶. 可见, 阻断Ca²⁺的持续性升高可保护线粒体功能, 这将有益于AP的治疗. 这些研究提示胰腺腺泡细胞钙超载不仅是引发AP的关键环节, 而且在促进AP发展中起重要作用.

6 高脂血症

大量动物实验、临床研究表明高脂血症是AP的病因之一, 肥胖和向心性肥胖与AP的严重程度有关^[31]. AP可引起一过性甘油三酯(triglycerides, TG)升高, Graesdal *et al*^[32]在实验性诱导犬胰腺炎后检测到血TG水平升高. 分析其原因: (1)胰腺炎时, 全身应激, 血清儿茶酚胺、胰高血糖素、生长激素等脂解激素水平升高, 这些激素作用于脂肪细胞的激素敏感性脂酶, 使脂肪组织的TG分解; (2)应激时胰岛素分泌相对减少或出现胰岛素抵抗, 脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)活性依赖于胰岛素, 因而LPL的活性下降, 引起高TG, 同时卵磷脂酰基转移酶活性也下降, 对高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)表面的胆固醇不能酯化进入HDL核心, 使HDL

■应用要点

本文阐述了研究AP发病机制在对其病变认识和治疗中的重要性, 各种学说研究的不断深入, 对探讨和制定临床治疗AP的理想方案, 减少其并发症和死亡率有一定的现实意义, 同时也为今后科研的方向提供了新思路.

■名词解释

胰蛋白酶原激活肽(TAP): 是胰蛋白酶原氨基末端的一段短肽, 在胰蛋白酶原激活后转变为活化的胰蛋白酶过程中可以被释放出来, 并直接被释放进入腹腔和血液循环及尿液中。

水平下降。Deng *et al*^[33]研究发现内源性的高TG血症可使胰腺炎病理损害明显加重。Segersvärd *et al*^[34]在患AP的大鼠模型中发现, 与瘦大鼠相比, 只在肥胖的大鼠身上看到显示肝损害的脂肪性肝炎和丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平明显升高, 且肥胖大鼠各器官中可检测出更高的TNF- α mRNA, IL-10。Yoon *et al*^[35]通过实验分析发现伴有高脂血症的AP血清中的淀粉酶通常正常或低于正常水平, 其具体机制尚未完全明了。高脂饮食可以导致细胞膜和细胞器膜脂肪酸含量及其构成的比例发生变化^[30], 从而影响信号传导过程, 引起细胞内钙的异常增加, 继而发生细胞坏死。又有实验发现^[36], 分离高脂肪饮食大鼠的胰腺腺泡细胞, 再予胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)刺激后, 其细胞内Ca²⁺的上升高于正常细胞, 从而引发AP。Zhang *et al*^[37]研究指出, 大鼠胰腺腺泡细胞培养液中加入脂肪酸, 结果发现胰腺腺泡细胞的损伤程度与脂肪酸的作用时间和浓度成正比。总之, 高脂血症介导AP的确切关系目前还未明了, 可能与激素、炎症因子及Ca²⁺的调节紊乱有关, 建立高脂大鼠模型研究可能有助于新的发现和突破。

7 结论

虽然AP的病因已牵涉到各种各样的感染性因素, 但其发生可与其他非感染性因素并存, 究竟何种因素为引起AP的触发点尚未明了。最近, Konstantinou *et al*^[38]报道了1例AP合并单纯疱疹病毒感染的患者, 由于胰头水肿压迫胰内胆管导致胰酶过早激活从而诱发AP。AP不论有无细菌感染, 都有内毒素水平增高, 炎症过程本身和内毒素血症均可以刺激机体产生过量细胞因子, 各种细胞因子参与了AP复杂的病理生理过程, 各因素之间既相互独立又相互渗透, 共同促进疾病的发生发展, 但由于目前仍缺少对AP发病机制和病理变化的足够认识, 所以对该病的预防和治疗仍未找到立竿见影的方案。选择性建立动物AP模型, 应当是今后探讨AP发病机制和治疗策略的新视窗。

8 参考文献

- 1 Hashimoto D, Ohmuraya M, Hirota M, Yamamoto A, Suyama K, Ida S, Okumura Y, Takahashi E, Kido H, Araki K, Baba H, Mizushima N, Yamamura K. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *J Cell Biol* 2008; 181: 1065-1072
- 2 Allen HS, Steiner J, Broussard J, Mansfield

- C, Williams DA, Jones B. Serum and urine concentrations of trypsinogen-activation peptide as markers for acute pancreatitis in cats. *Can J Vet Res* 2006; 70: 313-316
- 3 Sha H, Ma Q, Jha RK. Trypsin is the culprit of multiple organ injury with severe acute pancreatitis. *Med Hypotheses* 2009; 72: 180-182
- 4 Zwerina J, Hayer S, Redlich K, Bobacz K, Kollias G, Smolen JS, Schett G. Activation of p38 MAPK is a key step in tumor necrosis factor-mediated inflammatory bone destruction. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 463-472
- 5 Karrasch T, Steinbrecher KA, Allard B, Baldwin AS, Jobin C. Wound-induced p38MAPK-dependent histone H3 phosphorylation correlates with increased COX-2 expression in enterocytes. *J Cell Physiol* 2006; 207: 809-815
- 6 Sun B, Dong CG, Wang G, Jiang HC, Meng QH, Li J, Liu J, Wu LF. [Analysis of fatal risk factors for severe acute pancreatitis: a report of 141 cases] *Zhonghua Wai Ke Zazhi* 2007; 45: 1619-1622
- 7 Zhang XP, Zhang L, Chen LJ, Cheng QH, Wang JM, Cai W, Shen HP, Cai J. Influence of dexamethasone on inflammatory mediators and NF-kappaB expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 548-556
- 8 Muller CA, McArthur N, Belyaev O, Burr W, Werner J, Meiser A, Weyhe D, Büchler MW, Uhl W. The effect of synacthen on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2008; 37: 316-320
- 9 Gulcubuk A, Altunatmaz K, Sonmez K, Haktanir-Yatkin D, Uzun H, Gurel A, Aydin S. Effects of curcumin on tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the late phase of experimental acute pancreatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2006; 53: 49-54
- 10 Noh KW, Pungpapong S, Wallace MB, Woodward TA, Raimondo M. Do cytokine concentrations in pancreatic juice predict the presence of pancreatic diseases? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 782-789
- 11 de-Madaria E, Martínez J, Sempere L, Lozano B, Sánchez-Payá J, Uceda F, Pérez-Mateo M. Cytokine genotypes in acute pancreatitis: association with etiology, severity, and cytokine levels in blood. *Pancreas* 2008; 37: 295-301
- 12 Schneider A, Haas SL, Hildenbrand R, Siegmund S, Reinhard I, Nakovics H, Singer MV, Feick P. Enhanced expression of interleukin-18 in serum and pancreas of patients with chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6507-6514
- 13 Shimizu K. Pancreatic stellate cells: molecular mechanism of pancreatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S119-S121
- 14 Moreno C, Nicaise C, Gustot T, Quertinmont E, Nagy N, Parmentier M, Louis H, Devière J. Chemokine receptor CCR5 deficiency exacerbates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1089-G1099
- 15 Panek J, Zasada J, Poźniczek M. [Microcirculatory disturbance in the course of acute pancreatitis] *Przegl Lek* 2007; 64: 435-437
- 16 Zhang S, Peng XG, Liu CC, Liu H, Lu Y. Low-dose dopamine reduces inflammatory factors of acute pancreatitis in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 646-649
- 17 Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Fritz S, Schneider

- L, Gebhard MM, Büchler MW, Werner J. Platelet function in acute experimental pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 439-444
- 18 Xia SH, Hu CX, Zhao ZL, Xia GD, Di Y. Significance of platelet activating factor receptor expression in pancreatic tissues of rats with severe acute pancreatitis and effects of BN52021. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2992-2998
- 19 Chen C, Xia SH, Chen H, Li XH. Therapy for acute pancreatitis with platelet-activating factor receptor antagonists. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4735-4738
- 20 van Minnen LP, Blom M, Timmerman HM, Visser MR, Gooszen HG, Akkermans LM. The use of animal models to study bacterial translocation during acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 682-689
- 21 Liul'ko IV, Kosul'nikov SO, Gorbach DV. [Pathogenetic aspects of surgical treatment of destructive pancreatitis] *Klin Khir* 2007; 22-27
- 22 Lytras D, Manes K, Triantopoulou C, Paraskeva C, Delis S, Avgerinos C, Derveniz C. Persistent early organ failure: defining the high-risk group of patients with severe acute pancreatitis? *Pancreas* 2008; 36: 249-254
- 23 Xu XF, Lou WH, Wang DS, Jin da Y, Ni XL, Wu ZH. Influence of glutamine on pancreatic blood flow and apoptosis of pancreatic acinar in rats with severe acute pancreatitis. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 121-126
- 24 Zhang XP, Xu HM, Jiang YY, Yu S, Cai Y, Lu B, Xie Q, Ju TF. Influence of dexamethasone on mesenteric lymph node of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3511-3517
- 25 Odinkova IV, Sung KF, Mareninova OA, Hermann K, Evtodienko Y, Andreyev A, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria. *Gut* 2009; 58: 431-442
- 26 Zhang XP, Tian H, Lu B, Chen L, Xu RJ, Wang KY, Wang ZW, Cheng QH, Shen HP. Tissue microarrays in pathological examination of apoptotic acinar cells induced by dexamethasone in the pancreas of rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 527-536
- 27 Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ* 2007; 14: 1285-1294
- 28 Fischer L, Gukovskaya AS, Penninger JM, Mareninova OA, Friess H, Gukovsky I, Pandol SJ. Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates bile acid-induced Ca(2+) responses in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G875-G886
- 29 Wittel UA, Wiech T, Chakraborty S, Boss B, Lauch R, Batra SK, Hopt UT. Taurocholate-induced pancreatitis: a model of severe necrotizing pancreatitis in mice. *Pancreas* 2008; 36: e9-e21
- 30 Xue P, Deng LH, Zhang ZD, Yang XN, Xia Q, Xiang DK, Huang L, Wan MH. Effect of Chaiqinchengqi decoction on sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase mRNA expression of pancreatic tissues in acute pancreatitis rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2343-2348
- 31 Sempere L, Martinez J, de Madaria E, Lozano B, Sanchez-Paya J, Jover R, Perez-Mateo M. Obesity and fat distribution imply a greater systemic inflammatory response and a worse prognosis in acute pancreatitis. *Pancreatol* 2008; 8: 257-264
- 32 Graesdal A. [Severe hypertriglyceridemia--an important cause of pancreatitis] *Tidsskr Nor Lægeforen* 2008; 128: 1053-1056
- 33 Deng LH, Xue P, Xia Q, Yang XN, Wan MH. Effect of admission hypertriglyceridemia on the episodes of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4558-4561
- 34 Segersvård R, Tsai JA, Herrington MK, Wang F. Obesity alters cytokine gene expression and promotes liver injury in rats with acute pancreatitis. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 23-28
- 35 Yoon YK, Ji JH, Mun BS. [Hypertriglyceridemia-induced pancreatitis] *Korean J Gastroenterol* 2008; 51: 309-313
- 36 Huang G, Yao J, Zeng W, Mizuno Y, Kamm KE, Stull JT, Harding HP, Ron D, Muallem S. ER stress disrupts Ca2+-signaling complexes and Ca2+ regulation in secretory and muscle cells from PERK-knockout mice. *J Cell Sci* 2006; 119: 153-161
- 37 Zhang XP, Wang L, Zhou YF. The pathogenic mechanism of severe acute pancreatitis complicated with renal injury: a review of current knowledge. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 297-306
- 38 Konstantinou GN, Liatsos CN, Patelaros EG, Karagiannis SS, Karnesis LI, Mavrogiannis CC. Acute pancreatitis associated with herpes simplex virus infection: report of a case and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 114-116

同行评价

本文论述急性胰腺炎发病机制进展, 条理清晰, 可读性较强。

编辑 李军亮 电编 何基才

肠易激综合征发病机制研究进展

张鸣鸣, 姜敏

■背景资料

肠易激综合征是最常见的一种功能性胃肠病,虽然发病率高,但是其发病机制尚未有定论。现在普遍认为肠易激综合征发病与胃肠动力异常和内脏敏感性异常密切相关,同时还与肠道感染、免疫、神经-内分泌系统异常、精神心理因素、性别、遗传、饮食等多种因素有关。

张鸣鸣, 姜敏, 中国医科大学附属一院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 本综述由张鸣鸣完成, 姜敏审校。

通讯作者: 姜敏, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属一院消化内科. jiang-min@163.com
电话: 024-83282563

收稿日期: 2009-05-14 修回日期: 2009-06-30

接受日期: 2009-07-06 在线出版日期: 2009-08-28

Advances in the pathogenesis of irritable bowel syndrome

Ming-Ming Zhang, Min Jiang

Ming-Ming Zhang, Min Jiang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Min Jiang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. jiang-min@163.com

Received: 2009-05-14 Revised: 2009-06-30

Accepted: 2009-07-06 Published online: 2009-08-28

Abstract

Irritable bowel syndrome (IBS) is a highly prevalent functional gastrointestinal disorder in the world. Although previous studies have led to a greater understanding of the underlying pathophysiology of IBS, the mechanisms underlying the development of IBS are complex and still unclear. It is currently known that a variety of factors contribute to the development of IBS. Abnormal gastrointestinal motility and visceral hypersensitivity are thought to be the pathophysiological basis of the disease. In this article, we will review the recent advances in the pathogenesis of irritable bowel syndrome.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Pathogenesis; Abnormal gastrointestinal motility; Visceral hypersensitivity

Zhang MM, Jiang M. Advances in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2484-2490

摘要

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)

是常见的功能性胃肠病,其发病机制尚未完全阐明。目前认为IBS是由多种因素共同作用的结果,肠道动力异常,内脏高敏感性为IBS发病的病理生理基础。本文对IBS的多种发病机制的最新研究作一综述。

关键词: 肠易激综合征; 发病机制; 肠道动力异常; 内脏高敏感性

张鸣鸣, 姜敏. 肠易激综合征发病机制研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2484-2490

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2484.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种慢性功能性肠道疾病,临床上以腹痛或者腹部不适伴排便习惯或大便性状改变为特征,症状持续或间歇发作,但又缺乏可以解释的形态学或生化检查异常。该病是最常见的一种功能性肠道疾病,1997年我国协和医院潘国宗 *et al* 组织的一项调查显示,北京地区IBS流行率在7%左右^[1]。本病的发病机制尚未完全明确,目前认为IBS的发病可能与肠道动力异常、内脏感觉异常、炎症、感染、神经-内分泌、遗传、饮食等多种因素的相互作用有关,其中胃肠动力异常和内脏感觉异常被认为是IBS主要的病理生理学基础。本文拟以肠道动力异常及内脏感觉异常2种因素对IBS的各种病因最新研究作一综述。

1 肠道动力异常

排便异常或大便性状异常为IBS主要症状之一,因此胃肠动力异常一直为IBS病理生理研究的重点。早期的研究多局限于远端结肠,近年来对全消化道动力的研究发现,除结肠外,IBS患者的食管、胃、小肠甚至胆囊等在一定程度上也存在动力学异常,目前认为小肠动力异常与IBS症状的产生关系密切。

1.1 食管及胃动力 早在20世纪80年代就有研究显示,IBS患者食管下端括约肌压力较健康个体低,且食管收缩异常更为常见,而有食管收缩异

■同行评议者

李定国, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科; 任超世, 研究员, 中国医学科学院生物医学工程研究所

常的患者也经常伴随着IBS样症状. 目前对于IBS患者胃动力的研究, 说法不一. van der Voort *et al*用胃电图来观察IBS患者餐后胃排空状况, 认为IBS患者中存在胃排空延迟的现象^[2], 而另有研究显示只有那些伴有消化不良症状的IBS患者才存在胃动力的异常^[3]. 关于IBS患者胃运动的研究结果尚无定论, 只有少数研究报道IBS患者胃排空延迟^[4-5], 更多的结果显示IBS患者胃排空基本正常.

1.2 小肠运动 小肠运动障碍在IBS发病中起重要作用, 小肠内容物的转运速度可直接用来评估小肠运动. 几乎所有相关的研究都认为, 在以腹泻为主的IBS(diarrhea predominant IBS, D-IBS)患者中小肠内容物转运速度加快^[6], 而以便秘为主的IBS(constipation predominant IBS, C-IBS)患者小肠转运速度减慢^[7].

在饥饿或者小肠内容物大部分被吸收后的消化间期, 小肠出现周期性的移行性复合运动(migrating motor complex, MMC), 腹泻型IBS患者MMC周期在白天较正常人缩短, 但出现次数却增多, 而便秘型IBS患者MMC较正常人延长, 且MMCⅢ期收缩幅度降低. 对IBS患者的小肠进行压力测定可发现2种异常的MMC: (1)群集性收缩(discrete clustered contraction, DCC), 在28%的正常人中可观察到DCC, 而在腹泻型IBS患者中, DCC的发生率为78%. (2)延迟扩布收缩(prolonged propagated contractions, PPC): 正常情况下主要发生于远端回肠, 起到阻止内容物逆流的作用, 而在IBS患者中可在小肠内测到PPC的发生, IBS患者DCC和PPC的出现多伴有腹痛的发生^[8-10].

1.3 结肠运动 正常人结肠的运动形式主要有混合运动(袋状往返运动)和推进运动(蠕动和集团运动). 正常情况下, 混合运动主要是使肠内容物和肠壁充分接触, 利于水和无机盐的吸收, 推进运动主要用于运输肠内容物. 基础状态下, D-IBS患者乙状结肠腔内压力降低, 各段结肠推进性蠕动增强, 以降乙段结肠明显, 同时可伴有腹痛; C-IBS患者乙状结肠腔内压力增高, 其结肠袋状收缩增加, 致使便秘型患者多表现为痉挛性收缩和腹胀, 同时有颗粒状便. 一项研究^[11]通过对IBS患者横结肠压力测定发现, 在餐后或给患者注射胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)后, 非便秘型IBS患者的肠道动力指数(motility index, MI)和高幅传播性收缩(high amplitude propagating contractions, HAPCS)两者的均值和

峰值均比对照组明显升高. 此外, 这项研究还显示: 90%以上的患者结肠内HAPCS增强伴随着腹痛的发生, 故推测过强的HAPCS可能是腹痛的原因之一.

最近有研究报道IBS患者的结肠反射运动存在异常: IBS患者在低能量饮食后直乙结肠反射性收缩节律存在异常^[12], 并且结肠扩张引起的直肠反射性收缩节律减低^[13]. 这些对于结肠反射性运动的研究为IBS患者结肠神经-肌肉功能状态的研究提供了重要信息, 之前有研究对多种平滑肌松弛剂在IBS患者的临床治疗中的效果进行观察分析, 发现其对IBS患者的症状有较好作用, 推测IBS患者可能存在平滑肌运动障碍^[14]. 有关IBS患者肠道神经-肌肉的改变目前开展的研究还不多, 这也许会成为将来研究的一个重要方向.

关于IBS胃肠运动的改变, 目前尚无特征性的标志, 复杂多变的动力异常目前也未有统一的定论, 尚需要进一步的临床研究. 对于引起胃肠动力异常的原因也是有多种因素相互作用, 例如: 神经系统, 这涉及到中枢神经、脑-肠轴、肠神经系统功能的紊乱, 也许还有自主神经系统的参与; 炎症, 多种炎症介质通过多种机制影响到胃肠动力, 包括感染后的胃肠道功能紊乱; 还有现在引起重视的神经内分泌系统等多种因素参与了IBS患者胃肠道动力异常的发生.

2 内脏感觉异常

目前多数研究认为IBS患者存在内脏高敏感状态, 即内脏组织对于刺激的感受性增强, 包括痛觉过敏和痛觉异常, 前者主要表现为对伤害性刺激的敏感性增强及感受阈值降低, 后者指的是在正常人不引起疼痛的刺激可以诱发IBS患者疼痛. 1973年, Ritchie首次用乙状结肠充气实验表明IBS患者结肠感觉存在异常, 并提出了“内脏感觉过敏”的概念^[15]. 自此, 出现了大量关于内脏敏感性的报道, 证实了这一异常的存在. IBS患者内脏敏感性增高不仅表现在结肠^[16], 还可以表现在小肠、胃以及食管^[17-18]. 但不是所有的IBS患者都有内脏感觉异常^[19], 具有多项IBS症状的患者也许存在广泛的内脏敏感性增高, 而对于症状范围比较局限的患者来说, 也许只有某一个具体的器官具有感觉异常^[20].

早期有研究显示, IBS患者选择性地对小肠的机械刺激过敏, 而非电刺激; Sirmen *et al*的研究报道: 给IBS患者十二指肠注入液体时, 其初

■研究前沿

目前炎症免疫、脑-肠轴、精神心理因素等是肠易激综合征研究的热点, 本文就上述因素进行总结, 并将各种发病机制的相互联系进行论述, 提出了精神心理因素与内脏高敏感性、炎症免疫对肠道动力与感觉的影响等需要进一步研究的问题.

■相关报道

在有关内脏敏感性的研究中, Dorn *et al* 认为不应该忽视心理因素带来的影响, 这两者之间的关系虽然早有人提出, 但仍需要进一步的研究加以证实。

始感觉阈值、不适阈值及疼痛阈值均较正常人明显降低, 而胀气感明显增加, 且腹泻型IBS患者的疼痛阈值较便秘型IBS下降更明显^[21]。国内姜敏 *et al* 运用调查问卷和直肠水囊容积试验对IBS患者和正常对照组的内脏感觉进行评价, 结果显示: IBS患者直肠容积的初始阈值和紧迫感阈值较对照组明显降低, 且以腹痛为主的IBS患者阈值下降更为明显^[22]。但是在内脏高敏感性的上不能忽视心理因素带来的影响, 早期有研究发现患者报告疼痛或者不适阈值与患者心理因素有关, 而这种心理因素与患者对于焦虑和躯体化症状的评价紧密相关^[23]。近期有研究者对IBS患者及正常人的内脏感觉阈值进行评价后认为: IBS患者结肠较正常人疼痛阈值和加负荷感觉阈值降低不是由于患者内脏敏感性增高, 而是他们对于疼痛的报告标准降低, 而这种标准是由心理因素决定的, 所以研究者认为IBS患者的“内脏高敏感性”似乎是由心理因素决定的, 而不是生理因素^[24]。但是目前关于对IBS患者内脏感觉异常是否受心理因素的影响, 结论尚有争论, 也有研究认为IBS患者与正常人在内脏疼痛或者不适的报告上不存在心理因素引起的偏倚^[25], 这还需要进一步的研究。

3 其他影响因素

肠道动力异常与内脏感觉异常作为IBS发病的病理生理基础, 受到多种因素的影响, 这些因素相互影响相互作用, 最终通过影响肠道运动与感觉而产生IBS症状。

3.1 肠道炎症与免疫功能的变化 越来越多的报道认为肠道的急性感染可增加IBS发病的机会^[26-28]。英国研究者Neal对544例急性胃肠炎患者进行了观察, 报道感染后6 mo肠功能紊乱的发生率为25%, 致病细菌主要为弯曲菌(64.1%)和沙门菌(30.5%), 并提出了感染后IBS(postinfectious IBS, PI-IBS)。有研究显示: 4%-32%的IBS是发生在急性肠道感染之后, 即PI-IBS, 常见感染原有沙门菌、志贺菌、弯曲杆菌属、贾第鞭毛虫等^[29]。PI-IBS患者可以存在结肠黏膜低度炎症, 这些患者在肠道感染原清除之后, 肠道的低度炎症仍然存在^[30]。Pimentel *et al* 给大鼠口服空肠弯曲杆菌, 引起肠道急性感染, 即使在病原菌清除后3 mo, 仍有57%的大鼠存在大便性状的改变, 且直肠和左半结肠上皮内淋巴细胞数量增多^[31]。PI-IBS患者肠道黏膜内存在持续的炎症反应, 这种炎症反应导致肠

黏膜内细胞结构发生变化, 肥大细胞(mast cell, MC)^[32-33]、肠嗜铬细胞^[29]、T淋巴细胞^[32-33]、中性粒细胞^[32]等增多, 使得炎症因子表达增强, 如白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)^[34-35]、环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)^[36-37]、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)^[38]、前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)^[39-40]、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)^[41-42]、一氧化氮(nitric oxide, NO)^[43]等, 这些炎症因子作用于肠道黏膜层和平滑肌层的神经纤维, 通过神经、内分泌等途径影响肠道动力和感觉, 从而产生IBS症状。

PI-IBS患者在感染后肠道黏膜可持续存在低度的炎症, 但是那些没有肠道急性感染史的IBS患者仍可以观察到炎症反应。一项研究显示: IBS患者的回盲部MC数量较非特异性肠炎组和正常对照组明显增加, 其中腹泻型IBS增高更为明显, 同时研究还报道: IBS患者回盲部和直乙结肠交界处可见到多出MC脱颗粒现象, 还有多处MC侵入腺上皮, 而在正常对照组和非特异性肠炎组却没发现此种现象^[44]。有关肠道炎症和免疫功能的改变可能通过以下几种机制影响肠道功能: (1)肠道内的炎症刺激可能引起促肾上腺皮质激素释放因子(corticotrophin releasing factor, CRF)增加, 而持续的CRF分泌增加可引起结肠运动加快和内脏感觉异常^[45]。(2)肠道的炎症反应可能会削弱肠道黏膜的屏障作用, 使得黏膜通透性增加^[46]。(3)炎症刺激导致MC活化脱颗粒, MC是一种重要的肠道炎症细胞, 表面具有胃肠激素的受体, 一些胃肠激素可以刺激MC释放多种生物活性物质影响肠道运动和感觉, 这也许是炎症所致IBS症状的关键, 是神经-免疫和脑-肠轴之间的桥梁^[47]。IBS作为功能性肠道疾病, 长期以来认为不存在形态学的改变, 而IBS患者肠道的微炎症改变了这一说法, 但是并不是所有IBS患者都存在炎症, 且这种肠道低度炎症改变的发生率尚不明确, 其相关的研究还不能充分解释这种炎症存在的原因, 且这种低度炎症反应具体是如何影响肠道动力及内脏感觉而产生IBS症状, 这诸多的问题还有待于进一步研究。

3.2 神经-内分泌和脑-肠轴 肠道运动的调节主要包括神经系统和内分泌系统, 并且这2个系统相互作用, 相互影响, 任何影响这2个系统的因素都可以使肠道运动紊乱。近年来对于肠嗜铬细胞(enterochromaffin cell, EC)和5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的研究较多, 越来越多的证据表明5-HT在IBS的发病中有重要作用。早在

1977年Kosola就发现IBS患者结肠黏膜的5-HT和肾上腺能神经支配的EC显著增多, 而且EC的增多与肠腔分泌5-HT增多一致. IBS患者5-HT增加通过脑-肠轴调节, 最终可影响胃肠道动力和内脏感觉^[48]. 有研究发现IBS患者肠黏膜中杯状细胞、MC、浆细胞、神经内分泌细胞超微结构的变化. 显示他们均处于高度功能活跃和分泌旺盛状态. 提示神经-免疫-内分泌系统可能在IBS发病中发挥着重要的作用^[21]. 除了5-HT之外, 目前还有关于多种其他胃肠激素的研究^[49]表明: CCK、胃动素(motilin, MOT)、生长抑素(somatostatin, SS)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)、P物质(substance P, SP)等这些在正常个体中调节胃肠动力和感觉的激素在IBS患者的血中浓度增高, 通过多种机制: 如使MC活化、脑-肠轴等, 影响肠道平滑肌和神经系统, 产生IBS症状. 此外, 这些胃肠激素也可以通过免疫系统, 间接影响胃肠道运动和感觉. 胃肠激素间的相互调节非常复杂, 并非测定血和肠道黏膜中的浓度可以真正全面地反映IBS患者体内激素的状况, 胃肠激素和IBS的关系尚不能确定, 随着研究的深入, 胃肠激素在IBS发病中的意义可以进一步被揭示.

脑-肠轴在胃肠道感觉和运动功能的调节中起极其重要的作用, 其任何一个环节出现异常都可以影响胃肠道功能. 有研究发现IBS患者脊髓兴奋性增高, 当外周有害刺激包括炎症介质和神经损伤使得一些静止性伤害性感受器激活时, 增加了脊髓中可活化的伤害性感受器的数量, 从而降低了初级传入神经的感受阈值^[50-52], 引起内脏敏感性的增高. 近年来许多研究运用正电子断层扫描(positron emission computed tomography, PET)及功能性核磁共振(functional magnetic resonance imaging, fMRI)来检测脑部血流改变从而评估脑部功能, 发现IBS患者脑部代谢和内脏感觉的中枢通路与正常人有较大差异. 有研究表明, IBS患者直肠被扩张时, 其脑血流图与正常人不同, 丘脑部激活而扣带回处减弱^[53]. 有人用fMRI检测发现, 直肠扩张后的IBS患者与正常人相比, 脑图像中存在明显的非活化区^[54], 这些对内脏感觉刺激的异常反应可能导致了肠道的动力异常, 从而产生IBS症状. 除此之外, 有研究^[55-57]报道IBS患者自主神经功能异常, 与正常人相比, IBS患者交感神经活动增强和副交感神经活动减弱. 自主神经系统一方

面可激活MC使之脱颗粒释放活性物质, 如5-HT和组胺等, 导致内脏感觉阈值下降, 另一方面可通过作用于肠神经系统(enteric nervous system, ENS)引起平滑肌细胞紧张性改变, 使肠壁压力/容积之比发生改变, 导致内脏传入纤维的传入冲动增加, 反射性引起肠道运动加快或减慢. 肠道黏膜可感受内脏机械和化学刺激, 其主要的初级感觉神经递质主要是5-HT. 5-HT可以调节肠道的动力、调节胃肠道的分泌和协调肠道的感知功能^[58], 同时也是参与脑-肠轴的重要神经介质^[59]. 目前关于脑-肠轴在IBS中的具体作用机制还不明确, 需要更进一步的研究.

3.3 心理和社会因素 大量的研究都表明, 心理社会因素与IBS密切相关, 可以影响IBS的发生、发展和预后, 情绪变化或应激可以改变结肠和小肠运动, 并且可以提高胃肠道内脏感觉的敏感性, 在功能性胃肠疾病发病机制中起重要作用^[60]. 有研究运用调查问卷的方式对620位急性胃肠炎的患者进行情绪、压力、完美主义信仰、对于疾病的负面观念和行为进行评价, 并且在感染后3、6 mo对其进行随访, 发现那些压力大、抑郁和焦虑积分高的人更易患IBS^[61]. 有研究报道IBS患者焦虑抑郁总积分和回盲部肠黏膜MC数目、MC脱颗粒比率之间具有正相关性^[62], MC释放大量生物活性物质, 例如: 神经肽、生物胺、酶、细胞因子等, 可使微血管平滑肌和通透性发生改变、使肠道平滑肌收缩和舒张状态发生改变、调节腺体分泌功能、调节机体免疫状态、使痛觉敏感性发生改变, 从而引起IBS症状. 其中, 目前普遍认为以腹泻为主的IBS患者受焦虑、抑郁等心理因素以及神经质、多疑的人格特征的影响较以便秘为主的IBS患者更大^[63-65]. 此外, 精神压力可以改变肠道运动^[66], 提高内脏的敏感性^[67], 激活肠道黏膜炎症反应^[68], 并且影响肠上皮功能, 这些都是对IBS发病的起重要作用. 除自身心理因素外, 社会环境因素对IBS也有重要意义, 社会环境通过作用于心理而影响IBS的发病, 严重的生活事件和痛苦的经历在功能性胃肠病患者中比在器质性疾病患者中出现的多. 心理社会因素与胃肠道生理功能之间通过脑-肠轴相互影响^[69], 可以认为精神心理因素是脑-肠轴在IBS发病中起重要作用的证据之一. 有关心理社会因素的研究, 对于IBS的防治具有重大意义, 目前已有多种抗焦虑、抗抑郁药应用于IBS的治疗, 并取得了较

■创新盘点

本文概括范围广, 重点突出, 以胃肠道动力异常和内脏敏感性异常为基础对肠易激综合征发病机制进行论述, 同时将其其他多种发病因素对这两种基础病因的影响进行阐述, 在复习基础的同时展现了最新的研究成果.

■应用要点

本文将肠易激综合征的发病机制最新研究进行阐述,使读者对本病的研究概况有一综合了解,并且本文提出了有待解决的问题,指导读者了解今后的研究方向。

好的疗效。

4 结论

IBS的发病因素较为复杂,除上述几种病因外,其他例如:性别、饮食、遗传等也有大量研究报道与IBS有关。目前普遍认为,肠道动力异常和内脏感觉异常为IBS的病理生理基础,其他各种因素均可影响这两方面,通过这2种机制引起IBS症状。但是IBS的各种发病机制相互作用,相互影响,其间联系复杂,绝非一种机制可以解释IBS的全部症状,随着研究的深入,这多种因素间的复杂关联也会逐渐被人们所认识。

5 参考文献

- 1 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 韩少梅, 郭慧平, 方秀才. 北京地区肠易激综合征的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查. *中华流行病学杂志* 2000; 21: 26-29
- 2 van der Voort IR, Osmanoglou E, Seybold M, Heymann-Mönnikes I, Tebbe J, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H. Electrogastrography as a diagnostic tool for delayed gastric emptying in functional dyspepsia and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 467-473
- 3 Stanghellini V, Tosetti C, Barbara G, De Giorgio R, Cogliandro L, Cogliandro R, Corinaldesi R. Dyspeptic symptoms and gastric emptying in the irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2738-2743
- 4 Chey WY, Jin HO, Lee MH, Sun SW, Lee KY. Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1499-1506
- 5 Narducci F, Bassotti G, Granata MT, Pelli MA, Gaburri M, Palumbo R, Morelli A. Colonic motility and gastric emptying in patients with irritable bowel syndrome. Effect of pretreatment with octylonium bromide. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 241-246
- 6 Portincasa P, Moschetta A, Baldassarre G, Altomare DF, Palasciano G. Pan-enteric dysmotility, impaired quality of life and alexithymia in a large group of patients meeting ROME II criteria for irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2293-2299
- 7 Small PK, Loudon MA, Hau CM, Noor N, Campbell FC. Large-scale ambulatory study of postprandial jejunal motility in irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 39-47
- 8 Schmidt T, Hackelsberger N, Widmer R, Meisel C, Pfeiffer A, Kaess H. Ambulatory 24-hour jejunal motility in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 581-589
- 9 Kellow JE, Phillips SF. Altered small bowel motility in irritable bowel syndrome is correlated with symptoms. *Gastroenterology* 1987; 92: 1885-1893
- 10 Kellow JE, Gill RC, Wingate DL. Prolonged ambulant recordings of small bowel motility demonstrate abnormalities in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1990; 98: 1208-1218
- 11 Kellow JE, Eckersley GM, Jones M. Enteric and central contributions to intestinal dysmotility in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1992; 37:

168-174

- 12 Di Stefano M, Miceli E, Missanelli A, Mazzocchi S, Corazza GR. Meal induced rectosigmoid tone modification: a low caloric meal accurately separates functional and organic gastrointestinal disease patients. *Gut* 2006; 55: 1409-1414
- 13 Ng C, Danta M, Kellow J, Badcock CA, Hansen R, Malcolm A. Attenuation of the colorectal tonic reflex in female patients with irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G489-G494
- 14 Poynard T, Naveau S, Mory B, Chaput JC. Meta-analysis of smooth muscle relaxants in the treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; 8: 499-510
- 15 Ritchie J. Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* 1973; 14: 125-132
- 16 Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganière M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002; 122: 1771-1777
- 17 Zighelboim J, Talley NJ, Phillips SF, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Visceral perception in irritable bowel syndrome. Rectal and gastric responses to distension and serotonin type 3 antagonism. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 819-827
- 18 Holtmann G, Goebell H, Talley NJ. Functional dyspepsia and irritable bowel syndrome: is there a common pathophysiological basis? *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 954-959
- 19 Costantini M, Sturniolo GC, Zaninotto G, D'Inca R, Polo R, Naccarato R, Ancona E. Altered esophageal pain threshold in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 206-212
- 20 Bouin M, Lupien F, Riberdy M, Boivin M, Plourde V, Poitras P. Intolerance to visceral distension in functional dyspepsia or irritable bowel syndrome: an organ specific defect or a pan intestinal dysregulation? *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 311-314
- 21 Simrén M, Abrahamsson H, Björnsson ES. An exaggerated sensory component of the gastrocolonic response in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2001; 48: 20-27
- 22 姜敏, 汤浩, 刘峥艳, 张义侠, 傅宝玉. 肠易激综合征内脏感知异常与临床症状的相关性. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 561-564
- 23 Whitehead WE, Crowell MD, Davidoff AL, Palsson OS, Schuster MM. Pain from rectal distension in women with irritable bowel syndrome: relationship to sexual abuse. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 796-804
- 24 Dorn SD, Palsson OS, Thiwan SI, Kanazawa M, Clark WC, van Tilburg MA, Drossman DA, Scarlett Y, Levy RL, Ringel Y, Crowell MD, Olden KW, Whitehead WE. Increased colonic pain sensitivity in irritable bowel syndrome is the result of an increased tendency to report pain rather than increased neurosensory sensitivity. *Gut* 2007; 56: 1202-1209
- 25 Corsetti M, Ogliari C, Marino B, Basilisco G. Perceptual sensitivity and response bias during rectal distension in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 541-547
- 26 Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and

- its pathogenesis. *Gut* 2004; 53: 1096-1101
- 27 Jung IS, Kim HS, Park H, Lee SI. The clinical course of postinfectious irritable bowel syndrome: a five-year follow-up study. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 534-540
 - 28 Mearin F, Pérez-Oliveras M, Perelló A, Vinyet J, Ibañez A, Coderch J, Perona M. Dyspepsia and irritable bowel syndrome after a Salmonella gastroenteritis outbreak: one-year follow-up cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129: 98-104
 - 29 Spiller RC. Role of infection in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 41-47
 - 30 Smith JL, Bayles D. Postinfectious irritable bowel syndrome: a long-term consequence of bacterial gastroenteritis. *J Food Prot* 2007; 70: 1762-1769
 - 31 Pimentel M, Chatterjee S, Chang C, Low K, Song Y, Liu C, Morales W, Ali L, Lezcano S, Conklin J, Finegold S. A new rat model links two contemporary theories in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 982-989
 - 32 Guilarte M, Santos J, de Torres I, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Martínez C, Casellas F, Saperas E, Malagelada JR. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* 2007; 56: 203-209
 - 33 Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, Wilson I. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 122: 1778-1783
 - 34 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗. 结肠黏膜肥大细胞活化在肠易激综合征发病中的作用. *中华消化杂志* 2003; 23: 523-526
 - 35 Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Salvioli B, Corinaldesi R. New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 2: 1-9
 - 36 Barbara G, De Giorgio R, Deng Y, Vallance B, Blennerhassett P, Collins SM. Role of immunologic factors and cyclooxygenase 2 in persistent postinfective enteric muscle dysfunction in mice. *Gastroenterology* 2001; 120: 1729-1736
 - 37 Akiho H, Deng Y, Blennerhassett P, Kanbayashi H, Collins SM. Mechanisms underlying the maintenance of muscle hypercontractility in a model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 2005; 129: 131-141
 - 38 Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000; 119: 1148-1157
 - 39 Delafoy L, Raymond F, Doherty AM, Eschaliere A, Diop L. Role of nerve growth factor in the trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic hypersensitivity. *Pain* 2003; 105: 489-497
 - 40 Barreau F, Cartier C, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. Nerve growth factor mediates alterations of colonic sensitivity and mucosal barrier induced by neonatal stress in rats. *Gastroenterology* 2004; 127: 524-534
 - 41 Bissonnette EY, Hogaboam CM, Wallace JL, Befus AD. Potentiation of tumor necrosis factor- α -mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. *J Immunol* 1991; 147: 3060-3065
 - 42 姜敏, 李红菊, 汤浩, 张义侠, 傅宝玉. 肥大细胞在肠易激综合征患者结肠的分布特点及其作用. *中国医科大学学报* 2005; 34: 335-336
 - 43 Million M, Grigoriadis DE, Sullivan S, Crowe PD, McRoberts JA, Zhou H, Saunders PR, Maillot C, Mayer EA, Taché Y. A novel water-soluble selective CRF1 receptor antagonist, NBI 35965, blunts stress-induced visceral hyperalgesia and colonic motor function in rats. *Brain Res* 2003; 985: 32-42
 - 44 Dunlop SP, Hebden J, Campbell E, Naesdal J, Olbe L, Perkins AC, Spiller RC. Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1288-1294
 - 45 Madden JA, Hunter JO. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 1: S67-S72
 - 46 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome II process. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II1-II5
 - 47 Zou BC, Dong L, Wang Y, Wang SH, Cao MB. Expression and role of 5-HT7 receptor in brain and intestine in rats with irritable bowel syndrome. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 2069-2074
 - 48 孔武明, 龚均, 陈明霞, 董蕾, 秦斌. 肠易激综合征患者肠黏膜超微结构改变的电镜观察. *西安交通大学学报(医学版)* 2008; 29: 318-320
 - 49 Gonçalves L, Almeida A, Pertovaara A. Pronociceptive changes in response properties of rostroventromedial medullary neurons in a rat model of peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 2188-2195
 - 50 Carlson JD, Maire JJ, Martenson ME, Heinricher MM. Sensitization of pain-modulating neurons in the rostral ventromedial medulla after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 2007; 27: 13222-13231
 - 51 Viisanen H, Pertovaara A. Influence of peripheral nerve injury on response properties of locus coeruleus neurons and coeruleospinal antinociception in the rat. *Neuroscience* 2007; 146: 1785-1794
 - 52 Ringel Y. Brain research in functional gastrointestinal disorders. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: S23-S25
 - 53 Wilder-Smith CH, Schindler D, Lovblad K, Redmond SM, Nirkko A. Brain functional magnetic resonance imaging of rectal pain and activation of endogenous inhibitory mechanisms in irritable bowel syndrome patient subgroups and healthy controls. *Gut* 2004; 53: 1595-1601
 - 54 Lucas A, Cobelens PM, Kavelaars A, Heijnen CJ, Holtmann G, Haag S, Gerken G, Langhorst J, Dobos GJ, Schedlowski M, Elsenbruch S. Disturbed in vitro adrenergic modulation of cytokine production in inflammatory bowel diseases in remission. *J Neuroimmunol* 2007; 182: 195-203
 - 55 Posserud I, Agerforz P, Ekman R, Björnsson ES, Abrahamsson H, Simrén M. Altered visceral perceptual and neuroendocrine response in patients with irritable bowel syndrome during mental stress. *Gut* 2004; 53: 1102-1108
 - 56 Basilisco G. [Pathogenesis of irritable bowel syndrome: current understanding] *Recenti Prog Med* 2007; 98: 543-547
 - 57 Heitkemper M, Burr RL, Jarrett M, Hertig V, Lustyk MK, Bond EF. Evidence for autonomic nervous system imbalance in women with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2093-2098
 - 58 Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, Bunnett NW, Grundy D, Corinaldesi R. Mast cell-dependent excitation of

■同行评价

本文内容丰富, 参考文献引用合理, 具有很好的可读性。

- visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; 132: 26-37
- 59 Greenwood-van Meerveld B. Importance of 5-hydroxytryptamine receptors on intestinal afferents in the regulation of visceral sensitivity. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19 Suppl 2: 13-18
- 60 Heymann-Mönnikes I, Arnold R, Florin I, Herda C, Melfsen S, Mönnikes H. The combination of medical treatment plus multicomponent behavioral therapy is superior to medical treatment alone in the therapy of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 981-994
- 61 Spence MJ, Moss-Morris R. The cognitive behavioural model of irritable bowel syndrome: a prospective investigation of patients with gastroenteritis. *Gut* 2007; 56: 1066-1071
- 62 陈文科, 邹益友, 李富军, 罗丹. 肠易激综合征精神心理因素、肠黏膜肥大细胞及5-羟色胺的变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 46-50
- 63 Bradding P, Holgate ST. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 31: 119-133
- 64 Talley NJ, Spiller R. Irritable bowel syndrome: a little understood organic bowel disease? *Lancet* 2002; 360: 555-564
- 65 Mönnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, Klapp B, Wiedenmann B, Heymann-Mönnikes I. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis* 2001; 19: 201-211
- 66 Farnam A, Somi MH, Sarami F, Farhang S, Yasrebinia S. Personality factors and profiles in variants of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6414-6418
- 67 Taché Y, Perdue MH. Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 137-142
- 68 Murray CD, Flynn J, Ratcliffe L, Jacyna MR, Kamm MA, Emmanuel AV. Effect of acute physical and psychological stress on gut autonomic innervation in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 127: 1695-1703
- 69 Ladep NG, Obindo TJ, Audu MD, Okeke EN, Malu AO. Depression in patients with irritable bowel syndrome in Jos, Nigeria. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7844-7847

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 •

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 2009-08-28)

回转器模拟失重对SGC-7901和HFE-145细胞凋亡的影响

朱 鸣, 吴本俨, 聂捷琳, 李莹辉

朱鸣, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100036
吴本俨, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
聂捷琳, 李莹辉, 航天医学工程研究所第13研究室 北京市 100094

总装备部预研基金资助项目, No. 51400020204JB1002

作者贡献分布: 此课题主要由吴本俨与朱鸣设计; 研究过程、数据分析及论文写作由朱鸣完成; 聂捷琳协助完成研究工作; 吴本俨与李莹辉对本研究工作进行指导。

通讯作者: 朱鸣, 主治医师, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院消化内科. zm669922@163.com
电话: 010-66928118-6231

收稿日期: 2009-06-05 修回日期: 2009-07-22

接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-28

Effects of simulated weightlessness on apoptosis of cell line SGC-7901 and HFE-145

Ming Zhu, Ben-Yan Wu, Jie-Lin Nie, Ying-Hui Li

Ming Zhu, Department of Gastroenterology, the General Air Force Hospital of Chinese PLA, Beijing 100036, China
Ben-Yan Wu, Department of Gastroenterology, South Building, the General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Jie-Lin Nie, Ying-Hui Li, the 13th Laboratory of Institute of Space Medico-Engineering, Beijing 100094, China

Supported by: the Forth Research Foundation of the Main Equipment Department, No. 51400020204JB1002

Correspondence to: Ming Zhu, Department of Gastroenterology, the General Air Force Hospital, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100036, China. zm669922@163.com

Received: 2009-06-05 Revised: 2009-07-22

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of simulated weightlessness on cellular apoptosis of human gastric carcinoma cell line SGC-7901 and human gastric mucosa cell line HFE-145.

METHODS: A rotating clinostat was used to simulate weightlessness. Each cell line was divided into two groups: rotating group and 1G control group. The experiments lasted 72 h in total. Apoptosis was measured by TUNEL method.

RESULTS: Compared with control group, the apoptosis index of SGC-7901 cell line increased in rotating group in 72 h ($P < 0.01$), but no significant change could be found in 12 h, 24 h, 36

h and 48 h. Compared with control group, the apoptosis index of HFE-145 cell line increased in 12 h ($P < 0.05$), but no significant change was found afterward compared with control group.

CONCLUSION: The apoptosis index of SGC-7901 cell line increased with simulated weightlessness by a clinostat in 72 h, while HFE-145 cells only changed in 12 h, and adapted to simulated weightlessness afterward.

Key Words: Simulated weightlessness; Gastric carcinoma cells; Gastric mucosa cells; Apoptosis

Zhu M, Wu BY, Nie JL, Li YH. Effects of simulated weightlessness on apoptosis of cell line SGC-7901 and HFE-145. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2491-2494

摘要

目的: 探讨模拟失重对胃癌SGC-7901细胞和胃黏膜上皮HFE-145细胞凋亡的影响。

方法: 采用回转器模拟失重, 2种细胞各分为2组, 回转组和1G对照组, 实验时间共72 h。用TUNEL法检测细胞凋亡。

结果: 与对照组相比, SGC-7901细胞在72 h回转组凋亡比例明显增多($P < 0.01$), 12、24、36、48 h回转组与对照组无明显差异。与对照组相比, HFE-145细胞在12 h回转组凋亡比例明显增多($P < 0.05$), 之后与对照组无明显差异。

结论: 回转器模拟失重使胃癌SGC-7901细胞72 h时凋亡增加。胃黏膜上皮HFE-145细胞在12 h时出现上述变化。

关键词: 模拟失重; 胃癌细胞; 胃黏膜上皮细胞; 凋亡

朱鸣, 吴本俨, 聂捷琳, 李莹辉. 回转器模拟失重对SGC-7901和HFE-145细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(24): 2491-2494

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2491.asp>

0 引言

太空环境对于人类来说是一个全新的未知领域,

■背景资料

太空环境对于人类来说是一个全新的未知领域, 以往的科学研究表明太空飞行可导致机体的一些生理学变化, 包括脑脊液流动性的改变、电解质减少、肌肉萎缩、太空运动病、贫血、免疫反应下降和骨质疏松等。但是生物体内的细胞对重力的反应还需要进一步研究。本实验把这胃癌SGC-7901细胞和胃黏膜上皮HFE-145细胞置于回转器模拟失重的状态下, 研究模拟失重对细胞凋亡的影响。

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

■创新盘点

以往未见对失重或模拟失重状态下胃癌细胞和胃黏膜上皮细胞的研究。本研究结果提示3 d的回转器模拟失重状态能使胃癌细胞的凋亡增加,而对胃黏膜上皮细胞影响不明显。

以往的科学研究表明太空飞行可导致机体的一些生理学变化,包括脑脊液流动性的改变、电解质减少、肌肉萎缩、太空运动病、贫血、免疫反应下降和骨质疏松等^[1]。但是生物体内的细胞对重力的反应还需要进一步研究,以往未见对失重或模拟失重状态下胃癌细胞和胃黏膜上皮细胞的研究,本实验将胃癌SGC-7901细胞和胃黏膜上皮HFE-145细胞置于回转器模拟失重的状态下,研究模拟失重对细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞株SGC-7901细胞为解放军总医院南楼消化科实验室所保存;胃黏膜上皮细胞株HFE-145细胞由Wayne State University School of Medicine, Detroit, USA. Hassan ashktorab教授馈赠。DMEM培养基:华美公司;TUNEL试剂盒:鼎国公司。BH2 Olympus显微镜(日本生产);MG3型回转器,生物物理所研制。

1.2 方法 接种SGC-7901细胞和HFE-145细胞至15 cm²培养瓶中(瓶底贴细胞爬片,1 cm×2 cm/片),加入DMEM培养基(含100 mL/L灭活小牛血清,100 kU/L的双抗,50 g/L碳酸氢钠,调pH至7.2)5 mL。24 h待细胞完全贴壁后(约1.5×10⁴/cm),瓶中灌满培养基,排气后将瓶口密封,将其随机平分为2组。一组放置在回转器上,并把回转器放置在培养箱(30 r/min, 37℃)中,另一组放置在培养箱中正常生长作为对照。

分别在模拟失重12、24、36、48和72 h后,SGC-7901细胞组各取6瓶细胞,HFE-145细胞组各取5瓶细胞,取出细胞爬片,4%多聚甲醛固定30 min以上。PBS洗后,SGC-7901细胞加0.1% Triton X100 25 min, HFE-145细胞加15 mg/L蛋白酶K 35 min。加入0.3% H₂O₂(甲醇溶解),室温30 min。PBS洗,晾干。滴加TUNEL反应液,置于湿盒,37℃,60 min。缓冲液A洗后加封闭液,37℃,30 min。加显色反应液,37℃,45 min。缓冲液B洗后加显色液,置于暗盒中,室温,20 min。核固红复染。以不加TUNEL反应液者为阴性对照。

结果判断:凋亡细胞核呈蓝紫色,也常见蓝紫色颗粒溢出胞核至胞质,阴性细胞的胞核呈粉红色,细胞质基本不着色。凋亡细胞的胞核固缩,核浆比增大,以Image-pro4.5图像分析系统进行图像分析。

统计学处理 用State7.0统计分析软件进行统计。分别以 t 检验比较回转组和对照组凋亡细胞百分比的差异。 $P<0.05$ 为统计学有显著差异。

2 结果

回转器模拟失重后细胞凋亡的变化:12、24、36、48 h后,回转组SGC-7901细胞的细胞凋亡比例与对照组相比无明显差异,72 h回转组细胞凋亡比例较对照组明显增多(图1,表1, $P<0.01$)。

24、36、48、72 h后,回转组HFE-145细胞的细胞凋亡比例与对照组相比无明显差异,12 h回转组细胞的凋亡比例较对照组明显增多(图2,表1, $P<0.05$)。

3 讨论

1992年Gavrieli根据凋亡发生的原理,研究出原位凋亡检测方法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end labeling method, TUNEL)。该方法最大的优点是保持了组织结构,能够原位观测细胞凋亡^[2],本实验采用TUNEL法检测细胞的凋亡比例。而回转器是一种能使生物样本不停地绕水平轴匀速旋转的仪器,重力的作用可有效地去除,从而达到模拟微重力条件下生物效应的效果^[3]。在本研究中,我们应用回转器来模拟失重。

本实验表明,回转器模拟失重使胃癌SGC-7901细胞在72 h时凋亡增加,而胃黏膜上皮HFE-145细胞仅在模拟失重后12 h出现上述变化,之后与对照组无明显差异,说明对失重状态产生了适应。

那么,细胞在失重状态下发生生物学行为变化的原因是什么呢?到目前为止,其发生机制尚不明确。最近的研究推论当细胞在失重状态下细胞骨架和细胞膜发生了变化^[4-7],整个细胞的结构发生了相应的重新分布以保持平衡。这种重分布可以影响细胞连接和细胞外基质,并且产生信号传导过程中的一系列反应^[4,8],进而引起基因表达的变化,最终表现为细胞生物学特征的改变^[4]。

在对一些肿瘤细胞的研究中发现,失重或模拟失重可导致人甲状腺滤泡癌细胞ML-1进入早期细胞程序死亡,同时有线粒体的破坏和重分布以及微管的破坏^[5,9]。但是在回转器模拟失重状态下,人胰腺癌NOR-P1细胞较对照组出现较多的有丝分裂细胞(Ki-67阳性细胞)和较少的凋亡细胞^[10]。

在对一些正常细胞的研究中发现,失重或模拟失重可使人前列腺细胞增殖抑制、凋亡增加及分化能力增强,并通过不同的信号转导系

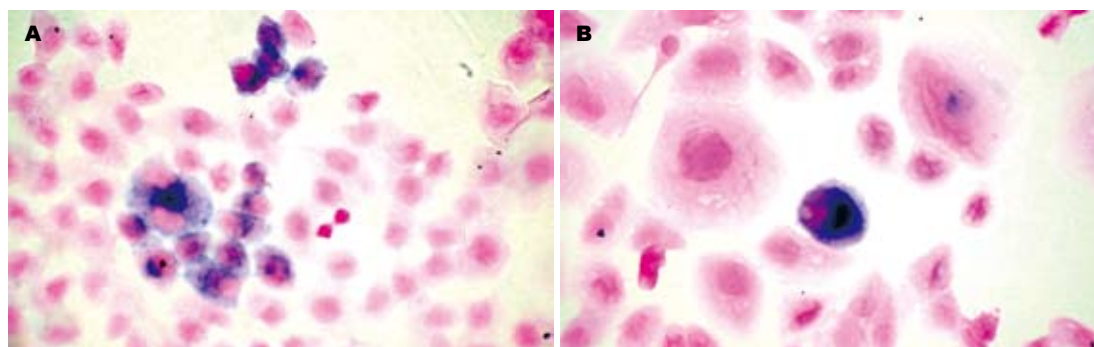


图 1 SGC-7901细胞72 h(TUNEL法×200). A: 回转组; B: 对照组.

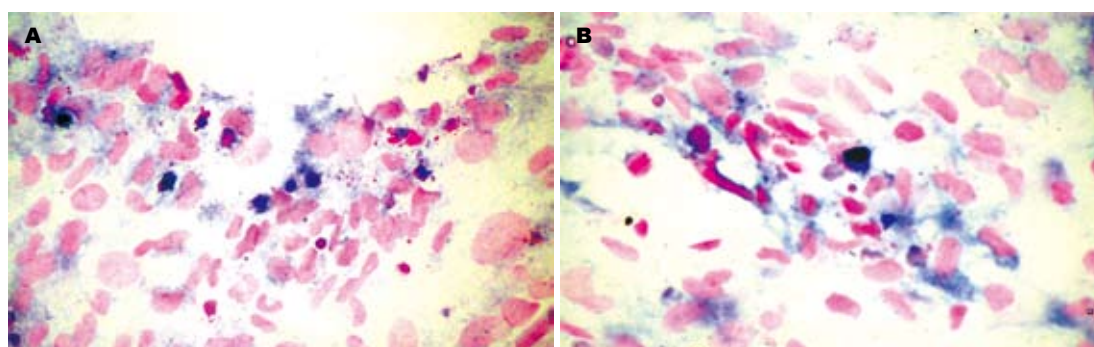


图 2 HFE-145细胞12 h(TUNEL法×200). A: 回转组; B: 对照组.

■同行评价

本研究选题较好, 设计合理, 结果可信, 具有很好的学术价值.

表 1 回转器模拟失重后SGC-7901和HFE-145细胞凋亡的变化 (mean ± SD)

细胞	分组	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
SGC-7901 (n = 6)	对照	9.6 ± 1.21	4.9 ± 0.74	4.7 ± 0.57	4.4 ± 1.15	4.8 ± 1.02
	回转	9.9 ± 0.92	4.8 ± 0.81	5.7 ± 0.77	6.9 ± 0.48	8.9 ± 0.56 ^b
HFE-145 (n = 5)	对照	4.7 ± 0.22	3.9 ± 0.57	4.6 ± 0.83	3.3 ± 0.68	5.1 ± 1.05
	回转	6.3 ± 0.52 ^a	4.6 ± 0.68	5.3 ± 0.84	4.3 ± 0.79	5.4 ± 0.84

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组.

统激活第二信使及其相互作用能力^[11]. 失重能使人甲状腺细胞^[12]和人内皮细胞的凋亡增加^[13-14]. 但是, 人红细胞的凋亡^[15]不受失重的影响. C6神经胶质细胞回转器模拟失重30 min后出现典型的凋亡改变, 但是20或32 h后凋亡的细胞减少^[16].

SGC-7901细胞与HFE-145细胞对回转器模拟失重的反应不同, 可能是因为SGC-7901细胞是胃癌细胞系, 他们已经恶变, 失去了正常细胞的稳定性, 而胃黏膜上皮HFE-145细胞能够快速更新且有较好的适应能力, 可以很快地建立一种新的平衡.

以往未见对失重或模拟失重状态下胃癌和胃黏膜上皮细胞的研究, 我们的研究结果与其他的研究之所以有不同之处, 可能是因为细胞种类不同或模拟失重的条件及时间不同, 所以,

细胞对失重的反应不尽相同. 但是, 回转器不能完全模拟太空的情况, 且与其他模拟失重的设备不同, 所以, 我们的结论仅限于3 d内回转器模拟失重的情况下.

总之, 回转器模拟失重使胃癌SGC-7901细胞在72 h时出现了凋亡增加, 而胃黏膜上皮HFE-145细胞仅在模拟失重后12 h出现了相似的变化, 说明3 d的回转器模拟失重状态能使胃癌细胞的凋亡增加, 而对胃黏膜上皮细胞影响不明显. 当然, 得出这一结论需要进一步的研究证实.

4 参考文献

- Hughes-Fulford M. Changes in gene expression and signal transduction in microgravity. *J Gravit Physiol* 2001; 8: P1-P4
- Zou JP, Shimizu J, Ikegame K, Takiuchi H, Fujiwara

- H, Hamaoka T. Tumor-immunotherapy with the use of tumor-antigen-pulsed antigen-presenting cells. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 35: 1-6
- 3 Hou G, Mohamalawari DR, Blancaflor EB. Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. *Plant Physiol* 2003; 131: 1360-1373
- 4 Ingber D. How cells (might) sense microgravity. *FASEB J* 1999; 13 Suppl: S3-S15
- 5 Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Bauer J, Kossmehl-Zorn S, Cogoli A, Curcio F, Oksche A, Wehland M, Kreutz R, Paul M, Grimm D. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 267-277
- 6 Kumei Y, Morita S, Katano H, Akiyama H, Hirano M, Oyha K, Shimokawa H. Microgravity signal ensnarls cell adhesion, cytoskeleton, and matrix proteins of rat osteoblasts: osteopontin, CD44, osteonectin, and alpha-tubulin. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1090: 311-317
- 7 Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Cogoli A, Faramarzi S, Bauer J, Curcio F, Paul M, Grimm D. Longterm conditions of mimicked weightlessness influences the cytoskeleton in thyroid cells. *J Gravit Physiol* 2004; 11: P169-P172
- 8 Kumei Y, Shimokawa H, Ohya K, Katano H, Akiyama H, Hirano M, Morita S. Small GTPase Ras and Rho expression in rat osteoblasts during spaceflight. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1095: 292-299
- 9 Vassy J, Portet S, Beil M, Millot G, Fauvel-Lafève F, Gasset G, Schoevaert D. Weightlessness acts on human breast cancer cell line MCF-7. *Adv Space Res* 2003; 32: 1595-1603
- 10 Nakamura K, Kuga H, Morisaki T, Baba E, Sato N, Mizumoto K, Sueishi K, Tanaka M, Katano M. Simulated microgravity culture system for a 3-D carcinoma tissue model. *Biotechniques* 2002; 33: 1068-1070, 1072, 1074-1076
- 11 Clejan S, O'Connor K, Rosensweig N. Tri-dimensional prostate cell cultures in simulated microgravity and induced changes in lipid second messengers and signal transduction. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 60-73
- 12 Kossmehl P, Shakibaei M, Cogoli A, Infanger M, Curcio F, Schönberger J, Eilles C, Bauer J, Pickenhahn H, Schulze-Tanzil G, Paul M, Grimm D. Weightlessness induced apoptosis in normal thyroid cells and papillary thyroid carcinoma cells via extrinsic and intrinsic pathways. *Endocrinology* 2003; 144: 4172-4179
- 13 Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Baatout S, Witzing A, Grosse J, Bauer J, Cogoli A, Faramarzi S, Derradji H, Neefs M, Paul M, Grimm D. Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth factor. *Apoptosis* 2006; 11: 749-764
- 14 Ulbrich C, Westphal K, Baatout S, Wehland M, Bauer J, Flick B, Infanger M, Kreutz R, Vadrucchi S, Egli M, Cogoli A, Derradji H, Pietsch J, Paul M, Grimm D. Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity. *J Cell Biochem* 2008; 104: 1324-1341
- 15 Sytkowski AJ, Davis KL. Erythroid cell growth and differentiation in vitro in the simulated microgravity environment of the NASA rotating wall vessel bioreactor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001; 37: 79-83
- 16 Uva BM, Masini MA, Sturla M, Bruzzzone F, Giuliani M, Tagliafierro G, Strollo F. Microgravity-induced apoptosis in cultured glial cells. *Eur J Histochem* 2002; 46: 209-214

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》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). (科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠Ang-1、Ang-2/Tie-2的影响

刘绍能, 时磊, 李敏, 吕鑫霞, 阚杰, 马继征, 陈兰羽

刘绍能, 时磊, 李敏, 吕鑫霞, 阚杰, 马继征, 陈兰羽, 中国中医科学院广安门医院 北京市 100053

北京市自然科学基金资助项目, No. 7072068

作者贡献分布: 此课题由刘绍能与陈兰羽设计; 研究过程由李敏、吕鑫霞、时磊、阚杰及马继征操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李敏提供; 数据分析由时磊完成; 本论文写作由刘绍能、李敏及时磊完成。

通讯作者: 刘绍能, 主任医师, 100053, 北京市, 中国中医科学院广安门医院. liushaoneng886@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-06-10 修回日期: 2009-07-30

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-28

Effects of Qizhu granules on Ang-1, Ang-2/Tie-2 signal transduction pathways in CCl₄-induced liver fibrosis rats

Shao-Neng Liu, Lei Shi, Min Li, Xin-Xia Lv, Jie Kan, Ji-Zheng Ma, Lan-Yu Chen

Shao-Neng Liu, Lei Shi, Min Li, Xin-Xia Lv, Jie Kan, Ji-Zheng Ma, Lan-Yu Chen, Guanganmen Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Supported by: the Beijing Municipal Natural Science Foundation, No. 7072068

Correspondence to: Shao-Neng Liu, Guanganmen Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China. liushaoneng886@yahoo.com.cn

Received: 2009-06-10 Revised: 2009-07-30

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To observe the effects of Qizhu granules on Angiopoietin-1, Angiopoietin-2/Tie-2 signal transduction pathways in CCl₄-induced liver fibrosis rats.

METHODS: The rats were randomly divided into blank, model, Qizhu granules and tablet of compound Biejia ruangan groups. Liver fibrosis rat models were replicated by CCl₄, Qizhu granules and tablets of compound Biejia ruangan were given. And 4 weeks later, liver tissues of each rat were collected and the expression quantity of Angiopoietin-1 mRNA, Angiopoietin-2 mRNA and Tie-2 mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR.

RESULTS: The Ang-1 mRNA expression quantity of Qizhu granules was obviously lower than

that of the model group (0.32 ± 0.11 vs 0.66 ± 0.80 , $P < 0.01$). The Ang-2 mRNA expression quantity was higher than that of the model group (0.27 ± 0.34 vs 0.09 ± 0.01 , $P < 0.05$). There was no significant difference in the expression quantity of Ang-1 mRNA, Ang-2 mRNA and Tie-2 mRNA between groups of Qizhu granules and compound Biejia ruangan.

CONCLUSION: Qizhu granules can alleviate liver fibrosis by intervening liver sinusoidal capillarization, and one of its mechanisms is to regulate the expression of Angiopoietin-1 mRNA, Angiopoietin-2 mRNA and Tie-2 mRNA.

Key Words: Qizhu granules; Angiopoietin-1; Angiopoietin-2; Soluble tyrosine kinase receptor-2; liver sinusoidal capillarization

Liu SN, Shi L, Li M, Lv XX, Kan J, Ma JZ, Chen LY. Effects of Qizhu granules on Ang-1, Ang-2/Tie-2 signal transduction pathways in CCl₄-induced liver fibrosis rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2495-2498

摘要

目的: 观察芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠肝组织Ang-1、Ang-2/Tie-2的影响。

方法: 应用CCl₄复制大鼠肝纤维化模型, 同时给予芪术颗粒灌胃预防, 并设立空白对照组、模型对照组、鳖甲软肝片对照组, 分别于造模4 wk后取大鼠肝组织, 实时荧光定量PCR方法检测Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA的表达量。

结果: 芪术颗粒组Ang-1 mRNA表达量明显低于模型组(0.32 ± 0.11 vs 0.66 ± 0.80 , $P < 0.01$), 而Ang-2 mRNA的表达量明显高于模型组(0.27 ± 0.34 vs 0.09 ± 0.01 , $P < 0.05$)。芪术颗粒组和鳖甲软肝片组比较, 二者对Ang-1、Ang-2及Tie-2 mRNA表达的影响无显著差异。

结论: 芪术颗粒通过调控Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA的表达, 阻断肝窦毛细血管化的形成以减少肝纤维化的产生。

关键词: 芪术颗粒; 血管生成素-1; 血管生成素-2;

■背景资料

芪术颗粒由黄芪、莪术、丹参、柴胡等药物组成, 具有益气活血、化瘀通络之功效, 曾列为国家“九五”、“十五”攻关项目。临床与实验均证实了该药有很好的抗肝纤维化作用。本实验在前期研究的基础上, 运用RT-PCR法研究芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠Ang-1、Ang-2/Tie-2的影响, 以进一步阐明芪术颗粒抗肝纤维化的作用机制。

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科; 党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

■研发前沿

肝窦毛细血管化对肝星状细胞活化、细胞外基质异常沉积均有着重要影响,是肝纤维化发生发展过程中的一个关键病理改变。

可溶性酪氨酸激酶受体-2; 肝窦毛细血管化

刘绍能, 时磊, 李敏, 吕鑫霞, 阙杰, 马继征, 陈兰羽. 芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠Ang-1、Ang-2/Tie-2的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2495-2498

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2495.asp>

0 引言

芪术颗粒是我院治疗肝纤维化的有效药物, 临床应用已有30余年. 以往实验研究证实, 该药对肝纤维化模型大鼠有良好的防治效果^[1-3]. 在此基础上, 我们观察了芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠肝组织血管生成素-1、2/可溶性酪氨酸激酶受体-2(angiotensin 1, 2/soluble tyrosine kinase receptor-2, Ang1、2/Tie-2)的影响, 以进一步阐明该药治疗肝纤维化的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠, 40只, 清洁II级, 体重150±20 g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 本院II级动物房饲养, 饲以标准的大鼠合成饲料, 自由饮用大鼠专用无菌水, 环境温度20±2℃, 相对湿度36%; 芪术颗粒由本院制剂室提供, 批号: 20080121; 复方鳖甲软肝片, 内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司生产, 批号: 20081001; CCl₄: 分析纯, 由国药集团化学试剂有限公司提供, 批号: 20080522; 橄榄油: 分析纯, 北京化学试剂公司, 批号: 20080322. TRIzol(购自Invitrogen公司); 反转录试剂盒(购自Fermentas公司). PCR仪, 型号: GeneAmp 5700 Taq MAN, 美国Applied Biosystems公司生产; 凝胶图像分析仪, 型号: ImageMaster VDS, 美国Pharmacia Biotech公司生产; 高速冷冻离心机, 型号: Allagra.21R Centrifuge, 德国Beckman公司生产; 紫外线分光光度计, 型号: DU640, 德国Beckman公司生产; OYY-III-5型电泳仪, 北京六一仪器厂生产.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 大鼠随机分为空白对照、模型对照、芪术颗粒及鳖甲软肝片组, 每组10只, 并作相应造模处理. 其中空白对照组大鼠同等条件下饲养, 不造模. 模型对照、芪术颗粒及鳖甲软肝片组大鼠均使用10% CCl₄橄榄油溶液按3 mL/kg剂量腹腔注射, 每周2次, 共4 wk, 复制肝纤维化进展期模型.

1.2.2 给药: 造模同时各组按以下要求给药: 空白对照组: 同等条件下饲养, 不灌胃. 模型对照组:

等量大鼠专用无菌水灌胃, 灌胃剂量1 mL/100 g, 每天灌胃1次. 芪术颗粒组: 予芪术颗粒灌胃, 给药量为2 g/(kg·d), 每天灌胃1次. 复方鳖甲软肝片对照组: 予复方鳖甲软肝片灌胃, 灌胃剂量为0.7 g/(kg·d), 每天灌胃1次. 同时, 各组每周称体质量1次, 依体质量调整灌胃及造模药物剂量.

1.2.3 取材: 实验第4周, 处死各组大鼠, 取新鲜肝组织, 置于-80℃液氮中保存, 供实时荧光定量PCR检测用.

1.2.4 Ang-1、Ang-2/Tie-2检测: 取50-100 mg的标本应用TRIzol Reagent试剂盒, 按说明书要求提取总RNA, 测吸光度(A值)定量RNA浓度后, 置于-80℃冰箱保存待用. 20 μL反转录反应体系中经特异性下游引物反转录成cDNA后, 用EASY Dilution将cDNA液按10⁰、10¹、10²、10³梯度稀释, 各取2.0 μL稀释好的cDNA进行RT-PCR反应, 检测发现目的基因的扩增效率和管家基因的扩增效率一致, 可应用ΔΔCt方法进行相对定量.

取5.0 μg总RNA依照Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit说明书合成cDNA. 之后, 取2.0 μL cDNA依照SYBR Green PCR Master Mix说明书要求进行PCR检测, 引物采用Primer Premier 5.0设计, 由赛百盛公司合成. β-actin(263 bp): 上游: 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3', 下游: 5'-AAT GTC ACG CAC GAT TTC CC-3'. Ang-1(256 bp): 上游: 5'-CTC CGT AAG GGC TTC CAT-3', 下游: 5'-CTG CGT CCT CTG TTG TCG-3'. Ang-2(329 bp): 上游: 5'-CAA GAC GGA ACA ACG AAC-3', 下游: 5'-CAC CGC TAA CCA ACC AAA-3'. Tie-2: (337 bp): 上游: 5'-ATG GAC TCT TTA GCC GGC TTA-3', 下游: 5'-CCT TAT AGC CTG TCC TCG AA-3'. 反转录条件: 42℃温浴60 min, 70℃温浴10 min. PCR循环参数: 95.0℃ 10 min, 1个循环; 95.0℃ 25 s、55.0℃ 25 s、72.0℃ 50 s, 40个循环; 72.0℃ 5 min, 1个循环.

1.2.5 定量分析: 以上反应设定均在与PCR仪相连的计算机上进行, 每个循环电脑自动记录反应管中的荧光信号值, 并描绘曲线. 反应结束由PE 5700软件分析结果, 自动计算定量数值. 定量结果: $r < -0.980$, 否则定量结果无效. 以达到阈值的最低循环数(Ct值)计算样本中mRNA拷贝数相对量. 每个样本的Ct值由目的基因和管家基因决定, 即 $\Delta Ct(\text{目的基因}) = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{管家基因})$, $\Delta\Delta Ct(\text{目的基因}) = \Delta Ct(\text{目的基因}) - \Delta Ct(\text{标$

■相关报道

Ohmori *et al*认为肝纤维化过程中血管化程度明显加重, 且Kimura *et al*通过研究证实, Angs/Tie-2受体系统在部分肝切除后肝血窦的重建及大鼠肝坏死区域肝窦毛细血管化的形成中起重要作用.

表1 肝组织Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA相对拷贝量比较 ($n=10$, mean \pm SD)

分组	Ang-1	Ang-2	Tie-2
空白对照组	0.01 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.22 \pm 0.22
模型对照组	0.66 \pm 0.80 ^b	0.09 \pm 0.01	0.29 \pm 0.08
芪术颗粒组	0.32 \pm 0.11 ^{bd}	0.27 \pm 0.34 ^{bc}	0.24 \pm 0.21
鳖甲软肝片组	0.37 \pm 0.23 ^a	0.22 \pm 0.02 ^{ac}	0.28 \pm 0.66

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 空白对照组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 模型对照组。

准值)。样品中目的基因的相对拷贝量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计处理, 结果用mean \pm SD表示, 多组均数比较采用单因素方差分析。组间各指标mRNA表达量比较采用LSD检验, $P<0.05$ 表示存在统计学意义。

2 结果

模型组Ang-1 mRNA表达量较空白对照组明显增加($P<0.01$, 表1, 图1), 而Tie-2、Ang-2 mRNA的表达量有所增加, 但无统计学意义($P>0.05$, 表1, 图2)。芪术颗粒组Ang-1 mRNA表达量明显低于模型组, 而Ang-2 mRNA的表达量明显高于模型组($P<0.05$, 表1, 图2)。芪术颗粒组和鳖甲软肝片组比较, 二者对Ang-1、Ang-2及Tie-2 mRNA表达的影响无显著差异(表1, 图1-2)。

3 讨论

肝窦毛细血管化在肝纤维化的发展过程中起着重要作用。目前已有文献报道, 肝纤维化过程中血管化程度明显加重^[4-5], 且通过使用血管生成抑制剂, 可实现实验动物的肝纤维化逆转。肝窦毛细血管化直接阻碍了肝细胞与血液之间氧和营养物质的交换, 引起肝窦塌陷和肝细胞萎缩、坏死, 从而加速肝纤维化的进程并促使其向肝硬化转变^[6], 因此, 肝窦毛细血管化的逆转是关系到肝纤维化能否逆转的重大问题。

Angs家族对于血管生成、成熟、重塑和维持起着重要作用。Angs是一组分泌型的细胞因子, 包括Ang-1、2、3、4 4位成员, 其中Ang-1、2已被证明和血管生成关系密切。Angs/Tie-2系统在早期人胚肝发育过程中对肝窦等有着重要的影响作用, 主要是通过对肝窦内皮细胞的作用来促进血管的形成和肝脏的发育^[7]。Kimura *et al*^[8]通过研究证实, Angs/Tie2受体系统在部分肝切除后肝血窦的重建及大鼠肝坏死区域肝窦

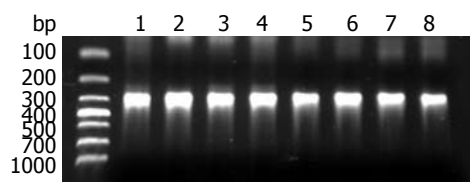


图1 β -actin、Ang-1 mRNA的RT-PCR产物电泳结果。1-4: β -actin(263 bp)的表达; 1: 空白组; 2: 模型组; 3: 芪术颗粒组; 4: 鳖甲软肝片组; 5-8: Ang-1 mRNA(256 bp)的表达; 5: 空白组; 6: 模型组; 7: 芪术颗粒组; 8: 鳖甲软肝片组。

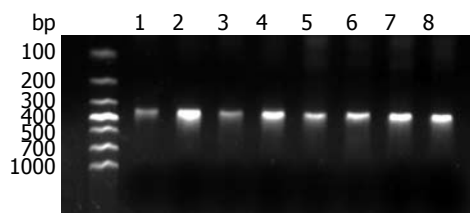


图2 Tie-2及Ang-2 mRNA的RT-PCR产物电泳结果。1-4: Tie-2(337 bp)的表达; 1: 空白组; 2: 模型组; 3: 芪术颗粒组; 4: 鳖甲软肝片组; 5-8: Ang-2 mRNA(329 bp)的表达; 5: 空白组; 6: 模型组; 7: 芪术颗粒组; 8: 鳖甲软肝片组。

毛细血管化的形成中起重要作用, 同时研究发现, CCl₄肝损伤的大鼠, 其肝组织Ang-1 mRNA的表达较正常大鼠增加10倍。Ishikawa *et al*^[9]研究认为, 肝窦毛细血管化发生是通过坏死区域的血管内皮细胞与活化的肝星状细胞的相互作用而形成, 而活化的肝星状细胞可表达Angs。所以, Angs/Tie-2受体系统在肝窦毛细血管化中起着重要的作用。Ang-1主要由血管旁支持细胞包括周细胞、血管平滑肌细胞等合成, 通过旁分泌作用, 与附近内皮细胞膜上的Tie-2受体特异性结合, 引起其受体磷酸化和随后的信号传递, 从而抑制内皮细胞凋亡, 减少血管的萎缩和退化。而Ang-2作为Ang-1的拮抗剂则可以促进新生血管的消退^[10-12]。

芪术颗粒由黄芪、莪术、丹参、柴胡等药物组成, 具有益气活血、化瘀通络之功效, 主要用于肝纤维化的治疗。从本研究结果来看, 芪术颗粒干预后的大鼠, 肝组织Ang-1、Tie-2 mRNA的表达量较模型组明显减少, 而Ang-2 mRNA的表达量相对较多, 这有利于减少新生血管的形成。由此我们可以推断, 芪术颗粒可通过调控Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA的表达, 阻断肝窦毛细血管化的形成以减少肝纤维化的产生。

4 参考文献

- 刘绍能, 姚乃礼, 殷海波, 王勒渝, 解荣庆. 芪术颗粒对I、Ⅲ、Ⅳ型胶原影响的免疫组化研究. 中药药理与

■应用要点

芪术颗粒通过调控Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA的表达, 阻断肝窦毛细血管化的形成以减少肝纤维化的产生。

■名词解释

肝窦毛细血管化: 胶原在狄氏间隙和肝静脉根部、中央静脉沉积, 将有许多窦孔高通过性的肝窦变为与其他器官内一样的连续毛细血管床的病理改变过程。

■同行评价

本研究设计比较合理,结果可靠,研究内容具有实际意义.

- 2 刘绍能,姚乃礼,殷海波,王勒渝,解荣庆. 芪术颗粒对大鼠肝纤维化模型TGF- β 1、EGF表达的影响. 中药药理与临床 2001; 17: 24-25
- 3 刘绍能,姚乃礼,殷海波. 芪术颗粒对大鼠肝纤维化模型的治疗作用. 中药新药与临床药理 2002; 13: 216-218
- 4 Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, Sakai T, Fujikawa K, Wagayama H, Takase K, Nakano T. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated chronic liver diseases. *Hum Pathol* 2001; 32: 1363-1370
- 5 Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1010-1021
- 6 张永,韩宁,尹常健. 柔肝抑纤饮抗DMN肝纤维化大鼠肝窦毛细血管化的实验研究. 中华中医药学刊 2009; 27: 97-99
- 7 姜红心,魏志新,齐安东,李翠花,王簪,李磊. VEGF和Angiopoietin家族在早期人胚肝发育过程中的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 336-340
- 8 Kimura H, Mochida S, Inao M, Matsui A, Fujiwara K. Angiopoietin/tie receptors system may play a role during reconstruction and capillarization of the hepatic sinusoids after partial hepatectomy and liver necrosis in rats. *Hepatol Res* 2004; 29: 51-59
- 9 Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, Shibuya M, Fujiwara K. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 587-593
- 10 Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998; 83: 233-240
- 11 王彪,鲁开化,赵亚南,庄福连,林文雄. Ang/Tie2体系与VEGF、bFGF在血管瘤增生退化过程中的协同作用. 中国美容医学 2006; 15: 1227-1230
- 12 van der Heijden M, van Nieuw Amerongen GP, Chedamni S, van Hinsbergh VW, Johan Groeneveld AB. The angiopoietin-Tie2 system as a therapeutic target in sepsis and acute lung injury. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 39-53

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》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology)》,是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志,旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章,使其成为一种公众资源,同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文,了解其领域的所有的关键的进展,更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务,为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

除了公开存取之外,《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾,即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲,包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价.

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤,食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学,以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术.

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章,为内科学、外科学、感染病学、中医中药学、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.(科学编辑:李军亮 2009-08-28)

门静脉动脉化对肝硬化犬肝切除后肝再生的作用

王鹏, 李鹏, 芮理, 李厚祥, 钱海鑫

王鹏, 李鹏, 芮理, 李厚祥, 南通大学附属医院普外科 江苏省南通市 226000

钱海鑫, 苏州大学附一院肝胆外科 江苏省苏州市 215006
南通市社会发展科技计划基金资助项目, No. S30003

作者贡献分布: 王鹏、李鹏及芮理对此文所作贡献均等; 此课题由李厚祥、王鹏及李鹏设计; 研究过程及论文撰写主要由王鹏、李鹏及芮理完成; 钱海鑫对此研究及论文写作进行指导。

通讯作者: 王鹏, 博士生, 主治医师, 226000, 江苏省南通市, 南通大学附属医院普外科. wyc2578@sina.com
电话: 0513-85837517

收稿日期: 2009-06-19 修回日期: 2009-08-01

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-28

Effects of portal vein arterialization on liver regeneration in hepatocirrhosis after partial hepatectomy in dogs

Peng Wang, Peng Li, Li Rui, Hou-Xiang Li, Hai-Xin Qian

Peng Wang, Peng Li, Li Rui, Hou-Xiang Li, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu Province, China

Hai-Xin Qian, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006 Jiangsu Province, China

Supported by: the Social Development and Science Technique Program Foundation of Nantong, No. S30003

Correspondence to: Peng Wang, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu Province, China. wyc2578@sina.com

Received: 2009-06-19 Revised: 2009-08-01

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To study the effects of portal vein arterialization (PVA) on the liver regeneration in hepatocirrhosis after partial hepatectomy in dogs in order to provide a basis for its clinical use.

METHODS: The liver cirrhosis model of dogs was established. The dogs were divided into three groups randomly: group A (PVA group), partial hepatectomy plus PVA; group B (control group), partial hepatectomy; and group C, sham-operated group. All dogs were killed four weeks after operation. During the experiment, liver regeneration rate, expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in liver tissue and arterial ketone body

ratio(AKBR) were observed.

RESULTS: Liver regeneration rate was significantly higher in group A than in group B ($86.6\% \pm 2.9\%$ vs $73.7\% \pm 6.9\%$, $P < 0.01$); the AKBR of groups A and B was significantly lower than group C (both $P < 0.01$), but 4 wks after operation, the AKBR of group A (1.32 ± 0.14) became close to group C (1.33 ± 0.11), without significant difference ($P > 0.05$); the expression of PCNA in liver tissues of group A was significantly faster than group B.

CONCLUSION: PVA has significantly positive effect on liver regeneration after partial hepatectomy in dogs with hepatocirrhosis.

Key Words: Portal vein arterialization; Hepatocirrhosis; Liver regeneration

Wang P, Li P, Rui L, Li HX, Qian HX. Effects of portal vein arterialization on liver regeneration in hepatocirrhosis after partial hepatectomy in dogs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2499-2502

摘要

目的: 探讨门静脉动脉化(portal vein arterialization, PVA)对肝硬化犬肝切除后肝再生的作用, 为扩大PVA临床应用提供依据。

方法: 将肝硬化模型犬随机分为3组, A组(手术组): 行肝左外叶切除加门静脉动脉化手术; B组(对照组): 仅行肝左外叶切除手术; C组(假手术组); 均于术后4 wk处死, 实验过程中检测肝脏再生率(SE)与动脉血酮体比(AKBR), 免疫组织化学法检测增殖细胞核抗原(PCNA)。

结果: 肝脏再生率SE值A组显著高于B组, 两者有显著性差异($86.6\% \pm 2.9\%$ vs $73.7\% \pm 6.9\%$, $P < 0.01$); 术后A、B两组AKBR值均较C组降低(均 $P < 0.01$), 术后4 wk A组该值(1.32 ± 0.14)已接近C组(1.33 ± 0.11), 差异无统计学意义 $P > 0.05$; 术后PCNA表达A组显著快于B组。

结论: 门静脉动脉化对肝硬化犬部分肝切除后肝脏再生有明显的促进作用。

■背景资料

门静脉动脉化目前主要应用在肝移植、肝门部肿瘤清扫、肝部分切除术、门脉高压分流术4个方面。在肝部分切除术中90%患者合并肝硬化, 术后易发生肝功能衰竭, PVA可以增强肝细胞的再生能力, 促进肝功能的改善。

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

■研发前沿

PVA对于肝硬化患者本身的门脉高压症状(食管胃底静脉曲张、肠管淤血等)的影响,应该行限制性手术。吻合口径的大小应该控制在什么范围,值得探讨。

关键词: 门静脉动脉化; 肝硬化; 肝再生

王鹏, 李鹏, 芮理, 李厚祥, 钱海鑫. 门静脉动脉化对肝硬化犬肝切除后肝再生的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2499-2502

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2499.asp>

0 引言

以往肝再生的研究多针对正常肝脏, 对病理状况下的肝脏再生研究不多. 而临床上, 原发性肝癌及肝内胆管结石等很多疾病都常合并有肝硬化, 比率高达50%-85%^[1], 合并肝硬化的患者在行肝叶切除后, 发生肝功能不全甚至肝衰竭死亡的较多^[2]. 本实验选用胃十二指肠动脉与门静脉吻合的术式, 研究门静脉动脉化(portal vein arterialization, PVA)对肝硬化肝部分切除后肝再生的影响, 以在短时间内促进肝功能的恢复, 减少肝衰竭的发生, 为临床提供一个可行的辅助外科治疗手段.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年杂种犬24只, 雌雄各12只, 体质量9.5-11.5 kg, 由南通大学动物实验中心提供. 增殖细胞核抗原试剂盒由福建迈新生物技术公司提供.

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 实验犬按参考文献[3]制作肝硬化模型, 所有犬每周腹腔内2次注射40% CCl₄与60%花生油混合剂, 剂量0.12 mL/kg, 共8 wk; 犬饲料含10%猪油, 饮用水含10%酒精. 2 wk后所有犬均出现精神萎靡, 3-4 wk后均出现体质量减轻, 消瘦; 体毛减少, 毛色晦暗等表现. 8 wk后有部分犬可见明显腹壁静脉曲张, 模型制作前后血生化检查及肝脏病理显示所有犬均形成肝硬化. 制作过程中有2只犬死亡, 雌雄各1只. 将剩余22只犬随机分为3组, A组(手术组)9只: 行肝脏部分切除加PVA手术; B组(对照组)8只: 仅行肝脏部分切除手术; C组(假手术组)5只: 开腹观察1 h后缝合. 手术中A、B组各有死亡1只, 术后1 wk A组、术后B组各有死亡1只, 术后4 wk处死犬18只.

1.2.2 PVA方式: 选用胃十二指肠动脉与门静脉行端侧吻合术. 本实验均行单纯的肝左外侧叶切除.

1.2.3 实验指标: (1)评价肝脏再生能力的肝脏再生率SE值^[4]=(术后犬处死时肝质量/体质量)/(术前肝质量/体质量). (2)免疫组织化学检测增殖

细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA): 所有标本均经100 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm连续切片, 免疫组织化学染色. PCNA免疫组织化学染色采用SP法, 试剂由福建迈新生物技术公司提供. 染色时均设置空白对照. 免疫组织化学染色后均以苏木素复染. (3)动脉血酮体比(arterial ketone body ratio, AKBR): 分别在造模前、术前、术后2 d、术后4 wk采取犬股动脉血, 按吴红斌 *et al*^[5]方法检测乙酰乙酸(ACAC)及β-羟丁酸(β-OHB), 按公式: AKBR = ACAC/β-OHB计算AKBR的比值.

统计学处理 所有数据以mean±SD表示, 肝脏再生率、AKBR结果采用方差分析, 组间两两比较使用*t*检验, PCNA结果采用成组*t*检验, 所有统计学处理均采用Stata 7.0软件完成.

2 结果

2.1 AKBR值 实验结果显示造模后3组AKBR值均明显降低, 提示肝硬化后肝脏能量储备下降, 术后A、B两组AKBR值均较C组降低($P<0.01$), 术后4 wk A组该值已接近C组($P>0.05$), B组虽有恢复但仍低于C组, 提示PVA对肝脏能量代谢有良好的促进作用(表1).

2.2 肝脏再生指标 A组肝再生率高于B组($P<0.01$), 提示肝再生能力加强(表2).

2.3 PCNA 实验结果显示术后第1天A、B组PCNA的表达量均显著增加, 至术后3 d达高峰, 以后逐渐下降, 术后14 d 2组比较已无统计学差异, 术后4 wk已经接近术前水平; 但A组PCNA的表达量在术后1、3、7 d明显大于B组($P<0.01$), 提示PVA对肝再生有促进作用(表3).

3 讨论

PVA可作为肝部分切除术的辅助手段, Shimizu *et al*^[4]在对小鼠进行广泛肝叶切除加PVA的研究中发现, 该术式能使血氧分压和血氧饱和度显著增加, 肝组织中的ATP水平显著增高, 促进肝脏再生, 提高小鼠生存率. 中国人民解放军总医院黄志强教授^[6]领导开展的研究也取得了相类似的结果. 表明PVA对于肝脏术后肝衰具有积极的预防作用, 但既往的实验研究对象多采用正常肝脏, 鲜有对病理肝脏的实验研究. 而临床上肝脏外科的手术大多针对的是病损肝脏, 如部分肝切除术的主要适应证是肝脏肿瘤, 其中以原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占大多数, 在病因与发病学上, HCC与病毒性肝炎、肝硬化有着密切的关系. 其典型过

■相关报道

Lange *et al*认为PVA增加了肝脏的血流, 可提高入肝血液的含氧量, 改善肝功能, 促进肝脏的再生能力. 陈永亮 *et al*认为动脉血流控制在一定范围不会对肝脏结构及肝功能的恢复产生不良的影响.

表 1 3组不同时期AKBR值

	造模前	术前	术后2 d	术后4 wk
A组	2.03 ± 0.11	1.34 ± 0.14	1.04 ± 0.11 ^b	1.32 ± 0.14
B组	2.02 ± 0.12	1.36 ± 0.13	0.60 ± 0.10 ^b	0.77 ± 0.09 ^b
C组	2.04 ± 0.15	1.30 ± 0.13	1.32 ± 0.11	1.33 ± 0.11

^b*P* < 0.01 vs C组.

表 2 3组不同时期肝质量(g)、体质量(kg)和肝再生率(%)

分组	<i>n</i>	术前体质量	切除肝质量	切肝/全肝	28 d体质量	28 d肝质量	肝再生率
A组	7	9.3 ± 0.9	122.5 ± 7.9	44.2 ± 0.9	9.1 ± 0.7	232.6 ± 17.7	86.6 ± 2.9
B组	6	9.7 ± 1.1	126.5 ± 11.3	44.1 ± 1.1	9.6 ± 0.9	204.0 ± 37.1	73.7 ± 6.9 ^d
C组	5	9.3 ± 0.5			9.3 ± 0.4	272.6 ± 23.0 ^b	

^b*P* < 0.01 vs A、B组; ^d*P* < 0.01 vs A组.

表 3 A、B组PCNA的表达

	术前	术后1 d	术后3 d	术后7 d	术后14 d	术后28 d
A组(<i>n</i> = 7)	7.75 ± 2.55	27.38 ± 5.78 ^b	67.88 ± 7.99 ^b	34.11 ± 3.93 ^b	16.14 ± 3.89 ^b	8.26 ± 2.21
B组(<i>n</i> = 6)	7.57 ± 2.82	18.86 ± 2.91 ^{bd}	30.14 ± 3.24 ^{bd}	29.43 ± 2.99 ^{bd}	17.08 ± 4.51 ^b	9.03 ± 2.11

^b*P* < 0.01 vs 术前; ^d*P* < 0.01 vs A组.

程为: 病毒性肝炎-肝硬化-肝癌. 在我国及远东地区, 90%左右HCC患者合并有不同程度的肝硬化^[7]. 这就意味着, 针对HCC所进行的部分肝切除, 大多数是在有肝硬化或慢性肝病基础上进行的, 而肝硬化与肝切除术后肝功能衰竭之间有密切的联系.

术后肝衰是临床肝切除术后一致命并发症, 也是引起术后早期死亡的主要原因之一. 目前对术后肝衰的治疗还颇为困难. 临床上, 肝切除术后肝衰的发生率报道不尽相同, 为2%-17%^[8]. 在原有肝硬化基础疾病者, 对部分肝切除的耐受力大大下降, 术后肝衰的发生率明显增加. 所以, 从一定意义上讲, 肝硬化是降低肝癌手术切除率重要因素之一^[9-10].

因此我们设计制作了犬肝硬化模型, 利用PVA能够增加肝血流量, 增强肝细胞的再生能力, 改善肝功能的特点^[11], 研究其对病变肝脏再生的影响, 为进一步扩大PVA在肝脏外科中的应用提供依据. 实验中我们发现PVA能提高肝硬化犬部分肝切除后的AKBR值, 而AKBR值可以反映肝脏线粒体氧化还原潜在能力, 即缺氧可明显且迅速地损害肝线粒体功能, 导致AKBR低

下, 结果使ATP产生能力下降, 从而发生细胞能量危机, 使肝细胞坏死进而发生急性肝衰^[12]. 这就提示PVA使线粒体功能得到改善, 对肝脏能量代谢有良好的促进作用. PVA亦能改善肝再生率. 通过测量肝脏湿质量而计算出的肝再生率是评价肝脏再生能力的最直观的指标. 实验发现A组再生率明显高于B组. 另外, PVA可增加PCNA的表达. PCNA是真核细胞DNA合成所必需的一种36 kDa核蛋白, 存在并合成于核内, 静止细胞中PCNA含量很少, 增殖细胞和转化细胞中其含量发生明显变化, 大部分G₀-G₁期细胞无明显的PCNA表达, G₁晚期其表达度增加, S期达到高峰, G₂-M期下降, 其含量和表达强弱的变化与DNA合成及DNA复制的活跃程度一致^[13]. 因此, PCNA是评价肝脏再生的一个简单可靠的指标. 本研究结果表明, 由于CCl₄所致的损伤, 术前肝硬化犬肝细胞呈增殖修复现象. 手术后2组均表现出再生增殖, 从实验结果可以看出A组的PCNA表达量在术后1、3、7 d明显高于B组(*P* < 0.01), 提示PVA对肝硬化肝再生有促进作用.

肝切除术后是否发生肝功能衰竭取决于残余肝脏的再生能力, 而这又依赖于能量的供给,

■创新盘点

本研究制作了犬肝硬化模型, 并选用胃十二指肠动脉与门静脉做端侧吻合, 改变了以往PVA实验中多选用肝动脉的模式, 在肝脏原有的血供基础上更增加了他的营养供应.

■同行评价

本研究观察了门静脉动脉化对肝硬化犬肝切除后肝再生的作用,结果有一定参考价值。

但在肝切除、肝动脉阻断等应激状态下,线粒体的呼吸和ATP的合成就要受到肝细胞内氧浓度的限制。这时氧对能量代谢就十分重要。在单纯肝动脉阻断的报道中,人们认为肝脏功能的维持与充足的氧供是密不可分的^[4]。

以往研究表明,肝硬化肝脏的再生与正常肝再生对比明显减慢,硬化肝脏的有效再生肝细胞数低于正常肝脏,导致余肝组织增殖缓慢,是硬化肝脏储备功能下降的主要原因。本实验在保持肝脏原有血供不变的基础上,接入动脉血,使门静脉血氧分压升高,给应激状态下的肝细胞提供足够的氧供,来满足线粒体呼吸链电子传递所需,促进肝脏的再生速度,使硬化肝脏再生加强,有效肝功能恢复加快。因此,我们认为PVA可作为肝硬化部分肝切除术后防止肝衰的辅助手段。

4 参考文献

- 1 Moser MA, Kneteman NM, Minuk GY. Research towards safer resection of the cirrhotic liver. *HBP Surg* 2001; 11: 285-297
- 2 吴孟超, 吴东. 原发性肝癌综合治疗的现状与展望. 癌症进展 2005; 3: 410-412
- 3 牛廷献, 史智勇. 肝纤维化动物模型的研究进展. 实验动物科学与管理 1997; 14: 27
- 4 Shimizu Y, Miyazaki M, Shimizu H, Ito H, Nakagawa K, Ambiru S, Yoshidome H, Nakajima N. Beneficial effects of arterialization of the portal vein on extended hepatectomy. *Br J Surg* 2000; 87: 784-789
- 5 吴红斌, 严律南. 动脉血酮体比率的测定方法. 中国普外基础与临床杂志 1994; 1: 117-118
- 6 陈永亮, 黄志强, 李文岗, 张焯, 王燕生. 门静脉动脉化对大鼠肝脏再生的影响. 消化外科 2005; 4: 421-424
- 7 沈世强, 陈祖兵. 原发性肝癌的治疗决策. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3477-3479
- 8 江正辉, 黄志强. 肝癌. 第1版. 重庆: 重庆出版社, 1996: 261-288
- 9 Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 181-200
- 10 吴阶平, 裘法祖. 黄家驷外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1223-1234
- 11 Lange R, Erhard J, Sander A, Kemnitz J, Garkuwa DA, Eigler FW. [Animal experiment studies of arterialization of the portal vein in liver transplantation using the Göttingen minipig] *Langenbecks Arch Chir* 1997; 382: 277-283
- 12 严律南, 陈晓理. 肝癌肝切除术围手术期处理的临床研究. 中国普外基础与临床杂志 2005; 12: 162-166
- 13 Wolf HK, Michalopoulos GK. Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study of proliferating cell nuclear antigen expression. *Hepatology* 1992; 15: 707-713

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》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者)。文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。(科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

Polo样激酶1小片段干扰RNA对肝癌细胞株HepG2的影响

张庆, 胡承明, 谭小平, 王卫政, 何长华, 刘南植

张庆, 胡承明, 长江大学临床医学院内科教研室 湖北省荆州市 434000

谭小平, 王卫政, 何长华, 长江大学附属第一医院消化内科 湖北省荆州市 434000

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

作者贡献分布: 此课题由何长华与张庆设计; 研究过程由张庆、何长华、胡承明、谭小平及王卫政操作完成; 数据分析由张庆与胡承明完成; 刘南植提供技术指导; 本文写作由张庆与何长华完成。

通讯作者: 何长华, 434000, 湖北省荆州市, 长江大学附属第一医院消化内科, www.95@126.com

电话: 0716-8114055

收稿日期: 2009-05-20 修回日期: 2009-08-07

接受日期: 2009-08-10 在线出版日期: 2009-08-28

Effects of small interference RNAs targeting Polo-like kinase 1 in human liver cancer cell line HepG2

Qing Zhang, Cheng-Ming Hu, Xiao-Ping Tan, Wei-Zheng Wang, Chang-Hua He, Nan-Zhi Liu

Qing Zhang, Cheng-Ming Hu, Department of Internal Medicine, Clinical Medical College of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China

Xiao-Ping Tan, Wei-Zheng Wang, Chang-Hua He, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China

Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Chang-Hua He, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei Province, China. www.95@126.com

Received: 2009-05-20 Revised: 2009-08-07

Accepted: 2009-08-10 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To explore the role of PLK1 in carcinogenesis and development of liver cancer and its clinical significance for cancer treatment with the technique of RNA interference (RNAi).

METHODS: HepG2 cells were transfected with small interfering RNAs (siRNAs) targeting against the human PLK1 by chemosynthesis. The PLK1 mRNA levels of the cells transfected with siRNAs were monitored with real time PCR. Cell proliferation was evaluated by direct cell counting with trypan blue staining. Cell

cycle and apoptosis were examined by flow cytometry.

RESULTS: The PLK1 mRNA levels of transfected liver cancer cells were greatly lowered as compared with that of the control groups in 48 h after the siRNAs transfection ($49.7\% \pm 3.6\%$), ($P < 0.01$). Cell proliferation was reduced from 24 h after transfection. Cell cycle distribution was changed and showed a strong G₂/M arrest in 48 h and 72 h after transfection, and cell apoptosis was increased. There was significant difference as compared with the control group (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: PLK1 plays an important role in the carcinogenesis and development of liver cancer. siRNAs targeting against human PLK1 may specially suppress the expression of PLK1 mRNA in liver cancer cells, inhibit cell proliferation and enhance cell apoptosis. The RNAi targeting PLK1 is expected to be used in gene therapy for human liver cancers.

Key Words: Polo-like kinase 1; RNA interference; Real time PCR; Liver cancer

Zhang Q, Hu CM, Tan XP, Wang WZ, He CH, Liu NZ. Effects of small interference RNAs targeting Polo-like kinase 1 in human liver cancer cell line HepG2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2503-2507

摘要

目的: 联合RNA干扰技术探讨Polo样激酶1(PLK1)在肝癌的发生发展中的作用及对临床治疗的指导作用。

方法: 化学合成针对PLK1的小片段干扰RNA(PLK1-siRNA), 转染至肝癌细胞株HepG2中, 利用实时定量PCR、台盼蓝活性细胞计数和流式细胞术对PLK1的基因表达、细胞增殖、细胞周期和凋亡的检测。

结果: 转染PLK1-siRNA后, 肝癌细胞中PLK1 mRNA表达明显下降($P < 0.01$), 表达量相当于空白组的 $49.7\% \pm 3.6\%$; 细胞增殖活性从转染24 h后明显下降; 细胞分裂周期发生变化, S期

■背景资料

肝癌是最为常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率在我国居恶性肿瘤的首位。Polo样激酶1(PLK1)是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶, 他参与了细胞周期中, 中心体的成熟、纺锤体的形成以及染色体的分离等过程, 对细胞的有丝分裂起重要的调控作用。目前已发现PLK1在多种肿瘤中呈异常高表达, 并与某些临床病理特征相关。

■同行评议者

禄韶英, 副主任医师, 西安交通大学医学院第一附属医院普外科; 党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

■ 研发前沿

RNA干扰(RNAi)现象广泛存在于各种生物中,不仅与细胞分化和生物发育密切相关,还在基因表达调控、基因治疗与基因功能中发挥重要作用。

比例下降,阻滞在G₂/M期的细胞比例上升,于48、72 h阻滞在G₂/M期的细胞比例和细胞凋亡率与空白组相比均有显著增加(均 $P<0.05$)。

结论: PLK1在肝癌的发生发展中起着重要作用,其siRNA能特异性抑制肝癌细胞中PLK1基因的表达,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,针对PLK1基因的RNA干扰有望用于肿瘤的基因治疗。

关键词: Polo样激酶1; RNA干扰; 实时定量聚合酶链式反应; 肝癌

张庆, 胡承明, 谭小平, 王卫政, 何长华, 刘南植. Polo样激酶1小片段干扰RNA对肝癌细胞株HepG2的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2503-2507
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2503.asp>

0 引言

Polo样激酶1(polo-like kinase 1, PLK1)是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶^[1],他参与了细胞周期中,中心体的成熟、纺锤体的形成以及染色体的分离等过程,对细胞的有丝分裂起重要的调控作用。在正常情况下,DNA受损时会通过抑制PLK1的活性而阻止细胞进入分裂期(M期)^[2-3]。目前已发现PLK1在多种肿瘤中呈异常高表达,并与某些临床病理特征相关^[4]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是一种由双链RNA启动的序列特异性基因沉默机制,他是转录后基因沉默现象的一种,是机体固有的对抗外源侵袭基因即维持自身基因稳定性的一种自我保护机制。RNAi现象广泛存在于各种生物中,不仅与细胞分化和生物发育密切相关,还在基因表达调控、基因治疗与基因功能中发挥重要作用^[5]。在本研究中,我们通过RNAi技术抑制PLK1的表达,探讨PLK1在肝癌发生发展中的作用及对临床治疗的指导作用。

1 材料和方法

1.1 材料 siRNA由上海吉玛制药公司化学合成,其PLK1源序列来源于NCBI NM_05030,其siRNA正义链: 5'-GGGCGGCUUUGCCAAGUGCdTdT-3',反义链: 5'-GCACUUGGCAAAGCCGCCdTdT-3', 5'端荧光标记阴性对照siRNA 1条。肝癌HepG2细胞株来源于华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所,采用含10%胎牛血清(杭州四季青生物公司)的DMEM高糖培养基(Hyclone公司),在37℃ CO₂恒温培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 分组: 空白对照组只有转染液; 阴性对照组为siRNA+转染液; PLK1-siRNA组为PLK1-siRNA+转染液。将 4×10^8 /L的细胞于转染前1 d种植在6 cm的培养皿中培养,细胞融合约40%-50%进行转染,将转染液脂质体Lipofectamine 2000(Introvigen公司)和siRNA先分别与不含血清的DMEM培养基混合,5 min后将他们混合在一起,室温放置20 min后分别加入细胞中继续培养,然后根据实验需要收集细胞。

1.2.2 实时定量PCR检测: RNA提取和第1链合成。将各组经转染后的细胞分别用TRIzol(Gibco公司)提取总RNA,再使用逆转录试剂盒(Promega公司)合成第1链。PLK1引物,正义链: 5'-TGAGCCTGAGGCCCGATACTA-3',反义链: 5'-TTGCCAGTCCAAAATCCCCTA-3'; β -actin引物,正义链: 5'-GGAGAAGATGACCCAGATC-3',反义链: 5'-GATCTTCATGAGGTAGTCAG-3'。利用RT-PCR胶回收产物作为标准品,倍比稀释后制作标准曲线。RT-PCR反应体系20 μ L: SYBR Green I MIX(Toyobo公司)10 μ L引物1 0.4 μ L引物2 0.4 μ L cDNA 2 μ L DEPC水7.2 μ L。扩增过程: 95℃ 5 s, 58℃ 5 s, 72℃ 20 s循环40次,使用Roche Lightcycler PCR扩增仪扩增。每组样本重复测量3次。

1.2.3 细胞增殖活性检测: 将 5×10^7 /L细胞种植在六孔板中培养24 h后按上述方法转染,分别于转染0、12、24、48及72 h收集细胞,用1.5 mL PBS和0.1%台盼蓝混合液使细胞悬浮,然后使用血细胞计数板计数,每个样本重复计数3次,以72 h后空白对照的平均活性细胞数为参照,计数出每组各时间的百分比,然后绘成细胞活性增殖图。

1.2.4 流式细胞术: 细胞种植在培养皿中,按上述方法转染12、24、48和72 h后,将细胞用胰酶消化,用冷PBS洗涤,再用70%的冰乙醇固定过夜,固定的细胞被收集、洗涤和悬浮在含有10 mg/L PI(Sigma公司)和100 mg/L RNase A(华美生物公司)的PBS中,然后于4℃中孵育至少30 min,利用流式细胞仪(BD公司)分析细胞周期分配和凋亡。

统计学处理 数据应用SPSS11.0软件进行统计学处理,所有数据采取mean \pm SD表示,根据实验资料要求,选用t检验、方差分析进行数据处理,以 $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 siRNA转染后的PLK1 mRNA的表达 经转

表 1 空白组、阴性对照组和PLK1-siRNA组分别转染后细胞周期分配和凋亡的情况 (%)

分组	48 h				72 h			
	凋亡率	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	凋亡率	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白	0.6±0.5	51.9±3.2	30.2±2.7	14.2±1.7	0.7±0.5	51.1±2.7	30.7±2.5	14.3±1.5
阴性对照	0.7±0.5	50.2±2.9	32.7±3.1	14.4±1.5	0.8±0.5	50.5±2.3	31.2±2.7	13.6±1.7
PLK1-siRNA	12.3±2.3 ^a	41.9±3.1	19.5±1.9	24.1±1.8 ^a	35.9±2.6 ^a	25.3±2.7	8.2±2.9	31.1±1.9 ^a

^a $P < 0.05$ vs 空白组, 阴性对照组.

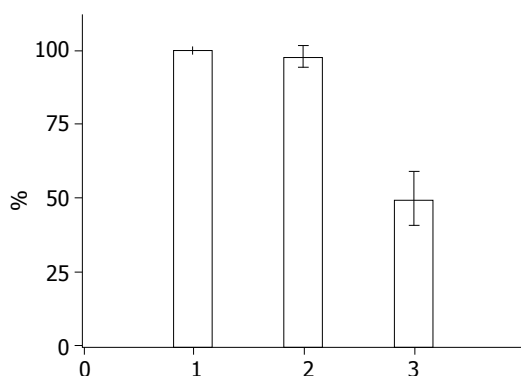


图 1 PLK1 mRNA的表达. 1: 空白组; 2: 阴性对照组; 3: PLK1-siRNA组.

染后48 h PLK1-siRNA组mRNA的表达明显被抑制, 表达量与空白组与阴性对照组比较明显降低($t = 23.921, 21.184, P < 0.01$), 而阴性对照组mRNA的表达基本上与空白组无明显区别($97.8\% \pm 1.5\%$ vs $100\% \pm 0.0\%$, $P < 0.01$, 图1).

2.2 转染后细胞增殖活性比较 通过台盼蓝活性细胞计数发现空白组和阴性对照组细胞增殖活性无明显差别, 而PLK1-siRNA组细胞增殖活性于12 h前与空白、阴性对照组无明显差异, 到24 h细胞增殖活性相对于空白组开始减弱, 增殖活性呈下降趋势, 从24-72 h其细胞增殖活性相对于空白组分别为 $45.5\% \pm 2.1\%$ 、 $36.1\% \pm 1.7\%$ 及 $31.3\% \pm 1.5\%$ ($P < 0.01$, 图2).

2.3 siRNA干扰后细胞周期分配和凋亡 通过流式细胞术检测, 发现肝癌细胞HepG2转染后, 空白组和阴性对照组细胞周期分配无显著性差别, 均未见明显凋亡; PLK1-siRNA组转染12 h后细胞周期分配、凋亡与空白组相似, 于24 h后开始出现凋亡, 虽然凋亡不明显, 但细胞周期分配开始出现变化, S期比例下降, 阻滞在G₂/M期的细胞比例上升, 于48、72 h细胞周期分配和凋亡随时间延长变化越大, 被阻滞在G₂/M期的细胞比例分别为空白组约1倍、1.5倍, 凋亡率为 $12.3\% \pm 2.3\%$ 及 $35.9\% \pm 2.6\%$ ($P < 0.05$, 表1).

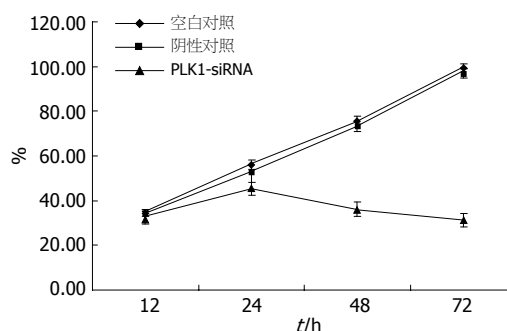


图 2 以空白组72 h的细胞数为参照绘制的细胞增殖活性图.

3 讨论

肝癌是最为常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率在我国居恶性肿瘤的首位. 近年来, 肝癌的分子遗传学和分子病理学研究取得了突破性进展, 使人们认识到肝癌发生的根本原因可能在细胞内部基因结构及表达的异常改变, 涉及到多种癌基因、抑癌基因、生长因子及其受体、细胞黏附因子及DNA修复基因等的异常和积累.

RNAi是Fire *et al*^[6]于1998年发现的生物中天然存在的转录后基因沉默机制. 其基本机制是外源或内源双链RNA(dsRNA)被称为Dicer的RNA酶或RNA酶III切割成21-23个碱基长的siRNA, 引发并参与RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的形成, 引导RISC序列特异性切割mRNA, 从而在mRNA水平上关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程. 在本实验中, 我们通过化学合成针对PLK1的siRNA, 利用体外转染, 将其转染到肝癌细胞HepG2中, 发现PLK1 siRNA组细胞PLK1 mRNA的表达明显抑制, 表达量相对于空白组 $49.7\% \pm 3.6\%$. 说明siRNA通过基因沉默机制能使肝癌细胞PLK1基因沉默来抑制其表达.

PLK1是近年发现的一种细胞周期调控基因, 他是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶, 在细胞有丝分裂的不同时期都起到十分重要的作用: 在G₂晚期M初期参与细胞分裂周期

■ 相关报道

根据PLK1在许多肿瘤中高表达, 与肿瘤细胞增殖和致癌性转化密切相关, 目前已经建立了针对PLK1 mRNA的反义寡核苷酸和干扰RNA, 他们能特异性的对PLK1 mRNA及其蛋白产物表现为剂量依赖性的抑制作用, 由此也抑制了PLK1的丝氨酸/苏氨酸激酶的活性, 能有效抑制培养细胞系或裸鼠肿瘤模型中肿瘤细胞的增殖.

■应用要点

采用“基因沉默”技术,干预PLK1等肿瘤增殖“关键基因”表达,开展抑制肿瘤增殖发展的体内、外实验研究,将有可能为肿瘤的治疗提供新型有效的方法。

25C(cell division cycle 25C, CDC25C)的激活、继而促成Cyclin B/Cdc2的激活,协助中心体的功能成熟以及纺锤体的形成,从而促进M期的起始和染色体正常分离、分配^[7-9];通过调节APC(anaphase-promoting complex)来决定细胞能否按期离开M期;他在细胞自我保护中也起着重要作用,当DNA受损时可引起PLK1苏氨酸残基磷酸化而使其活性受抑,从而使细胞阻滞于G₂/M期^[10-12];在分裂活跃的组织器官或肿瘤细胞中PLK1活性较高,据有关研究报道,通过对PLK1抗体的微注射可以抑制细胞周期的进展^[13],利用反义寡核苷酸和RNA干扰技术直接抑制PLK1的表达,从而抑制增殖细胞有丝分裂活性^[14-21]。此外Smith *et al*报道PLK1的过多表达能使NIH3T3细胞癌基因聚集,这些细胞能在裸鼠上形成肿瘤^[22]。这些研究都表明PLK1可能在肿瘤发生发展上起着重要作用。Tokumitsu *et al*曾对75例胃癌在mRNA水平上对PLK1表达进行了分析,阳性率为73%^[23]。我们曾在蛋白水平分析发现PLK1在胃癌中高表达^[24],说明PLK1在肿瘤发生发展上可能起着重要的作用。

我们通过实验发现,经PLK1-siRNA转染的细胞其增殖活性相对于空白组明显下降,细胞周期分配发生变化,S期比例下降,细胞阻滞在G₂/M期的比例上升,于48 h和72 h分别为24.1%±1.8%、31.1%±1.9%,细胞凋亡率也明显增加,48 h和72 h分别为12.3%±2.3%、35.9%±2.6%,相对于空白组和阴性对照组均有显著性意义。由此可见,通过基因沉默机制使能肝癌细胞PLK1基因沉默来抑制其表达,从而抑制肝癌细胞的增殖活性,使细胞阻滞于G₂/M期,促进细胞凋亡,从而说明PLK1在肝癌发生发展中起着重要作用。

根据PLK1在许多肿瘤中高表达,与肿瘤细胞增殖和致癌性转化密切相关,目前已经建立了针对PLK1 mRNA的反义寡核苷酸和干扰RNA,他们能特异性的对PLK1 mRNA及其蛋白产物表现为剂量依赖性的抑制作用,由此也抑制了PLK1的丝氨酸/苏氨酸激酶的活性,能有效抑制培养细胞系或裸鼠肿瘤模型中肿瘤细胞的增殖^[14-21]。说明了PLK1可以作为肿瘤治疗的一个靶点,在临床治疗中有着重要的指导作用^[25]。在本实验中,利用RNAi,肝癌细胞株增殖活性明显下降,凋亡率明显增加,也正说明了PLK1不仅在肝癌发生发展中起着重要作用,而且可作为肝癌治疗的潜在靶位点。

总之,PLK1的生物学特性是:在增殖程度高的肿瘤细胞中具有高度表达,而在正常细胞则低表达或不表达,这说明他可能在肿瘤发生发展中起着重要作用,并使他可能成为抗肿瘤治疗的潜在靶位点。针对肿瘤细胞的有丝分裂调节通路异常表达基因的治疗应该比传统药物具有更好的疗效和靶向性,从而具有更低的毒性。如果采用“基因沉默”技术,干预PLK1等肿瘤增殖“关键基因”表达,开展抑制肿瘤增殖发展的体内、外实验研究,将有可能为肿瘤的治疗提供新型有效的方法。

4 参考文献

- 1 Donohue PJ, Alberts GF, Guo Y, Winkles JA. Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 10351-10357
- 2 Smits VA, Klompmaaker R, Arnaud L, Rijksen G, Nigg EA, Medema RH. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 672-676
- 3 Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 143-148
- 4 Eckerdt F, Yuan J, Strebhardt K. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene* 2005; 24: 267-276
- 5 Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004; 305: 1437-1441
- 6 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 7 Hamanaka R, Smith MR, O'Connor PM, Maloid S, Mihalic K, Spivak JL, Longo DL, Ferris DK. Polo-like kinase is a cell cycle-regulated kinase activated during mitosis. *J Biol Chem* 1995; 270: 21086-21091
- 8 Golsteyn RM, Schultz SJ, Bartek J, Ziemiecki A, Ried T, Nigg EA. Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila polo* and *Saccharomyces cerevisiae Cdc5*. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 6): 1509-1517
- 9 Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall LA. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* 2000; 12: 405-411
- 10 Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 2002; 3: 341-348
- 11 Yuan J, Eckerdt F, Bereiter-Hahn J, Kurunci-Csacsko E, Kaufmann M, Strebhardt K. Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 2002; 21: 8282-8292
- 12 Kotani S, Tugendreich S, Fujii M, Jorgensen PM, Watanabe N, Hoog C, Hieter P, Todokoro K. PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate

- anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1998; 1: 371-380
- 13 Lane HA, Nigg EA. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* 1996; 135: 1701-1713
 - 14 Zhou Q, Bai M, Su Y. Effect of antisense RNA targeting polo-like kinase 1 on cell cycle and proliferation in A549 cells. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1642-1649
 - 15 Gray PJ Jr, Bearss DJ, Han H, Nagle R, Tsao MS, Dean N, Von Hoff DD. Identification of human polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 641-646
 - 16 Masuda Y, Nishida A, Hori K, Hirabayashi T, Kajimoto S, Nakajo S, Kondo T, Asaka M, Nakaya K. Beta-hydroxyisovalerylshikonin induces apoptosis in human leukemia cells by inhibiting the activity of a polo-like kinase 1 (PLK1). *Oncogene* 2003; 22: 1012-1023
 - 17 Elez R, Piiper A, Kronenberger B, Kock M, Brendel M, Hermann E, Pliquett U, Neumann E, Zeuzem S. Tumor regression by combination antisense therapy against Plk1 and Bcl-2. *Oncogene* 2003; 22: 69-80
 - 18 Spänkuch-Schmitt B, Wolf G, Solbach C, Loibl S, Knecht R, Stegmüller M, von Minckwitz G, Kaufmann M, Strebhardt K. Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 3162-3171
 - 19 Elez R, Piiper A, Giannini CD, Brendel M, Zeuzem S. Polo-like kinase1, a new target for antisense tumor therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 352-356
 - 20 Liu X, Erikson RL. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8672-8676
 - 21 Spänkuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, Strebhardt K. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1863-1877
 - 22 Smith MR, Wilson ML, Hamanaka R, Chase D, Kung H, Longo DL, Ferris DK. Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 397-405
 - 23 Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S, Akazawa K, Nakano S, Niho Y. Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 15: 687-692
 - 24 张庆, 刘南植, 洪玮, 倪志, 李秀梅. 胃癌组织PLK1的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1499-1502
 - 25 Reagan-Shaw S, Ahmad N. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer. *FASEB J* 2005; 19: 611-613

■同行评价

本研究设计合理, 结果可信, 对目前肝肿瘤基因治疗有较好的参考价值。

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》数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \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! (科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

文拉法辛对伴抑郁焦虑的非糜烂性胃食管反流病的作用

彭继承, 李运泽, 练海燕

■背景资料

非糜烂性胃食管反流病(NERD), 占胃食管反流病(GERD)70%左右, 这类患者临床症状严重程度与糜烂性食管炎(EE)相似。目前NERD发病机制尚不明确, 其发病率有逐年升高的趋势, 且常伴一定程度的抑郁、焦虑症状。本文应用文拉法辛和埃索美拉唑联合莫沙必利对比治疗伴有焦虑或抑郁的NERD患者, 观察其临床疗效, 并探讨其发病机制。

彭继承, 李运泽, 练海燕, 广西医科大学第五附属医院消化内科 广西壮族自治区柳州市 545001

作者贡献分布: 彭继承、李运泽及练海燕对此文所作贡献均等; 此课题由彭继承、李运泽及练海燕设计; 研究过程由彭继承、李运泽及练海燕操作完成; 研究所用分析工具由李运泽与练海燕提供; 数据分析由彭继承完成; 本论文写作由彭继承、李运泽及练海燕完成。

通讯作者: 彭继承, 主治医师, 545006, 广西壮族自治区柳州市, 广西医科大学第五附属医院消化内科, pjc.com@163.com
电话: 0772-2662778

收稿日期: 2009-06-03 修回日期: 2009-08-09

接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-08-28

Efficacy of Venlafaxine in treatment of non-erosive gastroesophageal reflux disease with depression and anxiety

Ji-Cheng Peng, Yun-Ze Li, Hai-Yan Lian

Ji-Cheng Peng, Yun-Ze Li, Hai-Yan Lian, Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Ji-Cheng Peng, Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. pjc.com@163.com

Received: 2009-06-03 Revised: 2009-08-09

Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of Venlafaxine in treatment of non-erosive gastroesophageal reflux disease accompanied with depression and anxiety.

METHODS: Fifty-six patients with non-erosive gastroesophageal reflux disease accompanied with depression and anxiety were divided into treatment group and control group double-blindly and randomly. All patients were treated with Esomeprazole (20 mg qd) and Mosapride dispersible tablet (5 mg tid). Patients in treatment group were treated with Venlafaxine (25-50 mg tid). Two groups were under treatment for 4 weeks. The symptoms of heartburn, contraflow, depression and anxiety were observed before and after treatment. The therapeutic efficacy was evaluated by the symptom scores and effective power.

RESULTS: The difference of heartburn scores and contraflow scores before treatment, was significant between and within the two groups ($P < 0.01$). After treatment, the differences of heartburn, contraflow scores, Hamilton Depression Scale (HAMD) and Hamilton Anxiety Scale (HAMA) were also significant ($P < 0.05$). The total effective rate of treatment group was higher than that of control group (96.1% vs 79.1%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The therapeutic efficacy of combined treatment of Venlafaxine, Esomeprazole and Mosapride is good for non-erosive gastroesophageal reflux disease accompanied with depression and anxiety.

Key Words: Non-erosive Gastroesophageal Reflux Disease; Depression; Anxiety; Itopride; Venlafaxine

Peng JC, Li YZ, Lian HY. Efficacy of Venlafaxine in treatment of non-erosive gastroesophageal reflux disease with depression and anxiety. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2508-2511

摘要

目的: 探讨文拉法辛对伴有抑郁和/或焦虑的非糜烂性胃食管反流病的治疗效果。

方法: 56例伴有抑郁和/或焦虑的非糜烂性胃食管反流病患者双盲随机分为对照组和治疗组, 所有患者使用埃索美拉唑(20 mg qd)联合莫沙必利分散片(5 mg tid)治疗4 wk; 治疗组另加用文拉法辛(25-50 mg tid)治疗4 wk。观察烧心、反流、抑郁和焦虑等症状, 并用症状积分及有效率评价疗效。

结果: 与治疗前比较, 2组患者治疗后烧心、反流积分均改善, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 治疗后治疗组与对照组比较, 患者烧心、反流积分均改善, 差异有统计学意义($P < 0.01$), HAMD及HAMA积分均改善, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 治疗组总有效率高于对照组(96.1% vs 79.1%, $P < 0.05$)。

结论: 对伴有抑郁和/或焦虑的非糜烂性胃食

■同行评议者

黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科; 许文燮, 教授, 上海交通大学生命科学院生物医学工程系

管反流病文拉法辛和埃索美拉唑及莫沙必利联用有较好的疗效。

关键词: 非糜烂性胃食管反流病; 焦虑; 抑郁; 埃索美拉唑; 文拉法辛

彭继承, 李运泽, 练海燕. 文拉法辛对伴抑郁焦虑的非糜烂性胃食管反流病的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2508-2511

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2508.asp>

0 引言

非糜烂性胃食管反流病(non-erosive reflux disease, NERD), 占胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)70%左右^[1], 这类患者临床症状严重程度与糜烂性食管炎(erosive esophagitis, EE)相似, 但对质子泵抑制剂(protonpumpinhibitor, PPI)等的治疗反应较差^[2-3]。目前NERD发病机制尚不明确, 其发病率有逐年升高的趋势, 且常伴一定程度的抑郁、焦虑症状^[4]。精神心理应激在NERD发病机制中的作用越来越引人注意, 越来越多的医生将抗抑郁药如氟西汀、黛力新等用于治疗NERD患者, 但起效相对较慢, 或疗效尚不十分满意。文拉法辛在抑郁、焦虑患者中应用广泛, 疗效肯定, 但国内尚未有治疗伴有焦虑抑郁的NERD的报导。我们应用文拉法辛和埃索美拉唑联合莫沙必利对比治疗伴有焦虑或抑郁的NERD患者, 观察其临床疗效, 并探讨其发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究经我院伦理委员讨论同意, 经患者签署知情同意书下进行。选取2007-01/2009-03广西医科大学第五附属医院NERD伴有抑郁和/或焦虑的患者56例, 其中男23例, 女33例。将所有患者采用双盲随机对照法分为对照组、治疗组, 2组的年龄分布和性别构成差异均无显著性($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 入选标准: 年龄18-70岁; 主要依赖烧心和反流等症状学特点进行诊断, 符合《中国胃食管反流病共识意见2006年10月三亚》^[5]; 埃索美拉唑量表症状积分 >12 分^[6]。

1.2.2 病例剔除标准: 伴严重心、肺、肝、肾及恶性肿瘤疾病; 有药物过敏; 有精神类疾病史和服药物史; 哺乳期、妊娠期妇女。

1.2.3 治疗及疗效评价: 对照组使用埃索美拉唑(20 mg qd)联合莫沙必利分散片(5 mg tid)治疗

4 wk; 治疗组除使用上述药物治疗4 wk外, 加用文拉法辛25 mg tid, 视病情逐渐增至50 mg tid, 根据耐受性和临床需要, 对病情严重的患者可将剂量增至375 mg/d, 在增加剂量时, 75 mg/d的增长速度不得少于4 d, 亦用药4 wk。治疗前后记录血常规、肝肾功能和心电图检查结果; 对治疗前后的烧心、反流、抑郁和焦虑等临床症状进行记录并评分; 记录可能的药物不良反应。NERD症状评分参考文献^[6], 根据反流、烧心等症状严重程度及发生频度进行症状记分。每种症状积分 = 每个症状评分+每个症状发作频率评分。抑郁、焦虑评分参考《国际疾病分类》(ICD-10, 1992)及《中国精神障碍分类与诊断标准》(CCMD-3), 汉密尔顿抑郁量表(HAMD17项版本)评分 >12 分为抑郁症状, 焦虑量表(HAMA)评分 >10 分为焦虑症状。疗效判定标准参考文献^[7]。显效率+有效率 = 总有效率。

统计学处理 采用SPSS12.5统计软件, 计量资料用mean \pm SD表示并 t 检验, 计数资料用%表示并 χ^2 检验。

2 结果

2.1 烧心、反流、HAMD及HAMA积分比较 治疗后2组内烧心积分、组间烧心积分差异有统计学意义($P<0.01$); 治疗后2组内反流积分、组间反流积分差异均有统计学意义($P<0.01$)。治疗后治疗组HAMD及HAMA积分均较治疗前明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 治疗后2组间HAMD及HAMA积分差异有统计学意义($P<0.05$, 表1)。

2.2 临床疗效 治疗组26例患者中显效21例, 总有效25例, 2组显效率和总有效率比较差异均有统计学意义($P<0.05$, 表2)。

2.3 不良反应 对照组有4例患者因药物反应或症状改善不良要求停止试验治疗, 治疗组有2例患者因药物反应要求停止试验治疗。不良反应主要为胃肠道症状如口干、肠鸣、大便次数增多, 治疗组另有血压轻度升高、困倦等, 但药物反应均较轻微。治疗前后血常规、肝肾功能及心电图均未见异常变化。

3 讨论

NERD是一组独立的异质性疾病, 其发病机制不很清楚, 可能通过以下机制: (1)酸反流扩大的食管黏膜上皮细胞间隙及上皮通透性增加, 使酸更容易进入食管内的感觉神经末梢, 并使之激

■研究前沿

非糜烂性胃食管反流病(NERD)常伴抑郁、焦虑症状, 其发病机制尚不明确, 对PPI的治疗反应较差。

■应用要点

本实验提示对伴有抑郁或焦虑的NERD, 文拉法辛和埃索美拉唑联合莫沙必利有较好的疗效, 对临床治疗具有一定的参考和指导意义。

表 1 治疗前后烧心、反流、HAMD及HAMA积分比较 (分, mean \pm SD)

	对照组		治疗组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
烧心	5.14 \pm 2.31	0.75 \pm 0.68 ^b	5.29 \pm 1.96	0.07 \pm 0.06 ^{bd}
反流	5.54 \pm 2.58	0.89 \pm 0.85 ^b	5.76 \pm 2.77	0.03 \pm 0.02 ^{bd}
HAMD	28.11 \pm 9.69	17.38 \pm 7.61 ^a	27.79 \pm 8.96	10.28 \pm 6.78 ^{ac}
HAMA	23.78 \pm 7.52	14.17 \pm 6.23 ^a	24.26 \pm 7.74	8.39 \pm 5.57 ^{ac}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 同组治疗前; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组治疗后。

表 2 2组患者临床疗效分析 $n(\%)$

	n	显效	有效	总有效
治疗组	26	21(80.7) ^a	4(15.4)	25(96.1) ^a
对照组	24	11(45.8)	8(33.3)	19(79.1)

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

活产生症状。(2)食管高敏感24 h食管pH测定病理性酸反流仅约50%-75%的NERD患者达到阳性标准^[8], 表明生理量酸反流足以产生症状, 提示这些患者食管可能对酸高度敏感。目前认为非糜烂性反流病的食管高敏感性可能与食管感觉神经纤维末梢致敏和/或脊髓、大脑中枢致敏有关^[9]。(3)与非酸性刺激(如胆汁)或食管动力异常有关^[10]。(4)精神心理因素NERD患者中约40%存在轻中度抑郁和/或焦虑, 比例不仅明显高于一般人群^[11], 也高于EE, 说明精神心理应激在NERD患者反流症状的发生中起重要作用^[12]。精神因素可能通过脑肠反射、压力应激改变胃肠道的激素分泌和动力反应, 如抑郁、焦虑能调节食管的感知, 造成患者感知低张的食管刺激, 产生疼痛等感觉, 这可能与患者对食管内反流事件过度注意, 从而造成疼痛的感知有关^[13-14]。

PPI治疗GERD的疗效已在世界各国得到认可^[15]。埃索美拉唑主要经非酶代谢具有快速、强力和持久的抑制胃酸的分泌作用, 且可提高LES的压力, 对抗反流有重要作用。但NERD对PPI的治疗反应较差^[2-3], 究其原因, 可能单用PPI甚至加用动力药无法解决NERD存在的抑郁和/或焦虑问题以及食管高敏感性。文拉法辛适用于各种类型抑郁症, 包括伴有焦虑的抑郁症。他能增强人的中枢神经系统某些神经递质的活性, 文拉法辛及其活性代谢物O-去甲基文拉法辛(ODV)能有效地抑制5-羟色胺和去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)的再摄取, 对多巴胺的再摄取也有一定的抑制作用, 从而降低大脑中枢和

外周神经对外界反应的敏感性, 不仅解决了抑郁、焦虑问题, 还降低了食管高敏感性, 从而缓解烧心、反流症状。反过来, NERD患者久治不愈的烧心、反流症状会加重心理负担, NERD的反流症状与心理因素可能互为因果, 互相影响。

我们观察到治疗组的烧心和反流积分、HAMD及HAMA积分、显效率和总有效率均与对照组差异均有统计学意义($P < 0.01$), 证实了文拉法辛对NERD的有效性。文拉法辛对NE再摄取有抑制作用, 且没有明显的负反馈作用发生, NE在突触间隙的水平升高很快, 故文拉法辛起效快, 治疗后第1周末HAMD评分就有显著改善, 而氟西汀在第2周才有明显改善, 起效早于氟西汀^[16]。另外, 我们的观察发现治疗组药物不良反应轻微, 仅有轻度胃肠道症状、血压轻度升高和困倦等。我们认为, 短期治疗伴有抑郁或焦虑的胃食管反流病, 采用文拉法辛和埃索美拉唑及莫沙必利联用有较佳的疗效, 但长期疗效和药物不良反应有待于进一步观察。

4 参考文献

- Rosaida MS, Goh KL. Gastro-oesophageal reflux disease, reflux oesophagitis and non-erosive reflux disease in a multiracial Asian population: a prospective, endoscopy based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 495-501
- Fass R, Ofman JJ. Gastroesophageal reflux disease--should we adopt a new conceptual framework? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1901-1909
- 钟英强, 许哲, 于钟, 张世能, 朱兆华. 雷贝拉唑对不同类型胃食管反流病疗效和食管黏膜环氧化酶2的影响. *中国新药与临床杂志* 2006; 25: 254-258
- 王大冰, 元云玲, 张太科, 殷伟, 韩玉娟, 韩芝, 刘英. 胃食管反流病患者临床症状与精神因素关系研究. *现代临床医学* 2007; 33: 87-88
- 林三仁, 许国铭, 胡品津, 周丽雅, 陈旻湖, 柯美云, 袁耀宗, 房殿春, 萧树东. 中国胃食管反流病共识意见 2006年10月三亚. *胃肠病学* 2007; 12: 233-239
- Wong WM, Lam KF, Lai KC, Hui WM, Hu WH, Lam CL, Wong NY, Xia HH, Huang JQ, Chan AO, Lam SK, Wong BC. A validated symptoms questionnaire (Chinese GERDQ) for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:

- 1407-1413
- 7 徐晓蓉, 李兆申. 非糜烂性反流病的诊断和治疗进展. 胃肠病学 2004; 9: 245
- 8 Martinez SD, Malagon IB, Garewal HS, Cui H, Fass R. Non-erosive reflux disease (NERD)--acid reflux and symptom patterns. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 537-545
- 9 Miwa H, Minoo T, Hojo M, Yaginuma R, Nagahara A, Kawabe M, Ohkawa A, Asaoka D, Kurosawa A, Ohkusa T, Sato N. Oesophageal hypersensitivity in Japanese patients with non-erosive gastro-oesophageal reflux diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 112-117
- 10 王虹, 高建萍, 周磊, 顾清, 顾而立, 周慧. 食管体部动力异常在胃食管反流病中的作用. 胃肠病学 2004; 9: 13-16
- 11 徐志洁, 段丽萍, 王琨, 夏志伟, 林三仁. 焦虑和抑郁与胃食管反流病症状发生的相关研究. 中华医学杂志 2005; 85: 3210-3215
- 12 刘洋, 龚均, 董蕾, 王学勤, 朱有玲. 非糜烂性反流病的临床研究. 四川大学学报 2005; 36: 552-554
- 13 Shaw MJ, Talley NJ, Beebe TJ, Rockwood T, Carlsson R, Adlis S, Fendrick AM, Jones R, Dent J, Bytzer P. Initial validation of a diagnostic questionnaire for gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 52-57
- 14 Mayer EA. Spinal and supraspinal modulation of visceral sensation. *Gut* 2000; 47 Suppl 4: iv69-iv72; discussion iv76
- 15 DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 190-200
- 16 安成革. 氟西汀与文拉法辛治疗抑郁症患者的疗效对照研究. 中外医疗 2008; 27: 53

■同行评价

本研究实用性强, 结果对临床治疗相关疾病具有一定的参考和指导意义。

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 •

第九届全国消化系恶性病变介入诊疗研讨会暨内镜 / 介入新技术论坛征文通知

本刊讯 为满足临床一线医师对消化系病变介入新技术研究、探讨和交流的欲望, 进一步提升国内消化系疾病尤其是消化系恶性病变介入诊治的技术水平, 上海同仁医院联合河南省人民医院以及河南省新乡医学院第一附属医院, 定于2009-11-06/11在河南省新乡市主办第九届全国消化系恶性病变介入诊疗研讨会暨内镜/介入新技术论坛。本次会议由河南省抗癌协会、河南省消化内镜学会、河南省医学会介入治疗专业分会具体承办, 《中华放射学杂志》、《中华消化内镜学杂志》、《世界胃肠病学杂志》、《介入放射学杂志》、《微创医学杂志》以及《医学信息内外科学杂志》共同参与协办。会议将着重介绍消化系病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法, 为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台。本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管、胃肠道等消化系管腔内支架治疗应用技术和发生的问题以及消化系病变、门静脉高压、胆道结石等疾病的消化内镜、介入放射、内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨。会议还将邀请美国、德国和韩国专家介绍相关领域的技术进展并安排内容丰富的手术演示。参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分。

1 征文内容

(1)消化系恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等; (2)消化系良性病变, 如: 门静脉高压、胆管结石、消化系出血等的内镜及介入新技术应用; (3)消化系疾病诊治前沿交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验、个案报告等各类稿件。

2 投稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文; (2)论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果与结论四要素。经验交流、短篇报道等全文限1000字以内; (3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文。优秀论文将安排在国家级杂志上发表。 (4)所有稿件一律要求电脑打印(Word格式), 邮寄者需附软盘, 特别鼓励用E-mail投稿(以附件Word格式); (5)截稿日期: 2009-09-31。

3 联系方式

杨瑞民, 453100, 河南省卫辉市健康路88号, 新乡医学院第一附属医院介入科. y-rmin@163.com, 电传: 0373-4402942, 手机: 13903805978

梁宝松, 450003, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院内镜科. lbaosong@hotmail.com, 电话: 0371-65063502

血管紧张素原基因M235T变异与HBV感染后肝硬化形成的关系

宋淑静, 田敬华, 赵辉, 刘亚楠, 郭杰, 马小亮, 王慧珠

■背景资料

AGT基因多态性与多种疾病相关, 包括高血压、脑梗塞、冠心病、肝纤维化等。AGT基因核心启动子区的变异与乙肝感染后的肝硬化相关, 但血管紧张素原基因T174M变异与肝硬化没有显著关系。

宋淑静, 田敬华, 赵辉, 刘亚楠, 郭杰, 马小亮, 王慧珠, 北京地坛医院检验科 北京市 100015

作者贡献分布: 宋淑静与田敬华对此文所作贡献均等; 此课题由宋淑静与田敬华设计; 研究过程由刘亚楠、郭杰、马小亮及王慧珠操作完成; 数据分析由田敬华与赵辉完成; 本论文写作由宋淑静与田敬华完成。

通讯作者: 宋淑静, 副主任技师, 100015, 北京市, 北京地坛医院检验科, songshujing@sina.com

电话: 010-84322429

收稿日期: 2009-06-04 修回日期: 2009-07-16

接受日期: 2009-07-20 在线出版日期: 2009-08-28

Association of M235T variants of angiotensinogen gene with hepatocirrhosis

Shu-Jing Song, Jing-Hua Tian, Hui Zhao, Ya-Nan Liu, Jie Guo, Xiao-Liang Ma, Hui-Zhu Wang

Shu-Jing Song, Jing-Hua Tian, Hui Zhao, Ya-Nan Liu, Jie Guo, Xiao-Liang Ma, Hui-Zhu Wang, Clinical Laboratory, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

Correspondence to: Shu-Jing Song, Clinical Laboratory, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China. songshujing@sina.com

Received: 2009-06-04 Revised: 2009-07-16

Accepted: 2009-07-20 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To study the relationship between M235T variants of angiotensinogen (AGT) gene and hepatocirrhosis.

METHODS: The genomic DNA of leukocytes was extracted from patients with hepatocirrhosis and normal people to observe the distribution of different genotypes and differences of allele frequencies between the normal and the hepatocirrhosis groups by polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and automatic sequencing.

RESULTS: There was no difference in the distributions of genotypes MM, MT and TT at locus M235T of AGT gene between the hepatocirrhosis group (7.8%, 40.6%, 51.6%) and the control group (8.0%, 59.7%, 32.3%), $\chi^2 = 5.120$, $P > 0.05$.

CONCLUSION: The polymorphism of M235T of

the AGT gene may not be involved in the hepatocirrhosis.

Key Words: Angiotensinogen; Genetic polymorphism; Hepatocirrhosis

Song SJ, Tian JH, Zhao H, Liu YN, Guo J, Ma XL, Wang HZ. Association of M235T variants of angiotensinogen gene with hepatocirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2512-2514

摘要

目的: 探讨血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)基因M235T分子变异与肝硬化的关系。

方法: 提取肝硬化患者和正常人白细胞基因组DNA, 通过PCR、限制性片段长度多态性和测序等技术, 观察在正常组和肝硬化组的不同基因型的分布和等位基因频率的差异。

结果: AGT基因 M235T 位点MM、MT和TT基因型的分布在肝硬化组和正常组分别为: 7.8%、40.6%、51.6%与8.0%、59.7%、32.3%, 两组之间不存在差异($\chi^2 = 5.120$, $P > 0.05$)。

结论: AGT基因M235T变异可能与肝硬化没有显著关系。

关键词: 血管紧张素原; 遗传多态性; 肝硬化

宋淑静, 田敬华, 赵辉, 刘亚楠, 郭杰, 马小亮, 王慧珠. 血管紧张素原基因M235T变异与HBV感染后肝硬化形成的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17(24): 2512-2514

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2512.asp>

0 引言

人血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)基因全长13 kb, 含5个外显子和4个内含子^[1]. AGT主要在肝脏合成, 其合成不仅受多种激素调节, 更主要的是受基因转录水平的调控. 位于AGT基因的第二外显子的M235T变异与多种疾病相关, 如原发性高血压、冠心病、心肌梗死、肾病、

■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

心血管疾病等^[2-6]。近期研究发现, 组织局部肾素-血管紧张素系统的激活与肝纤维化的发生有关^[7-8]。因此, 本研究通过对AGT基因M235T分子变异分析, 试图探讨慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染后AGT基因突变与肝硬化发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-06/2005-12北京地坛医院住院的慢性HBV感染后肝硬化患者64例, 年龄40±10岁, 其中男45例, 女19例。正常人全血标本62例, 年龄35±10岁, 其中男35例, 女27例。患者的诊断符合2000年西安第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》中的相关标准。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取: 人基因组DNA样品取自实验对象外周血。采用全血基因组DNA提取试剂盒(北京华美生物公司)提取白细胞基因组DNA, -2℃放置, 备用。

1.2.2 DNA片段的扩增: 扩增体系含各引物1 μmol/L, dNTP浓度各为200 μmol/L, Mg²⁺浓度为2.0 mmol/L, Taq DNA聚合酶2.5 U, 10×缓冲液2.5 μL(深圳晶美生物工程有限公司), 模板DNA约0.1 μg, 加灭菌去离子水补足体积为25 μL。按下述程序进行DNA扩增反应: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 63.5℃退火30 s, 72℃延伸40 s, 循环35次后于72℃继续延伸7 min。20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察扩增结果。引物序列见表1。

1.2.3 PCR产物的RFLP分析: PCR扩增产物8 μL, 10×缓冲液2 μL, 限制性内切酶12 U, 加灭菌去离子水补足体积至20 μL。酶切反应在37℃进行12 h。酶切产物在3%琼脂糖凝胶电泳。凝胶成像系统仪下观察并保存结果。RFLP分析使用的限制性内切酶见表1。

统计学处理 计数资料组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为组间有显著差异。

2 结果

2.1 PCR扩增 电泳结果显示PCR产物大小与理论设计片段大小基本一致。

2.2 RFLP酶切分析及测序 M235T变异样品经Tth II酶切, 电泳结果显示出现3种带型。带型167 bp为MM纯合型; 带型167 bp, 140 bp为MT杂合型; 带型140 bp为TT纯合型(图1)。PCR产物直接测序结果进一步验证了以上结果。

2.3 AGT M235T 变异与肝硬化相关性分析 实

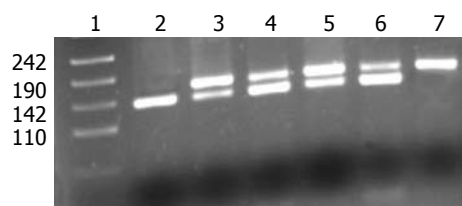


图1 PCR/RFLP电泳结果。1: DNA Marker; 2: TT纯合型; 3-6: MT杂合型; 7: MM纯合型。

验样本基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡。采用 χ^2 统计, 对64例肝硬化样品和62例正常人样品AGT基因M235T多态性进行分析(表2), 发现携带AGT基因(+4027)位点MM、MT、TT基因型的样品数目分别为5(7.8%)、26(40.6%)、33(51.6%)和5(8.0%)、37(59.7%)、20(32.3%), 基因型分布差异没有显著性意义($\chi^2 = 5.120$, $P>0.077$)。M、T等位基因频率分别为28%、72%和38%、62%, 两者之间的差异没有统计学意义($\chi^2 = 2.261$, $P = 0.077$)。

3 讨论

AGT是肾素的唯一底物, 主要在肝脏合成。原位杂交结果显示人AGT基因位于染色体1q42-43。人类AGT cDNA由1455个核苷酸组成, 编码485个氨基酸^[9]。近期研究发现, 组织局部肾素-血管紧张素系统的激活与肝纤维化的发生有关^[7-8]。

我们采用PCR、PCR/RFLP、测序等方法分析肝硬化和正常人血液标本。AGT基因M235T位点MM、MT、TT基因型的频率在慢性HBV感染后的肝硬化组和正常组分别为7.8%、40.6%、51.6%和8.0%、59.7%、32.3%, 两组之间不存在差异($\chi^2 = 5.120$, $P>0.05$)。M、T等位基因频率分别为28%、72%和38%、62%, 两者之间的差异没有统计学意义($\chi^2 = 2.261$, $P>0.05$)。分析表明, HBV感染后肝硬化的形成可能与AGT基因M235T分子变异无关。

近年来, AGT基因多态性对肝硬化形成的影响日益受到关注。Powell *et al*^[10]报道, HCV感染后, AGT(-6)A-G突变的患者往往导致慢性化, 并表现为进行性肝纤维化($P = 0.030$)。近期我们的研究报告也显示, AGT基因核心启动子区域A-6G和A-20C的多态性与HBV感染后肝硬化相关(A-6G, $P = 0.042$; A-20C, $P = 0.007$)。而启动子区的另外2个位点的多态性则与HBV感染后肝硬化的形成无关(AGT-217, $P = 0.615$; AGT-152, $P = 0.170$)^[11]。Forrest *et al*^[12]对195名慢性HCV感染后的肝纤维化患者的AGT基因M235T分子变异分析表明, AGT基因M235T分子变异与

■ 研发前沿

最新的研究表明AGT基因核心启动子区的变异与乙型肝炎感染后的肝硬化相关, 但血管紧张素原基因T174M变异与肝硬化没有显著关系。

■ 相关报道

多项研究表明组织局部肾素-血管紧张素系统的激活与肝纤维化的发生有关。作为肾素-血管紧张素系统的唯一初始底物, AGT基因核心启动子区的变异与乙肝感染后的肝硬化相关, 但血管紧张素原基因外显子T174M变异与肝硬化没有显著关系。

■同行评价

本文探讨AGT基因M235T多态性与HBV相关性肝硬化的关系,对肝硬化形成机制的探讨有一定意义。

表 1 M235T变异分析使用的引物和限制性内切酶

变异位点	引物序列	产物大小(bp)	限制性内切酶
M235T	CCGTTTGTGCAGGGCCTGGCTCTCT CAGGGTGTCTCCACACTGGACCCC	167	Tth II

表 2 AGT基因M235T位点基因型分布及等位基因频率分析

分组	基因型				等位基因频率(%)	
	MM(%)	MT(%)	TT(%)	合计	M	T
肝硬化	5(7.8)	26(40.6)	33(51.6)	64	28	72
对照组	5(8.0)	37(59.7)	20(32.3)	62	38	62
	$\chi^2 = 5.120 \quad P = 0.077$				$\chi^2 = 2.261 \quad P = 0.133$	

HCV感染后的肝纤维化的发展无直接相关性($P>0.05$),这与我们的结果相符。综合以上的研究结果,我们不难发现AGT核心启动子变异的患者更容易发生肝纤维化。

AGT基因核心启动子区域上存在一个顺式作用元件AGCE1,该元件位于TATA盒和转录起始位点之间,对AGT基因转录表达起重要调控作用。AGCE1在激活AGT转录,特别是对下游核心元件激活AGT转录具有增强作用。该区域存在的突变影响AGT基因转录,从而上调AGT基因表达^[13]。血清和组织里的AGT浓度直接影响体内血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I)和Ang II的合成,从而影响肾素-血管紧张素系统激活的程度^[14],并进一步引起肝纤维化的发生^[7-8]。以上也许就是AGT核心启动子变异的患者更容易发生肝纤维化的主要原因。至于其具体作用机制,还需要深入的研究。

4 参考文献

- Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Induction of rat liver angiotensinogen mRNA following acute inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 129: 826-832
- Sethi AA, Nordestgaard BG, Grønholdt ML, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Angiotensinogen single nucleotide polymorphisms, elevated blood pressure, and risk of cardiovascular disease. *Hypertension* 2003; 41: 1202-1211
- Wang JH, Lin CM, Wang LS, Lai NS, Chen DY, Cherng JM. Association between molecular variants of the angiotensinogen gene and hypertension in Amis tribes of eastern Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2002; 101: 183-188
- Chang HR, Cheng CH, Shu KH, Chen CH, Lian JD, Wu MY. Study of the polymorphism of angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme

and angiotensin receptor in type II diabetes with end-stage renal disease in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2003; 66: 51-56

- Xu MQ, Ye Z, Hu FB, He L. Quantitative assessment of the effect of angiotensinogen gene polymorphisms on the risk of coronary heart disease. *Circulation* 2007; 116: 1356-1366
- Jurkovicova D, Sedlakova B, Riecanaky I, Goncalvesova E, Penesova A, Kvetnansky R, Krizanova O. Cardiovascular diseases and molecular variants of the renin-angiotensin system components in Slovak population. *Gen Physiol Biophys* 2007; 26: 27-32
- 魏红山, 李定国, 陆汉明, 展玉涛, 王志荣, 黄新, 徐芹芳, 陈颖伟. 肾素-血管紧张素系统与肝纤维化发生. *中华消化杂志* 2001; 21: 145-147
- 魏红山, 李定国, 陆汉明, 展玉涛, 王志荣, 黄新, 徐芹芳. 血管紧张素 II 对肝星状细胞增殖及胶原合成影响. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 133
- Campbell DJ. Tissue renin-angiotensin system: sites of angiotensin formation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 10 Suppl 7: S1-S8
- Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31: 828-833
- Xiao F, Wei H, Song S, Li G, Song C. Polymorphisms in the promoter region of the angiotensinogen gene are associated with liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1488-1491
- Forrest EH, Thorburn D, Spence E, Oien KA, Inglis G, Smith CA, McCrudden EA, Fox R, Mills PR. Polymorphisms of the renin-angiotensin system and the severity of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2005; 12: 519-524
- Yanai K, Nibu Y, Murakami K, Fukamizu A. A cis-acting DNA element located between TATA box and transcription initiation site is critical in response to regulatory sequences in human angiotensinogen gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 15981-15986
- Cumin F, Le-Nguyen D, Castro B, Menard J, Corvol P. Comparative enzymatic studies of human renin acting on pure natural or synthetic substrates. *Biochim Biophys Acta* 1987; 913: 10-19

编辑 李军亮 电编 何基才

胆管腔内超声对胆管良恶性狭窄的鉴别诊断

李焕喜, 秦鸣放, 王震宇, 王光霞

李焕喜, 秦鸣放, 王震宇, 王光霞, 天津医科大学南开临床学院 天津市南开医院微创外科 天津市 300100

作者贡献分布: 资料收集、总结及论文撰写由李焕喜完成; 超声内镜操作由王震宇与王光霞完成; 王震宇与秦鸣放负责全文理论指导.

通讯作者: 李焕喜, 300100, 天津市, 天津医科大学南开医院, 天津市南开医院微创外科. lhx1hx1101@163.com

电话: 022-27435219

收稿日期: 2009-06-10 修回日期: 2009-07-30

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-28

Evaluation of malignant and benign bile duct strictures by intraductal ultrasonography

Huan-Xi Li, Ming-Fang Qin, Zhen-Yu Wang, Guang-Xia Wang

Huan-Xi Li, Ming-Fang Qin, Zhen-Yu Wang, Guang-Xia Wang, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital; Nankai Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300100, China

Correspondence to: Huan-Xi Li, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital; Nankai Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300100, China. lhx1hx1101@163.com

Received: 2009-06-10 Revised: 2009-07-30

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To determine whether intraductal ultrasonography (IDUS) is of assistance in distinguishing benign from malignant biliary strictures.

METHODS: Sixty-seven patients (all were followed up for 12-36 mo) with biliopancreatic obstruction who underwent the examination of ERCP and IDUS from January 2006 to January 2007 were analyzed, and the difference of imaging diagnosis was compared and the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of IDUS were calculated.

RESULTS: Malignant strictures (37 patients) were confirmed histopathologically and benign stricture (30 patients) was confirmed based on negative pathology plus extended clinical follow-up. Sensitivity, specificity, positive predictive values, negative predictive values and accuracy of IDUS for malignant bile duct strictures

were 89.2%, 77.4%, 82.5%, 88.9% and 85.1%.

CONCLUSION: Intraductal ultrasonography is safe and is of high value in differentiating benign from malignant biliary strictures.

Key Words: Intraductal ultrasonography; Bile duct strictures; Diagnosis

Li HX, Qin MF, Wang ZY, Wang GX. Evaluation of malignant and benign bile duct strictures by intraductal ultrasonography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2515-2517

摘要

目的: 探讨胆管腔内超声对良恶性胆道狭窄的鉴别诊断价值.

方法: 2006-01/2007-01所有在我院行ERCP及IDUS检查的胆道梗阻患者67例(所有患者随访12-36 mo), 对比影像学诊断差异, 计算IDUS的敏感性, 特异性, 阳性预测值, 阴性预测值及准确性.

结果: 手术病理或者细胞学刷检证实为恶性胆管狭窄者共37例, 病理阴性且长期随访证实良性胆管狭窄者共30例, IDUS对胆管恶性狭窄判断的敏感性为89.2%(33/37), 特异性为77.4%(24/31), 阳性预测值为82.5%(33/40), 阴性预测值为88.9%(24/27), 准确性为85.1%(57/67).

结论: 胆管腔内超声是一项安全可靠的技术, 对胆管良恶性狭窄性质的鉴别有较高的价值.

关键词: 胆管腔内超声; 胆管狭窄; 诊断

李焕喜, 秦鸣放, 王震宇, 王光霞. 胆管腔内超声对胆管良恶性狭窄的鉴别诊断. *世界华人消化杂志* 2009; 17(24): 2515-2517
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2515.asp>

0 引言

胆管狭窄的良恶性判断一直是临床诊断的难题, 常用的影像学检查方法对胆管狭窄性质的判断特异性不高. 胆管腔内超声(intraductal ultrasonography, IDUS)是近几年来开展的一

■背景资料

胆管狭窄性质的判断一直是临床上的难题, 尽管有很多方法可以帮助狭窄病因的确定, 但是准确性均不理想. 因此对这类原因不能确定的胆管狭窄患者临床上并没有相应的处理指南, 导致了一些错误的治疗方法得以实施.

■同行评议者

于聪慧, 教授, 中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科; 张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■研究前沿

胆管狭窄性质的临床研究集中在早期准确诊断, 风险评估、手术切除及内镜治疗。多种新技术如IDUS的应用, 极大地提高了诊断的准确性。

种安全有效的诊断胆管狭窄的新方法, 我院2006-01/2007-01采用IDUS鉴别诊断胆管良恶性狭窄, 取得较好的效果, 现总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01/2007-01所有在我院行ERCP及IDUS检查的胆道梗阻患者67例, 男39例, 女28例, 年龄34-87(平均61.1)岁。67例均有不同程度的血胆红素增高, 右上腹疼痛不适, 31例有恶心呕吐, 39例有不同程度发热。全部病例经B超和(或)CT、MRCP及ERCP等影像学检查发现胆管有不同程度狭窄, 但狭窄病因不能确定。

1.2 方法

1.2.1 ERCP及IDUS检查: 按常规ERCP术前准备, 在ERCP诊断的同时行IDUS检查, 将微型超声探头插入胆管内自近端向远端多次扫描狭窄部位。IDUS检查完成后, 根据患者病情完成其余的ERCP操作, 如取石、放置支架或者鼻胆管引流等。

1.2.2 胆管良恶性狭窄的IDUS判定标准: 所有IDUS超声图像均由2位有经验的超声内镜专家解读。恶性胆管狭窄的判断标准为^[1]: 正常胆管壁结构破坏, 管壁可见边缘不规则的低回声肿块, 内部回声不均匀, 浸润至周围组织。良性的判断标准为: 胆管壁3层结构基本完整, 回声均匀, 边缘光滑, 或者呈高回声全层均匀性增厚, 未见明显低回声肿块及血管侵犯征象。

统计学处理 敏感性、特异性、阴性预测值、阳性预测值及诊断准确性的计算公式如下: 敏感性 = 真阳性数/(真阳性数+假阴性数), 特异性 = 真阴性数/(真阴性数+假阳性数), 阴性预测值 = 真阴性数/总阴性数, 阳性预测值 = 真阳性数/总阳性数, 诊断准确性 = (真阳性数+真阴性数)/总例数。

2 结果

所有67例患者中, 其中IDUS判断为恶性者40例, 最终诊断为恶性狭窄者33例(图1A), 1例患者男性91岁, 因黄疸原因待查入院, CT、MRI均未发现占位性病变, ERCP提示胆总管扩张, 胆总管下端狭窄, 细胞刷检查未见恶性细胞, 行IDUS发现胆管远端低回声病变, 后患者行手术治疗, 术后病理证实为1.5 cm的早期十二指肠乳头癌(表1)。7例IDUS判断为恶性最终诊断为良性狭窄的患者中胆管炎性狭窄3例(图1B), 慢性胰腺炎2例, 胆管结石2例。3例IDUS判断为良性最终诊断为恶性的患者中胰腺癌1例, 胆管结石合并胆管癌1例, 胆管癌1例。IDUS对胆管恶性狭窄判断的

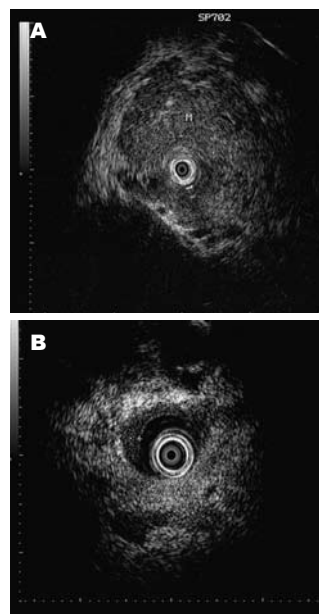


图1 胆管癌和胆管炎性狭窄IDUS观。A: 胆管癌IDUS示胆管壁不均匀低回声团块; B: 胆管炎性狭窄IDUS示胆管壁均匀性增厚。

敏感性为89.2%(33/37), 特异性为77.4%(24/31), 阳性预测值为82.5%(33/40), 阴性预测值为88.9%(24/27), 准确性为85.1%(57/67)。

3 讨论

胆管狭窄性质的判断一直是临床上的难题, 尽管体表超声、CT、MRI对此类疾病的诊断有了极大的提高, 但准确性均不理想^[2]。ERCP结合胆管细胞刷活检可以确诊胆管恶性狭窄, 但是胆管细胞刷的敏感性不高(18%-60%)^[3], 胆管狭窄良恶性的判断对治疗方式的选择和预后有着十分重要的作用, 因此对这类原因不明胆管狭窄的临床处理比较困难, 使得部分良性狭窄患者误为恶性导致不必要的手术治疗, 部分恶性狭窄患者误为良性耽误了最佳手术时机。

IDUS是近几年来开展的一种诊断胆管狭窄的新方法, 他将微型超声探头插入胆管内扫描, 接近病灶减少干扰, 并采用高频探头, 图像分辨力更高, 有利于发现小的病灶, 早期发现胆管癌, 并可对胆管癌进行分期, 较准确地显示肿瘤病变的侵犯深度, 正常胆管壁呈高、低、高3层回声结构, 恶性胆管狭窄的超声图像为正常胆管壁结构破坏, 管壁可见边缘不规则的低回声肿块, 内部回声不均匀, 浸润至周围组织。良性胆管狭窄的超声图像为胆管壁3层结构基本完整, 回声均匀, 边缘光滑; 或者呈高回声全层均匀性增厚, 未见明显低回声肿块及血管侵犯征象。

为了探讨IDUS对胆管狭窄病因的诊断价值, 本研究中对67例有胆管狭窄的患者在进行ERCP的同时行IDUS检查, 根据以往文献报道确定良

■应用要点

本文采用ERCP时行IDUS检查判断胆管狭窄性质, 有一定的创新性, 是目前诊断准确性最高的检查方法, 对临床上治疗和对病期判断有一定的参考性。

表 1 影像学诊断结果 (n)

	手术病理或细胞刷诊断	IUDS	CT	腹部B超	ERCP	MRCP
恶性						
胆管癌	25	27	21	16	18	14
胰头癌	8	8	8	7	—	—
胆囊癌	2	1	2	2	1	2
肝内胆管癌	1	—	1	—	—	—
十二指肠乳头癌	1	1	—	—	—	—
良性						
胆管炎性狭窄	17	16	12	9	24	28
慢性胰腺炎	7	7	6	6	—	—
Mirizzi综合征	2	2	1	1	1	1
十二指肠间质瘤	1	—	1	1	—	—

■名词解释

管腔内超声 (IDUS): 是从内镜活检钳道伸至靶器官, 故直径仅1.8-2.4 mm, 由于此类探头能进行诸如胆、胰管等小管道超声探查, 故称管腔内超声。超声频率12-30 MHz, 分辨率极高, 主要用于表浅病变及小管道(如胆管等)的超声检查。

恶性胆管狭窄的IDUS判断标准。根据这一标准, 在本研究67例胆管狭窄患者中IDUS对胆管恶性狭窄判断的敏感性为89.2%(33/37), 特异性为77.4%(24/31), 阳性预测值为82.5%(33/40), 阴性预测值为88.9%(24/27), 准确性为85.1%(57/67), 准确性高于单纯ERCP(67%)及组织学检查(68%)^[4]。ERCP和MRCP对良恶性胆管狭窄的区分率分别为72%和56%, ERCP结合IDUS诊断胆道恶性狭窄的准确率为85.1%, 与报道类似^[5-6]。Stavropoulos *et al*^[7]在一项前瞻性研究中, 评估了61例胆道狭窄的患者, 其中43例是恶性的, 但在CT上未见肿块。利用IDUS进行检测, 他可以将诊断的准确率由ERCP的58%提高到90%。本研究ERCP诊断的24例良性狭窄患者中, 9例被IDUS证实存在恶性病变。研究中还发现了1例1.5 cm的早期十二指肠乳头癌, 因此IDUS对早期胆道或者壶腹肿瘤的诊断有一定帮助, 甚至在硬化性胆管炎患者中IDUS也可以将其中可能合并的胆管癌诊断出来。Tischendorf *et al*^[8]报道在硬化性胆管炎中IDUS对胆管恶性狭窄的诊断敏感性为87.5%, 特异性为90.6%, 阳性预测值为70.3%, 阴性预测值为96.7%。与其他影像学相比, IDUS在胆道狭窄诊断中具有一定的优势, 他分辨率高, 可以近距离扫描病灶, 是目前诊断良恶性胆管狭窄的首选方法, 并有助于术前判断危险程度和预后, 对治疗方法的选择具有指导作用^[4]。

本研究中ERCP术后胰腺炎的发生率为1.5%(1/67), 为轻型胰腺炎, 经保守治疗后好转, 无出血、穿孔等并发症发生。因此在ERCP时进行IDUS检查是一项安全可靠的方法, 并不增加ERCP的并发症。

4 参考文献

- 1 Tamada K, Ueno N, Tomiyama T, Oohashi A, Wada S, Nishizono T, Tano S, Aizawa T, Ido K, Kimura K. Characterization of biliary strictures using intraductal ultrasonography: comparison with percutaneous cholangioscopic biopsy. *Gastrointest Endosc* 1998; 47: 341-349
- 2 Tanțău M, Pop T, Badea R, Spirchez Z, Moăteanu O, Tantau A. Intraductal ultrasonography for the assessment of preoperative biliary and pancreatic strictures. *J Gastrointest Liver Dis* 2008; 17: 217-222
- 3 Fogel EL, deBellis M, McHenry L, Watkins JL, Chappo J, Cramer H, Schmidt S, Lazzell-Pannell L, Sherman S, Lehman GA. Effectiveness of a new long cytology brush in the evaluation of malignant biliary obstruction: a prospective study. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 71-77
- 4 Vazquez-Sequeiros E, Baron TH, Clain JE, Gostout CJ, Norton ID, Petersen BT, Levy MJ, Jondal ML, Wiersema MJ. Evaluation of indeterminate bile duct strictures by intraductal US. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 372-379
- 5 Domagk D, Wessling J, Reimer P, Hertel L, Poremba C, Senninger N, Heinecke A, Domschke W, Menzel J. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography, intraductal ultrasonography, and magnetic resonance cholangiopancreatography in bile duct strictures: a prospective comparison of imaging diagnostics with histopathological correlation. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1684-1689
- 6 Menzel J, Poremba C, Dietl KH, Domschke W. Preoperative diagnosis of bile duct strictures--comparison of intraductal ultrasonography with conventional endosonography. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 77-82
- 7 Stavropoulos S, Larghi A, Verna E, Battezzati P, Stevens P. Intraductal ultrasound for the evaluation of patients with biliary strictures and no abdominal mass on computed tomography. *Endoscopy* 2005; 37: 715-721
- 8 Tischendorf JJ, Meier PN, Schneider A, Manns MP, Kruger M. Transpapillary intraductal ultrasound in the evaluation of dominant bile duct stenoses in patients with primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1011-1017

■同行评价

本文探讨了胆管腔内超声在胆管良恶性狭窄性质鉴别诊断中的应用价值, 对临床上治疗和对病期的判断有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

RKIP在胆囊癌中的表达及临床意义

谈 焱, 孟海萍, 吴斌全, 吴浩荣

■背景资料

原发性胆囊癌的发病率在消化系统肿瘤中占第5位, 死亡率占第9位, 其恶性程度高, 起病隐匿, 早期诊断不易, 且容易合并周围脏器侵犯和淋巴转移, 临床治疗效果差。近年来, 其发病率有上升的趋势。虽然临床诊断技术不断进步, 胆囊癌检出率逐年升高, 但是总体诊断率仍然低下。为此, 人们必须寻找更加精确、有效的分子标志物, 以期早期发现肿瘤。

谈焱, 吴浩荣, 苏州大学附属第二医院普外科 江苏省苏州市 215004

孟海萍, 吴斌全, 蚌埠医学院附属第一医院检验科 安徽省蚌埠市 233004

作者贡献分布: 此课题由谈焱与吴浩荣共同设计; 研究过程由谈焱, 孟海萍及吴斌全共同完成; 数据分析与论文写作由谈焱完成。

通讯作者: 吴浩荣, 教授, 215004, 江苏省苏州市, 苏州大学附属第二医院普外科。tmjtx2009@163.com

电话: 0512-67783303

收稿日期: 2009-06-29 修回日期: 2009-08-14

接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-08-28

Expression of RKIP and its clinical significance in gallbladder carcinoma

Yi Tan, Hai-Ping Meng, Bin-Quan Wu, Hao-Rong Wu

Yi Tan, Hao-Rong Wu, Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 210029, Jiangsu Province, China

Hai-Ping, Meng, Bin-Quan Wu, Department of Clinical Laboratory, First Hospital Affiliated to Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China

Correspondence to: Hao-Rong Wu, Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. tmjtx2009@163.com

Received: 2009-06-29 Revised: 2009-08-14

Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of Raf kinase inhibitory protein (RKIP) in gallbladder carcinoma and to explore its possible relationship with clinicopathological parameters and prognosis of gallbladder carcinoma.

METHODS: RKIP expression was examined by streptavidin peroxidase immunohistochemical method on paraffin-embedded tissue specimens from 50 patients with gallbladder cancer and 38 with chronic cholecystitis who underwent surgical treatment between January 2006 and June 2009 in Suzhou University. None of these patients received preoperative treatment, and detailed clinicopathological information was provided.

RESULTS: The positive expression rate of RKIP in gallbladder carcinoma was significantly high-

er than in chronic cholecystitis, with statistically significant difference (74.0% vs 0.8%, $P < 0.01$). In gallbladder carcinoma, the expression of RKIP had no correlation with age, gender, histologic type and gallbladder stone ($P > 0.05$), but overexpression of RKIP correlated significantly with lower histological grading (31.8% vs 92.3%, $P < 0.05$), lymph node or distant metastasis (75.0% vs 100.0%, $P < 0.05$), and shorter survival after operation (50.0% vs 93.8%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: RKIP is overexpressed in development of gallbladder carcinoma. RKIP may play an important role in tumor progression of human gallbladder carcinoma.

Key Words: Gallbladder carcinoma; Raf kinase inhibitory protein; Immunohistochemistry

Tan Y, Meng HP, Wu BQ, Wu HR. Expression of RKIP and its clinical significance in gallbladder carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2518-2521

摘要

目的: 探讨胆囊癌中Raf激酶抑制蛋白(RKIP)的表达状况及其与胆囊癌临床病理指标和预后的可能关系。

方法: 2006-01/2009-06苏州大学附属第二医院胆囊癌患者50例, 外科手术切除术后病理证实的存档组织蜡块。所有病例术前未进行放化疗, 有完整的临床病理资料。采用免疫组织化学Elivision Plus法, 对50例原发性胆囊癌与38例慢性胆囊炎组织中RKIP表达进行检测。

结果: 在胆囊癌组织中表达的阳性率明显高于慢性胆囊炎组织, 差异有统计学意义(74.0% vs 0.8%, $P < 0.01$)。RKIP表达水平与胆囊癌患者年龄、性别、组织学类型及是否伴有结石等因素均无明显关系($P > 0.05$), 但RKIP高表达与胆囊癌的低分级(31.8% vs 92.3%, $P < 0.05$)、淋巴结或远处转移(75.0% vs 100.0%, $P < 0.05$)以及术后生存时间减少(50.0% vs 93.8%, $P < 0.05$)有明显关系。

结论: RKIP在胆囊癌中高表达可能提示其在

■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

胆囊癌的发生、发展中起重要作用。

关键词: 胆囊肿瘤; Raf激酶抑制蛋白; 免疫组织化学法

谈臻, 孟海萍, 吴斌全, 吴浩荣. RKIP在胆囊癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2518-2521

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2518.asp>

0 引言

Raf激酶抑制蛋白(raf kinase inhibitor protein, RKIP)广泛存在于各种不同的生物中, 1999年Yeung *et al*^[1]发现其可以与Raf-1结合, 从而抑制Raf-1/MEK/ERK信号通路, 将其命名为RKIP, 进一步研究发现RKIP还参与了对核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路和G蛋白偶联受体信号通路的调控. 2003年Fu *et al*^[2]发现RKIP可以抑制肿瘤细胞转移, 使其成为抗肿瘤领域一个新的热点. 我们采用免疫组织化学法分析了胆囊癌组织中RKIP的表达及其与临床病理指标和预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01/2009-06苏州大学附属第二医院胆囊癌患者50例, 男20例, 女30例; 年龄30-76岁, 其中>60岁32例, <60岁18例. 外科手术切除术后病理证实的存档组织蜡块. 所有病例术前未进行放化疗, 有完整的临床病理资料. 组织学类型: 腺癌43例, 腺鳞癌3例, 鳞癌4例. 病理分级: 高分化(I级)11例, 中分化(II级)23例, 低分化(III级)16例. 按Nevin临床分期: I期1例, II期7例, III期12例, IV期11例, V期19例. 根据术中探查及病理报告结果: 有淋巴结或远处转移30例, 无转移20例. 合并有胆囊结石25例, 无结石25例. 另外选取38例慢性胆囊炎组织标本作为对照组; 即用型兔抗人RKIP多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 广谱型Elivision Plus试剂盒、DAB显色剂(均购自福州迈新生物技术有限公司).

1.2 方法

1.2.1 随访患者: 通过电话调查、信件随访及入户调查的方式了解50例胆囊癌患者从手术之日起1年内是否存活、存活时间及其死亡原因。

1.2.2 免疫组织化学染色: 将每例石蜡块用组织切片机做成4 μ m厚的连续组织切片4张, 1张作苏木精-伊红(HE)染色, 余作免疫组织化学染色. 以已知正常乳腺组织阳性切片作阳性对照, 以

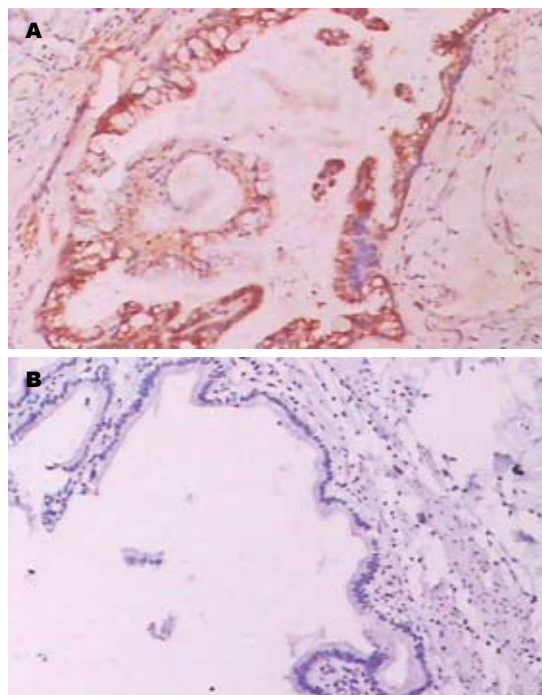


图1 组织中RKIP表达(magnification $\times 100$). A: 胆囊癌组织中强阳性; B: 胆囊炎组织中阴性.

PBS代替一抗作为阴性对照. RKIP采用柠檬酸微波抗原修复方法, 免疫组织化学染色具体步骤按Elivision Plus试剂盒说明书进行操作, 以胞质或胞膜出现棕黄色颗粒视为阳性细胞, 结果判断根据Hao *et al*^[3]的方法.

统计学处理 应用SPASS13.0统计软件进行分析. χ^2 检验分析 $P < 0.05$ 表明有显著性差异.

2 结果

2.1 随访患者 50例中有25例获得完整随访资料, 结果存活1年以上的有8例, 1年内死于肿瘤者16例, 1年生存率为32.0%.

2.2 胆囊良恶性病变组织中RKIP的表达 RKIP阳性染色主要位于胞质. 慢性胆囊炎和胆囊癌患者组织中RKIP阳性表达与表达率分别为37/50和3/38与0.8%和74.0%, 胆囊癌组与慢性胆囊炎组差异有统计学意义($\chi^2 = 38.05$, $P < 0.01$). RKIP主要位于胞质(图1).

2.3 RKIP表达与胆囊癌临床病理参数 RKIP表达随着癌组织病理分级的增高, 阳性表达率逐渐增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 有淋巴结或远处转移组的阳性表达率明显高于无转移组($P < 0.05$); 术后1年内死亡组的阳性率亦高于术后生存期超过1年组($P < 0.05$). 但RKIP表达与胆囊癌患者年龄、性别、组织学类型以及是否伴有结石等因素无明显相关性(表1).

■研究前沿

RKIP可以抑制肿瘤细胞转移, 使其成为抗肿瘤领域一个新的热点. 本研究采用免疫组织化学法分析了胆囊癌组织中RKIP的表达及其与临床病理指标和预后的关系.

■相关报道

多数的研究发现, RKIP的表达在正常组织中高于肿瘤组织中, 在肿瘤组织中原发灶高于转移灶, RKIP的低表达或缺失的肿瘤转移性、侵袭性强, 预后差. 故认为RKIP是肿瘤转移抑制基因.

■创新盘点

本研究首次发现胆囊癌组织中RKIP的表达明显高于胆囊良性组织。RKIP高表达与胆囊癌的低分级、淋巴结或远处转移以及术后生存时间减少有明显关系,表明RKIP具有潜在致癌活性。RKIP有可能是胆囊癌的一个新的治疗靶点。

表 1 胆囊癌临床病理参数与RKIP表达的关系

临床病理参数	PEBP1阳性表达(%)	χ^2 值	P值
性别			
男	16/18(88.9)	0.09	>0.05
女	29/32(90.6)		
年龄(岁)			
<60	18/20(90.0)	0.23	>0.05
≥60	27/30(90.0)		
组织学类型			
腺癌	39/43 (90.7)	0.01	>0.05
非腺癌	5/7(71.4)		
是否伴有结石			
有结石	21/25(84.0)	0.89	>0.05
无结石	24/25(96.0)		
病理分级			
I 级	4/11(31.8)		<0.05
II - III 级	36/39(92.3)		
Nevin临床分期			
I - II 期	4/7(57.1)		0.048 ¹
III - V 期	39/43(95.3)		
淋巴结或远处转移			
有转移	30/30(100.0)	5.79	<0.05
无转移	15/20(75.0)		
术后生存时间(年)			
<1	15/16(93.8)		0.028 ¹
≥1	4/8(50.0)		

¹: 使用确切概率法。

3 讨论

原发性胆囊癌的发病率在消化系肿瘤中占第5位,死亡率占第9位,其恶性程度高,起病隐匿,早期诊断不易,且容易合并周围脏器侵犯和淋巴转移,临床治疗效果差^[4]。近年来,其发病率有上升的趋势。虽然临床诊断技术不断进步,胆囊癌检出率逐年升高,但是总体诊断率仍然低下。为此,我们必须寻找更加精确、有效的分子标志物,以期早期发现肿瘤。

最近研究发现RKIP能抑制前列腺癌^[2]、肺癌^[5]、肝癌^[6]等多种恶性肿瘤转移,其具体机制可能与抑制Raf-1/MEK/ERK或NF- κ B信号转导途径有关。Fu *et al*^[2]用免疫组织化学方法检测发现前列腺癌患者原发病灶的病理标本中有RKIP的表达,但在转移前列腺的病理标本无RKIP的表达;进一步对转染了含RKIP cDNA的质粒的LNCaP和C4-2B细胞进行研究,发现在体外RKIP的表达与前列腺癌细胞的浸润呈负相关:在转移的肿瘤细胞中增加RKIP的表达,能减弱体外浸润能力,而在非转移的癌细胞中减少RKIP表

达能增强他们的体外浸润。Hagan *et al*^[5]检测了103例乳腺癌患者的病理标本中的RKIP,发现在乳腺癌的原发病灶中有一定表达, RKIP的表达与乳腺癌的类型、分化程度、肿瘤大小、ER的表达无关,但在转移淋巴结中低表达或无表达。Lee *et al*^[6]发现RKIP在肝癌中的表达明显低于邻近的正常肝组织,增加RKIP的表达可以减少肝癌细胞的增殖和迁移。相似的结果亦见于肺癌及黑色素瘤的研究^[7-8]。目前,多数的研究发现^[9-10]: RKIP的表达在正常组织中高于肿瘤组织中,在肿瘤组织中原发灶高于转移灶, RKIP的低表达或缺失的肿瘤转移性、侵袭性强,预后差。故认为RKIP是肿瘤转移抑制基因。但亦有相反的研究结果, Zhu *et al*^[11]发现RKIP具有促进细胞迁移的作用。他们在对狗肾传代细胞(madin-darby canine kidney, MDCK)上皮细胞进行研究时发现, RKIP是细胞迁移抑制因子locostatin的底物。迄今发现locostatin是唯一的RKIP抑制因子,他可以破坏RKIP结合并抑制Raf-1激酶的能力。siRNA介导的RKIP表达沉默可减弱细胞迁移率,而过表达RKIP则导致细胞呈现高迁移的表型,并降低了对locostatin的敏感性,在MDCK上皮细胞中过表达RKIP能促进细胞迁移。Zhang *et al*^[12]报道RKIP能抑制胰小岛 β 细胞的增殖,抑制细胞周期的进程。RKIP还能促进肿瘤细胞凋亡^[13]。这些不同的实验结果表明RKIP可能在调控细胞迁移中存在不同作用方式,可能是依赖不同的上下游因子,从而导致了RKIP在不同的肿瘤类型中通过不同的方式促进或者抑制肿瘤的浸润和转移。

本研究首次应用免疫组织化学方法发现胆囊癌组织中RKIP的表达明显高于胆囊良性组织。RKIP高表达与胆囊癌的低分级、淋巴结或远处转移以及术后生存时间减少有明显关系($P<0.05$),表明RKIP具有潜在致癌活性。RKIP有可能是胆囊癌的一个新的治疗靶点。鉴于RKIP广泛的生物学效应及在肿瘤生长及转移中的重要作用,我们正在对其在胆囊癌中的作用机制进行进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 1999; 401: 173-177
- 2 Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, Keller ET. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer

- metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 878-889
- 3 Hao XP, Willis JE, Pretlow TG, Rao JS, MacLennan GT, Talbot IC, Pretlow TP. Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions. *Cancer Res* 2000; 60: 18-21
 - 4 Kumar S, Masood N, Shaikh AJ, Valimhammad AT, Haider G, Lal A, Niamatullah N. Clinical presentation and outcomes of patients with biliary malignancies: the Aga Khan University experience. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009; 10: 463-466
 - 5 Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, Oien K, Ferrier R, Gusterson B, García JJ, Kolch W. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7392-7397
 - 6 Lee HC, Tian B, Sedivy JM, Wands JR, Kim M. Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology* 2006; 131: 1208-1217
 - 7 韩海勃, 张志谦, 赵威. RKIP蛋白在多个肺癌细胞系中的表达下调. *基础医学与临床* 2007; 27: 849-852
 - 8 Houben R, Vetter-Kauczok CS, Ortmann S, Rapp UR, Broecker EB, Becker JC. Phospho-ERK staining is a poor indicator of the mutational status of BRAF and NRAS in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2003-2012
 - 9 Zeng L, Imamoto A, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 1275-1287
 - 10 Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, Hammond SM, Minn AJ, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J* 2009; 28: 347-358
 - 11 Zhu S, Mc Henry KT, Lane WS, Fenteany G. A chemical inhibitor reveals the role of Raf kinase inhibitor protein in cell migration. *Chem Biol* 2005; 12: 981-991
 - 12 Zhang L, Fu Z, Binkley C, Giordano T, Burant CF, Logsdon CD, Simeone DM. Raf kinase inhibitory protein inhibits beta-cell proliferation. *Surgery* 2004; 136: 708-715
 - 13 Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, Beach S, Mott S, Roy R, Braastad C, Sun Y, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB, Darnowski J, Pantazis P, Wyche J, Fu Z, Kitagawa Y, Keller ET, Sedivy JM, Yeung KC. RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 17515-17523

■同行评价

本研究选题尚可, 对临床医师有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 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 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 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_2 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B₁、维生素B₂、维生素B₆、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B₁₂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 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 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_2 , 50 mL/L CO_2 ; 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 = 45×10^{-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. (科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

JDP2与胰腺癌侵袭及转移的相关性

汪海洋, 许元鸿, 郭克建

■背景资料

JDP2作为AP-1的家族成员之一, 自身以及c-Jun、JunB、JunD或ATF-2形成二聚体, 是一种广泛的AP-1抑制蛋白, 在细胞凋亡, 细胞分化等方面发挥重要作用。近些年研究表明JDP2可能与肿瘤的发生发展相关, 但至今尚无JDP2与胰腺癌关系的研究。

汪海洋, 许元鸿, 郭克建, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠胰外科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 此课题由许元鸿与郭克建设计; 研究过程由汪海洋操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由许元鸿提供; 数据分析由汪海洋与许元鸿完成; 本论文写作由汪海洋、许元及郭克建完成。

通讯作者: 许元鸿, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠胰外科. yuanyhongxu@hotmail.com
电话: 024-23252624

收稿日期: 2009-06-01 修回日期: 2009-07-31

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-28

Relationship of JDP2 with invasion and metastasis of pancreatic cancer

Hai-Yang Wang, Yuan-Hong Xu, Ke-Jian Guo

Hai-Yang Wang, Yuan-Hong Xu, Ke-Jian Guo, Department of Pancreatic and Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yuan-Hong Xu, Department of Pancreatic and Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yuanyhongxu@hotmail.com

Received: 2009-06-01 Revised: 2009-07-31

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To investigate the expression and the clinical pathological significance of JDP2 protein in pancreatic cancer.

METHODS: The expression of JDP2 protein in 36 pancreatic cancer tissues and matched non-cancerous adjacent tissues were detected by Western blot. The association between the expression of JDP2 protein and the prognosis of patients were analyzed by Log-rank test.

RESULTS: The expression of JDP2 protein significantly decreased in pancreatic cancer compared with the matched non-cancerous adjacent tissues (0.287 ± 0.052 vs 0.517 ± 0.172 , $P < 0.05$). The expression of JDP2 protein was closely associated with tumor size, histological type, invasion degree, lymph node metastasis, distant metastasis and clinical stage ($P < 0.05$). The survival time of the patients with low JDP2 expression significantly shortened ($P < 0.01$).

CONCLUSION: JDP2 may be closely associated with the proliferation, invasion, metastasis and prognosis of pancreatic cancer.

Key Words: Jun dimerization protein 2; Pancreatic cancer; Western blot

Wang HY, Xu YH, Guo KJ. Relationship of JDP2 with invasion and metastasis of pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2522-2525

摘要

目的: 探讨JDP2蛋白在胰腺癌组织中的表达及其与胰腺癌临床病理特征的关系。

方法: 利用Western blot检测36例胰腺癌手术切除标本与对应的癌旁胰腺组织中JDP2蛋白的表达。用Log-rank检验分析JDP2蛋白表达与预后的关系。

结果: JDP2在胰腺癌中的表达与对应癌旁胰腺组织相比显著下降(0.287 ± 0.052 vs 0.517 ± 0.172 , $P < 0.05$)。JDP2在胰腺癌中的表达与肿瘤大小、病理分级、肿瘤累及范围、淋巴结转移、远处转移和临床分期有明显差异($P < 0.05$)。胰腺癌中JDP2的表达水平下降时, 术后生存时间明显缩短($P < 0.01$)。

结论: JDP2可能与胰腺癌的增殖、侵袭、转移及预后密切相关。

关键词: Jun二聚化蛋白2; 胰腺癌; 蛋白印迹法

汪海洋, 许元鸿, 郭克建. JDP2与胰腺癌侵袭及转移的相关性. *世界华人消化杂志* 2009; 17(24): 2522-2525
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2522.asp>

0 引言

Jun二聚化蛋白2(jun dimerization protein 2, JDP2)由163个氨基酸组成, 并含有一个碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)结构, 是转录因子活化蛋白1(activator protein-1, AP-1)家族成员之一, 由c-Jun作为结合蛋白分离^[1]。JDP2可以和自身以及c-Jun、JunB、JunD或ATF-2形

■同行评议者

郝纯毅, 主任医师, 北京肿瘤医院肿瘤外科; 巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科

成二聚体, 并可以抑制Jun、c-Fos和ATF-2等的转录活性, 显示JDP2是一种广泛的AP-1抑制蛋白^[1-2]. AP-1是由Jun, Fos或ATF蛋白系列所构成的二聚体, 其功能涉及细胞周期调节, 细胞分化, 凋亡及肿瘤的发生等方面^[3-5]. 研究表明, JDP2作为AP-1的抑制蛋白在UV诱导的细胞凋亡, 细胞分化以及肿瘤的发生过程中起重要作用. 但目前为止, 研究JDP2与胰腺癌的关系尚不清楚^[6-7]. 本文通过临床标本的检测, 证实JDP2可能在胰腺癌的侵袭和转移中发挥重要作用.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2000-02/2003-12中国医科大学附属第一医院36例胰腺癌手术切除标本和对应的癌旁胰腺组织, 所有标本均经病理证实. 胰腺癌患者中, 男23例, 女13例, 年龄50-76(平均62.4)岁. 临床分期采用1987年国际抗癌协会(UICC)的TNM分期: I期7例, II期10例, III期11例, IV期8例. 所有患者均随访至2008-12, 并记录生存时间. 获取组织后, 立即切块并快速液氮冻存, 保存在-80℃冰箱中. 研究与患者签署知情同意书.

1.2 方法 200 mg组织加入800 μL的蛋白裂解液(50 mmol/L Tris2 HCl, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% SDS, 每10 mL加入一片蛋白酶抑制剂), 充分组织匀浆裂解后, 经4℃、12 000 g离心20 min, 取上清液并测定蛋白浓度. 取80 μg蛋白与上样缓冲液混合, 煮沸5 min, 置于SDS变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 蛋白通过湿转过夜转移到PVDF膜, 1% BSA封闭4 h后与1:500的羊抗人JDP2多克隆抗体(Santa Cruz公司)于4℃反应过夜, 另用1:10 000的鼠抗人GAPDH mAb(上海康成公司), 作为内参. 加入相应的二抗, 室温下孵育2 h. 抗体检测按试剂盒说明书进行(Amersham公司). 结果经过计算机扫描后定量分析.

统计学处理 使用SPSS13.0软件包进行统计学分析. 组间差异用Mann-Whitney检验. 以JDP2蛋白含量(癌/癌旁)0.56倍为分界值, 将36例胰腺癌患者分成高表达组和低表达组各18例. 各组术后生存以Kaplan-Meier曲线表示, 用Log-rank检验比较两组间差异. $P<0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 JDP2在胰腺癌组织中的表达 Western blot检测JDP2蛋白在胰腺癌及其对应癌旁组织中的表

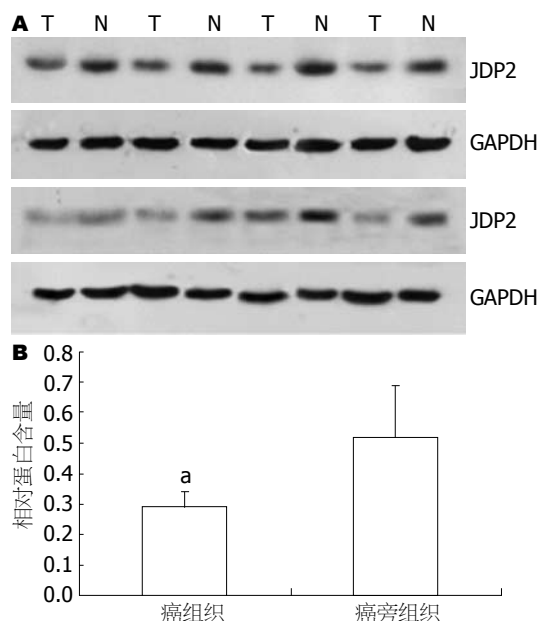


图1 JDP2在胰腺癌组织中的表达. A: Western blot检测JDP2在胰腺癌及其对应癌旁组织中的表达, 具有代表性的8例; B: JDP2在胰腺癌组织中的相对蛋白含量; T: 胰腺癌组织; N: 对应的癌旁组织. * $P<0.05$ vs 癌旁组织.

达, 发现JDP2在胰腺癌中的表达显著下降. JDP2蛋白在胰腺癌中的相对含量为 0.287 ± 0.052 , 在对应的癌旁胰腺组织中的相对含量为 0.517 ± 0.172 , 两组进行比较差异有统计学意义($P<0.05$, 图1).

2.2 胰腺癌组织中的JDP2表达与临床病理特征的关系 利用JDP2在癌组织与对应癌旁组织的表达比值代表该病例的JDP2含量. 统计学分析胰腺癌组织中的JDP2表达与临床病理特征的关系, JDP2在胰腺癌中的表达与年龄、性别及肿瘤部位无明显差异($P>0.05$), 与肿瘤大小、病理分级、肿瘤累及范围、淋巴结转移、远处转移和临床分期有明显差异(Mann-Whitney检验, $P<0.05$, 表1).

2.3 JDP2在胰腺癌中的表达与术后生存时间的关系 将胰腺癌中JDP2的表达水平与术后生存时间进行分析, 发现该蛋白的表达水平和癌旁组织相比降低至0.56倍以下时, 术后生存时间明显缩短($P<0.01$, 图2).

3 讨论

胰腺癌作为临床上较常见的消化系统恶性肿瘤, 早期即可局部或远处转移, 大部分患者都无法获得根治性治疗, 预后很差^[8-9]. 深入阐明胰腺癌侵袭和转移的分子机制, 在胰腺癌的诊断和治疗中具有重要的临床意义.

■ 相关报道

Heinrich *et al*发现, 在他们检测的53例取自7种不同类型恶性肿瘤的标本中, JDP2的表达水平在35.8%的癌组织标本呈不同程度下降, 而只有在5.8%的样品显示相反的结果, 提示JDP2很可能具有抑癌作用.

■创新盘点

本文探讨JDP2在胰腺癌组织中的表达情况及其与胰腺癌临床病理特征的关系,为胰腺癌治疗提供新的靶点和预后标志物。

表 1 胰腺癌组织中的JDP2表达与临床病理特征的关系

分组	n	JDP2含量(癌/癌旁)	P值
年龄(岁)			
<60	19	0.58 ± 0.23	0.326
≥60	17	0.54 ± 0.22	
性别			
男	23	0.57 ± 0.18	0.416
女	13	0.52 ± 0.28	
肿瘤部位			
胰头	28	0.59 ± 0.32	0.299
胰体尾	8	0.48 ± 0.21	
病理分级			
高分化	18	0.72 ± 0.30	0.042
中低分化	28	0.26 ± 0.12	
肿瘤大小(cm)			
<2.5	12	0.82 ± 0.49	0.023
≥2.5	24	0.43 ± 0.21	
肿瘤累及范围			
T ₁ -T ₂	25	0.69 ± 0.25	0.021
T ₃ -T ₄	11	0.27 ± 0.12	
淋巴结转移			
N ₀	26	0.67 ± 0.26	0.012
N ₁	10	0.26 ± 0.11	
远处转移			
M ₀	30	0.62 ± 0.37	0.020
M ₁	6	0.25 ± 0.12	
临床分期			
I-II	17	0.76 ± 0.33	0.013
III-IV	19	0.38 ± 0.17	

Heinrich *et al*发现,在他们检测的53例取自七种不同类型恶性肿瘤的标本中,JDP2的表达水平在35.8%的癌组织标本呈不同程度下降,而只有在5.8%的样品显示相反的结果,提示JDP2很可能具有抑癌作用^[10]。而JDP2在胰腺癌中的表达研究,国内外未见报道。在本研究中,我们利用Western blot检测JDP2在胰腺癌组织中的表达情况,结果表明JDP2与邻近的癌旁组织相比,蛋白表达水平明显下降。通过统计学分析发现JDP2的表达与肿瘤大小、病理分级、肿瘤累及范围、淋巴结转移、远处转移和临床分期明显相关。这些结果提示JDP2可能与胰腺癌的增殖、侵袭和转移密切相关。胰腺癌的发生发展与某些癌基因的激活和抑癌基因的失活以及与诸多生长因子和细胞因子的异常表达有关^[11-12],在这些诸多因素中,JDP2很可能作为抑癌基因与Ras, P16, 转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β), 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及白介素

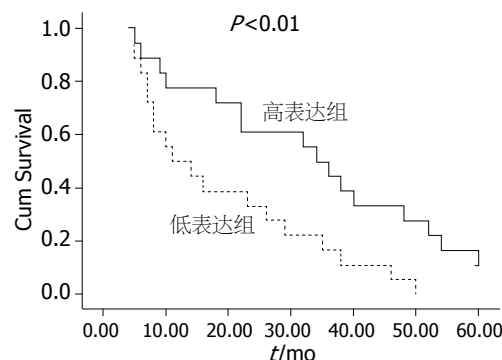


图 2 JDP2在胰腺癌组织中的蛋白表达与术后生存率的关系。以JDP2蛋白含量(癌/癌旁)0.56倍为分界值,将36例胰腺癌患者分成高表达组和低表达组各18例。

-8(interleukin-8, IL-8)的调控有关。Heinrich *et al*发现JDP2能够明显抑制由Ras诱导的NIH3T3细胞的转化^[10];另外,在人角质细胞JDP2可以抑制由Ras和TGF- α 协同引起的上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT),而EMT被认为与肿瘤细胞的高侵袭性有关^[13]。在前列腺癌细胞系,外源JDP2可通过减少c-Jun诱导JunB的表达,从而抑制前列腺癌细胞的增殖^[11]。由于JunB能够增加P16的表达^[14],JDP2有可能通过调节JunB来维持P16的正常表达。研究表明,在胰腺癌细胞系低pH环境可诱导IL-8的持续表达增高,而如果去除IL-8基因调节区域中的AP-1结合序列,其表达就没有改变,说明AP-1是IL-8的关键调控蛋白^[15]。这一结果提示,作为AP-1的抑制蛋白,JDP2有可能通过抑制IL-8来参与抑制胰腺癌的转移。

除此之外,本研究发现JDP2的表达水平与胰腺癌术后生存时间密切相关。因此JDP2有可能成为胰腺癌预后的标志物。胰腺癌作为一种高度恶性的消化系统肿瘤,进一步阐明JDP2的作用机制和意义可以深入了解胰腺癌恶性生物学行为的机制,进而采取针对性的干预方案。

4 参考文献

- 1 Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, Elledge SJ, Karin M. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3094-3102
- 2 Jin C, Ugai H, Song J, Murata T, Nili F, Sun K, Horikoshi M, Yokoyama KK. Identification of mouse Jun dimerization protein 2 as a novel repressor of ATF-2. *FEBS Lett* 2001; 489: 34-41
- 3 Matthews CP, Colburn NH, Young MR. AP-1 a target for cancer prevention. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 317-324
- 4 Moore-Carrasco R, Busquets S, Figueras M, Palanki M, López-Soriano FJ, Argilés JM. Both AP-1 and NF-kappaB seem to be involved in tumour growth

- in an experimental rat hepatoma. *Anticancer Res* 2009; 29: 1315-1317
- 5 Hasegawa H, Senga T, Ito S, Iwamoto T, Hamaguchi M. A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells. *Exp Cell Res* 2009; 315: 1384-1392
- 6 Lerdrup M, Holmberg C, Dietrich N, Shaulian E, Herdegen T, Jäätelä M, Kallunki T. Depletion of the AP-1 repressor JDP2 induces cell death similar to apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745: 29-37
- 7 Ostrovsky O, Bengal E, Aronheim A. Induction of terminal differentiation by the c-Jun dimerization protein JDP2 in C2 myoblasts and rhabdomyosarcoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 40043-40054
- 8 Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 413-422
- 9 Embuscado EE, Laheru D, Ricci F, Yun KJ, de Boom Witzel S, Seigel A, Flickinger K, Hidalgo M, Bova GS, Iacobuzio-Donahue CA. Immortalizing the complexity of cancer metastasis: genetic features of lethal metastatic pancreatic cancer obtained from rapid autopsy. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 548-554
- 10 Heinrich R, Livne E, Ben-Izhak O, Aronheim A. The c-Jun dimerization protein 2 inhibits cell transformation and acts as a tumor suppressor gene. *J Biol Chem* 2004; 279: 5708-5715
- 11 Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 2007; 56: 1134-1152
- 12 Schneider G, Hamacher R, Eser S, Friess H, Schmid RM, Saur D. Molecular biology of pancreatic cancer--new aspects and targets. *Anticancer Res* 2008; 28: 1541-1550
- 13 Davies M, Robinson M, Smith E, Huntley S, Prime S, Paterson I. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *J Cell Biochem* 2005; 95: 918-931
- 14 Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 859-868
- 15 Ju KD, Yu JH, Kim H, Kim KH. Role of mitogen-activated protein kinases, NF-kappaB, and AP-1 on cerulein-induced IL-8 expression in pancreatic acinar cells. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1090: 368-374

■同行评价

本研究设计合理, 结果可信, 内容具有一定的价值及意义。

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 •

《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: . (科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

炎症性肠病患者肠黏膜白细胞分化抗原-14的表达及意义

吴思梦, 徐德魁, 郑长青

■背景资料

炎症性肠病(IBD)是一组病因不明的慢性肠道炎症性疾病, 其中免疫紊乱在IBD发病机制中起着重要的作用。白细胞分化抗原-14(CD14)是一种特异性巨噬细胞表面标志物, 与LPS结合后激活巨噬细胞获得多种增强活性, 在介导慢性肠道炎症中起着关键作用。

吴思梦, 中国医科大学附属盛京医院输血科 辽宁省沈阳市 110004

徐德魁, 郑长青, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 吴思梦与郑长青对此文所作贡献均等; 此课题由吴思梦与郑长青设计; 研究过程由吴思梦操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由吴思梦提供; 数据分析由徐德魁完成; 本论文写作由吴思梦、徐德魁及郑长青完成。

通讯作者: 郑长青, 主任医师, 教授, 博士生导师, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院消化内科。zhengchangqing88@163.com

电话: 024-96615-75123

收稿日期: 2009-05-24 修回日期: 2009-07-10

接受日期: 2009-07-13 在线出版日期: 2009-08-28

Expression of cluster of differentiation antigen-14 in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease and its implication

Si-Meng Wu, De-Kui Xu, Chang-Qing Zheng

Si-Meng Wu, Blood Bank, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

De-Kui Xu, Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhengchangqing88@163.com

Received: 2009-05-24 Revised: 2009-07-10

Accepted: 2009-07-13 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of CD14 in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease and its relationship with the disease.

METHODS: Specimens from 25 cases of ulcerative colitis (UC) and 15 Crohn's disease (CD) and 20 controls were studied by immunohistochemical staining. The clinical diagnosis of inflammatory bowel disease was confirmed according to the routine radiologic, endoscopic and histologic criteria. All controls had normal colonoscopy, and the mucosal biopsies were histologically normal.

RESULTS: There was expression of CD14 in lamina propria. Percent of positive cells in intestinal mucosa in ulcerative colitis was higher than that in Crohn's disease, but without significant difference ($P > 0.05$). There was significant difference between ulcerative colitis and controls ($t = 4.404, P < 0.01$). Difference was also significant between Crohn's disease and controls ($t = 3.324, P < 0.01$). CD14 was positively related to the disease activity index. There was significant difference among slight, moderate and severe UC ($F = 56.709, P < 0.01$) and as well as among the slight, moderate and severe CD ($F = 12.880, P < 0.01$).

CONCLUSION: CD14 may be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, and its intensity reflects the activity of the disease.

Key Words: CD14; Crohn disease; Ulcerative colitis

Wu SM, Xu DK, Zheng CQ. Expression of cluster of differentiation antigen-14 in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease and its implication. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2526-2529

摘要

目的: 探讨炎症性肠病患者肠黏膜CD14的表达及与该病的关系。

方法: 收集活动性溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者25例及克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者15例; 20例对照来自于非炎症性肠病患者手术切除的正常结肠组织(肠镜及肠黏膜病理组织学检查结果均正常)。炎症性肠病的临床诊断均依据于常规影像学、内镜学及组织学标准。采用免疫组织化学方法检测肠黏膜组织中CD14表达量。

结果: 肠黏膜固有层单个核细胞表达CD14。UC患者CD14阳性细胞百分数高于CD患者, 但二者差异无统计学意义($P > 0.05$); UC患者较正常对照有显著性差异($t = 4.404, P < 0.01$), CD患者较正常对照亦见显著性差异($t = 3.324, P < 0.01$)。CD14的表达与疾病活动度(disease activity index, DAI)相关, UC组轻、中、重度比较有显著性差异($F = 56.709, P < 0.01$); CD

■同行评议者

季国忠, 教授, 南京医科大学第二附属医院消化科

组轻、中、重度比较亦有显著性差异($F = 12.880, P < 0.01$).

结论: CD14参与了炎症性肠病的发病过程, 其表达强度反映了该病的程度.

关键词: CD14; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病

吴思梦, 徐德魁, 郑长青. 炎症性肠病患者肠黏膜白细胞分化抗原-14的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2526-2529
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2526.asp>

0 引言

白细胞分化抗原-14(Cluster of differentiation antigen 14, CD14)是一种特异性巨噬细胞表面标志物, 是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)高亲和受体, 与LPS结合后激活巨噬细胞获得多种增强活性, 如抗微生物活性、细胞因子分泌、抗原递呈等, 在介导慢性肠道炎症中起着关键作用. 本实验对CD14在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者体内表达及与疾病活动性的关系进行研究, 以明确CD14在炎症性肠病发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 病例组选择中国医科大学盛京医院1995-10/2007-04经病理证实的溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)及克罗恩病(Crohn disease, CD)患者, IBD的临床诊断均依据常规影像学、内镜学及组织学标准, 均为活动期. UC组25例, 男13例, 女12例, 平均年龄49.73(13-79)岁, 按照Southerland^[1]疾病活动指数评估, 轻度8例, 中度14例, 重度3例; CD组15例, 男10例, 女5例, 平均年龄55.92(26-66)岁, 按照Harvey和Bradshaw简化标准^[1]评估, 轻度6例, 中度7例, 重度2例. 正常对照20例, 选取非炎症性肠病患者手术切除的正常结肠组织, 男11例, 女9例, 平均年龄45.57(17-67)岁. 病例组及对照组均未患有血液病、过敏性疾病及其他感染性疾病.

1.2 方法 全部蜡块均行4 μm 厚连续切片, 常规脱蜡至水, 室温下30 mL/L过氧化氢去除内源性过氧化物酶, 高温高压修复抗原; 滴加一抗(CD14抗体即用型, 北京中杉公司), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 滴加二抗(即用型通用型, 北京中杉公司), 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封片. 组织切片中显示胞质染为淡黄色至黄棕色者为阳性细胞标志, 凡显色强度与背景无明显差别者

表 1 CD14阳性细胞百分数与UC组DAI的关系

分组	<i>n</i>	阳性细胞百分数(%)
轻	8	1.52 \pm 2.14
中	14	6.16 \pm 1.66
重	3	14.59 \pm 17.02

$F = 56.709, P = 0.000 < 0.01$.

表 2 CD14阳性细胞百分数与CD组DAI的关系

分组	<i>n</i>	阳性细胞百分数(%)
轻	6	0.68 \pm 1.66
中	7	4.61 \pm 2.92
重	2	9.60 \pm 0.31

$F = 12.880, P = 0.001 < 0.01$.

为阴性. 肠黏膜固有层CD14表达以计数1000倍高倍镜下4个视野内平均阳性细胞百分数. 盲法计数并由两人独立判断, 取其平均值.

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件进行 t 检验及One-way Anova检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有意义, 以 $P < 0.01$ 为差异有显著意义.

2 结果

2.1 肠黏膜CD14免疫组化染色 IBD患者肠黏膜固有层细胞阳性为胞质着色; 正常肠黏膜固有层未见阳性细胞(图1). UC患者肠黏膜CD14免疫组织化学染色显示阳性细胞百分数分别从0%-16.55%不等, CD患者中0%-9.38%不等, 正常肠黏膜中均为0. 比较活动期UC、CD患者肠黏膜阳性细胞百分数, 发现UC患者CD14阳性细胞百分数高于CD患者, 但二者差异无统计学意义($t = 1.393, P = 0.175 > 0.05$); UC患者较正常对照有显著性差异($t = 4.404, P = 0.001 < 0.01$), CD患者较正常对照亦见显著性差异($t = 3.324, P = 0.006 < 0.01$).

2.2 CD14阳性细胞百分数在IBD轻、中、重度患者肠黏膜的表达 阳性细胞百分数以mean \pm SD表示; DAI增高, 其表达增强($P < 0.01$, 表1-2).

3 讨论

IBD是一组病因不明的慢性肠道炎症性疾病, 包括UC和CD. IBD发病与环境、感染、遗传、免疫等因素有关. 其中免疫紊乱在IBD发病机制中起着重要的作用^[2]. IBD被认为是由于正常肠道菌群的提呈导致黏膜免疫系统不适当/过度激活

■ 研究前沿

IBD的病因和发病机制尚不清楚, CD14可能在IBD中发挥重要作用. CD14有望控制IBD发作、维持其缓解, 提高IBD患者的生存质量.

■ 相关报道

Rugtveit *et al*发现在活动期IBD肠黏膜固有层巨噬细胞表达CD14增加; Grimm *et al*研究显示, 活动期IBD肠黏膜表达CD14的巨噬细胞占固有层所有单个核细胞的25.1%, 而正常肠黏膜表达CD14的巨噬细胞仅占固有层所有单个核细胞的3.7%.

■创新盘点

本文检测CD14在IBD患者肠黏膜固有层的表达,并在其表达强度与疾病活动度间进行统计学分析,从临床角度探讨CD14在IBD发病机制中的作用。

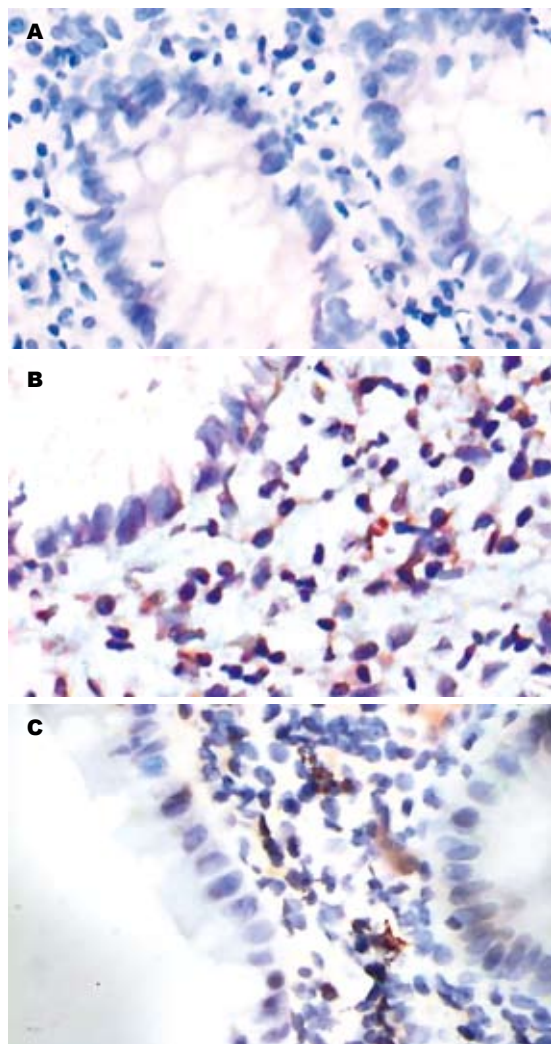


图1 各组患者肠黏膜CD14的表达(免疫组织化学染色 $\times 100$)。A: 正常肠黏膜固有层内未见CD14阳性细胞; B: UC患者肠黏膜固有层可见散在的CD14阳性细胞; C: CD患者肠黏膜固有层内可见散在CD14阳性细胞。

造成的。在这个过程中,免疫活性单核/巨噬细胞通过调节细胞及效应细胞导致并维持慢性炎症。

CD14主要存在于单核/巨噬细胞表面,部分来源于粒细胞。CD14的表达具有相对的组织 and 细胞特异性,而其表达的组织器官特异性与其细胞的组织分布有关,多种因素可以影响CD14的表达。离体单核细胞向巨噬细胞成熟这一过程、多种细胞因子及LPS都会影响CD14的表达。其中以腹腔巨噬细胞高表达,而枯否细胞、肺泡巨噬细胞和小神经胶质细胞均呈低表达。现有文献[3]报道,败血症、外源性过敏性肺炎、急性单核细胞白血病、急性髓单核细胞白血病、冠心病患者血清中CD14水平升高。

血清中存在LPS结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP), LPS与LBP结合形成LPS/LBP复合物,然后与细胞膜上的受体

CD14相互作用, CD14进一步参与存在于细胞膜上的跨膜受体Toll样受体/核因子- κ B(toll-like receptors/nuclear factor- κ B, TLRs/NF- κ B)通路,导致巨噬细胞激活[4]。有研究发现[5],活动性UC和CD的肠黏膜巨噬细胞亚群的表型与正常黏膜的不同,其中包括在CD的肉芽肿及活动性UC组织中发现的RFD9阳性巨噬细胞和3G8阳性巨噬细胞。巨噬细胞激活后,产生TNF2 α 、IL-21、IL-26等多种前炎症细胞因子,导致炎症反应发生,在介导初次免疫应答和炎症反应过程中具有多种作用[6]。其中IL-21在消化系统能调节除增强Th1细胞免疫反应外的其他的炎症路径,并在CD中促进慢性进行性黏膜炎症[7-8]。Cario *et al* [9]发现UC和CD患者整个结肠及回肠末端上皮过度表达TLR4,过量的TLR4会导致NF- κ B过度激活,产生持续扩大的炎症反应,表现为炎症介质的过量表达。目前研究表明[10],TLR4在CD患者回肠末端及UC患者直肠肠黏膜上调,UC患者回肠末端则是TLR2上调。关于基因方面的研究,国外发现[11],IBD与CD14 c.1-260C>T启动子变异相关,而与TLR4 c.896A>G变异无关。

Rugtveit *et al* [12]发现在活动期IBD黏膜固有层巨噬细胞表达CD14增加。也有研究表明[11],活动期及缓解期CD患者回肠末端和UC患者直肠肠黏膜巨噬细胞均高度表达CD14。本研究也证实活动期UC、CD肠黏膜固有层CD14阳性细胞百分数显著高于正常肠黏膜,并且CD14的表达在IBD活动度间有明显差异,病情越重,CD14表达越强。Grimm *et al* [5]研究显示,活动期IBD肠黏膜表达CD14的巨噬细胞占固有层所有单个核细胞的25.1%,而正常肠黏膜表达CD14的巨噬细胞仅占固有层所有单个核细胞的3.7%。本实验对照组正常肠黏膜未见CD14阳性细胞,可能与样本量较少有关。

炎症性肠病传统药物治疗存在很大的局限性,5-氨基水杨酸和柳氮磺胺吡啶被认为是UC的治疗支柱,但对CD患者却不能有效地维持缓解[13]。目前,在IBD的治疗中,新的理念正逐渐形成,其中分子靶标阻断炎症、免疫途径理念取得了较大进展[14]。

Le Roy *et al* [15]研制了一种阻断LPS/LBP复合物与CD14相互作用的抗体,结果显示有效抑制了LPS介导的TNF的产生。而抗CD14 mAb也明显抑制了LPS与鼠巨噬细胞的结合。在CD14参与的IBD免疫发病过程中,阻断CD14的治疗方案有望成为治疗IBD的新手段。

4 参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. 中华消化杂志 2007; 27: 545-550
- 2 Yoon JS, Newton SM, Wysocka M, Troxel AB, Hess SD, Richardson SK, Lin JH, Benoit BM, Kasprzycka M, Wasik MA, Rook AH. IL-21 enhances antitumor responses without stimulating proliferation of malignant T cells of patients with Sézary syndrome. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 473-480
- 3 张葵. CD14的研究进展及临床意义. 临床检验杂志 2003; 21: 367-368
- 4 Gegner JA, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14. *J Biol Chem* 1995; 270: 5320-5325
- 5 Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, Doe WF. Evidence for a CD14⁺ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 291-297
- 6 Hyakushima N, Mitsuzawa H, Nishitani C, Sano H, Kuronuma K, Konishi M, Himi T, Miyake K, Kuroki Y. Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-mediated signaling. *J Immunol* 2004; 173: 6949-6954
- 7 Fina D, Caruso R, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-21 (IL-21) controls inflammatory pathways in the gut. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007; 7: 288-291
- 8 Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 390-400
- 9 Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010-7017
- 10 Frolova L, Drastich P, Rossmann P, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 267-274
- 11 Baumgart DC, Buning C, Geerdts L, Schmidt HH, Genschel J, Fiedler T, Gentz E, Molnar T, Nagy F, Lonovics J, Lochs H, Wiedenmann B, Nickel R, Witt H, Dignass A. The c.1-260C>T promoter variant of CD14 but not the c.896A>G (p.D299G) variant of toll-like receptor 4 (TLR4) genes is associated with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2007; 76: 196-202
- 12 Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997; 112: 1493-1505
- 13 Oldenburg B, Hommes D. Biological therapies in inflammatory bowel disease: top-down or bottom-up? *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 395-399
- 14 冉志华, 沈骏. 炎症性肠病治疗中的新概念. 胃肠病学 2009; 14: 69-73
- 15 Le Roy D, Di Padova F, Tees R, Lengacher S, Landmann R, Glauser MP, Calandra T, Heumann D. Monoclonal antibodies to murine lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) protect mice from lethal endotoxemia by blocking either the binding of LPS to LBP or the presentation of LPS/LBP complexes to CD14. *J Immunol* 1999; 162: 7454-7460

■同行评价

本文探讨了IBD患者肠黏膜白细胞分化抗原-14 (CD14)的表达, 提出CD14参与了IBD免疫发病过程, 对IBD的发病机制研究和临床治疗有一定的指导价值。

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》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

益气通腑逐瘀方灌肠疗法对脓毒症患者肠道黏膜屏障功能的影响

鲁召欣, 高翠翠, 张明, 张众慧, 姜志明, 杨君, 徐拥庆, 李涛, 解建

■背景资料

脓毒症病死率高, 达30%-50%, 已成为临床急危重症患者死亡的主要原因之一。尽管在抗感染、多脏器支持技术等方面有了较大进展, 但其临床死亡率仍然很高。本文就益气通腑逐瘀方灌肠治疗脓毒症的作用机制进行了探讨, 旨在改善目前脓毒症高死亡率的现状。

鲁召欣, 高翠翠, 山东中医药大学临床学院 山东省济南市 250014

张明, 张众慧, 姜志明, 杨君, 徐拥庆, 李涛, 解建, 山东省千佛山医院重症医学科 山东省济南市 250014

作者贡献分布: 解建与鲁召欣对此文所作贡献均等; 此课题由解建与鲁召欣设计; 研究过程由鲁召欣、高翠翠、张明、张众慧、姜志明、杨君、徐拥庆、李涛及解建操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由解建提供; 数据分析由鲁召欣、高翠翠及张明完成; 本论文写作由鲁召欣完成。

通讯作者: 解建, 主任医师, 硕士生导师, 250014, 山东省济南市, 山东省千佛山医院重症医学科。xiejian2509@sina.com
电话: 0531-89268583

收稿日期: 2009-05-23 修回日期: 2009-07-20

接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-28

Effect of Yiqi Tongfu Zhuyu decoction enema therapy on intestinal mucosal barrier function in patients with sepsis

Zhao-Xin Lu, Cui-Cui Gao, Ming Zhang, Zhong-Hui Zhang, Zhi-Ming Jiang, Jun Yang, Yong-Qing Xu, Tao Li, Jian Xie

Zhao-Xin Lu, Cui-Cui Gao, Clinical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China

Ming Zhang, Zhong-Hui Zhang, Zhi-Ming Jiang, Jun Yang, Yong-Qing Xu, Tao Li, Jian Xie, Intensive Care Unit, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, Shandong Province, China

Correspondence to: Jian Xie, Intensive Care Unit, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, Shandong Province, China. xiejian2509@sina.com

Received: 2009-05-23 Revised: 2009-07-20

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To observe the effect of Yiqi Tongfu Zhuyu decoction enema therapy on the intestinal mucosal barrier function in patients with sepsis.

METHODS: Forty cases of sepsis were randomly divided into two groups: the treatment group (20 cases) and the control group (20 cases). Sensitive antibiotics, nutritional support, and mechanical ventilation were administered to both groups if necessary. Combined Yiqi Tongfu Zhuyu enema treatment was given to the treatment group twice a day while normal saline enema was given

to the control group twice a day. Peripheral bacterial DNA fragment was determined before and after treatment with PCR, plasma D-lactic acid level was monitored by spectrophotometry, and the urinary lactulose/mannitol (L/M) values were monitored by HPLC. Occurrence of acute respiratory distress syndrome (ARDS) and multiple organ dysfunction syndrome (MODS) was observed in patients with sepsis.

RESULTS: The D-lactate levels were significantly reduced in the treatment group after 7 and 14 d compared with the control group ($6.04 \pm 1.06 \mu\text{g/L}$ vs $8.83 \pm 0.73 \mu\text{g/L}$; $3.89 \pm 0.86 \mu\text{g/L}$ vs $7.18 \pm 0.90 \mu\text{g/L}$, both $P < 0.01$). Urinary L/M level was significantly lowered 14 d after treatment (0.0499 vs 0.0709 , $P < 0.05$). After treatment, the rate of bacterial DNA negative fragment of treatment group was obviously higher than the control group and ARDS and MODS incidence rate were significantly reduced (74.1% vs 33.3% ; 17.6% vs 50% ; 0% vs 22.2% , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Yiqi Tongfu Zhuyu enema therapy can improve the intestinal mucosa barrier function of the patients with sepsis, and reduce intestinal bacteria and endotoxin translocation, and ARDS/MODS incidence in patients with sepsis.

Key Words: Yiqi Tongfu Zhuyu decoction; Enema therapy; Sepsis; Intestinal mucosa barrier function

Lu ZX, Gao CC, Zhang M, Zhang ZH, Jiang ZM, Yang J, Xu YQ, Li T, Xie J. Effect of Yiqi Tongfu Zhuyu decoction enema therapy on intestinal mucosal barrier function in patients with sepsis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2530-2533

摘要

目的: 观察益气通腑逐瘀方灌肠疗法对脓毒症患者肠道黏膜屏障功能的影响。

方法: 将40例脓毒症患者, 随机分为治疗组(20例)与对照组(20例)。2组患者均给予敏感抗生素、营养支持等常规治疗, 必要时给予机械通

■同行评议者

汪波, 副主任医师, 北京大学第一医院急诊科

气治疗. 治疗组在此基础上联合益气通腑逐瘀方灌肠治疗, 对照组在此基础上行等量煎药用水灌肠, 均每日2次. PCR法测定患者治疗前后外周血细菌DNA片段, 分光光度法监测其血清D-乳酸水平, 高效液相色谱法监测尿果糖/甘露醇(L/M)值, 观察脓毒症患者ARDS、MODS的发生.

结果: 治疗7 d与14 d后, 治疗组较对照组D-乳酸水平均有显著降低($6.04 \pm 1.06 \mu\text{g/L}$ vs $8.83 \pm 0.73 \mu\text{g/L}$; $3.89 \pm 0.86 \mu\text{g/L}$ vs $7.18 \pm 0.90 \mu\text{g/L}$, 均 $P < 0.01$); 治疗14 d后, 较对照组尿L/M水平有明显降低(0.0499 vs 0.0709 , $P < 0.05$); 治疗结束后, 与对照组相比治疗组细菌DNA片段转阴率增高、ARDS发生率及MODS发生率均有明显降低(71.4% vs 33.3% ; 17.6% vs 50% ; 0% vs 22.2% , 均 $P < 0.05$).

结论: 益气通腑逐瘀方灌肠治疗能改善脓毒性患者肠道黏膜屏障功能, 降低肠道细菌、内毒素移位, 并能降低脓毒症患者ARDS、MODS的发生率.

关键词: 益气通腑逐瘀方; 灌肠疗法; 脓毒症; 肠道黏膜屏障功能

鲁召欣, 高翠翠, 张明, 张众慧, 姜志明, 杨君, 徐拥庆, 李涛, 解建. 益气通腑逐瘀方灌肠疗法对脓毒症患者肠道黏膜屏障功能的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2530-2533
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2530.asp>

0 引言

脓毒症(sepsis)是指由感染引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 是烧伤、严重创伤、休克、大手术后常见的并发症, 可进一步发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 病死率高达30%-50%^[1], 已成为是临床急危重病患者死亡的主要原因之一. 尽管在抗感染、多脏器支持技术等方面有了较大进展, 但其临床死亡率仍然很高. 美国每年有75万脓毒症患者, 超过21万(28%)死亡, 其中约9%的脓毒症患者发展成严重脓毒症(severe sepsis), 甚至发展为脓毒性休克(septic shock)^[2]. 在各种损伤下, 肠道内微生物和内毒素可以通过肠道侵入肠外组织, 导致肠道菌群/内毒素移位^[3], 导致脓毒症患者发展为ARDS甚至MODS. 益气通腑逐瘀方由黄芪、生地、桃仁、大黄、枳实、丹参、当归等药物

表 1 两组脓毒症患者治疗前一般情况比较 ($n = 20$)

分组	性别(n)		年龄(岁)	APACHE II 评分(分)
	男	女	(mean \pm SD)	(mean \pm SD)
治疗组	13	7	55 ± 14	18 ± 4
对照组	11	9	57 ± 11	17 ± 3

组成, 具有益气、通腑、活血、化瘀的功效. 目前在治疗脓毒症方面, 中西医结合的治疗方法, 已取得了较好的临床效果, 但使用益气通腑逐瘀方灌肠治疗尚未见报道, 因此我们通过观察益气通腑逐瘀方灌肠治疗对脓毒症患者肠道黏膜屏障功能的影响, 探讨益气通腑逐瘀方在治疗脓毒症及预防ARDS/MODS方面的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 入选山东省千佛山医院2008-06/2009-03入住ICU的脓毒症患者40例, 随机分为2组, 治疗组: 男13例、女7例, 年龄 55 ± 14 岁, 急性生理学和慢性健康状况评分(APACHE II)(18 ± 4)分; 对照组: 男11例、女9例, 年龄 57 ± 11 岁, 急性生理学和慢性健康状况评分(APACHE II)(17 ± 3)分. 治疗前, 两组患者年龄、APACHE II评分无显著性差异, 具有可比性($P > 0.05$, 表1). 益气通腑逐瘀方由山东中医药大学第一附属医院提供, 其药物组成为: 黄芪30 g、生地15 g、桃仁15 g、大黄9 g(后入)、枳实15 g、丹参15 g、当归15 g、赤芍9 g、丹皮9 g、川芎9 g、红花9 g. 水煎浓缩, 每毫升含生药0.5 g.

1.2 方法

1.2.1 诊断标准: 脓毒症诊断参照2001年由SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS指定的标准^[4], ARDS的诊断参照2006年中华医学会重症医学分会制定的诊断标准^[5].

1.2.2 治疗: 治疗组、对照组均给予敏感抗生素控制感染; 吸氧保证氧供, 病情需要者给予机械通气; 血压降低者应用血管活性药物多巴胺中心静脉持续泵入维持血压; 肠内、外营养支持等常规治疗. 治疗组在此基础上用益气通腑逐瘀方灌肠治疗, 3 mL/kg, 每日2次, 每次保留0.5-1 h, 7 d为一疗程; 对照组在此基础上用煎药用水灌肠, 3 mL/kg, 每日2次, 每次保留0.5-1 h, 7 d为一疗程. 2组均连续应用2疗程.

1.2.3 外周血细菌DNA片段测定: 开始治疗前及治疗后第7、14天分别抽取静脉血2 mL, 采用PCR法测定DNA片段^[6].

■ 研究前沿

肠道屏障功能障碍学说是脓毒症发生ARDS、MODS的重要机制. 由于SIRS的发生导致肠道屏障功能受损, 进一步导致肠道的细菌/内毒素移位, 致使重要脏器的损伤, 导致ARDS、MODS的发生. 目前研究对脓毒症患者肠道屏障功能保护的药物目前报道较少, 因此如何从保护肠道屏障功能入手研究治疗脓毒症的新方法、新药物是目前亟待解决的问题.

■ 相关报道

陈海龙 *et al* 认为通腑类中药具有保护肠道屏障功能, 减少细菌/内毒素移位, 抑制TNF- α 、IL-6等促炎因子的过度分泌, 下调抗炎介质IL-10、PGE的产生, 促进免疫平衡. 郭昌星 *et al* 对逐瘀法治疗炎症反应综合征进行了研究, 认为逐瘀法可以提高机体细胞抗氧化酶的活性, 降低脂质过氧化, 从而阻止SIRS的发展.

■创新亮点

本研究通过观察中医益气、通腑、逐瘀三法灌肠给药对脓毒症患者肠道黏膜屏障功能及肠道内毒素/细菌移位的影响,探讨了益气通腑逐瘀方灌肠治疗预防脓毒症向ARDS/MODS进展的作用机制。

■应用要点

本研究应用益气通腑逐瘀方灌肠给药的方法,探讨了他对脓症患者肠道黏膜屏障功能的影响,研究结果将有助于进一步了解中医药治疗脓毒症的作用机制,将为治疗脓毒症提供新的治疗策略。

表 2 35例患者治疗前后D-乳酸与尿L/M水平 (mean ± SD)

分组	n	治疗前		治疗后7 d		治疗后14 d	
		D-乳酸(μg/L)	尿L/M	D-乳酸(μg/L)	尿L/M	D-乳酸(μg/L)	尿L/M
治疗组	17	10.09 ± 1.14	0.0904	6.04 ± 1.06 ^b	0.0719	3.89 ± 0.86 ^b	0.0499 ^a
对照组	18	10.03 ± 1.12	0.0896	8.83 ± 0.73	0.0738	7.18 ± 0.90	0.0709

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组。

表 3 35例患者治疗前后细菌DNA片段转阴率及治疗后ARDS/MODS发生率 (mean ± SD)

分组	n	DNA片段阳性n(%)		转阴率(%)	ARDS n(%)	MODS n(%)
		治疗前	治疗后			
治疗组	17	14(82.4)	4(23.5)	71.4 ^a	3(17.6) ^a	0(0.0) ^a
对照组	18	15(83.3)	10(55.6)	33.3	9(50.0)	4(22.2)

^aP<0.05 vs 对照组。

1.2.4 血浆D-乳酸测定: 开始治疗前及治疗后第7、14天分别抽取静脉血2 mL, 经去蛋白后, 采用酶联紫外分光光度法检测D-乳酸的表达水平^[7]。

1.2.5 尿乳果糖/甘露醇(L/M)值测定: 开始治疗前及治疗后第7、14天早晨口服10 mL乳果糖/甘露醇溶液(乳果糖2 g、甘露醇1 g), 收集6 h内全部尿液, 取其中20 mL, 加入0.2 mg硫柳贡防腐处理后在-20℃保存。采用酶法分别检测尿果糖和甘露醇浓度^[8]。

统计学处理 采用SPSS13.0软件。数据以mean±SD表示, 组间均数比较用t检验, 率的比较采用χ²检验。以P<0.05为有统计学上显著差异, P<0.01为有极显著差异。

2 结果

40例患者有5例(治疗组3例, 对照组2例)因经济问题或治疗不到7 d死亡中途剔除, 其余35例均存活至完成治疗2个疗程(14 d), 28 d死亡率因病例数少未作观察。治疗7 d及14 d后, 治疗组较对照组D-乳酸水平均有降低, 统计学差异显著(P<0.01); 治疗14 d后, 治疗组较对照组尿L/M水平明显降低, 统计学差异显著(P<0.05, 表2)。

治疗结束后, 治疗组细菌DNA片段转阴率增高、ARDS发生率及MODS发生率均较对照组降低, 统计学差异显著(P<0.05, 表3)。

3 讨论

肠道屏障主要包括肠黏膜机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障。严重损伤后的应激

反应可造成肠黏膜屏障破坏、肠道菌群生态失调及机体免疫功能下降, 从而发生肠道细菌移位/内毒素血症, 触发机体过度的炎症反应以及器官损害。因此, 肠道是脓毒症导致ARDS/MODS的发动机, 肠道因素在脓毒症发生、发展中的作用不容忽视^[9]。

D-乳酸只有在D-乳酸脱氢酶的催化下才能被代谢, 而哺乳动物体内只有L-乳酸脱氢酶, 血液中的D-乳酸几乎全都来源于肠道, 机体各组织均不产生D-乳酸。当肠道黏膜受损时, 由于肠道黏膜屏障功能被破坏, 大量D-乳酸就会通过受损的肠黏膜进入血液中, 因此, 血液中D-乳酸水平的变化可以显示肠道黏膜屏障功能^[7]。同时, 肠黏膜有机械性损害时, 尿中乳果糖/甘露醇比值明显升高, 因此, 尿中乳果糖/甘露醇比值在目前监测肠道黏膜屏障功能中最为常用^[10-11]。

本研究发现, 经益气通腑逐瘀方灌肠治疗后, 治疗组患者肠道黏膜屏障功能好转, 且PCR法测定DNA片段转阴率升高, ARDS发生率、MODS发生率均有明显降低, 这些均提示益气通腑逐瘀方灌肠在治疗脓毒症方面具有积极的作用。其作用机制可能为: 益气养阴类药物有较强的抗内毒素作用, 主要是通过激活网状内皮吞噬系统, 能明显提高机体对内毒素的抵抗能力^[12]; 通里攻下类方药可以保护肠道屏障功能, 减少MODS肠源性内毒素血症和肠源性细菌移位; 并能有效抑制TNF-α、IL-6等促炎因子的过度分泌, 下调抗炎因子IL-10、PGE的产生, 促进Th1细胞漂移和HLA-DR表达的上升, 有利于免

疫平衡的恢复^[13-16]; 活血化瘀类药物在一定程度上能提高机体细胞抗氧化酶的活性, 降低脂质过氧化, 从而阻止炎症反应进一步发展, 对SIRS治疗起到积极作用^[17].

本研究证实益气通腑逐瘀方灌肠治疗脓毒症能起到预防发生ARDS/MODS的疗效, 也提示其具有很好的临床应用价值, 值得在临床推广, 但由于本研究病例数偏少, 未能观察28 d死亡率等, 这是不足之处, 益气通腑逐瘀方灌肠治疗脓毒症机制的研究将是以后研究的重要课题.

4 参考文献

- 1 姚咏明, 盛志勇. 我国创伤脓毒症基础研究新进展. 中华创伤杂志 2003; 19: 9-12
- 2 Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Müller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care* 2005; 9: R816-R824
- 3 Nieuwenhuijzen GA, Deitch EA, Goris RJ. Infection, the gut and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. *Eur J Surg* 1996; 162: 259-273
- 4 Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250-1256
- 5 马晓春, 王辰, 方强, 刘大为, 邱海波, 秦英智, 席修明, 黎毅敏. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南(2006). 中国危重病急救医学 2006; 18: 706-710
- 6 Kane TD, Alexander JW, Johannigman JA. The detection of microbial DNA in the blood: a sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients. *Ann Surg* 1998; 227: 1-9
- 7 Smith SM, Eng RH, Buccini F. Use of D-lactic acid measurements in the diagnosis of bacterial infections. *J Infect Dis* 1986; 154: 658-664
- 8 Miki K, Butler R, Moore D, Davidson G. Rapid and simultaneous quantification of rhamnose, mannitol, and lactulose in urine by HPLC for estimating intestinal permeability in pediatric practice. *Clin Chem* 1996; 42: 71-75
- 9 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症防治学. 北京: 科学技术文献出版社, 2008: 4
- 10 Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995; 108: 1566-1581
- 11 Juvonen PO, Alhava EM, Takala JA. Gut permeability in patients with acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1314-1318
- 12 张艺平, 韩鹏. 中药抗内毒素研究新进展. 中国中西医结合急救杂志 2001; 8: 122-124
- 13 陈海龙, 吴咸中, 关凤林, 裴德凯. 中医通里攻下法对多器官功能不全综合征时肠道屏障功能保护作用的实验研究. 中国中西医结合杂志 2000; 20: 12
- 14 万幸, 刘倩娟, 王培训. 大承气汤对全身性炎症反应干预作用的实验研究. 广州中医药大学学报 2003; 20: 153-156
- 15 于泳浩, 崔乃强, 傅强, 李君, 吴咸中. 大承气颗粒对重型脓毒症促炎-抗炎反应平衡的影响. 中国中西医结合外科杂志 2004; 10: 409-412
- 16 曹书华, 王今达. 大承气汤在多器官功能障碍综合征治疗过程中的免疫调节作用. 中华创伤杂志 2004; 20: 720-723
- 17 郭昌星, 杨兴易, 林兆奋, 赵良, 单红卫, 景炳文. 血府逐瘀汤对全身炎症反应综合征患者氧自由基的影响. 中国中西医结合急救杂志 2002; 9: 228-229

■同行评价

本研究立题较好, 具有一定的临床指导意义.

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 •

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> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-08-28)

临床不典型急性阑尾炎的超声诊断

杨力, 张万蕾, 宋奕宁, 王雪, 李建国

■背景资料

阑尾炎是一种临床常见病, 临床症状体征不典型的阑尾炎一直是临床诊断的难点。80%以上的急性阑尾炎具有典型的临床症状和体征, 包括转移性右下腹痛和局限性压痛, 诊断常无困难。但部分急性阑尾炎患者临床症状和体征变化多端, 腹痛极不典型。

杨力, 张万蕾, 宋奕宁, 王雪, 李建国, 北京大学人民医院超声科北京市 100044

作者贡献分布: 此课题立题由杨力完成; 设计由杨力与张万蕾完成; 研究过程由杨力、张万蕾、宋奕宁及王雪操作完成; 数据分析及论文撰写由杨力完成; 实验指导与论文修改由李建国完成。

通讯作者: 杨力, 主治医师, 100044, 北京市西城区西直门南大街11号, 北京大学人民医院超声科。yanglit@yahoo.com.cn

电话: 010-88325380

收稿日期: 2009-06-26 修回日期: 2009-08-11

接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-08-28

Ultrasonic diagnosis of acute appendicitis with atypical clinical manifestations

Li Yang, Wan-Lei Zhang, Yi-Ning Song, Xue Wang, Jian-Guo Li

Li Yang, Wan-Lei Zhang, Yi-Ning Song, Xue Wang, Jian-Guo Li, Department of Ultrasound, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Correspondence to: Doctor Li Yang, Department of Ultrasound, Peking University People's Hospital, 11 Xizhimen South Street, Xicheng District, Beijing 100044, China. yanglit@yahoo.com.cn

Received: 2009-06-26 Revised: 2009-08-11

Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To explore the value of high and low frequency ultrasound in the diagnosis of acute appendicitis with atypical clinical manifestations.

METHODS: A total of 65 acute appendicitis patients with atypical clinical symptoms and signs but confirmed by surgery and pathology were examined and diagnosed by high frequency (7.0-10.0 MHz) associated with low frequency (3.5-4.0 MHz) ultrasound. Their ultrasonic images of acute appendicitis were reviewed retrospectively.

RESULTS: Fifty-four (83.08%) patients were diagnosed by ultrasound. The rates of diagnosis by high frequency and low frequency ultrasound were significantly different (83.08% vs 61.53%, $\chi^2 = 4.32$, $P < 0.05$). Some indirect evidences were achieved by ultrasonography: appendiceal fecalith was observed in 33 (61.11%) patients, local

adynamic ileus in 25 (46.29%) patients, peripendicular fluid in 21 (38.88%) patients and complex mass in 14 (25.92%) patients. Mesenteric lymphadenectasis was found in 10 (18.52%) patients.

CONCLUSION: In most cases, the correct diagnosis of acute appendicitis with atypical clinical manifestations can be made by high frequency associated with low frequency ultrasound.

Key Words: Acute appendicitis atypical clinical manifestations; High frequency ultrasound; Low frequency ultrasound

Yang L, Zhang WL, Song YN, Wang X, Li JG. Ultrasonic diagnosis of acute appendicitis with atypical clinical manifestations. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2534-2537

摘要

目的: 探讨高频超声结合低频超声检查在临床不典型阑尾炎诊断中的应用价值。

方法: 选择症状体征不典型, 临床诊断腹痛待查患者65例, 分别使用3.5-4.0 MHz普通腹部探头和7.0-10.0 MHz高频探头做超声检查, 经手术后病理证实为急性阑尾炎共65例, 结合其临床特征分析非典型急性阑尾炎超声声像图表现。

结果: 65例患者超声提示急性阑尾炎54例, 显示率为83.08%。高频超声肿大阑尾显示率与低频超声相比差异有统计学意义(83.08% vs 61.53%, $\chi^2 = 4.32$, $P < 0.05$)。低频超声结合高频超声显示非典型阑尾炎有一些间接征象: 阑尾粪石33例(61.11%), 周围肠管扩张25例(46.29%), 阑尾周围积液21例(38.88%), 阑尾周围包块14例(25.92%), 肠系膜淋巴结肿大10例(18.52%)。

结论: 高频结合低频超声检查能提高肿大阑尾及周围结构显示率, 可成为临床不典型急性阑尾炎首选辅助诊断方法。

关键词: 不典型急性阑尾炎; 低频超声; 高频超声

■同行评议者

钱林学, 教授, 首都医科大学附属北京友谊医院内科

杨力, 张万蕾, 宋奕宁, 王雪, 李建国. 临床不典型急性阑尾炎的超声诊断. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2534-2537
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2534.asp>

0 引言

阑尾炎是外科常见的急腹症之一, 80%以上的急性阑尾炎具有典型的临床症状和体征, 包括转移性右下腹痛和局限性压痛, 诊断常无困难. 但部分急性阑尾炎患者临床症状和体征变化多端, 腹痛极不典型, 如: 全腹痛或无转移, 给诊断带来一定的困难^[1-2]. 随着数字化超声仪器的出现, 超声已成为急性阑尾炎诊断与鉴别的常规检查手段, 尤其对于临床症状不典型、诊断困难的患者^[3-4]. 本文对近3年门急诊中临床症状和体征均不典型, 临床诊断为腹痛待查的患者, 进行高频及低频超声检查, 最后经手术病理证实为急性阑尾炎65例. 回顾性分析其超声表现, 以期总结临床非典型阑尾炎超声声像图特征.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2006-02/2009-04我院门急诊腹痛患者, 均无转移性右下腹痛和右下腹局限型压痛等典型急性阑尾炎的体征, 临床诊断为腹痛待查, 最后行手术治疗确诊急性阑尾炎65例. 患者腹痛情况: 全右侧腹部疼痛21例; 右后腰部疼痛11例; 全腹疼痛9例; 右上腹痛9例; 左下腹部疼痛3例; 上腹部疼痛伴发热恶心想吐8例; 脐周痛伴呕吐腹泻4例. 患者腹痛程度很不一致, 平均病程0.5-15 d. 均于术前行超声检查, 全部病例经手术病理证实为急性阑尾炎, 其中男38例, 女27例, 平均年龄(54.5±24.5)岁, 60岁以上28例(43.07%); 有糖尿病, 高血压, 冠心病, 习惯性便秘等内科疾病患者36例(55.38%).

1.2 方法 使用GE logiq 9型及Aloka4000型彩色多普勒超声仪, 腹部探头频率3.5-4.0 MHz, 腹部凸阵高频或线阵式高频探头7.0-10.0 MHz. 患者取平卧位, 常规探查腹、盆腔诸脏器及周围大血管, 重点在右下腹或腹部压痛最明显处附近作纵、横断面连续扫查, 缓慢加压, 首先使用低频探头, 随后改用高频探头. 若发现异常结构, 观察其形态、大小、边界、回声、管壁有无增厚、肠管是否扩张、病变与周围的关系等, 记录图像.

2 结果

2.1 超声诊断阑尾炎情况 65例确诊患者超声提示急性阑尾炎54例, 显示率为83.08%. 其中发现

异位阑尾5例, 均为高频超声检查后提示: 右侧盆腔异位2例, 右中腹部异位2例, 左下腹异位1例.

2.2 低频超声与高频超声对阑尾的显示 低频超声显示肿大阑尾40例, 25例未显示, 显示率61.53%; 高频超声显示肿大阑尾54例, 11例未显示, 显示率83.08%(图1). 用SPSS12.0软件将二者进行计数资料 χ^2 检验, 二者差异有统计学意义($\chi^2 = 4.32, P < 0.05$).

2.3 临床非典型急性阑尾炎超声声像图特点 超声检测到肿大阑尾, 长轴显示为呈腊肠样盲端结构, 短轴呈双环状. 与术后病理对照, 单纯性阑尾炎23例(42.59%), 包括5例异位阑尾: 阑尾轻度肿胀, 浆膜回声欠光滑, 管壁层次尚清晰, 腔内少量积液; 急性化脓性阑尾炎16例(29.63%): 阑尾肿胀明显, 浆膜高度充血, 腔内见脓液, 周围有积液; 急性坏疽性阑尾炎15例(27.78%): 阑尾因梗阻积脓, 阑尾壁水肿增厚, 回声减低, 管壁部分或全部坏死, 结构消失, 周边境界模糊(图2).

2.4 临床非典型急性阑尾炎间接征象的超声表现 在65例临床非典型阑尾炎中, 超声发现其合并了一些间接征象: 阑尾粪石33例, 占61.11%, 表现为肿大阑尾内见小的强回声后伴声影; 阑尾周围肠管扩张25例, 占46.29%, 阑尾周围的回肠多见, 可见肠管不同程度的扩张并见肠绒毛; 阑尾周围积液21例, 占38.88%, 为肿大阑尾周围的无回声区; 阑尾周围包块14例, 占25.92%, 形态欠规则, 回声不均, 内部可见少量血流信号; 肠系膜淋巴结肿大10例, 占18.52%, 呈圆形或椭圆形, 大小不等, 中等回声(图3).

3 讨论

临床上约20%急性阑尾炎缺乏典型的症状和体征, 被称为非典型阑尾炎. 老人、小孩及一些肥胖者等有基础合并症的患者多见^[5-6]. 本研究入组患者腹痛部位各异, 平均年龄(54.5±24.5)岁, 60岁以上43.07%, 55.38%合并内科疾病, 符合不典型阑尾炎的临床资料分布特征. 本组小儿患者较少, 考虑原因为我院是综合性医院, 小儿病例收集少造成.

采用低频3.5-4.0 MHz凸阵探头进行腹部疾病超声检查是超声最早也是最常见的应用. 近年将高频超声7.0-10.0 MHz用于腹部疾病, 尤其是胃肠道疾病的检查越来越广泛^[7]. 高频超声分辨力高, 增加了近场分辨率, 使得局部组织结构显示率增加. 本研究应用高频超声对非典型阑尾炎的肿大阑尾显示率为83.08%, 高于低频超

■研发前沿

部分急性阑尾炎患者临床症状和体征变化多端, 很难诊断. 随着数字化超声仪器的出现, 超声已成为急性阑尾炎诊断与鉴别的常规检查手段. 但超声对腹壁脂肪较厚者或盲肠后位阑尾炎的诊断有一定的局限性, 还需要结合临床症状及其他检查.

■创新盘点

本文运用高频超声结合低频超声进行了临床不典型阑尾炎的超声检查研究, 提高了肿大阑尾及周围结构显示率, 体现了超声诊断阑尾炎的优势.

应用要点

本研究总结分析了临床不典型阑尾炎超声声像图特征,对于临床不典型阑尾炎的诊断有较强的实用价值。

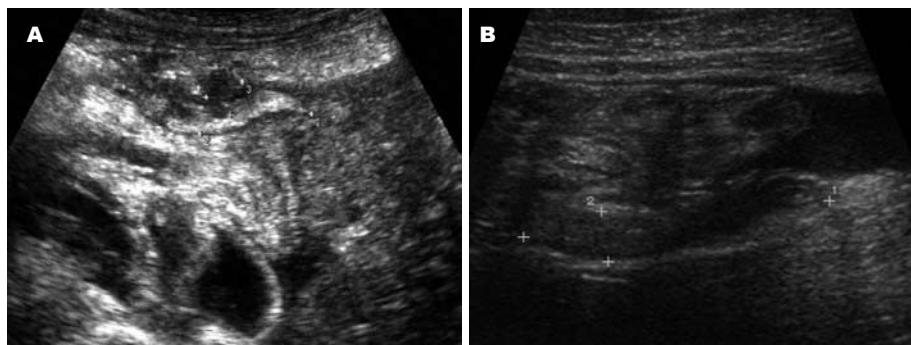


图1 同一患者低频超声与高频超声检查肿大阑尾对比. A: 低频超声检查,右下腹团块状不均回声结构,未见明确肿大阑尾; B: 高频超声检查,在不均状回声结构中显示肿大阑尾,图中测量为肿大阑尾。

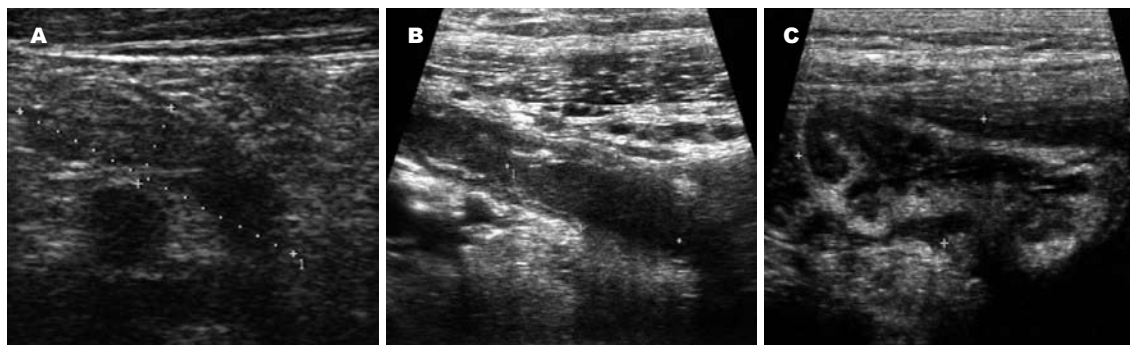


图2 高频超声显示急性阑尾炎. A: 急性单纯性阑尾炎, 肿大阑尾呈腊肠样盲端结构, 阑尾壁薄, 连续; B: 急性化脓性阑尾炎, 阑尾肿胀明显, 腔扩张, 积液增多, 阑尾管壁增厚, 不光滑; C: 急性坏疽性阑尾炎, 阑尾壁明显增厚, 回声低, 不连续, 黏膜层部分消失, 周围积液明显。

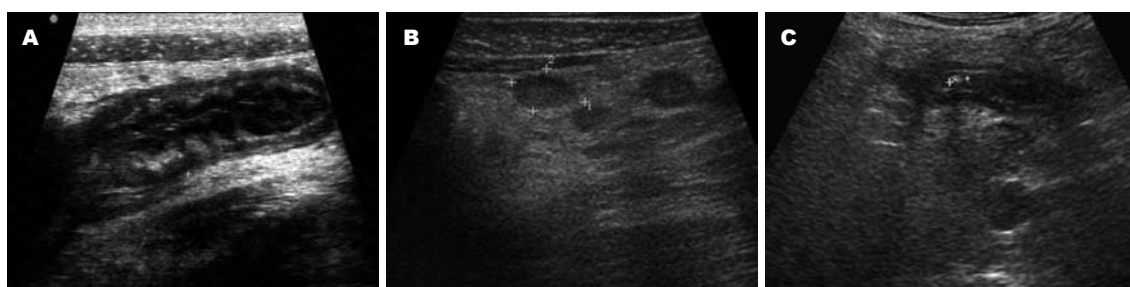


图3 非典型急性阑尾炎间接图像. A: 扩张肠管, 肠管壁厚度; B: 肠系膜多发淋巴结肿大, 其中之一的淋巴结; C: 阑尾粪石, 肿大阑尾中的粪石。

声61.53%的显示率。我们还发现5例异位阑尾, 100%由高频超声检查提示, 说明高频超声对异位阑尾炎很敏感。这也解释了临床部分患者异位阑尾部位疼痛而无典型症状的原因。超声显示从单纯性阑尾炎到化脓性阑尾炎再坏疽性阑尾炎是炎症逐渐加重的动态过程, 随着病变程度的加重, 超声声像图见阑尾腔不同程度扩张, 阑尾壁逐渐增厚, 不连续, 黏膜层部分消失, 这些与文献报道一致^[8-10]。本组病例中, 单纯性阑尾炎占42.59%, 急性化脓性阑尾炎29.63%, 急性坏疽性阑尾炎27.78%, 与报道的单纯性阑尾炎占70%以上不太一致。分析原因: 非典型的阑尾炎患者症状反应慢, 就诊时间长或因症状不典型而误诊、漏诊, 都是造成阑尾化脓甚至坏疽的

原因。应用高频超声检查仍然漏掉16.92%的急性阑尾炎, 对这些患者病例资料进行分析发现: 有6例(54.55%)为体质指数(body mass index, BMI, 计算公式为体质量除以身高平方) >25 的肥胖患者, 其阑尾周围脂肪较多, 造成阑尾与周围结构对比差。超声显示不佳, 这与既往临床报道一致^[11]。这也是超声检查的局限之处, 即超声波受到腹壁脂肪及腹腔气体的影响而影响声像图的显像。提示如果超声为阴性发现, 而临床仍没有确诊, 还应进一步结合其他检查除外阑尾炎的诊断。高频超声没有发现的5例急性阑尾炎中, 4例手术记载为盲肠后位阑尾, 揭示超声对盲肠后位阑尾显示率低。提示如果高频超声阴性发现, 还应结合临床, 进行增强CT等其他影像学检

查以免漏诊^[12]。另外, 我们发现在超声发现肿大阑尾声像图同时, 结合低频超声, 还有一些间接征象。这些间接征象的临床表现也是造成患者症状体征不典型的原因之一。超声在肿大的阑尾中见强回声后伴弱声影, 是阑尾粪石的典型征象, 他阻塞了阑尾管腔, 是造成阑尾炎的重要原因。周围肠管扩张是局限性肠梗阻的表现。文献报道, 近50%的急性阑尾炎都存在局限性麻痹性肠梗阻^[13], 超声可以敏感地发现肠管扩张, 即使未能发现肿大阑尾, 若有肠管扩张, 也应给临床提示, 以防漏诊; 阑尾周围积液及实性包块, 说明阑尾已经出现穿孔或坏死等症状, 这在本组患者中比例较高, 说明一些非典型阑尾炎发病急, 症状严重, 较早出现了合并症, 如弥漫性全腹痛等类似胃肠道穿孔的症状, 超声可以给出较好的鉴别诊断; 本组有10例发现肠系膜淋巴结肿大, 均为高频超声发现, 肠系膜淋巴结肿大作为一种反应性的增生, 在急性阑尾炎中可见。值得注意的是, 有些胃与肠道肿瘤也可引起腹腔淋巴结的肿大, 但这些转移的淋巴结部位是在腹部大血管周围, 结构欠规则, 长径比短径<2。同时若超声未见到肿大阑尾而单纯见到肠系膜淋巴结肿大, 也可以结合临床提示肠系膜淋巴结炎的可能。

总之, 高频超声结合低频超声能显著提高临床非典型阑尾炎的诊断率。对于腹痛患者, 加大超声扫查范围, 灵活应用不同频率的超声探头, 是提高急性阑尾炎诊断正确率的重要方法。

4 参考文献

- 1 Tsai HM, Shan YS, Lin PW, Lin XZ, Chen CY. Clinical analysis of the predictive factors for recurrent appendicitis after initial nonoperative treatment of perforated appendicitis. *Am J Surg* 2006; 192: 311-316
- 2 魏志梧, 白喜林. 不典型阑尾炎的诊断. *实用医技杂志* 2008; 15: 2714-2715
- 3 Ng S, Fleming FJ, Drumm J, Waldron D, Grace PA. Current trends in the management of acute appendicitis. *Ir J Med Sci* 2008; 177: 121-125
- 4 黄雄. 急性阑尾炎超声诊断的图像特征及临床价值. *中国现代医药杂志* 2008; 10: 64-66
- 5 Hörmann M, Scharitzer M, Stadler A, Pokieser P, Puig S, Helbich T. Ultrasound of the appendix in children: is the child too obese? *Eur Radiol* 2003; 13: 1428-1431
- 6 唐云, 唐诚, 黄桢, 董宏坤. 115例老年人急性阑尾炎的超声检查分析. *国际医药卫生导报* 2009; 15: 41-42
- 7 邓彩妹, 卢丽萍, 沈锡琳. 高频超声在腹部检查中的应用价值探讨. *现代诊断与治疗* 2007; 18: 70-72
- 8 邹翰琴, 于丽, 王可. 急性阑尾炎病理分型与超声图像特征的对比分析. *中国超声医学杂志* 2008; 24: 1103-1105
- 9 秦红卫, 杨婕, 赵景林. 超声诊断急性阑尾炎72例分析. *中国误诊学杂志* 2008; 8: 4037-4038
- 10 Suppiah A, Barandiaran J, Morgan R, Perry EP. First case of villous adenoma of the appendix leading to acute appendicitis presenting as strangulated femoral hernia: changes in management owing to concurrent adenoma. *Hernia* 2008; 12: 95-98
- 11 Sakai S, Kobayashi K, Toyabe S, Mandai N, Kanda T, Akazawa K. Comparison of the levels of accuracy of an artificial neural network model and a logistic regression model for the diagnosis of acute appendicitis. *J Med Syst* 2007; 31: 357-364
- 12 鲁际, 戴洪修, 谭光喜, 张安莹, 王洁兵, 肖治明. 螺旋CT多平面重建在急性阑尾炎诊断和鉴别诊断中的临床应用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1165-1170
- 13 Styruud J, Eriksson S, Nilsson I, Ahlberg G, Hapaniemi S, Neovius G, Rex L, Badume I, Granstrom L. Appendectomy versus antibiotic treatment in acute appendicitis. a prospective multicenter randomized controlled trial. *World J Surg* 2006; 30: 1033-1037

■同行评价

本研究选题新颖, 结果可靠, 对临床有较好的参考价值。

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》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。(科学编辑: 李军亮 2009-08-28)

人类巨细胞病毒UL147基因在临床低传代分离株中的多态性

何蓉, 阮强, 齐莹, 马艳萍

■背景资料

1996年, Cha *et al* 对HCMV实验室株AD169株和Towne株及一株命名为Toledo的临床株进行了核酸序列比较, 发现Towne株含有4个、Toledo株含有19个在AD169株不存在的基因, 且Towne株中的4个新基因只有一个基因与Toledo株的基因相同(UL147), 表明HCMV此段序列为高度可变区。Toledo株的19个新基因被分别命名为HCMV UL133-UL151, 作者推测, 此19个基因可能在病毒的复制、潜伏和对宿主的致病性方面起重要作用, 其中一些基因具有编码糖蛋白的能力, 可能在体内病毒对细胞受体的吸附方面起重要作用, 决定病毒的组织细胞嗜性。

■同行评议者

樊红, 副教授, 东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

何蓉, 阮强, 齐莹, 马艳萍, 中国医科大学附属盛京医院病毒室 辽宁省沈阳市 110004

国家自然科学基金资助项目, No. 30700916

作者贡献分布: 此课题由何蓉与阮强设计; 研究过程由何蓉、齐莹及马艳萍完成; 数据分析由何蓉、齐莹及马艳萍完成; 本论文写作由何蓉与阮强完成。

通讯作者: 何蓉, 副研究员, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院病毒室, her@sj-hospital.org
电话: 024-83956560 传真: 024-23892617

收稿日期: 2009-04-30 修回日期: 2009-06-16

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-08-28

Sequence variability of human cytomegalovirus UL147 genes in clinical isolates

Rong He, Qiang Ruan, Ying Qi, Yan-Ping Ma

Rong He, Qiang Ruan, Ying Qi, Yan-Ping Ma, Virus Laboratory, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30700916

Correspondence to: Rong He, Virus Laboratory, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. her@sj-hospital.org

Received: 2009-04-30 Revised: 2009-06-16

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To explore the sequence variability of human cytomegalovirus (HCMV) UL147 ORF in clinical isolates and its possible associations with HCMV infection.

METHODS: HCMV-UL147 ORF was amplified by PCR assay and sequenced in 23 low-passage isolates and urine from two healthy children. The whole gene sequence of HCMV-UL147 in the urine of healthy children was determined and analyzed.

RESULTS: The length of UL147 ORF of 25 isolates was 464-480 bp. Sequencing analysis showed significant strain-specific variability, and none of the sequences was exactly the same with Toledo. The variation was located in the 5' end of sequence. The prediction of secondary

structure demonstrated two types and the amino acid sequences kept highly conservative in the important functional area of protein. In jaundice, microcephaly and Hirschsprung's disease, no sequence differences were found among the disease types.

CONCLUSION: HCMV-UL147 might play a role in HCMV infection and subsequent diseases.

Key Words: Human cytomegalovirus; UL147 gene; Variability

He R, Ruan Q, Qi Y, Ma YP. Sequence variability of human cytomegalovirus UL147 genes in clinical isolates. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2538-2543

摘要

目的: 探讨人类巨细胞病毒(HCMV)UL147序列在临床患儿低传代分离株中的多态性及其与临床疾病的关系。

方法: 对23株HCMV临床低传代分离株及2例同年龄组健康儿童尿液HCMV-DNA采用PCR方法检测, 阳性健康儿童尿液进行HCMV-UL147基因全序列测定及分析。

结果: 25株分离株147 ORF长度为464-480 bp, 序列呈现较高的多态性, 所有研究的标本中没有序列与Toledo完全一致。序列差异多位于序列的5'端, 二级结构预测表现为2种类型, 在重要的蛋白质功能区氨基酸序列高度保守。未发现黄疸、小头畸形、先天性巨结肠等不同疾病类型的序列之间的差异。

结论: UL147基因可能在HCMV致病中起一定的作用。

关键词: 人类巨细胞病毒; UL147基因; 多态性

何蓉, 阮强, 齐莹, 马艳萍. 人类巨细胞病毒UL147基因在临床低传代分离株中的多态性. *世界华人消化杂志* 2009; 17(24): 2538-2543

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2538.asp>

0 引言

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)先天感染是引起新生儿疾病和先天畸形的重要感染因素之一,可引起黄疸性肝炎、胆道闭锁、先天性巨结肠、小头畸形,以及智力低下、耳聋等多器官、多系统病变^[1].关于HCMV先天感染的致畸机制尚不清楚.有研究表明HCMV在体内存在不同的细胞嗜性,提示不同临床症状的HCMV分离株的基因结构可能存在差异. Cha *et al*^[2]的研究发现在Toledo等临床低传代分离株中存在一个新的DNA区域,这个区域至少包括UL133-UL151共19个开放阅读框架(open reading frames, ORFs),而在实验室株AD169中却不存在这一区域.这个发现提示这些基因的编码产物可能与HCMV的致病性有关.本文着重研究HCMV UL147序列在临床患儿低传代分离株中的多态性,探讨其与病毒临床致病性的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 23株HCMV临床分离株均来自我院1988-1993年期间住院患儿,患者年龄<14 mo,其中黄疸患儿15名、小头畸形患儿5名、先天性巨结肠患儿3名.标本取自1988-1993年的HCMV分离实验, -70℃保存.并于2000年进行QPCR^[3]检测HCMV DNA均为阳性.2例来自同一地段的同年龄组健康儿尿液,经QPCR方法检测HCMV DNA阳性, -70℃保存尿标本备用.

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增: (1)取低传代分离株培养上清液0.5 mL, 100℃沸水浴15 min, 室温下离心15 000 r/min, 10 min.尿液处理采取常规碱裂解法. (2)反应体系50 μL, 循环条件: 95℃ 4 min; 94℃ 45 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 10 min.应用巢式、半巢式PCR对包含UL147 ORF的一段序列(Toledo9752-11449)进行扩增, 引物及序列见表1. (3)电泳检测结果, EB染色, 紫外灯下观察结果.

1.2.2 PCR产物纯化及测序: 应用Wizard SV gel and PCR Clean-Up试剂盒对PCR产物进行纯化, 测序由上海联合基因公司完成.

1.2.3 序列分析: 应用DNASTAR、Genedoc等软件进行序列分析.

2 结果

测序结果显示临床分离株UL147序列之间

存在高度多态性, 序列被GenBank收录, 序列号为AY788137到AY788146和AY366449到AY366461.

2.1 核苷酸序列比较 对25个来自临床有症状和无症状HCMV感染患儿的标本进行UL147 ORF研究, 所有研究的标本中147 ORF长度在464-480 bp, 没有序列与Toledo完全一致. 6份标本的序列与Toledo株相似, 序列的差异小于20个, 序列同源性为96.7%-97.1%. 其他19个序列与Toledo株的同源性在90.2%-92.3%. 序列变异集中在5'端. 其中4、9、10、15、16、27、29、39、51号标本均于起始位点处缺失3个碱基; 10、14、15、27、29、39号标本于110位(相对于Toledo)有3个碱基缺失; 16号标本与13位、3号标本于62位也分别有3个碱基缺失(图1-2).

2.2 氨基酸序列比较 预测Toledo的UL147ORF编码蛋白长度为160个氨基酸, 研究的25个序列预测147编码蛋白的长度为157-160个氨基酸, 6个标本的氨基酸序列与Toledo的同源性为96.2%-97.5%, 其他19个序列与Toledo的同源性在86.2%-91.2%(图3).

2.3 预测蛋白质重要功能区结构分析 在所有UL147序列中存在一个保守的CXC化学趋化因子功能域. NCBIProS数据库预测UL147编码蛋白功能区显示几乎所有的UL147序列中都存在一个CK2磷酸化位点和一个PKC磷酸化位点. 11个序列在第39位氨基酸处增加了一个TYR位点, 5个序列在第24位氨基酸处增加了一个ACP位点, 2个序列在第72位氨基酸处增加了一个MRS位点(图3).

2.4 蛋白质二级结构预测 蛋白质二级结构预测分析, 25个序列的二级结构大致形成2种类型(图4). 其中, 4、10、15、25、27、29、51、LS、39、38号序列之间的二级结构相似, 其他序列的二级结构与Toledo株相似. UL147编码蛋白的亲水性、表位及抗原性预测结果显示25个序列与Toledo株的性质差异不大(图5).

3 讨论

HCMV属于疱疹病毒β亚科, 是免疫抑制、器官移植患者的严重致病、致死因素, 是导致骨髓移植失败的重要原因, 也是母婴传播病原体之一. 然而, HCMV的致病机制尚不清楚. 近年来许多学者着手从分子水平对此病毒进行研究, 分析发现UL146、UL147 ORFs编码的蛋白与α化学因子类似^[4], 趋化因子是一类小的分泌

■研究前沿

目前有关19个基因多态性的研究主要来源于器官移植患者和艾滋病患者, 进一步选取不同感染类型标本作为研究对象, 将使多态性更加全面.

■相关报道

Penfold *et al*证实, UL146和UL147的产物与 α 趋化因子序列相似,其中UL146产物与病毒对中性白细胞的吸附有关,与在感染中病毒的扩散和巨细胞包涵体病患者病毒在中性白细胞持续存在有关. UL147编码产物被称为vCXC-2,没有ELR功能区,只有4个半胱氨酸残基. 具有ELR功能区的趋化因子能趋化中性粒细胞,而没有ELR功能区的趋化因子作用于T和B细胞有关.

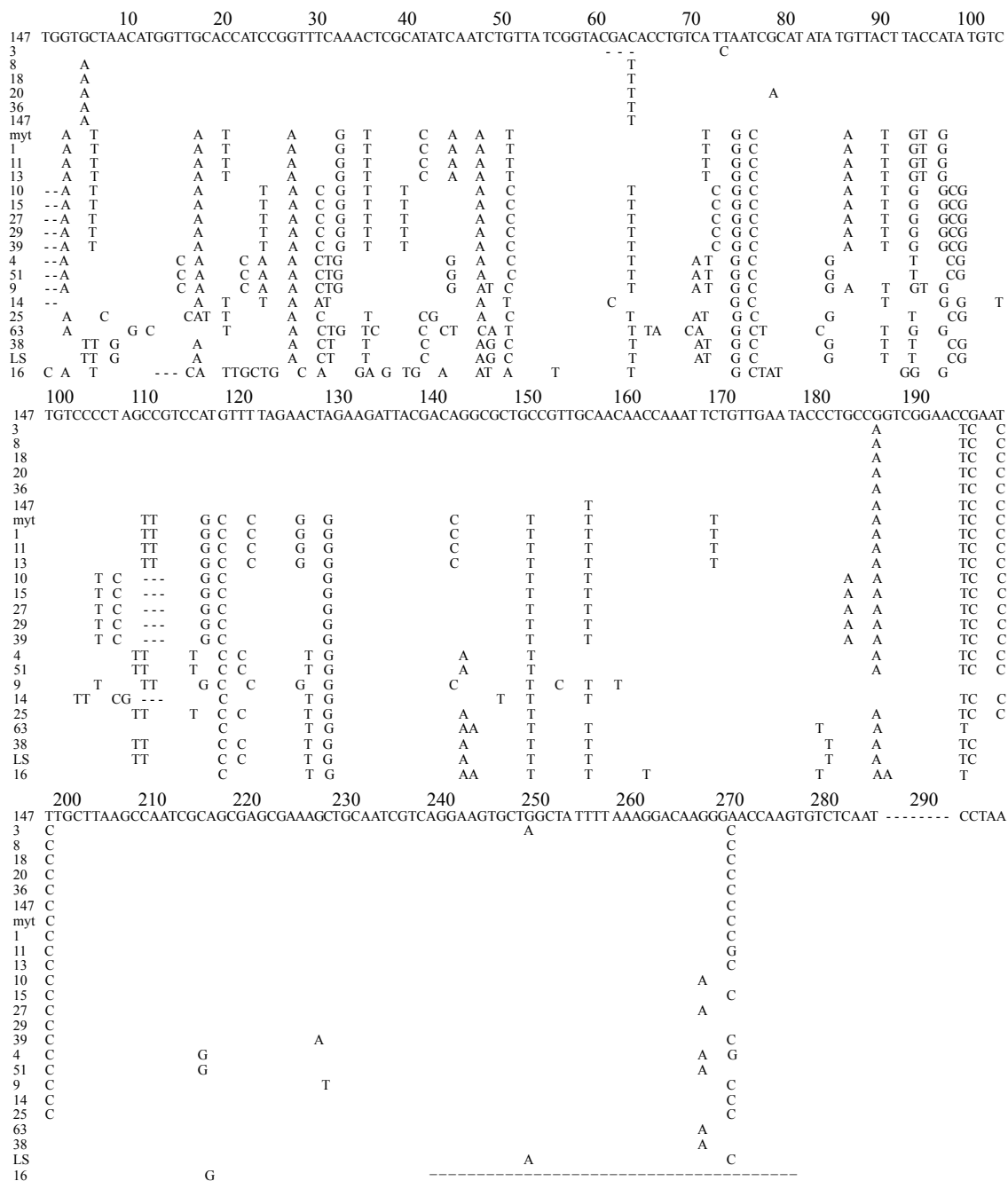


图1 25个临床分离株部分核苷酸序列同源性比较, 以Toledo为参考株. J: Jaundice(黄疸); M: Microcephaly(小头畸形); C: Megacolon(巨结肠); MYT, LS: asymptomatic children(无症状感染者).

表1 UL147扩增引物

引物	序列	核苷酸位置 (Toledo)
147 forward	5'ATCACCAGGACCGAGACGAAT3'	9752
147 reverse	5'CGGTGACAGGGTGTATCGT3'	11 449
147 nested-forward	5'AGCTGCAATCGTCAGGAAG3'	10 093
147 nester reverse	5'TCGGTAGACCAGAAGGGCG3'	10 845

型趋化细胞因子, 具有共同的结构特征: 在2个半胱氨酸残基间形成二硫键. 根据半胱氨酸的位置和数量的不同分为4种类型: CXC, CC, XC

和CX3X, X代表除半胱氨酸外的任何一种氨基酸^[5]. TOLEDO的UL146基因在CXC功能区前有ELR残基, 被称为VXCX-1, 有研究证实ELR残基

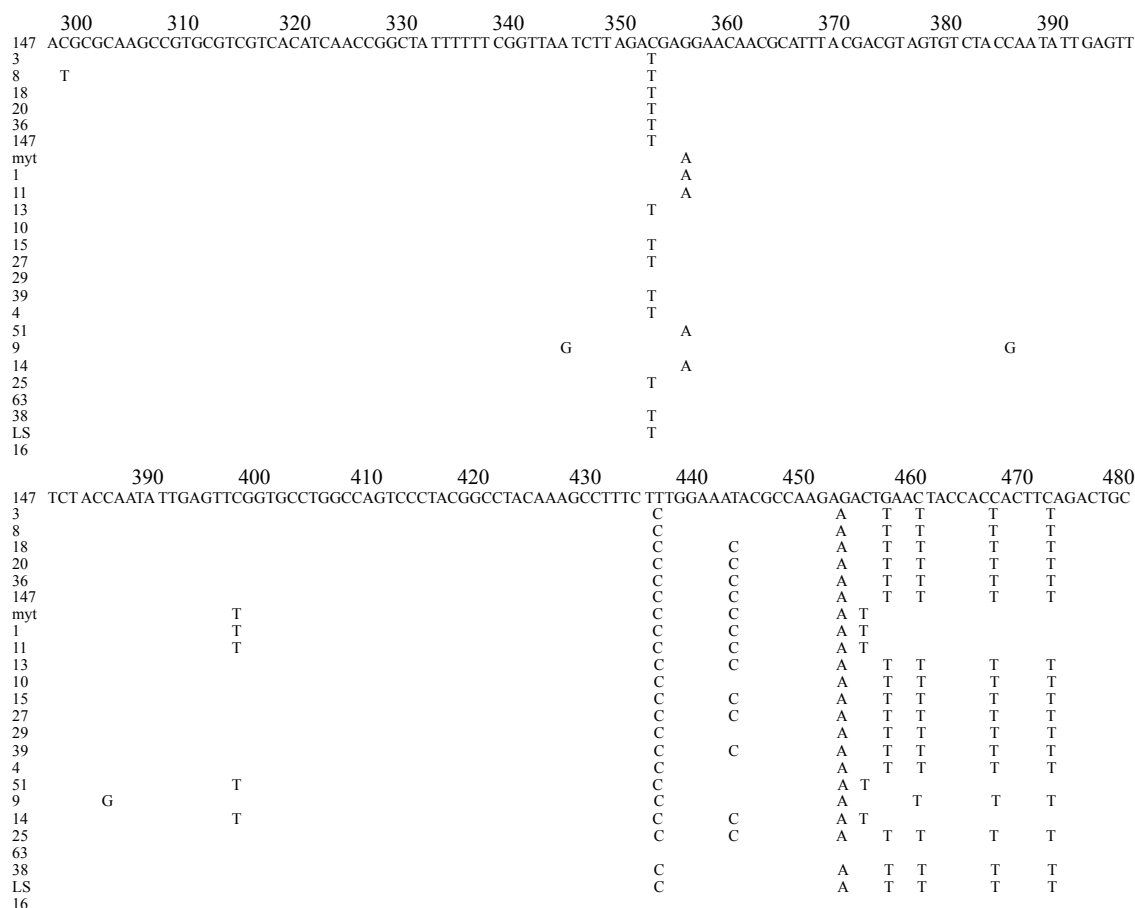


图 2 25个临床分离株部分核苷酸序列同源性比较, 以Toledo为参考株. J: Jaundice(黄疸); M: Microcephaly(小头畸形); C: Megacolon(巨结肠); MYT, LS: asymptomatic children(无症状感染儿).

对与IL-8活性和受体的结合非常重要^[6]. UL147编码产物被称为vCXC-2, 没有ELR功能区, 只有4个半胱氨酸残基. 具有ELR功能区的趋化因子能趋化中性粒细胞^[7], 而没有ELR功能区的趋化因子作用于T和B细胞^[8-9].

本实验对25个来自临床有症状和无症状HCMV感染患儿的标本进行UL147 ORF研究, 所有研究的标本中147 ORF长度在464-480 bp, 没有序列与Toledo完全一致. 25个标本测序分析结果显示序列之间存在多态性, 6份标本的序列与Toledo株相似, 序列的差异小于20个, 序列同源性的96.7%-97.1%. 其他19个序列与Toledo株的同源性在90.2%-92.3%. 序列变异集中在5'端. 12个序列存在不同程度的碱基缺失, 但均未引起移码突变.

25个标本中黄疸患儿15名、小头畸形患儿5名、先天性巨结肠患儿3名、同年龄组健康儿2名, 通过对不同病种患者UL147序列分析, 未发现健康儿与患者UL147序列多态性的差异, 也未发现3种不同类型HCMV感染临床疾病与UL147序列多态性间的关系.

25个临床标本的UL147编码蛋白的亲水性、表位及抗原性与Toledo株的性质差异不大, 所有序列均具有一个保守的CXC化学趋化因子功能域, 而化学因子在感染中与中性粒细胞的作用相关, 提示HCMV-UL147可能在病毒感染中起重要作用. 为下一步针对UL147基因功能研究提供了可靠的证据.

同时, 研究发现, UL147编码蛋白在PKC、CK2位点也是高度保守, 提示此区域在病毒作用机制中起重要作用.

与Toledo相比, 有11个序列在蛋白第39为氨基酸处增加了一个TYR位点, 5个序列在第24位氨基酸处增加了一个ACP位点, 2个序列在第72位氨基酸处增加了一个MRS位点. 这些位点是否在UL147蛋白功能中起作用, 如何起作用尚需进一步研究.

4 参考文献

- 1 刘兰青, 阮强, 任舒月, 史金阳, 吕绳敏. 巨细胞病毒感染与常见几种先天畸形相关性的研究. 中国医科大学学报 1998; 27: 76-78
- 2 Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski

■创新盘点

自1996年发现HCMV实验室株缺少临床分离株Toledo含有的UL133-UL151基因后的几年来, 共有2篇论文研究了其中的UL147基因, 本研究选取引起先天感染不同系统畸形的分离株, 及无症状感染几分离株作为研究对象, 研究更有说服力.

■应用要点

本研究选择按照病毒感染组织细胞不同进行严格分类的HCMV分离株和无症状感染儿HCMV分离株,进行UL147基因的多态性研究,渴望在分子水平阐明不同临床分离株致病性差异的机制,寻找具有临床诊断和治疗价值的基因或基因变化,为HCMV先天感染的临床诊断和防治提供资料。

图 3 25个临床分离株氨基酸序列同源性比较,以Toledo为参考株。J: Jaundice(黄疸); M: Microcephaly(小头畸形); C: Megacolon(巨结肠); MYT, LS: asymptomatic children(无症状感染儿)。

		PKC	ACP	TYP	
		*	20	*	40
				*	60
To	:	MVLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTGTE	:	66	
18M	:	MVLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
2J	:	MVLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
20M	:	MVLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
8J	:	MVLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
36J	:	MVLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
LS	:	MVLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
38J	:	MVLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
11J	:	MMLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
13J	:	MMLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
MYT	:	MMLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
1M	:	MMLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
9J	:	-MLTLWHLTPNSHMKFLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTGTE	:	65	
15J	:	-MLTLWHLSPNSYIKLLSVIRHLSLIAYMLFAACPPV-RLLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	64	
10J	:	-MLTLWHLSPNSYIKLLSVIRHLSLIAYMLFAACPPV-RLLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	64	
27C	:	-MLTLWHLSPNSYIKLLSVIRHLSLIAYMLFAACPPV-RLLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	64	
39J	:	-MLTLWHLSPNSYIKLLSVIRHLSLIAYMLFAACPPV-RLLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	64	
29C	:	-MLTLWHLSPNSYIKLLSVIRHLSLIAYMLFAACPPV-RLLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	64	
4J	:	-MLTLWHLTPILNSHMKLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	65	
51C	:	-MLTLWHLTPILNSHMKLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	65	
25J	:	MMPWTSYHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	66	
63J	:	MMLRRLHHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLFAACPPV-RLLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTGTE	:	66	
14J	:	MVLTLWHLSPNSHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	65	
3J	:	MVLTLWHPVSNHINLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTQ	:	65	
16	:	-MLTSHCWATRCNKLLSVIRHLSLIAYMLLTICPLAVHVLELEDYDRRCRCNNQILLNTLPVGTGTE	:	64	
		tw1hh ns LsVr 6 l aY6L Cp 6LELEDYD4RCRCNNQILLNTLP6GT2			
		MYR		CK2	
		*	80	*	100
				*	120
To	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
18M	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
2J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
20M	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
8J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
36J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
LS	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
28J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
11J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
13J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
MYT	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
1M	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
9J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	131	
15J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	130	
10J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	130	
27C	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	130	
39J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	130	
29J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	130	
4J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	131	
51C	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	131	
25J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
63J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	132	
14J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	131	
3J	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	131	
16	:	LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA	:	130	
		LLKPIAASESCNRQEVLA ILKDKGKTKCLNPNAQAVRRHINRLFRL ILDEEQRIYDVVSTNIEFGA			
		140		160	
To	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
18M	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
2J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
20M	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
8J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
36J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
LS	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
38J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
11J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
13J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
MYT	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
1M	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
9J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	159	
15J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	158	
10J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	158	
27C	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	158	
39J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	158	
29C	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	158	
4J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	159	
51C	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	159	
25J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
63J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	160	
14J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	159	
3J	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	159	
16	:	WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ	:	158	
		WPVPTAYKAFWLKWKAKKLNHYHFRRLRWZ			

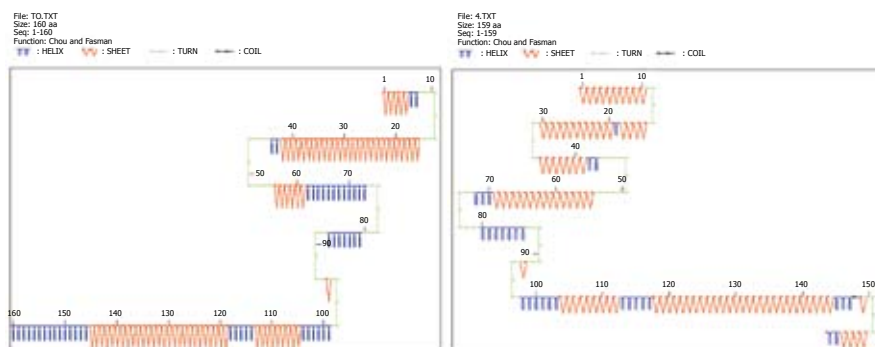


图 4 预测UL147蛋白二级结构.

■同行评价

本文研究HCMV UL147序列在临床患儿低传代分离株中的多态性, 探讨其与病毒临床致病性的关系, 对HCMV感染引起新生儿疾病和先天畸形的病因和机制的研究和临床分析具有重要的指导意义。

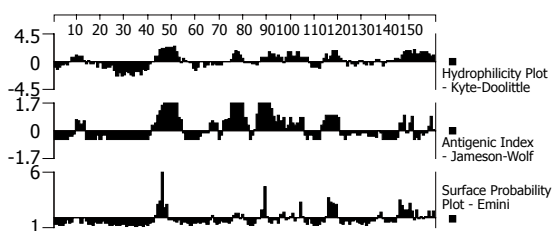


图 5 UL147 Toledo株编码蛋白的亲水性及抗原性分析.

- ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 1996; 70: 78-83
- 3 何蓉, 刘兰青, 吕绳敏, 阮强. 荧光定量PCR方法检测婴儿尿液中人类巨细胞病毒基因的含量. *中华儿科杂志* 2001; 12: 739-742
- 4 Penfold ME, Dairaghi DJ, Duke GM, Saederup N, Mocarski ES, Kemble GW, Schall TJ. Cytomegalovirus encodes a potent alpha

chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9839-9844

- 5 Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000; 21: 418-420
- 6 Clark-Lewis I, Dewald B, Loetscher M, Moser B, Baggiolini M. Structural requirements for interleukin-8 function identified by design of analogs and CXC chemokine hybrids. *J Biol Chem* 1994; 269: 16075-16081
- 7 Penfold ME, Dairaghi DJ, Duke GM, Saederup N, Mocarski ES, Kemble GW, Schall TJ. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9839-9844
- 8 Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705
- 9 Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 2000; 72: 391-398

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 •

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. (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-08-28)